



Institut für Biotechnologie

**Intrazelluläre Flußquantifizierung unter
instationären Wachstumsbedingungen
und Mischsubstratverwertung in
*Corynebacterium glutamicum***

André Drysch

**Intrazelluläre Flußquantifizierung unter
instationären Wachstumsbedingungen
und Mischsubstratverwertung in
*Corynebacterium glutamicum***

André Drysch

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4103

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4103

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Quantification of intracellular fluxes under instationary growth conditions and utilization of substrate mixtures in *Corynebacterium glutamicum*.

Corynebacterium glutamicum is intensively used for industrial large-scale (fed-) batch production of lysine. However, metabolic flux analyses based on ^{13}C -labeling experiments of *C. glutamicum* have hitherto been restricted to small-scale batch conditions and stationary carbon-limited chemostat cultures and are therefore of questionable relevance for industrial fermentations. To lever flux analysis to the industrial level, a novel sensor reactor approach was combined with nuclear magnetic resonance (NMR) analysis, metabolite balancing methods and the mathematical description of ^{13}C -isotope labeling to obtain a series of intracellular carbon flux maps documenting the changes of intracellular flux distributions during (fed-) batch fermentation processes. Experimental ^{13}C labeling patterns of proteino-genic amino acids and cytoplasmic metabolites were used to yield the intracellular metabolic fluxes.

The flux analysis showed that the *in vivo* reverse C_4 -decarboxylation flux at the anaplerotic node significantly decreased (70%) in parallel with threefold increased lysine formation during three investigated phases of exponential growth in batch fermentation. In a lysine production phase during a fed-batch fermentation, in which no biomass synthesis was observed, the reverse C_4 -decarboxylation flux was almost completely suppressed. These results indicate that the reverse flux is counteractive to the production of lysine, because the activity of this flux has an influence on the intracellular concentration of the lysine precursor oxaloacetate.

To date, little information is available on the significance of the phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase, the most important enzyme of the reverse C_4 -decarboxylation flux. Therefore, a PEP carboxykinase (*pck*)-deficient strain of *C. glutamicum* was constructed and tested on different carbon sources and substrate mixtures in comparison to the wildtype strain. The growth behaviour and the substrate consumption showed that the elimination of the PEP carboxykinase activity has no effect on the utilization of different sugars as sole carbon source. In contrast, additional supplementation of acetate or lactate to a culture medium with glucose, sucrose or fructose lead to a decreased growth of the *pck* mutant. These results show that acetate and lactate inhibit the PEP-dependent phosphotransferase system (PTS), which is responsible for the uptake of several sugars in *C. glutamicum*.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	7
1. Chemikalien	7
2. Bakterienstämme und Plasmide	8
3. Nährmedien	8
4. Kulturbedingungen	10
4.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> im Schüttelkolben	10
4.2 Batch-Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> im Laborfermenter und ^{13}C -Markierung	10
4.3 Batch- und Fedbatch-Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> im Sensorreaktorsystem und ^{13}C -Markierung	11
5. Herstellung von Proteinhydrolysaten und Isolierung von Aminosäuren und Metaboliten	15
5.1 Extraktion proteinogener und cytoplasmatischer Aminosäuren sowie weiterer Metabolite für die 2D-NMR-Analyse	15
5.1.1 Isolierung proteinogener Aminosäuren	15
5.1.2 Isolierung cytoplasmatischer Metabolite	15
5.2 Herstellung von Zellextrakten zur Bestimmung der intrazellulären Glutamat-Konzentration	17
6. Analytische Methoden	17
6.1 Bestimmung der optischen Dichte und der Biomassekonzentration	17
6.2 Bestimmung des Kohlenstoffgehalts der Biomasse	18
6.3 Enzymatische Quantifizierung von Substraten in Kulturüberständen	18
6.4 NMR-spektroskopische Methoden	18
6.4.1 Vermessung von Kulturüberständen mittels der ^1H -NMR-Spektroskopie	18
6.4.2 Bestimmung der ^{13}C -Isotopomerverteilungen in Aminosäuren und Metaboliten mittels der $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ HSQC 2D-NMR-Spektroskopie	19
6.5 Bestimmung der intrazellulären Glutamat-Konzentration mittels HPLC-Analyse	19
7. Methoden zur Kohlenstoffflußanalyse	20
8. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxykinase	25
9. Molekulargenetische Methoden	26
9.1 DNA-Isolierung	26
9.2 Restriktion und Analyse von DNA	27
9.3 Polymerase-Kettenreaktion	27
9.4 Transformationstechniken	28
III. Ergebnisse	29
1. Intrazelluläre Flußquantifizierung unter instationären Wachstumsbedingungen	29
1.1 Quantitative Bestimmung der Kohlenstoffflüsse in <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	29
1.1.1 Charakterisierung des Wachstums	29
1.1.2 Analyse der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus	29
1.2 Quantitative Bestimmung der Kohlenstoffflüsse im Lysin-Produzenten von <i>C. glutamicum</i> MH20-22B	35
1.2.1 Charakterisierung des Wachstums unter Leucin-limitierenden Bedingungen	35
1.2.2 Analyse der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus	38

1.2.3 Untersuchung der intrazellulären Glutamat-Konzentration und Bestimmung der NADPH-Bilanz	43
1.3 Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse von <i>C. glutamicum</i> MH20-22B bei exponentiellem Wachstum unter technischer <i>Batch</i> -Kultivierung.....	46
1.3.1 Vergleich des Wachstums und der extrazellulären Metabolitkonzentrationen im Produktions- und Sensorreaktor.....	46
1.3.2 Analyse der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus bei exponentiellem Wachstum.....	49
1.3.3 Korrektur der unvollständigen ¹³ C-Markierung der Biomasse.....	55
1.4 Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse von <i>C. glutamicum</i> MH20-22B bei maximaler Lysin-Produktion unter technischer <i>Fedbatch</i> -Kultivierung.....	56
1.4.1 Vergleich des Wachstums und der extrazellulären Metabolitkonzentrationen im Produktions- und Sensorreaktor.....	56
1.4.2 Analyse der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in der Lysin-Produktionsphase.....	59
2. Untersuchungen zur Bedeutung einer <i>pck</i>-Deletion für das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und Mischsubstraten.....	64
2.1 Konstruktion und Nachweis einer <i>pck</i> -Deletionsmutante von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032.....	65
2.2 Vergleichende Wachstumsexperimente der <i>pck</i> -Deletionsmutante mit <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	66
2.3 Vergleichende Wachstumsexperimente der <i>pck</i> -Deletionsmutante mit <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 auf verschiedenen Mischsubstraten.....	68
2.3.1 Wachstum auf einem Gemisch aus Nicht-PTS-Substraten und Acetat.....	68
2.3.2 Wachstum auf einem Gemisch aus PTS-Substraten und Acetat.....	71
2.3.3 Wachstum auf einem Gemisch aus Glucose und Lactat.....	76
IV. Diskussion.....	77
V. Zusammenfassung.....	89
VI. Literatur.....	90
VII. Anhang.....	103

Abkürzungen

AMP/ADP/ATP	Adenosin-Mono-/Di-/Triphosphat
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
CoA	Coenzym A
dd	Doublett von Doubletts
ddd	Doublett von Doubletts von Doubletts
d ₋₁ /d ₊₁	Doublett der Kopplung zur nächstniedrigeren/nächsthöheren C-Position
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
D ₂ O	Deuteriumoxid
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung (9.81 m s ⁻²)
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GDP/GTP	Guanosin-Di-/Triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HPr	hitzestabiles Protein/Histidin-Protein
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation</i>
Hz	Herz
IDP/ITP	Inosin-Di-/Triphosphat
kb	Kilobasenpaare
K _i	Inhibitionskonstante eines Enzyms bzgl. eines Metaboliten
K _m	Michaelis-Konstante eines Enzyms bzgl. eines Metaboliten
kV	Kilovolt
l	Liter
IBT1/2	Institut für Biotechnologie 1/2
M	Mol pro Liter
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NAD(P) ⁺ /NAP(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat), oxidiert/reduziert
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanz-Spektroskopie
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PC	<i>Personal computer</i>
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	potentia hydrogenii (Säurestärke)
P _i	Phosphat
<i>pck</i> /Δ <i>pck</i>	PEP-Carboxykinase-Gen/ <i>pck</i> -Deletion
ppm	<i>parts per million</i> , Teile pro Million

PTS	Phosphotransferasesystem (PT-System)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
ssp.	Subspecies
<i>t</i>	Zeit
t/a	Tonnen pro Jahr
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TG	Trockengewicht der Biomasse
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSP	Natrium-2,2,3,3-D ₄ -trimethylsilylpropionat
U	<i>Unit</i> ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{Protein}}^{-1}$)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Fluß in $\text{mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Flußvektor)
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
μ	Wachstumsrate (h^{-1})
μF	Mikrofarad
1D/2D	ein-/zweidimensional

Nukleinsäure-Basen:	A Adenin
	C Cytosin
	G Guanin
	T Thymin

I. Einleitung

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, stäbchen- bis keulenförmiges Bakterium und wurde erstmals von Kinoshita *et al.* (1957) als Glutamat-Produzent aus Bodenproben isoliert. Dieses zur Gruppe der Eubakterien gehörende Bakterium zeichnet sich besonders durch seine Biotin-Auxotrophie (Kinoshita *et al.*, 1957) und durch das Vorkommen von *meso*-Diaminopimelinsäure, Galactose, Arabinose und Mycolsäuren in der Zellwand aus (Lechevalier & Lechevalier, 1970; Schleifer & Kandler, 1972; Eggeling & Sahm, 2001). Viele Arten der Gattung *Corynebacterium* werden heute biotechnologisch bei der Herstellung von Käse (Lee *et al.*, 1985; Teuber *et al.*, 1987), bei der Steroid-Transformation (Constantinides, 1980) und bei der Produktion von Äpfelsäure (Takata *et al.*, 1979), Nukleotiden und verschiedenen Aminosäuren (Kinoshita, 1985; Liebl, 1991) verwendet. *Corynebacterium glutamicum* und seine Unterarten *flavum* und *lactofermentum* gehören zu den wichtigsten Aminosäure-produzierenden coryneformen Bakterien (Kinoshita, 1985; Liebl, 1991). So kann z.B. die Glutamat-Produktion durch Biotin-Mangel (Shiio *et al.*, 1962; Gutmann *et al.*, 1992), durch Temperaturerhöhung (Gourdon & Lindley, 1999; Lapujade *et al.*, 1999) oder in Anwesenheit von Penicillin, verschiedenen Detergenzien und Lokal-anästhetika (Lambert *et al.*, 1995) hervorgerufen werden. Durch klassische Mutagenese konnten *C. glutamicum*-Stämme erhalten werden, welche auch Lysin, Threonin, Isoleucin, Tyrosin oder Phenylalanin überproduzieren (Liebl, 1991; Leuchtenberger, 1996). Diese essentiellen Aminosäuren haben neben Glutamat, das als Geschmacksverstärker in der Nahrungsmittelindustrie verwendet wird, ebenfalls eine große kommerzielle Bedeutung und finden Verwendung als Zusätze in Infusionslösungen, Futtermitteln und als Ausgangssubstanz für die Synthese von therapeutischen Medikamenten, Peptiden und Agrochemikalien (Sahm *et al.*, 1995; Leuchtenberger, 1996). Heute werden weltweit mehr als 1.000.000 t/a Glutamat und 450.000 t/a Lysin fermentativ mit *C. glutamicum* hergestellt (Sahm *et al.*, 2000; Eggeling & Sahm, 2001).

In den letzten zehn Jahren wurden die Biosynthesewege für Glutamat, für die Aminosäuren der Aspartatfamilie und für die aromatischen Aminosäuren biochemisch und genetisch intensiv in *C. glutamicum* untersucht (Eikmanns *et al.*, 1993; Eggeling, 1994; Sahm *et al.*, 1995; Jetten & Sinskey, 1995a). Durch gezielte genetische Modifikationen (*metabolic design*) wurde die Produktion dieser Aminosäuren immer weiter optimiert (Eikmanns *et al.*, 1993; Sahm *et al.*, 1995; Krämer, 1996). So konnte z.B. die Lysin-Produktion durch die Überexpression der Dihydropicolinat-Synthase erhöht werden (Cremer *et al.*, 1990; Eggeling *et al.*, 1998). Ebenfalls wurde der Lysin-Export, welcher als limitierender Faktor für die Lysin-Produktion beschrieben wurde (Bröer *et al.*, 1993; Eggeling & Sahm, 2001), durch die

Überexpression des Exportergens *lysE* gesteigert (Vrljic *et al.*, 1996; Eggeling & Sahm, 2001).

Neben der Regulation des spezifischen Lysin-Biosynthesewegs spielt der Zentralstoffwechsel für die Lysin-Produktion mit *C. glutamicum* eine entscheidende Rolle, da dieser Pyruvat, Oxalacetat und Reduktionsäquivalente, wie z.B. NADPH, als Vorstufen liefert (**Abbildung 1**). Als wichtigste limitierende Vorstufe für die Lysin-Synthese gilt das Oxalacetat (Menkel *et al.*, 1989; Schrumpf, 1991), das durch Transaminierung in Aspartat umgewandelt wird. Besonders während des Wachstums und der Aminosäuresynthese benötigt der Citrat-Zyklus eine kontinuierliche und effektive Regenerierung von Oxalacetat, um die Intermediate, die für andere Biosynthesen abgezogen werden, wieder aufzufüllen. Diese Funktion übernehmen sogenannte anaplerotische (griech.: auffüllende) Enzyme.

Diese anaplerotischen Reaktionen in *C. glutamicum* sind ein komplexes Netzwerk und bestehen aus fünf verschiedenen Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen (**Abbildung 1**). Die anaplerotischen Carboxylierungsreaktionen werden von den zwei Enzymen PEP-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase katalysiert (Eikmanns *et al.*, 1989; Peters-Wendisch *et al.*, 1993, 1996 und 1997). Dabei werden die C₃-Metabolite Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat direkt zu Oxalacetat umgesetzt. Die PEP-Carboxylase galt lange, bis zum Nachweis der Pyruvat-Carboxylase in permeabilisierten Zellen (Peters-Wendisch *et al.*, 1996), als das einzige anaplerotische Enzym in *C. glutamicum*. Eine Überexpression des PEP-Carboxylase-Gens in einem Lysin-Produktionsstamm führte zu einer 10 bis 20%igen Erhöhung der Lysin-Ausbeute (Cremer *et al.*, 1991), wohingegen ein Verlust der PEP-Carboxylase-Aktivität keinen Effekt auf die Lysin-Produktion zeigte (Peters-Wendisch *et al.*, 1993; Gubler *et al.*, 1994). Eine größere Bedeutung für die Lysin-Synthese kommt hingegen der Pyruvat-Carboxylase zu. Hierbei wurde einerseits durch die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens eine Erhöhung der Lysin-Produktion um 50 %, andererseits durch den Verlust der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität eine Erniedrigung der Lysin-Synthese um 60 % beobachtet (Peters-Wendisch *et al.*, 2001). Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ist für die katalytische Aktivität auf Biotin als Cofaktor angewiesen (Peters-Wendisch, 1996).

Neben den beiden anaplerotischen Carboxylierungen erfolgen in *C. glutamicum* auch drei Decarboxylierungsreaktionen oder Rückreaktionen (**Abbildung 1**), bei denen die C₄-Körper Malat und Oxalacetat durch die PEP-Carboxykinase, die Oxalacetat-Decarboxylase und das Malat-Enzym wieder zu PEP oder Pyruvat umgewandelt werden (Jetten & Sinskey, 1993, 1995b; Cocaïgn-Bousquet *et al.*, 1996; Gourdon *et al.*, 2000).

Über die physiologische Bedeutung der PEP-Carboxykinase und deren Regulation *in vivo* gibt es bislang nur wenige Informationen. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Oxalacetat zu PEP und ist GTP/ITP-abhängig.

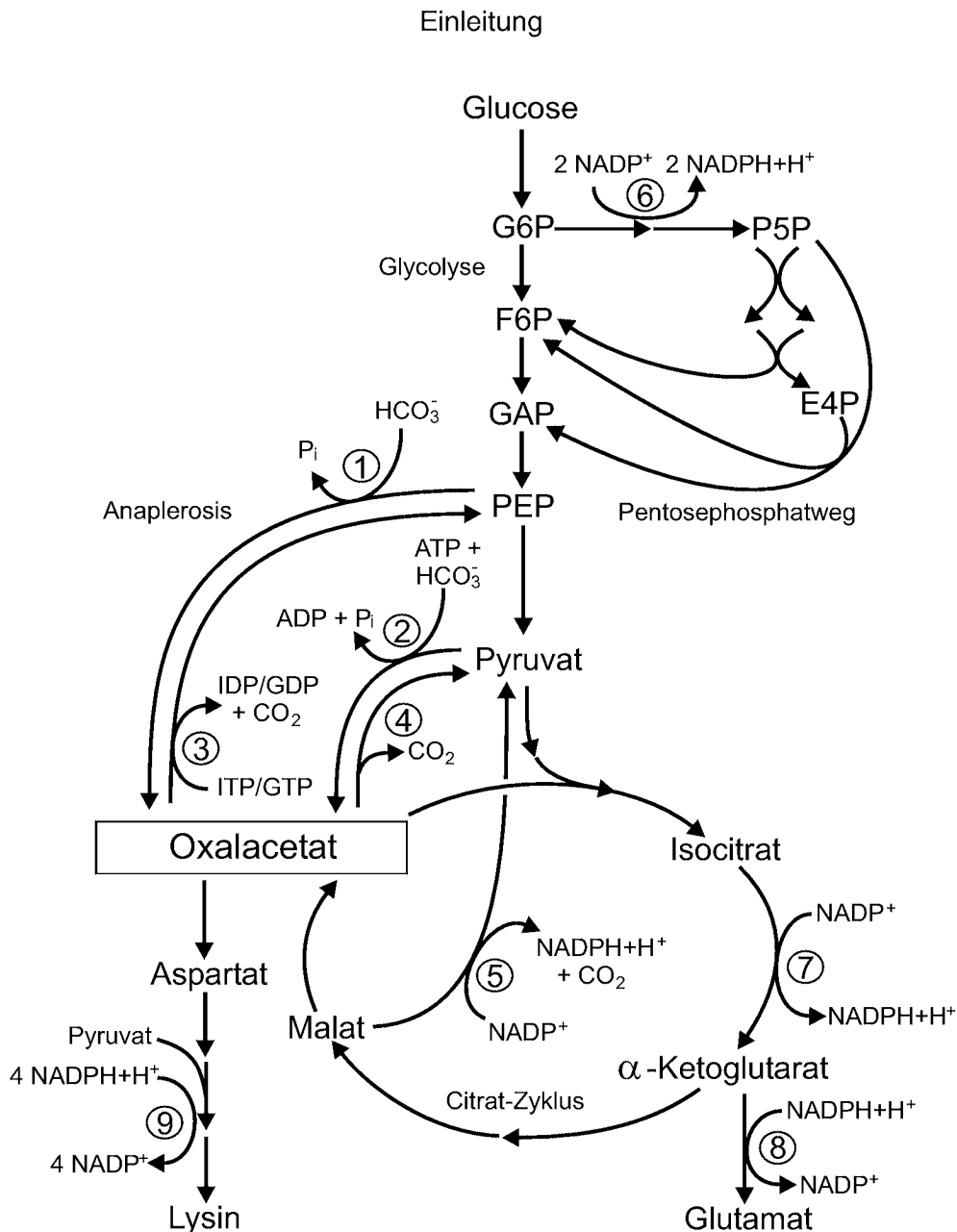


Abbildung 1: Anaplerotische Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen sowie NADPH produzierende und verbrauchende Prozesse in *C. glutamicum*. Carboxylierende (Oxalacetat-synthetisierende) Enzyme: 1, PEP-Carboxylase; 2, Pyruvat-Carboxylase. Decarboxylierende Enzyme: 3, PEP-Carboxykinase; 4, Oxalacetat-Decarboxylase; 5, Malat-Enzym. NADPH bildende Enzyme: 5, Malat-Enzym; 6, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Decarboxylase; 7, Isocitrat-Dehydrogenase. NADPH verbrauchende Reaktionen bei der Lysin- bzw. Glutamat-Produktion: 8, Glutamat-Dehydrogenase; 9, Lysin-Syntheseweg. Abkürzungen: G6P, Glucose-6-Phosphat; P5P, Pentose-5-Phosphat; E4P, Erythrose-4-Phosphat; F6P, Fructose-6-Phosphat; GAP Glyceraldehyd-3-Phosphat; PEP, Phosphoenolpyruvat.

In bezug auf die Lysin-Produktion führte eine Deletion der PEP-Carboxykinase in einem Lysin-Produktionsstamm zu einer ca. 20 bis 60%igen Erhöhung, eine PEP-Carboxykinase-Überexpression hingegen zu einer ca. 20%igen Erniedrigung der Lysin-Ausbeute (Riedel *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001). Weiterhin konnte kürzlich anhand einer PEP-Carboxykinase-Deletion im Wildstamm von *C. glutamicum* gezeigt werden, daß dieses Enzym eine

essentielle gluconeogenetische Funktion besitzt, da kein Wachstum auf Acetat und Lactat als einzige Kohlenstoffquelle möglich war (Riedel *et al.*, 2001). Auch wurde kürzlich anhand von *DNA-Microarray*-Analysen eine Erhöhung der Expression des PEP-Carboxykinase-Gens (*pck*) in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Acetat und einem Gemisch aus Glucose und Acetat festgestellt (Gerstmeir *et al.*, 2003), was die große Bedeutung dieses Enzyms für den Acetat-Stoffwechsel verdeutlicht. Eine weitere wichtige Funktion der PEP-Carboxykinase im Stoffwechsel von *C. glutamicum* wurde von Petersen (2001) diskutiert. Diese kann darin bestehen, aus einer Situation der Limitierung heraus, möglichst schnell auf die plötzliche Verfügbarkeit eines Substrats zu reagieren, dessen Aufnahme von einem PEP-gekoppelten Phosphotransferasesystem (PTS) abhängig ist. Dabei könnte PEP aus Pyruvat in einem Substratzyklus über die Pyruvat-Carboxylase und die PEP-Carboxykinase sofort regeneriert und für das PTS bereitgestellt werden (Petersen, 2001).

Die physiologische Bedeutung der Oxalacetat-Decarboxylase für *C. glutamicum* ist noch wenig untersucht. Die Funktion dieses Enzyms besteht möglicherweise in der Generierung von Pyruvat aus Oxalacetat bei Wachstum auf Acetat und C₄-Substraten (Vallino, 1991; Jetten & Sinskey, 1995b).

Das Malat-Enzym ist strikt NADP⁺-abhängig und katalysiert die Umwandlung von Malat zu Pyruvat (Peters-Wendisch, 1996; Gourdon *et al.*, 2000). Dieses Enzym ist für die NADPH-Regenerierung von Bedeutung, wenn z.B. der Fluß durch den oxidativen Pentosephosphatweg nicht ausreicht, um den Bedarf an NADPH zu decken. Dies ist der Fall bei Wachstum auf Fructose und Lactat, da diese Substrate nur zu einem geringen Teil über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt werden (Cocaign-Bousquet & Lindley, 1995; Dominguez *et al.*, 1998; Gourdon *et al.*, 2000). Bei Wachstum auf Glucose scheint das Malat-Enzym für die NADPH-Regenerierung jedoch unbedeutend zu sein (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996).

Wertvolle Informationen über die Verläufe der einzelnen Reaktionswege des Zentralmetabolismus von *C. glutamicum* konnten in den letzten Jahren mit Hilfe der metabolischen ¹³C-Stoffflußanalyse (SFA) gewonnen werden, welche heute eine weit verbreitete und anerkannte Technik zur quantitativen Untersuchung des intrazellulären Stoffwechsels ist (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Während der klassische SFA-Ansatz allein auf der Ausnutzung stöchiometrischer Bilanzgleichungen in Verbindung mit extrazellulären Stoffflüssen zur Substrataufnahme und Produktabgabe beruhte (Vallino & Stephanopoulos, 1990, 1993), rückte in der Folgezeit die Verknüpfung von ¹³C-Markierungsmethoden und erweiterter Metabolitbilanzierungsmodellen immer mehr in den Mittelpunkt (Zupke & Stephanopoulos, 1994; Wiechert & de Graaf, 1996, 1997; Wiechert *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1996, 1997). Damit gelang es parallele Stoffwechselwege, Zyklen, bidirektionale Flüsse und metabolische Engstellen (*bottlenecks*) im Stoffwechselnetzwerk sowohl zu identifizieren als auch zu

quantifizieren. Somit konnten bis heute komplexe Stoffwechselnetzwerke in zahlreichen Mikroorganismen genau bestimmt werden, wie in *Z. mobilis* (de Graaf, 2000c), *A. niger* (Schmidt *et al.*, 1999a; Pedersen *et al.*, 2000), *P. chrysogenum* (Christensen *et al.*, 2000; Christensen & Nielsen, 2000), *E. coli* (Schmidt *et al.*, 1999b; Flores *et al.*, 2001; Emmerling *et al.*, 2002), *B. subtilis* (Sauer *et al.*, 1996, 1997; Dauner *et al.*, 2001), *S. cerevisiae* (Gombert *et al.*, 2001) und *C. glutamicum* (Sonntag *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1996, 1997 und 1999; Wendisch *et al.*, 2000; de Graaf, 2000b; Petersen *et al.*, 2000, 2001; Wittmann & Heinzle, 2001; Wittmann & Heinzle, 2002).

Mit Hilfe dieser Stoffflußanalysen konnte z.B. anhand verschiedener *C. glutamicum*-Stämme eine Erhöhung der NADPH-regenerierenden Pentosephosphatweg-Aktivität bei steigender Lysin-Produktion beobachtet werden (Sonntag *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1996, 1997 und 1999; Wittmann & Heinzle, 2002), was mit einem erhöhtem Bedarf an NADPH für die Lysin-Synthese zusammenhängt (**Abbildung 1**). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß in *C. glutamicum* während des Wachstums auf Glucose stets die carboxylierenden und decarboxylierenden Reaktionen innerhalb der Anaplerosis gleichzeitig aktiv sind (Sonntag *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1997) und ein enger Zusammenhang zwischen der Lysin-Produktion und der Aktivität der Anaplerosis besteht. Dabei korrelierte ein geringer Decarboxylierungsfluß mit einer erhöhten Lysin-Synthese und umgekehrt (Marx *et al.*, 1996, 1997 und 1999). Mit der Weiterentwicklung der ¹³C-Markierungstechnik, der sogenannten ¹³C-Isotopomerenanalyse mittels der 2D-NMR-Spektroskopie (Szypersky, 1995; Wiechert & de Graaf, 1996) und der isotopomeren Metabolitbilanzierung (Wiechert *et al.*, 1999; Möllney *et al.*, 1999), wurden schließlich den carboxylierenden und decarboxylierenden Reaktionen der Anaplerosis die individuellen Enzymaktivitäten zugeordnet (Petersen *et al.*, 2000, 2001). Dabei zeigte sich, daß sowohl im Wildstamm als auch in einem Lysin-Produktionsstamm von *C. glutamicum* beide Carboxylasen aktiv sind, wobei die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase bedeutender war. Der decarboxylierende Rückfluß erfolgte hingegen fast ausschließlich über die PEP-Carboxykinase.

Die Bestimmung der Stoffflüsse in *C. glutamicum* erfolgte bislang in kontinuierlicher Kultur, wie z.B. im Chemostaten unter stationären Bedingungen (Marx *et al.*, 1996, 1997 und 1999; Petersen *et al.*, 2000, 2001), oder unter einfachen quasi-stationären Bedingungen, wie z.B. bei exponentiellem Wachstum (Sonntag *et al.*, 1995; Wendisch *et al.*, 2000). Bisher wurde jedoch noch nicht eingehend untersucht, wie sich intrazelluläre Stoffflüsse unter instationären Bedingungen, z.B. in *Batch*- und *Fedbatch*-Fermentationen mit verschiedenen Wachstums- und Produktionsphasen, verhalten. Darüber hinaus erfolgen industrielle Fermentationsprozesse zur Gewinnung von Aminosäuren und anderen Stoffwechselprodukten hauptsächlich unter diesen instationären Bedingungen (Eggeling & Sahm, 1999; Sahm *et al.*, 2000), d.h. die gewonnenen Stoffflußdaten aus stationären Kulturbedingungen lassen keine

Rückschlüsse auf den Stoffwechselzustand der Zellen bei *Batch*- oder *Fedbatch*-Fermentationen zu. Da gewöhnlich die Gewinnung der ^{13}C -Markierungsinformation für die Flußanalysen mittels Aminosäuren aus Proteinhydrolysaten der Biomasse erfolgt, muß sich der Stoffwechsel in einem Fließgleichgewicht oder stationärem Zustand befinden, da die Zeitspanne bis zur vollständigen Äquilibration der ^{13}C -Markierung in der Biomasse (z.B. Proteine) wesentlich länger dauert als in den cytoplasmatischen Metaboliten (Wiechert, 2001). Daher ist es ratsam, die ^{13}C -markierten Metabolite des Cytoplasmas für die Flußanalysen unter instationären Bedingungen zu nutzen, um zum einen die Markierungszeit zu verkürzen und zum anderen ^{13}C -Markierungen bei stagnierendem Wachstum, z.B. in Produktionsphasen, zu erhalten (Sahm *et al.*, 2000; Wiechert, 2001). Weiterhin ließen sich bisher Markierungsexperimente aufgrund der hohen Kosten der ^{13}C -markierten Substrate (z.B. $^{13}\text{C}_6$ Glucose ca. 250 €/g) nur im Labormaßstab (z.B. 0.5 bis 10 l) durchführen. Daher stellt die Erweiterung der Flußanalyse auf instationäre Fermentationsprozesse eine große Herausforderung dar, wobei besonders die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse unter industriellen *Batch*- und *Fedbatch*-Bedingungen von großem Interesse ist.

Da bereits die intrazellulären Stoffflüsse während der Lysin-Bildung unter stationären Kulturbedingungen eingehend untersucht wurden, war nun die Bestimmung der Stoffflußverteilung in *C. glutamicum* unter instationären Kulturbedingungen das Ziel dieser Arbeit. Dabei sollten erstmalig mittels der 2D-NMR-Spektroskopie ^{13}C -Markierungsinformationen aus cytoplasmatischen Metaboliten gewonnen und für die Bestimmung der Stoffflüsse bei verschiedenen Wachstums- und Produktionsphasen herangezogen werden. Zudem sollte es ermöglicht werden, mit Hilfe einer neuen Fermentationstechnik (Sensorreaktortechnik), mehrfach aufeinander folgende und kostengünstige Markierungsexperimente im technischen Fermentermaßstab durchzuführen, um über einen gesamten Fermentationsverlauf die Änderungen im Zentralmetabolismus unter Lysin-Produktionsbedingungen dokumentieren zu können. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war neue Erkenntnisse zur Bedeutung der PEP-Carboxykinase für den Zentralstoffwechsel zu erhalten. Bisher wurde die Funktion der PEP-Carboxykinase bei Wachstum auf verschiedenen Zuckern, wie z.B. PTS- bzw. Nicht-PTS-Substraten als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch mit gluconeogenetischen Substraten, nicht genauer untersucht. Aus diesem Grund wurden der Wildstamm von *C. glutamicum* und ein PEP-Carboxykinase-defizienter Stamm auf verschiedenen Kohlenstoffquellen bzw. Mischsubstraten kultiviert und das Wachstum und der Substratverbrauch ausführlich verglichen und charakterisiert.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien

Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und die jeweilige Bezugsquelle aufgelistet. Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen) und Merck AG (Darmstadt) bezogen.

Aldrich Chemicals, Milwaukee, USA:

Natrium-2,2,3,3-D₄-trimethylsilylpropionat

Boehringer, Mannheim:

Dithiothreitol, Kanamycinsulfat, Malat-Dehydrogenase, NADH

Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA:

[¹³C₆]Glucose (99% isotopische Anreicherung), [1-¹³C]Glucose (> 98% isotopische Anreicherung)

Deutero, Kastellaun:

Deuteriumoxid (99.98%)

Difco Laboratories, Detroit, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Peptone, Bacto-Tryptone, Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium, Hefe-Extrakt

Fischer Scientific, Loughborough, UK:

Methanol

Fluka, Buchs, Schweiz:

Polypropylenglycol P1200

Serva Feinbiochemica, Heidelberg:

Agarose, Natriumdodecylsulfat

2. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien-Stämme und Plasmide sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tabelle 1: Bakterien-Stämme und ihre genetischen Marker sowie Plasmide mit ihren Eigenschaften.

Stämme/Plasmide	Eigenschaften	Referenz
Stämme:		
<i>E.coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>endA1</i> , <i>lacZα</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1985
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC ^a 13032	Wildtyp (WT)	Abe <i>et al.</i> , 1967
13032 Δpck	<i>pck</i> -Deletionsmutante (Δpck) ^b	Riedel <i>et al.</i> , 2001
MH20-22B	Lysin-Produzent, <i>lysC_{FBR}</i> , <i>leuCD</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1992
Plasmide:		
pK19mobsacB	Km ^R , <i>sacB</i> , <i>oriT</i> , <i>oriV</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994b
pK19mopsacB- Δpck	Km ^R , <i>sacB</i> , <i>oriT</i> , <i>oriV</i> , mit 690 kb- Deletionsfragment des <i>pck</i> -Gens	Riedel <i>et al.</i> , 2001

^a American Type Culture Collection (ATCC); ^b In dieser Arbeit neu konstruiert.

3. Nährmedien

Komplexmedien. Für die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* auf Komplexmedium wurde das Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet mit 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl. Die Kultivierung von *C. glutamicum* 13032 Δpck erfolgte in LB-Medium mit zusätzlich 2 g/l Glucose. Für Vorkulturen von *C. glutamicum* wurde das CgIII-Medium (Kase & Katajama, 1972) mit 10 g/l Bacto-Pepton, 10 g/l Hefeextrakt und 2.5 g/l NaCl (pH 7.0 mit NaOH) bzw. BHI-Medium mit 37 g/l BHI verwendet.

Spezialmedien für die Transformation von Plasmid-DNA. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte auf SOB-Medium (Hanahan, 1985) mit 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 0.19 g/l KCl und 5 ml 2 M $\text{MgCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (pH 7.0 mit NaOH).

Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen erfolgte auf Epo-Medium (Schäfer *et al.*, 1994a) mit 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 4 g/l Isonicotinsäurehydrazid, 25 g/l Glycin und 1 ml/l Tween 80. Für Transformationen von *C. glutamicum* wurden die Medien BHIS (Liebl *et al.*, 1989) mit 37 g/l BHI, 91 g/l Sorbitol und LBHIS (van der Rest *et al.*, 1999) mit 5 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l NaCl, 2.5 g/l Hefeextrakt, 18.5 g/l BHI und 91 g/l Sorbitol verwendet.

Minimalmedien. Für Wachstumsversuche mit *C. glutamicum* im Schüttelkolben wurde das CgXII-Minimalmedium (Keilhauer *et al.*, 1993) verwendet mit 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/l Harnstoff, 1 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l K_2HPO_4 , 0.25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l CaCl_2 , 10 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg/l CuSO_4 , 0.02 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg/l Biotin, 30 mg/l Protocatechuat und 42 g/l MOPS (pH 7.0 mit NaOH).

Für *Batch*-Kultivierungen im Laborfermenter wurde das CgXII-Minimalmedium nach Keilhauer *et al.* (1993) in modifizierter Form verwendet mit 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l K_2HPO_4 , 0.25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l CaCl_2 , 10 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg/l CuSO_4 , 0.02 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 mg/l Biotin, 30 mg/l Protocatechuat, 1.2 g/l HCl, 0.2 g/l Polypropylenglycol P1200 und 75 mg/l Titriplex II.

Medienzusätze und Stammhaltung. Bei den Minimalmedien wurden die Kohlenstoffquelle, Biotin und Protocatechuat nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben. Zur Herstellung von festen Nährböden wurden den jeweiligen Medien 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Die Selektion und Haltung von *E. coli*-Transformanten erfolgte auf 50 µg/ml Kanamycin. Bei *C. glutamicum*-Transformanten (Plasmid-Integranen) wurden zur Selektion 15 µg/ml und für die Haltung 50 µg/ml Kanamycin verwendet.

Für die Stammhaltung wurden die verwendeten Stämme alle 2 bis 4 Wochen auf neue LB-Platten überimpft und bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt, wobei 2 ml einer LB-Kultur zentrifugiert (5 min, 13200 x g, RT), in 1 ml 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -70°C gelagert wurden.

4. Kulturbedingungen

4.1 Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* im Schüttelkolben

E. coli wurde ausschließlich auf LB-Komplexmedium kultiviert. Für Plasmidisolierungen wurden 3 ml Komplexmedium in einem Reagenzglas bzw. 50 ml Komplexmedium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit jeweils einer Einzelkolonie versetzt und für 16 h bei 37°C und 170 bzw. 120 Upm inkubiert.

Die Vorkultur von *C. glutamicum* zur Bestimmung des Wachstums erfolgte in je 50 ml CgIII-Komplexmedium in einem 500 ml-Schikanenkolben für 12 h bei einer Temperatur von 30°C (120 Upm). Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4500 x g, 4°C), einmal mit einer sterilen 0.9%igen (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und in CgXII-Minimalmedium aufgenommen. Die Hauptkultivierung erfolgte in 60 ml CGXII-Medium mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle in einem 500 ml-Schikanenkolben bei 30°C und 130 Upm.

4.2 Batch-Kultivierung von *C. glutamicum* im Laborfermenter und ¹³C-Markierung

Die Anzucht der Zellen erfolgte in je viermal 80 ml BHI-Komplexmedium in 500 ml-Schikanenkolben für 12 h bei einer Temperatur von 30°C (120 Upm). Zur Gewinnung des Inoculums für die Hauptkultur wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4500 x g, 4°C), einmal mit einer sterilen 0.9%igen (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und in derselben Lösung aufgenommen. Die *in vivo* Stoffflußanalysen erfolgten mit *C. glutamicum*-Zellen, die in Batch-Fermentationen in einem KFL 2000-Bioreaktor-System (Bioengineering, Wald, Schweiz) mit einem Totalvolumen von 2 l gezüchtet wurden. Das verwendete Minimalmedium basierte auf der Zusammensetzung nach Keilhauer *et al.* (1993) in modifizierter Form (s.o.). Der pH-Wert des Kulturmediums wurde durch automatische Dosierung einer 2-molaren NaOH-Lösung auf 7.0 während der gesamten Fermentation konstant gehalten. Die Kultivierungstemperatur betrug bei allen Fermentationen 30°C. Die Belüftung erfolgte mit synthetischer Luft (80 % N₂ und 20 % O₂) und einer konstanten Luft-Zustromrate von 48 l/h, bezogen auf Normbedingungen (0°C und 1 bar). Die verwendete Rührerdrehzahl von 800 Upm gewährleistete bei allen Fermentationen einen Sauerstoffpartialdruck von mindestens 70 % der Luftsättigung im Medium, welcher deutlich über dem limitierenden Wert von 20 % (Tesch, 1998) lag. Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) wurde mit einer amperometrischen Elektrode (Mettler-Toledo, Steinbach) bestimmt. Die Konzentrationen von ¹²CO₂ und ¹³CO₂ in der Abluft des Bioreaktors wurden mit Hilfe einer COI-Abgasanalytik (Fischer Analysen, Leipzig) getrennt erfaßt und mit einem PC unter dem Betriebssystem WINDOWS (Microsoft, Redmond, WA, USA) aufgezeichnet.

Zu Beginn der Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden 1200 ml Kulturmedium mit einer Start-OD₆₀₀ von 1.5 angeimpft und mit 7.5 g/l Glucose supplementiert, wobei die verwendete Glucose zu 30 % (w/w) aus vollmarkierter [¹³C₆]Glucose bestand. Nach 5 h bei exponentiellem Wachstum wurden zur Gewinnung der cytoplasmatischen Metabolite 0.5 g Biotrockenmasse bei einer OD₆₀₀ von 8 entnommen und für die anschließende 2D-NMR-Analyse aufgearbeitet.

Die Kultivierung des Leucin-auxotrophen Lysin-Produktionsstammes *C. glutamicum* MH20-22B erfolgte in 900 ml Kulturmedium, wobei vor Beginn der Fermentation das Medium mit 30 g/l Glucose, welche zu 30 % (w/w) aus vollmarkierter [¹³C₆]Glucose und zu 20 % (w/w) aus [1-¹³C]Glucose bestand, supplementiert wurde. Das Minimalmedium enthielt nur 150 mg/l Leucin, was dazu führte, daß die vorgelegte Glucose nach der exponentiellen Wachstumsphase bei einsetzender Leucin-Limitierung noch nicht vollständig verbraucht war. Obwohl noch ausreichend Glucose im Medium vorhanden war, bewirkte diese Leucin-Limitierung eine starke Abnahme des Zellwachstums und eine deutliche Zunahme der Lysin-Bildung (Lysin-Produktionsphase). Das Minimalmedium wurde mit einer hohen Start-OD₆₀₀ von 3.5 angeimpft, so daß bereits nach ca. 6 h die Lysin-Produktionsphase erreicht wurde. Zur Gewinnung der cytoplasmatischen Metabolite für die anschließende 2D-NMR-Analyse wurden in der exponentiellen Phase nach 4 h (OD₆₀₀ von 10) und in der Lysin-Produktionsphase nach 12.5 h (OD₆₀₀ von 32) jeweils 1 g Biotrockenmasse entnommen und aufgearbeitet. Die Entnahme der Biotrockenmasse aus der exponentiellen Phase und der Lysin-Produktionsphase erfolgte nicht während einer einzigen Fermentation, sondern es wurden dafür jeweils zwei Fermentationen durchgeführt.

4.3 Batch- und Fedbatch-Kultivierung von *C. glutamicum* im Sensorreaktorsystem und ¹³C-Markierung

Die Entwicklung des Sensorreaktorsystems und die mit diesem System durchgeführten *Batch- und Fedbatch*-Fermentationen wurden von Kooperationspartnern aus dem Institut für Biotechnologie 2 (R. Takors und M. El Massaoudi) durchgeführt. Daher wird in dieser Arbeit auf eine detaillierte Darstellung der technischen Grundlagen, Fermentationsparameter und Zusammensetzung der verwendeten Spezialmedien verzichtet und ausdrücklich auf weiterführende Literatur (El Massaoudi, 2003; El Massaoudi *et al.*, 2003) verwiesen. Mit diesem Sensorreaktorsystem ist es möglich, mehrmals ¹³C-Markierungsexperimente für die Flußanalyse während einer einzigen technischen Fermentation durchzuführen.

Das Prinzip dieser Reaktortechnik basiert auf einer kleinen Reaktoreinheit (Sensorreaktor, 2 l Totalvolumen), die in unmittelbarer Nähe zu einem großen Reaktor (Produktionsreaktor, 300 l Totalvolumen) installiert und an diesem gekoppelt betrieben werden kann. Dabei ist der Sensorreaktor über eine Inoculiereinheit mit dem Produktionsreaktor verbunden. In

Abbildung 2 ist die experimentelle Anordnung des Sensorreaktorsystems und der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

Während einer Fermentation im Produktionsreaktor wird zu einem frei wählbaren Zeitpunkt ein Inoculum über die Inoculiereinheit entnommen und als Arbeitsvolumen in den Sensorreaktor gefüllt. Anschließend wird zur ^{13}C -Markierung ein ^{13}C -markiertes Substrat über eine Pulsmarkierungseinheit in den Sensorreaktor eingetragen und eine Fermentation im Sensorreaktor parallel zum Produktionsreaktor durchgeführt. Zu Beginn und während der gesamten Fermentation werden die *Ist*-Werte des Produktionsprozesses im Produktionsreaktor für z.B. pH, pO_2 , Druck und Temperatur über eine Prozeßkontrolle als *Soll*-Werte dem Sensorreaktor übertragen und dort eingeregelt. Somit werden die im Produktionsreaktor vorherrschenden Fermentationsbedingungen im Sensorreaktor eingestellt. Am Ende der Markierungsphase, die zwischen 2 und 3 h liegt, werden die Zellen geerntet und für nachfolgende NMR- und Stoffflußanalysen bereitgestellt. Wie in **Abbildung 2** dargestellt ist, können die Schritte der Inoculierung, ^{13}C -Markierung, Parallelkultivierung und Ernte mehrfach nacheinander durchgeführt werden, um so unterschiedliche Produktionsphasen eines technischen Fermentationsprozesses in einer Serie von Stoffflußverteilungen abzubilden.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Fermentationen im Sensorreaktorsystem erfolgten mit dem Leucin-auxotrophen Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B.

Batch-Fermentation und ^{13}C -Markierung. Bei einer *Batch*-Fermentation werden bereits zu Beginn alle für das Wachstum benötigten Substrate im Fermenter vorgelegt. Charakteristisch für eine *Batch*-Fermentation ist, daß während der Kultivierung keine Nährstoffe zu- oder Stoffwechselprodukte abgeführt werden. Somit stellt diese Fermentation ein geschlossenes System dar.

Die *Batch*-Fermentation wurde im Produktionsreaktor (160 l Arbeitsvolumen) mit einer Start- OD_{600} von 3.8 und einer Glucosekonzentration von 130 g/l gestartet. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden drei Markierungsexperimente nach 8.5, 11 und 14 h durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1 l Kulturvolumen aus dem Produktionsreaktor in den Sensorreaktor eingetragen und beim Start der Parallelfermentation vollmarkierte [$^{13}\text{C}_6$]Glucose hinzugegeben. Bei allen drei Markierungsexperimenten wurde ein [$^{13}\text{C}_6$]-Glucose-Markierungsverhältnis zur vorgelegten Gesamtglucose von ca. 7 bis 10 % eingestellt. Die Parallelfermentationen im Sensorreaktor erfolgten jeweils für 2 bis 2.5 h und alle 30 min wurden zeitsynchron aus beiden Reaktoren Fermentationsüberstände für die ^1H -NMR-Analytik entnommen. Gegen Ende einer jeden Parallelfermentation wurde der gesamte Sensorreaktorinhalt durch schnelles Abpumpen abgeerntet und die Zellen zur Gewinnung des Biomassehydrolysats für die anschließende 2D-NMR-Analyse verwendet.

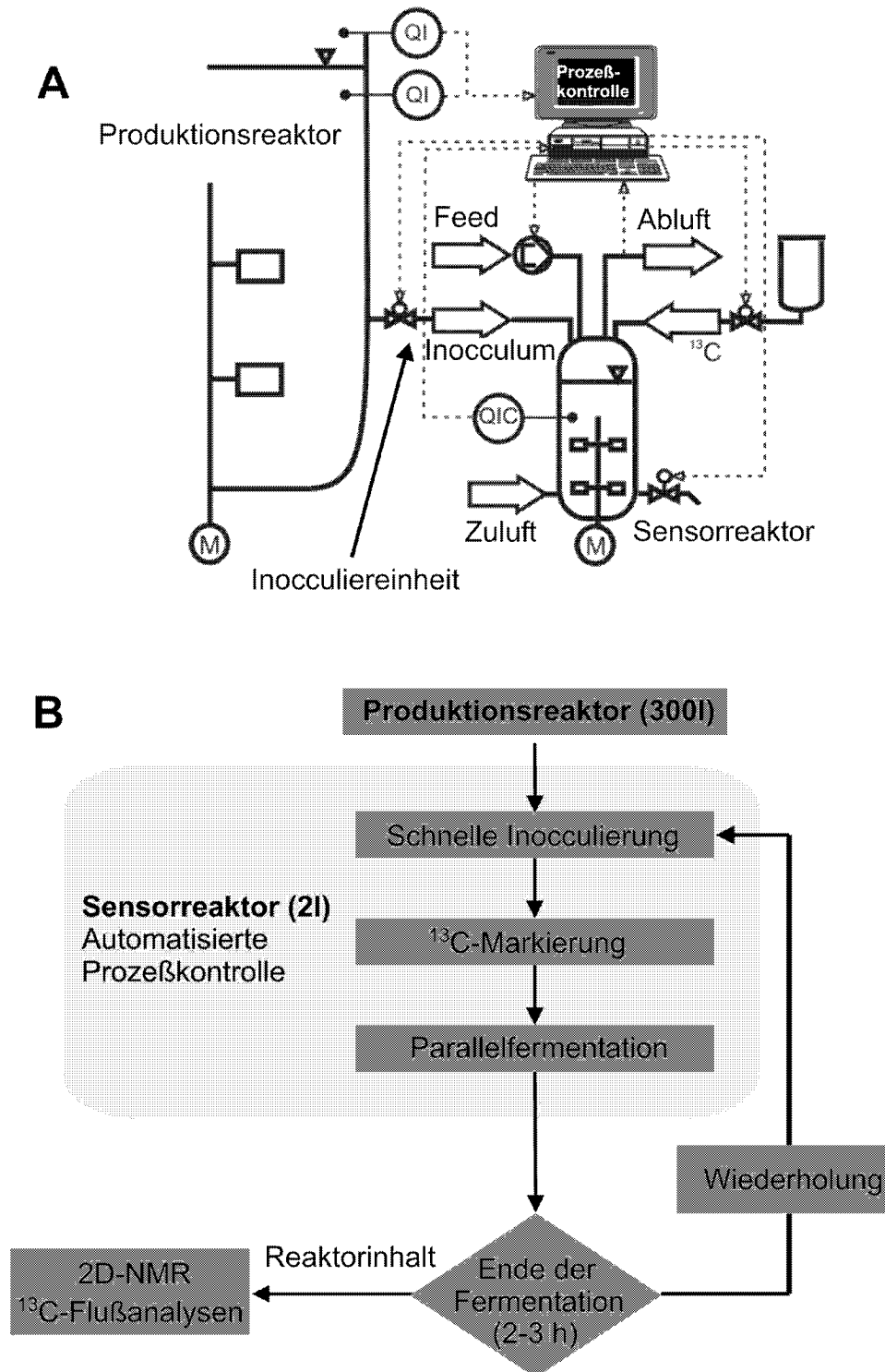


Abbildung 2: **A:** Experimentelle Anordnung des Sensorreaktorsystems zur Durchführung metabolisch instationärer Markierungsexperimente unter technischen Kulturbedingungen. Die Experimente werden in einem Sensorreaktor durchgeführt, der für den benötigten Zeitraum synchron zum Produktionsreaktor betrieben wird. Online erfassbare Meßdaten aus Flüssig- und Gasphase des Produktionsreaktors werden an die Prozeßkontrolle übergeben. Ausgewählte Prozeßgrößen des Sensorreaktors werden geregelt (El Massaoudi *et al.*, 2003). **B:** Flußschema zur Durchführung serieller ^{13}C -Markierungsexperimente im Sensorreaktor parallel zum laufenden Produktionsprozeß im Produktionsreaktor.

***Fedbatch*-Fermentation unter Leucin-Limitierung und ^{13}C -Markierung.** Mit Hilfe der Sensorreaktortechnik wurden während einer laufenden Fermentation im Zulaufverfahren (*Fedbatch*-Fermentation) zwei Markierungsexperimente durchgeführt. Charakteristisch für das Zulaufverfahren ist, daß bei kontinuierlicher Zugabe eines Substrats (Glucose) während der gesamten Fermentation eine Verlängerung des Wachstums und der Produktbildung und somit auch eine höhere Biomasse- und Produktkonzentration erreicht wird.

Zu Beginn wurde die Fermentation mit einer OD_{600} von 7.8 und einem Arbeitsvolumen von 120 l im Produktionsreaktor gestartet. Die Substratkonzentration als Vorlage betrug für die Kohlenstoffquelle Glucose 10 g/l und für Leucin 0.8 g/l. Zunächst wurde die Fermentation bis zu einer OD_{600} von 11, ohne kontinuierliche Zugabe von Glucose, im *Batch*-Betrieb gefahren. Danach erfolgte die kontinuierliche Zugabe von Glucose im *Fedbatch*-Betrieb, so daß die Konzentration der Glucose im Medium während der gesamten Fermentationsdauer ca. 10 g/l betrug. Der Glucose-Zulauf wurde nach einer direkten Meßgröße (Glucoseverbrauch) angepaßt.

Nach ca. 11.5 h war das Leucin im Medium verbraucht und es erfolgte der Übergang aus der exponentiellen Wachstumsphase in die Lysin-Produktionsphase (vgl. Punkt II.4.2). Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in der Lysin-Produktionsphase (24.5 und 32 h nach dem Fermentationsstart) erfolgte der Eintrag von 1 l Kulturvolumen aus dem Produktionsreaktor in den Sensorreaktor. Nach dem Start einer jeden Parallelfermentation im Sensorreaktor erfolgte direkt die Zugabe von $^{13}\text{C}_6$ Glucose, so daß ein $^{13}\text{C}_6$ Glucose-Markierungsverhältnis zur Gesamtglucose von ca. 15 % eingestellt wurde. Danach wurde sofort die kontinuierliche Zugabe von 15 % $^{13}\text{C}_6$ Glucose in den Sensorreaktor im *Fedbatch*-Betrieb gestartet und die Parallelfermentationen erfolgten für jeweils 3 h. Alle 20 min wurden für die ^1H -NMR-Analytik zeitsynchron aus beiden Reaktoren Fermentationsüberstände entnommen. Gegen Ende einer jeden Parallelfermentation wurde Zellkultur durch schnelles Abpumpen abgeerntet und die Zellen zur Gewinnung der cytoplasmatischen Metabolite für die anschließende 2D-NMR-Analyse verwendet.

5. Herstellung von Proteinhydrolysaten und Isolierung von Metaboliten

5.1 Extraktion proteinogener und cytoplasmatischer Aminosäuren sowie weiterer Metabolite für die 2D-NMR-Analyse

Um nach einem Markierungsexperiment die ^{13}C -Markierungsmuster der cytoplasmatischen Metabolite und der Aminosäuren des Zellproteins (proteinogene Aminosäuren) für die Flußanalysen zu bestimmen, wurden diese aus dem Cytoplasma bzw. aus markierter Biomasse für die NMR-spektroskopische Vermessung isoliert.

5.1.1 Isolierung proteinogener Aminosäuren

Nach Beendigung einer jeden Parallelferrmentation im Sensorreaktor (*Batch*-Fermentation, Punkt II.4.3) wurde der gesamte Inhalt des Sensorreaktors in eine eiskalte Flasche und sofort eine Menge von ca. 4 g Biotrockenmasse für NMR-Analysen entnommen. Die Zellen wurden dann sofort geerntet (10 min, 4500 x g, 4°C), in eiskaltem Wasser gewaschen und gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 2-4, Osterode). 250 mg dieser getrockneten Biomasse wurden anschließend in 12 ml 6-normaler HCl aufgenommen und bei 105°C für 12 h hydrolysiert (Marx, 1997). Um die Aminosäuren von restlichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde danach das Biomassehydrolysat (Proteinhydrolysat) mit 12 ml Wasser verdünnt und filtriert (Acrodisc Syringe Filters, Ann Arbor, USA). Für die NMR-Analysen wurde das Filtrat anschließend gefriergetrocknet und in 2 ml D_2O mit 10 % (w/v) Trichloressigsäure und 2 mM TSP als Standard gelöst. 700 µl dieser Lösung wurden in ein 5 mm-NMR-Röhrchen (Norell, Mays Landing, USA) gefüllt und für die nachfolgenden 2D-NMR-Analysen verwendet.

5.1.2 Isolierung cytoplasmatischer Metabolite

Die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse in Zellen aus der *Batch*-Kultivierung im Laborfermentermaßstab (Punkt II.4.2) und der *Fedbatch*-Fermentation im Sensorreaktor (Punkt II.4.3) erfolgte anhand von ^{13}C -Markierungsmustern der cytoplasmatischen Metabolite. Für die Extraktion dieser Intermediate wurde der Zellstoffwechsel bei der Probenahme schnellstmöglich mit Hilfe der *Methanol-Quenching*-Methode abgestoppt (modifiziert nach de Koning & van Dam, 1992; Schaefer *et al.*, 1999; Moritz, 2000) und die Zellen durch Perchlorsäure-Extraktion aufgeschlossen (modifiziert nach Schaefer *et al.*, 1999; Moritz, 2000).

Methanol-Quenching-Methode. Für die Extraktion der cytoplasmatischen Metabolite aus Zellen der *Batch*-Fermentationen im Laborfermentermaßstab wurden jeweils ca. 12 ml Kulturflüssigkeit aus dem Fermenter direkt in 35 ml Methanol (60 % (v/v), -58°C) gegeben und das genaue Probenvolumen durch Wiegen bestimmt. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (5 min, 10000 x g, -20°C) pelletiert und in 25 ml 45%igem (v/v) Methanol (-20°C) gewaschen. Insgesamt wurden so viele Probenahmen durchgeführt, um für jede Fermentationsphase ca. 0.5 bis 1 g Biotrockenmasse für die Extraktion zu erhalten.

Für die Extraktion der cytoplasmatischen Metabolite aus Zellen der *Fedbatch*-Fermentation im Sensorreaktor (Lysin-Produktionsphase) wurden sofort nach der Beendigung einer jeden Parallelfertmentation ca. 200 ml Kulturflüssigkeit (ca. 5 g Biotrockenmasse) sofort in einen Meßkolben (1000 ml) gepumpt, in welchem 800 ml 60%iges (v/v) Methanol (-58°C) vorgelegt war. Das genaue Probenvolumen wurde durch Wiegen bestimmt. Danach wurde die Kultur in Proben zu je 50 ml aufgeteilt, zentrifugiert (5 min, 10000 x g, -20°C) und jeweils ein Pellet mit 25 ml 45%igem (v/v) Methanol (-20°C) gewaschen.

Die pelletierten Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -70°C aufbewahrt. Um die niedrige Temperatur bei den verschiedenen Probenahmen und nachfolgenden Extraktionen zu gewährleisten, wurden die Proben in vorgekühlten Aluminiumblöcken aufbewahrt, die speziell an Falcon-Tubes (50 ml) angepaßte Bohrungen enthielten.

Perchlorsäure-Extraktion. Für den Zellaufschluß wurde jeweils 0.1 bis 0.2 g Biotrockenmasse in 10 ml 35%iger (v/v) Perchlorsäure (-20°C) resuspendiert und zusätzlich für 10 min durch Ultraschall-Behandlung im Eisbad (Ultraschallbad Bransonis 2200, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min, 41000 x g, 0°C) entfernt. Die Neutralisation der jeweiligen Überstände erfolgte mit einer 5-molaren K_2CO_3 -Lösung, wobei das dabei ausgefallene Kaliumperchlorat nachfolgend durch Zentrifugation (10 min, 4500 x g, 4°C) abgetrennt wurde. Die jeweiligen klaren Überstände (Extrakte) wurden anschließend vereinigt, gefriergetrocknet (Gefrier Trocknungsanlage Christ Alpha 2-4, Osterode) und dann in jeweils 2 ml D_2O mit 10%iger (w/v) Trichloressigsäure und 2 mM TSP gelöst (pH ca. 1.0). Für die 2D-NMR-Messung wurden 700 µl dieser Lösung in ein 5 mm-NMR-Röhrchen (Norell, Mays Landing, USA) gefüllt.

5.2 Herstellung von Zellextrakten zur Bestimmung der intrazellulären Glutamat-Konzentration

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Veränderung des Glutamat-Pools während verschiedener Phasen einer *Batch*-Fermentation mit dem Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B (Punkt II.4.2). Für die Gewinnung der cytoplasmatischen Extrakte wurde ebenfalls die *Methanol-Quenching*-Methode mit anschließender Perchlorsäure-Extraktion in abgewandelter Form durchgeführt (Punkt II.5.1.2). Dazu wurden in regelmäßigen Zeitabständen während der Fermentation 5 ml Kulturflüssigkeit direkt aus dem Bioreaktor entnommen und sofort in 12 ml Methanol (60% (v/v), -58°C) gegeben. Das genaue Probenvolumen wurde durch Wiegen bestimmt. Die gefrorenen Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 10000 x g, -20°C) abgetrennt und die Zellpellets mit 25 ml 45%igem Methanol (-20°C) gewaschen. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -70°C gelagert.

Anschließend wurde jeweils eine Probe (ca. 20 bis 40 mg Biotrockenmasse) in 2 ml 35%iger (v/v) Perchlorsäure (-20°C) aufgenommen und aufgeschossen. Der klare Überstand wurde direkt für die Bestimmung der Glutamat-Konzentrationen mittels der HPLC-Analyse verwendet.

6. Analytische Methoden

6.1 Bestimmung der optischen Dichte und der Biomassekonzentration

Die Bestimmung der optischen Dichte einer Zellkultur wurde mit einem Spektralphotometer UV 160A (Shimadzu, Tokyo, Japan) bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in einer 0.9%igen (w/v) NaCl-Lösung so weit verdünnt, daß die OD_{600} zwischen 0.1 und 0.3 lag. Als Nullwert diente die OD_{600} von einer reinen 0.9%igen (w/v) NaCl-Lösung.

Für die Bestimmung des Trockengewichts wurden 10 ml Kulturflüssigkeit in einem vorgewogenen Glasröhrchen abzentrifugiert (10 min, 4500 x g, 4°C), zweimal in 20 mM Ammoniumacetat gewaschen und anschließend für 48 h bei 105°C getrocknet. Für *C. glutamicum* ergab sich ein konstantes Verhältnis von 0.25 g/l Trockengewicht je Einheit der OD_{600} , so daß die OD_{600} als Maß für die Biomassekonzentration verwendet werden konnte.

6.2 Bestimmung des Kohlenstoffgehalts der Biomasse

Zur Bestimmung des Kohlenstoffgehalts der Biomasse wurde Kulturflüssigkeit (< 2 mg Trockengewicht) abzentrifugiert (10 min, 4500 x g, 4°C), zweimal mit einer 0.9%igen (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 2-4, Osterode). Der Gesamtkohlenstoffgehalt der gefriergetrockneten Biomasse wurde durch das Zentrallabor für chemische Analysen des Forschungszentrums Jülich mit einem Element-Analysator CHNS 932 (Leco, St. Joseph, USA) bestimmt. Dabei wird das Verbrennungsprodukt CO₂ mittels Infrarot-Spektroskopie nachgewiesen (Ehrenberger, 1979).

6.3 Enzymatische Quantifizierung von Substraten in Kulturüberständen

Die Konzentrationen von Acetat, Ammonium, Fructose, Gluconat, Glucose, Maltose, Ribose und Saccharose im Kulturüberstand wurden mit Hilfe enzymatischer UV-Tests (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Darmstadt) bestimmt (Bergmeyer, 1974). Hierzu wurden ca. 0.5 bis 1 ml Kultur für 5 min bei 13200 x g und 4°C zentrifugiert und der Kulturüberstand direkt für die Bestimmung der verschiedenen Substrate verwendet.

6.4 NMR-spektroskopische Methoden

Alle Spektren wurden mit einem AMX400-WB-NMR-Spektrometersystem (Bruker Analytik, Karlsruhe) aufgenommen. Das Gerät mit einer Magnetfeldstärke von 9.4 Tesla (entsprechend 400.13 MHz Protonen-Resonanzfrequenz) war mit einem 5 mm Inversprobenkopf für ¹H ausgerüstet und wurde mit dem Software-Paket XWINNMR (Bruker Analytik, Karlsruhe) betrieben.

6.4.1 Vermessung von Kulturüberständen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

Die Bestimmung verschiedenster Substrate und Stoffwechselprodukte in Fermentationsüberständen (Laborfermenter- und Sensorreaktorfermentationen) wurde mit Hilfe der ¹H-NMR durchgeführt. Mit dieser NMR-Methode können mehrere Substanzen im Kulturüberstand mittels einer einzigen Messung in kurzer Zeit quantifiziert werden. Hierzu wurden zunächst 1 bis 2 ml Kultur aus dem Reaktor entnommen und für 5 min bei 13200 x g und 4°C zentrifugiert. Der klare Kulturüberstand wurde anschließend direkt für die ¹H-NMR-Analysen verwendet. Dabei konnten die Konzentrationen von Glucose, Isopropylmalat, Lactat, Leucin, Lysin, Trehalose und Valin bestimmt werden.

Vor der ¹H-NMR-Messung wurden jeweils 0.35 ml Überstand mit 0.35 ml D₂O, welches zusätzlich 2 mM TSP-Standard enthielt, gemischt und in ein 5 mm-NMR-Röhrchen (Norell, Mays Landing, USA) gefüllt. Für alle ¹H-NMR-Messungen wurden folgende Meßparameter ausgewählt: 15 s Relaxationszeit, 7 s Wasser-Unterdrückungspuls, 90° Transmitter-Puls, 8 kHz Spektralweite, 16 k Fourier Datentransformation und 8 akkumulierte Einzelmessungen.

Die ^{13}C -markierten Überstände wurden direkt mit Breitband ^{13}C -Entkopplung gemessen. Dazu wurde das Schema des zusammengesetzten Entkopplungspulses GARP-1 verwendet (Shaka *et al.*, 1985).

Der Anteil an ^{13}C -markierter Glucose in den Kulturmedien des Sensorreaktors wurde anhand von ^{13}C -Anreicherungsgraden gemessen. Dafür wurden zwei getrennte Spektren aufgenommen: Spektrum A, ohne ^{13}C -Breitband-Entkopplung, und Spektrum B, mit ^{13}C -Breitband-Entkopplung (GARP-1). Die ^{13}C -Anreicherung ergab sich aus dem Signalfächenverhältnis der ^{13}C -Satelliten im Differenzspektrum A - B zum Gesamtsignal im ^{13}C -entkoppelten Spektrum (Sonntag *et al.*, 1993). Für die Bestimmung des Anteils an ^{13}C -markierter Glucose wurden die ^{13}C -Anreicherungsgrade der α -Glucose anhand der H1-Protonen gemessen.

6.4.2 Bestimmung der ^{13}C -Isotopomerverteilungen in Aminosäuren und Metaboliten mittels der [^1H , ^{13}C] HSQC 2D-NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C -Isotopomeren Markierungsmuster einzelner Kohlenstoffatome aus verschiedenen Metaboliten und Aminosäuren der cytoplasmatischen Extrakte und Proteinhydrolysate wurden mit der [^1H , ^{13}C] *heteronuclear single-quantum correlated* (HSQC) 2D-NMR-Spektroskopie (Szyperski, 1995) bestimmt. Dabei werden die Signale der ^{13}C -Atome in der sogenannten zweiten Dimension entsprechend der chemischen Verschiebung gebundener Protonen (^1H) getrennt, so daß sie nicht mehr bei der herkömmlichen eindimensionalen ^{13}C -NMR-Technik überlappen. Die Aufnahmeparameter waren $t_{1\text{max}} = 520$ ms, $t_{2\text{max}} = 231$ ms, Datensatzgröße 3072 Punkte in t_1 und 2048 Punkte in t_2 . Die Spektralbreiten betrugen 4.42 kHz für ^1H und 2.95 kHz für ^{13}C , die Sendefrequenzen waren 4.8 ppm für ^1H und 63.1 ppm für ^{13}C . Die Gesamtdauer der Aufnahme betrug 53.5 h.

6.5 Bestimmung der intrazellulären Glutamat-Konzentration mittels HPLC-Analyse

Die Quantifizierung des Glutamats aus Extrakten des Cytoplasmas wurde mit Hilfe der *reversed phase* HPLC durchgeführt (Lindroth & Mopper, 1979; Jones & Gilligan, 1983). Vor der säulenchromatographischen Auftrennung erfolgte eine Derivatisierung mit dem Reagenz *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA), das mit der Aminogruppe von Aminosäuren reagiert. Hierzu wurden je 2.5 μl einer Probe mit 20 μl *ortho*-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol-Lösung (Pierce Europe BV, Niederlande) vermischt zur Auftrennung in eine *reversed phase* HPLC-Säule (Hypersil ODS 5 μm , 120 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) mit vorgeschalteter Vorsäule (Hypersil ODS 5 μm , 40 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) eingespritzt. Die bei der Derivatisierung entstandenen thiosubstituierten Isoindolverbindungen wurden mit einem Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration von der Säule eluiert. Als polarer Laufpuffer diente hierbei 0.1 mM Natriumacetat mit

0.03 % (w/v) Natriumazid (pH 7.2 mit Essigsäure). Die Detektion der fluoreszierenden Aminosäure-Derivate wurde bei einer Wellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm durchgeführt. Zur Auftrennung und Detektion wurde eine HPLC-Anlage vom Typ HP1100 mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (Hewlett Packard, Waldbronn) verwendet. Die Systemsteuerung und Datenauswertung erfolgte mit dem Programm HP Chemstation (Hewlett Packard, Waldbronn).

Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine Standard-Lösung von 50 mM Glutamat in 50 mM $\text{H}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 7.0) eingesetzt. Die intrazelluläre Glutamat-Konzentration wurde auf der Basis des Trockengewichts und der Verdünnung bei der Extraktion unter Berücksichtigung der internen Standardisierung berechnet. Als Maß für das intrazelluläre (cytoplasmatische) Volumen von *C. glutamicum* wurde der Wert von $1.95 \pm 0.05 \mu\text{l mg}_{\text{TG}}^{-1}$ verwendet (Schrumpf, 1991; Gutmann *et al.*, 1992).

7. Methoden zur Kohlenstoffflußanalyse

Das für die Stoffflußanalysen verwendete biochemische Markierungsmodell des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum* wurde im wesentlichen von Marx *et al.* (1996) und Marx (1997) übernommen und bildet die Grundlage für die mathematische Flußanalyse. Dieses aus einem Netzwerk von Reaktionen bestehende Modell berücksichtigt die Glycolyse, den Pentosephosphatweg, den Citrat-Zyklus, den Glyoxylat-Zyklus und die Anaplerosis und beschreibt bei den einzelnen Reaktionen die Umsetzungen der Metabolite (metabolisches Netzwerk) und der Kohlenstoffatome in den Metaboliten (C-Atom-Transitionsnetzwerk). Die in diesem Modell zu Flüssen zusammengefaßten Enzymreaktionen und die betrachteten Metabolite bzw. Metabolit-Gemische (-Pools) des Zentralstoffwechsels sind in **Tabelle 2** und **Abbildung 3** dargestellt.

Um eine gute Quantifizierung der Stoffflüsse zu gewährleisten, wurde das biochemische Modell im Bereich des Pentosephosphatwegs, der Glycolyse und des Citrat-Zyklus vereinfacht. Dabei sind Ribose-5-Phosphat, Ribulose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat als Pentose-5-Phosphat-Gemisch (-Pool) zusammengefaßt. Weiterhin wurden sowohl PEP und Pyruvat als auch Malat und Oxalacetat als Gemische im Modell formuliert. Die anaplerotischen Carboxylierungsreaktionen und decarboxylierenden Rückreaktionen innerhalb der Anaplerosis wurden in einem bidirektionalen Fluß zwischen PEP/Pyruvat und Malat/Oxalacetat behandelt.

Tabelle 2: Beschreibung der Flüsse, Metabolite und Enzymreaktionen für das verwendete Flußmodell des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum*.

Fluß	Metabolit-Umsetzung ^a	Enzymreaktionen ^b
<i>Glycolyse</i>		
V ₁	G6P ↔ F6P ^c	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
V ₂	F6P → GAP + GAP	Phosphofructokinase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat-Isomerase
V ₃	GAP ↔ PGA	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Bisphosphoglycerat-Kinase
V ₄	PGA ↔ PEP/PYR	Phosphoglycerat-Mutase, Enolase
<i>Pentosephosphatweg</i>		
V ₅	G6P → P5P + CO ₂	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Lactonase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
V ₆	2 P5P ↔ S7P + GAP ^c	Transketolase
V ₇	S7P + GAP ↔ F6P + E4P ^c	Transaldolase
V ₈	E4P + P5P ↔ F6P + GAP ^c	Transketolase
<i>Citrat- und Glyoxylat-Zyklus</i>		
V ₉	PEP/PYR → AcCoA + CO ₂	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
V ₁₀	AcCoA + MAL/OAA → ICIT	Citrat-Synthase, Aconitase
V ₁₁	ICIT → AKG + CO ₂	Isocitrat-Dehydrogenase
V ₁₂	AKG → SUCC + CO ₂	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase
V ₁₃	SUCC ↔ MAL/OAA ^c	Succinat-Dehydrogenase, Fumarase
V ₁₄	ICIT → SUCC + GlyOx	Isocitrat-Lyase
V ₁₅	AcCoA + GlyOx → MAL/OAA	Malat-Synthase
<i>Anaplerosis</i>		
V ₁₆	PEP/PYR ↔ MAL/OAA ^d	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Oxalacetat-Decarboxylase, Malat-Enzym

^a Abkürzungen: G6P, Glucose-6-Phosphat; F6P, Fructose-6-Phosphat; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; PGA, 3-Phosphoglycerat; PEP/PYR, Phosphoenolpyruvat/Pyruvat-Gemisch; P5P, Pentose-5-Phosphat-Gemisch (Ribose-5-Phosphat, Ribulose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat); S7P, Seduheptulose-7-Phosphat; E4P, Erytrose-4-Phosphat; AcCoA, Acetyl-Coenzym A; MAL/OAA, Malat/Oxalacetat-Gemisch; ICIT, Isocitrat; AKG, α-Ketoglutarat; SUCC, Succinat; GlyOx, Glyoxylat;

^b Die zusammengefaßten Metabolit-Gemische PEP/PYR, MAL/OAA und P5P lassen die Enzymreaktionen Pyruvat-Kinase, Glucose-Phosphotransferasesystem, Malat-Dehydrogenase, Ribose-5-Phosphat-Isomerase und Ribulose-5-Phosphat-Epimerase unbetrachtet; ^c Die bidirektionalen Flüsse V₁, V₃, V₄, V₆-V₈ und V₁₃ werden in den in dieser Arbeit dargestellten Flußschemen als Netto-Flüsse aufgezeigt; ^d V₁₆ wird im ¹³C-Markierungsmodell in einem bidirektionalen Fluß zwischen PEP/PYR und MAL/OAA berechnet. Für eine bessere Übersicht werden jedoch Hin- und Rückfluß in den Flußschemen als getrennte Reaktionswege dargestellt.

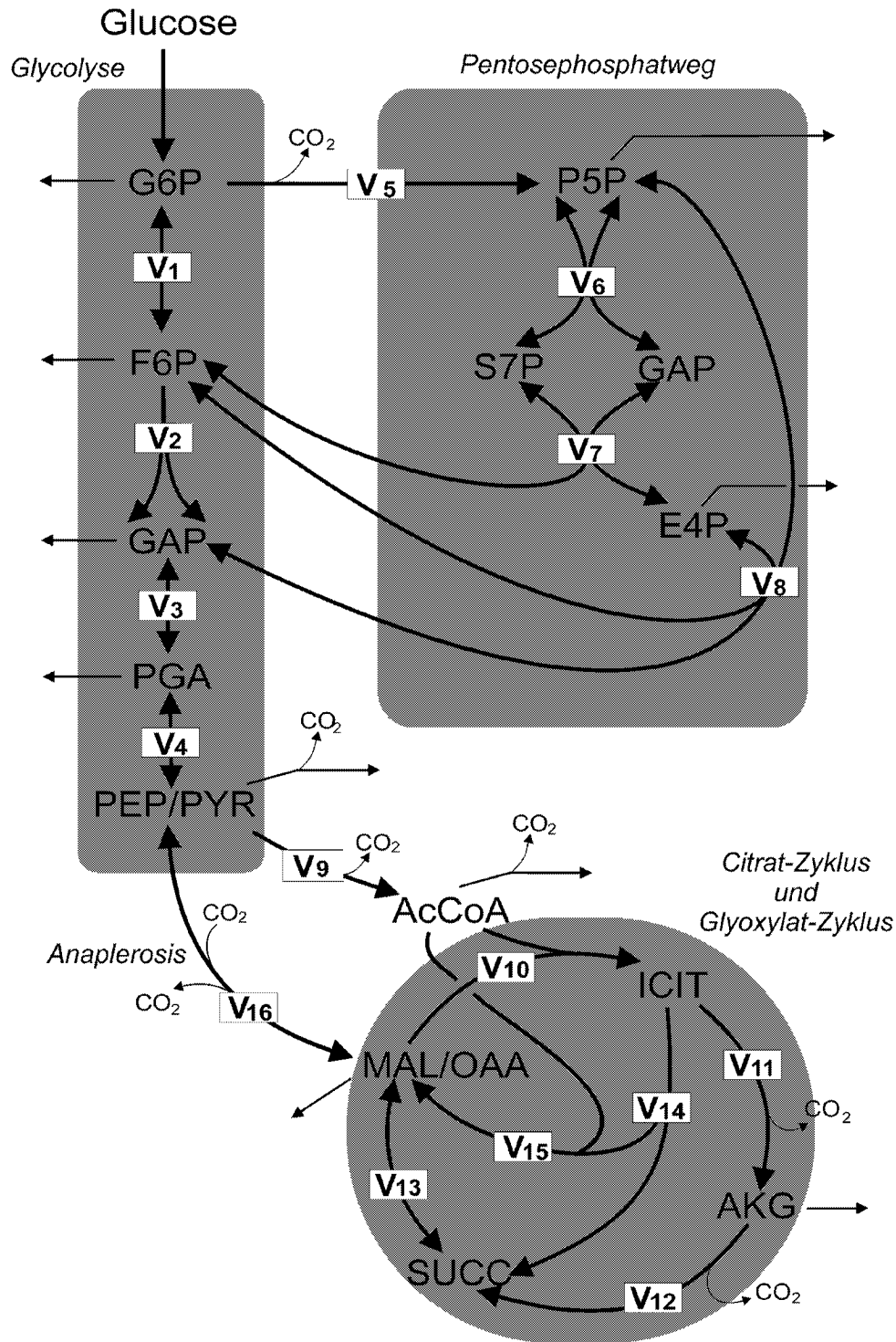


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechselmodells von *C. glutamicum* für die Stoffflußanalyse. Die betrachteten Metabolite und Reaktionsflüsse sind in Tabelle 2 erklärt. Dünn gedruckte Pfeile bezeichnen die Flüsse für die Produkt-Bildung und den Vorläufer-Metabolit-Bedarf zur Biomasse-Synthese.

Da in einigen Fällen thermodynamische Daten eine Rückreaktion von Enzymen ausschließen, wurden die Metabolitflüsse V₂, V₅, V₉-V₁₂, V₁₄ und V₁₅ als irreversibel angenommen. Im Modell wurden zudem 11 anabole Flüsse berücksichtigt, die dem Zentralmetabolismus

Metabolite zur Biomasse-Synthese entziehen. Der aus der Polymer-Zusammensetzung der Zelle abgeleitete stöchiometrische Metabolit-Vorläufer-Bedarf ist in **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 3: Stöchiometrischer Bedarf an Vorläufer-Metaboliten für die Biomassessynthese von *C. glutamicum* (modifiziert nach Marx *et al.*, 1996; Marx, 1997).

Metabolit	Bedarf $\mu\text{mol/g}_{\text{TG}}$	Metabolit	Bedarf $\mu\text{mol/g}_{\text{TG}}$
G6P	205	PEP	534
F6P	71	PYR	2685 (1805 ^a)
P5P	879	AcCoA	2939 (2499 ^a)
E4P	268	OAA	1710
GAP	129	AKG	1252
PGA	1293		

Für den Vorläuferbedarf der Proteinsynthese wurde die Aminosäure-Zusammensetzung von *C. glutamicum* und für die Synthese der restlichen Zellbestandteile (DNA, RNA, Lipide; Glycogen, etc.) die Zusammensetzung von *E. coli* nach Neidhard *et al.* (1990) zugrunde gelegt (Marx *et al.*, 1996); Abkürzungen wie in Tabelle 2; ^a Abweichender Vorläuferbedarf in *C. glutamicum* MH20-22B aufgrund der Leucin-Auxotrophie dieses Stammes.

Die computergestützte Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse in *C. glutamicum* erfolgte mit Hilfe der von Wiechert *et al.* (1999) und Möllney *et al.* (1999) entwickelten ¹³C-Flux-Software (Internet: <http://www.simtec.mb.uni-siegen.de/Software/13Cflux/>), die eine mathematische Lösung von Isotopomer-Markierungssystemen beschreibt. Dazu wurde das biochemische Modell, welches ein solches Markierungssystem darstellt, in einem computergestützten Verfahren an die isotopomeren Markierungsdaten der 2D-NMR-Messungen angepaßt, d.h., es wurde die Quadratsumme aus den Abweichungen zwischen gemessenen und erwarteten bzw. simulierten ¹³C-Markierungen minimiert. Die Fehlerquadratsumme war ein Gütekriterium für die Anpassung der gemessenen und erwarteten Werte. Für die Suche der optimalsten Anpassung wurde ein Simplex-Algorithmus (Nelder & Mead, 1965) verwendet. Neben den isotopomeren Markierungsdaten wurden für die Flußanalyse auch die Umsetzungen von Substraten und Produkten zwischen dem Zentralstoffwechsel und der Kulturflüssigkeit („extrazelluläre Flüsse“) herangezogen, wie z.B. die spezifische Aufnahme-rate des Substrats (Glucose) und die beim Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B ermittelten Produktionsraten für Lysin und einiger Nebenprodukte. Zudem wurden die aus der Wachstumsrate folgenden Abflüsse von Metaboliten in die Biomasse berücksichtigt. In **Abbildung 4** ist das Prinzip der ¹³C-Stoffflußanalyse vereinfacht dargestellt.

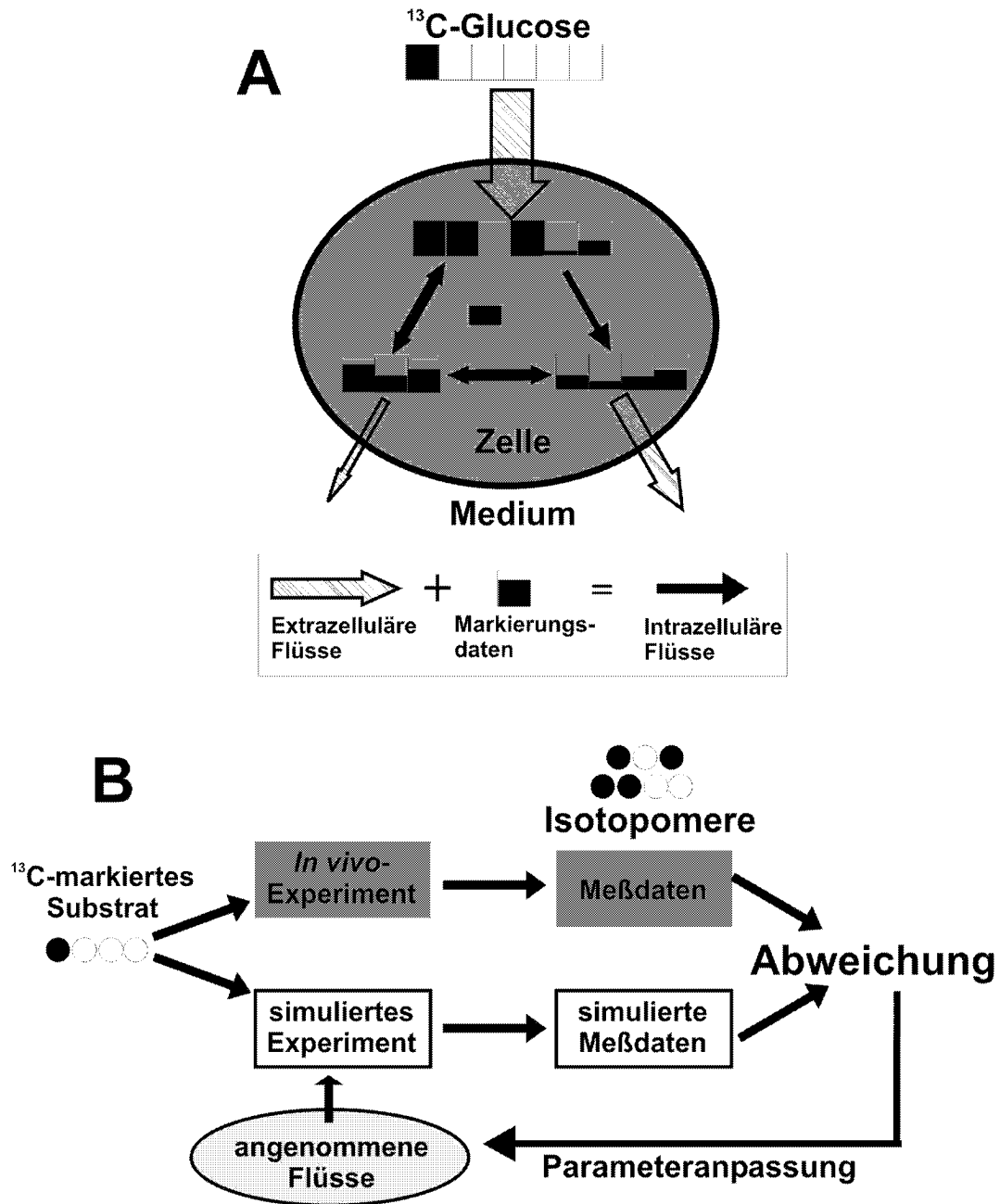
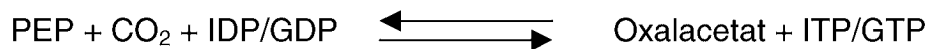


Abbildung 4: Prinzip der ^{13}C -Stoffflußanalyse: **A:** Die intrazellulären Stoffflüsse in *C. glutamicum* werden aus der ^{13}C -Markierungsinformation (Isotopomerverteilung) sowie aus den gemessenen extrazellulären Flüssen (Substrat-Verbrauchs- und Produktionsraten) ermittelt. **B:** Die Flußberechnung erfolgt mit Hilfe einer Software (^{13}C -Flux; Wiechert *et al.*, 1999; Möllney *et al.*, 1999) durch Simulation eines Markierungsexperiments. Die intrazelluläre Stoffflußverteilung wird dadurch bestimmt, indem die einzelnen Stoffflüsse durch Minimierung der Fehlerquadratsumme an die ^{13}C -Isotopomerenanteile durch einen Algorithmus angepaßt werden (Wiechert, 2001).

8. Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxykinase

Zur Herstellung von zellfreien Extrakten für die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der PEP-Carboxykinase wurden *C. glutamicum*-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (10 min, 4500 x g, 4°C) und mit Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl, 20 mM KCl, 5 mM MnSO₄, 0.1 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, pH 7.0) gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Aufschlußpuffer aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators UP 200S (Dr. Hielscher, Teltow; Einstellungen: Amplitude 55 %, Zyklus 0.5) für 7 Minuten während einer Kühlung im Eis-Wasser-Bad. Danach wurden die Zellreste abzentrifugiert (30 min, 15000 x g, 4°C) und der Überstand als Rohextrakt für die Bestimmung der Enzymaktivität und der Proteinkonzentration verwendet.

Die PEP-Carboxykinase katalysiert die reversible Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat:



Die Aktivitätsbestimmung der carboxylierenden Reaktion wurde mit einem Malat-Dehydrogenase gekoppelten Test durchgeführt (Petersen, 2001; modifiziert nach Bentle & Lardy, 1976). Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 100 mM HEPES (pH 7.0), 10 mM MnCl₂, 100 mM KHCO₃, 2 mM Glutathion (reduziert), 0.2 mM NADH, 24 U Malat-Dehydrogenase und maximal 100 µl Rohextrakt. Bei diesem Enzymtest wurde die Extinktionsänderung durch die Umsetzung von NADH über die Zeit zu NAD⁺ bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch verfolgt (Spektralphotometer UV-160 1PC, Shimadzu, Tokyo, Japan). Dabei wurde zunächst nach Zugabe von 10 mM PEP der Leerwert bei einer Reaktionszeit von 1 Minute verfolgt und anschließend die Aktivitätsmessung mit 2.5 mM IDP gestartet und für 2 Minuten beobachtet. Der Leerwert vor der Zugabe von IDP wurde dann bei der PEP-Carboxykinase-Aktivitätsbestimmung berücksichtigt.

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Rohextrakten zur Berechnung der spezifischen PEP-Carboxykinase-Aktivität erfolgte photometrisch mittels Bicinchoninsäure (Smith *et al.*, 1985). Hierzu wurden zunächst Lösung A (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, USA) und Lösung B (4 % (w/v) CuSO₄ · 5 H₂O) 50 : 1 gemischt (Testreagenz). Anschließend wurden 50 µl Proteinlösung zu 1 ml Testreagenz hinzugegeben und für 30 min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen der Testansätze wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen (Spektralphotometer UV 160A, Shimadzu, Tokyo, Japan). Alle

Proteinlösungen wurden so verdünnt, daß die Proteinkonzentration nicht über 1 mg/ml lag. Als Standard für die Proteinbestimmung diente Rinderserumalbumin.

9. Molekulargenetische Methoden

Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*, für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und für die Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen wurden im wesentlichen die in **Tabelle 4** aufgelisteten Kits verwendet. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Kit	Hersteller	Verwendung
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden	Vermehrung und Isolierung reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden	Vermehrung und Isolierung reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> in hohen Konzentrationen
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden	Isolierung reiner chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i>
Qiagen PCR Kit	Qiagen, Hilden	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Analyse

9.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden die in **Tabelle 4** aufgelisteten Kits verwendet. Die Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurde mit dem in **Tabelle 4** aufgeführten Kit für Gram-positive Bakterien durchgeführt. In diesem Fall ist für *C. glutamicum* aufgrund des Mureinsacculus eine Behandlung mit Lysozym nötig.

Die DNA-Konzentrationen wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (Ultraspec 3000, Amersham Pharmacia, Upsala, Schweden), wobei eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm sollte als ein Maß für die Reinheit der DNA zwischen 1.8 und 2.0 liegen (Sambrook *et al.*, 1989).

9.2 Restriktion und Analyse von DNA

Der Erfolg einer jeden Plasmid-DNA-Isolierung wurde über Restriktionsmuster überprüft, wobei die Technik der Restriktion im allgemeinen nach Sambrook *et al.* (1989) erfolgte. Die Verwendung der Restriktionsendonukleasen erfolgte in den vom Hersteller (i.d.R. Roche Diagnostics) angegebenen Puffern und vorgeschriebenen Temperaturen, wobei 1 µg DNA für 1 h mit 1 U Enzym behandelt wurde. Restriktionsansätze zu analytischen Zwecken wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und die Größenfraktionierung der restringierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989). Hierbei wurden die Fragmente in 0.8%igen (w/v) Agarosegelen mit TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) und bei einer Spannung von 60-80 V aufgetrennt (Gelapparatur Horizon 58 Life Technologies, Gaithersburg, USA). Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumenteil Probenauftragslösung (0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin, 100 mM EDTA) versetzt. Um die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde nach der Auftrennung der DNA-Fragmente das Agarosegel für 10 min in einer 0.1%igen (v/v) Ethidiumbromid-Lösung inkubiert.

9.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet (Saiki *et al.*, 1988). Für den Nachweis der *pck*-Deletion wurden jeweils zwei Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, welche an den 5'- und 3'-Enden des *pck*-Gens binden. Diese Primer wurden bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Biozym Diagnostics (Oldendorf) durch 30 sich wiederholende Zyklen aus DNA-Denaturierung für 30 sec bei 94°C, Anlagerung der Oligonukleotide (*annealing*) für 30 sec bei 56°C und DNA-Kettenverlängerung (*elongation*) mit Hilfe thermostabiler *Taq*-DNA-Polymerase (Tindall *et al.*, 1988) für 150 sec bei 72°C.

Primer ad1fw 5'-GCG TGA ACT TTA AGC GTG AGC TG-3'

Primer ad2rw 5'-CTG GAG AAG TAA TGA CTA CTG CTG-3'

Ein PCR-Ansatz (100 µl) enthielt 10 µl 10x Puffer (vom Hersteller, **Tabelle 4**), 2.5 U *Taq*-DNA-Polymerase, je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und je 0.5 µl der beiden Primer-Oligonukleotide (100 pmol/µl). Als Template-DNA wurden mindestens 1 ng reine chromosomale DNA aus *C. glutamicum* eingesetzt.

9.4 Transformationstechniken

Transformation von Plasmid-DNA bei *E. coli*. Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte mit Rubidiumchlorid-behandelten Zellen und anschließendem Hitzeschock (modifiziert nach Hanahan *et al.*, 1983, 1985). Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde *E. coli* DH5 α in 50 ml SOB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von maximal 0.5 kultiviert und anschließend 10 bis 15 min auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen geerntet (10 min, 4500 x g, 4°C) und in 15 ml einer eiskalten Lösung mit 12 g/l RbCl, 9.9 g/l MnCl₂, 1.5 g/l CaCl₂, 2.9 g/l Kaliumacetat und 150 g/l 100%igem Glycerin (pH 5.8 mit Essigsäure) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 4500 x g, 4°C), in 4 ml einer Lösung mit 2.1 g/l MOPS, 1.2 g/l RbCl, 11 g/l CaCl₂ und 150 g/l 100%igem Glycerin (pH 6.8 mit NaOH) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 100 μ l wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Für die Transformation wurden 100 μ l dieser Zellsuspension und ca. 10 ng Plasmid-DNA gemischt, für 30 min auf Eis und sofort danach für 90 sec bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 min in 800 μ l LB-Medium bei 37°C unter leichtem Schütteln im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) regeneriert. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Transformation von Plasmid-DNA bei *C. glutamicum*. Die Transformation von *C. glutamicum* erfolgte mittels Elektroporation nach der Methode von van der Rest *et al.* (1999). Für die Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurde eine 2 ml-Vorkultur (LB-Medium mit 2 % (w/v) Glucose) mit einer *C. glutamicum*-Kolonie von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 30°C kultiviert. Anschließend wurde 100 ml Epo-Medium mit Zellen der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0.3 angeimpft und bei 18°C für 28 h bis zu einer OD₆₀₀ von 1 kultiviert. Die Kultur wurde dann für 10 min auf Eis inkubiert und danach geerntet (10 min, 4500 x g, 4°C). Um die bei der Elektroporation störenden Salze zu entfernen, wurden die Zellen viermal mit 50 ml einer eiskalten und sterilen 10%igen (v/v) Glycerin-Lösung gewaschen und in 0.5 ml derselben Lösung aufgenommen. Aliquots von 100 μ l wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Transformation wurden 100 μ l dieser kompetenten Zellen und 1 bis 2 μ g Plasmid-DNA gemischt und anschließend in eine vorgekühlte und sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Der Transfer der DNA erfolgte mit einem Gene Pulser (Biorad, München) bei einer Spannung von 2.5 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 25 μ F. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml BHIS-Medium überführt und für 6 Minuten bei 46 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 h unter leichtem Schütteln bei 30°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) regeneriert, auf Kanamycin-haltigen LBHIS-Platten zur Selektion ausplattiert und bei 30 °C bebrütet.

III. Ergebnisse

1. Intrazelluläre Flußquantifizierung unter instationären Wachstumsbedingungen

1.1 Quantitative Bestimmung der Kohlenstoffflüsse in *C. glutamicum* ATCC 13032

Zur Bestimmung der Stoffflüsse im Zentralmetabolismus von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden erstmals isotopomere ^{13}C -Markierungsdaten aus cytoplasmatischen Metaboliten verwendet. Zunächst sollte überprüft werden, welche isotopomeren Markierungsmuster verschiedener Substanzen des Cytoplasmas überhaupt mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie nachzuweisen sind. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, mit welcher Genauigkeit sich die intrazellulären Stoffflüsse, insbesondere die der metabolischen Knotenpunkte, mit den Markierungsinformationen aus den 2D-NMR-Messungen bestimmen lassen.

1.1.1 Charakterisierung des Wachstums

Für die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse wurde der Wildtypstamm von *C. glutamicum* in einer *Batch*-Fermentation im Laborfermenter (Punkt II.4.2) bei exponentiellem Wachstum kultiviert. Die Wachstumsrate betrug $0.32 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, so daß eine Verdopplungszeit der Biomasse von 2 h berechnet wurde. Für den Zeitraum zwischen 1 und 5 h nach Beginn der Inkubation wurde die Glucose-Aufnahmerate mit $3.22 \pm 0.20 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und die CO_2 -Produktionsrate mit $6.41 \pm 0.49 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Der Kohlenstoffgehalt der Biomasse betrug $35.6 \pm 0.8 \text{ mmolC g}_{\text{TG}}^{-1}$. Mit Ausnahme geringer Mengen an Lactat ($< 0.8 \text{ mM}$) und Acetat ($< 0.1 \text{ mM}$) im Kulturüberstand wurde die Glucose zu $60 \pm 4\%$ für die Biomasseproduktion und zu $33 \pm 3\%$ zur CO_2 -Bildung verwendet. Die Kohlenstoffbilanz war mit $93 \pm 5\%$ geschlossen.

1.1.2 Analyse der Stoffflüsse im Zentralmetabolismus

Mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie wurden aus dem cytoplasmatischen Extrakt des Wildtyps von *C. glutamicum* die isotopomeren Markierungsmuster von 26 Kohlenstoffatomen verschiedener Metabolite bestimmt (**Tabelle 5**). Die meisten im 2D-Spektrum identifizierten ^{13}C -Markierungsmuster stammten von L-Aminosäuren, aus denen sich direkt die ^{13}C -Markierungsmuster der Vorläufermetabolite des Zentralmetabolismus ableiten lassen, wie z.B. Oxalacetat aus Aspartat, α -Ketoglutarat aus Glutamat, Pyruvat aus Alanin und Valin, etc. (de Graaf, 2000a).

Ergebnisse

Tabelle 5: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Metabolite für die Bestimmung der Stoffflüsse im Zentralmetabolismus von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei exponentiellem Wachstum. Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₋₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)			
		s	d ₋₁	d ₊₁	dd
Trehalose	1	9.2 ± 3		90.8 ± 3	
	2	5.4 ± 3		14.0 ± 3 ^b	80.6 ± 6
	3	0 ± 3		17.2 ± 3 ^b	83.6 ± 6
	5	2.4 ± 2		14 ± 6 ^b	83.6 ± 4
Nukleoside ^a	1	21 ± 1.5		79 ± 2	
	2	11.1 ± 5		39.3 ± 3 ^b	49.6 ± 5
	4	5.7 ± 1.6		8.8 ± 2 ^b	85.5 ± 3
Aspartat	2	10.1 ± 2	28.8 ± 3	10 ± 3	51.1 ± 4
	3	11.3 ± 1	35.8 ± 1	24.8 ± 1	28.1 ± 1.5
Alanin	2	2.1 ± 2	5 ± 3	7.7 ± 3	85.2 ± 7
	3	10.8 ± 3	89.2 ± 6		
Citrat	2	8.8 ± 2	42.3 ± 2	19.9 ± 2	29.1 ± 2
	4	8.8 ± 2	19.9 ± 2	42.3 ± 2	29.1 ± 2
Valin	4	13.4 ± 6	86.6 ± 5		
	5	70.7 ± 4	29.3 ± 8		
Glutamat	2	10.8 ± 0.6	24.8 ± 0.8	38.1 ± 1.5	26.3 ± 3
	3	23.2 ± 1		54.9 ± 2 ^b	21.9 ± 2
	4	6.8 ± 0.7	3.1 ± 1	64.4 ± 0.6	25.7 ± 0.8
Glutamin	2	9.6 ± 2	23.5 ± 4	41.6 ± 5	25.3 ± 4
	4	8.0 ± 0.9		68.2 ± 1.1 ^b	23.9 ± 0.8
Leucin	3	50.6 ± 2		42.8 ± 2 ^b	6.6 ± 4
Isoleucin	4	30.9 ± 4		52.0 ± 2 ^b	17.1 ± 9
	5	49 ± 1.5	51 ± 1.5		
	6	9.7 ± 1.5	90.3 ± 2		
Lysin	2	6.7 ± 4		12.0 ± 5 ^b	81.3 ± 6
	5	12.7 ± 8		66.5 ± 6 ^b	20.8 ± 9
	6	16.8 ± 3	83.2 ± 4		

^a Als Markierungsinformation wurden nur Derivate von Ribonukleosiden verwendet, welche eindeutig in Spektrum zugeordnet werden konnten. Verwendet wurden C1 von Adenosin, C2 und C4 von Cytidin; ^b Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₋₁ und d₊₁ bestimmen.

Neben den in *C. glutamicum* in hoher Konzentration vorliegenden Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, Glutamin, Aspartat und Alanin (Tesch *et al.*, 1999; Sahm *et al.*, 2000), konnten zusätzlich die ^{13}C -Markierungsmuster der Kohlenstoffatome von Citrat, Trehalose und verschiedener Ribonukleoside identifiziert werden, welche weitere sehr wichtige Markierungsinformationen für die Flußanalyse liefern. So bietet das isotopomere Markierungsmuster von Citrat direkte Informationen über die Kohlenstoffflüsse im Citrat-Zyklus. Weiterhin enthalten die isotopomeren Markierungsmuster der Ribonukleoside Informationen über den Kohlenstofffluß in den Pentosephosphatweg, da die in den Nukleosiden enthaltene Ribose im Pentosephosphatweg gebildet wird.

Die Entstehung und Zusammensetzung der Feinstrukturen eines isotopomeren ^{13}C -Markierungsmusters aus einer 2D-NMR-Messung ist in **Abbildung 5** am Beispiel des dritten Kohlenstoffatoms von Aspartat dargestellt. Je nach der Anzahl der zum gemessenen ^{13}C -Atom benachbarten ^{13}C -Atome wird eine Singulett- (s), Doublett- (d_{-1} , d_{+1}) oder Doublett von Doubletts- (dd) Feinstruktur erhalten, wobei der Abstand der Peaks bei den Doubletts (d_{-1} bzw. d_{+1}) den jeweiligen Kopplungskonstanten entspricht. Die Bezeichnungen d_{-1} und d_{+1} für die Doubletts wurden von Petersen *et al.* (2000) übernommen. Aus dem Signal des C3-Atoms von Aspartat, welches in neun einzelne Peaks aufgespalten werden kann, können die Anteile von vier verschiedenen Markierungsmustern im gleichen Molekül bestimmt werden. Die ^{13}C -Signale endständiger Kohlenstoffatome verschiedener Verbindungen spalten nur in ein Singulett und ein Doublett auf.

Unter Verwendung der isotopomeren Markierungsinformationen, der Wachstumsrate und der Stoffwechselraten (Glucose-Aufnahme) wurde mit Hilfe der ^{13}C -Flux-Software (Wiechert *et al.*, 1999; Möllney *et al.*, 1999) die Flußanalyse durchgeführt. Eine Auswahl der resultierenden absoluten Metabolitflüsse im Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum* bei exponentiellem Wachstum auf Glucose ist in **Tabelle 6** dargestellt. Die Standardabweichung der Flüsse in die Glycolyse und in den Pentosephosphatweg von Glucose-6-Phosphat ausgehend betrug etwa 20 %. Die mit Hilfe der ^{13}C -Flux-Software ermittelten Standardabweichung der Flüsse durch die Glycolyse und den Citrat-Zyklus wurde jeweils mit etwa 10 % ermittelt. Auch im Bereich der Anaplerosis liegt die Abweichung zu den Flußwerten bei 10 % (anaplerotischer Carboxylierungsfluß) und 20 % (decarboxylierender Rückfluß).

Die ermittelten Stoffflüsse in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei exponentiellem Wachstum sind in **Abbildung 6** in einem Flußdiagramm angegeben. Vom Glucose-Zufluß von 100 % nach Glucose-6-Phosphat wurden 37 % über den Pentosephosphatweg und 62 % über die Glycolyse metabolisiert. Die restlichen 2 % des Glucose-6-Phosphats wurden für die Biomassebildung verwendet. Dieses Ergebnis stimmt mit den von Sonntag *et al.* (1995) ermittelten Stoffflüssen im Wildtyp weitgehend überein.

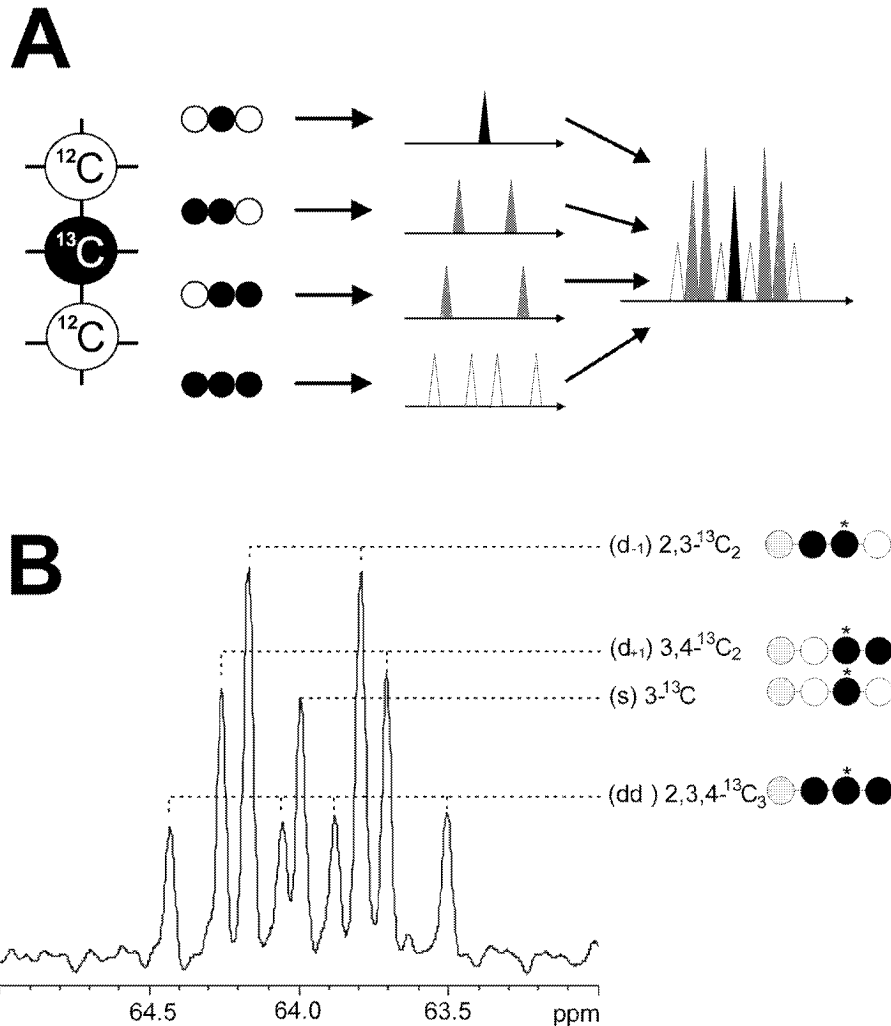


Abbildung 5: A: Entstehung von isotopomeren Feinstrukturen anhand eines Moleküls mit drei Kohlenstoffatomen mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie. Das mittlere ^{13}C -Atom bildet im ^{13}C -Spektrum ein Singulett aus. Ist zusätzlich eines der benachbarten Kohlenstoffatome ^{13}C -markiert, entsteht jeweils ein Doublett. Sind beide benachbarten Kohlenstoffatome markiert, entsteht ein Doublett von Doubletts. Eine komplett unmarkierte Verbindung erzeugt kein ^{13}C -NMR-Signal (Szypersky, 1995; de Graaf, 2000a; Wiechert, 2001). **B:** Feinstrukturen eines ^{13}C -NMR-Signals am Beispiel des C3-Atoms von Aspartat bestimmt aus dem Extrakt des Cytoplasmas von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei exponentiellem Wachstum: s, Singulett von [3- ^{13}C]Aspartat; d₋₁ und d₊₁, Doubletts mit Kopplung zum zweiten bzw. vierten Kohlenstoffatom von [2,3- $^{13}\text{C}_2$]Aspartat bzw. [3,4- $^{13}\text{C}_2$]Aspartat; dd, Doublett von Doubletts bei [2,3,4- $^{13}\text{C}_3$]Aspartat. Durch Integration der Peak-Flächen können die Intensitäten der Singulett-, Doubletts- und Doublett von Doubletts-Signale als Markierungsinformation für die Flußanalyse bestimmt werden.

Der weitere glycolytische Nettofluß von Fructose-6-Phosphat, über die C₃-Einheiten Glycerinaldehyd-3-Phosphat und 3-Phosphoglycerat, nach PEP/Pyruvat betrug 145 %. Ausgedrückt in C₆-Einheiten bedeutet dies einen Fluß von 72.5 %, was zeigt, daß 27.5 % des Substrats für die Biomassessynthese und die CO₂-Bildung bereits in der Glycolyse und im Pentosephosphatweg verbraucht wurde.

Ergebnisse

Tabelle 6: Ausgewählte, mit Hilfe der ^{13}C -Flußanalyse berechnete Stoffflüsse und deren Standardabweichungen des Zentralmetabolismus von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei exponentiellem Wachstum in einer *Batch*-Kultur im Laborfermenter.

Umsetzung	<i>in vivo</i> -Stoffflüsse (mmol $\text{g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Glucose-Aufnahme ^a	3.27 ± 0.04
Glucose-6-P $\rightarrow$ Pentose-5-P + CO_2 ^b	1.19 ± 0.31
Glucose-6-P $\rightarrow$ Fructose-6-P	2.01 ± 0.35
Triosephosphate $\rightarrow$ PEP/Pyruvat ^c	5.43 ± 0.31
PEP/Pyruvat $\rightarrow$ AcCoA + CO_2	2.72 ± 0.13
Isocitrat $\rightarrow$ α -Ketoglutarat + CO_2 ^d	1.68 ± 0.17
Malat/Oxalacetat + AcCoA $\rightarrow$ Isocitrat ^e	1.69 ± 0.14
Succinat $\rightarrow$ Malat/Oxalacetat	1.29 ± 0.13
PEP/Pyruvat + CO_2 $\rightarrow$ Malat/Oxalacetat ^f	1.86 ± 0.20
Malat/Oxalacetat $\rightarrow$ PEP/Pyruvat + CO_2 ^g	0.93 ± 0.22

^a Im Modell berechnete Aufnahmerate; ^b Ribose-5-Phosphat, Ribulose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat als Pentose-5-Phosphat-Pool; ^c Nettofluß von Fructose-6-Phosphat, über Glyceraldehyd-3-Phosphat and 3-Phosphoglycerat, nach PEP/Pyruvat; ^d Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion; ^e Citrat-Zyklus-Eingangsfluß; ^f Anaplerotische Carboxylierungen: PEP-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase; ^g Decarboxylierende Rückreaktionen: PEP-Carboxykinase, Oxalacetat-Decarboxylase, Malat-Enzym; P, Phosphat; AcCoA, Acetyl-CoA.

Im Bereich der Anaplerosis betrug der anaplerotische Carboxylierungsfluß 57 %, wohingegen der decarboxylierende Rückfluß mit 28 % nur halb so groß war. Somit konnte in diesem Experiment ebenfalls bestätigt werden, daß die carboxylierenden und decarboxylierenden Reaktionen gleichzeitig aktiv sind (Sonntag *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1997, Petersen *et al.*, 2000, 2001). Da in diesen Analysen die Metabolite PEP und Pyruvat sowie Oxalacetat und Malat im Modell in jeweils einem Pool zusammengefaßt wurden, lassen sich keine Aussagen über die im einzelnen involvierten Enzyme und deren Aktivitäten treffen. Der Fluß in den Citrat-Zyklus betrug 52 % und der Glyoxylatweg war inaktiv, wie für das Wachstum auf Glucose erwartet werden konnte (Marx *et al.*, 1996, 1999; Wendisch *et al.*, 2000).

Anhand der Stoffflußanalyse mit dem Wildstamm von *C. glutamicum* konnte somit gezeigt werden, daß mit der Verwendung von isotopomeren ^{13}C -Makierungsinformationen aus Metaboliten des Cytoplasmas intrazelluläre Metabolitflüsse mit guter Genauigkeit zu bestimmen sind.

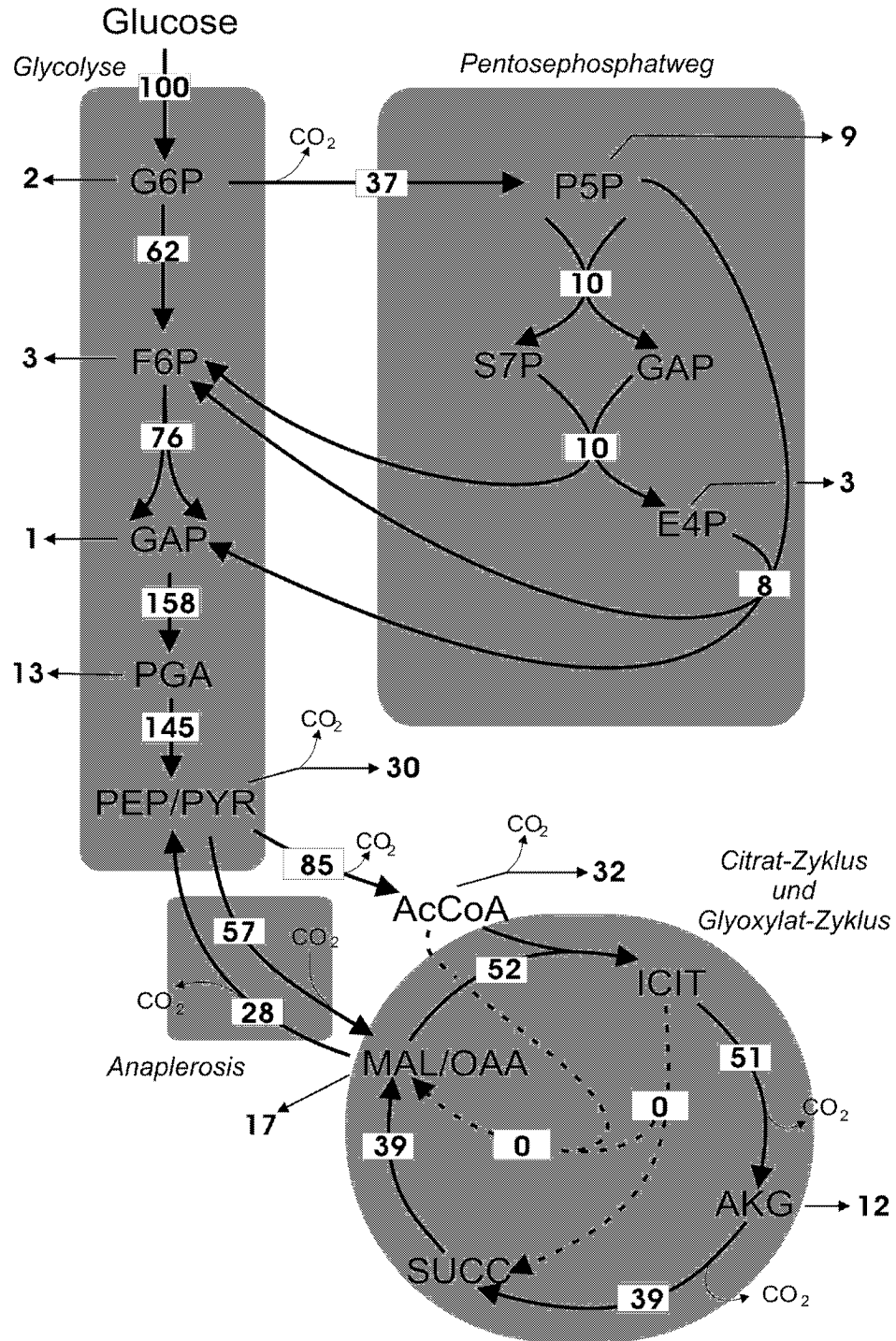


Abbildung 6: Stoffflüsse im Wildstamm von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei exponentiellem Wachstum auf Glucose. Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($3.27 \pm 0.04 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3.

1.2 Quantitative Bestimmung der Kohlenstoffflüsse im Lysin-Produzenten von *C. glutamicum* MH20-22B

Bisher erfolgten Stoffflußanalysen hauptsächlich anhand von *C. glutamicum*-Zellen, welche unter stationären Wachstumsbedingungen im Chemostaten kultiviert wurden. Da aber bei der industriellen Lysin-Produktion *Batch*-Prozesse mit verschiedenen Wachstums- und Produktionsphasen von großer Bedeutung sind, war nun das weitere Ziel, cytoplasmatische Markierungsdaten für die Bestimmung von Stoffflüssen in *C. glutamicum* bei Wachstum in einer *Batch*-Kultur mit verschiedenen Wachstums- und Produktionsphasen zu nutzen. Hierbei war von besonderem Interesse, die Änderungen des Zentralstoffwechsels während limitierender Wachstumsbedingungen und bei der Lysin-Produktion im Laborfermenter (Punkt II.4.2) genauer zu analysieren.

1.2.1 Charakterisierung des Wachstums unter Leucin-limitierenden Bedingungen

Für die Untersuchungen der Stoffflüsse unter instationären Kulturbedingungen erwies sich der Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B wegen seiner Leucin-Auxotrophie als sehr geeignet. Durch diese Auxotrophie können während einer *Batch*-Kultur durch Leucin-Limitierung zwei völlig verschiedene Stoffwechselzustände induziert werden, die zur Veränderung des Wachstums und der Lysin-Produktion führen. Entscheidend hierbei war, daß die Leucin-Limitierung vor dem Verbrauch der Glucose einsetzte und die Zellen, trotz ausreichender Glucose-Versorgung, nicht mehr in der Lage waren ihr exponentielles Wachstum zu halten. In **Abbildung 7** ist der zeitliche Verlauf einer solchen durch Leucin-Limitierung beeinflussten *Batch*-Kultur von *C. glutamicum* MH20-22B im Laborfermenter dargestellt.

Es wird deutlich, daß bei ausreichender Leucin-Versorgung ein starkes Wachstum und eine starke Zunahme der CO₂-Konzentration in der Abluft auftrat. Die Bildung von Lysin und einiger Nebenprodukte, wie Valin, Lactat und Trehalose (< 0.2 mM), blieb hingegen sehr gering, da die Kohlenstoffquelle Glucose hauptsächlich für den Aufbau von Biomasse verwendet wurde (Wachstumsphase). Nach ca. 6 h war das Leucin im Medium verbraucht, was zu einer Verminderung des Zellwachstums und der CO₂-Bildung führte. Die Lysin-Produktion wurde jedoch deutlich erhöht (Lysin-Produktionsphase).

Ergebnisse

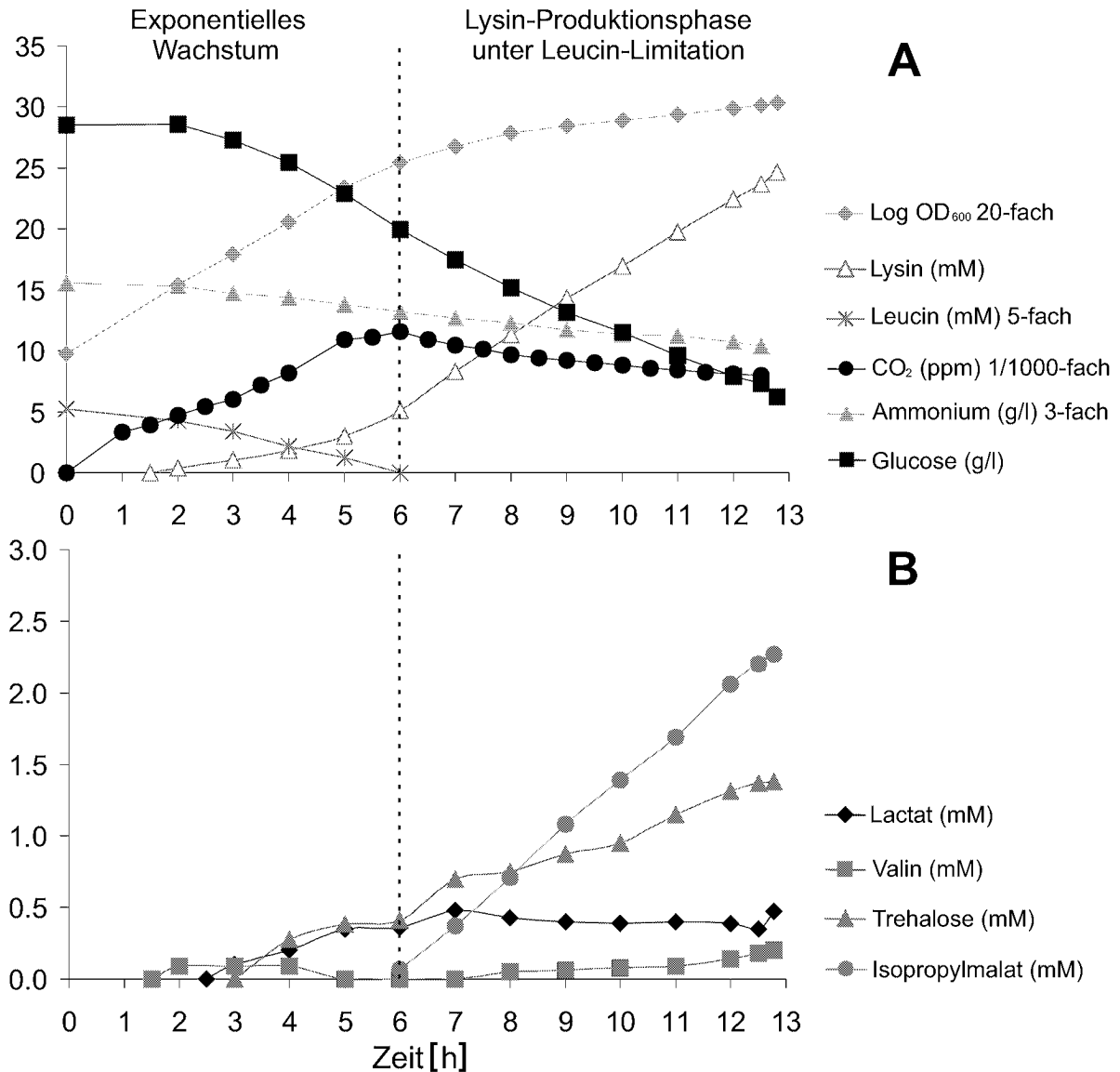


Abbildung 7: Batch-Kultur von *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum und in der Lysin-Produktionsphase unter Leucin-Limitierung im Laborfermenter. **A:** Wachstum (OD₆₀₀, logarithmische Auftragung) und Ammonium-, Lysin-, Leucin- und Glucose-Konzentrationen im Medium, sowie die CO₂-Konzentration im Abgas. Für eine anschauliche Darstellung wurden einige Konzentrationen mit einem bestimmten Wert multipliziert. **B:** Konzentrationen der ins Medium abgegebenen Nebenprodukte Lactat, Valin, Trehalose und Isopropylmalat.

Neben Lysin schied *C. glutamicum* MH20-22B in der Lysin-Produktionsphase zudem verstärkt Trehalose und besonders Isopropylmalat, einen Vorläufer der Leucin-Synthese, ins Medium aus (**Abbildung 7**). Diese Ausscheidung von Isopropylmalat ist charakteristisch für die Leucin-Auxothrophie dieses Stammes, da aufgrund einer Mutation der Isopropylmalat-Dehydratase (*leuCD*) der Leucin-Syntheseweg unterbrochen ist (Schrumpf *et al.*, 1992) und somit dieser Metabolit angehäuft wird.

Ergebnisse

In der exponentiellen Wachstumsphase ($\mu = 0.32 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$) wurde die Glucose-Aufnahmerate mit $3.63 \pm 0.35 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und die CO_2 -Produktionsrate mit $8.04 \pm 0.40 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Die Verdopplungszeit der Biomasse betrug in dieser Phase 2 h. Die Lysin-Produktionsrate wurde mit $0.29 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Der Kohlenstoffgehalt der Biomasse betrug $34.6 \pm 0.7 \text{ mmolC g}_{\text{TG}}^{-1}$ und unterschied sich nicht von dem ermittelten Kohlenstoffgehalt der Biomasse des Wildtyps bei exponentiellem Wachstum (s.o.). Die Kohlenstoffbilanz für *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum war mit $94.1 \pm 6.5 \%$ geschlossen (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Extrazelluläre Stoffwechselraten und Kohlenstoffbilanzen bei *C. glutamicum* MH20-22B in einer *Batch*-Kultur unter Leucin-limitierenden Bedingungen.

	exp. Wachstumsphase ^a ($\mu = 0.32 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$)	Lysin-Produktionsphase ^b ($\mu = 0.057 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$)
<i>Raten in mmol g_{TG}⁻¹ h⁻¹:</i>		
Glucose-Aufnahme	3.63 ± 0.35	1.45 ± 0.04
Leucin-Aufnahme	0.10 ± 0.01	-
Lysin-Produktion	0.29 ± 0.02	0.39 ± 0.01
CO_2 -Produktion	8.04 ± 0.40	3.29 ± 0.08
Trehalose-Produktion	n.b.	0.021 ± 0.001
Isopropylmalat-Produktion	n.b.	0.046 ± 0.001
<i>Verbleib des Substratkohlenstoffs (Glucose) in %:</i>		
Biomasse	49.1 ± 5.1	23.0 ± 1.0
Lysin	8.0 ± 0.9	26.7 ± 1.2
CO_2	37.0 ± 4.0	37.8 ± 1.4
Trehalose	n.b.	2.8 ± 0.2
Isopropylmalat	n.b.	3.7 ± 0.1
<i>Summe</i>	94.1 ± 6.5	94.0 ± 2.1

^a Die hier angegebenen Stoffwechseldaten gelten für den Zeitraum zwischen 1 und 4 h nach Beginn der Inkubation; ^b Die hier angegebenen Stoffwechseldaten gelten für den Zeitraum zwischen 8 und 12.5 h nach Beginn der Inkubation; μ , Wachstumsrate; n.b., nicht bestimmbar.

Anhand der Stoffwechselraten und der Kohlenstoffbilanzen ist die Änderung des Stoffwechsels von *C. glutamicum* in der Lysin-Produktionsphase besonders deutlich erkennbar. Die Lysin-Produktionsrate nimmt mit $0.39 \pm 0.01 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu, obwohl die Glucose-Aufnahmerate um das 2.5-fache und die Wachstumsrate ($\mu = 0.057 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$) sogar um das 6-fache im Vergleich zum exponentiellem Wachstum deutlich abnahm (**Tabelle 7**). Die Verdopplungszeit der Biomasse betrug in dieser Phase 12 h. Normalerweise ist anzunehmen, daß unter Leucin-Limitierung kein Wachstum mehr möglich ist. Ein leichtes Wachstum in dieser Phase kann jedoch damit begründet werden, daß möglicherweise *C. glutamicum* noch in geringem Maße intrazelluläres Leucin für die Biomassebildung nutzen konnte und somit diese Phase eine Übergangsphase in die völlige Leucin-Limitierung darstellt.

Tabelle 7 zeigt, daß *C. glutamicum* bei Leucin-Limitierung wesentlich weniger Glucose aufnahm, aber dieses Substrat um so intensiver für die Lysin-Produktion verwendete. Die ebenfalls erhöhte Produktion von Nebenprodukten, insbesondere von Trehalose und Isopropylmalat, machte zusammen 6.5 % in der Kohlenstoffbilanz aus. Die Kohlenstoffbilanz für *C. glutamicum* MH20-22B in der Lysin-Produktionsphase bei stark vermindertem Wachstum war mit $94.0 \pm 2.1 \%$ geschlossen. Der Kohlenstoffgehalt der Biomasse in der Lysin-Produktionsphase betrug $34.7 \pm 0.7 \text{ mmolC g}_{\text{TG}}^{-1}$.

Insgesamt konnte anhand der verminderten Glucose-Aufnahme und der verminderten CO_2 -Produktion gezeigt werden, daß sich die Aktivität des Zentralstoffwechsels bei Leucin-Limitation, mit Ausnahme des Lysin-Synthesewegs, deutlich erniedrigt hatte, da bei stark reduziertem Wachstum weniger Metabolite und Energie für die Biomassebildung benötigt wurden.

1.2.2 Analyse der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus

Die Bestimmung der Stoffflüsse für die exponentielle Wachstumsphase und die Lysin-Produktionsphase in *C. glutamicum* MH20-22B erfolgte, wie bei der Stoffflußanalyse für den Wildstamm von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei exponentiellem Wachstum, anhand der isotopomeren Markierungsmuster. Dabei wurden die isotopomeren Markierungsmuster von 25 (exponentielle Wachstumsphase) bzw. 29 Kohlenstoffatomen (Lysin-Produktionsphase) verschiedener Metabolite des Cytoplasmas bestimmt (**Tabelle 15 und 16, Anhang**). Unter Berücksichtigung dieser isotopomeren Markierungsdaten, der Wachstumsraten und extrazellulären Stoffwechselraten wurden mit Hilfe der mathematischen Stoffflußanalyse die *in vivo*-Stoffflüsse in $\text{mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für jede der beiden Fermentationsphasen bestimmt (**Tabelle 8**). Anhand der Standardabweichungen der einzelnen Stoffflüsse wird deutlich, daß die Flüsse durch die Glycolyse und den Citrat-Zyklus eine Abweichung unter 10 % aufwiesen. Die Abweichung der Flußverteilung von Glucose-6-Phosphat in den Pentose-

phosphatweg und die Glycolyse betrug für die exponentielle Wachstumsphase ca. 10 bzw. 20 % und für die Lysin-Produktionsphase ca. 20 bzw. 10 %. Im Bereich der Anaplerosis lag die Abweichung unter 16 % und bestätigt somit eine gute Bestimmung der *in vivo*-Stoffflüsse von *C. glutamicum* in beiden Fermentationsphasen.

In **Tabelle 8** wird die Verminderung der Aktivität des Zentralmetabolismus in der Lysin-Produktionsphase im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase, wie es bereits zuvor anhand der verminderten Glucose-Aufnahme bzw. CO₂-Produktion zu sehen war, besonders deutlich. Beispielsweise war in der Glycolyse der Nettofluß von Fructose-6-Phosphat nach PEP/Pyruvat und im Citrat-Zyklus die Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion im Vergleich zu den jeweiligen Flüssen bei exponentiellem Wachstum um mehr als den Faktor 2 reduziert.

Tabelle 8: Ausgewählte, mit Hilfe der ¹³C-Flußanalyse berechnete Stoffflüsse und deren Standardabweichungen des Zentralmetabolismus von *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum und in der Lysin-Produktionsphase bei Kultivierung im Laborfermenter.

Umsetzung	<i>in vivo</i> -Stoffflüsse (mmol g _{TG} ⁻¹ h ⁻¹)	
	exp. Wachstumsphase	Lysin-Produktionsphase
Glucose-Aufnahme ^a	3.62 ± 0.05	1.47 ± 0.04
Glucose-6-P → Pentose-5-P + CO ₂ ^b	1.28 ± 0.27	0.79 ± 0.11
Glucose-6-P → Fructose-6-P	2.28 ± 0.30	0.64 ± 0.14
Triosephosphat → PEP/Pyruvat ^c	5.51 ± 0.14	2.37 ± 0.09
PEP/Pyruvat → AcCoA + CO ₂	3.30 ± 0.13	1.20 ± 0.07
Malat/Oxalacetat + AcCoA → Isocitrat ^d	2.47 ± 0.14	0.99 ± 0.09
Isocitrat → α-Ketoglutarat + CO ₂ ^e	2.46 ± 0.27	0.98 ± 0.15
Succinat → Malat/Oxalacetat	2.09 ± 0.21	0.92 ± 0.11
PEP/Pyruvat + CO ₂ → Malat/Oxalacetat ^f	2.50 ± 0.15	0.93 ± 0.07
Malat/Oxalacetat → PEP/Pyruvat + CO ₂ ^g	1.34 ± 0.06	0.38 ± 0.06
Malat/Oxalacetat → Aspartat	0.61 ± 0.01	0.45 ± 0.01
Lysin-Produktion ^h	0.29 ± 0.01	0.39 ± 0.01

^a Im Modell berechnete Aufnahmerate; ^b Ribose-5-Phosphat, Ribulose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat als Pentose-5-Phosphat-Pool; ^c Nettofluß von Fructose-6-Phosphat, über Glyceraldehyd-3-Phosphat and 3-Phosphoglycerat, nach PEP/Pyruvat; ^d Citrat-Zyklus-Eingangsfluß; ^e Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion; ^f Anaplerotische Carboxylierungen: PEP-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase; ^g Decarboxylierende Rückreaktionen: PEP-Carboxykinase, Oxalacetat-Decarboxylase, Malat-Enzym; ^h Im Modell berechnete Produktionsrate; P, Phosphat; AcCoA, Acetyl-CoA.

In **Abbildung 8** und **9** sind die für den Zentralmetabolismus ermittelten Stoffflüsse für jede der beiden Fermentationsphasen dargestellt. Der Fluß in die Lysin-Synthese betrug in der exponentiellen Wachstumsphase nur 8 %, hingegen in der Lysin-Produktionsphase 26 %. Ebenso erhöhte sich auch der Fluß von Malat/Oxalacetat in Richtung Aspartat, einen Vorläufer der Lysin-Synthese, von 17 % in der exponentiellen Wachstumsphase auf 30 % in der Lysin-Produktionsphase. Ferner waren deutliche Unterschiede in der Abzweigung von Glucose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg und in die Glycolyse zu erkennen. Dabei floß bei exponentiellem Wachstum 35 % des Glucose-6-Phosphats in den Pentosephosphatweg, wobei in der Lysin-Produktionsphase 53 % des Glucose-6-Phosphats über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt wurde. Dies ist mit dem steigenden Bedarf an NADPH für die Lysin-Produktion zu erklären.

Innerhalb der Anaplerosis sind in beiden Fermentationsphasen ebenfalls interessante Unterschiede zu erkennen. Der anaplerotische Carboxylierungsfluß von PEP/Pyruvat zu Malat/Oxalacetat betrug in der exponentiellen Wachstumsphase 69 % und war in der Lysin-Produktionsphase mit 63 % praktisch unverändert. Im Gegensatz dazu betrug der decarboxylierende Rückfluß in der exponentiellen Wachstumsphase 37 % und in der Lysin-Produktionsphase 26 %, was eine signifikante Erniedrigung um ca. 30 % bedeutet. Der Glyoxylatweg war in beiden Wachstumsphasen inaktiv, was im Einklang mit den Literaturdaten steht (Marx *et al.*, 1996, 1999; Wendisch *et al.*, 2000).

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß es mit Hilfe von ^{13}C -Markierungsdaten aus cytoplasmatischen Metaboliten möglich ist, die *in vivo*-Stoffflußverteilung in *C. glutamicum* bei unterschiedlichen Wachstumsphasen einer *Batch*-Kultur sehr gut zu bestimmen. Anhand der Flußbestimmungen konnte beobachtet werden, daß durch Leucin-Limitierung in der Lysin-Produktionsphase der Stoffwechsel hauptsächlich in Richtung der Lysin-Synthese verschoben wurde. Mit der Erhöhung der Lysin-Produktion korrelierte ein erhöhter Fluß in den Pentosephosphatweg sowie ein erniedrigter decarboxylierender Rückfluß von Malat/Oxalacetat nach PEP/Pyruvat, um den erhöhten Bedarf an NADPH und Oxalacetat zu decken.

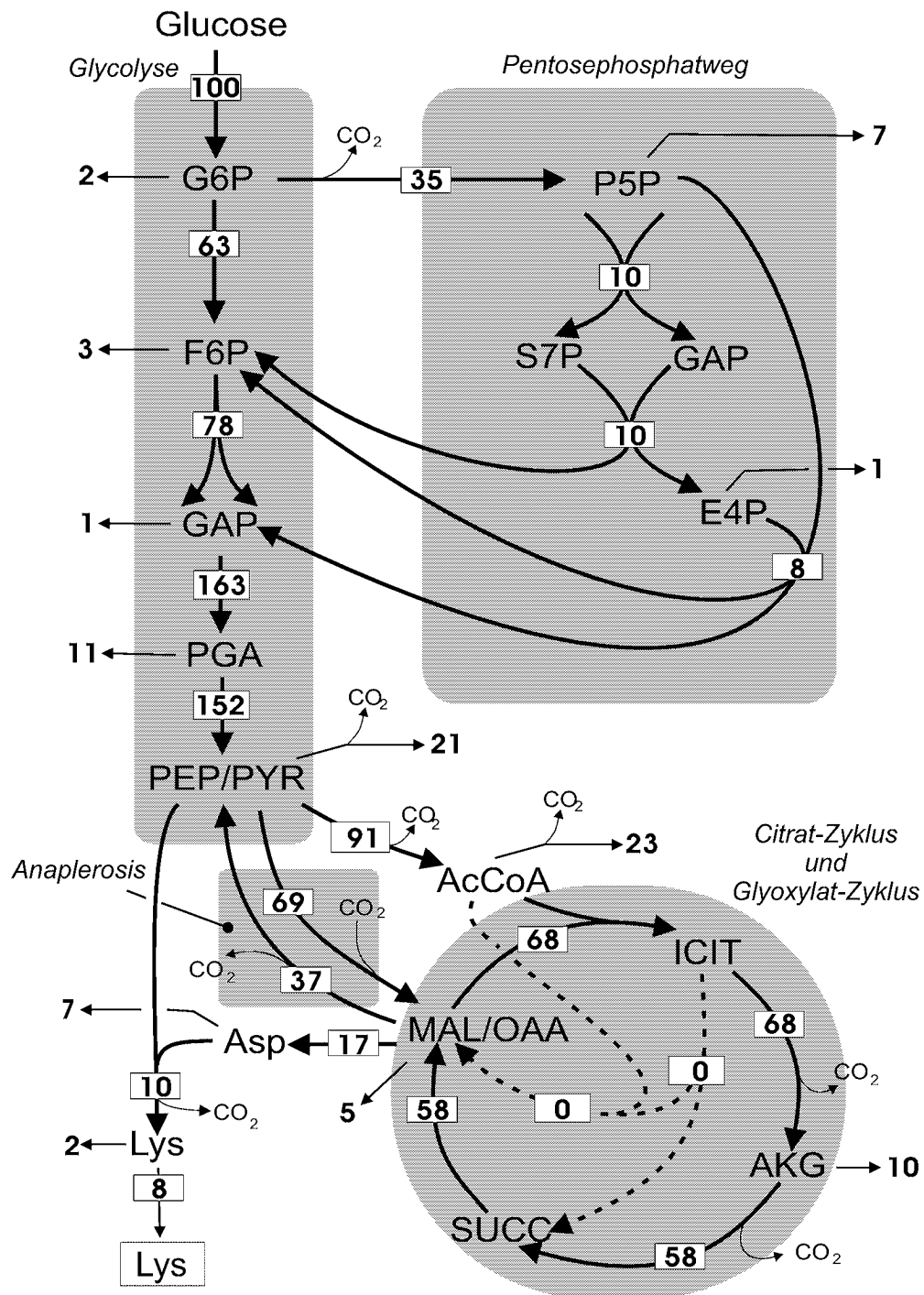


Abbildung 8: Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B von *C. glutamicum* bei exponentiellem Wachstum auf Glucose. Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($3.62 \pm 0.05 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3.

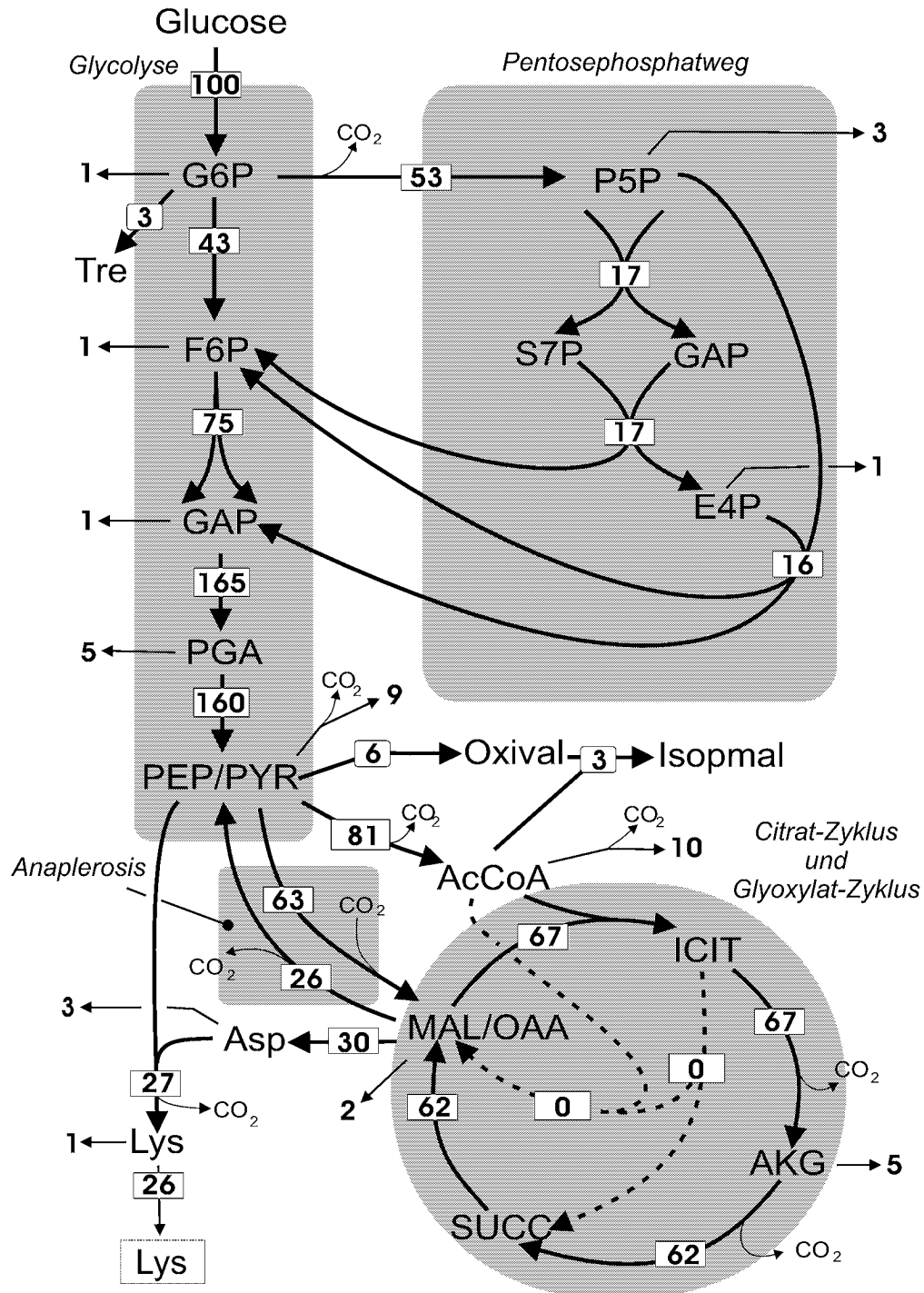


Abbildung 9: Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B von *C. glutamicum* bei geringem Wachstum in der Lysin-Produktionsphase. Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($1.47 \pm 0.04 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3. Oxival, α -Oxoisovalerat; Isopmal, α -Isopropylmalat.

1.2.3 Untersuchung der intrazellulären Glutamat-Konzentration und

Bestimmung der NADPH-Bilanz

Die durchgeführten Flußanalysen in der exponentiellen Wachstumsphase und der Lysin-Produktionsphase basierten auf den isotopomeren ^{13}C -Markierungsinformationen der cytoplasmatischen Metabolite. Die Verwendung von cytoplasmatischen Metaboliten bietet den Vorteil, daß die vollständige Markierung dieser Substanzen direkt über den Zentralmetabolismus wesentlich schneller erfolgt und sich die Markierung im Cytoplasma beständig an neue Stoffwechselveränderungen anpaßt.

Um die schnelle Äquilibration der ^{13}C -Markierung im Zentralmetabolismus zu verdeutlichen, wurde die intrazelluläre Glutamat-Konzentration von *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum und Leucin-Limitierung bestimmt. Wie aus **Abbildung 10** zu sehen ist, erniedrigte sich die intrazelluläre Glutamat-Konzentration von ca. 60 mM in der exponentiellen Phase auf ca. 40 mM in der Lysin-Produktionsphase, was mit dem verminderten Bedarf an Glutamat bei verringerter Biomassebildung begründet werden kann. Relativ hohe intrazelluläre Glutamat-Konzentrationen sind typisch für *C. glutamicum* und können, je nach Stamm und Kulturbedingung, zwischen 200 und 50 mM liegen (Schrumpf, 1991; Tesch, 1998; Petersen *et al.*, 2001). Um zu belegen, daß die verwendete Markierungsinformation aus dem Cytoplasma die tatsächliche Stoffwechselsituation widerspiegelt und zum Zeitpunkt der Probenahme eine vollständige Äquilibration der ^{13}C -Markierung im Cytoplasma vorlag, wurden die Umsatzzeiten (*Turnover*-Zeiten) am Beispiel des Glutamat-Pools bestimmt, wobei die *Turnover*-Zeit die mittlere Verweilzeit eines bestimmten Metaboliten in dessen intrazellulären Pool beschreibt. Ein 95%iger Austausch des jeweiligen intrazellulären Pools wird dadurch definiert, wenn die *Turnover*-Zeit dreimal durchlaufen wurde (R. Takors, persönl. Mitteilung, 2003).

Die *Turnover*-Zeit von Glutamat läßt sich anhand des Lysin-Synthese-Wegs bzw. an der daran gekoppelten Stickstoffassimilation ermitteln. Während der Lysin-Synthese, von Oxalacetat ausgehend, erfolgen zwei Transaminierungsreaktionen über die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und die Succinyl-Aminoketopimelat-Transaminase des Succinyl-Diaminopimelat-Wegs (Sonntag *et al.*, 1993). Dabei wird Glutamat zu α -Ketoglutarat deaminiert. Dieses α -Ketoglutarat kann aber nun wieder über die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) reduktiv zu Glutamat aminiert werden (Tesch *et al.*, 1999).

Die Ammoniumkonzentration betrug bei der Probenahme für die Flußanalysen in der exponentiellen Wachstumsphase 270 mM und in der Lysin-Produktionsphase 200 mM, was bedeutet, daß Lysin unter den in dieser Arbeit verwendeten Kulturbedingungen zu ca. 70 % über den Succinyl-Diaminopimelat-Weg und nur zu 30 % über den Diaminopimelat-Dehydrogenase-Weg gebildet wurde (Sonntag *et al.*, 1993). Unter Verwendung dieser Informationen konnte anhand der GDH-Reaktionen der Glutamat-Fluß der exponentiellen

Ergebnisse

Phase mit $0.493 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und der Lysin-Prpduktionsphase mit $0.663 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bestimmt werden. Daraufhin wurde unter Berücksichtigung des cytoplasmatischen Volumens mit $1.95 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{l mg}_{\text{TG}}^{-1}$ (Schrumpf, 1991; Gutmann *et al.*, 1992) die *Turnover-Zeit* des Glutamat-Pools für die exponentielle Phase mit 3.7 min und für die Lysin-Produktionsphase mit 1.8 min berechnet. Die Zeit, in welcher 95 % des Glutamat-Pools ausgetauscht wäre, wurde mit 11 (exponentiellen Phase) bzw. 5 min (Lysin-Produktionsphase) bestimmt. Somit konnte gezeigt werden, daß die ^{13}C -Markierung in großen intrazellulären Pools wie Glutamat bereits in wenigen Minuten äquilibriert ist.

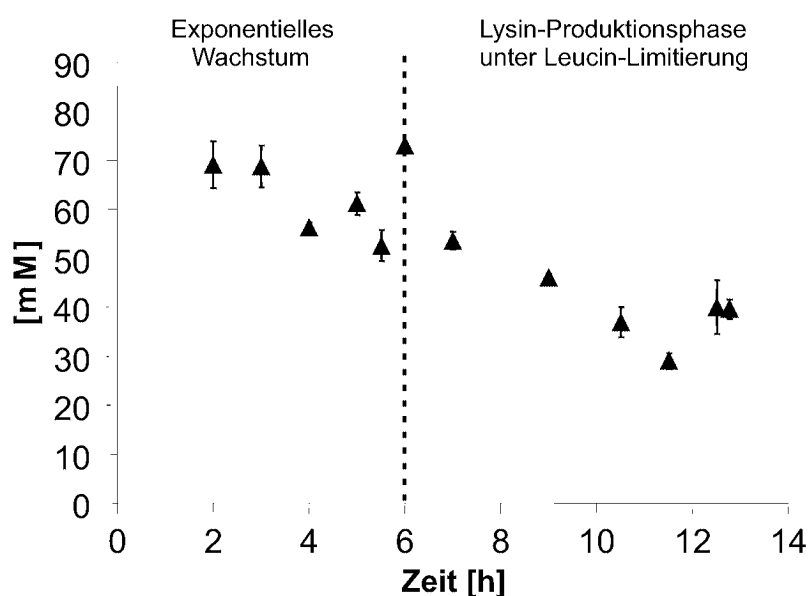


Abbildung 10: Verlauf der intrazellulären Glutamat-Konzentration während des exponentiellen Wachstums und in der Lysin-Produktionsphase.

Weiterhin war es interessant zu ermitteln, ob die Bereitstellung von NADPH für die Biomassebildung und Lysin-Synthese hauptsächlich über den Pentosephosphatweg und über die Isocitrat-Dehydrogenase erfolgt (Moritz, 2000), oder ob noch weitere Enzymreaktionen, wie z.B. das Malat-Enzym, zur NADPH-Bildung in beiden Fermentationsphasen beitragen. Die NADPH-Produktion bei exponentiellem Wachstum und in der Lysin-Produktionsphase konnte anhand der ermittelten Flüsse in den Pentosephosphatweg und über den Isocitrat-Dehydrogenase-Fluß errechnet werden. Der NADPH-Bedarf für das Wachstum wurde anhand des NADPH-Bedarfs von $14.8 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1}$ (Marx *et al.*, 1996) und der jeweiligen Wachstumsrate berechnet. Der NADPH-Bedarf für die Lysin-Bildung wurde anhand der jeweiligen Lysin-Produktionsrate und dem stöchiometrischen NADPH-Bedarf von $4 \text{ mol mol}_{\text{Lysin}}^{-1}$ bestimmt. In **Tabelle 9** ist der NADPH-Bedarf sowie die NADPH-Produktion in beiden Fermentationsphasen dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 9: NADPH-Bedarf und NADPH-Produktion in *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum und in der Lysin-Produktionsphase.

Wachstumsphase	NADPH-Bedarf (mmol g _{TG} ⁻¹ h ⁻¹)		
	Biomasse	Lysin-Synthese	Summe
exponentielles Wachstum	4.53 ± 0.16	1.16 ± 0.04	5.69 ± 0.16
Lysin-Produktionsphase	0.85 ± 0.01	1.55 ± 0.04	2.40 ± 0.04

Wachstumsphase	NADPH-Produktion (mmol g _{TG} ⁻¹ h ⁻¹)		
	durch PPW ^a	durch ICD ^b	Summe
exponentielles Wachstum	2.53 ± 0.51	2.46 ± 0.27	5.00 ± 0.58
Lysin-Produktionsphase	1.58 ± 0.21	0.98 ± 0.15	2.57 ± 0.26

^a PPW, Pentosephosphatweg; ^b ICD, Isocitrat-Dehydrogenase.

Es wird deutlich, daß der NADPH-Bedarf des Stoffwechsels bei exponentiellem Wachstum und in der Lysin-Produktionsphase bereits durch den Pentosephosphatweg und durch die Isocitrat-Dehydrogenase weitgehend gedeckt wurde. Anscheinend hatten in beiden Fermentationsphasen andere NADPH-regenerierende Reaktionen keinen signifikanten Anteil an der Bereitstellung von NADPH. Weiterhin wird deutlich, daß der NADPH-Bedarf in der Lysin-Produktionsphase um mehr als das 2-fache erniedrigt war. Dies ist mit der insgesamt starken Verminderung des Wachstums bzw. mit dem geringeren Bedarf an NADPH für die Biomassebildung zu erklären. Des weiteren erfolgte die NADPH-Produktion in der exponentiellen Phase zu etwa gleichen Teilen durch den Pentosephosphatweg und durch die Isocitrat-Dehydrogenase. In der Lysin-Produktionsphase war hingegen die Nachlieferung über die Isocitrat-Dehydrogenase im Vergleich zum Pentosephosphatweg um ca. 40 % geringer. Dieses Ergebnis steht mit den Flußanalysen von Marx *et al.* (1997, 1999) in Einklang, wonach ein erhöhter Fluß in den Pentosephosphatweg mit einem erniedrigten Fluß über die Isocitrat-Dehydrogenase korrelierte und umgekehrt. Anhand der **Tabelle 8** wird deutlich, daß aufgrund des reduzierten Bedarfs an Metaboliten für die Biomassebildung die Flußaktivität des Citrat-Zyklus und somit auch die der Isocitrat-Dehydrogenase in der Lysin-Produktionsphase signifikant erniedrigt war. Die dadurch reduzierte NADPH-Regenerierung über die Isocitrat-Dehydrogenase wird in *C. glutamicum* bei steigender Lysin-Produktion durch eine Erhöhung des Flusses in den Pentosephosphatweg kompensiert (Wittmann & Heinzle, 2002).

1.3 Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse von *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum unter technischer *Batch*-Kultivierung

Um Stoffflußanalysen im technischen *Batch*-Maßstab durchführen zu können, wurde erstmals die sogenannte Sensorreakorteknik angewendet. Sowohl die Entwicklung als auch die Durchführung der Fermentationen wurden im IBT2 (R. Takors und M. El Massaoudi) durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeit war, die Anwendbarkeit dieser Reaktortechnik für metabolische Stoffflußanalysen zu überprüfen und zum ersten Mal eine Serie von Flußkarten zu erstellen, welche die Stoffflußveränderungen im Zentralmetabolismus während einer technischen *Batch*-Fermentation dokumentieren.

1.3.1 Vergleich des Wachstums und der extrazellulären Metabolitkonzentrationen im Produktions- und Sensorreaktor

Für die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse wurde der Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B in einer *Batch*-Fermentation im Produktionsreaktor bei exponentiellem Wachstum ($\mu = 0.20 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$) kultiviert (**Abbildung 11**). Zu drei nacheinander folgenden Zeitpunkten wurde der Sensorreaktor mit der Kultur aus dem Produktionsreaktor beschickt, die Kultur mit [$^{13}\text{C}_6$]Glucose supplementiert (Glucose-Puls) und jeweils die Parallelfermentation für 2 bis 2.5 h durchgeführt (Punkt II.4.3). Die in diesem Experiment verwendeten Markierungsverhältnisse an [$^{13}\text{C}_6$]Glucose zur unmarkierten Glucose betrugen 7.7 % für Phase 1, 7.2 % für Phase 2 und 10.5 % für Phase 3. Nach jeder Parallelfermentation wurde der komplette Sensorreaktorinhalt geerntet und sofort für die nachfolgenden Analysen aufgearbeitet. Die einzelnen ^{13}C -Markierungszeiträume bzw. Parallelfermentationen im Sensorreaktor werden in dieser Arbeit vereinfacht als Phasen definiert. Die gesamte Fermentation erfolgte bei ausreichender Leucin-Konzentration.

Um zu prüfen, ob nicht der zusätzliche Glucose-Puls und die Überführung der Zellen in den Sensorreaktor Änderungen bei der Substrataufnahme und im Stoffwechsel hervorruft, wurden die Konzentrationen der Substrate und Produkte in beiden Reaktoren bestimmt. Hierzu wurden zur Bestimmung der Konzentrationsverläufe Kulturüberstände aus beiden Reaktoren entnommen und mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie analysiert. Neben den Substraten Glucose, Leucin und dem gewünschten Fermentationsprodukt Lysin wurden noch Trehalose und Valin als Nebenprodukte identifiziert. **Abbildung 12** zeigt, daß das Zellwachstum bei allen drei Parallelfermentationen nahezu identisch war und die Bildung von Lysin in beiden Bioreaktoren annähernd gleich verlief. Der Leucin-Verbrauch und die Bildung von Nebenprodukten stimmte in beiden Reaktoren ebenfalls sehr gut überein. Interessanterweise wurde Valin zunächst bis zu einer Prozeßzeit von ca. 13 h produziert und anschließend wieder verwertet. Dieser Konzentrationsverlauf wurde sehr genau vom Sensorreaktor nachvollzogen, was bedeutet, daß der Stoffwechsel von *C. glutamicum* in

beiden Reaktoren vergleichbar war. Diese Ergebnisse zeigen also, daß die Überführung des Organismus vom Produktions- in den Sensorreaktor und der zusätzliche [$^{13}\text{C}_6$]Glucose-Puls für die ^{13}C -Markierung den Zentralstoffwechsel in *C. glutamicum* MH20-22B nicht beeinträchtigt hatten.

Um die Güte der parallelen Fermentationen im Produktions- und Sensorreaktor besser graphisch zu verdeutlichen, wurden die Konzentrationen der Substrate und (Neben-) Produkte von beiden Reaktoren in Phasendiagrammen gegeneinander aufgetragen (**Abbildung 12**). Der Verlauf der Regressionsgeraden mit einem Winkel bei 45° zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der Konzentrationsverläufe in beiden Reaktoren. Als weiteres Gütekriterium wurde der Regressionskoeffizient r ermittelt. Dieser Koeffizient liegt z.B. bei der Biomasseproduktion ($r = 0.995$), bei der Glucose-Aufnahme ($r = 0.998$) und bei der Lysin-Bildung ($r = 0.998$) nahe bei 1.

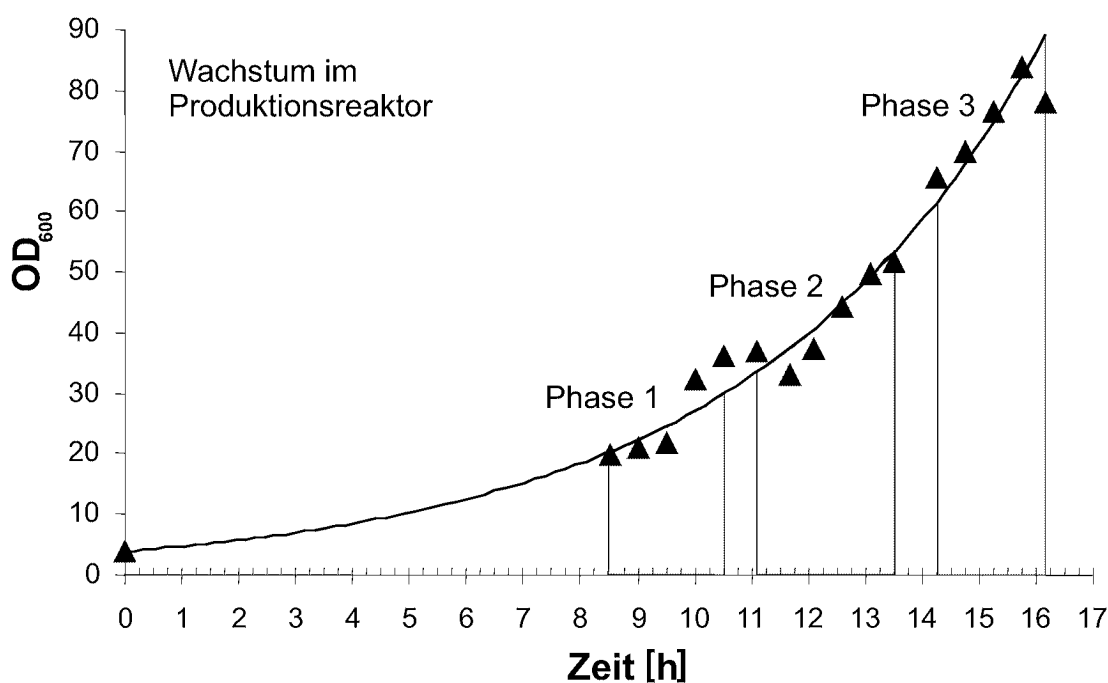


Abbildung 11: Exponentielles Wachstum von *C. glutamicum* MH20-22B im Produktionsreaktor. Parallele ^{13}C -Markierungsexperimente im Sensorreaktor wurden nacheinander zu drei Zeitpunkten durchgeführt. ^{13}C -Markierungszeiträume: 8.5-10.5 h (Phase 1), 11-13.5 h (Phase 2) und 14-16 h (Phase 3).

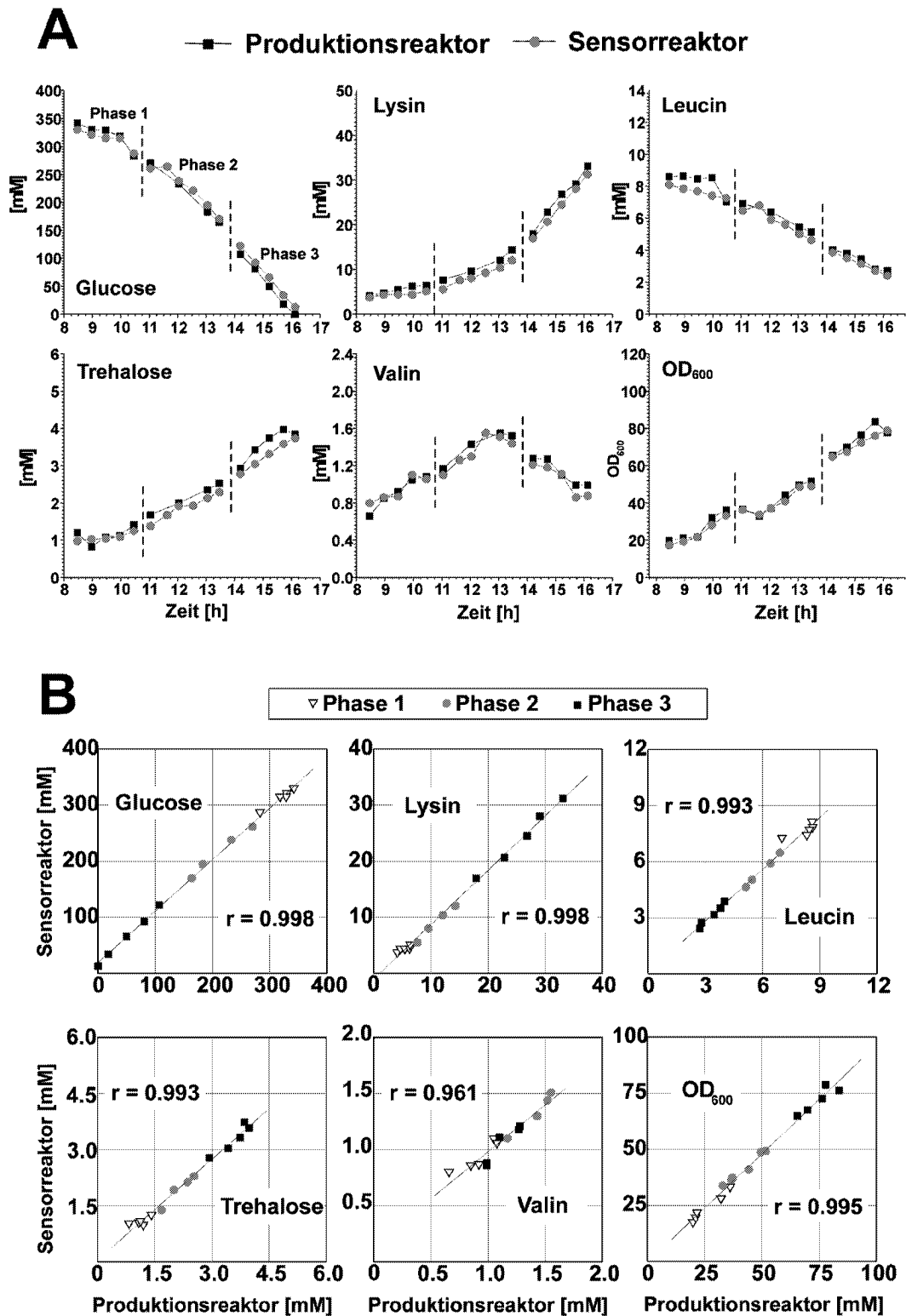


Abbildung 12: Batch-Fermentation von *C. glutamicum* MH20-22B im Produktionsreaktor und in dem daran angeschlossenen Sensorreaktor bei exponentiellem Wachstum. Es wurden nacheinander drei Parallelfermentationen (Phase1, 2 und 3) durchgeführt. **A:** Auftragung des Wachstums (OD_{600}), der Konzentration der Kohlenstoffquelle Glucose, der gewünschten Aminosäure Lysin und der Nebenprodukte Trehalose und Valin im Produktionsreaktor und Sensorreaktor. Die hier dargestellten Phasen sind aus Abbildung 11 zu entnehmen. **B:** Auftragung der Konzentrationen im Produktionsreaktor gegen die im Sensorreaktor gemessenen Konzentrationen. r , Regressionskoeffizient.

Ergebnisse

Für die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse wurden anhand der Konzentrationsverläufe aus den Sensorreaktorfermentationen die wichtigsten spezifischen Aufnahme- bzw. Produktionsraten für jede der drei Phasen ermittelt (**Tabelle 10**). Dabei traten die größten Unterschiede im Bereich der Lysin-Bildung auf, wobei sich von Phase 1 bis zur Phase 3 die Lysin-Produktion um den Faktor von etwa drei erhöhte.

Tabelle 10: Gemessene extrazelluläre Stoffwechselraten bei exponentiellem Wachstum von *C. glutamicum* MH20-22B im Sensorreaktor (Phase 1-3). Die Standardabweichungen wurden durch Regressionsanalysen erhalten und zeigen die wahren Meßfehler der einzelnen Raten während der jeweiligen Parallelferrmentation.

Raten in $\text{mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Phase 1	Phase 2	Phase 3
Glucose-Aufnahme	3.70 ± 0.34	3.80 ± 0.37	3.20 ± 0.20
Leucin-Aufnahme	0.074 ± 0.007	0.076 ± 0.006	0.042 ± 0.002
Lysin-Produktion	0.113 ± 0.024	0.260 ± 0.015	0.414 ± 0.024
Trehalose-Produktion	0.013 ± 0.009	0.037 ± 0.005	0.029 ± 0.002

1.3.2 Analyse der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus bei exponentiellem Wachstum

Anders als zu den bisher in dieser Arbeit durchgeführten Flußanalysen erfolgten die Bestimmungen der intrazellulären Stoffflüsse für alle drei Phasen anhand von isotopomeren Markierungsmustern aus proteinogenen Aminosäuren. Diese Aminosäuren wurden zuvor aus Biomassehydrolysaten gewonnen und anschließend mit der 2D-NMR-Spektroskopie vermessen. Dabei konnten insgesamt 29 isotopomere Markierungsmuster einzelner Kohlenstoffatome von 11 verschiedenen Aminosäuren bestimmt werden (**Tabelle 17, 18 und 19, Anhang**). Ausgewählte *in vivo*-Stoffflüsse in $\text{mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und deren Standardabweichung für alle drei Fermentationsphasen sind in **Tabelle 11** angegeben.

Die Flüsse durch die Glycolyse und den Citrat-Zyklus wurden sehr gut bestimmt und wiesen eine Standardabweichung unter 5 % auf. Im Bereich der Anaplerosis lag die Abweichung bei den Carboxylierungsflüssen unter 5 % und bei den decarboxylierenden Rückflüssen unter 15 %. Größere Ungenauigkeiten der Flüsse traten jedoch bei der Abzweigung von Glucose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg und die Glycolyse auf. Dabei betrug die Abweichung für den Fluß in die Glycolyse in allen drei Phasen zwischen 10 und 20 %. Der Fluß in den Pentosephosphatweg wies sogar eine Abweichung von bis zu 40 % (Phase 3) auf.

Ergebnisse

Tabelle 11: Ausgewählte, mit Hilfe der ^{13}C -Flußanalyse berechnete Stoffflüsse und deren Standardabweichungen des Zentralmetabolismus von *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum in allen drei Parallelfermentationen im Sensorreaktor (Phase 1-3). Die einzelnen Phasen können aus Abbildung 11 entnommen werden.

Umsetzung	<i>in vivo</i> -Stoffflüsse (mmol g _{RG} ⁻¹ h ⁻¹)		
	Phase 1	Phase 2	Phase 3
Glucose-Aufnahme	3.13 ± 0.07	3.23 ± 0.07	3.29 ± 0.07
Glucose-6-P → Pentose-5-P + CO ₂	1.18 ± 0.20	0.98 ± 0.24	1.12 ± 0.46
Glucose-6-P → Fructose-6-P	1.88 ± 0.20	2.13 ± 0.23	2.06 ± 0.44
Triosephosphat → PEP/Pyruvat	4.98 ± 0.15	5.15 ± 0.14	5.25 ± 0.17
PEP/Pyruvat → AcCoA + CO ₂	3.69 ± 0.13	3.59 ± 0.12	3.43 ± 0.15
Malat/Oxalacetat + AcCoA → Isocitrat	3.16 ± 0.15	3.05 ± 0.14	2.90 ± 0.17
Isocitrat → α-Ketoglutarat + CO ₂	3.16 ± 0.20	3.05 ± 0.19	2.90 ± 0.21
Succinat → Malat/Oxalacetat	2.88 ± 0.10	2.77 ± 0.10	2.62 ± 0.10
PEP/Pyruvat → Malat/Oxalacetat	1.70 ± 0.08	1.58 ± 0.07	1.32 ± 0.07
Malat/Oxalacetat → PEP/Pyruvat	0.98 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.32 ± 0.05
Malat/Oxalacetat → Aspartat	0.32 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.61 ± 0.01
Lysine-Produktion	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.41 ± 0.01

Erläuterungen siehe Tabelle 8.

Diese hohen Ungenauigkeiten können damit begründet werden, daß in diesen Markierungsexperimenten ausschließlich [$^{13}\text{C}_6$]Glucose verwendet wurde, welches ein nicht ausreichendes Markierungssubstrat für die exakte Bestimmung der Flüsse von Glucose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg bzw. in die Glycolyse darstellt (Möllney *et al.*, 1999). Die Flußverteilung des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum* in den drei Phasen ist in **Abbildung 13, 14** und **15** dargestellt.

Der Fluß von Glucose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg betrug jeweils 38 % (Phase 1), 30 % (Phase 2) und 35 % (Phase 3). Der Nettofluß durch die Glycolyse, von Fructose-6-Phosphat zu den C₃-Einheiten PEP/Pyruvat, betrug in allen drei Phasen ca. 160 %. Ausgedrückt in C₆-Einheiten beträgt der Glycolysefluß bis PEP/Pyruvat 80 %, was zeigt, daß bereits ca. 20 % des Substrats über die Stufe der Triosephosphate für die Biomassesynthese und CO₂-Produktion verwendet wurde.

Signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf der *Batch*-Fermentation wurden im Bereich der Anaplerosis festgestellt. Der decarboxylierende Rückfluß erniedrigte sich in der Phase 2 um 30 % und in der Phase 3 sogar um 70 % im Vergleich zur Phase 1. Diese Abnahme

korrelierte mit der Lysin-Produktion, welche sich in der Phase 2 und 3 verdoppelte bzw. verdreifachte.

Um Informationen über die Regulation des decarboxylierenden Rückflusses bei steigender Lysin-Produktion zu erhalten, wurden die spezifischen PEP-Carboxykinase-Aktivitäten in *C. glutamicum* MH20-22B am Ende einer jeden Fermentation im Sensorreaktor bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die spezifischen Aktivitäten ($\text{U/mg}_{\text{Protein}}$) während jeder Phase nahezu identisch waren (Phase 1: 0.072 ± 0.002 , Phase 2: 0.067 ± 0.020 und Phase 3: 0.072 ± 0.006) und daher keine Regulation auf Gen-Expressionsebene erfolgte.

Im Bereich des anaplerotischen Carboxylierungsflusses waren ebenso im Verlauf der *Batch*-Fermentation auffällige Veränderungen festzustellen. Dabei erniedrigte sich der Fluß von PEP/Pyruvat zu Malat/Oxalacetat von 54 % in der Phase 1 auf 49 % in Phase 2 und sogar auf 40 % in Phase 3. Der anaplerotische Nettofluß hingegen erhöhte sich bei steigender Lysin-Produktion von 23 % in Phase 1 auf 30 % in Phase 3. Diese Erhöhung des Nettoflusses korrelierte mit dem Fluß von Malat/Oxalacetat nach Aspartat, welcher sich während der Fermentation verdoppelte.

Die in dieser Arbeit dargestellte Serie von Markierungsexperimenten zeigt, daß es mit Hilfe des Sensorreaktorsystems möglich ist, eine zeitlich aufgelöste Stoffflußanalyse durchzuführen. Diese Flußanalysen verdeutlichten zum ersten Mal die Veränderungen der Anaplerosis während des exponentiellen Wachstums von *C. glutamicum* MH20-22B in einer technischen *Batch*-Fermentation. Dabei korrelierte eine Erniedrigung des anaplerotischen Carboxylierungsflusses und des decarboxylierenden Rückflusses mit einer Erhöhung der Lysin-Produktion. Der anaplerotische Nettofluß hingegen erhöhte sich im Laufe der Fermentation. Anscheinend reguliert *C. glutamicum* MH20-22B die anaplerotischen Flüsse, um einen höheren Produktfluß zu erreichen.

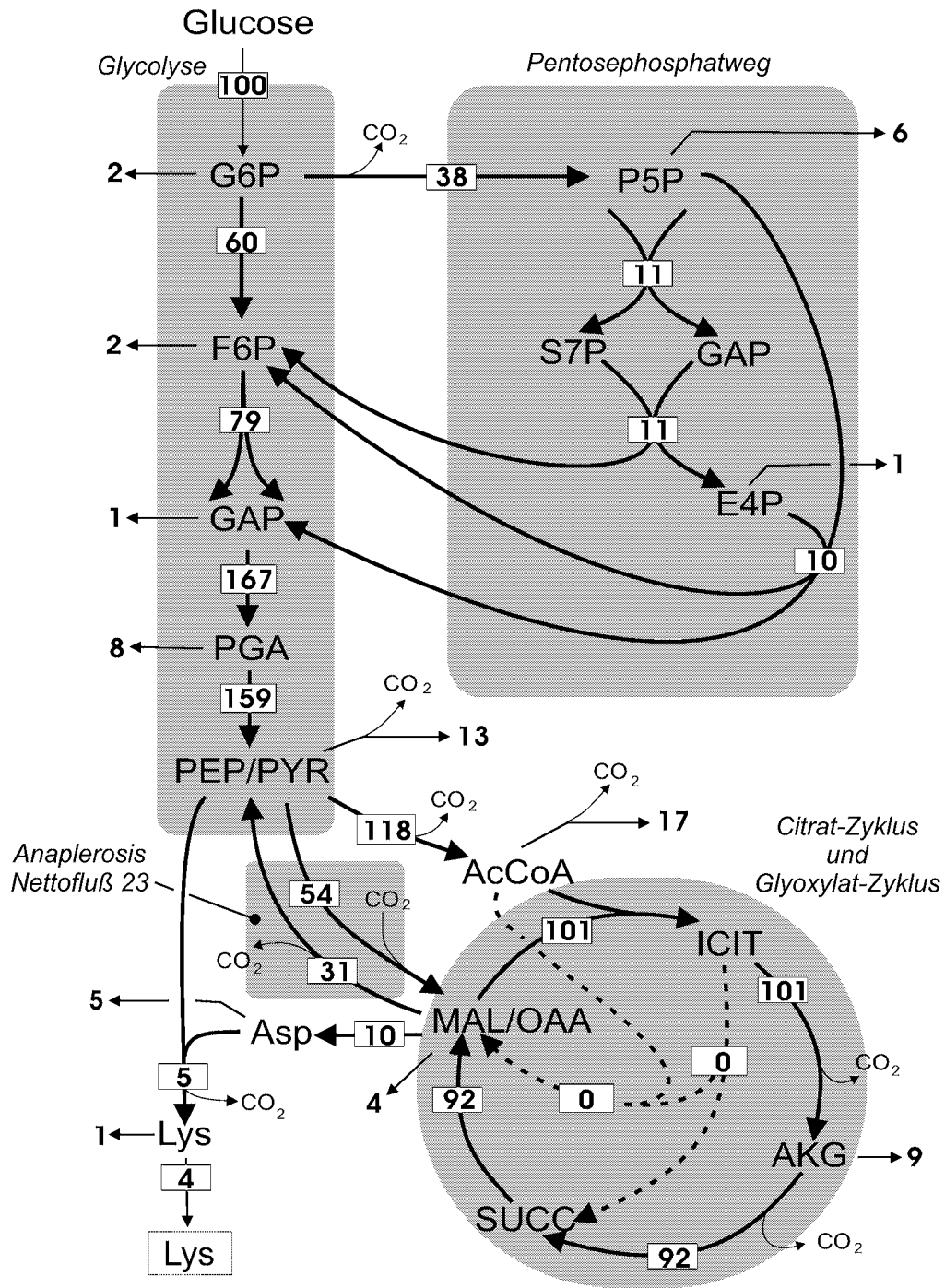


Abbildung 13: Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B von *C. glutamicum* nach 8.5-10.5 h Parallelerfermentation im Sensorreaktor bei exponentiellem Wachstum (**Phase 1**). Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($3.13 \pm 0.07 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3.

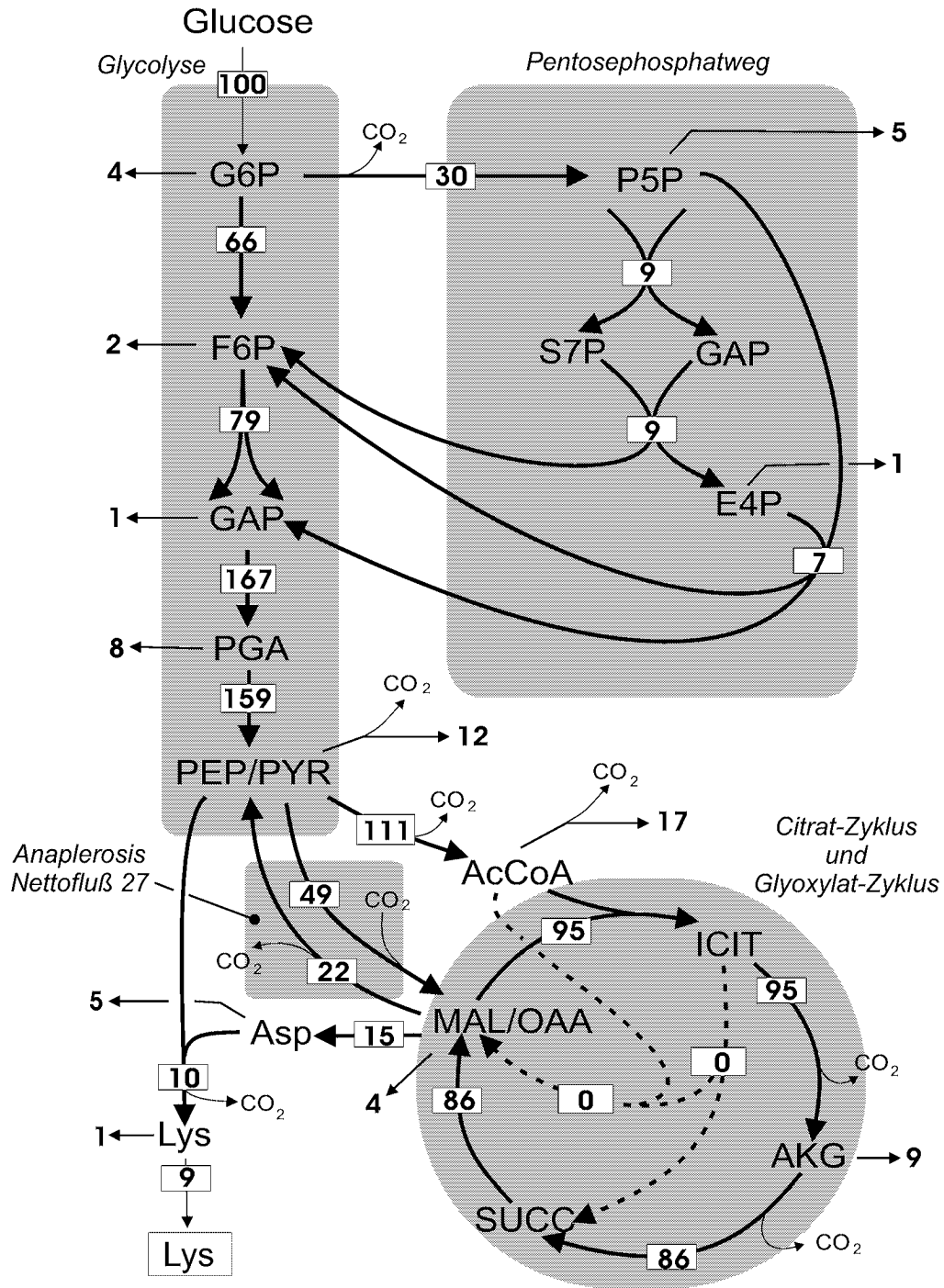


Abbildung 14: Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B von *C. glutamicum* nach 11-13.5 h Parallelferrmentation im Sensorreaktor bei exponentiellem Wachstum (**Phase 2**). Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($3.23 \pm 0.07 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3.

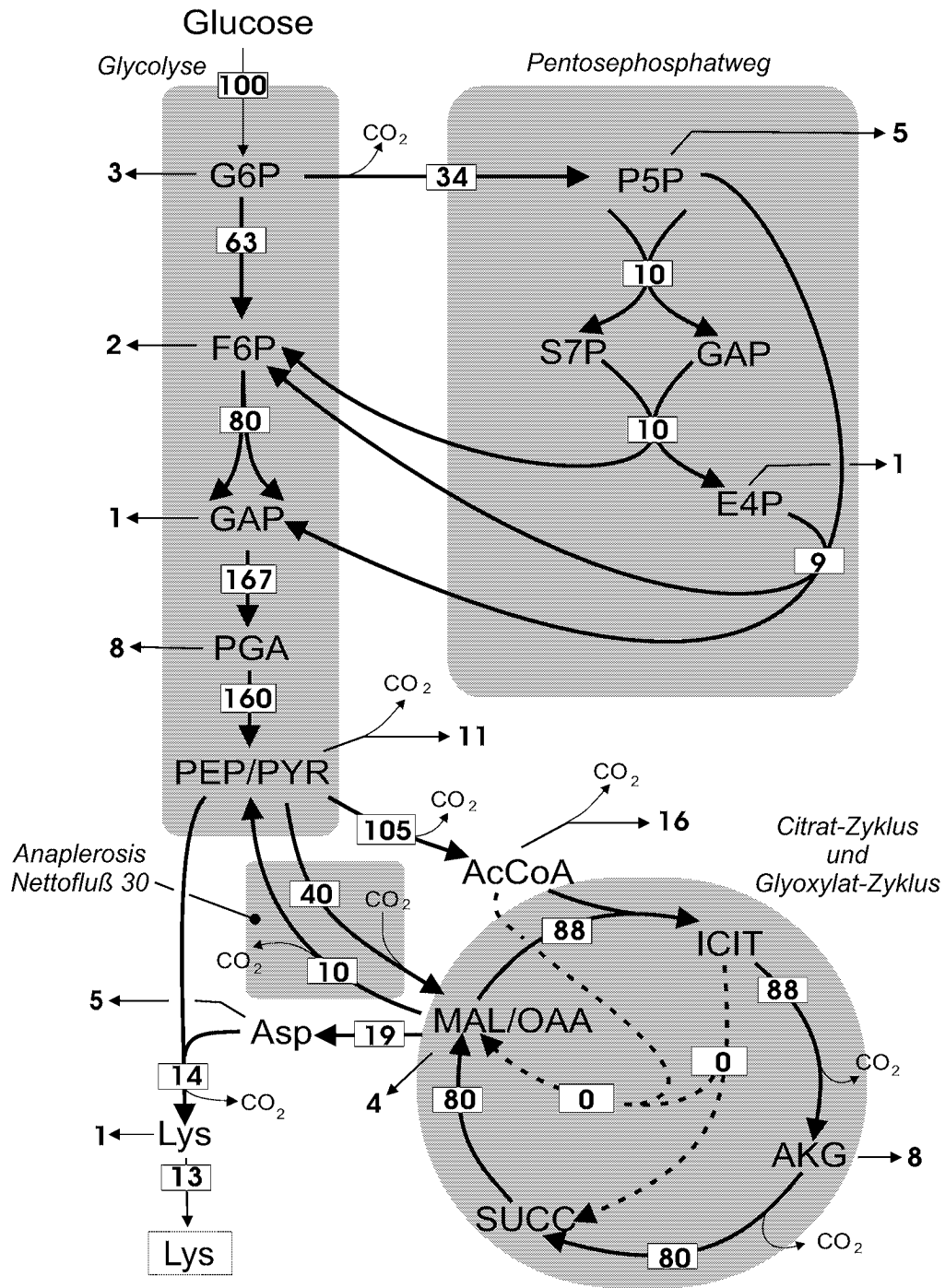


Abbildung 15: Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B von *C. glutamicum* nach 14-16 h Parallelerfermentation im Sensorreaktor bei exponentiellem Wachstum (**Phase 3**). Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($3.29 \pm 0.07 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3.

1.3.3 Korrektur der unvollständigen ^{13}C -Markierung der Biomasse

Die Stoffflußanalysen der einzelnen Sensorreaktorfermentationen basieren auf ^{13}C -Isotopomerenmarkierungen der proteinogenen Aminosäuren aus der Biomasse. Dabei ist ein Teil der Biomasse (Inoculum des Sensorfermenters) auch bis zum Ende der Fermentation unmarkiert. Aufgrund der natürlich vorhandenen ^{13}C -Markierung von 1.11 % führt dies jedoch zu störenden ^{13}C -Singulettsignalen im NMR-Spektrum. Diese Hintergrundsignale müssen korrigiert werden, damit die Flußanalyse zuverlässige Ergebnisse erzeugt. Hierzu kann man die Singulettanteile eines jeden gemessenen NMR-Signals entsprechend der Hintergrundmarkierung verringern, wobei allerdings diese Methode sehr aufwendig ist. Mathematisch läßt sich zeigen, daß der gleiche Effekt erreicht werden kann, wenn man den prozentualen ^{13}C -Markierungsanteil der eingesetzten Glucose für die Flußanalyse im Stoffflußmodell heruntersetzt (A.A. de Graaf, persönl. Mitteilung, 2001). Diese Korrektur soll anhand der zweiten Parallelerfermentation (Phase 2) des Sensorreaktoorexperiments veranschaulicht werden (**Abbildung 16**).

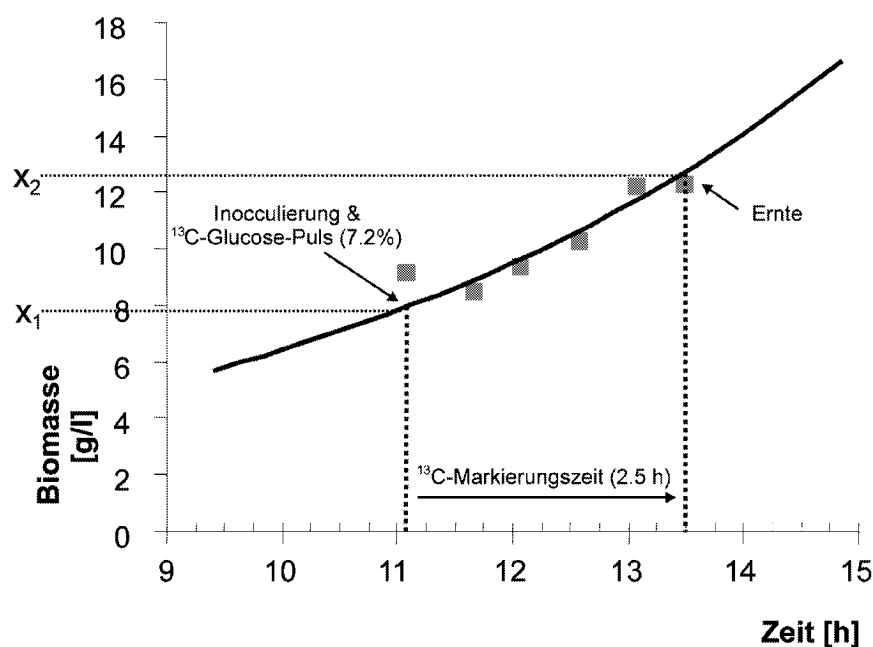


Abbildung 16: ^{13}C -Markierung und Wachstum während der 2. Parallelerfermentation (Phase 2) im Sensorreaktoorexperiment. x_1 : unmarkierte Zellen beim Fermentationsstart; x_2 : Gesamtbiomasse am Ende der Parallelerfermentation auf einem Gemisch aus markierter und unmarkierter Glucose.

Zu Beginn der Parallelerfermentation wurde der Sensorreaktor mit unmarkierter Biomasse x_1 (ca. 7.9 g/l) aus dem Produktionsreaktor inokuliert. Gleichzeitig erfolgte ein $[^{13}\text{C}_6]$ Glucose-Puls in den Sensorreaktor, wobei sich ein Anteil an $^{13}\text{C}_6$ -markierter Glucose von $L = 7.2\%$ einstellte (s.o.). Während dieser Parallelerfermentation wuchsen die Zellen für einen Zeitraum von 2.5 h auf einem Gemisch von unmarkierter und markierter Glucose zu einer

Konzentration von x_2 (ca. 12.25 g/l) heran. Die Menge an Biomasse, die nun aus markierter Glucose gebildet wurde, läßt sich mit der Gleichung $(x_2 - x_1)/x_2$ berechnen. Für die Korrekturrechnung des prozentualen Anteils an verwendeter ^{13}C -Glucose L^* gilt also $L^* = (x_2 - x_1)/x_2 \times L$. Unter Verwendung dieser Formel wurde somit der Anteil an ^{13}C -Glucose zur Gesamtglucose in Phase 2 des Sensorreaktorexperiments mit 2.6 % bestimmt. Dieser Wert wurde nun im Modell für die Flußanalyse berücksichtigt. Der korrigierte Markierungsanteil der beiden anderen Parallelfementationen betrug 2.5 % für Phase 1 und 3.3 % für Phase 3.

1.4 Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse von *C. glutamicum* MH20-22B bei maximaler Lysin-Produktion unter technischer *Fedbatch*-Kultivierung

In Anlehnung an die Markierungsexperimente im Sensorreaktor bei exponentiellem Wachstum in einer *Batch*-Fermentation wurden nun Markierungsexperimente mit dem Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B in einem an technische Bedingungen angepaßten *Fedbatch*-Prozeß (Zulaufverfahren) unter Leucin-limitierenden Bedingungen durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, wie sich die intrazellulären Stoffflüsse bei maximaler Lysin-Produktion verhalten. Die Fermentationen wurden im IBT2 (R. Takors und M. El Massaoudi) durchgeführt.

1.4.1 Vergleich des Wachstums und der extrazellulären Metabolitkonzentrationen im Produktions- und Sensorreaktor

Für die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse in *C. glutamicum* MH20-22B bei maximaler Lysin-Bildung wurde dieser Stamm zunächst bei exponentiellem Wachstum mit ausreichender Leucin-Konzentration im Produktionsreaktor kultiviert. Nachdem das Leucin im Medium verbraucht war, erfolgte der Übergang in die Lysin-Produktionsphase. In dieser Produktionsphase, in welcher keine Zunahme der Biomasse erfolgte, da sowohl extra- als auch intrazelluläres Leucin komplett verbraucht war, wurde der Sensorreaktor zu zwei nacheinander folgenden Zeitpunkten mit Kultur aus dem Produktionsreaktor beschickt, das gewünschte ^{13}C -Markierungsverhältnis durch Supplementation mit $[^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ eingestellt und der Glucose-Zulauf gestartet (Punkt II.4.3). Die jeweiligen Parallelfementationen wurden für 3 h durchgeführt (**Abbildung 17**). Am Ende einer jeden Parallelfementation wurde das Markierungsverhältnis an $[^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ zur unmarkierten Glucose mit 16.5% für Phase 1 und mit 17.9 % für Phase 2 bestimmt.

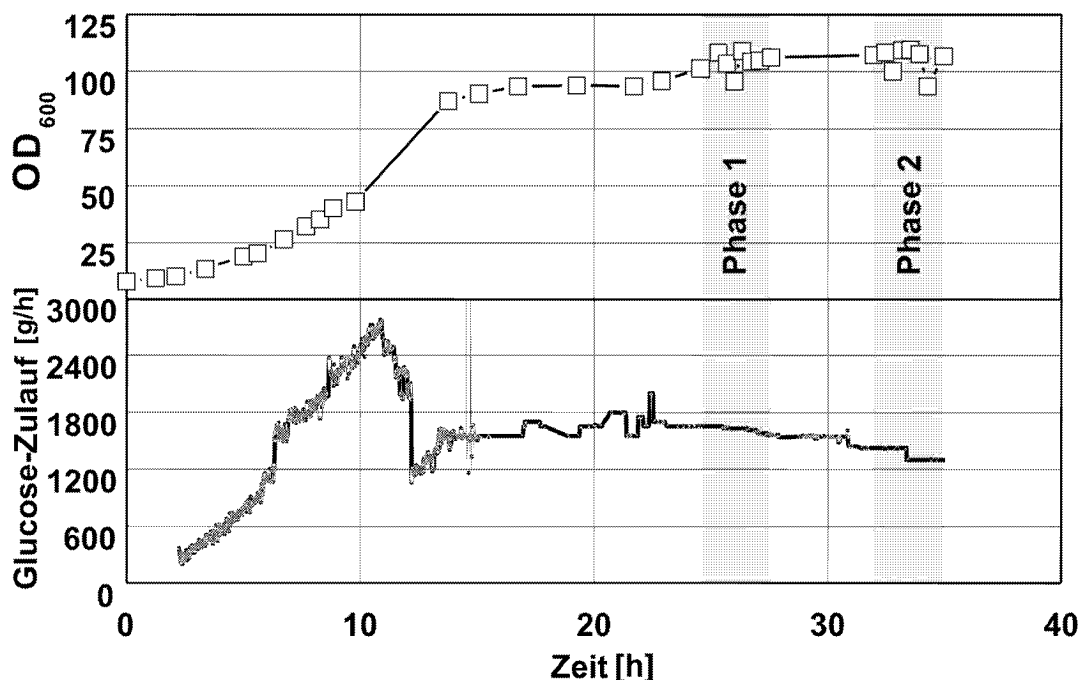


Abbildung 17: Fedbatch-Fermentation mit *C. glutamicum* MH20-22B im Produktionsreaktor unter Leucin-Limitierung. Parallele ^{13}C -Markierungsexperimente im Sensorreaktor wurden nacheinander zu zwei Zeitpunkten in der Lysin-Produktionsphase durchgeführt. ^{13}C -Markierungszeiträume: 24,5-27,5 h (Phase 1) und 32-35 h (Phase 2).

Um die Übereinstimmung der Parallelf fermentationen im Sensor- bzw. Produktionsreaktor zu überprüfen, wurden die Zelldichte (OD_{600}) sowie der Konzentrationsverlauf von Glucose, Lysin und der Nebenprodukte Lactat, Trahalose und Isopropylmalat bestimmt. Wie **Abbildung 18** zeigt, stimmte der Verlauf der extrazellulären Lysin-Konzentration und der Biomasse (OD_{600}) im Produktions- und Sensorreaktor sehr gut überein. Ebenfalls wurden die Nebenprodukte Lactat, Trehalose und Isopropylmalat in beiden Reaktoren synchron produziert, was zeigt, daß auch in diesem Experiment die Stoffwechselsituation in beiden Reaktoren vergleichbar war.

Für die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse wurden aus den Sensorreaktorfermentationen die wichtigsten spezifischen Aufnahme- bzw. Produktionsraten für jede der zwei Phasen ermittelt (**Tabelle 12**). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, was auf eine vergleichbare Stoffwechselsituation von *C. glutamicum* MH20-22B in beiden Markierungszeiträumen hindeutet. Lediglich die Glucose-Aufnahme und die Lysin-Bildung nahmen in der Phase 2 nur sehr geringfügig ab.

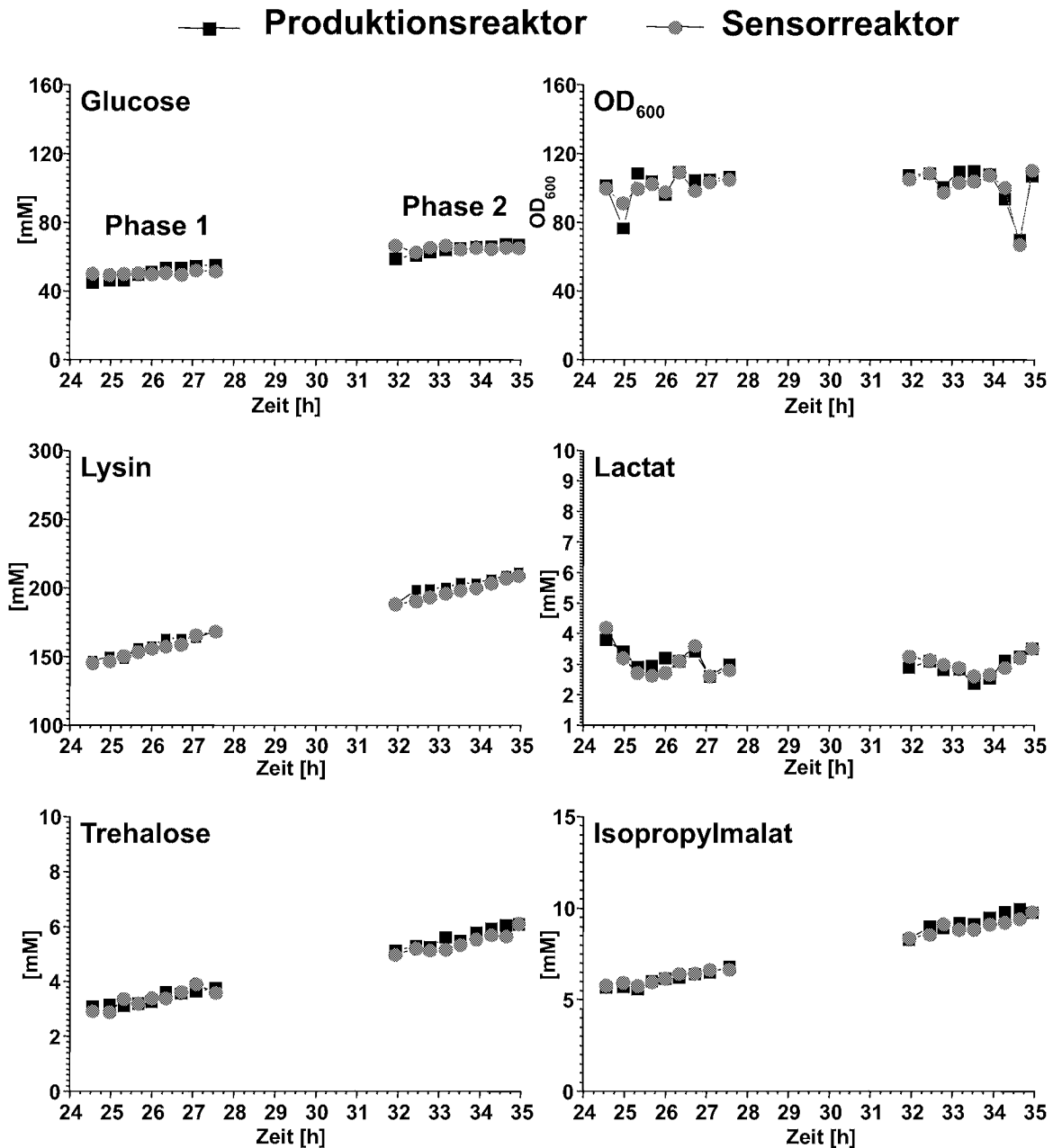


Abbildung 18: Fedbatch-Fermentation von *C. glutamicum* MH20-22B im Produktionsreaktor und in dem daran angeschlossenen Sensorreaktor während der Lysin-Produktionsphase bei stagnierendem Wachstum. Es wurden nacheinander zwei Parallelfementationen für jeweils 3 h (Phase1 und Phase 2) im Abstand von 4.5 h durchgeführt. Dargestellt ist der Verlauf des Wachstums (OD_{600}) und der Konzentrationsverläufe der Kohlenstoffquelle Glucose, der gewünschten Aminosäure Lysin und der Nebenprodukte Lactat, Trehalose und Isopropylmalat im Produktionsreaktor und Sensorreaktor. Die hier dargestellten Phasen sind aus Abbildung 17 zu entnehmen.

Tabelle 12: Gemessene extrazelluläre Stoffwechselraten von *C. glutamicum* MH20-22B in der Lysin-Produktionsphase in zwei Parallelfementationen im Sensorreaktor (Phase 1 und 2). Die Standardabweichungen wurden durch Regressionsanalysen erhalten und zeigen die wahren Meßfehler der einzelnen Raten während der jeweiligen Parallelfementation.

Raten in $\text{mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Phase 1	Phase 2
Glucose-Aufnahme	1.16 ± 0.09	0.86 ± 0.11
Lysin-Produktion	0.31 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Trehalose-Produktion	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002
Isopropylmalat-Produktion	0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.001

1.4.2 Analyse der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in der Lysin-Produktionsphase

Für die ^{13}C -gestützte Stoffflußanalyse in *C. glutamicum* MH20-22B zu zwei Markierungszeiträumen in der Lysin-Produktionsphase wurden Metabolite des Cytoplasmas herangezogen. Dazu wurden mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie jeweils die isotopomeren Markierungsmuster von 26 Kohlenstoffatomen verschiedener Metabolite bestimmt (**Tabelle 20 und 21, Anhang**).

Wie anhand der **Tabelle 13** zu sehen ist, konnten die intrazellulären Flüsse durch die Glycolyse, von Fructose-6-Phosphat ausgehend, und den Citrat-Zyklus mit einer Standardabweichung bis unter 20 % gut bestimmt werden. Der anaplerotische Carboxylierungsfluß wurde mit einer Abweichung von nur 7 % sehr gut bestimmt. Größere Ungenauigkeiten traten jeweils bei der Abzweigung von Glucose-6-Phosphat ausgehend in den Pentosephosphatweg und in die Glycolyse auf. Der Fluß in den Pentosephosphatweg wies eine Abweichung von mehr als 30 % auf. Der Fluß über die Glucose-6-Phosphat-Isomerase wies sogar eine Abweichung von mehr als 100 % auf und zeigt, daß dieser Fluß nicht bestimmt werden konnte. Somit ist der im Flußmodell berechnete Rückfluß von Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat sehr fraglich (**Tabelle 13**). Diese sehr große Ungenauigkeit der Flußbestimmung am Knotenpunkt Glucose-6-Phosphat ist durch das Fehlen einiger ^{13}C -Markierungsinformationen zu erklären. Im Gegensatz zur 2D-NMR-Vermessung von proteinogenen Aminosäuren, konnten keine isotopomeren Markierungsinformationen aus den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin herangezogen werden. Ebenfalls konnten, im Gegensatz zu den in Punkt III.1.1.2 und Punkt III.1.2.2 durchgeführten NMR-Messungen, keine Markierungsinformationen aus Ribonukleosiden gewonnen werden (**Tabelle 20 und 21, Anhang**). Anscheinend war in diesem Experiment der Anteil an markierter Glucose von ca. 15 % zu gering.

Ergebnisse

Tabelle 13: Ausgewählte, mit Hilfe der ^{13}C -Flußanalyse berechnete Stoffflüsse und deren Standardabweichungen des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B in der Lysin-Produktionsphase in zwei Parallelerfermentationen im Sensorreaktor (Phase 1 und 2). Die einzelnen Phasen können aus Abbildung 17 entnommen werden.

Umsetzung	<i>in vivo</i> -Stoffflüsse ($\text{mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$)	
	Phase 1	Phase 2
Glucose-Aufnahme	1.05 ± 0.05	0.75 ± 0.05
Glucose-6-P $\rightarrow$ Pentose-5-P + CO_2	1.63 ± 0.59	1.19 ± 0.41
Glucose-6-P $\leftarrow$ Fructose-6-P	0.61 ± 0.73	0.47 ± 0.63
Triosephosphat $\rightarrow$ PEP/Pyruvat	1.50 ± 0.17	1.05 ± 0.08
PEP/Pyruvat $\rightarrow$ AcCoA + CO_2	0.82 ± 0.15	0.45 ± 0.07
Malat/Oxalacetat + AcCoA $\rightarrow$ Isocitrat	0.81 ± 0.16	0.43 ± 0.09
Isocitrat $\rightarrow$ α -Ketoglutarat + CO_2	0.81 ± 0.17	0.43 ± 0.09
Succinat $\rightarrow$ Malat/Oxalacetat	0.81 ± 0.14	0.43 ± 0.07
PEP/Pyruvat + $\text{CO}_2 \rightarrow$ Malat/Oxalacetat	0.43 ± 0.03	0.29 ± 0.02
Malat/Oxalacetat $\rightarrow$ PEP/Pyruvat + CO_2	0.11 ± 0.07	0.02 ± 0.04
Malat/Oxalacetat $\rightarrow$ Aspartat	0.32 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Lysin-Produktion	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01

Erläuterungen siehe Tabelle 8.

Die Stoffflüsse im Zentralmetabolismus von *C. glutamicum* MH20-22B zu zwei Markierungsphasen in der Lysin-Produktionsphase sind in **Abbildung 19** und **20** dargestellt. Da in der Lysin-Produktionsphase kein Wachstum zu beobachten war, wurden die Abflüsse in die Biomasse im Flußmodell auf Null heruntergesetzt (genauer auf $0.0001 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{h}^{-1}$, um numerische Probleme bei der Flußberechnung zu vermeiden). Bedeutende Veränderungen traten hingegen im Bereich der Anaplerosis auf. Der decarboxylierende Rückfluß war signifikant erniedrigt und konnte mit Hilfe des mathematischen Modells nicht mehr exakt bestimmt werden (**Tabelle 13**). Abgesehen von der Standardabweichung betrug der Rückfluß, bei einem Lysin-Synthesefluß von 32 bzw. 37 % in beiden Parallelerfermentationen, nur noch 10 bzw. 2 % (**Abbildung 19** und **20**). Dies zeigt erstmals, daß der Rückfluß von Malat/Oxalacetat zu PEP/Pyruvat bei maximaler Lysin-Produktion und stagnierendem Wachstum fast vollständig zum Erliegen kam. Im Gegensatz dazu blieb der anaplerotische Carboxylierungsfluß mit etwa 40 % für beide Phasen gleich (**Abbildung 19** und **20**), was die Nachlieferung von Oxalacetat für die erhöhte Lysin-Bildung absicherte.

Zur Verdeutlichung, daß trotz kurzer Markierungsdauer eine vollständige Äquilibration der ^{13}C -Markierung in den freien cytoplasmatischen Metaboliten vorlag, wurde auch in diesem Experiment die *Turnover*-Zeit am Beispiel von Glutamat bestimmt. Dies erfolgte anhand der bereits in Punkt III.1.2.3 beschriebenen Kriterien. Für die Berechnung der *Turnover*-Zeit wurde für beide Phasen eine intrazelluläre Glutamat-Konzentration von ca. 40 mM, wie sie in Punkt III.1.2.3 bei Leucin-Limitierung ermittelt wurde, angenommen. Weiterhin wurde während der Fermentationen die extrazelluläre Ammoniumkonzentration in Phase 1 mit 300 mM und in Phase 2 mit 270 mM bestimmt, was bedeutet, daß aufgrund dieser Konzentrationen auch in diesem Experiment die Lysin-Bildung in *C. glutamicum* MH20-22B zu ca. 70 % über den Succinyl-Diaminopimelat-Weg erfolgte (Sonntag *et al.*, 1993). Unter Berücksichtigung dieser Informationen betrug die *Turnover*-Zeit des Glutamat-Pools 2.3 min für Phase 1 und 2.5 min für Phase 2. Die Zeit, in welcher 95 % des Glutamat-Pools über die GDH-Reaktionen ausgetauscht wäre, wurde mit 6.8 (Phase 1) bzw. 7.5 min (Phase 2) bestimmt. Dies bedeutet, daß bei einer kurzen Markierungsdauer von 3 h im Sensorreaktor der komplette Glutamat-Pool über die an der Lysin-Synthese gekoppelten GDH-Reaktionen ca. 25 mal ausgetauscht wurde. Somit kann belegt werden, daß die für diese Flußanalyse verwendeten Markierungsinformationen tatsächlich die aktuelle Stoffwechselsituation widerspiegelt und der Pool der jeweiligen freien intrazellulären Metabolite am Ende der Parallelfementationen vollständig markiert waren.

Insgesamt ist festzuhalten, daß es mit Hilfe von ^{13}C -Markierungsdaten aus cytoplasmatischen Metaboliten und der Sensorreaktortechnik möglich ist, eine Serie von Stoffflußanalysen in einer Produktionsphase bei stagnierendem Wachstum durchzuführen, was bisher noch nicht möglich war. Die *in vivo*-Stoffflußverteilung in *C. glutamicum* unter limitierenden Wachstumsbedingungen und bei maximaler Lysin-Produktion im technischen Maßstab zeigte zum ersten Mal eine fast vollständige Inaktivität der decarboxylierenden Rückreaktionen der Anaplerosis.

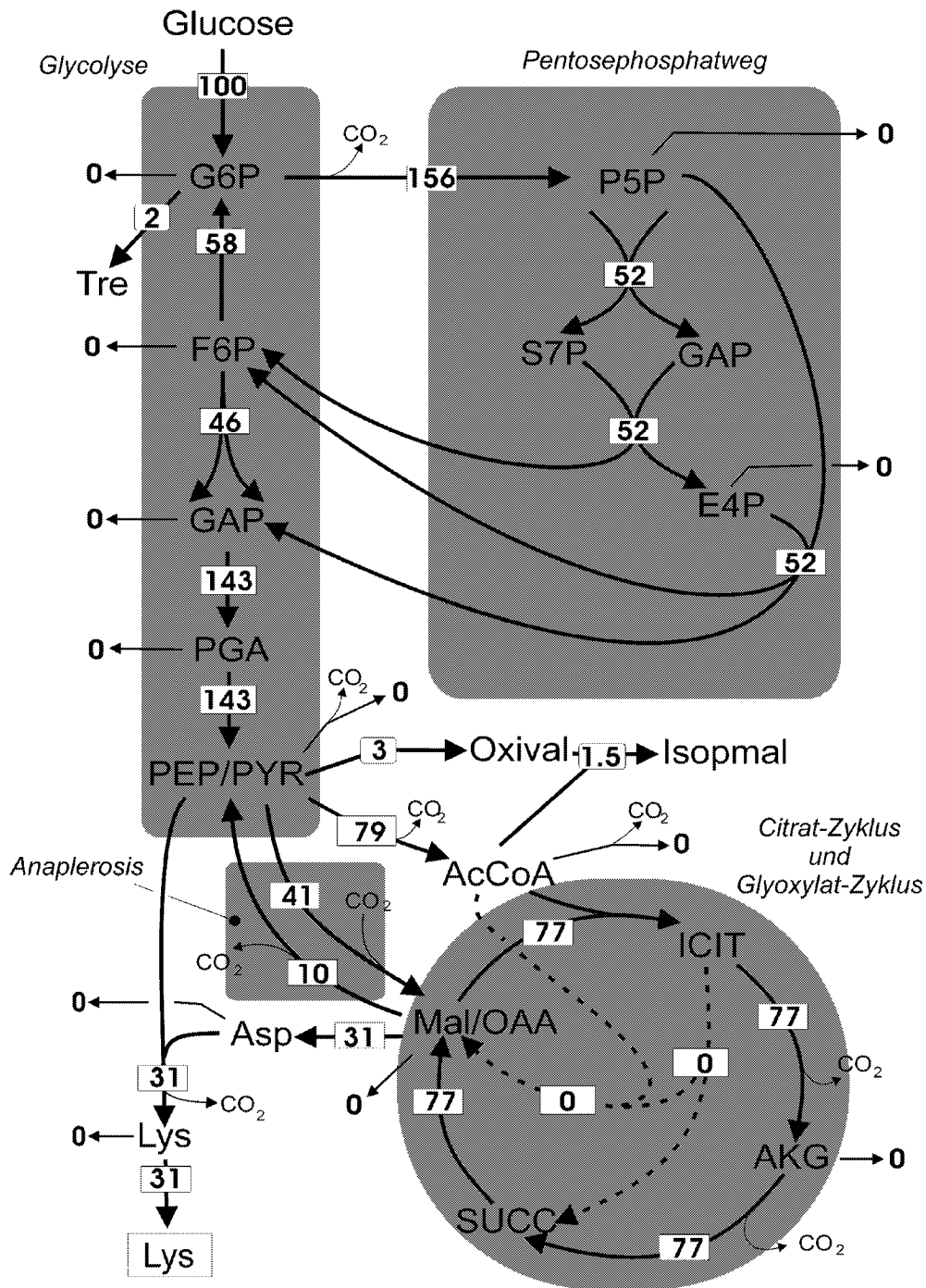


Abbildung 19: Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B von *C. glutamicum* nach 24.5-27.5 h Parallelerfermentation im Sensorreaktor in der Lysin-Produktionsphase (**Phase 1**). Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($1.05 \pm 0.05 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3. Oxival, α -Oxoisovalerat; Isopmal, α -Isopropylmalat.

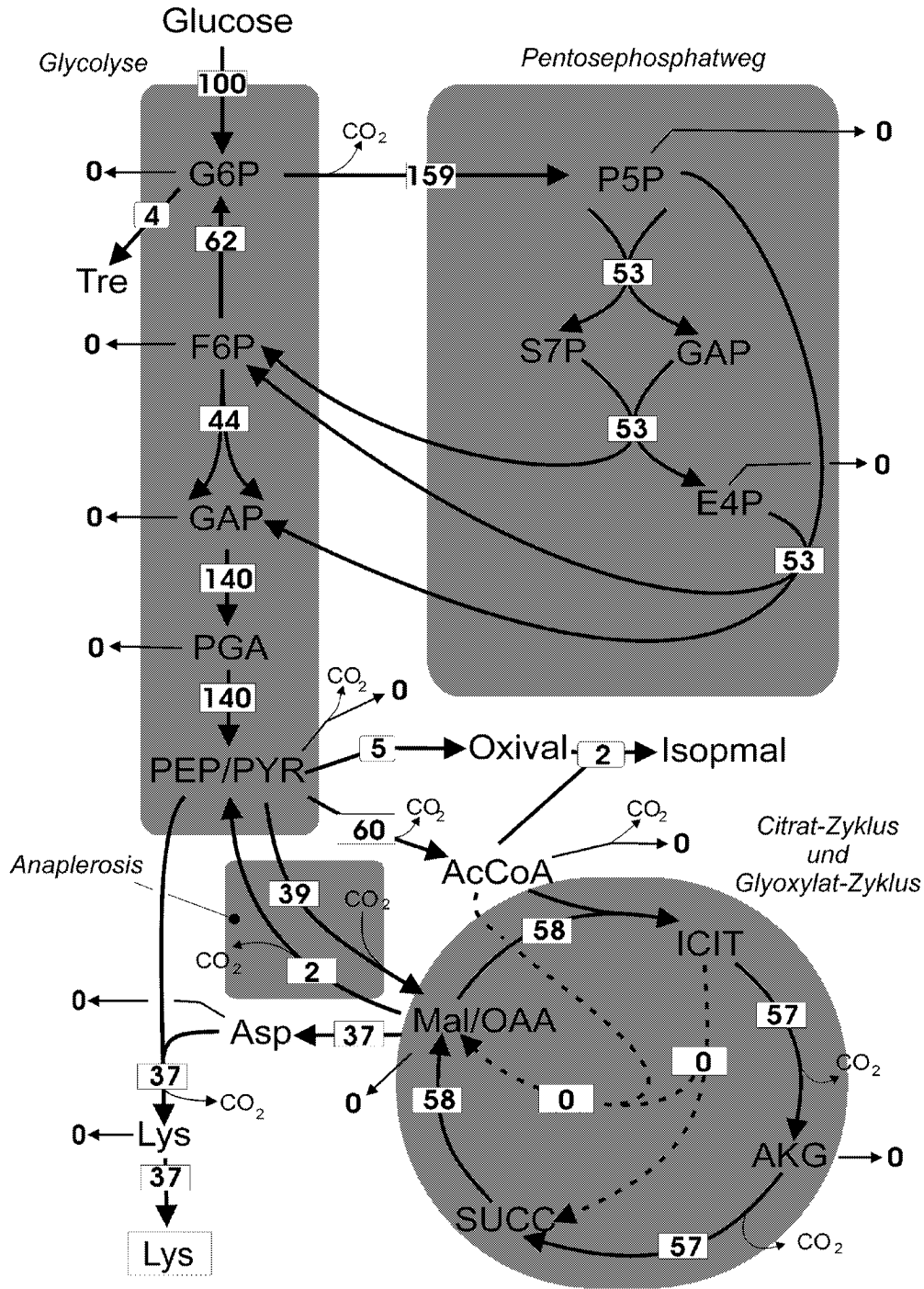


Abbildung 20: Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B von *C. glutamicum* nach 32-35 h Parallelfermentation im Sensorreaktor in der Lysin-Produktionsphase (**Phase 2**). Die Metabolitflüsse bzw. Abflüsse in die Biomasse sind in % relativ zur im Flußmodell berechneten Glucose-Aufnahmerate ($0.75 \pm 0.05 \text{ mmol g}_{\text{TG}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) von 100 % angegeben. Erläuterungen: vgl. Tabelle 2 und Abbildung 3. Oxival, α -Oxoisovalerat; Isopmal, α -Isopropylmalat.

2. Untersuchungen zur Bedeutung einer *pck*-Deletion für das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und Mischsubstraten

Anhand der Arbeiten von Riedel *et al.* (2001) konnte bereits gezeigt werden, daß die PEP-Carboxykinase in *C. glutamicum* eine bedeutende gluconeogenetische Funktion besitzt, da eine PEP-Carbokinase-Deletionsmutante (*C. glutamicum* 13032 Δ *pck*) auf Acetat und Lactat nicht wachsen konnte. Im Gegensatz dazu zeigte jedoch eine *pck*-Deletionsmutante bei Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied (Riedel *et al.*, 2001). Nun stellte sich die Frage, ob möglicherweise die Verwertung anderer nicht-gluconeogenetischer Kohlenstoffquellen bei einer *pck*-Deletion nicht doch zu Wachstumseffekten führt, um somit weitere Hinweise zur Bedeutung der PEP-Carboxykinase im Stoffwechsel zu erhalten. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst ein *pck*-Deletionsstamm konstruiert und anschließend das Wachstum auf weiteren nicht-gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen mit dem Wildstamm verglichen. Um einen *pck*-Deletionsstamm zu erhalten, welcher direkt mit dem im hiesigen Institut vorhandenen Wildtypstamm vergleichbar war, war die Neukonstruktion dieser Mutante von besonderem Interesse.

Die in dieser Arbeit verwendeten nicht-gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen wurden in Zucker unterschieden, welche sowohl von *C. glutamicum* über das PEP-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS), wie z.B. Glucose, Fructose und Saccharose (Marlin & Bourd, 1991; Dominguez & Lindley, 1996; Dominguez *et al.*, 1998; Parche *et al.*, 2001), als auch PTS-unabhängig, wie z.B. Ribose, Maltose und Gluconat (L. Eggeling, persönl. Mitteilung, 2003), aufgenommen werden. Da bei der PTS-abhängigen Zuckeraufnahme PEP zu Pyruvat umgewandelt wird, kann möglicherweise die Verfügbarkeit von PEP ein limitierender Faktor sein. So könnte über einen Substrat-Zyklus das gebildete Pyruvat über die Pyruvat-Carboxylase zu Oxalacetat und weiter über die PEP-Carboxykinase wieder zu PEP regeneriert und dadurch ein unter Umständen für das PTS günstiges PEP/Pyruvat-Verhältnis in der Zelle eingestellt werden. Über den Vorteil einer schnellen Bereitstellung von PEP für die PTS-abhängige Zuckeraufnahme durch diesen Substrat-Zyklus wurde bereits diskutiert (Petersen, 2001), wonach eine *pck*-Deletion einen negativen Einfluß auf die Zuckeraufnahme und somit auch auf das Wachstum ausüben könnte. Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der PEP-Carboxykinase in *C. glutamicum* kann ein Wachstumsvergleich des Wildtyps mit einer *pck*-Deletionsmutante auf Mischsubstraten darstellen, wobei Gemische aus PTS-Zuckern bzw. Nicht-PTS-Zuckern und gluconeogenetischen Substraten, wie z.B. Acetat und Lactat, von Interesse sind.

Zur Untersuchung der Bedeutung einer *pck*-Deletion bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen wurden bei allen vergleichenden Wachstumsexperimenten die zu untersuchenden *C. glutamicum*-Stämme zunächst auf CGIII-Komplexmedium vorkultiviert und anschließend auf CGXII-Minimalmedium mit den jeweiligen Kohlenstoffquellen gezüchtet.

2.1 Konstruktion und Nachweis einer *pck*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* ATCC 13032

Die Herstellung einer *pck*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* ATCC 13032 erfolgte nach der von Schäfer *et al.* (1994) etablierten Methode mit dem Plasmid pK19*mobsacB*- Δ *pck*. Dieses Plasmid (Ausgangsplasmid: pK19*mobsacB*) enthält zusätzlich ein 0.69 kb großes *pck*-Deletionsfragment, aus welchem zuvor ein internes 1.07 kb Fragment herausgeschnitten wurde und jeweils die 3'- bzw. 5'- Enden des *pck*-Gens mit einer Größe von 350 bzw. 340 bp wieder miteinander ligiert wurden (D. Rittmann, persönl. Mitteilung, 2003; Riedel *et al.*, 2001). Da pK19*mobsacB*- Δ *pck* in *C. glutamicum* nicht replizierbar ist, wurden nach Transformation des Plasmids und anschließender Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Kanamycinresistenz Klone isoliert, in denen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert war. Die Ausgliederung des Plasmids erfolgte durch ein zweites Rekombinationsereignis über die jetzt im Chromosom doppelt vorliegenden DNA-Bereiche, indem die Zellen auf LB-Komplexmedium ohne Kanamycin kultiviert wurden. Anschließend wurde die Kultur auf LB-Komplexmedium mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Durch die von *sacB* kodierte Levan-Sucrase kommt es zu einer durch Saccharose induzierten Lethalität (Bramucci *et al.*, 1996), wodurch nur solche Klone wachsen konnten, die das Plasmid ausgegliedert und wieder verloren hatten. Bei den Saccharose-resistenten und Kanamycin-sensitiven Klonen nach der zweiten Rekombination war entweder die genetische Wildtyp-Situation wieder hergestellt oder die gewünschte Deletion entstanden.

Die *pck*-Deletion in einigen Klonen wurde mit PCR-Analysen durch Verwendung von außerhalb des Bereichs der Deletion liegenden Primern überprüft. Dabei zeigte sich, daß die getesteten Deletionsmutanten ein *pck*-Deletionsfragment von ca. 0.7 kb aufwiesen, wohingegen der getestete Wildtypstamm noch das intakte *pck*-Gen (ca. 1.8 kb-Fragment) besaß (**Abbildung 31, Anhang**). Zusätzlich wurden verschiedene Deletionsmutanten auf spezifische PEP-Carboxykinase-Aktivitäten überprüft. In Rohextrakten des Wildtypstammes nach Wachstum auf LB-Komplexmedium wurden spezifische Aktivitäten von 0.086 ± 0.006 U/mg_{Protein} nachgewiesen. In den Rohextrakten der Deletionsmutanten war hingegen praktisch keine PEP-Carboxykinase-Aktivität (< 0.002 U/mg_{Protein}) meßbar.

2.2 Vergleichende Wachstumsexperimente der *pck*-Deletionsmutante mit *C. glutamicum* ATCC 13032 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

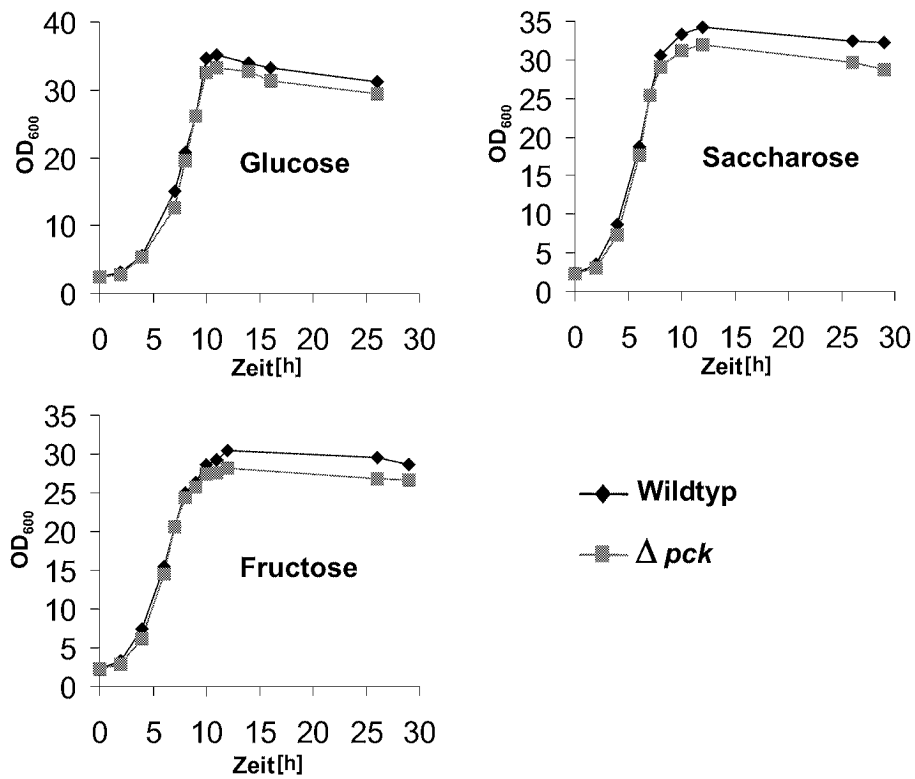
Um die Auswirkung einer *pck*-Deletion auf das Wachstum zu untersuchen, wurde eine *pck*-Deletionsmutante und der Wildstamm von *C. glutamicum* auf Minimalmedium mit verschiedenen PTS- und Nicht-PTS-Zuckern kultiviert. Als einzige Kohlenstoffquelle wurden dem Medium jeweils 2 % (w/v) PTS-Zucker (Glucose, Fructose und Saccharose) bzw. Nicht-PTS-Substrate (Ribose, Maltose, Gluconat) zugegeben.

Bei exponentiellem Wachstum auf den jeweiligen Zuckern wiesen der Wildtyp und die *pck*-Deletionsmutante nahezu identische Wachstumsraten auf (**Tabelle 14**). Auch war der gesamte Verlauf des Wachstums der beiden Stämme auf PTS- und Nicht-PTS-Substraten annähernd gleich (**Abbildung 21**). Lediglich erreichte der Wildtyp nach dem vollständigen Verbrauch der jeweiligen Kohlenstoffquelle eine etwas höhere End-OD₆₀₀ als die *pck*-Deletionsmutante. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, daß die PEP-Carboxykinase bei Wachstum auf PTS- und Nicht-PTS-Substraten keine bedeutende Rolle zu haben scheint, wie es bereits zuvor für das Wachstum auf Glucose beschrieben wurde (Riedel *et al.*, 2001).

Tabelle 14: Wachstumsraten (μ) des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* bei exponentiellem Wachstum auf PTS- und Nicht-PTS-Substraten

Kohlenstoffquelle	Wachstumsrate (h^{-1})	
	Wildtyp	Δpck
<i>PTS-Substrat:</i>		
Glucose	0.315 ± 0.007	0.322 ± 0.009
Saccharose	0.368 ± 0.026	0.388 ± 0.028
Fructose	0.340 ± 0.020	0.367 ± 0.021
<i>Nicht-PTS-Substrat:</i>		
Gluconat	0.356 ± 0.024	0.323 ± 0.015
Maltose	0.237 ± 0.007	0.234 ± 0.014
Ribose	0.207 ± 0.005	0.220 ± 0.012

Wachstum auf PTS-Substraten



Wachstum auf Nicht-PTS-Substraten

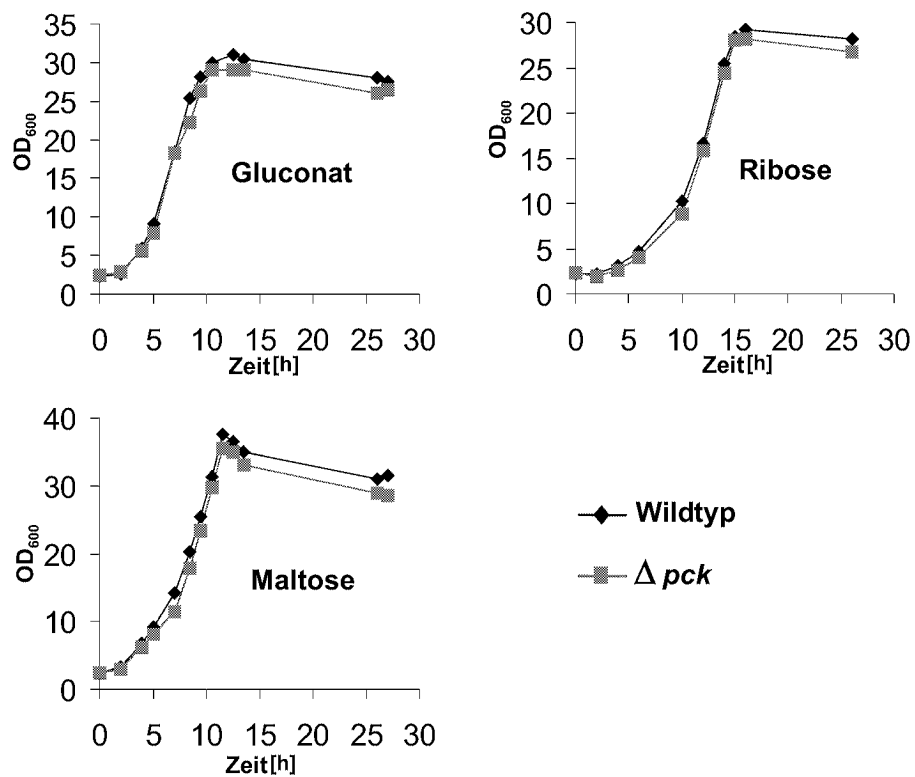


Abbildung 21: Wachstumskurven des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf PTS- und Nicht-PTS-Substraten

2.3 Vergleichende Wachstumsexperimente der *pck*-Deletionsmutante mit *C. glutamicum* ATCC 13032 auf verschiedenen Mischsubstraten

Da die *pck*-Deletionsmutante weder auf Nicht-PTS- noch auf PTS-Substraten einen eindeutigen Phänotyp zeigte, wurde nun die *pck*-Deletionsmutante mit dem Wildstamm auf Mischsubstraten getestet. Hierzu erfolgten Wachstumsexperimente, bei denen die beiden Stämme parallel in Minimalmedium kultiviert wurden, welches zusätzlich neben den Nicht-PTS- und PTS-Substraten eine gluconeogenetische Kohlenstoffquelle, wie z.B. Acetat oder Lactat, enthielt. Als Kontrolle erfolgten Kultivierungen in Minimalmedien, welche nur das Nicht-PTS- bzw. PTS-Substrat oder nur die gluconeogenetische Kohlenstoffquelle enthielten.

2.3.1 Wachstum auf einem Gemisch aus Nicht-PTS-Substraten und Acetat

In vergleichenden Wachstumsexperimenten wurde zunächst bestimmt, wie der Wildstamm von *C. glutamicum* und die *pck*-Deletionsmutante Gemische von Nicht-PTS-Substraten (Maltose bzw. Gluconat) und Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle verwertet. Die verwendeten Konzentrationen im Gemisch oder als einzige Kohlenstoffquelle betrugen für Maltose 18 mM (6.2 g/l), für Gluconat 35 mM (6.7 g/l) und für Acetat 120 mM (7.2 g/l). Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, daß der Anteil eines jeden Substrats, bezogen auf die Anzahl der Kohlenstoffatome, vergleichbar war.

In **Abbildung 22** und **23** sind die Wachstumsverläufe des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante und der Verbrauch der jeweiligen Kohlenstoffquelle dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß die *pck*-Deletionsmutante auf Acetat als einzige Kohlenstoffquelle nicht wachsen konnte, was mit der Notwendigkeit der PEP-Carboxykinase für die Gluconeogenese zusammenhängt (Riedel *et al.*, 2001). Der Wildstamm konnte hingegen auf Acetat gut wachsen. Weiterhin zeigten der Wildstamm und die *pck*-Deletionsmutante ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten auf Maltose oder Gluconat als einzige Kohlenstoffquelle. Auf den beiden Nicht-PTS-Substraten mit Acetat im Gemisch war das Wachstumsverhalten ebenfalls nicht verändert. Auch wuchsen beide Stämme zur ungefähr gleichen End-OD₆₀₀ von ca. 23 (Maltose-Acetat-Gemisch) und ca. 20 (Gluconat-Acetat-Gemisch) heran. Die End-OD₆₀₀ betrug bei Wachstum auf den jeweiligen Gemischen, wie auf Maltose, Gluconat und Acetat als einzige Kohlenstoffquelle, ungefähr das doppelte, was bedeutet, daß sowohl die Nicht-PTS-Substrate als auch Acetat für die Biomassesynthese verwendet wurden.

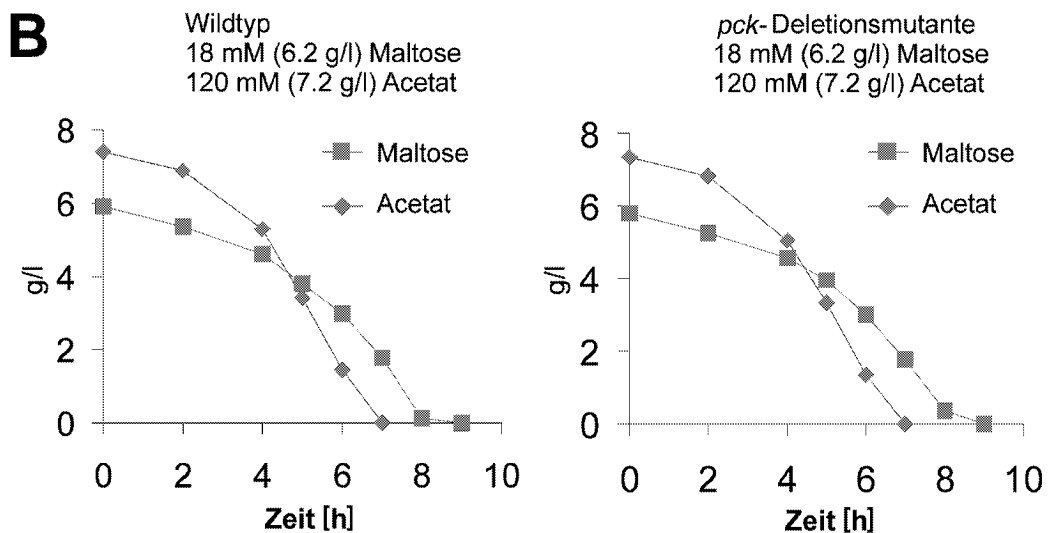
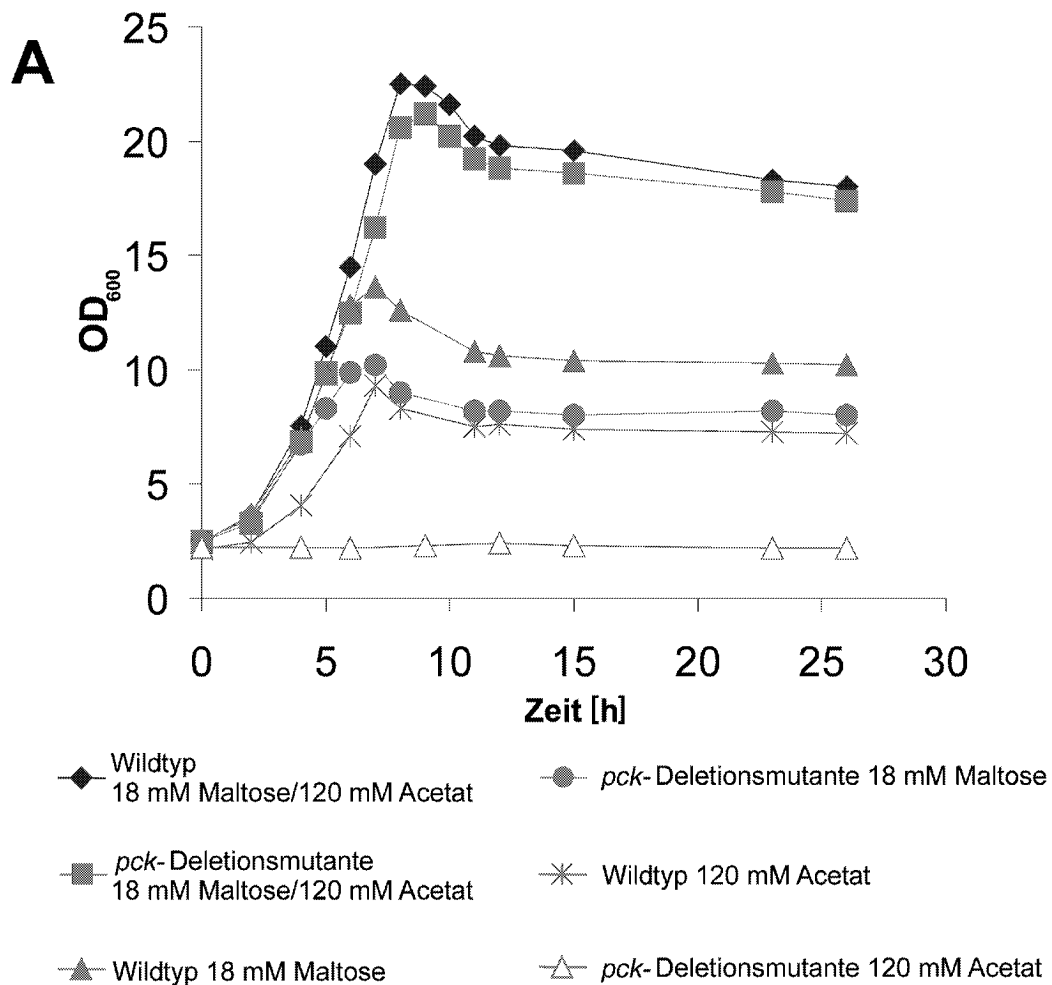


Abbildung 22: A: Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf Maltose und Acetat als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch. **B:** Verbrauch von Maltose und Acetat im Gemisch beim Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante.

Ergebnisse

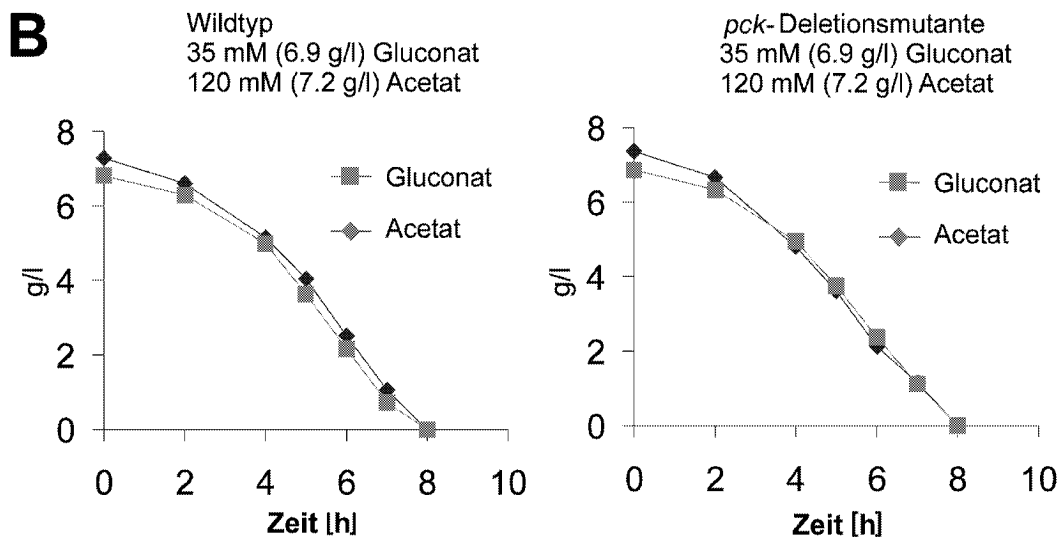
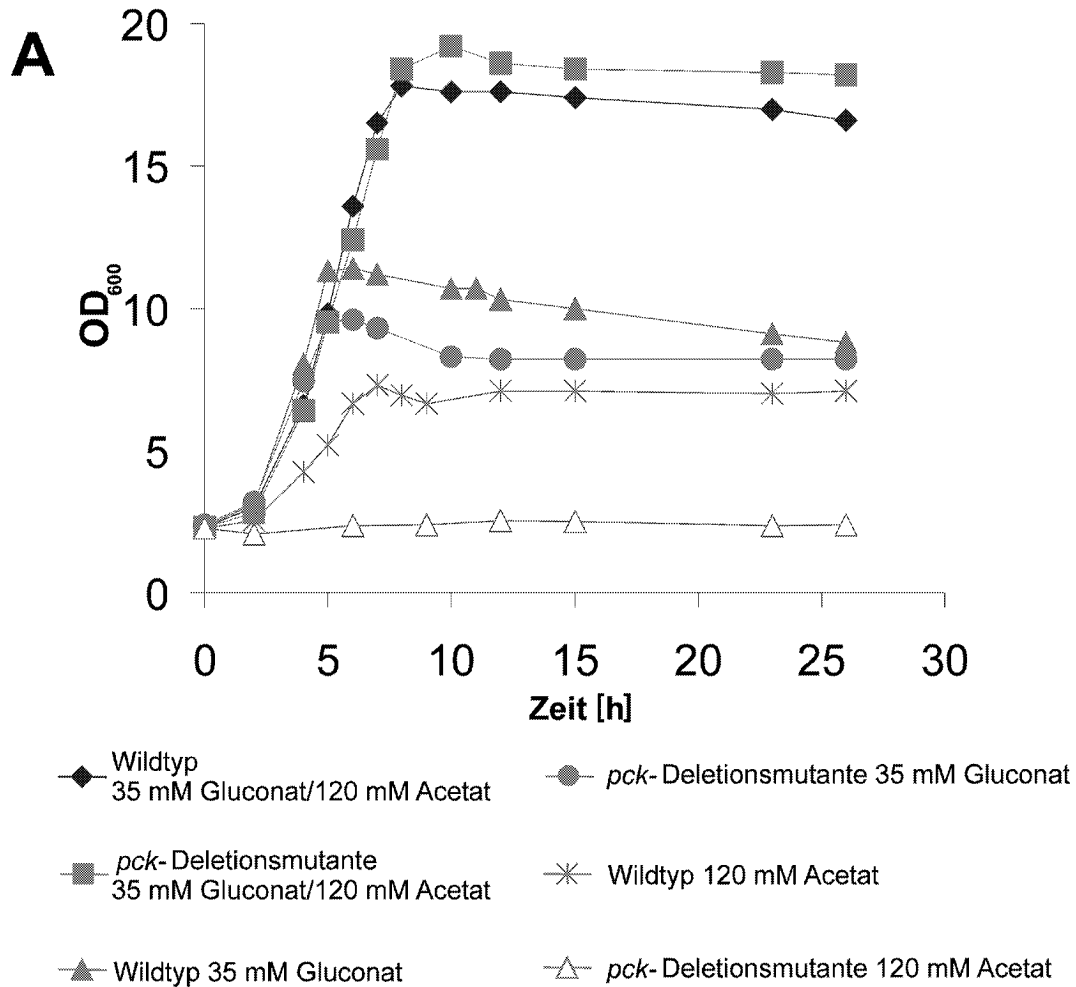


Abbildung 23: A: Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf Gluconat und Acetat als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch. **B:** Verbrauch von Gluconat und Acetat im Gemisch beim Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Wildstamm und auch die *pck*-Deletionsmutante auf den Gemischen Maltose-Acetat bzw. Gluconat-Acetat monophasisch wuchsen und beide Kohlenstoffquellen gleichzeitig verwerteten. Somit wurde anhand dieser Wachstumsexperimente deutlich, daß die PEP-Carboxykinase bei Wachstum auf Gemischen aus Nicht-PTS- und gluconeogenetischen Substraten keine bedeutende physiologische Funktion besitzt.

2.3.2 Wachstum auf einem Gemisch aus PTS-Substraten und Acetat

In weiteren Wachstumsexperimenten wurde nun untersucht, wie der Wildstamm von *C. glutamicum* und die *pck*-Deletionsmutante Gemische von PTS-Substraten (Glucose, Saccharose und Fructose) und Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle verwertet. Die in diesen Experimenten verwendeten Konzentrationen im Gemisch oder als einzige Kohlenstoffquelle betrugen für Glucose 35 mM (6.3 g/l), für Saccharose 18 mM (6.2 g/l), für Fructose 35 mM (6.3 g/l) und für Acetat 120 mM (7.2 g/l).

Beim Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf dem Gemisch Glucose-Acetat sind deutliche Wachstumsunterschiede zu erkennen (**Abbildung 24**). Auf Glucose als einzige Kohlenstoffquelle wiesen der Wildstamm und die *pck*-Deletionsmutante ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten auf. Im Glucose-Acetat-Gemisch wuchs der Wildstamm nach ca. 10 h zu einer End-OD₆₀₀ von 23 heran und damit auf etwa die doppelte End-OD₆₀₀, wie auf Glucose oder Acetat als einzige Kohlenstoffquelle. Dies zeigt, daß Glucose und Acetat für die Biomassebildung verwendet wurden. Im Gegensatz dazu wuchs die *pck*-Deletionsmutante auf dem Glucose-Acetat-Gemisch nur sehr langsam und erreichte erst nach ca. 40 h eine End-OD₆₀₀ von nur ca. 10. Diese End-OD₆₀₀ wurde auch beim Wachstum auf Glucose als einzige Kohlenstoffquelle erreicht. Besonders interessante Ergebnisse lieferten die Bestimmungen des Glucose- bzw. Acetat-Verbrauchs im Gemisch (**Abbildung 24**). Der Wildstamm verwertete über einen Zeitraum von 10 h Glucose und Acetat fast zu gleichem Anteil, wobei Acetat leicht bevorzugt wurde. Beim Wachstum der *pck*-Deletionsmutante wurde hingegen in den ersten 14 h das Acetat eindeutig bevorzugt. Der Verbrauch an Glucose war in dieser Zeit nur sehr gering. Erst als kein Acetat im Medium vorhanden war, konnte die *pck*-Deletionsmutante verstärkt Glucose für das Wachstum nutzen. Dennoch erfolgte die Verwertung der Glucose nicht so schnell wie beim Wildtyp und die Glucose wurde erst nach 40 h vollständig verbraucht. Diese Unterschiede im Substratverbrauch und das verlangsamte Wachstum der *pck*-Deletionsmutante deuten auf einen spezifischen regulatorischen Zusammenhang zwischen der Verwertung von Glucose und Acetat hin.

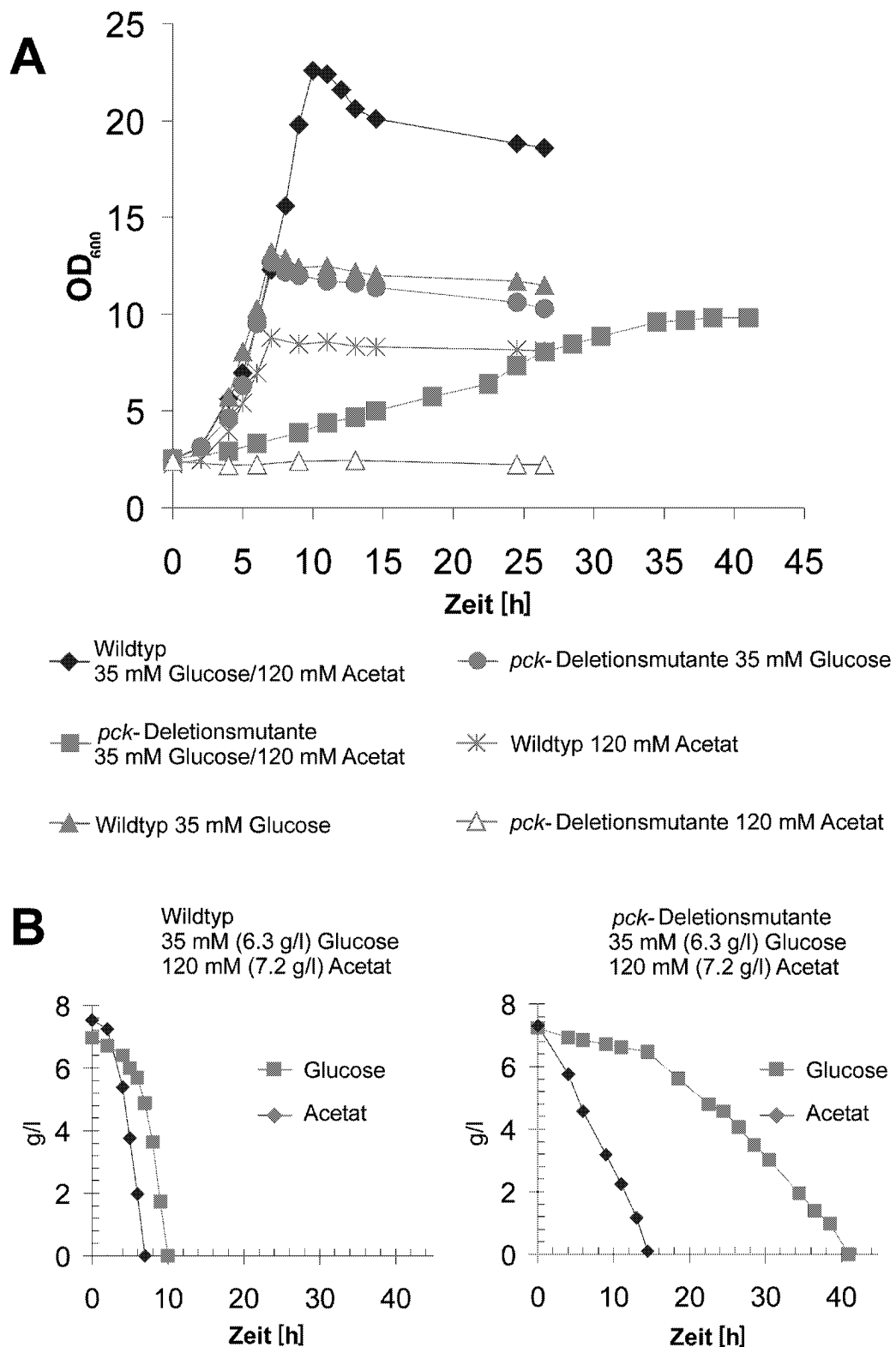


Abbildung 24: **A:** Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf Glucose und Acetat als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch. **B:** Verbrauch von Glucose und Acetat im Gemisch beim Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante.

Darüber hinaus kann vermutet werden, daß eventuell Acetat in der *pck*-Deletionsmutante nicht für die Bildung von Biomasse verwendet, sondern nur zu CO₂ co-verstoffwechselt wurde, da aufgrund der fehlenden PEP-Carboxykinase-Aktivität dieses Substrat nicht gluconeogenetisch genutzt werden kann. Dies kann auch erklären, warum die *pck*-Deletionsmutante nicht die gleiche End-OD₆₀₀ wie der Wildstamm bei Wachstum auf dem Gemisch Glucose-Acetat erreichte.

Bei Wachstum der *pck*-Deletionsmutante auf einem Gemisch aus Saccharose und Acetat war ebenfalls eine starke Hemmung des Wachstums zu beobachten (**Abbildung 25**). Der Wildstamm verwertete innerhalb von 8 h Saccharose und Acetat zu gleichen Anteilen. Die *pck*-Deletionsmutante konnte hingegen in den ersten 14 h auf dem Gemisch nicht wachsen. Obwohl die *pck*-Deletionsmutante nicht wuchs, verbrauchte dieser Stamm in dieser Zeit fast ausschließlich Acetat. Dies zeigt, daß dieses Substrat nicht für den Aufbau von Biomasse verwendet wurde. Nach 14 h erfolgte eine völlig umgekehrte Situation, da nun ausschließlich Saccharose und nicht Acetat verbraucht wurde. Somit war nur in diesem Zeitraum die *pck*-Deletionsmutante in der Lage, wenn auch nur sehr langsam, zu wachsen. Erst nachdem die Saccharose nach ca. 26 h verbraucht war, wurde das restliche Acetat verstoffwechselt aber wiederum nicht für die Biomassessynthese genutzt.

Als drittes PTS-Substrat wurde schließlich Fructose im Gemisch mit Acetat für die Wachstumsexperimente verwendet (**Abbildung 26**). Hierbei fiel die Verminderung des Wachstums der *pck*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp nicht so deutlich aus. Anhand des Substratverbrauchs im Gemisch ist zu erkennen, daß sowohl der Wildtyp als auch die *pck*-Deletionsmutante beide Substrate gleichzeitig verwerteten. Bei Wachstum der *pck*-Deletionsmutante erfolgte der Fructose-Verbrauch bei Anwesenheit von Acetat jedoch leicht verlangsamt, wobei die Fructose nach 8 h verbraucht war. Bei Wachstum auf dem Gemisch wurde das Acetat möglicherweise auch hier hauptsächlich für die katabole Co-Verstoffwechselung genutzt, da die *pck*-Deletionsmutante im Vergleich mit dem Wildstamm eine ebenfalls verringerte End-OD₆₀₀ aufwies.

Insgesamt zeigten die Wachstumsexperimente, daß der Wildstamm von *C. glutamicum* bei Wachstum auf allen PTS-Substrat-Acetat-Gemischen beide Kohlenstoffquellen parallel verwertete. Im Gegensatz dazu deuten die Wachstumsexperimente mit der *pck*-Deletionsmutante auf eine starke Acetat-abhängige Regulation im Bereich der metabolischen Umsetzung oder der Aufnahme von PTS-Substraten hin. Darüber hinaus lassen bei Wachstum der *pck*-Deletionsmutante auf den Substratgemischen die verschiedenen Profile des Substratverbrauchs weitere regulatorische Einflüsse vermuten. Dies scheint besonders beim Wachstum auf dem Saccharose-Acetat-Gemisch der Fall zu sein.

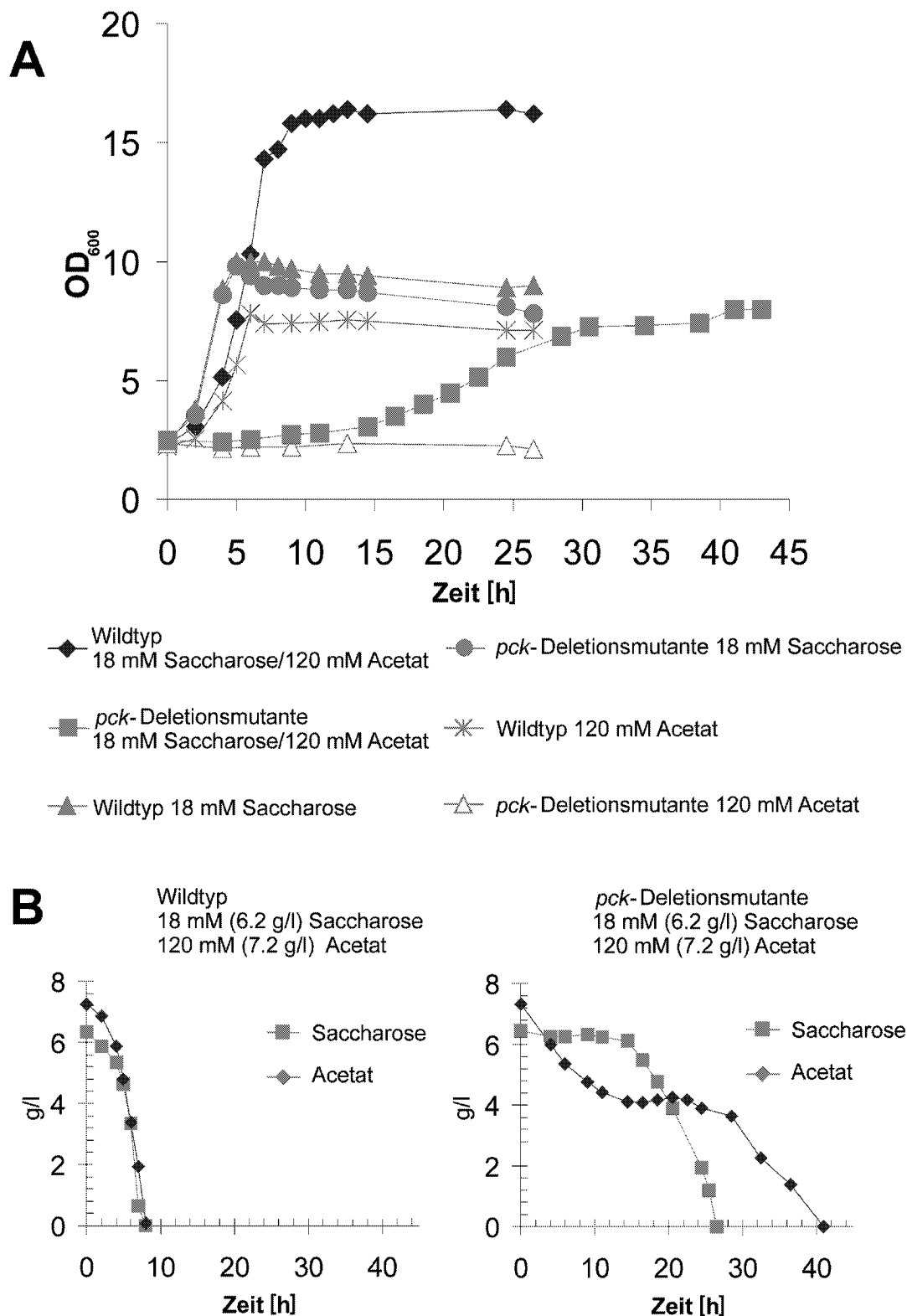


Abbildung 25: A: Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf Saccharose und Acetat als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch. **B:** Verbrauch von Saccharose und Acetat im Gemisch beim Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante.

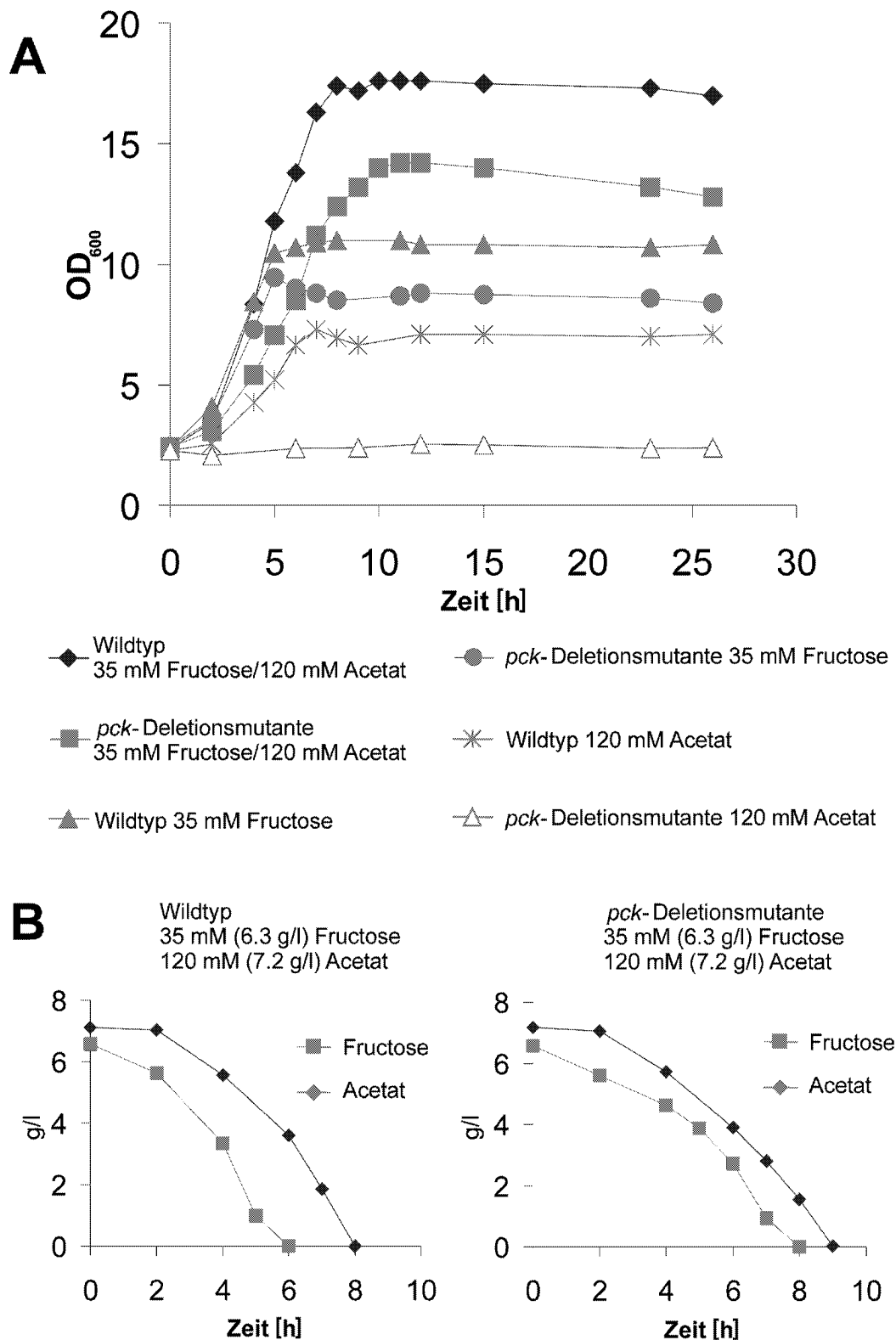


Abbildung 26: **A:** Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf Fructose und Acetat als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch. **B:** Verbrauch von Fructose und Acetat im Gemisch beim Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante.

2.3.3 Wachstum auf einem Gemisch aus Glucose und Lactat

Da bisher nur Acetat als gluconeogenetisches Substrat für das Wachstum auf Mischsubstraten verwendet wurde, war es nun interessant zu überprüfen, ob nun auch Lactat einen Einfluß auf die Verwertung von PTS-Substraten besitzt. In **Abbildung 28** sind die Wachstumskurven des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf Glucose und Lactat als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch dargestellt.

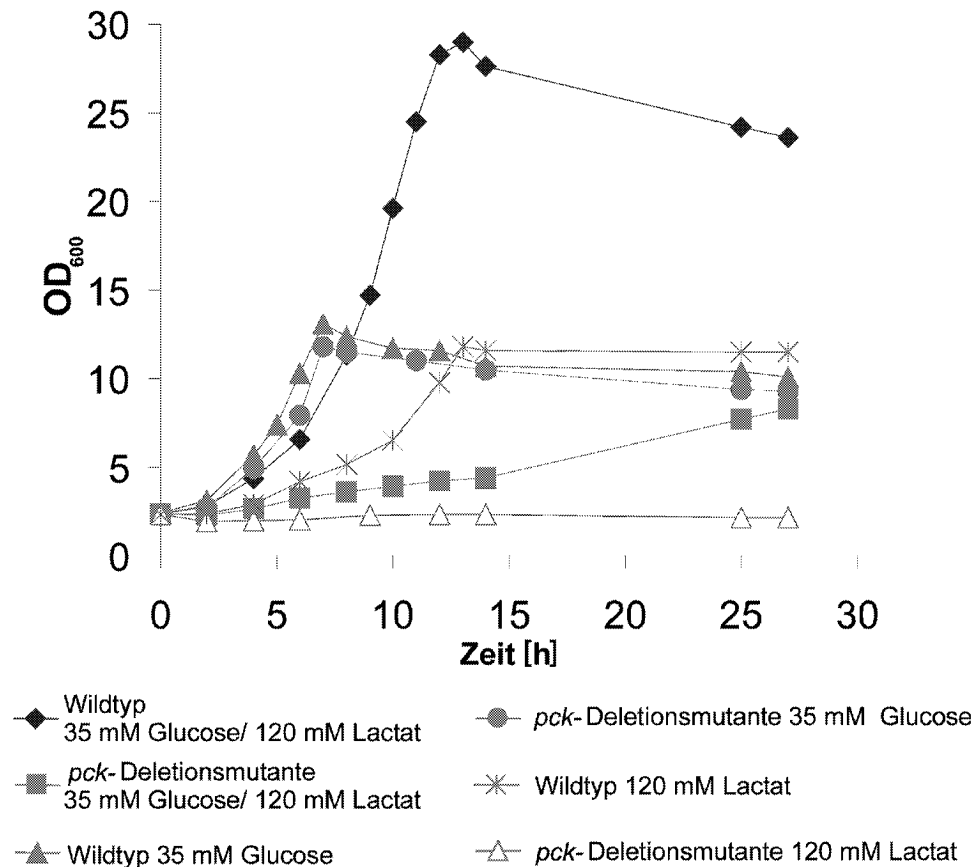


Abbildung 27: Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf Glucose und Lactat als einzige Kohlenstoffquelle und im Gemisch.

Anhand der Wachstumskurven wird deutlich, daß die *pck*-Deletionsmutante auf Lactat als einzige Kohlenstoffquelle nicht wachsen konnte, wohingegen das Wachstum des Wildtyps auf Lactat nicht beeinträchtigt war (Riedel *et al.*, 2001). Beim Wachstum des Wildtyps und der *pck*-Deletionsmutante auf dem Gemisch Glucose-Lactat sind jedoch auch hier deutliche Wachstumsunterschiede zu erkennen. Auf dem Substratgemisch war der Wildtyp nach ca. 13 h bis zu einer End-OD₆₀₀ von 30 ausgewachsen. Im Gegensatz dazu wuchs die *pck*-Deletionsmutante auf dem Gemisch im Vergleich zum Wildtyp, ähnlich wie bei Wachstum auf dem Gemisch Glucose-Acetat, ebenfalls nur sehr langsam. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß nicht nur Acetat, sondern auch Lactat eine regulatorische Funktion im Bereich der PTS-abhängigen Glucose-Aufnahme oder bei der metabolischen Umsetzung von Glucose besitzt.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurden Stoffflußanalysen unter instationären Wachstumsbedingungen durchgeführt, welche auf der Verwendung von isotopomeren Markierungsinformationen aus cytoplasmatischen Metaboliten oder proteinogenen Aminosäuren beruhten. Die Verwendung von proteinogenen Aminosäuren für die Stoffflußanalyse kann aber für instationäre *Batch*-Fermentationen, d.h. Fermentationen mit verschiedenen Wachstums- und Produktionsphasen, ein deutliches Problem darstellen. Erfolgt während der Kultivierung, bei welcher bereits zu Beginn der Fermentation ^{13}C -markiertes Substrat zugegeben wurde, nach dem exponentiellen Wachstum eine deutliche Veränderung des intrazellulären Stoffwechsels, wie es z.B. in Produktionsphasen mit reduziertem Wachstum der Fall ist, so spiegeln die ^{13}C -Markierungsmuster aus den proteinogenen Aminosäuren der Biomasse nicht die *in vivo* Stoffflußverhältnisse dieser Produktionsphase eindeutig wieder. Dies bedeutet, daß „neue Markierungsinformationen“ in Proteinen aus der Produktionsphase mit „alten Markierungsinformationen“ aus der zuvor durchlaufenden Wachstumsphase kombiniert werden (Jonsbu *et al.*, 2001). Als Alternative zur Quantifizierung der intrazellulären Stoffflüsse in *C. glutamicum* wurden die Markierungsinformationen aus extrazellulären Metaboliten, welche während der Fermentation ins Medium abgegeben werden, herangezogen (Wittmann & Heinzle, 2001; Wittmann & Heinzle, 2002). Allerdings ist auch diese Methode für instationäre Flußanalysen weitgehend ungeeignet, da die ^{13}C -Markierungsinformation in Metaboliten, welche z.B. bereits in großer Konzentration zu Beginn und während der exponentiellen Wachstumsphase ins Medium abgegeben werden, die Markierungsinformation der extrazellulären Metabolite aus der nachfolgenden Produktionsphase „überlagert“.

Eine deutliche Minimierung dieses Problems wird durch die Verwendung von Markierungsinformationen aus dem Metabolom, d.h. aus freien cytoplasmatischen Metaboliten, welche noch nicht in Proteine bzw. in die Biomasse eingebaut wurden, erreicht. Wie in dieser Arbeit anhand der berechneten *Turnover*-Zeiten gezeigt wurde (Punkt III.1.2.3 und III.1.4.2), erfolgt der komplette Austausch des intrazellulären Glutamat-Pools, dem größten Aminosäure-Pool in *C. glutamicum*, bei exponentiellem Wachstum und selbst in Lysin-Produktionsphasen mit stark reduziertem Wachstum innerhalb von wenigen Minuten. Dies deutet darauf hin, daß in den Markierungsexperimenten auch die anderen Metabolit- und Aminosäure-Pools des Cytoplasmas bereits mehrfach ausgetauscht wurden und die Markierungsinformation die tatsächliche Stoffwechselsituation zum Zeitpunkt der Probenahme darstellt. Somit ist die Verwendung von Markierungsinformationen aus Metaboliten des Cytoplasmas für die instationäre Stoffflußanalyse die geeignete Lösung, da in kürzester Zeit die intrazelluläre ^{13}C -Markierung äquilibriert ist.

Unter Verwendung der isotopomeren Markierungsdaten aus Metaboliten des Cytoplasmas wurden nun die Stoffflüsse im Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B unter instationären *Batch*-Bedingungen quantifiziert (exponentielle Wachstumsphase und Lysin-Produktionsphase, Punkt III.1.2). Bei der Kultivierung fiel am deutlichsten in der Lysin-Produktionsphase bei Leucin-Limitierung ein starker Rückgang des Wachstums, der Glucose-Aufnahme und der CO₂-Produktion auf. Anhand der Arbeiten von Moritz (2000) wurde gezeigt, daß bei einsetzender Leucin-Limitierung der ATP-Bedarf der Zelle deutlich sinkt, die Aktivität ATP-produzierender Stoffwechselwege aber erst verzögert reduziert wird und daher ein ATP-Anstau in der Zelle die Folge ist. Dieses ATP kann eine Hemmung der Glycolyse bewirken, wobei die Pyruvat-Kinase als ein möglicher Kontrollpunkt diskutiert wird, da ATP ein bedeutender Inhibitor des Enzyms in *C. glutamicum* ist (Jetten *et al.*, 1994a). Bei *C. glutamicum ssp. flavum* wurde gezeigt, daß die Phosphofructokinase im Gegensatz zu Phosphofructokinasen aus anderen Organismen durch ATP nicht gehemmt wird (Sugimoto & Shii, 1989). Daher kann angenommen werden, daß auch in *C. glutamicum* MH20-22B keine Hemmung der Glycolyse auf Höhe der Phosphofructokinase, erfolgt, sondern somit im weiteren Verlauf der Glycolyse. Weiterhin konnte bei einsetzender Leucin-Limitierung eine Erhöhung der intrazellulären Fructose-1,6-Bisphosphat-Konzentration bestimmt werden, da sich dieser Metabolit bei einer Hemmung der Glycolyse anstaut (Moritz, 2000). Bei Gram-positiven Bakterien ist bekannt, daß Fructose-1,6-Bisphosphat ein allosterischer Aktivator einer ATP-abhängigen Protein-Kinase ist, die das HPr-Protein des PT-Systems an Serin 46 phosphoryliert (Deutscher & Saier, 1983; Lengler *et al.*, 1999) und sogar, wie es bereits bei *L. lactis* gezeigt werden konnte, das PTS inhibiert (Reizer *et al.*, 1989; Ye *et al.*, 1994). Diese Regulation könnte ebenfalls zur Verminderung der PTS-abhängigen Glucose-Aufnahme bei *C. glutamicum* führen (Moritz, 2000), wobei jedoch diese Vermutung sehr fraglich ist, da keine HPr-Kinase-Aktivität in *C. glutamicum* nachzuweisen war (Parche *et al.*, 2001). Weiterhin konnte anhand der Untersuchungen von Moritz (2000) gezeigt werden, daß die intrazelluläre Konzentration von ATP und Fructose-1,6-Bisphosphat nur vorübergehend vergrößert ist und danach wieder abfällt. Somit ist die Regulation durch ATP nur innerhalb einer kurzen Zeit nach Beginn der Leucin-Limitierung relevant. Daraus läßt sich schließen, daß noch weitere unbekannte Faktoren bei fortschreitender Leucin-Limitierung zur Reduzierung der Glucose-Aufnahme beitragen und somit dieser Effekt noch nicht eindeutig erklärt werden kann.

Abgesehen von der verminderten Glucose-Aufnahme und des stark verminderten Wachstums wird in der Produktionsphase vermehrt Lysin gebildet. Die Stoffflußanalyse der exponentiellen Wachstumsphase und der Lysin-Produktionsphase unter Leucin-Limitierung (Punkt III.1.2.2) ergaben eine starke Korrelation zwischen dem Fluß in den Pentose-phosphatweg und der Lysin-Synthese. Im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase

war in der Produktionsphase ein 3-fach erhöhter Lysinfluß mit einer 34%igen Erhöhung des Flusses in den Pentosephosphatweg gekoppelt, was mit dem erhöhten Bedarf an NADPH für die Lysin-Synthese begründet ist. Der Stofffluß durch den Pentosephosphatweg ist bereits ausführlich untersucht worden (Marx *et al.*, 1996, 1997 und 1999). Demzufolge wird der Stofffluß durch diesen Stoffwechselweg im wesentlichen durch den Verbrauch und die Produktion von NADPH bestimmt. Ist die Aktivität des Citrat-Zyklus hoch, wie z.B. während der Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum*, findet eine verstärkte NADPH-Bildung durch die Isocitrat-Dehydrogenase statt, so daß die Pentosephosphatweg-Aktivität sinkt. Während der Lysin-Produktion, die viel NADPH verbraucht, konnte hingegen eine stark erhöhte Pentosephosphatweg-Aktivität beobachtet werden (Marx *et al.*, 1997). In diesem Fall ist der Pentosephosphatweg der Haupt-NADPH-Lieferant der Zelle (Marx *et al.*, 1997).

Weiterhin zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Stoffflußanalysen deutliche Veränderungen innerhalb der Anaplerosis bei exponentiellem Wachstum und in der Lysin-Produktionsphase während der Fermentationen im Sensorreaktorsystem. Dabei verringerte sich der decarboxylierende Rückfluß im Verlauf der *Batch*- bzw. *Fedbatch*-Fermentationen bei ansteigender Lysin-Produktion signifikant. Interessant war jedoch, daß sich ebenfalls der anaplerotische Carboxylierungsfluß bei exponentiellem Wachstum und ansteigender Lysin-Bildung, wenn auch nicht in dem Maße wie der decarboxylierende Rückfluß, im Verlauf der Fermentation erniedrigte. Anhand von zahlreichen Stoffflußanalysen mit isogenen Stämmen von *C. glutamicum* in Chemostat-Kulturen konnte gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Anaplerosis und der Lysin-Produktion besteht (Marx *et al.*, 1996, 1997 und 1999; de Graaf *et al.*, 2001). Hierbei korrelierte eine erhöhte Lysin-Produktion mit einer Erniedrigung des Carboxylierungs- und Decarboxylierungsflusses. Mit Hilfe der Sensorreaktortechnik war es zudem zum ersten Mal möglich, die zeitlichen Veränderungen innerhalb der Anaplerosis im Verlauf einer einzigen technischen Fermentation durch eine Serie von Markierungsexperimenten darzustellen. In **Abbildung 28** sind die Flüsse der Anaplerosis und der Lysin-Produktionsfluß bei exponentiellem Wachstum (*Batch*-Kultivierung) und in der Lysin-Produktionsphase (*Fedbatch*-Kultivierung) im zeitlichen Verlauf zusammengefaßt.

Es wird deutlich, daß in exponentiell wachsenden Zellen ein Rückgang der anaplerotischen Carboxylierungsreaktionen und der decarboxylierenden Rückreaktionen innerhalb der Anaplerosis erfolgte. Da aber die carboxylierenden Reaktionen wesentlich höher als die decarboxylierenden Reaktionen waren, konnte ein Anstieg des anaplerotischen Nettoflusses beobachtet werden, welcher mit einer erhöhten Lysin-Bildung korrelierte. Jedoch wurde dabei ein Lysin-Produktionsfluß von nicht mehr als 15 % erreicht, da die Kohlenstoffquelle hauptsächlich für die Biomassebildung verwendet wurde (*Batch*-Fermentation). In der Lysin-Produktionsphase bei stagnierendem Wachstum und maximaler Lysin-Produktion (*Fedbatch*-

Fermentation) blieb hingegen der anaplerotische Carboxyierungsfluß mit 40 % unverändert und der decarboxylierende Rückfluß war nahezu vollständig unterdrückt, was die Bereitstellung von Oxalacetat für die Lysin-Produktion gewährleistete. Diese Flußdaten weisen somit auf einen komplexen Regulationsmechanismus innerhalb der anaplerotischen Carboxylierungsreaktionen und der decarboxylierenden Rückreaktionen hin und unterstreichen die essentielle Bedeutung der Anaplerosis für die Lysin-Produktion in *C. glutamicum*.

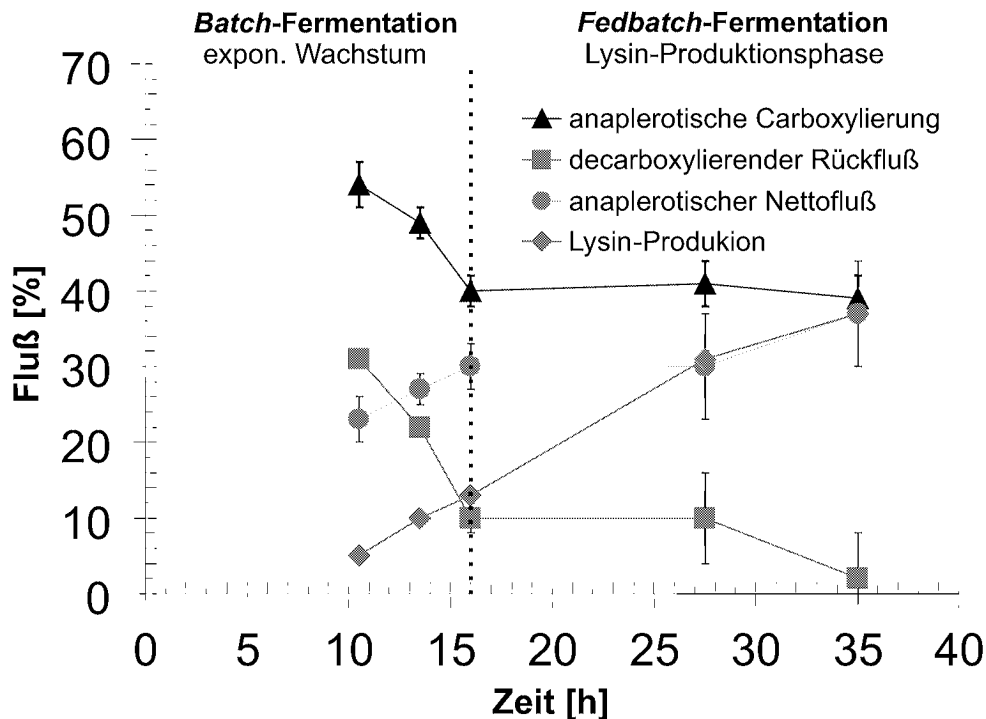


Abbildung 28: Flußverteilung in *C. glutamicum* MH20-22B bei Wachstum auf Glucose im Sensorreaktorsystem. Dargestellt sind die berechneten anaplerotischen Carboxyierungsflüsse, die decarboxylierenden Rückflüsse, die anaplerotischen Nettoflüsse und die Lysin-Produktionsflüsse aus den drei Phasen der *Batch*-Fermentation und den zwei Phasen der *Fedbatch*-Fermentation. Die Flüsse sind in % relativ zur Glucose-Aufnahme dargestellt.

Wichtige Hinweise zu Regulation der Anaplerosis in *C. glutamicum* konnten bereits anhand von Stoffflußanalysen erhalten werden (Petersen *et al.*, 2000, 2001). Dabei zeigte sich, daß bei Wachstum auf Glucose der decarboxylierende Rückfluß fast ausschließlich über die PEP-Carboxykinase erfolgte und die Oxalacetat-Decarboxylase und das Malat-Enzym, selbst bei fehlender PEP-Carboxykinase-Aktivität, nicht aktiv waren. Weiterhin konnte anhand eines Lysin-Produktionsstammes gezeigt werden, daß bei fehlender PEP-Carboxykinase-Aktivität die Lysin-Produktion erhöht wird. Sowohl die Oxalacetat-Decarboxylase als auch das Malat-Enzym waren in diesem Stamm ebenfalls inaktiv und konnten die Aktivität der PEP-Carboxykinase nicht ersetzen (Petersen *et al.*, 2001; Riedel *et al.*, 2001). Diese

Daten lassen vermuten, daß ebenfalls unter instationären Kulturbedingungen bei Wachstum auf Glucose der decarboxylierende Rückfluß hauptsächlich über die PEP-Carboxykinase verläuft. Somit findet die in dieser Arbeit beobachtete Erniedrigung des Rückflusses bei steigender Lysin-Produktion überwiegend über dieses Enzym statt. Über die Regulation der PEP-Carboxykinase-Aktivität in *C. glutamicum* durch bestimmte Effektoren ist bisweilen nur sehr wenig bekannt (B. Eikmanns, persönl. Mitteilung, 2003). Darüber hinaus ergaben Literaturrecherchen zur Regulation der PEP-Carboxykinase in verschiedenen Prokaryonten und Pilzen keine weiteren Hinweise. Es konnte jedoch zumindest eine Regulation der PEP-Carboxykinase-Aktivität auf transkriptionaler Ebene ausgeschlossen werden, da in allen drei hintereinander durchgeführten Markierungsexperimenten bei exponentiellem Wachstum und ansteigender Lysin-Produktion im Sensorreaktor annähernd identische PEP-Carboxykinase-Aktivitäten gemessen wurden (Punkt III.1.3.2). Dieses Ergebnis steht mit Beobachtungen von Riedel *et al.* (2001) im Einklang, wonach die PEP-Carboxykinase-Aktivität von der verwendeten Kohlenstoffquelle und nicht von der Wachstumsphase während einer Fermentation abhängig war.

Das Malat-Enzym ist bei Wachstum auf Substraten, welche nicht oder nur zu einem kleinen Teil über den Pentosephosphatweg als NADPH-bildender Stoffwechselweg verwertet werden, von großer Bedeutung (Cocaign-Bousquet & Lindley, 1995; Domingez *et al.*, 1998; Gourdon *et al.*, 2000). Weiterhin wurde diskutiert, daß in *Batch*-Kulturen dieses Enzym *in vivo* aktiv ist (Petersen, 2001), da die intrazelluläre Malat-Konzentration möglicherweise weit über den K_m -Wert des Malat-Enzyms von 3.8 mM (Gourdon *et al.*, 2000) liegen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch anhand der NADPH-Bilanz gezeigt (Punkt III.1.2.3), daß bereits bei Wachstum auf Glucose der NADPH-Bedarf weitgehend durch den Pentosephosphatweg und durch die Isocitrat-Dehydrogenase gedeckt wurde und daher andere NADPH-bildende Reaktionen, wie z.B. auch das Malat-Enzym, nicht oder nur zu einem geringen Teil aktiv sind. Diese Beobachtungen stehen mit Literaturdaten im Einklang, in welchen dem Malat-Enzym bei Wachstum auf Glucose ebenfalls keine NADPH-regenerierende Funktion zugeschrieben wird (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996).

Die physiologischen Bedeutung der Oxalacetat-Decarboxylase in *C. glutamicum* ist noch wenig verstanden, allerdings konnte durch Jetten & Sinskey (1995b) gezeigt werden, daß dieses Enzym durch ADP (K_i 1.2 mM), GDP (K_i 1.8 mM), Coenzym A (K_i 2.4 mM) und Succinat (K_i 2.8 mM) gehemmt wird. Somit können diese Effektoren in *Batch*-Fermentationen bei der Erniedrigung des decarboxylierenden Rückflusses eine wichtige Rolle spielen. Anhand der Arbeiten von Moritz (2000) konnte gezeigt werden, daß die ADP-Konzentration in *C. glutamicum* MH20-22B während der Lysin-Produktionsphase unter Leucin-Limitierung bei etwa 1 mM liegt. Diese Konzentration liegt somit im Bereich des K_i -Werts für ADP und kann daher ein möglicher Grund für eine Hemmung der Oxalacetat-Decarboxylase sein.

Die PEP-Carboxylase wird durch Aspartat gehemmt (Ozaki & Shiio, 1969, Mori & Shiio, 1985; Jetten *et al.*, 1994b; Peters-Wendisch, 1996). Der K_i -Wert für Aspartat liegt mit 1 mM bei einer physiologisch relevanten Konzentration (Jetten *et al.*, 1994b) und kann eine sinnvolle Erklärung sein, warum die PEP-Carboxylase bei steigender Lysin-Produktion und somit auch bei einem möglichen Anstieg der intrazellulären Konzentration des Lysin-Vorläufers Aspartat im Verlauf der Lysin-Produktion bei exponentiellem Wachstum im Sensorreaktor immer stärker gehemmt wurde.

Zur Regulation der Pyruvat-Carboxylase wurden in einigen Mikroorganismen den Metaboliten α -Ketoglutarat, Oxalacetat und Aspartat eine hemmende Wirkung zugeschrieben (Cazzulo *et al.*, 1970; Scrutton & Young, 1972; Osami *et al.*, 1981; Modak & Kelly, 1995; Ponk *et al.*, 1996). Erst durch mathematische Modellierung war es kürzlich möglich, α -Ketoglutarat und Oxalacetat als Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase in *C. glutamicum* zu beschreiben (Petersen, 2001; Petersen *et al.*, 2001), wobei die K_i -Werte für Oxalacetat auf ca. 30-100 μ M und für α -Ketoglutarat auf ca. 1 mM abgeschätzt wurden. Diese niedrigen Inhibitionskonstanten des Enzyms deuten auf eine starke Regulation durch Oxalacetat und α -Ketoglutarat hin. Im Gegensatz zur PEP-Carboxylase benötigt die Pyruvat-Carboxylase ATP als Cofaktor und wird von AMP und ADP gehemmt (Peters-Wendich, 1996; Perers-Wendisch *et al.*, 1997), wonach AMP (K_i 0.8 mM) wesentlich effektiver hemmt als ADP (K_i 2.6 mM). Dies würde bedeuten, daß die Pyruvat-Carboxylase durch einen niedrigen Energiezustand der Zelle gehemmt werden könnte und daher die Erniedrigung des anaplerotischen Carboxylierungsflusses von dem Energiezustand der Zelle abhängig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Acetyl-CoA die PEP- und Pyruvat-Carboxylase in *C. glutamicum* gegenläufig reguliert, d.h., einerseits aktiviert es die PEP-Carboxylase (Ozaki & Shiio, 1969; Mori & Shiio, 1985; Jetten *et al.*, 1994b) und andererseits inhibiert es die Pyruvat-Carboxylase (Peters-Wendisch, 1996; Perers-Wendisch *et al.*, 1997). Die physiologische Funktion dieser gegenläufigen Regulation ist noch unbekannt.

Der Glyoxylat-Zyklus mit den Schlüsselenzymen Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase wurde in Lysin-produzierenden *C. glutamicum*-Stämmen als mögliche anaplerotische Sequenz diskutiert (Yamaguchi *et al.*, 1986; de Hollander, 1994; Jetten & Sinskey, 1995a). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß bei Wachstum auf Glucose der Glyoxylat-Zyklus in allen Wachstumsphasen inaktiv war. Dies konnte ebenfalls mit dem Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B bei Chemostat-Kultivierung unter Glucose-Limitierung (Marx *et al.*, 1996) und bei exponentiellem Wachstum des Wildtyps von *C. glutamicum* unter nicht-limitierenden Bedingungen verdeutlicht werden (Wendisch *et al.*, 2000). Zudem wurde beobachtet, daß die Enzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase bei Wachstum auf Glucose nicht synthetisiert werden (Reinscheid *et al.*, 1994a und 1994b).

Bislang ist es nicht möglich ein detailliertes Regulationsmodell zu erstellen, welches weitgehend die Veränderungen der anaplerotischen Carboxylierungsreaktionen und decarboxylierenden Rückreaktionen bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen im Detail erklären kann. Daher müßten für die Quantifizierung der Regulation innerhalb der Anaplerosis in Zukunft Konzentrationsbestimmungen von intrazellulären Metaboliten durchgeführt werden, welche bereits als Effektoren der Anaplerosis bekannt sind. In **Abbildung 29** sind die bisher bekannten Effektoren bzw. Regulatoren dargestellt, die bei den in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der anaplerotischen Stoffflüsse eine Bedeutung haben können.

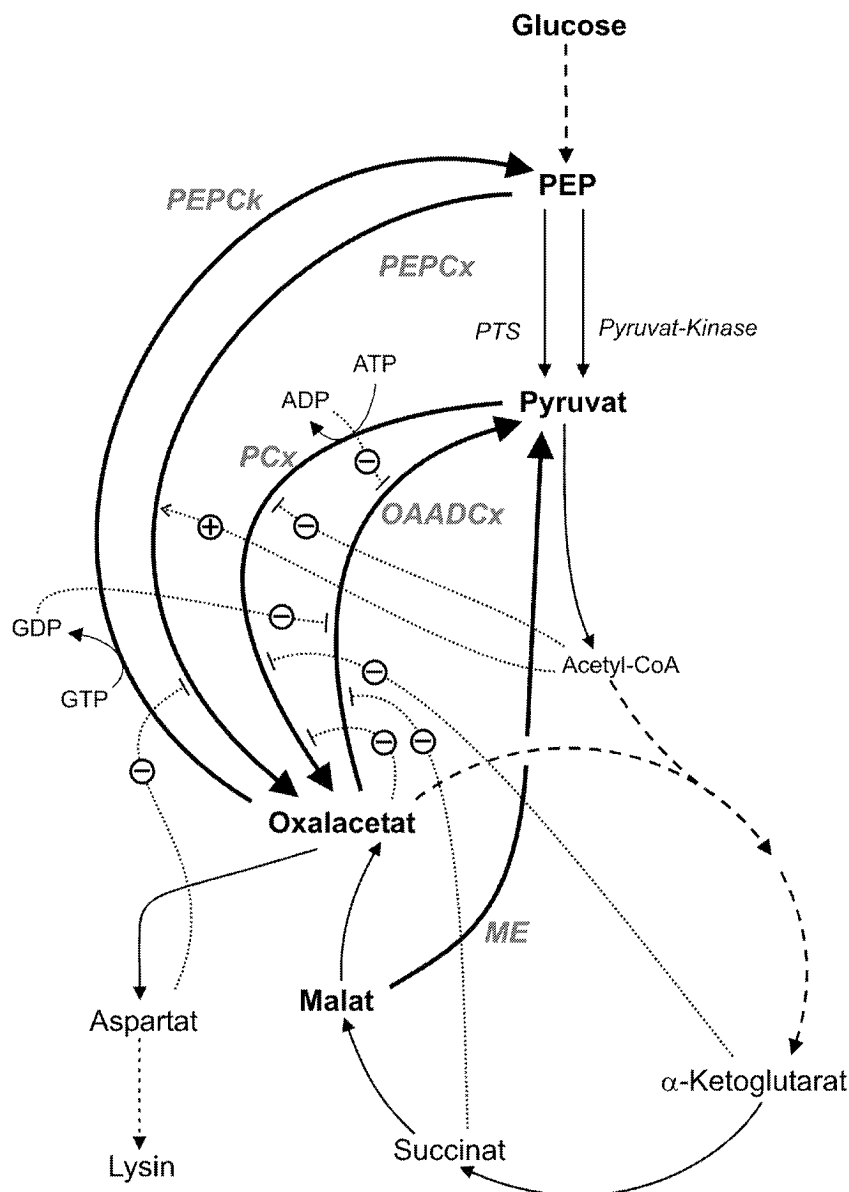


Abbildung 29: Regulationsmechanismen der Anaplerosis in *C. glutamicum*. + Aktivatoren. - Inhibitoren. *PEPCx*: PEP-Carboxylase; *PCx*: Pyruvat-Carboxylase; *PEPCK*: PEP-Carboxykinase; *OAADCx*: Oxalacetat-Decarboxylase; *ME*: Malat-Enzym.

Über die Funktion der PEP-Carboxykinase im Zentralmetabolismus bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen ist bisher nur wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein PEP-Carboxykinase (*pck*)-Deletionsstamm konstruiert und anschließend im Vergleich zum Wildtyp von *C. glutamicum* auf zahlreichen einzelnen Kohlenstoffquellen und Substratgemischen kultiviert. Dabei wurde deutlich, daß der *pck*-Deletionsstamm und der Wildstamm keine signifikanten Wachstumsunterschiede auf Nicht-PTS-Substraten, wie Ribose, Maltose und Gluconat, und auf PTS-Substraten, wie Glucose, Maltose und Saccharose, als einzige Kohlenstoffquelle zeigte. Auf Acetat und Lactat konnte die *pck*-Deletionsmutante hingegen nicht wachsen, was ebenfalls die Arbeiten von Riedel *et al.* (2001) bestätigten und somit die bedeutende gluconeogenetische Funktion dieses Enzyms verdeutlicht.

Die Analyse des Wachstums und des Substratverbrauchs ergaben, daß der Wildstamm auf Gemischen aus Nicht-PTS-Substraten und Acetat und auf Gemischen aus PTS-Substraten und Acetat monophasisch wuchs und beide Kohlenstoffquellen gleichzeitig verwertete. Dies konnte bereits auch bei Wachstum auf Gemischen von Glucose und verschiedenen organischen Säuren, wie Lactat, Pyruvat, Acetat und Propionat, gezeigt werden (Cocaign *et al.*, 1993; Dominguez *et al.*, 1993; Wendisch *et al.*, 2000; Claes *et al.*, 2002). Unter Verwendung von Gemischen aus Nicht-PTS-Substraten und Acetat traten bei der *pck*-Deletionsmutante im direkten Vergleich zum Wildstamm ebenfalls keine Unterschiede in bezug auf das Wachstum und den Substratverbrauch auf. Bei der Kultivierung der *pck*-Deletionsmutante auf Gemischen aus PTS-Substraten und Acetat war hingegen das Wachstum und die Verwertung der PTS-Substrate stark eingeschränkt. Diese Beobachtungen weisen somit auf eine bislang noch unbekannte Acetat-abhängige Regulation im Bereich der PTS-abhängigen Zuckeraufnahme oder bei der metabolischen Umsetzung der PTS-Substrate hin. Bereits die Stoffflußanalysen von Wendisch *et al.* (2000) zeigten, daß bei Wachstum auf einem Gemisch aus Glucose und Acetat, im Vergleich zum Wachstum auf Glucose als einzige Kohlenstoffquelle, die Glucose-Aufnahme um etwa die Hälfte verringert war. Diese Analysen ließen jedoch keine direkte Aussage über einen möglichen regulatorischen Einfluß durch Acetat zu. Erst die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsexperimente belegten schließlich, daß tatsächlich eine Regulation der Aufnahme bzw. Verwertung von PTS-Zuckern, wie Glucose, Fructose und Saccharose, durch Acetat erfolgt.

Am Beispiel des Substratverbrauchs der *pck*-Deletionsmutante auf dem Glucose-Acetat-Gemisch konnte gezeigt werden, daß zunächst Acetat bevorzugt wurde und der Glucoseverbrauch nur sehr gering war. Erst als das Acetat verbraucht war, konnte Glucose verstärkt verstoffwechselt werden. Diese Acetat-abhängige Verringerung der Glucose-Aufnahme könnte mit Hilfe der von Wendisch *et al.* (2000) durchgeführten Flußanalysen stöchiometrisch erklärt werden (**Abbildung 30**). Bei Wachstum des Wildtyps von *C. glutamicum* auf

Glucose als einzige Kohlenstoffquelle wurde die Glucose-Aufnahme mit $148 \text{ mU mg}_{\text{Protein}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ angegeben. Der glycolytische Fluß von Glycerinaldehyd-3-Phosphat nach PEP/Pyruvat betrug $227 \text{ mU mg}_{\text{Protein}}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Da bekanntlich für die Aufnahme von einem mol Glucose über das PTS ein mol PEP benötigt wird, ständen mit $227/148$ rein rechnerisch 1.5 mol PEP pro mol Glucose für das PTS zur Verfügung, wobei 0.5 mol bereits für die Biomassebildung verwendet wurde.

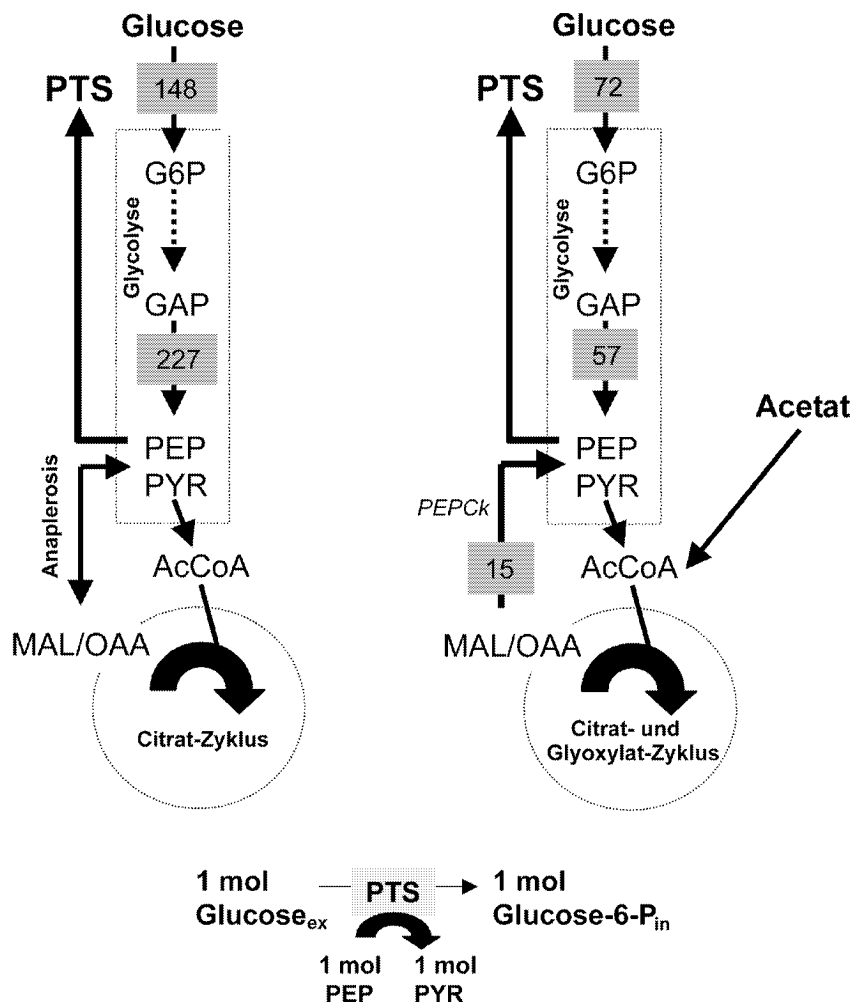


Abbildung 30: Stoffflüsse in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei Wachstum auf Glucose als einzige C-Quelle und auf Glucose und Acetat im Gemisch (vereinfacht nach Wendisch *et al.*, 2000). Bei Wachstum auf Glucose wird genügend PEP über die Glycolyse (1.5 mol) gebildet, was für die PTS-abhängige Glucose-Aufnahme genutzt werden kann. Bei Wachstum auf Glucose und Acetat wird die Glucose-Aufnahme vermindert, jedoch erfolgt die Auffüllung des PEP-Pools über den decarboxylierenden Rückfluß (PEP-Carboxykinase). PTS, PEP-abhängiges Phosphotransferasesystem; G6P, Glucose-6-Phosphat; PPW, Pentosephosphatweg; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; PEP/PYR, PEP/Pyruvat-Pool; OAA/MAL, Oxalacetat/Malat-Pool; PEPCK, PEP-Carboxykinase. Die hier gezeigten Flüsse sind in $\text{mU mg}_{\text{Protein}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ angegeben.

Bei Wachstum auf einem Gemisch aus Glucose und Acetat konnte beobachtet werden, daß die Glucose-Aufnahme nur noch $72 \text{ mU mg}_{\text{Protein}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ betrug, wohingegen der Fluß von Glycerinaldehyd-3-Phosphat nach PEP/Pyruvat mit $57 \text{ mU mg}_{\text{Protein}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bestimmt wurde. Hier ständen am Ende der Glycolyse mit 57/72 nur 0.8 mol PEP pro mol Glucose zur Verfügung, was schon alleine für die Glucose-Aufnahme über das PTS nicht reichen würde. Dies wird aber im Wildtyp über einen gluconeogenetischen Fluß über die decarboxylierende Rückreaktion (PEP-Carboxykinase) von $15 \text{ mU mg}_{\text{Protein}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ausgeglichen, so daß wieder genügend PEP zu Verfügung stehen würde. Weiterhin ist interessant, daß bei Wachstum auf dem Glucose-Acetat-Gemisch die Glucose überwiegend in der Glycolyse für die Bildung von Vorstufen der Biomassesynthese verwendet wird und die Bildung von Acetyl-CoA aus Glucose sehr gering ist. Die Bildung von Acetyl-CoA erfolgt somit hauptsächlich durch die Verstoffwechselung von Acetat (Wendisch *et al.*, 2000).

Mit Hilfe der *pck*-Deletionsmutante konnte nun gezeigt werden, daß die Verringerung der Glucose-Aufnahme durch die Anwesenheit von Acetat bestimmt wird. Da nun in dieser Mutante der Mangel an PEP über die PEP-Carboxykinase-Reaktion nicht mehr ausgeglichen werden kann, steht somit nicht mehr genügend PEP für die PTS-abhängige Glucose-Aufnahme zur Verfügung. Daher wurde auf dem Glucose-Acetat-Gemisch zuerst hauptsächlich Acetat verstoffwechselt. Die Tatsache, daß sich der *pck*-Deletionsstamm und der Wildtyp auf Gemischen aus Nicht-PTS-Substraten (Maltose und Gluconat) und Acetat in bezug auf das Wachstum und den Substratverbrauch gleich verhielten, unterstreicht das Vorhandensein einer Acetat-abhängigen PTS-Regulation, da diese Nicht-PTS-Substrate für ihre Aufnahme in die Zelle kein PEP benötigen. Anhand von *DNA-Microarray*-Analysen konnte kürzlich gezeigt werden, daß z.B. die Expression des *ptsM*-Gens, welches für das Glucose-PTS-Enzym II (Glucose-Permease) kodiert, im Vergleich zum Wachstum auf Glucose, auf Acetat 2.3-fach und auf Glucose und Acetat im Gemisch 2.9-fach erniedrigt war (Gerstmeir *et al.*, 2003). Dies kann erklären, warum die Glucose-Aufnahme in Anwesenheit von Acetat stark gehemmt wird. Darüber hinaus wurden anhand dieser Analysen weitere Gene identifiziert, welche ebenfalls bei Anwesenheit von Acetat auf transkriptionaler Ebene reguliert werden. Dabei erhöhte sich die Expression der Gene von Enzymen aus dem Citrat- und Glyoxylat-Zyklus, welche bedeutend für die Umsetzung von Acetat sind, wie z.B. die Gene der Aconitase, Fumarase, Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase (Hayashi *et al.*, 2002; Gerstmeir *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wurde eine Erniedrigung der Expression von Genen einiger glycolytischen Enzyme und Enzyme des Pentosephosphatwegs, wie z.B. die Gene der Pyruvat-Kinase, Enolase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Transketolase und Transaldolase, beobachtet (Hayashi *et al.*, 2002; Gerstmeir *et al.*, 2003). Die Erniedrigung der Expression dieser Gene scheint jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt werden

konnte, keine bedeutende Rolle zu spielen, da in diesem Fall sogar der Wildtyp eine Verringerung bei Wachstum auf den Mischsubstraten hätte zeigen müssen.

Nun stellt sich die Frage, ob Acetat und/oder möglicherweise ein Metabolit des Acetat-Stoffwechsels diese transkriptionale Regulation bewirkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Glucose im Substratgemisch, nachdem das Acetat vollständig verbraucht war, durch die *pck*-Deletionsmutante verstärkt verwertet werden konnte. Jedoch erfolgte diese Glucose-Verwertung sichtbar langsamer als die Glucose-Verwertung durch den Wildstamm im Substratgemisch. Vermutlich häufen sich bei der Acetat-Verwertung Metabolite des Acetat-Stoffwechsels in der Zelle an und üben für eine gewisse Zeit, auch noch nach dem vollständigen Verbrauch des Acetats, eine regulatorische Funktion auf transkriptionaler Ebene aus. Für Acetyl-CoA wurde bereits im Acetat-Stoffwechsel eine regulatorische Wirkung auf transkriptionaler Ebene zugeschrieben (Wendisch *et al.*, 1997). Dabei wurde gezeigt, daß in Mutanten, welche aufgrund einer fehlenden Aktivität der Phosphotransacetylase und der Acetat-Kinase kein Acetyl-CoA aus Acetat bilden konnten, die spezifischen Aktivitäten der Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase stark erniedrigt waren. Ebenfalls korrelierten erhöhte Aktivitäten der Isocitrat-Lyase, der Malat-Synthase, der Acetat-Kinase und der Phosphotransacetylase mit einer erhöhten intrazellulären Acetyl-CoA-Konzentration. Dies bekräftigt somit die Vermutung, daß auch Metabolite des Acetat-Stoffwechsels ihren Beitrag zu einer regulierten Aufnahme von PTS-Substraten leisten können.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß möglicherweise auch Lactat eine Regulation der PTS-abhängigen Glucose-Aufnahme bewirkt, da die *pck*-Deletionsmutante eine deutliche Verminderung des Wachstums auf einem Gemisch aus Glucose und Lactat aufzeigte. *DNA-Microarray*-Analysen zur Bestimmung der Expression bestimmter Gene bei Anwesenheit von Lactat wurden jedoch bisher noch nicht durchgeführt.

Bei Wachstum der *pck*-Deletionsmutante auf einem Fructose-Acetat-Gemisch konnte ebenfalls eine Verzögerung der Fructose-Aufnahme und des Wachstums festgestellt werden, aber jedoch nicht in dem Maße, wie es bei Wachstum auf Glucose und Acetat im Gemisch zu sehen war. Die Arbeiten von Gerstmeir *et al.* (2003) zeigten, daß z.B. die Expression des *fruA*-Gens, welches für das Fructose-spezifische PTS II BC kodiert, im Vergleich zum Wachstum auf Glucose, auf Acetat 2.4-fach und auf Glucose und Acetat im Gemisch 2.2-fach erniedrigt war. Dies bekräftigt ebenfalls eine Acetat-Regulation der PTS-abhängigen Fructose-Aufnahme.

Bei Wachstum auf Saccharose und Acetat im Gemisch wurde gezeigt, daß die *pck*-Deletionsmutante zu Beginn der Kultivierung fast ausschließlich Acetat verwendete, im weiteren Verlauf jedoch danach ausschließlich Saccharose und nicht Acetat aufgenommen wurde. Die Untersuchungen von Dominguez & Lindley (1996) ergaben, daß die Aufnahme

von Saccharose eine Ausnahme im Bereich der PTS-abhängigen Zuckeraufnahme darstellt. Dabei wird zunächst Saccharose über das Saccharose-PTS aufgenommen und intrazellulär in Glucose-6-Phosphat und Fructose umgewandelt. Da *C. glutamicum* über keine Fructokinase verfügt, welche Fructose durch Phosphorylierung aktivieren kann, wird die intrazelluläre Fructose zunächst über einen noch unbekannten Mechanismus nach außen ins Medium abgegeben, über das Fructose-PTS aufgenommen und schließlich dabei zu Fructose-1-Phosphat phosphoryliert, welches weiter als Fructose-1,6-Bisphosphat in die Glycolyse einfließt. Dieser ungewöhnliche Mechanismus kann einen Einfluß auf die Substrataufnahme im Saccharose-Acetat-Gemisch haben. Zunächst wurde die Aufnahme von Saccharose über das PTS durch die Anwesenheit von Acetat weitgehend gehemmt. Dennoch konnte anscheinend ein sehr geringer Teil der Saccharose über das PTS aufgenommen und zu Glucose-6-Phosphat und Fructose umgewandelt werden. Die Fructose wurde dann anschließend über den von Dominguez & Lindley (1996) beschriebenen Weg nach außen abgegeben und über das Fructose-PTS aufgenommen. Hierbei ist nochmals anzumerken, daß die Aufnahme der Fructose über das Fructose-PTS viel effizienter abläuft, da die Acetat-Hemmung für die Fructose-Aufnahme, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wesentlich geringer war. Diese zusätzliche Fructose führte anschließend dazu, daß nun ausreichend PEP über die Glycolyse gebildet werden konnte und somit wiederum den durch die *pck*-Deletion verursachten PEP-Mangel ausglich bzw. verringerte. Daher konnte somit im Verlauf der Kultivierung mehr Saccharose über das PTS aufgenommen werden. Warum jedoch in dieser Zeit kein Acetat aufgenommen wurde, kann nicht geklärt werden. Über eine erniedrigte Expression von Genen, welche für Komponenten des Saccharose-PT-Systems kodieren, gibt es bislang keine Angaben. Wahrscheinlich wird auch hier die PTS-abhängige Aufnahme der Saccharose durch die Anwesenheit von Acetat auf transkriptionaler Ebene reguliert. Interessant ist noch zu erwähnen, daß alle PTS-Zucker nicht ausschließlich für ihre Aufnahme auf ihre spezifischen PT-Systeme angewiesen sind, sondern auch, obwohl jedoch meist in geringerem Maße, über andere PT-Systeme aufgenommen werden können (Dominguez & Lindley, 1996; Dominguez *et al.*, 1997). So wird z.B. Glucose nicht nur über das Glucose-PTS, sondern auch über das Fructose-, Mannose- und Saccharose-PTS aufgenommen, wobei vermutet werden kann, daß alle diese PT-Systeme durch die Anwesenheit von Acetat mehr oder weniger beeinflusst werden.

Zusammengefaßt ist festzuhalten, daß Acetat und Lactat im allgemeinen eine Verzögerung der Aufnahme von PTS-Substraten bewirken und zwar direkt oder indirekt über das PTS. Die verschiedenen Profile beim Wachstum und beim Substratverbrauch deuten jedoch eine komplexe Regulation an, welche z.Z. noch weitgehend unverstanden ist. In Zukunft können *DNA-Microarray*-Analysen in Kombination mit einer intrazellulären Metabolit-Quantifizierung zum besseren Verständnis beitragen.

V. Zusammenfassung

Corynebacterium glutamicum wird zur technischen Herstellung von Aminosäuren, wie z.B. von Lysin, seit vielen Jahren eingesetzt. Da die Produktion von Aminosäuren hauptsächlich in *Batch*- bzw. *Fedbatch*-Fermentationen durchgeführt wird, war es das Ziel dieser Arbeit, die intrazellulären Stoffflüsse unter diesen Bedingungen zu quantifizieren. Weiterhin sollte untersucht werden, welche physiologische Bedeutung der Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxykinase, einem wichtigen Enzym bei der gluconeogenetischen Substratverwertung und der Lysin-Synthese, bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und Mischsubstraten zukommt.

1. Nach Zugabe von ^{13}C -markierter Glucose wurde mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie die isotopomere Markierung in verschiedenen intrazellulären Metaboliten ermittelt. Mit diesen Daten gelang es, die Stoffflüsse während des Wachstums und der Produktionsphase zu bestimmen. Im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase war während der Lysin-Produktionsphase die Aktivität des Pentosephosphatwegs erhöht, so daß mehr NADPH für die Lysin-Synthese gebildet wurde.
2. Ferner wurden mit dem Sensorreaktorsystem mehrere Markierungsexperimente nacheinander im Sensorreaktor, parallel zu der laufenden *Batch*-Fermentation im Produktionsreaktor, durchgeführt. Somit war es möglich, eine chronologische Serie von Stoffflußdaten im technischen Fermentermaßstab zu gewinnen. Anhand der Fermentationsprofile wurden nahezu identische Wachstumsbedingungen im Produktions- und Sensorreaktor gezeigt. Die Stoffflußanalyse ergab, daß bei steigender Lysin-Produktion eine Reduzierung des Oxalacetat-Abbaus über die decarboxylierenden Rückflüsse der Anaplerosis um 70 % erfolgte. Im *Fedbatch*-Verfahren kam der Oxalacetat-Abbau bei maximaler Lysin-Produktion fast vollständig zum Erliegen.
3. Nach Ausschalten des Oxalacetat-abbauenden Enzyms PEP-Carboxykinase wurde das Wachstum auf verschiedenen Zuckern im Vergleich zum Wildstamm nicht beeinflusst. Dagegen erfolgte bei dieser Mutante durch Zugabe von Acetat oder auch Lactat zu einem Nährmedium mit Glucose, Fructose oder Saccharose als Kohlenstoff- und Energiequelle eine starke Wachstumsverminderung. Dabei wird das PTS, welches für die Aufnahme dieser Zucker verantwortlich ist, durch Acetat oder Lactat reprimiert.

VI. Literatur

Abe S., Takayama K. & Kinoshita S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.

Bentle L.A. & Lardy H.A. (1976). Interactions of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **251**: 2916-2921.

Bergmeyer H.U. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed., vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London.

Bramucci M.G. & Nagarajan V. (1996). Direct deletion of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on saccharose-induced lethality. *Appl. Environmental. Microbiol.* **62 (11)**: 3948-3953.

Bröer S., Eggeling L. & Krämer R. (1993). Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 316-321.

Cazzulo J.J., Sundaram T.K. & Kronberg H.L. (1970). Properties and regulation of pyruvate carboxylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **176**: 1-19.

Christensen B., Thykaer J. & Nielsen J. (2000). Metabolic characterization of high- and low-yielding strains of *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Bacteriol.* **54**: 212-217.

Christensen B. & Nielsen J. (2000). Metabolic Network Analysis of *Penicillium chrysogenum* using ¹³C-labeled glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **68**: 652-659.

Claes W.A., Pühler A. & Kalinowski J. (2002). Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J. Bacteriol.* **184**: 2728-2739.

Cocaign M., Monnet C. & Lindley N.D. (1993). Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various substrates: Use of substrate mixtures to localize metabolic bottlenecks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 536-530.

Cocaign-Bousquet M. & Lindley N.D. (1995). Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 260-267.

- Cocaign-Bousquet M., Guyonvarch A & Lindley N.D. (1996).** Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 429-436.
- Constantinides A. (1980).** Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized cells of *Corynebacterium simplex*. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 119-126.
- Cremer J., Eggeling L. & Sahm H. (1990).** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 478-480.
- Cremer J., Eggeling L. & Sahm H. (1991).** Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1746-1752.
- Dauner M., Storni T. & Sauer U. (2001).** *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J. Bacteriol.* **183 (24)**: 7308-7317.
- de Graaf A.A. (2000a).** Use of ^{13}C labelling and NMR spectroscopy in metabolic flux analysis. In: *NMR in Microbiology: Theory and applications*. pp. 73-103, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- de Graaf A.A. (2000b).** Metabolic flux analysis of *Corynebacterium glutamicum*. In: Schügerl K., Bellgardt K.H. (eds.), *Bioreaction Engineering*. Springer-Verlag, Berlin ISBN 354066906X.
- de Graaf A.A. (2000c).** Metabolic analysis of *Zymomonas mobilis*. In: Schügerl K., Bellgardt K.H. (eds.), *Bioreaction Engineering*. Springer-Verlag, Berlin ISBN 354066906X.
- de Graaf A.A., Eggeling L. & Sahm H. (2001).** Metabolic engineering for lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 73, Scheper T. (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- de Hollander J.A. (1994).** Potential metabolic imitations in lysine production by *Corynebacterium glutamicum* as revealed by metabolic network analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 508-515.
- de Koning W. & van Dam K. (1992).** A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal. Biochem.* **204**: 118-123.

Deutscher J. & Saier M.H. (1983). ATP-dependent kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 6790-6794.

Dominguez H., Coccain-Bousquet M. & Lindley N.D. (1993). Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 600-603.

Dominguez H. & Lindley N.D. (1996). Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3878-3880.

Dominguez H., Coccain-Bousquet M. & Lindley N.D. (1997). Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 600-603.

Dominguez H., Rollin C., Guyonvarch A., Guerquin-Kern J.-L., Coccain-Bousquet M. & Lindley N.D. (1998). Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* **254**: 96-102.

Eggeling L. (1994). Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino acids* **6**: 261-272.

Eggeling L., Oberle S. & Sahm H. (1998). Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: Use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 24-90.

Eggeling L. & Sahm H. (1999). L-glutamate and L-lysine: Traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153.

Eggeling L. & Sahm H. (2001). The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.* **92 (3)**: 201-213.

Ehrenberger F. (1979). Zur Bestimmung von Sauerstoffbedarfs- und Kohlenstoff-Kennzahlen in der Wasserqualitätsbestimmung. *GIT Fachz. Lab.* **23**: 738-747.

Eikmanns B.J., Follettie M.T., Griot M.U. & Sinskey A.J. (1989). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: Molecular cloning, nucleotide sequence and expression. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 330-339.

Eikmanns B.J., Eggeling L. & Sahm H. (1993). Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 145-163.

- El Massaoudi M. (2003).** Entwicklung eines Sensor Reaktor Systems für metabolische Stoffflußanalysen in instationären Fermentationen. Dissertation Universität Bonn. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* (im Druck).
- El Massaoudi M., Spelthahn J., Drysch A., de Graaf A.A. & Takors R. (2003).** Production process monitoring by serial mapping of microbial carbon flux distributions using a novel sensor reactor approach: I - Sensor reactor system. *Metab. Eng.* **5**: 86-95.
- Emmerling M., Dauner M., Ponit A., Fiaux J., Hochuli M., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J.E. & Sauer U. (2002).** Metabolic flux responses to pyruvate knockout in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184** (1): 152-164.
- Flores S., Gosset G., Flores N., de Graaf A.A. & Bolivar F. (2001).** Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* **277** (17): 14390-14399.
- Gerstmeir R., Wendisch V.F., Schnicke S., Ruan H., Farwick M., Reinscheid D. & Eikmanns B.J. (2003).** Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* (im Druck).
- Gombert A.K., dos Santos M.M., Christensen B. & Nielsen J. (2001).** Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J. Bacteriol.* **183** (4): 1441-1451.
- Gourdon P. & Lindley N.D. (1999).** Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **1**: 224-231.
- Gourdon P., Baucher M.F., Lindley N.D. & Guyonvach A. (2000).** Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl. Environm. Microbiol.* **66**: 2981-2987.
- Gubler M., Jetten M., Lee S.H. & Sinskey A.J. (1994).** Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2494-2500.
- Gutmann M., Hoischen C. & Krämer R. (1992).** Carrier mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**: 115-123.
- Hanahan D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580

- Hanahan D. (1985).** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *DNA cloning. A practical approach*. vol. I, Glover D.M. (ed.), IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA. pp. 109-135.
- Hayashi M., Mizoguchi H., Shiraishi N., Obayashi M., Nakagawa S., Imai J.-I., Watanabe S., Ota T. & Ikeda M. (2002).** Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (6): 1337-1334.
- Jetten M.S.M. & Sinskey A.J. (1993).** Charakterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* **111**: 183-188.
- Jetten M.S.M, Gubler M.E., Lee S.H. & Sinskey A.J. (1994a).** Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2501-2507.
- Jetten M.S.M., Pitoc G.A., Follettie M.T. & Sinskey A.J. (1994b).** Regulation of phospho(enol)pyruvate- and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 47-52.
- Jetten M.S.M. & Sinskey A.J. (1995a).** Recent advances in the physiology and genetics of amino acid producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**: 73-103.
- Jetten M.S.M. & Sinskey A.J. (1995b).** Purification and properties of oxaloacetate decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie v. Leeuwenhoek* **67**: 221-227.
- Jones B.M. & Gilligan J.P. (1983).** o-Phthaldialdehyde precolumn derivatisation and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromtography* **266**: 471-482.
- Jonsbu E., Chrisensen B. & Nielsen J. (2001).** Canges of in vivo fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 93-100.
- Kase H. & Nakayama K. (1972).** Mechanism of L-threonine und L-lysine production by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* **36** (9): 1611-1621.
- Keilhauer C., Eggeling L. & Sahm H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* Operon. *J. Bacteriol.* **175** (17): 5595-5603.

- Kinoshita S., Udaka S. & Shimono M. (1957).** Studies of the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
- Kinoshita S. (1985).** Glutamic acid bacteria. In: *Biology of industrial microorganisms*. Dwemain A.L. & Solomon N.A. (eds.). The Benjamin/Cummings Publishing Company, London. pp. 115-142.
- Krämer R. (1996).** Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J. Biotechnol.* **45**: 1-21.
- Lambert C., Erdmann A., Eikmanns M. & Krämer R. (1995).** Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4334-4342.
- Lapujade P., Goergen J. & Engasser J.-M. (1999).** Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metabol. Eng.* **1**: 255-261.
- Lechevalier M.P. & Lechevalier K. (1979).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
- Lee C.W., Lucas S. & Desmoazeaud M.J. (1985).** Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 201-205.
- Lengler J.W., Drews G. & Schlegel H.G. (1999).** Biology of prokaryotes. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Leuchtenberger W. (1996).** Amino acids - technical production and use. In: *Biotechnology vol. 6. Products of primary metabolism*. Rehm H.-J., Reed G., Pühler A. & Stadler P. (eds.), Verlag Chemie, Weinheim. pp. 465-502.
- Liebl W. (1991).** The Genus *Corynebacterium* - Nonmedical. In: *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 2nd ed., pp. 1157-1171. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M, Harder W. & Schleifer K.-H. (eds.), Springer Verlag, Heidelberg.
- Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U. & Schleifer K.H. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *Eur. J. Biochem.* **254**: 395-403.
- Lindroth P. & Mopper K. (1979).** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatisation with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1167-1174.

- Malin G.M. & Bourd G.I. (1991).** Phosphotransferase-dependent glucose transport in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 517-523.
- Marx A. (1997).** Bestimmung des Kohlenstoffflusses im Zentralstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum* mittels ¹³C-Isotopenanalyse. Dissertation Universität Bonn. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3459 (ISSN 0944-2952).
- Marx A., de Graaf A.A., Wiechert W., Eggeling L. & Sahm H. (1996).** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 111-129.
- Marx A., Striegel K., de Graaf A.A., Sahm H. & Eggeling L. (1997).** Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioeng.* **56**: 168-180.
- Marx A., Eikmanns B.J., Sahm H., de Graaf A.A. & Eggeling L. (1999).** Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metab. Eng.* **1**: 35-48.
- Menkel E., Thierbach G., Eggeling L. & Sahm H. (1989).** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 684-688.
- Modak H.V. & Kelly D.J. (1995).** Acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*: Rapid and efficient purification using dye-ligand affinity chromatography. *Microbiology* **141**: 2619-2628.
- Möllney M., Wiechert W., Kownatzki D. & de Graaf A.A. (1999).** Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optional design of isotopomer labeling experiments. *Biotechnol. Bioeng.* **66**: 86-103.
- Mori M. & Shio I. (1985).** Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J. Biochem.* **97**: 1119-1128.
- Moritz B.S. (2000).** Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatwegs in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3743 (ISSN 0944-2952).
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L. & Schaechter M. (1990).** Physiology of the bacterial cell. Sinauer associates, Sunderland, pp. 133-173.

Nelder J.A. & Mead R. (1965). A simplex method for function minimization. *Computer J.* **7**: 308-313.

Osmani S.A., Marston F.A.O., Selmes I.P., Chapman A.G. & Scrutton M.C. (1981). Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Regulatory properties. *Eur. J. Biochem.* **118**: 271-278.

Ozaki H. & Shii I. (1969). Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. II. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *J. Biochem.* **66**: 297-311.

Parche S., Burkovski A., Sprenger G.A., Weil B., Krämer R. & Titgemeyer F. (2001). *Corynebacterium glutamicum*: A dissection of the PTS. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3** (3): 423-428.

Pedersen H., Christensen B., Hjort C. & Nielsen J. (2000). Construction and characterization of an oxalic non-producing strain of *Aspergillus niger*. *Metab. Eng.* **2**: 34-41.

Petersen S. (2001). Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität anaplerotischer Stoffwechselwege in *Corynebacterium glutamicum* mittels ¹³C-Markierungstechnik. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3875 (ISSN 0944-2952).

Petersen S., de Graaf A.A., Eggeling L., Möllney M., Wiechert W. & Sahm H. (2000). *In vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **275**: 35932-35941.

Petersen S., Mack C., de Graaf A.A., Riedel C., Eikmanns B.J. & Sahm H. (2001). Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in *Corynebacterium glutamicum* reveal anaplerotic regulation mechanismus *in vivo*. *Metab. Eng.* **3**: 344-361.

Peters-Wendisch P.G. (1996). Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3259 (ISSN 0944-2952).

Peters-Wendisch P.G., Eikmanns B.J., Thierbach G., Bachmann B. & Sahm H. (1993). Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensible for growth and lysine production. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**: 269-274.

Peters-Wendisch P.G., Wendisch V.F., de Graaf A.A. Eikmanns B.J. & Sahm H. (1996). C₃-carboxylation as an anaplerotic reaction in phophoenolpyruvate carboxylase-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **165**: 387-396.

- Peters-Wendisch P.G., Wendisch V.F., Paul S., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1997).** Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **143**: 1095-1103.
- Peters-Wendisch P.G., Schiel B., Wendisch V.F., Katsoulidis E., Möckel B., Sahm H. & Eikmanns B.J. (2001).** Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 295-300.
- Pronk J.T., Steensma H.Y. & van Dijken J.P. (1996).** Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607-1633.
- Reinscheid D.J., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1994a).** Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**: 3474-3483.
- Reinscheid D.J., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1994b).** Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: Sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology* **140**: 3099-3108.
- Reizer J., Sutrina S.L., Saier M.H., Steward G.C., Peterkowsky A. & Reddy P. (1989).** Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: Studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO J.* **8**: 2111-2120.
- Riedel C., Rittmann D., Dangel P., Möckel B., Petersen S., Sahm H. & Eikmanns B.J. (2001).** Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 573-583.
- Sahm H., Eggeling L., Eikmanns B. & Krämer R. (1995).** Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 243-252.
- Sahm H., Eggeling L. & de Graaf A.A. (2000).** Pathway analysis and metabolic Engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol. Chem.* **381**: 899-910.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higushi R., Horn G.T., Mullis K.B. & Ehrlich H.A. (1988).** Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **23**: 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Sauer U., Hatzimanikatis V., Hohmann H.P., Manneberg M., van Loom A.P.G.M. & Bailey L.E. (1996).** Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3687-3696.
- Sauer U., Hatzimanikatis V., Bailey J.E., Hochuli M., Szyperski T. & Wüthrich K. (1997).** Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnol.* **15**: 448-452.
- Schaefer U., Boos W., Takors R. & Weuster-Botz D. (1999).** Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamix. *Anal. Biochem.* **270**: 88-96.
- Schäfer A., Schwarzer A., Kalinowski J. & Pühler A. (1994a).** Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 7309-7319.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. & Pühler A. (1994b).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schleifer K.H. & Kandler O. (1972).** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Schmidt K., Norregaard L.C., Pedersen B., Meissner A., Duus J.O. & Nielsen J. (1999a).** Quantification of intracellular metabolic fluxes from fractional enrichment and ^{13}C - ^{13}C coupling constraints on the isotopomer distribution in labelled biomass components. *Metab. Eng.* **1**: 166-179.
- Schmidt K., Nielsen J. & Villadsen J. (1999b).** Quantitative analysis of metabolite fluxes in *E. coli* using two-dimensional NMR spektroskopy and complete isotopomer models. *J. Biotechnol.* **71**: 175-189.
- Schrumpf B. (1991).** Lysinbildung mit *Corynebacterium glutamicum*: Analyse des Metabolitflusses durch Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen und enzymatische Untersuchungen. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 2478 (ISSN 0366-0885).
- Schrumpf B., Eggeling L. & Sahm H. (1992).** Isolation and prominent characteristics of a L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-571.
- Scrotton M.C. & Young M.R. (1972).** Pyruvate carboxylase. In: *The enzymes*, vol. 6. pp. 1-35. Boyer B.D. (ed.), Academic Press, New York.

Shaka A.J., Barker P.B. & Freeman R. (1985). Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J. Magn. Reson.* **64**: 547-552.

Shiio I., Otsuka S.I. & Takahashi M. (1962). Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* **51**: 56-62.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fuiimoto E.K., Goeke N.M., Olsen B.J. & Klenk D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.

Sonntag K., Eggeling L., de Graaf A.A. & Sahm H. (1993). Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* **213**: 1325-1331.

Sonntag K., Schwinde J., de Graaf A.A., Marx A., Eikmanns B.J., Wiechert W. & Sahm H. (1995). ¹³C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 489-495.

Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A. & Nielsen J. (1998). Metabolic engeneering-principles and methodologies. Academic press, San Diego, CA, USA ISBN 0-12-666260-6.

Sugimoto S. & Shiio I. (1989). Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **53 (5)**: 1261-1268.

Szypersky T. (1995). Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.* **232**: 433-448.

Takata J., Yamamoto K., Tosa T. & Chibata J. (1979). Screening of micoorganisms having high fumarase activity and their immobilization with carrageenan. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **7**: 161-172.

Tesch M. (1998). *In vivo*-¹⁵N-NMR-Untersuchungen zur Ammoniumassimilation in *C. glutamicum*. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3496 (ISSN 0944-2952).

Tesch M., de Graaf A.A. & Sahm H. (1999). *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by ¹⁵N nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1099-1109.

Teuber M., Geis A., Kursch U., Lembke J. & Moebus O. (1987). Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Lebensmitteln und Futtermitteln. In: Handbuch der Biotechnologie. Praeve P., Faust U., Sittig W. & Sukatsch D.A. (Ed.), Oldenburg Verlag, München. pp. 269-313.

Tindall K.R. & Kunkel T.A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.

Vallino J.J. (1991). Identification of branch-point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network perturbations. Ph.D. Thesis, Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts.

Vallino J.J. & Stephanopoulos G. (1990). Flux determination in cellular bioreaction networks: Application to lysine fermentation. In: *Frontiers in bioprocessing*, Sikdar S.K., Bier M. & Todd P. (eds.), Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc. pp. 205-219.

Vallino J.J. & Stephanopoulos G. (1993). Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 633-646.

van der Rest M.E., Lange C. & Molenaar D. (1999). A heat-shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* xenogenic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-545.

Vrlijk M., Sahm H. & Eggeling L. (1996). A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**: 815-826.

Wendisch V.F., Spies M., Reinscheid D.J., Schnicke S., Sahm H. & Eikmanns B.J. (1997). Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: Transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch. Microbiol.* **168**: 262-269.

Wendisch V.F., de Graaf A.A., Sahm H. & Eikmanns B.J. (2000). Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: Comparative analysis with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J. Bacteriol.* **182**: 3088-3096.

Wiechert W. (2001). ¹³C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* **3**: 195-206.

Wiechert W. & de Graaf A.A. (1996). *In vivo* stationary flux analysis by ¹³C labeling experiments. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 54: Metabolic Engineering, Scheper T. (ed.), Springer Verlag, pp. 111-154.

Wiechert W. & de Graaf A.A. (1997). Bidirectional reaction steps in metabolic networks. Part I: Modelling and simulation of carbon isotope labelling experiments. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 101-117.

Wiechert W., Siefke C., de Graaf A.A. & Marx A. (1997). Bidirectional reaction steps in metabolic networks. Part II: Flux estimation and statistical analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 118-135.

Wiechert W., Möllney M., Isermann N., Wurzel M. & de Graaf A.A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems. *Biotechnol. Bioeng.* **66**: 69-85.

Wittmann C. & Heinzle E. (2001). Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*. A novel approach for metabolic flux analysis. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2441-2455.

Wittmann C. & Heinzle E. (2002). Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: Metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing *Corynebacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (12): 5843-5859.

Yamaguchi K., Ishino S., Araki K & Shirahata K. (1986). ¹³C NMR studies of lysine fermentation with a *Corynebacterium glutamicum* mutant. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2453-2459.

Ye J.J., Reizer J., Cui X. & Saier M.H. (1994). Inhibition of the phosphoenolpyruvate:lactose phosphotransferase system and activation of a cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of serine 46 in the phosphocarrier protein HPr. *J. Biol. Chem.* **269**: 11837-11844.

Zupke C. & Stephanopoulos G. (1994). Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in networks using atom mapping matrices. *Biotechnol. Prog.* **10**: 489-498.

Eigene Veröffentlichungen:

Drysch A., El Massaoudi M., Mack C., Takors R., de Graaf A.A. & Sahm H. (2003). Production process monitoring by serial mapping of microbial carbon flux distributions using a novel sensor reactor approach: II - ¹³C labeling-based metabolic flux analysis and L-lysine production. *Metab. Eng.* **5**: 96-107.

Drysch A., El Massaoudi M., Wiechert W., de Graaf A.A. & Takors R. (2003). Serial flux mapping of *Corynebacterium glutamicum* during fed-batch L-lysine production using the sensor reactor approach. *Biotechnol. Bioeng.* (im Druck).

VII. Anhang

Tabelle 15: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Aminosäuren und Metabolite für die Bestimmung der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B bei exponentiellem Wachstum. Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₋₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)			
		s	d ₋₁	d ₊₁	dd
Trehalose	1	43.4 ± 4		56.6 ± 3	
	2	3.6 ± 3.5		16.9 ± 4 ^b	79.4 ± 12
	3	3.4 ± 3		12.1 ± 5 ^b	84.6 ± 12
	4	7.3 ± 6		16.8 ± 6 ^b	75.9 ± 10
	5	4.8 ± 4		5.7 ± 4 ^b	89.5 ± 8
Nukleoside ^a	1	35.3 ± 1.5		64.7 ± 2	
	2	8.6 ± 5		35.4 ± 4 ^b	55.9 ± 5
	4	3.1 ± 2.5		9.5 ± 2 ^b	87.4 ± 3
Aspartat	2	12.1 ± 1.5	22.8 ± 2.5	14.2 ± 2.5	50.9 ± 3
	3	19.0 ± 2	31.0 ± 1	23.9 ± 1	26.1 ± 2
Alanin	3	28.9 ± 2.5	71.1 ± 3		
Citrat	2	19.4 ± 3	38.0 ± 3	20.4 ± 3.5	22.2 ± 3.5
	4	19.4 ± 3	20.4 ± 3.5	38.0 ± 3	22.2 ± 3.5
Valin	4	29.5 ± 4	70.5 ± 3.5		
	5	68.7 ± 2	31.3 ± 5		
Glutamat	2	20.9 ± 1	27.6 ± 2	25.0 ± 2	26.5 ± 3
	3	24.1 ± 1		54.7 ± 2.5 ^b	21.2 ± 2
	4	17.5 ± 1	7.5 ± 1.5	52.0 ± 1	22.9 ± 1
Isoleucin	4	33.6 ± 1.5		50.9 ± 3.5 ^b	15.5 ± 4
	5	47.5 ± 1	52.5 ± 2		
	6	25.9 ± 1	74.1 ± 1		
Lysin	3	17.3 ± 2		55.5 ± 3 ^b	27.3 ± 4
	4	28.0 ± 1		50.5 ± 3 ^b	21.5 ± 4
	5	18.3 ± 3		58.6 ± 3 ^b	23.1 ± 4
	6	16.9 ± 5	83.1 ± 6		

^a Als Markierungsinformation wurden nur Derivate von Ribonukleosiden verwendet, welche eindeutig in Spektrum zugeordnet werden konnten. Verwendet wurden C1 von Guanosin, C2 und C4 von Cytidin; ^b Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₋₁ und d₊₁ bestimmen.

Anhang

Tabelle 16: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Metabolite und Aminosäuren für die Ermittlung der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B in der Lysin-Produktionsphase. Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₋₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)			
		s	d ₋₁	d ₊₁	dd
Trehalose	1	42.8 ± 3		57.2 ± 3	
	2	6.2 ± 2.5	21.1 ± 4 ^b		72.8 ± 11
	3	13.0 ± 5	15.6 ± 6 ^b		71.5 ± 11
	4	6.5 ± 6	28.9 ± 6 ^b		64.6 ± 11
	5	3.4 ± 5	10.8 ± 2.5 ^b		85.8 ± 8
Nukleoside ^a	1	31.9 ± 1.5		68.1 ± 2	
	2	9.5 ± 5	42.3 ± 4.3 ^b		48.2 ± 5
	4	2.7 ± 1.3	11.9 ± 3 ^b		85.3 ± 3
Aspartat	2	14.8 ± 1.5	26.5 ± 2	11.6 ± 2.5	47.0 ± 2
	3	18.5 ± 1	29.8 ± 1	27.2 ± 1	24.5 ± 1.5
Alanin	3	25.3 ± 2	74.7 ± 3		
Citrat	2	18.6 ± 3	37.5 ± 3	20.4 ± 3.5	23.4 ± 3.5
	4	18.6 ± 3	20.4 ± 3.5	37.5 ± 3	23.4 ± 3.5
Valin	4	29.9 ± 3	70.1 ± 4		
	5	72.9 ± 2	27.1 ± 5		
Glutamat	2	18.9 ± 1	27.1 ± 2	30.1 ± 2	23.8 ± 3
	3	29.0 ± 1	53.9 ± 2 ^b		17.1 ± 2
	4	17.8 ± 1	8.0 ± 1.5	51.4 ± 1	22.9 ± 1
Isoleucin	4	31.3 ± 1	50.0 ± 2 ^b		18.7 ± 4
	5	48.3 ± 1	51.7 ± 2		
	6	24.6 ± 1.5	75.4 ± 1.5		
Lysin	3	13.9 ± 2	55.0 ± 3 ^b		31.1 ± 4
	4	28.1 ± 1	51.4 ± 3 ^b		20.5 ± 4
	5	14.8 ± 3	56.4 ± 4 ^b		28.8 ± 5
	6	21.0 ± 2	79.0 ± 3		
Threonin	2	15.0 ± 1	27.1 ± 1	12.7 ± 2	45.1 ± 2
	3	17.3 ± 1	56.6 ± 1 ^b		26.1 ± 1.5
	4	45.6 ± 1	54.4 ± 1		
Glycin	2	22.0 ± 2	78.0 ± 2		

^a Als Markierungsinformation wurden nur Derivate von Ribonukleosiden verwendet, welche eindeutig in Spektrum zugeordnet werden konnten. Verwendet wurden wurden C1 von Guanosin, C2 und C4 von Cytidin; ^b Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₋₁ und d₊₁ bestimmen.

Anhang

Tabelle 17: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Aminosäuren aus hydrolysierter Biomasse für die Ermittlung der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B in der ersten Parallelfermentation (Phase 1). Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)				ddd ^c
		s	d ₁	d ₊₁	dd	
Histidin	2	27.2 ± 1.0	6.6 ± 2.0	6.3 ± 3.0	59.9 ± 3.0	
	3	31.7 ± 1.0	31.5 ± 2.0	5.3 ± 3.0	31.4 ± 2.0	
	5	41.8 ± 1.0	58.2 ± 3.0			
Glycin	2	39.9 ± 1.0	60.1 ± 1.0			
Phenylalanin	2	31.3 ± 1.0	3.0 ± 3.0	10.4 ± 2.0	55.4 ± 1.0	
	3	28.8 ± 2.0	61.7 ± 4.0 ^a		9.6 ± 3.0	
Tyrosin	5 + 9 ^b	29.3 ± 2.0	60.5 ± 2.0 ^a		10.2 ± 6.0	
	6 + 8 ^b	42.9 ± 1.0	24.3 ± 1.5 ^a		32.8 ± 3.0	
Alanin	2	30.9 ± 1.0	3.4 ± 2.5	8.4 ± 2.0	57.3 ± 1.0	
	3	35.5 ± 1.0	64.5 ± 1.0			
Glutamat	2	42.9 ± 2.5	27.1 ± 2.0	22.0 ± 3.0	7.9 ± 5.0	
	3	66.5 ± 1.0	30.5 ± 2.0 ^a		3.1 ± 3.0	
	4	32.3 ± 1.0	2.5 ± 1.5	61.2 ± 1.0	4.0 ± 2.5	
Aspartat	2	43.2 ± 1.0	27.1 ± 2.0	6.3 ± 1.0	23.4 ± 2.0	
	3	43.8 ± 1.0	23.0 ± 1.0	26.8 ± 1.0	6.4 ± 1.5	
Threonin	2	45.2 ± 2.0	26.8 ± 1.0	7.1 ± 2.0	21.0 ± 1.5	
	3	43.0 ± 1.0	48.4 ± 1.0 ^a		8.5 ± 2.6	
	4	63.1 ± 1.0	36.9 ± 1.0			
Isoleucin	3	35.8 ± 1.0	51.0 ± 3.0 ^a		9.2 ± 5.0	4.0 ± 4.0
	4	58.7 ± 1.0	31.4 ± 2.0 ^a		9.9 ± 6.0	
	5	72.0 ± 1.0	28.0 ± 2.5			
	6	45.3 ± 1.0	54.7 ± 3.0			
Valin	3	36.1 ± 2.0	52.4 ± 3.0 ^a		7.5 ± 3.0	4.0 ± 4.0
	4	45.1 ± 1.0	54.9 ± 3.0			
	5	90.9 ± 1.0	9.1 ± 2.0			
Lysin	3	43.0 ± 2.0	52.0 ± 3.0 ^a		5.0 ± 3.0	
	4	56.4 ± 1.0	31.2 ± 4.0 ^a		12.4 ± 5.0	
	5	36.0 ± 2.0	56.8 ± 3.0 ^a		7.2 ± 3.0	
	6	46.3 ± 1.0	53.7 ± 3.0			

^a Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₁ und d₊₂ bestimmen; ^b Zwei Kohlenstoffatome erzeugen die gleiche isotopomere Feinstruktur im ¹³C-NMR-Spektrum; ^c ddd: Doublett von Doubletts von Doubletts: Entsteht durch gleichzeitige Kopplung mit drei direkt benachbarten Kohlenstoffatomen.

Anhang

Tabelle 18: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Aminosäuren aus hydrolysierter Biomasse für die Ermittlung der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B in der zweiten Parallelferrmentation (Phase 2). Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)				ddd ^c
		s	d ₁	d ₊₁	dd	
Histidin	2	27.1 ± 1.0	4.9 ± 2.0	2.2 ± 2.0	65.7 ± 3.0	
	3	29.4 ± 1.0	33.4 ± 2.0	6.4 ± 3.0	30.9 ± 2.0	
	5	44.8 ± 1.0	55.2 ± 3.0			
Glycin	2	38.1 ± 1.0	61.9 ± 1.0			
Phenylalanin	2	29.9 ± 1.0	3.3 ± 3.0	8.1 ± 2.0	58.7 ± 1.0	
	3	27.5 ± 2.0	64.6 ± 4.0 ^a		7.9 ± 3.0	
Tyrosin	5 + 9 ^b	28.5 ± 2.5	63.0 ± 2.0 ^a		8.5 ± 4.0	
	6 + 8 ^b	42.8 ± 1.0	24.1 ± 1.5 ^a		33.2 ± 3.0	
Alanin	2	29.1 ± 1.0	2.6 ± 2.5	8.3 ± 2.0	59.9 ± 1.0	
	3	33.6 ± 1.0	66.4 ± 1.0			
Glutamat	2	41.0 ± 2.5	29.2 ± 2.0	23.8 ± 3.0	6.0 ± 4.0	
	3	67.2 ± 1.0	30.3 ± 2.0 ^a		2.5 ± 2.0	
	4	30.4 ± 1.0	2.5 ± 1.5	63.0 ± 1.0	4.1 ± 2.5	
Aspartat	2	41.8 ± 1.0	29.3 ± 2.0	6.5 ± 1.0	22.3 ± 2.0	
	3	43.1 ± 1.0	22.6 ± 1.0	28.5 ± 1.0	5.8 ± 1.5	
Threonin	2	41.9 ± 2.0	29.0 ± 1.0	6.1 ± 2.0	23.0 ± 1.5	
	3	41.9 ± 1.0	50.5 ± 1.0 ^a		7.6 ± 2.6	
	4	63.2 ± 1.0	36.8 ± 1.0			
Isoleucin	3	33.8 ± 1.0	56.1 ± 3.0 ^a		6.1 ± 5.0	4.0 ± 4.0
	4	65.4 ± 1.0	30.9 ± 2.0 ^a		3.7 ± 2.5	
	5	72.0 ± 1.0	28.0 ± 2.5			
	6	42.5 ± 1.0	57.5 ± 3.0			
Valin	3	35.8 ± 2.0	52.5 ± 3.0 ^a		7.8 ± 3.0	4.0 ± 4.0
	4	47.1 ± 1.0	52.9 ± 3.0			
	5	91.1 ± 1.0	8.9 ± 2.0			
Lysin	3	40.8 ± 2.0	53.5 ± 3.0 ^a		5.8 ± 3.0	
	4	54.3 ± 1.0	30.7 ± 4.0 ^a		15.0 ± 5.0	
	5	33.6 ± 2.0	57.8 ± 3.0 ^a		8.5 ± 3.0	
	6	44.2 ± 1.0	55.8 ± 3.0			

^a Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₁ und d₊₂ bestimmen; ^b Zwei Kohlenstoffatome erzeugen die gleiche isotopomere Feinstruktur im ¹³C-NMR-Spektrum; ^c ddd: Doublett von Doubletts von Doubletts: Entsteht durch gleichzeitige Kopplung mit drei direkt benachbarten Kohlenstoffatomen.

Anhang

Tabelle 19: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Aminosäuren aus hydrolysierter Biomasse für die Ermittlung der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B in der dritten Parallelfermentation (Phase 3). Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)				ddd ^c
		s	d ₁	d ₊₁	dd	
Histidin	2	31.9 ± 1.0	5.2 ± 2.0	3.0 ± 3.0	60.0 ± 3.0	
	3	32.4 ± 1.0	36.3 ± 2.0	4.8 ± 3.0	26.5 ± 2.0	
	5	51.9 ± 1.0	48.1 ± 3.0			
Glycin	2	42.5 ± 1.0	57.5 ± 1.0			
Phenylalanin	2	31.5 ± 1.0	3.8 ± 3.0	7.7 ± 2.0	57.0 ± 1.0	
	3	31.0 ± 2.0	57.5 ± 4.0 ^a		11.5 ± 3.0	
Tyrosin	5 + 9 ^b	31.6 ± 2.5	58.3 ± 2.0 ^a		10.1 ± 4.0	
	6 + 8 ^b	44.5 ± 1.0	23.3 ± 1.5 ^a		32.3 ± 3.0	
Alanin	2	32.6 ± 1.0	3.1 ± 2.5	6.8 ± 2.0	57.5 ± 1.0	
	3	36.6 ± 1.0	63.4 ± 1.0			
Glutamat	2	39.2 ± 2.5	30.1 ± 2.0	18.9 ± 3.0	11.8 ± 5.0	
	3	65.1 ± 1.0	31.1 ± 2.0 ^a		3.9 ± 3.0	
	4	27.3 ± 1.0	2.1 ± 1.5	62.7 ± 1.0	7.9 ± 3.0	
Aspartat	2	45.3 ± 1.0	27.8 ± 2.0	6.0 ± 1.0	20.9 ± 2.0	
	3	46.7 ± 1.0	19.6 ± 1.0	27.3 ± 1.0	6.4 ± 1.5	
Threonin	2	49.7 ± 2.0	25.5 ± 1.0	6.2 ± 2.0	18.6 ± 1.5	
	3	50.6 ± 1.0	43.7 ± 1.0 ^a		5.7 ± 2.6	
	4	65.7 ± 1.0	34.3 ± 1.0			
Isoleucin	3	38.3 ± 1.0	49.2 ± 3.0 ^a		9.5 ± 6.0	3.0 ± 3.0
	4	64.9 ± 1.0	27.3 ± 2.0 ^a		7.8 ± 6.0	
	5	70.6 ± 1.0	29.4 ± 2.5			
Valin	6	46.4 ± 1.0	53.6 ± 3.0			
	3	53.2 ± 3.0	33.2 ± 4.0 ^a		5.9 ± 3.0	7.7 ± 6.0
	4	59.1 ± 1.0	40.9 ± 3.0			
Lysin	5	90.8 ± 1.0	9.2 ± 2.0			
	3	43.3 ± 2.0	50.8 ± 3.0 ^a		5.9 ± 3.0	
	4	51.8 ± 1.0	35.9 ± 4.0 ^a		12.4 ± 5.0	
	5	32.8 ± 2.0	55.6 ± 3.0 ^a		11.5 ± 5.0	
	6	42.3 ± 1.0	57.7 ± 3.0			

^a Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₁ und d₊₂ bestimmen; ^b Zwei Kohlenstoffatome erzeugen die gleiche isotopomere Feinstruktur im ¹³C-NMR-Spektrum; ^c ddd: Doublett von Doubletts von Doubletts: Entsteht durch gleichzeitige Kopplung mit drei direkt benachbarten Kohlenstoffatomen.

Anhang

Tabelle 20: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Metabolite und Aminosäuren für die Ermittlung der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B in der ersten Parallelferrmentation (Phase 1). Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)			
		s	d ₁	d ₊₁	dd
Trehalose	1	26.2 ± 2		73.8 ± 3	
	2	22.4 ± 2.5	15.9 ± 4 ^a		61.7 ± 8
	3	36.2 ± 5	13.3 ± 5 ^a		50.6 ± 10
	4	30.4 ± 8	20.6 ± 5 ^a		49.0 ± 11
	5	19.6 ± 5	6.0 ± 2.5 ^a		74.4 ± 8
Aspartat	2	24.5 ± 2	37.5 ± 2	8.1 ± 3	29.9 ± 4
	3	24.1 ± 1	25.5 ± 1	35.4 ± 1	14.9 ± 2
Alanin	2	6.5 ± 2.5	3.7 ± 3	3.8 ± 3	86.1 ± 7
	3	16.2 ± 2	83.8 ± 2.5		
Citrat	2	20.5 ± 3	51.5 ± 3	15.5 ± 3.5	12.5 ± 3.5
	4	20.5 ± 3	15.5 ± 3.5	51.5 ± 3	12.5 ± 3.5
Valin	4	29.2 ± 3	70.8 ± 4		
	5	90.4 ± 2	9.6 ± 4		
Glutamat	2	24.5 ± 1.5	34.2 ± 2	32.3 ± 2	9.1 ± 2.5
	3	48.9 ± 2	45.3 ± 2 ^a		5.9 ± 1.5
	4	13.5 ± 1.5	1.4 ± 0.7	74.1 ± 1.5	11.0 ± 2
Isoleucin	4	63.7 ± 3	33.9 ± 5 ^a		2.4 ± 2
	5	69.2 ± 1.5	30.8 ± 3		
	6	30.3 ± 1.5	69.7 ± 1.5		
Lysin	3	40.1 ± 30	54.2 ± 2.5 ^a		5.7 ± 1.5
	4	57.7 ± 40	37.4 ± 3 ^a		5.0 ± 2
	5	34.9 ± 20	56.3 ± 3.5 ^a		8.9 ± 3
	6	42.5 ± 30	57.5 ± 4		
Threonin	2	27.7 ± 2	32.5 ± 1.5	10.3 ± 2.5	29.5 ± 2.5
	3	19.9 ± 3	61.1 ± 2 ^a		18.9 ± 3
	4	56.3 ± 1.5	43.7 ± 1.5		

^a Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₁ und d₊₁ bestimmen.

Anhang

Tabelle 21: Isotopomere Markierungsmuster mit Fehlergrenzen einzelner Kohlenstoffatome verschiedener Metabolite und Aminosäuren für die Ermittlung der Stoffflüsse des Zentralmetabolismus in *C. glutamicum* MH20-22B in der zweiten Parallelermentation (Phase 2). Erläuterungen der Feinstrukturen s, d₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 5.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)			
		s	d ₁	d ₊₁	dd
Trehalose	1	26.3 ± 2		73.7 ± 3	
	2	25.5 ± 2.5	16.4 ± 4 ^a		59.1 ± 7.5
	3	42.7 ± 5	10.7 ± 5 ^a		46.6 ± 10
	4	37.2 ± 9	15.4 ± 4.5 ^a		47.5 ± 11
	5	22.9 ± 6	2.4 ± 2.5 ^a		74.7 ± 8
Aspartat	2	21.4 ± 2	33.7 ± 2	12.4 ± 3.5	32.5 ± 4
	3	21.2 ± 1	33.8 ± 1	28.1 ± 1	16.3 ± 2
Alanin	2	9.1 ± 4	1.8 ± 2	4.0 ± 3	85.1 ± 7
	3	15.7 ± 2	84.3 ± 2.5		
Citrat	2	16.2 ± 3	53.1 ± 2.5	18.2 ± 3.5	12.5 ± 3.5
	4	20.5 ± 3	18.2 ± 3.5	53.1 ± 2.5	12.5 ± 3.5
Valin	4	25.0 ± 3	75.0 ± 4		
	5	89.2 ± 2	10.8 ± 4.5		
Glutamat	2	23.8 ± 1.5	35.0 ± 2	31.2 ± 2	10.0 ± 2.5
	3	49.9 ± 2	44.8 ± 2 ^a		5.3 ± 1.5
	4	12.7 ± 1.5	2.0 ± 0.8	75.4 ± 1.5	9.8 ± 1.5
Isoleucin	4	60.6 ± 3	33.2 ± 5 ^a		6.1 ± 4
	5	71.5 ± 1.5	28.5 ± 3		
	6	31.6 ± 1.5	68.4 ± 1.5		
Lysin	3	44.7 ± 30	50.5 ± 2.5 ^a		4.8 ± 1.5
	4	60.7 ± 3.5	35.3 ± 3 ^a		5.0 ± 2
	5	39.2 ± 20	52.4 ± 3.5 ^a		8.4 ± 3
	6	48.1 ± 30	51.9 ± 4		
Threonin	2	28.4 ± 2	31.5 ± 1.5	9.5 ± 2.5	30.6 ± 2.5
	3	25.9 ± 3	59.0 ± 2 ^a		15.1 ± 3
	4	56.8 ± 1.5	43.2 ± 1.5		

^a Wegen gleich oder fast gleich großer Kopplungskonstanten läßt sich nur die Summe der Feinstrukturen d₁ und d₊₁ bestimmen.

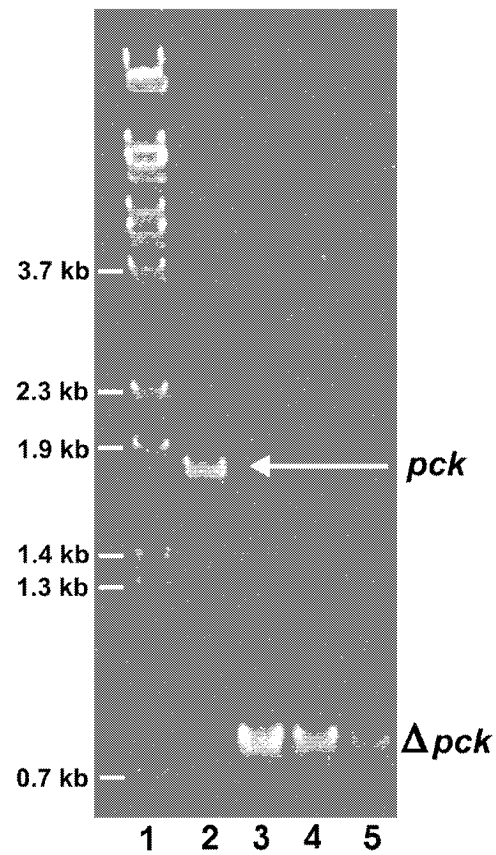


Abbildung 31: PCR-Nachweis zur Deletion von *pck* (PEP-Carboxykinase-Gen) in *C. glutamicum* ATCC 13032 (0.8%iges (w/v) Agarosegel). Spur 1: λ -DNA *Bst*EII (kb-Längenstandard); Spur 2: PCR mit chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 (ca. 1.8 kb-Fragment); Spur 3-5: PCR mit chromosomaler DNA aus *pck*-Deletionsmutanten (ca. 0.7 kb Fragment).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M.K. Grieshaber danke ich für die Übernahme des Korreferats und die Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für das Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Dr. A.A. de Graaf und Dr. L. Eggeling danke ich für die Einführung in die Stoffflußanalyse, die zahlreichen Diskussionen und die persönliche Betreuung.

Dr. R. Takors und M. El Massaoudi danke ich für die gute Zusammenarbeit, die interessanten Einblicke in die Bioverfahrenstechnik und die anregenden Diskussionen.

D. Hallmann, C. Mack, Dr. S. Petersen, Dr. S.M. Schoberth, D. Rittmann, S. Knebel, E. Speetzen, Dr. B. Kather, C. Lambert, K. Krumbach, Dr. V.F. Wendisch, Prof. Dr. B.J. Eikmanns und allen ungenannten Mitarbeitern des IBT1 und IBT2 danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor, die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft.

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs danke ich für die freundliche Aufnahme und die weiterführende Ausbildung.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Freunden, die mich durch die Zeit dieser Arbeit begleitet haben und mir immer manches hilfreiche und aufmunternde Wort zur rechten Zeit gaben.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4103
Dezember 2003
ISSN 0944-2952