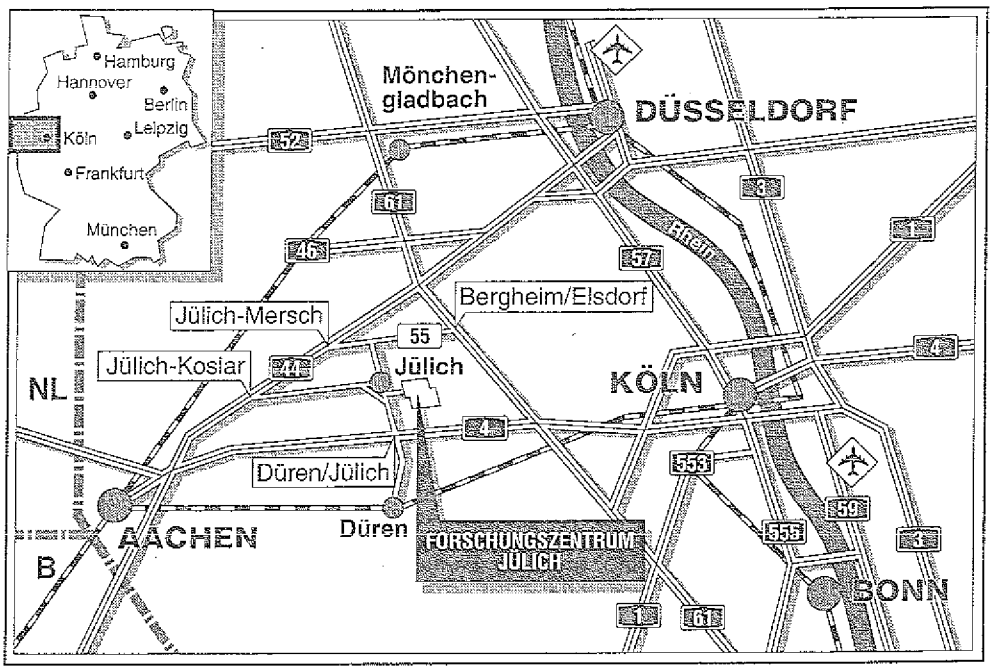
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Untersuchungen zur Zuckertoleranz in *Zymomonas mobilis*

Theodor Struch



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2674
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2674
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Untersuchungen zur Zuckertoleranz in *Zymomonas mobilis*

Theodor Struch

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
a_w	Wasseraktivität
c	Konzentration
CCCP	Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
Ci	Curie
d	Dichte (g/cm^3)
DHA	Dihydroxyaceton
dpm	desintegrations per minute
E	Extinktion
ex	extrazellulär
Frc	Fructose
g	Erdbeschleunigung
GK	Glycerokinase
Glc	Glucose
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HK	Hexokinase
HPLC	High performance liquid chromatography
in	intrazellulär
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
M	Molarität
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute
NAD(H)	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
OD_{550}	optische Dichte bei 550 nm
Os	Osmolalität
PCA	Perchlorsäure
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGDH	Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase
R_F	relative Beweglichkeit
s	Sekunde
spez.	spezifisch
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
U	Enzymeinheit (µmol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
V_{Max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	weight per volume

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

In den letzten Jahren nahm das Interesse an der Gewinnung von Ethanol aus nachwachsenden Rohstoffen zu. Zur Gewinnung von Ethanol aus stärke- und zuckerhaltigen Rohstoffen wurden leistungsfähige und kontinuierliche Fermentationsverfahren mit hoher Alkoholausbeute entwickelt (Rogers et al. 1982). Dabei gewinnt die Ethanol-Fermentation mit dem gram- Bakterium *Zymomonas mobilis* gegenüber dem traditionellen Verfahren der Hefegärung zunehmend an Bedeutung (Rogers et al. 1982; Eveleigh et al. 1983; Baratti und Bu'Lock 1986; Buchholz et al. 1987; Lawford 1988; Viikari 1988; Bringer-Meyer und Sahm 1988).

Zymomonas mobilis wurde von Barker und Hillier (1912) beschrieben und von Lindner (1928) in Reinkultur isoliert. Er zeigte, daß das Bakterium an der Vergärung von Pflanzensäften zu alkoholischen Getränken beteiligt ist. Das Substratspektrum des Bakteriums ist auf Glucose, Fructose und Saccharose als Energie- und C-Quelle begrenzt (Swings und De Ley 1977). Glucose wird durch erleichterte Diffusion von den Zellen aufgenommen (Di Marco und Romano 1985; Barnell et al. 1990). Während Hefen Monosaccharide über den Emden-Meyerhof-Weg metabolisieren, setzt *Z. mobilis* die Substrate unter anaeroben Bedingungen über den Entner-Doudoroff-Weg zu Pyruvat mittels Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenase zu äquimolaren Mengen an Ethanol und CO_2 um (Kluyver und Hoppenbrouwers 1931; Schreder et al. 1934; Gibbs und De Moss 1951, 1954; Mc Gill und Dawes 1971; Bringer-Meyer et al. 1986). Die Energieausbeute des Stoffwechsels ist mit 1 Mol ATP pro Mol umgesetzter Glucose gering (Montenecourt 1985). Im Vergleich zur Hefe *Saccharomyces cerevisiae* weist die Ethanolproduktion mit *Z. mobilis* folgende Vorteile auf: die spezifische Ethanolbildungsrate ist mit 5,4 g/g/h ca. 6 mal höher (Lee et al. 1979; Rogers et al. 1979), die Ethanolausbeute ist um 5 % höher als bei der Hefe, da weniger Glucose in Zellmaterial umgesetzt wird (Rogers et al. 1979).

Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien zeichnet sich *Z. mobilis* durch eine hohe Ethanol-Toleranz (bis zu 13 % (w/v)) (Rogers et al. 1982) und eine stark ausgeprägte Zuckertoleranz mit bis zu 40 % (w/v) Glucose aus (Swings und De Ley 1977; Kluyver und Hoppenbrouwers 1931). Für die hohe Ethanoltoleranz sind vermutlich in der Membran vorhandene Hopanoide, pentacyclische Triterpenoide, verantwortlich (Bringer et al. 1985; Schmidt et al. 1986, 1989). Dagegen ist bislang wenig über den Mechanismus der außergewöhnlich hohen Zuckertoleranz bekannt.

Der physiologische Streß, dem die zuckertoleranten und halophilen Organismen ausgesetzt sind, ist durch die geringe Verfügbarkeit von freiem Wasser bedingt. Der von Scott (1957) eingeführte Begriff der Wasseraktivität (a_w) beschreibt den Effekt verschiedener, gelöster Stoffe auf das Wachstum von Organismen. Die Wasseraktivität ist demnach ein Maß für die Konzentration an freiem Wasser in einer Lösung im Vergleich zu reinem Wasser und entspricht dem relativen Dampfdruck (p/p_o) über der Lösung.
Es gilt folgende Beziehung:

$$a_w = \frac{p}{p_o} = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

p: hydrostatischer Druck Medium
p_o: hydrostatischer Druck Wasser
n_1: Molenbruch Wasser
n_2: Molenbruch gelöster Stoff

Als physikochemischer Parameter ist die Wasseraktivität nicht zur Beschreibung eines gesamten biologischen Systems geeignet. Neben der Wasseraktivität werden auch andere Parameter, wie z.B. Osmolalität und osmotischer Druck benutzt, um die Verfügbarkeit von freiem Wasser in der Umgebung eines Mikroorganismus zu bestimmen (Jones 1987; Jones und Greenfield 1986). Für Systeme, bei denen aus Zuckern Alkohol gebildet wird, stellt die Osmolalität eine sensible Variable dar, bei der solut-spezifische Abweichungen vom Idealverhalten nach Raoult (z.B.

durch Zucker oder Alkohol) hinsichtlich der Gesamtosmolalität besonders deutlich werden (Jones und Greenfield 1986). Wird die Osmolalität des Mediums durch Zusatz von Soluten stark erhöht, reduziert sich die Konzentration an freiem, zur Verfügung stehendem Wasser (Zimmermann 1978) und damit einhergehend auch oft die Wachstumsgeschwindigkeit von Mikroorganismen (Anand und Brown 1968; Converti et al. 1985; Walter et al. 1987). Von Bedeutung ist dabei, ob das eingesetzte Solut die Zellmembran zu passieren vermag oder für diese impermeabel ist. Ist Letzteres der Fall, liegt über der Zellmembran ein erhöhter osmotischer Druck vor, so daß dem Cytoplasma Wasser entzogen wird. Infolge des Wasserverlusts erniedrigt sich der Turgor in der Zelle, was zu Membranschädigungen (Plasmolyse) führen kann (Mitchell und Moyle 1956; Cram 1976). Wenn das Solut für die Cytoplasmamembran permeabel ist, liegt in Bezug auf die Hemmung des Zellwachstums ein anderer Mechanismus vor. Aufgrund hoher extrazellulärer Konzentrationen des permeablen Solutes kommt es zu einem Einstrom des Solutes in die Zelle, verbunden mit einer geringeren Verfügbarkeit an freiem Wasser im Cytoplasma (Cram 1976; Zimmermann 1978). Dadurch können makromolekulare Zellkomponenten, die für die Aufrechterhaltung ihrer Tertiärstruktur Wasser benötigen, ihre Konformation verändern (Low 1985; Brown 1976). Die reduzierte Konzentration an freiem Wasser in der Zelle hat auch zur Folge, daß die Konzentrationen der in der Zelle bereits vorhandenen anorganischen Ionen und anderer Solute stark ansteigen, wodurch die physiologischen Funktionen der Zelle beeinträchtigt werden können. Der durch die hohen Konzentrationen an gelösten Stoffen (z.B. Zucker, Salze) bedingte Verlust an freiem Wasser liegt der Konservierung von Lebensmitteln zugrunde (Duckworth 1975).

Viele Mikroorganismen begegnen der reduzierten Verfügbarkeit von freiem Wasser in der Zelle mit Hilfe osmoregulatorischer Mechanismen. Unter Osmoregulation versteht man die Aufrechterhaltung des Zellturgors und Zellvolumens innerhalb der für das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen erforderlichen Grenzen (Brown et al. 1986). Eine Strategie zur Adaptation an niedrige Wasseraktivität ist die selektive intrazelluläre Synthese und Akkumulation von Soluten, die zur zellulären Physiologie kompatibel sind (Blomberg 1988). Nach Brown (1976) ver-

steht man unter kompatiblen Soluten gelöste Substanzen, die für die Aufrechterhaltung eines osmotischen Gleichgewichts verantwortlich sind und die physiologischen Reaktionen des Organismus nicht oder nur geringfügig beeinträchtigen. Darüber hinaus tragen viele kompatiblen Solute (z.B. Polyole) zum Schutz und zur Erhaltung der Hydrathülle von Proteinen bei (Schobert 1977). Alle bislang bekannten kompatiblen Solute lassen sich entsprechend ihrer chemischen Struktur in wenige Stoffgruppen klassifizieren (Yancey et al. 1982). Dazu gehören Zucker und Zuckerderivate, Polyole (Tab. 1.1 und 1.2), Aminosäuren und Methylamine.

Tab. 1.1: Zusammenstellung der wichtigsten kompatiblen Solute aus dem Bereich der Polyole

Glycerin	*Debaryomyces hansenii*	Jovall et al. (1990) André et al. (1988) Gustafsson (1979) Nobre und Da Costa (1985b) Adler und Gustafsson (1980) Larsson et al. (1990)
	Saccharomyces cerevisiae	Reed et al. (1987)
	Zygosaccharomyces rouxii	Onishi und Shiromaru (1984) van Zyl und Prior (1990) Reed et al. (1987) Yagi (1988)
	Dunaliella tertiolecta	Goyal (1989)
	D. salina	Bental et al. (1988)
	Aspergillus niger	Zidan und Abdel-Mallek (1987)
	A. ochraceus	
	A. tamarii	
Arabit	*Z. rouxii*	van Zyl und Prior (1990)
	Debaryomyces hansenii	Adler und Gustafsson (1980) Nobre und Da Costa (1985a,b) Larsson et al. (1990)
Sorbit/Prolin	*Stichococcus bacillaris*	Brown und Hellebust (1978)
	S. chloranthus	Brown und Hellebust (1980)
	Klebsormidium chloranthus	
Sorbit*	*Pseudomonas fluorescens*	Prior et al. (1987)
Mannit	*Chrysosporium fastidium*	Luard (1982a)
	Debaryomyces hansenii	Nobre und Da Costa (1985a)
Mannit/Erythrit	*Penicillium chrysogenum*	

* extern angeboten und intrazellulär akkumuliert

Tab. 1.2: Zusammenstellung der wichtigsten kompatiblen Solute aus dem Bereich der Zucker und Zuckerderivate

Trehalose	*E. coli*	Larsen et al. (1987)
	Oscillatoria 08, 23	Stal und Reed (1987)
	Calothrix 48a	
	D. hansenii	Jovall et al. (1990)
	Ectothiorhodospira halochloris	Galinski und Herzog (1990)
Saccharose	*Anabena ambigua*	Mackay et al. (1984)
	A. azollae	
	Calothrix	Reed et al. (1984b)
	Gloeothece	
	Nostoc/Anabena	Stal und Reed (1987)
	Oscillatoria 61	
Glucosylglycerin	*Synechocystis*	Fulda et al. (1990)
	Synechococcus	Mackay et al. (1984)
	Dermacarpa	
	Myxosarcina	
	Microcystis firma	Hagemann et al. (1987)
	Gloeocapsa 63	Stal und Reed (1987)
	Spirulina 85	
	LPP (Lyngbya, Plectonema, Phormidium)	
Arabinose	*D. hansenii*	Jovall et al. (1990)
Glucose	*Penicillium chrysogenum*	Luard (1982a,b)
	Gloeothece	Mackay et al. (1984)
	Scytonema	
	S. cerevisiae	Brown und Edgley (1980)
Glucose/Fructose	*Calothrix*	Mackay et al. 1984)
	LPP-Gruppe B	
	P. digitatum	Hocking und Norton (1983)
	P. janczewskii	
	Eurotium chevalieri	
	Xeromyces bisporus	
	Wallemia sebi	

Polyole als kompatible Solute werden häufig von halophilen Algen, osmophilen und xerotoleranten Pilzen gebildet (Brown 1978; Ben Amotz und Avron 1973; Jennings 1984; Hocking und Norton 1983; Hocking 1986). Typische Organismen mit Aminosäure- und Methylamin-Akkumulation findet man vorwiegend unter den Eubakterien, Protozoen und Pflanzen (Yancey et al. 1982).

Eine Alternative zur intrazellulären Synthese kompatibler Solute ist der Transport von Soluten aus dem Medium in die Zelle (Cram 1976; Imhoff 1986; Csonka 1989). Beispielsweise transportiert die xerotolerante Hefe *Saccharomyces rouxii* bei geringer Wasseraktivität Glycerin aus dem Medium in die Zelle

(Brown 1978; Edgley und Brown 1978). Für *Debaryomyces hansenii* wird ein aktives Glycerin-Transportsystem beschrieben, das gegen einen 5000 fachen Konzentrationgradienten Glycerin transportiert. Unter osmotischem Stress bedingt durch Erhöhung der Solut-Konzentration ist die Glycerin-Transportkapazität erhöht, während der K_M-Wert für Glycerin (1 mM) konstant bleibt (Adler et al. 1985).

Die regulatorischen Mechanismen bei der Adaptation an niedrige Wasseraktivität wurden insbesondere bei *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* untersucht (Le Rudelier 1982; Strøm et al. 1986; Higgins et al. 1987). Le Rudelier et al. (1984) gelang es, *E. coli*-Mutanten mit verbesserten Osmotoleranzeigenschaften zu isolieren, die auf eine Prolin-Überproduktion zurückzuführen waren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß *E. coli*-Stämme aus Cholin, das dem Medium entstammte, Glycin-Betain synthetisieren (Landfald und Strøm 1986). Wegen des Fehlens der für die Biosynthese von Glycin-Betain notwendigen Enzyme ist bei *S. typhimurium* und weiteren Bakterien ein effizientes Aufnahmesystem von Glycin-Betain aus dem Medium von großer Bedeutung für das Überleben unter osmotischem Streß (Perroud und Le Rudelier 1985; Cairney et al. 1985a; Fougère und Le Rudelier 1990; Pocard et al. 1989; Moore et al. 1987; Hutkins et al. 1987). Durch die Aufnahme von Glycin-Betain wurde zwischen intra- und extrazellulärem Raum ein osmotischer Ausgleich ermöglicht. Zwei verschiedene Glycin-Betain-Aufnahmesysteme wurden bei *E. coli* und *S. typhimurium* identifiziert. Im Gegensatz zu dem gering affinen *proP*-System ist *proU* ein spezifisches Transportsystem mit einer Affinität von 1 µM für Glycin-Betain, was für *E. coli* und *S. typhimurium* zutrifft. Das von dem *proU* Locus kodierte periplasmatische Bindungsprotein wurde von May et al. (1986), Higgins et al. (1987) und Barron et al. (1987) charakterisiert. Die Transkription des *proU*-Locus ist stark reguliert, denn die Gene werden nur exprimiert, wenn sich die Zellen in einem Medium mit hoher Osmolarität befinden (Cairney et al. 1985b; Dunlap und Csonka 1985; Gowrishankar 1985). Der Mechanismus für die Kontrolle der Osmoregulation auf der Ebene der Genexpression ist noch weitgehend unklar.

Das Vorhandensein hoher Konzentrationen an Soluten im Cytoplasma führt dennoch auch bei adaptierten Organismen dazu, daß keine optimale Hydratation und Solubilisierung des Enzymapparates vorliegt. Bei den Eubakterien, abgesehen von wenigen Ausnahmen, werden dadurch Enzymsysteme mehr oder weniger gehemmt. Dies gilt für die Malat-Dehydrogenase von *Ectothiorhodospira halochloris*, welche durch NaCl in physiologischen Konzentrationen (1,2 M) nur noch 40 % der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne Salz besitzt (Galinski 1986), wie auch für die NADH-Oxidase von *Saccharomyces cerevisiae*, die durch eine 36 %ige (w/v) Glucoselösung stark gehemmt wird (Brown 1975).

Als Mechanismus zur Adaptation von Organismen an geringe Wasseraktivität werden auch Veränderungen in der Zusammensetzung der Phospholipid-Membran diskutiert, die einerseits zu Änderungen der Permeabilitätseigenschaften und andererseits zur Stabilisierung der Zellmembranen führen können. Die Regulation der Membran-Permeabilität kann insofern von Bedeutung sein, als die Solute, für deren Synthese bzw. Transport Stoffwechselenergie aufgebracht werden mußte, nicht die Cytoplasmamembran passieren und an das Medium verloren gehen sollten. Der Einfluß der Wasseraktivität auf die Fettsäure-Zusammensetzung biologischer Membranen wurde von Wasseff (1977) bei *Blakelea trispora* untersucht. Das Verhältnis ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren nahm mit Erhöhung der Zuckerkonzentration zu. Untersuchungen von Brown und Johnson (1970) bei *S. cerevisiae* ergaben dagegen eine Abnahme des Anteils ungesättigter Fettsäuren bei Steigerung der Zuckerkonzentration. In vitro Experimente an Zellysaten und Zellmembranen von *Vibrio costicola* zeigen einen Anstieg der Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylglycerin-Syntheserate, wenn der osmotische Druck des Mediums durch Zugabe von Saccharose erhöht wird (Adams et al. 1987; Russell 1989; Russell et al. 1986). Ähnlich wie bei zahlreichen Mikroorganismen durch Einfluß von Salzen und Kohlenhydraten Veränderungen im Phospholipid- bzw. Fettsäure-Muster festgestellt wurden, konnte auch bei *Z. mobilis* durch Erhöhung der Glucosekonzentration des Mediums (bis zu 1,11 M) ein Anstieg des Cardiolipin- und Phosphatidylcholin- bzw. eine Reduktion des Phosphatidylethanolamin- und Phosphatidylglyce-

rin-Anteils am Gesamt-Phospholipid-Gehalt beobachtet werden. Damit einhergehend stieg der Anteil der cis-Vaccensäure zu Lasten der Palmitin- und Palmitoleinsäure leicht an (Carey und Ingram 1983).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Mechanismen der Toleranz von *Z. mobilis* gegenüber konzentrierten Glucose-, Fructose- bzw. Glucose-/Fructoselösungen zu untersuchen. Dazu wurde die Abhängigkeit von Wachstums- und Gärungsparametern und intrazellulären Metabolitkonzentrationen von der Zuckerkonzentration des Mediums untersucht. Durch Untersuchungen zum Zuckertransport war zu klären, inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem Zuckertransportsystem und den intrazellulär vorhandenen Metabolitkonzentrationen besteht. In einem letzten Teil sollten osmoregulatorische Aspekte mit Hilfe transportabler und nicht-transportabler Zucker gezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Außer den hier aufgeführten Chemikalien wurden alle anderen Chemikalien in analysenreiner Qualität von der Firma Merck AG, Darmstadt, bezogen.

Aldrich-Chemie-Gesellschaft, Steinheim

Silikonöl (d = 1.050)

Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig

D-[U-^{14}C]-Fructose
D-[U-^{14}C]-Glucose
Inulin-[^{14}C]-carbonsäure
[U-^{14}C]-Maltose
[U-^{14}C]-Taurin
$^{3}H_2O$
D-[U-^{14}C]-Xylose

Boehringer GmbH, Mannheim

Aldehyd-Dehydrogenase (aus Hefe)	EC 1.2.1.5
Alkohol-Dehydrogenase (aus Hefe)	EC 1.1.1.1
Fructose-6-phosphat, Dinatriumsalz	
β-Fructosidase (aus Hefe)	EC 3.2.1.26
Gluconat-Kinase (aus *Escherichia coli*)	EC 2.7.1.12
Glucose-Oxidase (aus *Aspergillus niger*)	EC 1.1.3.4
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc*)	EC 1.1.1.4
Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz	
α-Glucosidase (aus Hefe)	EC 3.2.1.20
Glycerokinase (aus *Candida mycoderma*)	EC 2.7.1.30
Hexokinase (aus Hefe)	EC 2.7.1.1
Lactat-Dehydrogenase (aus Kaninchenmuskel)	EC 2.7.1.40
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, Dinatriumsalz	
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, Dinatriumsalz	

6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (aus Hefe)	EC 1.1.1.44
Phosphoglucose-Isomerase (aus Hefe)	EC 5.3.1.9
Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel)	EC 2.7.1.40
Sorbit-Dehydrogenase (aus Schafsleber)	EC 1.1.1.14

Difco Laboratories, Detroit, Michigan (USA)

Bacto-Agar

Hefeextrakt

Du Pont de Nemours, Dreieich

D-[U-^{14}C]-Fructose

Fluka AG, Buchs (Schweiz)

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Xylose

Pharmacia-LKB Fine Chemicals, Uppsala (Schweden)

Sephacryl S-200 HR

Pierce, Oud Beijerland (Niederlande)

Na-Bicinchoninat

Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Silikonöl PN 200 (d = 1.06)

Baysilonöl PH 300 (d = 1.03)

Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

2-Desoxy-D-glucose

Glycylglycin

Morpholinoethansulfonsäure (MES)

Sigma GmbH, München

Dextran

Inulin

Levan

Maltose

Ribose

Triethanolamin

2.2 Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurde *Zymomonas mobilis ssp. mobilis* ATCC 29191 (ZM 6) und *Zymomonas mobilis ssp. mobilis* DSM 3126 verwendet (Bringer-Meyer et al. 1985).

2.3 Nährmedium

Zur Kultivierung von *Z. mobilis* wurde Vollmedium mit folgender Zusammensetzung benutzt (Bringer et al. 1984):

Hefeextrakt	5	g
KH_2PO_4	1	g
$(NH_4)_2SO_4$	1	g
$MgSO_4$	0,5	g
Glucose und/oder Fructose (variierend)	10-250	g
Aqua dest.	ad 1000	ml

Oberhalb einer Zuckerkonzentration von 50 g/l wurde der Zucker getrennt autoklaviert und steril hinzugegeben. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit HCl auf pH 5,0 eingestellt. Das Medium zur Herstellung von Agarplatten enthielt 2 % (w/v) Glucose als C-Quelle und zusätzlich 2 % (w/v) Bacto-Agar.

2.4 Kulturbedingungen

Die Stammhaltung erfolgte in Bellco-Röhrchen (Bellco-Glass Inc., New Jersey, USA) mit 10 ml Vollmedium (2 % Glucose w/v) bei Raumtemperatur. Die Röhrchen wurden mit Butylgummi-Stopfen und Aluminiumkappen verschlossen. Im Abstand von 2 Tagen wurde je 1 ml der Stammkultur in 10 ml Vollmedium überführt. Die Mutante *Zymomonas mobilis* DSM 3126 wurde regelmäßig auf Agarplatten mit 2 % (w/v) Fructose als C-Quelle ausgestrichen und auf Revertanten untersucht. Die Inkubation der Platten er-

folgte im Anaerobentopf (Gas-Pak-System, Baltimore Biol. Labs.) für 2-3 Tage bei 30° C. Zur weiteren Kontrolle wurde die Mutante in 10 ml Bellco-Röhrchen mit Glucose bzw. Fructose als C-Quelle inkubiert und das Wachstum photometrisch (Spectronic 301, Milton Roy, Inc., Rochester, N.Y., USA) bei 550 nm verfolgt.

Für die Vorkultur wurden Bellco-Röhrchen mit 10 ml Vollmedium eingesetzt, die mit 1 ml Inokulum der Stammkultur beimpft wurden. Nach ca. 7 stündiger Inkubation bei 30° C wurde die Kultur in 100 ml Vollmedium (5 % w/v Glucose) überführt. Wegen der starken CO_2-Entwicklung wurden die Gefäße zur Entgasung mit sterilen Einwegfiltern (0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) versehen. Die Zellernte erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 5500 x *g*. Das Sediment wurde in sterilem Medium aufgenommen und diente als Inokulum für die Hauptkultur im 2 l Zweihalskolben (Glasbläserei Forschungszentrum Jülich GmbH) bzw. Fermenter.

Die Durchführung von Batch-Fermentationen erfolgte nicht pH-reguliert im 2 l Zweihalskolben und pH-statisch im 2 l Fermenter der Firma Bioengineering AG (Wald, Schweiz) mit 1,5 l Arbeitsvolumen. Der Fermenter wurde mit dem Vollmedium in situ sterilisiert (121° C, 20 min). Nach der Sterilisation wurde der Fermenter beim Abkühlen auf 105° C steril an die Begasungsanlage angeschlossen und bei einer Temperatur von 30° C mit Argon anaerobisiert. Der pH-Wert wurde automatisch durch Zudosierung von 3 N NaOH geregelt. Die Fermentationen erfolgten bei einer Temperatur von 30° C und einer Rührgeschwindigkeit von 300 Upm.

2.5 Bestimmung der Bakterienmasse

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm verfogt. Bei einer Extinktion oberhalb von 0,35 wurden die Proben entsprechend mit Wasser verdünnt, damit die Proportionalität zwischen Extinktion und Zellkonzentration gewährleistet blieb.

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden Schälchen aus Aluminiumfolie 12 Stunden bei 105° C im Trockenschrank getrocknet, 1 Stunde im Exsikkator abgekühlt und gewogen. 10 ml Zellsuspension bekannter OD_{550} wurden in einer Kühlzentrifuge (Christ Minifuge) bei 4° C und 5500 x *g* 10 Minuten abzentrifugiert, zweimal mit kaltem aqua bidest. gewaschen und in 1 ml aqua bidest. suspendiert. Die mit der Zellsuspension gefüllten Schälchen wurden anschließend wieder, wie oben beschrieben, getrocknet und ein weiteres Mal gewogen. Dabei ergab sich für eine OD_{550} von 1 ein Trockengewicht von 0,2 g/l. Bei Medien mit zunehmender Zuckerkonzentration nahm das Trockengewicht bei gleicher OD um bis zu 12 % ab im Vergleich zu Medien mit niedrigen Zuckerkonzentrationen.

2.6 Quantitative Bestimmung von Substraten und Produkten

2.6.1 Bestimmung mittels HPLC

Die quantitative Analyse von Glucose, Fructose, Sorbit und Ethanol erfolgte durch HPLC (Model L-6200 Intelligent Pump, Model D-2000 Chromato-Integrator, Model 655A-40 Auto-Sampler, Model 655A-52 Column Oven, 655-0568 Degasser, Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan; Vertrieb über E. Merck, Darmstadt). Ebenso konnten Nebenprodukte der Fermentationen, wie z.B. Acetoin und Glycerin quantitativ erfaßt werden (Viikari 1986). Dihydroxyaceton wird im Chromatogramm durch den Ethanolpeak z.T. überlagert und wurde daher enzymatisch bestimmt. Die Messung der Kohlenhydrate erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Eluent:	Aqua bidest. (mit 0,22 µm Millipore-filter filtriert und durch einen kontinuierlichen Helium-Strom entgast)
Fließgeschwindigkeit:	0,6 ml/min
Säule:	Carbohydrate Column HPX-87C (300 x 7,8 mm), Bio-Rad, Chemical Division, Richmond, California, USA

	Temperatur: 85° C
Detektor:	Brechungindex (RI)-Detektor (ERC 7512, Erma Inc., Kyoto, Japan)
	Temperatur: 50° C
Injektionsvolumen:	10 µl

Die Verdünnung der Proben wurde so gewählt, daß die Konzentration der Zucker bzw. Zuckeralkohole in der Probe 1 - 3 g/l betrug. Die Eichung des HPLC-Gerätes erfolgte mit Zuckerlösungen, deren Einwaage enzymatisch überprüft wurde.

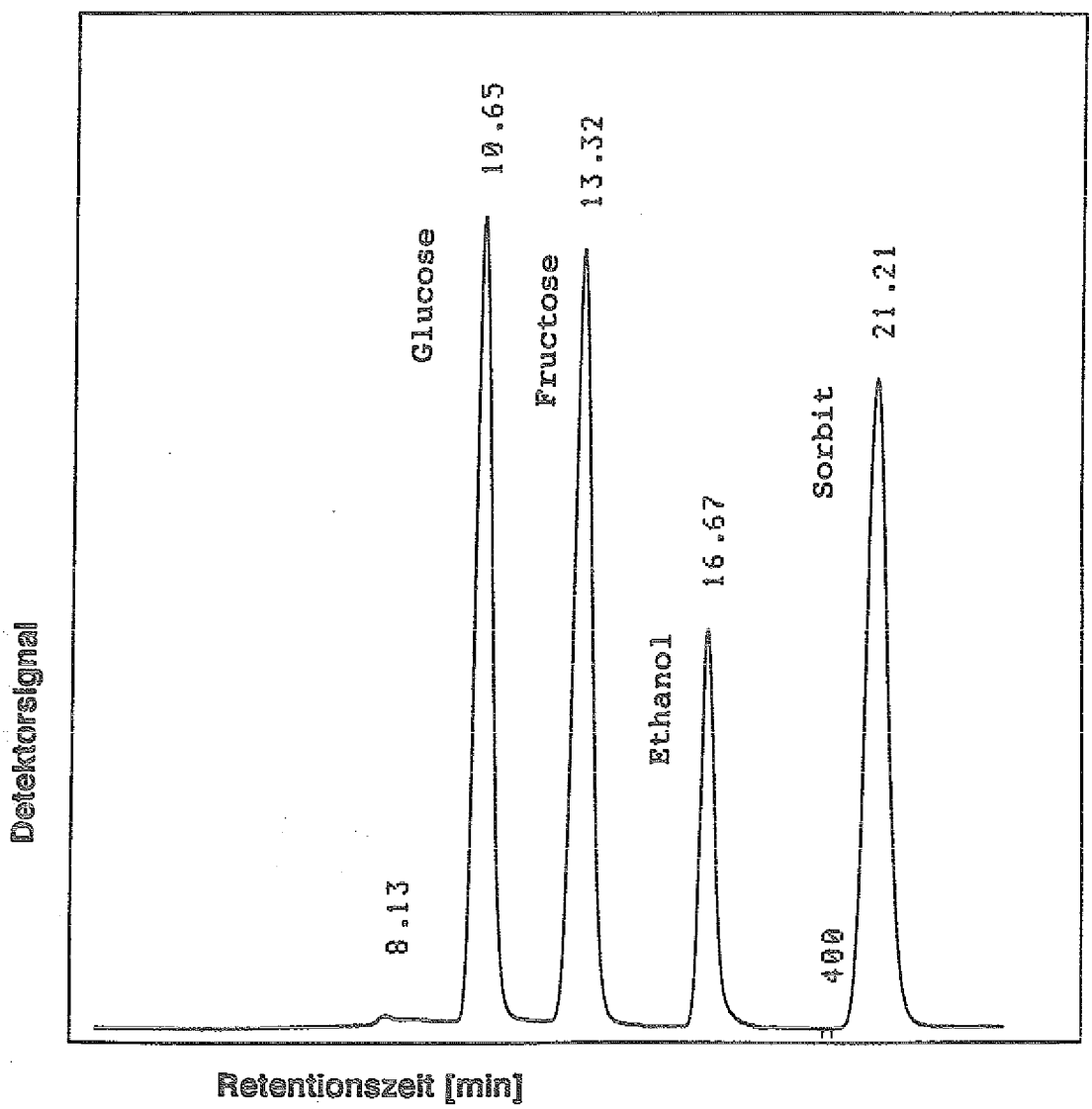


Abb. 2.1: Auftrennung eines Gemisches von Glucose, Fructose, Sorbit, Ethanol mit Hilfe der HPLC (Probenkonzentration je 3 g/l; Injektionsvolumen 10 µl; Papiervorschub 5 mm/min).

2.6.2 Bestimmung mittels Gaschromatographie

Die Ethanol- und Acetatkonzentrationen der Fermentationsproben wurden gaschromatographisch analysiert. Dabei wurde ein Gaschromatograph der Fa. Hewlett Packard, USA, Typ 5790 A mit Flammenionisationsdetektor, Integrator 3390 A, Sampler/Event Control Module 19400 A, Automatic Sampler 7671 A benutzt.

Analysenbedingungen (modifiziert nach Finn et al. 1984)

Säule:	Porapak QS, 80-100 mesh, 1/4 inch x 80 cm (Waters Ass. Inc., Milford, Mass., USA)
Säulentemperatur:	150° C
Injektortemperatur:	250° C
Detektortemperatur:	250° C
Trägergas:	Stickstoff
Gasfluß (N_2):	30 ml/min
Probevolumen:	1 µl

Hierbei betrugen die Retentionszeiten:

Acetat: 4,03 min
Ethanol: 0,93 min
Methanol: 0,39 min (interner Standard)

Probe (mit einer Ethanol- und Acetatkonzentration von je 1 g/l) und interner Standard (Methanol in 0,2 N HCl) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend gaschromatographisch analysiert. Zur Eichung des Gaschromatographen wurden Lösungen eingesetzt, die Methanol als internen Standard und Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. Die Bestimmung des Ethanolgehaltes dieser Eichlösungen wurde enzymatisch mittels Alkoholdehydrogenase vorgenommen.

2.6.3 Bestimmung mittels Zuckeranalysator

Die Trennung der Kohlenhydrate mit Hilfe des Zuckeranalysators erwies sich dann als vorteilhaft, wenn es galt, geringe Konzentrationen reduzierender Zucker neben einem großen Überschuß anderer Zucker zu bestimmen. Dabei erfolgte die Auftrennung der Kohlenhydrate nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie (Waffenschmidt und Jaenicke 1987). Zuckermoleküle bilden unter alkalischen Bedingungen mit Kaliumborat anionische Boratkomplexe, welche mit dem basischen Säulenmaterial der Trennsäule in Wechselwirkung treten. Kaliumboratpuffer steigender Konzentration bewirken bei alkalischem pH die Ablösung vom Ionenaustauscher. Durch Zusatz von Cu-Bicinchoninat wird der eluierte Zuckerboratkomplex bei hoher Temperatur in einen Farbkomplex überführt, dessen Konzentration im Durchflußphotometer bei 420 nm gemessen wird. Die Messungen wurden mit dem Zuckeranalysator Biotronik LC 2000, Fa. Biotronik, Maintal durchgeführt (Schimz et al. 1985).

<u>Analysenbedingungen:</u>

Vorsäule:	Dowex 1 X 4, 200-400 mesh (Fa. Biotronik, Maintal); 1 x 9 cm
Trennsäule:	Durrum DA-X-4-20 (Fa. Dionex, Weiterstadt); 0,6 x 30 cm
Temperatur:	60° C
Puffer zur Äquilibrierung:	0,1 M KBO_3 pH 8,0 (45 min)
Elution:	0,2 M KBO_3 pH 8,15 (60 min)
	0,4 M KBO_3 pH 9,45 (120 min)
Regenerierung:	10 % (w/v) Tetraborat (45 min)
Nachweisreagenz:	Na-Bicinchoninat 1,0 g
	K_2CO_3 209,5 g
	Asparaginsäure 1,85 g
	$CuSO_4$ x 5 H_2O 0,5 g
	ad 1 l aqua bidest.

Fließgeschwindigkeit

Puffer:	60 ml/h
Reagenz:	60 ml/h
Probenvolumen:	200 µl
Probenkonzentration:	4 - 25 nMol Zucker/Probe

Alle eingesetzten Puffer wurden zuvor filtriert (0,2 µm).

Für die zu analysierenden Zucker ergaben sich folgende Retentionszeiten:

Fructose:	104,5 min
Glucose:	152,3 min
Maltose:	67,9 min
Xylose:	126,5 min

2.6.4 Bestimmung mittels enzymatischer Methoden

Glucose wurde zur Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen enzymatisch nach Bergmeyer et al. (1974a) analysiert.

Meßprinzip:

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glucose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{Glucose-6-P-DH}} \text{Gluconat-6-phosphat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Die Menge an gebildetem NADPH + H^+ ist der Glucosekonzentration äquimolar. Gemessen wurde die Extinktionszunahme bei 340 nm. Die Proben müssen zu einer Glucosekonzentration unterhalb von 0,5 g/l verdünnt werden.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Puffer	0,5	
(0,75 M Triethanolamin		230 mM
pH 7,6 mit 10 mM $MgSO_4$)		3,11 mM
$NADP^+$ (11,5 mM)	0,05	0,36 mM
ATP (81 mM)	0,05	2,5 mM
Probe	0,05	bis zu 0,18 mM
Wasser (bidest)	0,95	

mischen und nach 3 min Extinktion der Lösungen messen (E_1)
Reaktion starten durch Zugabe der Enzymmischung

HK/G6P-DH	0,01	
(HK: 2 mg/ml		1,7 U/ml
G6P-DH: 1 mg/ml)		0,9 U/ml

mischen und nach ca. 15 min Extinktion messen (E_2)
Der Leerwert enthielt anstelle der Probe 0,05 ml aqua bidest.

Glucose-6-phosphat wurde enzymatisch wie die nicht-phosphorylierte Verbindung bestimmt. Allerdings wurde anstelle von ATP und Hexokinase aqua bidest. pipettiert. Alternativ dazu wurden die Zuckerphosphate nach Hydrolyse mit alkalischer Phosphatase als Glucose bestimmt. Hierzu wurde ein Probenaliquot mit alkalischer Phosphatase für 30 min bei 25°C im Thermoblock inkubiert. Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95°C wurde vorhandenes Protein denaturiert und nach Zentrifugation vom Überstand getrennt. Dieser wurde danach auf Glucose analysiert. Gleichzeitig in der Probe vorhandene nicht-phosphorylierte Zucker wurden dadurch berücksichtigt, daß aus der Differenz zwischen phosphoryliertem und dephosphoryliertem Zucker die in der Probe vorhandene Zuckerphosphatkonzentration errechnet werden kann.

Die enzymatische Bestimmung der Fructose erfolgte nach Bernt und Bergmeyer (1974).
Meßprinzip:

$$\text{Fructose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Fructose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Fructose-6-phosphat} \xleftrightarrow[\text{Isomerase}]{\text{Phosphoglucose-}} \text{Glucose-6-phosphat}$$

Glucose-6-phosphat reagiert wiederum wie oben beschrieben. Für die Messung wurde der Testansatz der Glucose-Bestimmung zugrunde gelegt und zusätzlich nach Messung von E_2 0,01 ml Phosphoglucoseisomerase (2 mg/ml) hinzugefügt (Endkonzentration: 4,3 U/ml). Ist nach ca. 15 min die Reaktion zum Stillstand gekommen, wird die Extinktion (E_3) gemessen.

Die Bestimmung von Fructose-6-Phosphat erfolgte analog der Messung von Glucose-6-Phosphat.

Nach Bergmeyer et al. (1974b) wurde Sorbit mit Hilfe der Sorbit-Dehydrogenase quantitativ bestimmt:

$$\text{D-Sorbit} + \text{NAD}^+ \xleftrightarrow{\text{Sorbit-Dehydrogenase}} \text{Fructose} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Unter Testbedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite von Fructose und NADH + H^+. Die gebildete NADH + H^+-Menge ist der Sorbitmenge äquivalent und wurde als Extinktionszunahme bei 340 nm bestimmt.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Puffer		
(0,1 M $Na_4P_2O_7$, pH 9,5	1,25	87,7 mM
NAD^+ (30 mM)	0,05	1,0 mM

Probe	0,1	bis zu 0,15 mM

mischen und Extinktionen der Lösungen messen (E_1)
Reaktion starten mit:

Sorbit-Dehydrogenase (4 mg/ml)	0,025	1,7 U/ml

nach ca. 90 min Extinktionen der Lösungen messen (E_2)

Die Gluconsäurekonzentration wurde nach Möllering und Bergmeyer (1974) ermittelt.

Meßprinzip:

$$\text{D-Gluconat} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Gluconat-Kinase}} \text{Gluconat-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Gluconat-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{Gluconat-6-P}} \text{Ribulose-5-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$$

Die bei der Reaktion gebildete NADPH + H^+-Menge ist der Gluconsäuremenge äquivalent und wurde im Spektralphotometer bei 340 nm gemessen. In der Küvette sollte die Menge der Gluconsäure < 0,5 g sein.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Puffer		
Glycylglycin (0,25 M)	0,5	90,6 mM
$MgSO_4$ (17 mM), pH 8,0		6,2 mM
NADP (11,5 mM)	0,05	0,4 mM
ATP (81 mM)	0,05	2,93 mM
Probe	0,05	bis zu 0,18 mM
Wasser	0,7	
6-PGDH (2mg/ml)	0,025	4,3 U/ml

mischen und nach 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1)
Reaktion starten mit:

Gluconat-Kinase (1 mg/ml)	0,005	1,4 U/ml

nach ca. 30 min Extinktionen der Lösungen messen (E_2)

Der Ethanolgehalt der Eichlösung für die Gaschromatographie (2.6.2) wurde enzymatisch mittels Alkohol-Dehydrogenase bestimmt (Bernt und Gutman 1974), welche folgende Reaktion katalysiert:

$$\text{Ethanol} + NAD^+ \xleftrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{Alkohol-}} \text{Acetaldehyd} + NADH + H^+$$

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Ethanol. Durch alkalisches Milieu, NAD^+-Überschuß und Abfangen des gebildeten Acetaldehyds mit Semicarbazid wurde die Reaktion auf die rechte Seite gezogen. Das gebildete NADH + H^+ war der Ethanolmenge äquimolar und wurde über die Extinktionszunahme bei 340 nm im Spektralphotometer bestimmt.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Puffer, pH 8,7	1,25	
$Na_4P_2O_7$ (75 mM) +		60 mM
Semicarbazid-Hydrochlorid (75 mM) +		60 mM
Glycin (21 mM)		16,8 mM
NAD (16 mM)	0,05	0,5 mM
Probe	0,05	bis zu 0,17 mM
aqua bidest.	0,50	

mischen und nach 2 min Extinktion messen (E_1)
Start der Reaktion durch:

Alkohol-Dehydrogenase (30 mg/ml)	0,01	7,7 U/ml

mischen, Lösung in Reagenzgläser überführen, mit Kugeln verschließen und 25 min im Wasserbad bei 37° C inkubieren. Nun Extinktion messen (E_2).

Die enzymatische Bestimmung von Glycerin erfolgte nach Eggstein und Kuhlmann (1974) gemäß folgender Reaktionen:

$$\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glycerokinase}} \text{Glycerin-3-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{Phosphoenolpyruvat} \xrightarrow{\text{Pyruvat-Kinase}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{Lactat-}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

Die während der Reaktion verbrauchte NADH + H^+-Menge ist der Glycerinmenge äquivalent und wurde über die Extinktionsabnahme bei 340 nm erfaßt.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Puffer, pH 7,4	0,50	
Glycylglycin (0,75 M) +		240 mM
$MgSO_4$ 2+ (10 mM)		3,2 mM
NADH/ATP/PEP-Gemisch	0,05	
NADH (8,2 mM)		0,27 mM
ATP (33 mM)		1,06 mM
PEP (46 mM)		1,47 mM
Probe	0,05	bis zu 0,18 mM
Wasser	0,95	
Pyruvat-Kinase (3 mg/ml)/	0,005	1,9 U/ml
Lactat-Dehydrogenase (1 mg/ml)		1,76 U/ml

mischen und nach 3 min Extinktion der Lösung messen (E_1)
Start der Reaktion durch:

Glycerokinase (1 mg/ml)	0,005	0,27 U/ml

nach ca. 5-10 min Extinktion der Lösung messen (E_2)

Der enzymatischen Bestimmung von Dihydroxyaceton liegt ebenfalls eine Phosphorylierung durch die Glycerokinase zugrunde (Wieland und Witt 1974).

$$\text{Dihydroxyaceton} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glycerokinase}} \text{Dihydroxyacetonphosphat} + \text{ADP}$$

Da auch Glycerin durch die Glycerokinase phosphoryliert wird, kann eine Differenzierung nur durch unterschiedliche Glycerokinase-Aktivitäten im Test erfolgen. Soll ausschließlich Glycerin phosphoryliert werden, ist eine geringe Glycerokinase-Aktivität (0,2 U GK/Test) erforderlich. Dagegen wird nach Ablauf der Glycerinreaktion durch Aktivitätserhöhung der Glycerokinase (4 U GK/Test) auch Dihydroxyaceton in ca. 40 min vollständig umgesetzt. Das dabei gebildete ADP wird gemäß der Glycerin-Bestimmung umgesetzt.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Testansatz wie unter 2.6.4. (Glycerin), anstelle von Glycerokinase (1 mg/ml):		
Glycerokinase verdünnt (0,25 mg/ml) mit $(NH4)_2SO_4$ (2,4 M)	0,005	0,07 U/ml

mischen und nach 10-15 min Extinktion der Lösung messen (E_2), anschließend Zugabe von:

Glycerokinase konzentriert (5 mg/ml)	0,005	1,4 U/ml

mischen und nach 40-45 min Extinktionen der Lösungen messen (E_3)

Auch hier ist NADH Meßgröße, d.h., daß die nach Zugabe der konzentrierten Glycerokinase verbrauchte NADH + H^+-Menge der Dihydroxyacetonmenge äquivalent ist.

Maltose wurde enzymatisch nach folgenden Reaktionen bestimmt (Gutman 1974):

$$\text{Maltose} + H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-Glucosidase}} 2\ \text{Glucose}$$

Die gebildete Glucose wird wie unter 2.6.4. aufgeführt weiter umgesetzt. Die dabei gebildete NADPH-Menge ist Meßgröße und der halben Maltosekonzentration äquimolar.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Natriumacetat-Puffer (0,1 M), pH 6,6	0,1	6,6 mM
Probe	0,05	
α-Glucosidase	0,01	1,7 U/ml
Mischen und bei 25° C 20 min inkubieren, dann Zugabe von:		
Triethanolamin-Puffer (0,75 M), pH 7,6 +	0,5	248 mM
$MgSO_4$ (10 mM)		3,31 mM
Wasser	0,74	
$NADP^+$ (11,5 mM)	0,05	0,38 mM
ATP (81 mM)	0,05	2,7 mM

mischen und nach 3 min Extinktion der Lösung messen (E_1)
Start der Reaktion durch Zugabe von:

Hexokinase (2 mg/ml)/	0,01	1,8 U/ml
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (1 mg/ml)		0,9 U/ml

mischen und nach 10-15 min Extinktionen der Lösungen messen (E_2)

Die Bestimmung der Lactatkonzentration wurde enzymatisch nach Noll (1974) durchgeführt, wobei folgende Reaktionen abliefen:

$$\text{L-Lactat} + NAD^+ \xrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{L-Lactat-}} \text{Pyruvat} + NADH + H^+$$

$$\text{Pyruvat} + \text{L-Glutamat} \xrightarrow[\text{Transaminase}]{\text{Glutamat-Pyruvat-}} \text{L-Alanin} + \alpha\text{-Ketobutyrat}$$

Das Gleichgewicht der Lactat-Reaktion liegt weit auf der Seite von Lactat. Daher wurde durch Abfangen des Pyruvats mit Hilfe des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase die Reaktion auf die Seite von Pyruvat und NADH + H^+ verschoben. Das bei der Reaktion gebildete NADH + H^+ wurde bei 340 bestimmt.

Testansatz:

Reagentien	Volumen [ml]	Endkonzentration
Puffer	0,5	
Glycylglycin (0,6 M) +		220 mM
Glutamat (0,1 M), pH 10,0		36 mM
NAD^+ (47 mM)	0,1	3,43 mM
Aqua bidest.	0,7	
Probe	0,05	bis zu 0,14 mM
GPT (20 mg/ml)	0,01	11,7 U/ml

mischen und nach 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1)
Start der Reaktion durch Zugabe von:

L-Lactat-Dehydrogenase (10 mg/ml)	0,01	40,1 U/ml

mischen und nach 20 min Extinktion der Lösung messen (E_2)

Zur Bestimmung der Gesamtlactatkonzentration wurde zusätzlich das Enzym D-Lactat-Dehydrogenase (5 mg/ml) mit 0,025 ml im Test eingesetzt. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:

$$\text{D-Lactat} + NAD^+ \xrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{D-Lactat-}} \text{Pyruvat} + NADH + H^+$$

Die Bestimmung der Konzentrationen der enzymatisch analysierten Verbindungen wurde nach folgender allgemeiner Berechnungsformel durchgeführt:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000}$$

V = Testvolumen [ml]
v = Probevolumen [ml]
MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz
d = Schichtdicke [cm]
ϵ = Extinktionskoeffizient von NAD(P)H bei 340 nm
= 6,3 [$l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

Wurde bei der Probenvorbereitung eine Verdünnung vorgenommen, mußte das Ergebnis mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

2.6.5 Nachweis von Glucose und Fructose mittels Dünnschichtchromatographie

Zur Identifizierung von [U-^{14}C]-Glucose und [U-^{14}C]-Fructose aus Perchlorsäure-Extrakten war ein dünnschichtchromatographischer Nachweis von Glucose und Fructose erforderlich. Hierzu wurden 1 µg der Proben und je 10 µl der Referenzlösungen (4 µg) auf eine HPTLC Fertigplatte mit Kieselgel 60 F_{254} (10 x 10 cm, 0,2 mm Schichtdicke; Merck, Darmstadt) aufgetragen. Entwickelt wurde bei voller Kammersättigung mit einem Laufmittelgemisch aus Butanol - Aceton - Wasser (4 : 5 : 1) (Lato et al. 1968). Die Platten wurden dreimal entwickelt und dann eine Stunde getrocknet. Zum Nachweis von Ketosen sowie Oligosacchariden, die Ketosen enthalten, wurden die Platten mit Sprühreagenz 1 behandelt, 1 min bei 130° C getrocknet, mit Sprühreagenz 2 behandelt und nochmals 2-3 min bei 130° C inkubiert. Reduzierende Zucker wurden nach Behandlung mit Sprühreagenz 3 durch 10 minütiges Erhitzen auf 130° C sichtbar gemacht.

Sprühreagenz 1: 5 g Harnstoff in 20 ml 2 M HCl +
100 ml 96%iger Ethanol

Sprühreagenz 2: 0,3 g Anthron in 10 ml Eisessig +
10 ml 96%iger Ethanol +
3 ml 85%ige Phosphorsäure +
1 ml aqua bidest.

Sprühreagenz 3: 1 g p-Anisidinhydrochlorid in 10 ml Methanol +
1 g Natriumdithionit
ad 100 ml mit 1-Butanol

Eine gute Trennung von Glucose und Fructose wurde jedoch nur dann erreicht, wenn mit 0,1 N $B(OH)_3$ imprägnierte HPTLC-Platten eingesetzt wurden (Stahl 1962). Unter diesen Bedingungen war ein sehr schlechtes Laufverhalten der Perchlorsäure-Extrakte aufgrund der hohen Salzkonzentrationen festzustellen. Dieser Effekt zeigte sich nicht, wenn nicht-imprägnierte Platten benutzt wurden. Daher wurde zum Nachweis von [U-^{14}C]-Fructose die in den Perchlorsäure-Extrakten enthaltene Glucose enzymatisch mit Hilfe der Glucose-Oxidase (5000 U/ml) quantita-

tiv entfernt. Der Extrakt wurde anschließend auf HPTLC-Platten aufgetragen. Nach Einsatz von Farbreagentien wurden die entsprechenden Substanzflecken ausgekratzt, abgesaugt und im Szintillationszähler gemessen. Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Trennung der Zucker sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Erkennbar ist, daß andere, evtl. im Perchlorsäure-Extrakt vorhandene Kohlenhydrate (Ribose, Xylose, Xylulose u.a.) mit ähnlichen R_F-Werten wie Fructose durch Farbreaktionen bzw. anderes Laufverhalten ausgeschlossen werden konnten.

Tab. 2.1: Dünnschichtchromatographische Trennung von Glucose und Fructose aus Perchlorsäure-Extrakten von *Z. mobilis*.

Als Laufmittel wurde ein Butanol-(1) - Aceton-Wasser - Gemisch (4 : 5: 1) eingesetzt.

Zucker	R_F x 100 HPTLC mit Borsäure	ohne Borsäure
β-D-Glucose[1]	54	60
D-Fructose[1]	41	57
PCA-Extrakt	s.T.	59*
Ribose[2]	27	63
Xylose[2]	36	65
Xylulose[2]	n.a.	72
Ribulose[2]	n.a.	0
Mannose	33	n.a.

1: aufgetragene Menge 0,9 µg
2: aufgetragene Menge 12,5 µg
s.T.: schlechte Trennung wegen hoher Salzkonzentrationen im Extrakt
* Nachweis von Fructose möglich, sofern zuvor Glucose enzymatisch umgesetzt wurde

2.7 Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen

2.7.1 Kultivierung von Zellen zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen

Zymomonas mobilis-Zellen wurden in der exponentiellen Phase des Wachstums bei OD_{550} von 4,5-5 geerntet und im glucosefreien Medium zu einer OD_{550} von 10-11 resuspendiert. 1 ml dieser Zellsuspension diente als Inokulum für 10 ml Vollmedium (in Bellco-Röhrchen) mit Zuckerkonzentrationen von 2-18 % (w/v). Da bei *Z. mobilis* die Wachstumsrate mit zunehmender extrazellulärer Zuckerkonzentrationen abnahm, konnte durch Ausnutzung des Temperatur-Effekts erreicht werden, daß für alle Ansätze mit 2-18 % (w/v) Zucker die Schwankungen der Wachstumsrate nicht mehr als 20 % betrugen. Daher wurden Testansätze mit 2-12 % (w/v) Zucker bei 20° C, solche mit hohen Zuckerkonzentrationen (13-18 % w/v) bei 30° C kultiviert. In Zeitabständen wurden Proben genommen, um die Glucose-Aufnahmerate zu bestimmen.

2.7.2 Silikonölzentrifugation von *Z. mobilis*-Zellen

Um die *Z. mobilis*-Zellen rasch aus dem Medium zu entfernen, wurde die Silikonölzentrifugation durchgeführt (Klingenberg und Pfaff 1967). Dazu wurden in 400 µl Mikrotestströhrchen (Beckman) 30 µl 20%ige Perchlorsäure (PCA) gefüllt, 10 s zentrifugiert (Microfuge E, Beckman), mit 65 µl Silikonöl überlagert und erneut 10 s zentrifugiert. Aufgrund der höheren Dichte befand sich die Perchlorsäurelösung zuunterst, darüber die Ölschicht. Das verwendete Silikonöl mußte eine auf das jeweilige Zuckermedium abgestimmte Dichte aufweisen, um zu gewährleisten, daß die Organismen die Ölschicht durchdringen können und der Überstand zellfrei war. Als geeignet erwiesen sich bei einer Zentrifugationszeit von 30 s folgende Öle:

Zuckerkonzentration [g/l]	Silikonöl für Zentrifugation	
0 - 80	Baysilonöl PH 300,	d=1,03
81 - 120	Mischung (1 : 1) aus	
	Baysilonöl PH 300,	d=1,03
	+ Silikonöl,	d=1,05
121 - 150	Silikonöl PN 200,	d=1,06

Zur intrazellulären Metabolitbestimmung (Abb. 2.2) wurden je 200 µl Zellsuspensionen bekannter OD auf die vorbereiteten Mikrotestströhrchen gegeben und sofort bei 12500 x *g* in einer Beckman-Microfuge E mit Horizontalrotor (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California, USA) 30 s zentrifugiert. Durch die Zentrifugation gelangten die Zellen durch die Ölschicht und sedimentierten in der Perchlorsäure-Lösung. Das Sediment diente der Ermittlung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen, während aus dem Überstand die extrazellulären Substrat- und Produktkonzentrationen bestimmt wurden. Zur Aufarbeitung wurden die Mikrotestströhrchen an der Grenzschicht Perchlorsäure - Silikonöl mit Hilfe eines Skalpells durchtrennt und Perchlorsäurelösung und Zellsediment in ein 0,8 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert (2 min, 12500 x *g*). Um die Extraktion zu vervollständigen, wurde das Sediment kurzzeitig aufgewirbelt und 5 min beschallt (Ultraschallbad Branson 2200, Branson Europa B.V., Soest, NL). Durch Zugabe von 24 µl 5 M KOH/1 M Triethanolamin Lösung wurden die Extrakte neutralisiert und das in der Kälte ($\leq 4^{o}$ C) ausgefallene Kaliumperchlorat durch Zentrifugation (2 min, 12500 x *g*) abgetrennt. Da für nachfolgende Analysen eine ausreichende Menge zur Verfügung stehen mußte, war es notwendig, pro Ansatz 16 Mikrotestströhrchen aufzuarbeiten.

Für intrazelluläre Fructosebestimmungen war es aufgrund von Hydrolysereaktionen erforderlich, anstelle von 30 µl 20%iger Perchlorsäure lediglich 30 µl 5%ige Perchlorsäure in die Mikrotestströhrchen einzufüllen. Zur Neutralisation der Extrakte wurde ein Puffer aus 2 M KOH/1 M Triethanolamin eingesetzt.

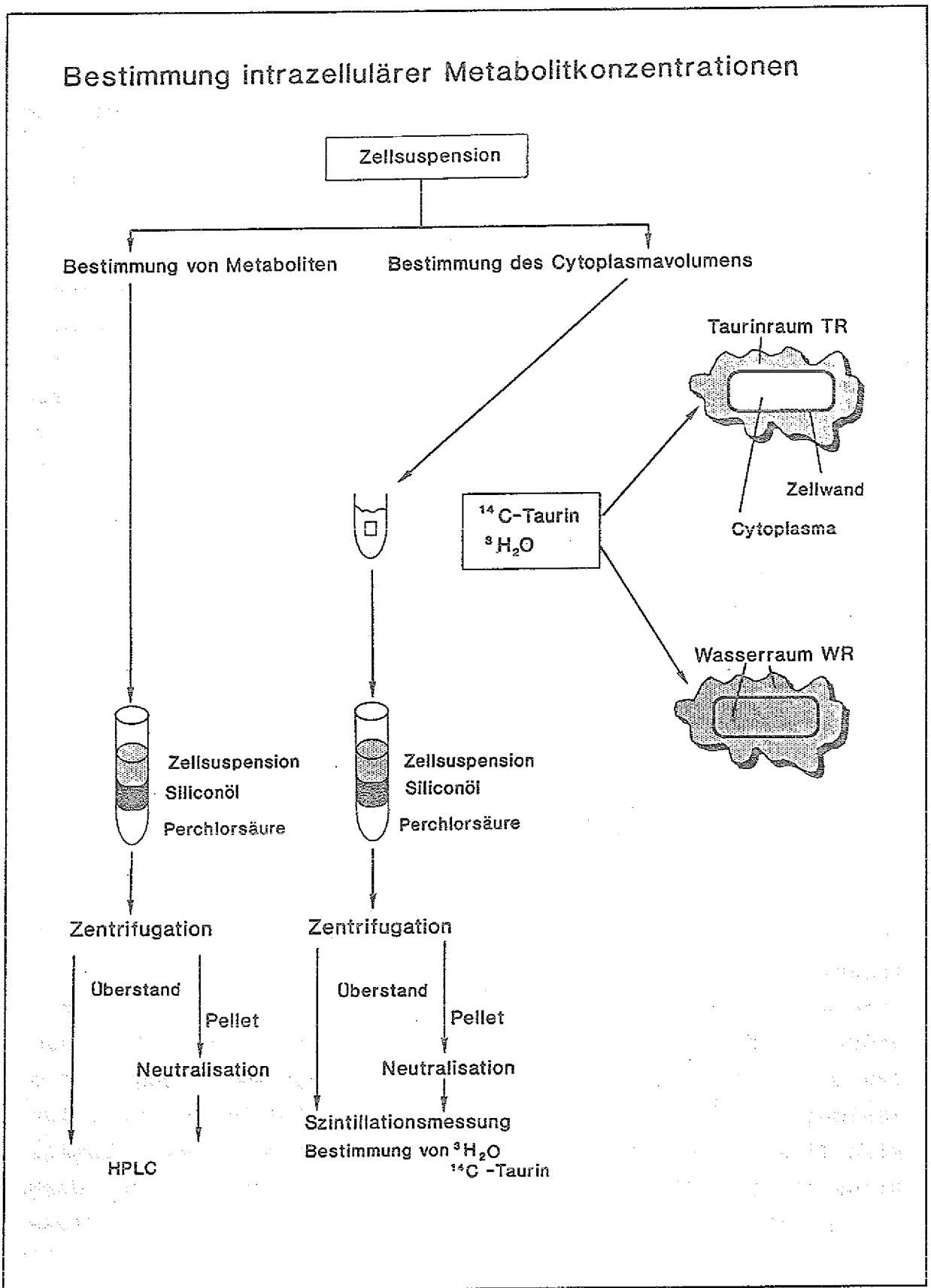


Abb. 2.2: Verlaufsschema zur Bestimmung intrazellulärer Metabolite

2.7.3. Bestimmung des Cytoplasmavolumens von *Z. mobilis*

Zur Bestimmung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen wurde das Cytoplasamvolumen über die Verteilung der Isotope ^{3}H und ^{14}C in Zellen und Überstand ermittelt (Rottenberg 1979). Bei der Volumenbestimmung (Abb. 2.2) schließt man aus der Verteilung permeabler und nicht permeabler Substanzen auf das Cytoplasmavolumen. Die Suche nach impermeablen Markern ergab, daß ^{14}C-Taurin, ^{14}C-Maltose und ^{14}C-Inulin nicht die Cytoplasmamembran von *Z. mobilis* passieren. Dagegen dringt $^{3}H_2O$ sofort in die Zelle ein. Die daraus resultierende Differenz zwischen Wasser- und Taurinraum ist Grundlage für die Berechnung des Cytoplasmavolumens der Zellen (Rottenberg 1979). Wenn nicht anders vermerkt, wurde bei den Volumenbestimmungen ^{14}C-Taurin als impermeabler Marker eingesetzt.

Nach Zugabe von 500 µl Zellsuspension zu einem Testansatz bestehend aus

5 µl	^{14}C-Taurin	(1 µCi; 115 µCi/µmol)
20 µl	^{12}C-Taurin	(10 mM)
5 µl	$^{3}H_2O$	(2 µCi)

wurde sorgfältig gemischt und für 2 min bei 25° C im Wasserbad inkubiert. An die Entnahme von 5 mal je 100 µl aus dem Inkubationsansatz und Überführung in Mikrotestströhrchen mit Perchlorsäure und Öl schloß sich die Zentrifugation in der Microfuge E (30 s, 12500 x *g*) an. 20 µl des Überstandes wurden für die Zählung der ^{3}H und ^{14}C counts im Scintillationszähler (Liquid Scintillation Counter Rackbeta 1214, LKB) in 4 ml Szintillationsfläschen überführt. Um Quenching auszuschließen, wurden pro Szintillationsgefäß außer 4 ml Scintillationsflüßigkeit (Instant Scint. Gel, Packard Instruments Company, Inc., Illinois, USA) 200 µl aqua bidest. pipettiert. Sehr wichtig war es, die Szintillationsgefäße sofort zu verschließen, da $^{3}H_2O$ schnell verdampft. Bei der Aufarbeitung der Mikrotestströhrchen wurden die Röhrchen an der Grenzschicht Öl - Perchlorsäure

durchtrennt und die Spitze in ein 1,6 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 750 µl aqua bidest. und anschließender Zentrifugation (2 min, 12500 x *g*) wurde das Pellet auf dem Vibrofix aufgewirbelt und der Extrakt für 5 min im Ultraschallbad (Branson 2200) behandelt. Dann wurde erneut zentrifugiert (5 min, 12500 x *g*) und 650 µl vom Überstand wurden zur Bestimmung der counts im Scintillationszähler vermessen. Dabei ist der Taurinraum ein Maß für den Anteil des Überstandes, der bei der Zentrifugation der Zellen durch die Ölschicht mitgerissen wurde und daher bei der Berechnung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen berücksichtigt werden muß.

Aus der Verteilung von ^{14}C markiertem Taurin und $^{3}H_2O$ in Pellet und Überstand lassen sich unter Berücksichtigung der eingesetzten Zählvolumina Wasser- und Taurinraum errechnen. Die Berechnung der Volumina erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Wasserraum:} \quad \frac{{}^{3}H_2O_{Sed}\ [dpm] \times ZV_{ÜS}\ [\mu l] \times V_{Sed}\ [\mu l]}{{}^{3}H_2O_{ÜS}\ [dpm] \times ZV_{Sed}\ [\mu l]} \quad [\mu l/Ansatz]$$

$$\text{Taurinraum:} \quad \frac{{}^{14}C_{Sed}\ [dpm] \times ZV_{ÜS}\ [\mu l] \times V_{Sed}\ [\mu l]}{{}^{14}C_{ÜS}\ [dpm] \times ZV_{Sed}\ [\mu l]} \quad [\mu l/Ansatz]$$

ZV_{Sed}: Zählvolumen des Pellets (650 µl)
V_{Sed} : Volumen des aufgearbeiteten Pellets (780 µl)
$ZV_{ÜS}$: Zählvolumen des Überstandes (20 µl)

Cytoplasmavolumen = Wasserraum - Taurinraum (µl/Ansatz)

Wasser- und Taurinraum wurden stets auf das Trockengewicht der eingesetzten Zellsuspension bezogen, so daß die Werte in µl/mg TG angegeben wurden.

2.8 Bestimmung der Zuckertransportraten

100 ml Zellen einer exponentiell gewachsenen *Z. mobilis*-Kultur wurden geerntet. Das Pellet wurde in kaltem 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5 mit 1 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$ suspendiert (Di Marco und Romano 1985), zweimal mit diesem Puffer gewaschen und dann zu einer OD_{550} von mindestens 5 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 10 min bei 25° C im Wasserbad zusammen mit vorbreiteten Mikrotestströhrchen vorinkubiert.

Zur Messung des Glucosetransports wurden 10 µl einer Stammlösung aus ^{14}C-Glucose (Endkonzentration: 2-50 mM; 0,2 µCi) vorbereitet. Berücksichtigt man, daß die Substratlösung zum Start der Reaktion 1 : 11 verdünnt wurde, ergab sich für diese Lösung angesichts des geringen Volumens von 10 µl eine hohe Dichte. Die Substratlösung wurde daher vorsichtig in Tropfenform oberhalb der Ölschicht an der Gefäßwand des horizontal orientierten Teströhrchens abgelegt, um zu verhindern, daß eine Vermischung mit der Ölschicht eintritt. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Substratlösung noch nicht mit der Zellsuspension in Berührung gekommen. Die Laufschiene mit dem horizontal gelagerten Mikrotestströhrchen wurde dann in den Horizontalrotor der Microfuge E eingeführt; die Transportmessung wurde durch Zugabe von 100 µl Zellsuspension bekannter OD gestartet, wodurch gleichzeitig die Vermischung mit der Substratlösung erfolgte. Nach Ablauf der Inkubationszeit (3, 5, 7, 9, 12, 15, 20 und 30 s) erfolgte die Zentrifugation zur Beendigung der Zuckeraufnahme. Zur Berechnung der Glucose-Aufnahmerate wurde der Anteil der aus dem Überstand bei der Zentrifugation ins Pellet mitgerissenen extrazellulären ^{14}C-Glucose mit Hilfe der Taurinraum-Bestimmung gemessen und bei der Berechnug der Glucose-Aufnahmerate entsprechend berücksichtigt.

Da sich wie bei allen physikochemischen Vorgängen der Netflux aus zwei gegensinnigen Flüssen, dem In- und Efflux zusammensetzt, wurden ergänzend zum Influx Untersuchungen zum Efflux von Glucose durchgeführt. Bei den Efflux-Versuchen wurde das Volumen des zur Resuspension eingesetzten Vollmediums ohne C-Quelle so bemessen, daß nach Beimpfung eines 10 ml Bellco-Röhrchens mit 100 g/l Glucose die OD_{550} mindestens 30 betrug. Nach 5 minütiger Inkubationsdauer wurde im Eppendorf-Reaktionsgefäß die Zellsuspension mit 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5 mit 1 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$ und 450 mM Maltose verdünnt. Der Zusatz von Maltose zur Verdünnungs-Lösung diente der Aufrechterhaltung der Osmolalität des Vollmediums, d.h., daß dadurch einem osmotischen Schock der *Z. mobilis*-Zellen beim Verdünnungsvorgang vorgebeugt wurde. Nach Start der Verdünnung wurden nach 5, 10, 15, 20, 25 und 30 s Proben (200 µl) aus dem Inkubationsansatz in vorbereiteten Mikrotestströhrchen abzentrifugiert (Microfuge E; 30 s, 12500 x *g*) und anschließend aufgearbeitet. Zur Bestimmung der intrazellulären Glucosekonzentration wurde eine Volumenbestimmung durchgeführt.

Messungen zum Fructosetransport wurden in Analogie zu den Bestimmungen der Glucose-Aufnahmerate durchgeführt. Lediglich anstelle des Kalium-Phosphat-Puffers wurde 50 mM MES-Puffer pH 6,0 eingesetzt, da unter diesen Bedingungen bessere Fructose-Aufnahmeraten erzielt werden konnten als mit Kalium-Phosphat-Puffer.

Die Aufnahme von Fructose aus dem Vollmedium ist von Bedeutung, weil aus technischen Gründen keine glucosefreie Fructose zur Verfügung steht. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine spezifische Akkumulation von Fructose aus dem Glucose enthaltenden Medium möglich ist, wurden *Z. mobilis*-Zellen im Vollmedium mit 5 % Glucose kultiviert. Zwei Parallelkulturen mit je 135 ml Vollmedium wurden mit 7,5 ml Vorkultur einer OD_{550} von 14 beimpft und zeitparallel 40 ml-Proben entnommen. Einer Kultur wurden 10 µCi ^{14}C-Fructose zugesetzt. Bei dieser Kultur wurde das entstandene $^{14}CO_2$ durch eine Verbindung vom Kulturgefäß zu einem Auffanggefäß mit 3 N KOH abgefangen. Proben der Kultur mit ^{14}C-Fructose wurden bis zur OD_{550} = 40 aufkonzentriert und dann der Silikonölzentrifuga-

tion unterworfen. Die ^{14}C-Extrakte der Proben, die im Abstand von 1,5 h nach Start der Inkubation gezogen wurden, wurden durch Inkubation mit Glucoseoxidase (5000 U/ml; 5 µl/1,2 ml Extrakt) glucosefrei gemacht und konnten daher auf nicht imprägnierte HPTLC-Platten aufgetragen werden. Mit Hilfe von Sprühreagentien konnte die Fructose als Substanzfleck dargestellt werden. Dieser wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und im Scintillationszähler ausgezählt. Als Kontrolle für das Laufverhalten der Extrakte dienten (nicht) markierte Glucose und Fructose-Standards.

Ein Aliquot der Probe ohne Zusatz von ^{14}C-Fructose diente der Bestimmung von OD_{550}, intra- und extrazellulärer Fructosekonzentrationen (durch Enzymtest bzw. Zuckeranalysator), sowie der Cytoplasmavolumen-Bestimmung mittels $^{3}H_2O$ und ^{14}C-Taurin.

2.9 Bestimmung der intrazellulären Osmolalität

Die Bestimmung der Gesamtosmolalität beruhte auf der Messung der Gefrierpunktserniedrigung wäßriger Lösungen. Dabei wurde die Probelösung (50 µl) am Meßgefäßhalter in das Peltier-Kühlsystem eines Gefrierpunkt-Osmometers (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin) abgesenkt, wo sie auf eine Temperatur von -6,9° C abkühlte. Unterhalb des Gefrierpunktes wurde die Kristallisation automatisch eingeleitet. Dies erfolgte durch Impfen der Lösung mit Eiskristallen, die infolge kondensierter Luftfeuchtigkeit an einer Edelstahlnadel eines zweiten Kühlsystems hafteten. Diese Nadel tauchte kurzzeitig in die unterkühlte Probelösung. Danach stieg die Temperatur bis auf die Kristallisationstemperatur an, die mit einer Auflösung von $1{,}858 \times 10^{-3}$ °C gemessen wurde und als Meßwert für osmolale Konzentrationen angegeben wird. Die Zweipunkteichung des Geräts erfolgte mit Wasser und einer NaCl-Lösung mit 300 mOs/kg H_2O bzw. 9,4484 g NaCl/kg H_2O (Fa. Gonotec, Berlin).

Zur Messung der Osmolalität wurden *Z. mobilis*-Zellen, wie un-

ter 2.4 aufgeführt, kultiviert und geerntet. Nach 2 maligem Waschen der Zellen mit 5 mM KCl-Lösung wurden diese resuspendiert, wobei die OD_{550} 100-300 betrug. 25 µl dieser stark aufkonzentrierten Zellsuspension wurden zusammen mit weiteren 25 µl aqua bidest. bzw. 5 mM KCl (Kontrollen) oder einer 1 %igen CTAB-Lösung (Cetyltrimethylammoniumbromid) in ein 0,8 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Osmolalität der Proben bestimmt. Zur Überprüfung der Permeabilisierung wurde die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) nach Algar und Scopes (1985) bestimmt. Dieses intrazelluläre Enzym kann nur in aufgeschlossenen oder permeabilisierten Zellen gemessen werden. Die Zellmembran intakter *Z. mobilis*-Zellen ist für das im Testansatz vorhandene NADH impermeabel.

2.10 Isolierung und Reinigung eines Fructose-Polymers

Untersuchungen zum Säureeinfluß auf die intrazellulären Fructosekonzentrationen lieferten Hinweise auf das Vorhandensein eines Fructose-Polymers in *Z. mobilis*. Um die Bedeutung der u.a. bei Glucose-Fermentationen gemessenen intrazellulären Fructosekonzentrationen bestimmen zu können, wurde das Fructose-Polymer aus *Z. mobilis* isoliert und gereingt (Barrow et al. 1984c). 1 l *Z. mobilis*-Zellen wurden im Vollmedium mit 5% (w/v) Glucose kultiviert und geerntet. Die in wenigen ml Vollmedium ohne Glucose resuspendierten Zellen wurden dann in der X-Presse aufgeschlossen. Beim Zellaufschluß mittels X-Presse wurden 5 ml Zellsuspension in eine vorgekühlte X-Presse (AB Biox, Nacka, Schweden) gefüllt, bei -20°C für 1 h gelagert und umgehend mit einer Hydraulik-Presse 4 mal durch eine 0,8 mm große Öffnung gedrückt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde anschließend zentrifugiert (30 min, 40000 x *g*). Nach erfolgter Zentrifugation (30 min, 40000 x *g*) wurde das Fructose-Polymer aus dem Sediment mit 5%iger Perchlorsäure unter ständigem Rühren (3 h) extrahiert. An die Neutralisation des Extrakts mit 2 M KOH schloß sich ein weiterer Zentrifugationsschritt an (10

min, 5000 x *g*), um ausgefallenes Kaliumperchlorat zu entfernen. Zur Reinigung des Fructose-Polymers wurde der neutralisierte Extrakt 72 Stunden gegen Wasser dialysiert. Der quantitative Nachweis des Polymers erfolgte durch Differenzmessung der Monomerenkonzentration vor und nach erfolgter Hydrolyse des Polymers mit 30 %iger Perchlorsäure. Die Neutralisation des gereinigten Extrakts wurde mit 5 M KOH vorgenommen; die enzymatische Bestimmung der Fructose anschließend durchgeführt. Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration mit Sephacryl S-200 ermittelt (Säule: 16 x 675 mm). Eluiert wurde mit 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8 bei einer Durchflußrate von 1 ml/min (Barrow et al. 1984c).

3. Ergebnisse

3.1 Toleranz von *Zymomonas mobilis* gegenüber hohen Zuckerkonzentrationen

3.1.1 Einfluß unterschiedlicher Glucosekonzentrationen im Medium auf intrazelluläre Metabolitkonzentrationen

Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien kann *Zymomonas mobilis* in Medien mit hohen Glucosekonzentrationen wachsen (Swings und De Ley 1979). Da bislang nur wenige Erkenntnisse über die Zuckertoleranz von *Z. mobilis* vorliegen, wurde der Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die spezifische Wachstumsrate μ, die spezifische Glucose-Aufnahmerate q_s, die spezifische Produktivität q_p, die Ethanol- und die Zellausbeute ermittelt. Dazu wurden Batch-Fermentationen mit Glucose als einziger C-Quelle durchgeführt, wobei die Glucosekonzentrationen zwischen 20 und 200 g/l betrugen. Es konnte gezeigt werden (Tab. 3.1), daß bei steigenden Anfangs-Glucosekonzentrationen im Medium die spezifische Glucose-Aufnahmerate, die spezifische Produktivität und die Ethanolausbeute weitgehend konstant blieben. Offenbar wurden durch die hohen Glucosekonzentrationen die Glucose-Aufnahmerate (7,7 g/g/h) und der Katabolismus von Glucose nicht beeinflußt, was sich in konstanten Werten für die spezifische Ethanol-Produktivität (3,9 g/g/h) und Ethanolausbeute (0,49 g/g) widerspiegelte. Demgegenüber zeigt Tabelle 3.1, daß bei steigender Anfangs-Glucosekonzentration im Medium die spezifische Wachstumsrate μ und die Zellausbeute deutlich abnahmen.

Tab. 3.1: Fermentations-Parameter von *Z. mobilis* Batch-Kulturen in Abhängigkeit von verschiedenen Glucosekonzentrationen des Mediums.

Die Zellen wurden in Vollmedium mit 5% (w/v) Glucose kultiviert, nach der Zellernte gewaschen und anschließend in Vollmedium ohne Glucose resuspendiert. Mit diesem Inokulum wurde bei allen Glucoselösungen (2-20 % w/v) die OD_{550} auf 0,5 eingestellt.

Glucosekonzentration [g/l]	20	50	100	150	200
Osmolalität des Mediums [Os/kg]	0,225	0,405	0,737	1,121	1,559
Spez. Wachstumsrate μ [h^{-1}]	0,462	0,347	0,276	0,267	0,168
Spez. Ethanol-Produktivität q_p [g/g/h]	3,74	4,31	3,63	3,71	3,91
Spez. Glucose-Aufnahmerate q_s [g/g/h]	7,40	8,13	7,68	7,91	7,56
Ethanol-Ausbeute $Y_{p/s}$ [g/g]	0,51	0,48	0,49	0,45	0,50
Zell-Ausbeute $Y_{x/s}$ [g/g]	0,075	0,063	0,062	0,056	0,043

Die Anwachsphasen (lag-Phasen) verlängerten sich mit steigender Glucosekonzentration (Abb. 3.1). Offensichtlich hemmte die hohe Osmolalität des Mediums von bis zu 1,6 Os/kg die Aktivität anaboler Enzyme, da die Geschwindigkeit der Glucose-Verwertung unbeeinflußt blieb.

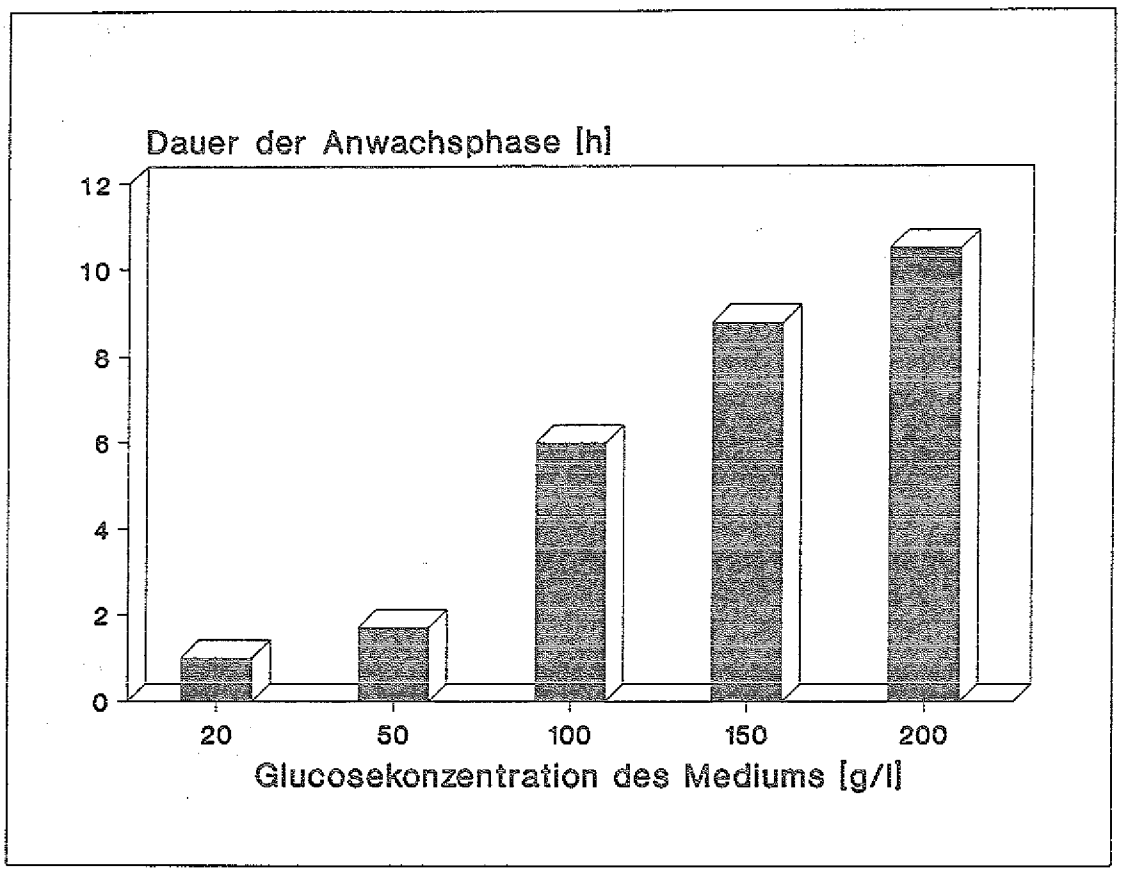


Abb. 3.1: Abhängigkeit der Länge der Anwachsphase (lag-Phase) von der Glucosekonzentration des Mediums

Für die Konzentrationsbestimmung potentiell vorhandener osmoadaptiver Substanzen mußte zunächst das Cytoplasmavolumen ermittelt werden. Die Bestimmung der Cytoplasmavolumina erfolgte über die Verteilung permeabler und impermeabler Solute. Als impermeable Marker wurden [U-^{14}C]-Taurin, [U-^{14}C]-Maltose und [^{14}C]-Inulin verwendet. Die Ergebnisse der Raumbestimmung sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Aus der Differenz von Wasser- und Markerraum ergibt sich das Cytoplasmavolumen (2,9 µl/mg TG). Unterschiede im Cytoplasmavolumen resultierten aus dem Verteilungsverhalten der eingesetzten Marker. Daß für Taurin mit 3,1 µl/mg TG (Markerraum) im Vergleich zu den anderen Markern ein hoher Wert erreicht wurde, ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß diese Verbindung als Zwitterion bis ins Periplasma bzw. bis zur Cytoplasmamembran gelangen kann. Im Gegensatz dazu ist

Inulin mit einem Molekulargewicht von 5175 ± 95 nicht in der Lage, die äußere Membran von *Z. mobilis* zu passieren, was zu einem niedrigeren Wert für den Inulinraum führt und für Berechnungen des Zellvolumens (= Differenz von Wasser- und Markerraum bei Inulin) genutzt werden kann. Aus der Differenz von Zellvolumen und Cytoplasmavolumen ergibt sich für *Z. mobilis* ein Periplasmavolumen, welches 12,5 % des Zellvolumens beträgt. Bei *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* wird dagegen das Periplasmavolumen mit mindestens 20 % vom Zellvolumen angegeben (Stock et al. 1977).

Tab. 3.2: Raumbestimmung von *Z. mobilis* mit Hilfe verschiedener impermeabler Marker zur Bestimmung des Cytoplasmavolumens.

Für die Inkubationsansätze wurden *Z. mobilis*-Zellen aus einer Kultur mit 5% (w/v) Glucose eingesetzt, wobei die Zellernte in der Mitte der exponentiellen Phase erfolgte. Die in der Tabelle aufgeführten Volumina blieben während der gesamten Inkubationsdauer (0-12 min) konstant. Als permeabler Marker diente ^3H_2O (0,4 µCi), als impermeable Marker [U-^{14}C]-Taurin (0,2 µCi; 115 µCi/µmol), [U-^{14}C]-Maltose (0,2 µCi; 540 µCi/µmol) und Inulin-[^{14}C]-carbonsäure (0,2 µCi; 11,9 µCi/µmol).

	Impermeable Marker		
	Taurin	Maltose	Inulin
Raum	Volumen [µl/mg TG]		
Wasser (^3H_2O)	5,9	5,8	6,0
Marker (^{14}C)	3,1	2,9	2,8
Cytoplasma	2,8	2,9	3,2*

* bei Inulin: Wert für Zellvolumen

Bei konstanter Glucose-Aufnahmerate q_s wurde das Cytoplasmavolumen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Mediums bestimmt. Hierzu wurden *Z. mobilis*-Zellen mit 3-18%igen (w/v) Glucoselösungen kultiviert und nach einer Inkubationsdauer von

mindestens 1,5 h bei einer Glucose-Aufnahmerate von 4,3 g/g/h der Silikonölzentrifugation zur Bestimmung des Cytoplasmavolumens unterworfen.

Tab. 3.3: Bestimmung des Cytoplasmavolumens in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Mediums.

Cytoplasmavolumen-Bestimmungen wurden mit [U-^{14}C]-Taurin (0,2 µCi; 115 µCi/µmol) durchgeführt.

Glucosekonzentration des Mediums [mM]	Osmolalität der Glucoselösung [Os/kg]	Cytoplasmavolumen [µl/mg TG]
35	0,031	2,9
228	0,233	2,7
409	0,431	2,5
606	0,609	1,9
668	0,727	1,6
721	0,803	1,7
805	0,915	1,5

Aus Tabelle 3.3 wird ersichtlich, daß mit zunehmender extrazellulärer Glucosekonzentration und bei konstanter Glucose-Aufnahmerate q_s eine signifikante Abnahme des Cytoplasmavolumens zu beobachten war. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Van Eck et al. (1989) bei der zuckertoleranten Hefe *Hansenula anomala* gemessen.

Zur Berechnung der intrazellulären Gesamtosmolalität sind die intrazellulären Konzentrationen von Ionen und nicht-ionischen niedermolekularen Bestandteilen der Zelle zu berücksichtigen. Dazu wurden Messungen zur Bestimmung der intrazellulären Osmolalität vorgenommen. Für diese Osmolalitäts-Messungen wurden in KCl-Lösung gewaschene *Z. mobilis*-Zellen aufkonzentriert und anschließend mit Cetyltrimethylammoniumbromid permeabilisiert. Als Kontrolle fungierten nichtpermeabilisierte *Z. mobilis*-Zellen. Aus der Differenz der osmotischen Werte von permeabi-

lisierten und nichtpermeabilisierten Zellen konnte die intrazelluläre Osmolalität zu 310 mOs/kg ermittelt werden, wobei *Z. mobilis*-Zellen in 5 mM KCl-Lösung resuspendiert wurden. Die Werte der intrazellulären Osmolalität stimmten gut mit Daten von Stock et al. (1977) bei *S. typhimurium* und *E. coli* überein. Demnach beträgt die intrazelluläre Osmolarität bei in Mineralsalzmedium resuspendierten *E. coli* und *S. typhimurium*-Zellen 300 mOs.

Die intrazellulären Konzentrationen von Glucose und Sorbit wurden in Abhängigkeit von der extrazellulären Glucosekonzentration bestimmt. Die in Abbildung 3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß mit steigender Glucosekonzentration im Medium ein starker Anstieg der intrazellulären Konzentrationen an nichtphosphorylierter Glucose einherging. Unterhalb einer extrazellulären Glucosekonzentration von ca. 120 mM lag die intrazelluläre Glucosekonzentration unter der Nachweisgrenze von 0,5 mM. *Zymomonas mobilis* verfügt also über hohe intrazelluläre Glucosekonzentrationen, die parallel zur Konzentration der Glucose im Medium ansteigen. Ein ähnliches Phänomen ist unter salinen Bedingungen von den Cyanobakterien *Gloeothece*, *Calothrix* und *Scytonema* bekannt (Mackay et al. 1984).

Zusätzlich wurden oberhalb einer extrazellulären Glucosekonzentration von 410 mM Konzentrationen von bis zu 67 mM an intrazellulärem Sorbit gemessen. Allerdings fällt dem Sorbit unter diesen Bedingungen keine bedeutende Rolle bei der Erklärung der Zuckertoleranz zu. Die intrazellulären Sorbitkonzentrationen lagen zwar um 1 - 2 Zehnerpotenzen höher als die des Mediums, trugen jedoch nur in sehr geringem Ausmaß zum osmotischen Gleichgewicht bei. Bei anderen Organismen, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens* (Prior et al. 1987) und *Stichococcus bacillaris* (Wegmann 1986), kommt dem Sorbit als osmoadaptiver Substanz eine wichtige Funktion zu.

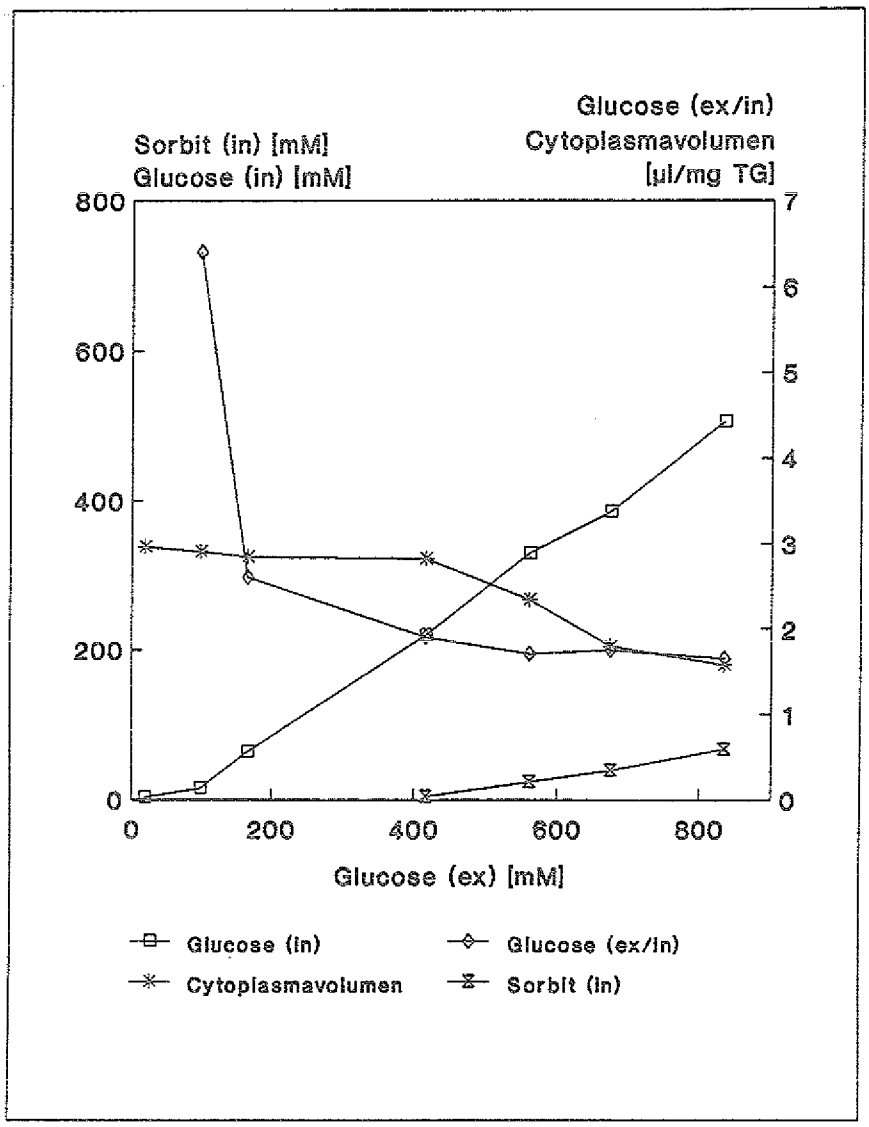


Abb. 3.2: Intrazelluläre Konzentrationen an Glucose und Sorbit in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Mediums.

Z. mobilis-Zellen wurden in Vollmedium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen (3-18 % (w/v)) kultiviert und bei einer Glucose-Aufnahmerate von 4,3±0,5 g/g/h der Silikonölzentrifugation unterworfen. Um gleiche Glucose-Aufnahmeraten zu erhalten, wurden *Z. mobilis*-Zellen bei 25°C (3-12 % (w/v) Glucose) bzw. 30°C (15-18 % (w/v) Glucose) kultiviert.

Von Zellen, die bei verschiedenen Glucosekonzentrationen gewachsen waren, wurden außerdem die intrazellulären Konzentrationen an Zuckerphosphaten bestimmt. Während in wachsenden

Zellen die Glucose-6-Phosphat-Konzentration bei 1 mM lag und nicht von der extrazellulären Glucosekonzentration abhängig war (Tab. 3.4), wurden von Algar und Scopes (1985) in ruhenden Zellen bzw. zellfreien Systemen Konzentrationen von bis zu 8 mM Glucose-6-Phosphat gemessen. Dabei nahm bei der zellfreien Gärung mit sinkender Glucosekonzentration auch die Glucose-6-Phosphat-Konzentration ab (Algar und Scopes 1985). Vergleicht man die Glucose-6-Phosphat-Konzentrationen der verschiedenen Systeme miteinander, so liegen erwartungsgemäß niedrigere Zuckerphosphatkonzentrationen in wachsenden Zellen vor.

Tab. 3.4: Bestimmung intrazellulärer Zuckerphosphatkonzentrationen in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und der Glucosekonzentration des Mediums

System	$Glucose_{ex}$ [mM]	$Glucose\text{-}6\text{-}P_{in}$ [mM]
Wachsende Zellen	92	1,1
	183	0,9
	276	1,3
Ruhende Zellen*	400	8,0

* nach Algar und Scopes (1985)

Die Fructose-6-Phosphat-Konzentrationen wachsender Zellen lagen im Bereich der Nachweisgrenze (≤ 0,5 mM). Diese Ergebnisse zeigen, daß Zuckerphosphate in *Z. mobilis* unbedeutend für das osmotische Gleichgewicht sind.

3.1.2. Einfluß unterschiedlicher Fructosekonzentrationen im Medium auf intrazelluläre Metabolitkonzentrationen

Zur Bestimmung intrazellulärer Fructose- und Sorbitkonzentrationen in Abhängigkeit von der Fructosekonzentration des Mediums wurden bei konstanter Fructose-Aufnahmerate q_s von 4,9 ± 0,6 g/g/h Cytoplasamvolumen-Bestimmungen durchgeführt. Aus Abbildung 3.3 ist ersichtlich, daß mit zunehmender Konzentration der extrazellulären Fructose eine deutliche Abnahme des Cytoplasmavolumens verbunden war (von 2,8 µl/mg TG auf 1,6 µl/mg TG). Vergleichbare Ergebnisse wurden für konzentrierte Glucoselösungen erzielt, was darauf schließen läßt, daß der osmotische Druck der Osmotika Glucose und Fructose in *Z. mobilis* nach demselben Prinzip ausgeglichen wird. Basierend auf den Daten der Cytoplasmavolumen-Bestimmung wurden die intrazellulären Metabolitkonzentrationen ermittelt (Abb. 3.3). Ähnlich wie bei Versuchen mit konzentrierten Glucoselösungen konnte gezeigt werden, daß bei Erhöhung der extrazellulären Fructosekonzentration oberhalb einer Konzentration von ca. 200 mM auch ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Fructosekonzentrationen zu verzeichnen war. Das Vorkommen intrazellulärer Fructosekonzentrationen mit osmoregulatorischer Wirkung war bislang von *Penicillium digitatum, P. janczewskii, Eurotium chevalieri, Xeromyces bisporus* und *Wallemia sebi* bekannt (Hocking und Norton 1983), bei denen äquimolare Glucose/Fructose-Gemische als Osmotikum eingesetzt wurden.

Erkennbar wurde weiterhin (Abb. 3.3), daß zwischen extra- und intrazellulären Konzentrationen ein Gradient bestand, der bei steigenden Fructosekonzentrationen geringer wurde. Es kam jedoch nicht zu einer Äquilibrierung zwischen extra- und intrazellulären Fructosekonzentrationen. War bei einer extrazellulären Fructosekonzentration von 207 mM der Quotient 3,6, so betrug er 1,8 bei einer extrazellulären Fructosekonzentration oberhalb 550 mM.

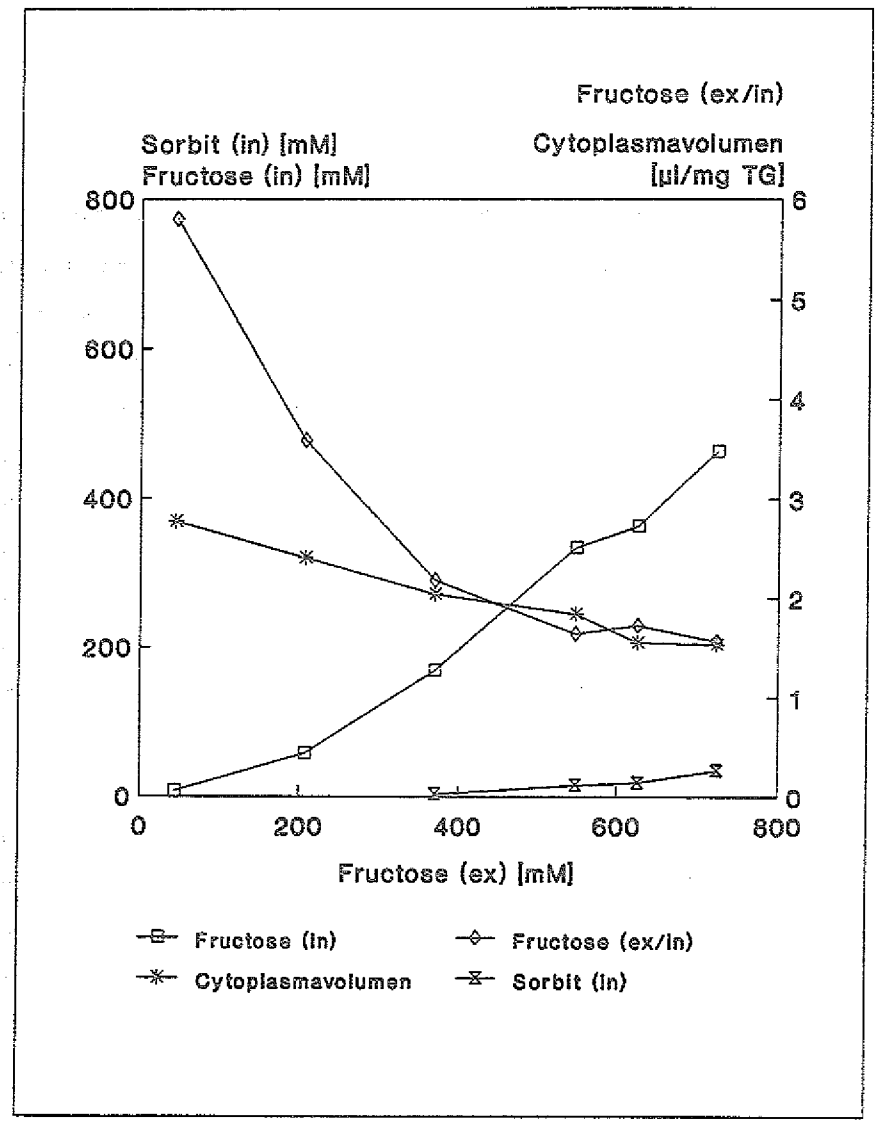


Abb. 3.3: Intrazelluläre Konzentrationen an Fructose und Sorbit in Abhängigkeit von der Fructosekonzentration des Mediums.

Z. mobilis-Zellen wurden in Vollmedium mit unterschiedlichen Fructosekonzentrationen (3 - 18 % w/v) kultiviert und bei konstanter Fructose-Aufnahmerate von 4,9±0,6 g/g/h zentifugiert. Um gleiche Fructose-Aufnahmeraten zu erhalten, wurden *Z. mobilis*-Zellen bei 25° C (3-12 % (w/v) Fructose) bzw. 30° C (15-18 % (w/v) Fructose) kultiviert.

Auch bei den mit Fructose kultivierten Zellen war die Konzentration an nichtphosphorylierter Fructose sehr gering. Mittels alkalischer Phosphatase konnte nachgewiesen werden, daß in den Extrakten oberhalb der Nachweisgrenze von 0,5 mM nicht Fruc-

tose-6-phosphat, sondern freie, nicht-phosphorylierte Fructose vorlag. Legt man ^{31}P-NMR-Untersuchungen von Barrow et al. (1984a) zugrunde, muß man von einer intrazellulären Fructose-6-phosphat-Konzentration von 0,5 - 0,95 mM ausgehen.

In den Perchlorsäure-Extrakten der auf Fructose gewachsenen Zellen konnte Sorbit nachgewiesen werden, wenn die extrazelluläre Fructosekonzentration 530 mM überstieg (Abb. 3.3). Demnach war das Vorhandensein intrazellulären Sorbits an eine Mindestkonzentration extrazellulärer Fructose gebunden.

Untersuchungen zur Nebenproduktbildung von *Z. mobilis* wurden durchgeführt, um deren Bedeutung für den osmotischen Ausgleich zu prüfen. Dazu dienten Batch-Fermentationen mit 15 % Glucose bzw. Fructose als C-Quelle. Im Gegensatz zur Glucose-Fermentation, bei der die Nebenproduktbildung im Bereich der Nachweisgrenze lag, konnten bei der Fructose-Fermentation am Ende der exponentiellen Wachstumsphase bis zu 54 mM Dihydroxyaceton und 20 mM Glycerin im Medium nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Außer Dihydroxyaceton und Glycerin (Viikari und Gisler 1986) wurde als weiteres Nebenprodukt der Fructose-Fermentation Mannit beschrieben (Viikari und Korhola 1986). Offenbar handelt es sich hierbei um eine stamm-spezifische Eigenschaft, die bei *Z. mobilis* ATCC 29191 nicht nachgewiesen werden konnte, jedoch für *Z. mobilis* VTT-E-78082 zutrifft.

Um die Bedeutung der Nebenprodukte für das osmotische Gleichgewicht abschätzen zu können, wurden unter Berücksichtigung der Cytoplasmavolumina, die bei hohen Fructosekonzentrationen des Mediums sehr niedrig (bis zu 1,8 µl/mg TG) waren, die intrazellulären Nebenproduktkonzentrationen gemessen. Abbildung 3.4 zeigt, daß bei Batch-Fermentationen mit Fructose als einziger C-Quelle die intrazellulären Konzentrationen von Glycerin und Dihydroxyaceton bis zu 35 % oberhalb der extrazellulären Konzentrationen lagen, demnach also wahrscheinlich nur langsam über die Cytoplasmamembran nach außen transportiert werden können. Unter diesen Bedingungen konnten also Nebenprodukte extra- und intrazellulär nachgewiesen werden, die Bedeutung von Glycerin und Dihydroxyaceton für den osmotischen Ausgleich der Zellen ist jedoch gering.

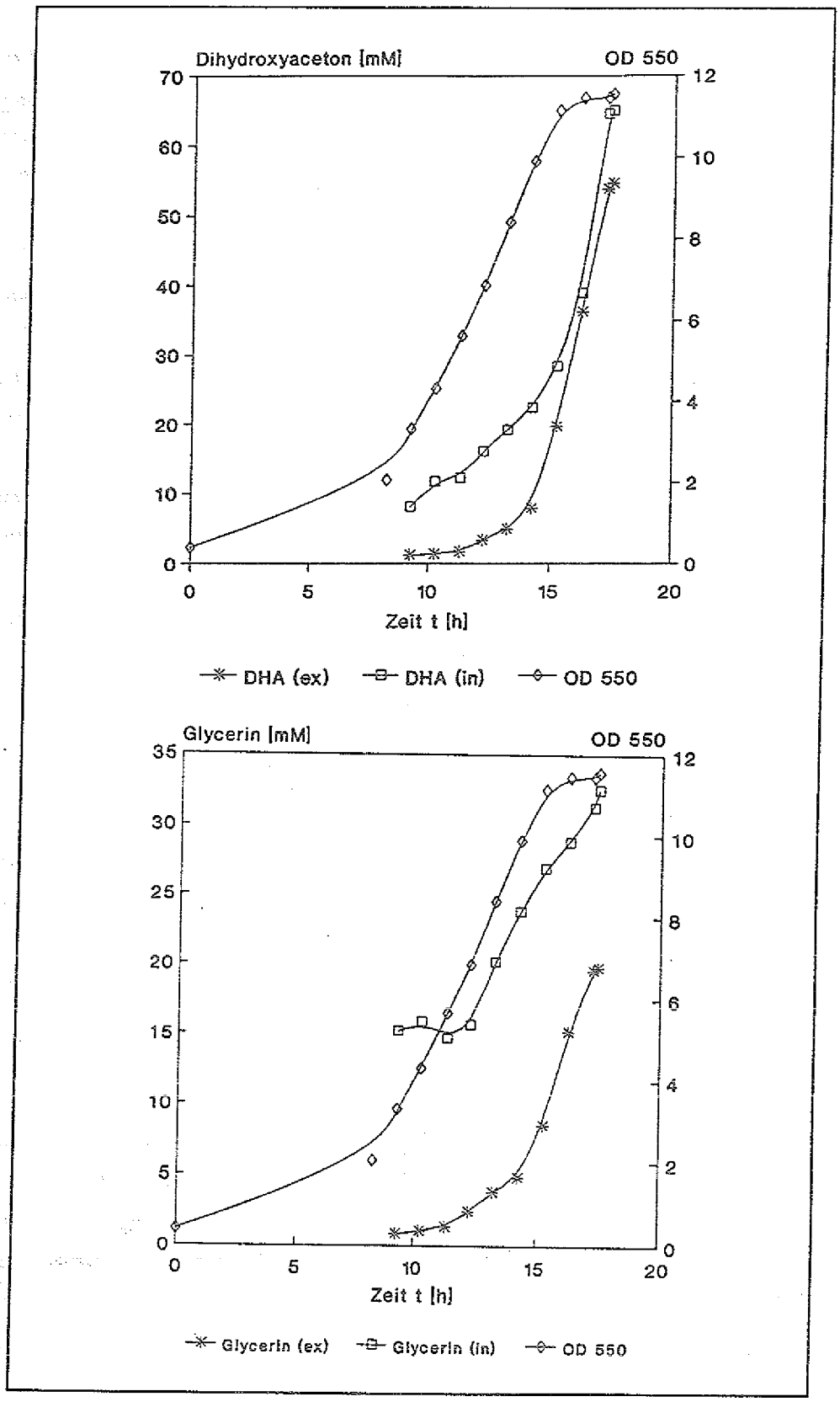


Abb. 3.4: Bestimmung extra- und intrazellulärer Nebenprodukte bei Fructose-Fermentationen von *Z. mobilis*.

Z. mobilis wurde im Vollmedium mit 15 % Fructose kultiviert. Die Fermetationen wurden pH-statisch im Fermenter durchgeführt. Die Cytoplasmavolumen-Bestimmung erfolgte mittels Silikonölzentrifugation.

Um Hinweise auf die Ursachen der Nebenproduktbildung bei Fructose-Fermentationen zu erhalten, wurden die Kohlenstoff-Bilanzen von Glucose- und Fructose-Fermentationen verglichen (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: C-Bilanz einer Glucose- und Fructose-Fermentation.

Batch-Fermentationen von *Z. mobilis* wurden im Medium mit je 15 % (w/v) Glucose bzw. Fructose durchgeführt. Durch Glucose-Metabolisierung entstehendes CO_2 wurde anteilmäßig in die C-Bilanz der Produkte eingerechnet, nicht jedoch der C-Anteil der Biomasse.

Substratverbauch	Glucose	Fructose
	845,4 mM	839,5 mM
Produkte	Konzentration [mM]	
Ethanol	1608,4	1571,2
Sorbit	2,1	3,9
Glycerin	1,1	24,9
Dihydroxyaceton	1,1	59,9
Acetoin	1,1	7,8
Acetat	2,5	8,3
Acetaldehyd	2,3	4,5
Lactat	2,2	2,0
Gluconsäure	0,4	≥0,4
C-Bilanz* (%)	95,1	93,6
Biomasse (%)	2,8	2,4
Ethanolausbeute [g/g]	0,49	0,45

* ohne Berücksichtigung der Biomasse

Aus Tabelle 3.5 wird deutlich, daß die Nebenproduktbildung bei Fructose-Fermentationen viel stärker als bei Glucose-Fermentationen ausgeprägt war. Abgesehen von Dihydroxyaceton und Glycerin konnten in weitaus geringeren Konzentrationen Acetoin und Lactat gefunden werden. Stellt man die C-Bilanzen aus beiden Fermentationen gegenüber, sind nur minimale Unterschiede erkennbar (95,1 bzw. 93,6 %). Ein vollständiger Ausgleich der C-Bilanz liegt nicht vor, da vermutlich die Acetaldehydkonzentration aus meßtechnischen Gründen unterbewertet ist. Deutlich erkennbar waren Unterschiede in der Biomasseproduktion, die bei Fructose-Fermentationen gegenüber Glucose-Wachstumsversuchen deutlich reduziert ist, was in Zusammenhang mit der Nebenproduktbildung steht (Dawes et al. 1966). Es ist wahrscheinlich, daß Dihydroxyaceton zusammen mit Acetaldehyd eine toxische Wirkung auf das Wachstum von *Z. mobilis*-Zellen ausübt (Viikari und Korhola 1986). Für die Biomasse wurde ein Anteil von 2,8 % bzw. 2,4 % am Gesamt-Kohlenstoff berechnet. Es ergaben sich keine deutlichen Hinweise auf die Existenz weiterer Nebenprodukte.

3.1.3 Untersuchung eines Fructose-Polymers

3.1.3.1 Eigenschaften des Fructose-Polymers

In Perchlorsäure-Extrakten aus Glucose-Fermentationen fanden sich unabhängig von den Fermentationsbedingungen konstante Fructosekonzentrationen von ca. 80 - 100 mM. Dieses Phänomen wurde in einer Reihe von Versuchen näher untersucht.

Um die Organismenspezifität zu untersuchen, wurden Perchlorsäure-Extrakte von *Escherichia coli* K-12 und *Z. mobilis* verglichen. Während bei *Z. mobilis* intrazellulär 86 mM Fructose nachgewiesen wurde, lag bei *E. coli* K-12 die intrazelluläre Fructosekonzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

Über die Verfügbarbeit der nach Perchlorsäure-Extraktion vorhandenen Fructose sollten Wachstumsversuche Hinweise liefern, bei denen nach Metabolisierung von Glucose als einziger C-Quelle *Z. mobilis*-Zellen in ein Vollmedium ohne C-Quelle überführt wurden. In Abhängigkeit von der Inkubationsdauer wurden Proben zur intrazellulären Metabolitbestimmung genommen und analysiert. Selbst nach 300 min Inkubationsdauer war keine Abnahme der Fructosekonzentration zu verzeichnen, was auf eine schlechte Verfügbarkeit bzw. Metabolisierung schließen ließ.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß mehrfaches Waschen der Zellen mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,5 bzw. 0,87 %iger Saline keinen Einfluß auf die Fructosekonzentration der Perchlorsäure-Extrakte hatte. Da sich Schleimschichten durch einfaches Waschen entfernen lassen (Duguid 1951), war daher auszuschließen, daß die in den Perchlorsäure-Extrakten meßbare Fructose einer bei *Z. mobilis* potentiell vorhandenen Schleimschicht entstammen könnte.

Um Hinweise auf den Säureeinfluß von Perchlorsäure auf das Vorhandensein von Fructose in den Extrakten zu erhalten, wurden verschiedene Zellaufschlußverfahren ohne Einsatz starker Säuren angewandt. Anstelle von 20 %iger Perchlorsäure wurden X-Presse-Aufschlüsse mit anschließender Protein-Denaturierung (Fällung mit 67 %igem Ethanol, Hitze-Denaturierung) durchgeführt. Den Daten der Tabelle 3.6 ist zu entnehmen, daß ohne Einfluß von starken Säuren (z.B. Ethanol-Extraktion, Hitze-Denaturierung) die Fructosekonzentrationen des X-Presse-Aufschlusses im Vergleich zu den in Perchlorsäure-Extrakten gemessenen Werten (85-100 mM) deutlich niedriger waren. Das gleiche Ergebnis wurde auch bei milder Perchlorsäure-Behandlung (5%ig) erreicht. Dagegen wurde bei Anwendung hoher Säurekonzentrationen (20%ige PCA, 2 N H_2SO_4) der für die Perchlorsäure-Extrakte gemessene Wert von 85-100 mM Fructose annähernd erreicht.

Tab. 3.6: Fructosekonzentrationen nach Zellaufschluß mit der X-Presse, Zentrifugation und Protein-Denaturierung.

Die Fructosekonzentrationen wurden so berechnet, daß sie mit den Werten der intrazellulären Metabolitbestimmung vergleichbar sind.

Methode	Fructosekonzentration [mM]	
	Überstand	Sediment
Ethanol (67%ig)	0,6	1,5
Hitze	0,4	2,6
PCA (20%ig)	7,3	53,6 - 86,5
(5%ig)	1,9	4,2
H_2SO_4 (2 N)	51,3*	

* Wert gilt für Zellaufschluß ohne anschließende Zentrifugation bei 48000 *g*

3.1.3.2. Lokalisation und Isolierung des Fructose-Polymers

Wie aus Tabelle 3.6 zur Bestimmung der Fructosekonzentrationen hervorgeht, ist für die nach Zellaufschluß und Protein-Denaturierung ermittelten Fructosekonzentrationen ein Säureeffekt verantwortlich. Um zu überprüfen, ob die Fructosekonzentrationen der Zellextrakte auf der Hydrolyse eines Fructose-Polymers beruhen, wurde versucht, ein solches Polymer zu isolieren. Dazu wurde nach erfolgtem X-Presse-Aufschluß zentrifugiert (48000 x *g*, 30 min), wobei man nach Perchlorsäure-Behandlung (20 %ig) im proteinfreien Überstand nur noch sehr geringe Fructosekonzentration (7,3 mM) wiederfand. Wenn das Sediment einer Perchlorsäure-Extraktion (20%ig) unterzogen wurde, wurden dagegen nahezu 8fach höhere Fructosekonzentrationen als beim Überstand erzielt (Tab. 3.6). Es sind also mindestens 85

% dieser konstitutiv intrazellulär bei *Z. mobilis* vorkommenden Fructose an Zellmembranen bzw. Zellpartikel gebunden.

Versuche zur Isolierung des Fructose-Polymers ergaben, daß es aus Zellen, die ausschließlich auf Glucose oder Fructose bzw. Saccharose (je 5 % w/v) gewachsen waren, extrahiert werden konnte. Zur Aufreinigung des Polymers (Abb. 3.5) wurde nach erfolgter Neutralisation des Extrakts und anschließender Zentrifugation der Überstand ausgiebig gegen Wasser dialysiert. Zur Quantifizierung wurde für ein Aliquot des Dialysats eine Differenzmessung der Fructose-Monomeren vor und nach Behandlung mit 20 %iger Perchlorsäure vorgenommen.

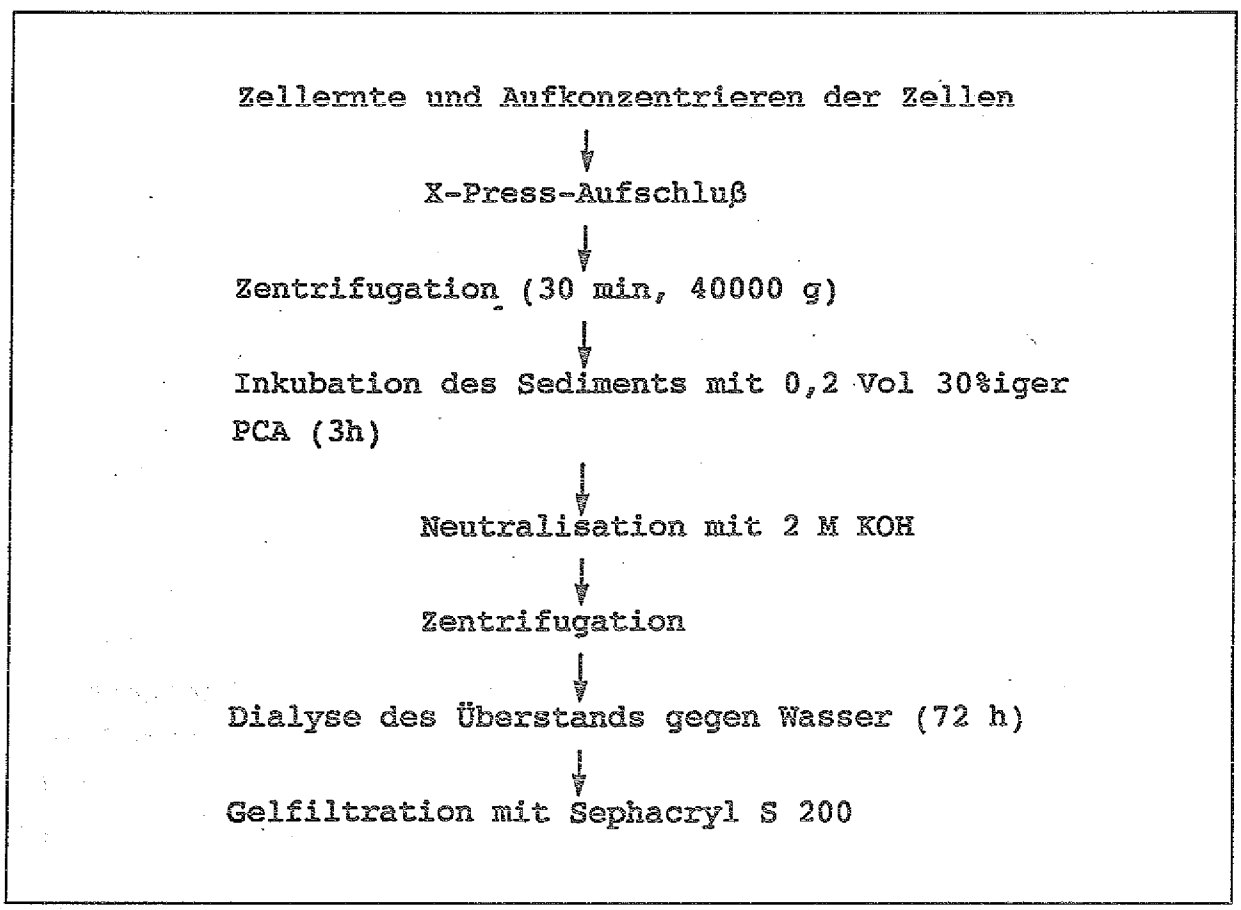


Abb. 3.5: Schematische Zusammenfassung von der Isolierung und Reinigung des Fructose-Polymers aus *Z. mobilis*.

Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration mit Sephacryl S 200 bestimmt. Dazu wurden Dextrine verschiedenen Molekulargewichts als Molekulargewichtsstandards benutzt. Für das Fruc-

tose-Polymer wurde ein Molekulargwicht von mindestens 12-14000 Da ermittelt. Diese Ergebnisse, die mit Daten von Barrow et al. (1984c) übereinstimmen, zeigen, daß die in Perchlorsäure-Extrakten von *Z. mobilis* vorhandene Fructose aus einem säurelabilen Fructose-Polymer stammt, das membrangebunden vorliegt und vermutlich nicht als C-Quelle verwertbar ist.

Versuche von Barrow et al. (1984c) zur Strukturaufklärung dieses Polymers ergaben, daß es sich um ein β-(2-6) Fructose-Polymer handelt, für das die Struktur α-Fructofuranosyl-(2-1)-β-fructofuranosyl-(2-6) vorgeschlagen wurde.

3.1.3.3 Biogenese der intrazellulären Fructose

Da aus technischen Gründen fructosefreie Glucose nicht verfügbar ist, lagen im Medium mit Glucose auch geringe Fructosekonzentrationen vor. Hinsichtlich der Herkunft der intrazellulären im Polymer gebundenen Fructose sind daher zwei Möglichkeiten denkbar:

a) enzymatische Isomerisierungsreaktionen
b) Akkumulation von Fructose aus dem Medium
   (Ursache: Verunreinigung der Glucose mit Fructose)

Zur Unterscheidung beider Möglichkeiten wurden batch-Versuche mit 5% (w/v) Glucose und [U-^{14}C]-Fructose durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Batch-Fermentation wurden Proben genommen, der Silikonölzentrifugation unterworfen und die Extrakte dünnschichtchromatographisch getrennt. Während der exponentiellen Phase des Wachstums wurden aus dem mit Fructose verunreinigten Glucose-Medium keine signifikanten Konzentrationen an Fructose akkumuliert (Tab. 3.7). Nach vollständiger Metabolisierung der Glucose wurde die im Medium als Verunreingung vorliegende Fructose größtenteils aufgenommen und verstoffwechselt. Die zu diesem Zeitpunkt (Tab. 3.7, Probe 3) intrazellulär vorliegende ^{14}C-Fructose-Konzentration war zwar gegenüber Probe 1 um den Faktor 5 erhöht, machte aber nur 0,5 % der gesamten intrazellulär vorhandenen Fructose aus. Demnach

ist für den Aufbau und die Aufrechterhaltung des "Fructose-Pools" keine spezifische Akkumulation von Fructose aus dem Medium verantwortlich, sondern vermutlich Isomerisierungreaktionen auf der Ebene der Zuckerphosphate, da diese auch als Vorstufen für die Synthese eines Fructose-Polymers in Frage kämen.

Tab. 3.7: Batch-Fermentation mit 5 % (w/v) Glucose und 2,4 mM [U-^{14}C]-Fructose zur Untersuchung der spezifischen Fructose-Akkumulation aus dem Medium.

Einer *Z. mobilis*-Kultur auf Glucose (5 % w/v) wurde 2,4 mM [U-^{14}C]-Fructose (1 µCi; 270 µCi/µmol) hinzugefügt. In Abhängigkeit von der extrazellulären Glucosekonzentration wurden Proben zur Silikonölzentrifugation entnommen, deren Extrakte durch Einsatz von Glucose-Oxidase glucosefrei wurden. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung wurden die spezifisch angefärbten Substanzflecken ausgekratzt und die counts im Szintillationszähler vermessen. Daraus wurde die aus dem Medium aufgenommene Fructosekonzentration errechnet. Diese Werte stehen in Relation zu den intrazellulären Fructosekonzentrationen, die von Extrakten einer Parallelkultur ohne Zusatz von [U-^{14}C]-Fructose bestimmt wurden.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Glucose [mM] Überstand	227,1	132,9	-
^{14}C-Fructose [mM] Überstand	2,4	2,2	0,4
aus dem Medium aufgenommene ^{14}C-Fructose [mM]	0,09	0,08	0,48
Intrazell. Fructose [mM] des PCA-Extrakts	83,6	84,9	94,8
TG [mg/ml]	3,87	9,27	13,68

3.1.4. Einfluß unterschiedlicher Glucose-/Fructose-konzentrationen im Medium auf intrazelluläre Metabolit-konzentrationen

Bei den Untersuchungen zur Toleranz von *Z. mobilis* gegenüber konzentrierten Glucose-/Fructoselösungen wurden ebenso intrazelluläre Metabolitbestimmungen in Relation zur extrazellulären Zuckerkonzentration durchgeführt. Um ungeachtet der unterschiedlich hohen Zuckerkonzentration (3-18 % w/v) vergleichbare Bedingungen für alle Fermentationen zu gewährleisten, wurden sämtliche intrazellulären Bestimmungen bei einer Glucose-Aufnahmerate von 4,2 ± 0,5 g/g/h durchgeführt. Glucose aus einem Glucose/Fructose-Gemisch wird gegenüber Fructose bevorzugt verstoffwechselt (Viikari 1984); für Fructose wurde damit übereinstimmend eine deutlich niedrigere Aufnahmerate von 1,7 g/g/h festgestellt. Die für die Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen erforderlichen Cytoplasmavolumen-Bestimmungen ergaben, daß mit steigender Zuckerkonzentration des Mediums und damit auch mit zunehmender Osmolalität die Cytoplasmavolumina von 2,9 µl/mg TG (20 g/l) auf 1,6 µl/mg TG (140 g/l) reduziert wurden. Aus Abbildung 3.6 geht hervor, daß mit Erhöhung der extrazellulären Glucose- und Fructosekonzentration ein entsprechender Anstieg in den intrazellulären Konzentrationen einherging. Vergleicht man die intrazellulären Glucosekonzentrationen der Glucose/Fructose-Fermentation mit denen der Glucose-Fermentationen, weisen die internen Konzentrationen der Fermentationen mit einem äquimolaren Glucose/Fructose-Gemisch geringere Glucosekonzentrationen auf als beim Ansatz mit ausschließlich Glucose. Ein Vergleich des Verhältnisses extra- und intrazellulärer Fructosekonzentrationen ergab kleinere Werte für den Fructose-Gradienten als für den Glucose-Gradienten, was sehr wahrscheinlich auf die niedrigere Stoffwechselaktivität mit Fructose zurückzuführen ist. Bei extrazellulären Glucosekonzentrationen unterhalb 7 g/l wurde Fructose mit hoher Rate verstoffwechselt, was mit Ergebnissen von Barrow et al. (1984b) in Einklang steht. Unter diesen Bedingungen wurde die Fructokinase nicht mehr vollständig durch Glucose inhibiert.

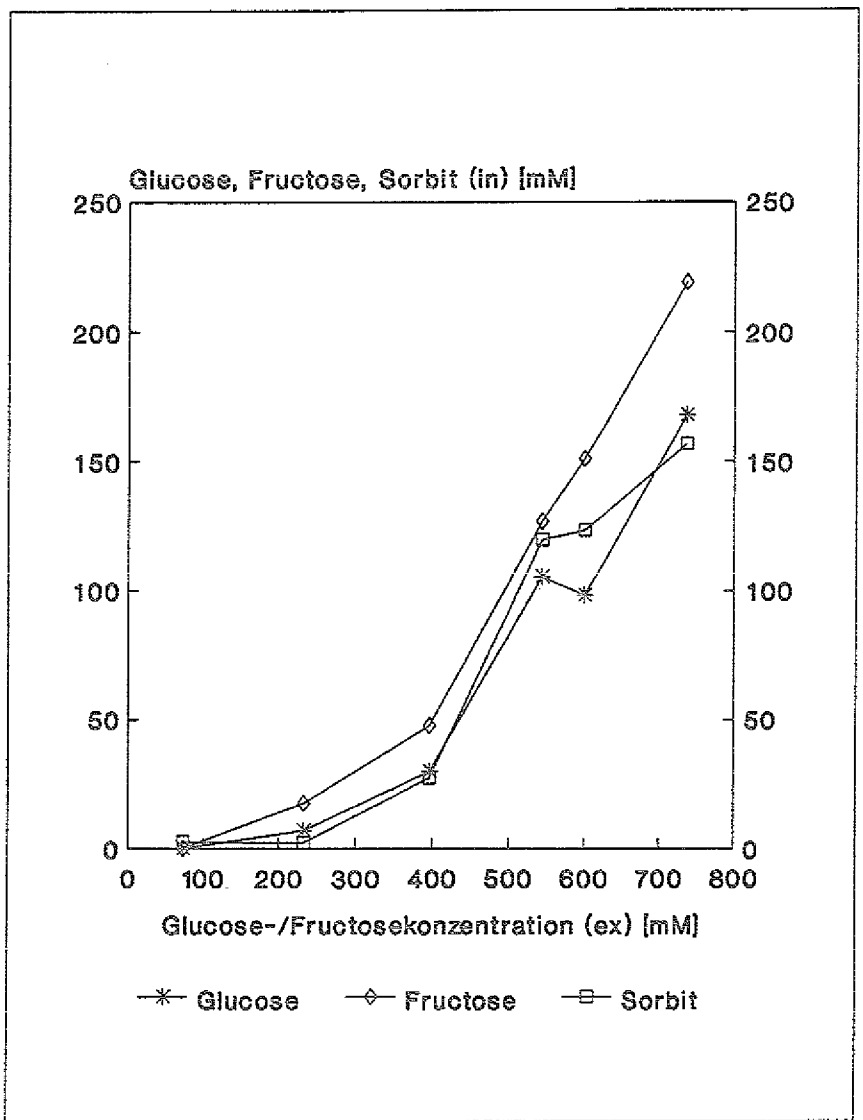


Abb. 3.6: Intrazelluläre Konzentrationen von Glucose, Fructose und Sorbit in Abhängigkeit von den Glucose-/Fructose-Konzentrationen des Mediums.

Z. mobilis-Zellen wurden in Vollmedium mit unterschiedlichen Glucose- und Fructosekonzentrationen (je 1,5 - 9 % w/v) kultiviert und bei einer konstanten Glucose-Aufnahmerate von 4,2±0,5 g/g/h zentrifugiert. Um gleiche Zucker-Aufnahmeraten zu erhalten, wurden *Z. mobilis*-Zellen bei 25°C (1,5 - 6 % w/v) bzw. 30°C (7,5 - 9,5 % w/v) kultiviert.

Oberhalb einer Gesamtzuckerkonzentration von ca. 400 mM waren hohe intrazelluläre Sorbitkonzentrationen vorhanden, wobei die intrazellulären Konzentrationen die extrazellulären deutlich übertrafen (Tab. 3.8). So betrug die intrazelluläre Sorbitkonzentration z.B. 157 mM bei einer Gesamtzuckerkonzentration von 737 mM. Damit trägt unter diesen Bedingungen der Zuckeralkohol Sorbit in weitaus größerem Ausmaß zur osmotischen Stabilisierung bei als dies bei den Fermentationen mit ausschließlich Glucose bzw. Fructose der Fall war.

Tabelle 3.8: Bestimmung extra- und intrazellulärer Sorbitkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration des Mediums.

$Glucose_{ex}$ [mM]	$Fructose_{ex}$ [mM]	$Sorbit_{ex}$ [mM]	$Sorbit_{in}$ [mM]	$Sorbit_{ex/in}$
11,2	61,2	8,4	2,6	3,23
92,0	140,9	11,0	2,4	4,58
168,2	227,8	13,2	27,5	0,48
252,5	291,6	15,1	119,8	0,13
242,8	357,4	28,6	123,4	0,23
312,8	423,8	41,5	156,7	0,26

3.2 Untersuchungen zum Zuckertransport bei *Z. mobilis*

3.2.1 Untersuchungen zum Glucosetransport

Legt man die aus den Batch-Fermentationen erhaltenen Daten der spezifischen Glucose-Aufnahmerate q_s und der intrazellulären Glucosekonzentrationen zugrunde, stellt sich die Frage, ob der

Glucosetransport limitierend für den Glucose-Metabolismus sein kann. Daher wurde versucht, Hinweise auf den Mechanismus und die kinetischen Daten der Glucose-Aufnahme bei *Z. mobilis* zu erhalten. Wie aus Abbildung 3.7 zu ersehen ist, handelt es sich um ein sehr schnelles Glucose-Transportsystem, durch das Glucose innerhalb weniger Sekunden in die Zelle gelangt und nach Di Marco und Romano (1985) dort Konzentrationen erreicht, die denen außerhalb der Zelle nahekommen.

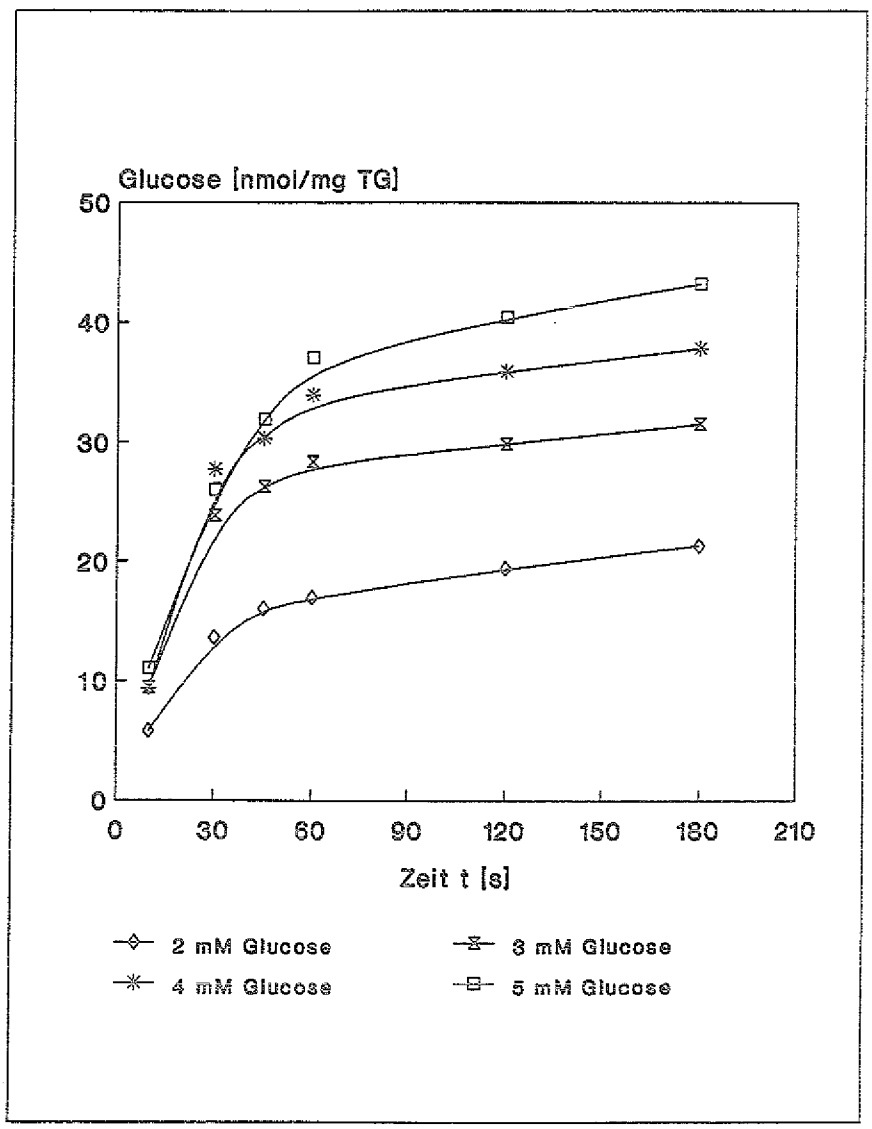


Abb. 3.7: Bestimmung von Glucose-Transportraten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Die Aufnahmekinetik von 2-5 mM [U-^{14}C] Glucose (0,2 µCi; 286 µCi/µmol) wurde in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5 mit 1 mM $MgCl_2$ durchgeführt. *Zymomonas mobilis*-Zellen wurden im Vollmedium mit 5% (w/v) Glucose kultiviert.

Zudem konnte gezeigt werden, daß der Transport von Glucose konstitutiv ist, da Zellen, die im Vollmedium sowohl mit Glucose als auch mit Fructose kultiviert wurden, gleiche Transportraten für Glucose lieferten.

Durch Einsatz verschiedener Inhibitoren und Substratanaloga sollte die Energieabhägigkeit und Spezifität des Glucose-Transportsystems charakterisiert werden. Es wurden Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP), 2-Desoxyglucose, Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Phloretin und Cytochalasin B eingesetzt. Im Vergleich zur Kontrolle enthielt der Inkubationsansatz 15 mM ^{14}C-Glucose und 2 mM Inhibitor oder 0,1 mM CCCP (Endkonzentrationen).

Bislang lagen keine Hinweise auf eine Energieabhängigkeit des Glucose-Transportsystems von *Z. mobilis* vor (Romano et al. 1979). Auch in der vorliegenden Arbeit hatte der Einsatz von 0,1 mM CCCP als Protonophor keinen Einfluß auf die Glucose-Aufnahmerate. Substratanaloga, wie z.B. 2-Desoxy-D-glucose bzw. Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, hemmten ebenfalls die Glucose-Aufnahmerate nicht. Auch die bei eukaryontischen Glucose-Transportsystemen wirksamen Inhibitoren Phloretin und Cytochalasin B (Maenz und Cheeseman, 1987; Uezato und Fujita, 1988) verursachten keine Hemmung des Glucose-Transports von *Z. mobilis*. Um zu überprüfen, ob Fructose als Substratanalogon ein wirksamer Inhibitor des Glucose-Transportsystems ist, wurden zu jeder Substratkonzentration (5, 7, 10, 15 bzw. 20 mM Glucose) 3 bzw. 30 mM Fructose zugegeben. Obwohl die Fructosekonzentration bis zum 6 fachen über der Glucosekonzentration lag, wurde kein Einfluß auf den Glucosetransport verzeichnet. Von Di Marco und Romano (1985) durchgeführte Glucose-Transportversuche mit einem 20fachen Überschuß an Fructose zeigten ebenfalls nur eine sehr geringe Hemmung. Bei diesen Arbeiten war die Aufnahmerate im Langzeitexperiment bei einem 20fachen Überschuß an Fructose um 12-15 % reduziert im Vergleich zur Kontrolle ohne Fructose-Zusatz.

Zusätzlich konnten Di Marco und Romano (1985) counterflow und Stereospezifität für das Glucose-Transportsystem aufzeigen. Eigene Ergebnisse, sowie die von Di Marco und Romano (1985)

zeigen, daß es sich um ein konstitutives, stereospezifisches, trägervermitteltes Glucose-Transportsystem handelt, das Glucose mit hohen Transportraten transportiert.

Um weitere Hinweise über den Mechanismus des Glucosetransports zu erhalten, wurde der Efflux von Glucose untersucht. Bei *Z. mobilis* konnte ein sehr rasch verlaufender Efflux beobachtet werden, der allerdings aus versuchstechnischen Gründen kinetisch nicht auflösbar war. Das gleiche Phänomen wurde bei Effluxversuchen mit einer Hexokinase-negativen *Saccharomyces cerevisae*-Mutante festgestellt (Lang und Cirillo 1987).

Zur Ermittlung der maximalen Kapazität des Glucose-Transportsystems wurden Transportversuche mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen (1 - 14 mM) durchgeführt. Trägt man die Transportgeschwindigkeit gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen auf, erhält man eine Sättigungskinetik, wie sie für enzymkatalysierte Reaktionen bekannt ist (Abb. 3.8). Aus dem daraus gewonnenen Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 3.9) wurde ein apparenter K_M-Wert von 11 mM und ein apparenter V_{Max}-Wert von 220 nmol/min∘mg TG bestimmt. Dies stimmt mit Ergebnissen von Di Marco und Romano (1985) überein, die ähnliche Werte (K_M = 5 mM, V_{Max} = 330 nmol/min∘mg Protein) bei dem *Z. mobilis* Stamm CP4 und der Glucokinase-negativen Mutante CP4-M2 erhielten.

Unter Berücksichtigung der gemessenen spezifischen Glucose-Aufnahmerate q_s, ermittelt aus in vivo-Versuchen, muß jedoch eine mindestens 4fach höhere Glucose-Aufnahmerate postuliert werden. Bereits Belaich et al. (1968) bestimmten bei *Z. mobilis* mit Hilfe kalorimetrischer Methoden einen Glucoseumsatz von 816 nmol/mg TG∘min in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Transportmessungen und den in vivo ermittelten q_s-Werten kann wie folgt erklärt werden: Die schnelle Änderung der Anfangskonzentrationen bei Transportmessungen mit niedrigen Zuckerkonzentrationen im Testansatz ist mit der gewählten Technik nicht auflösbar.

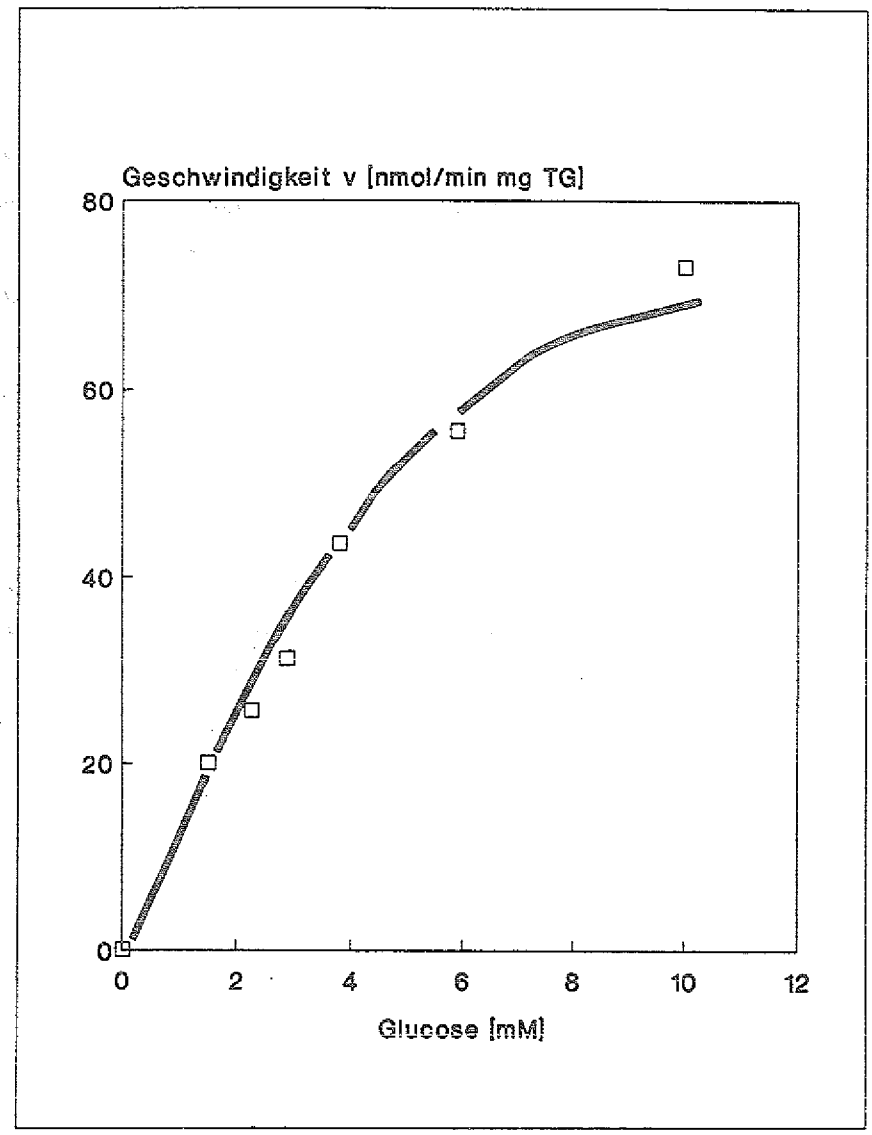


Abb. 3.8: Abhängigkeit der Glucose-Transportgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Z. mobilis wurde im Vollmedium mit 5% (w/v) Glucose kultiviert. Die im Testansatz vorgelegten Substrat-Konzentrationen betrugen 1 - 14 mM (0,2 µCi; 286 µCi/µmol).

Stattdessen wird sehr schnell (5 - 8 s) ein Fließgleichgewicht erreicht, in dem der gemessene Netto-Transport durch die Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmt wird. Bei einer sehr schnellen Äquilibrierung, wie sie bei diesem Glucose-Transportsystem vorliegt, darf die Effluxrate von Glucose aus den Zellen nicht unberücksichigt bleiben.

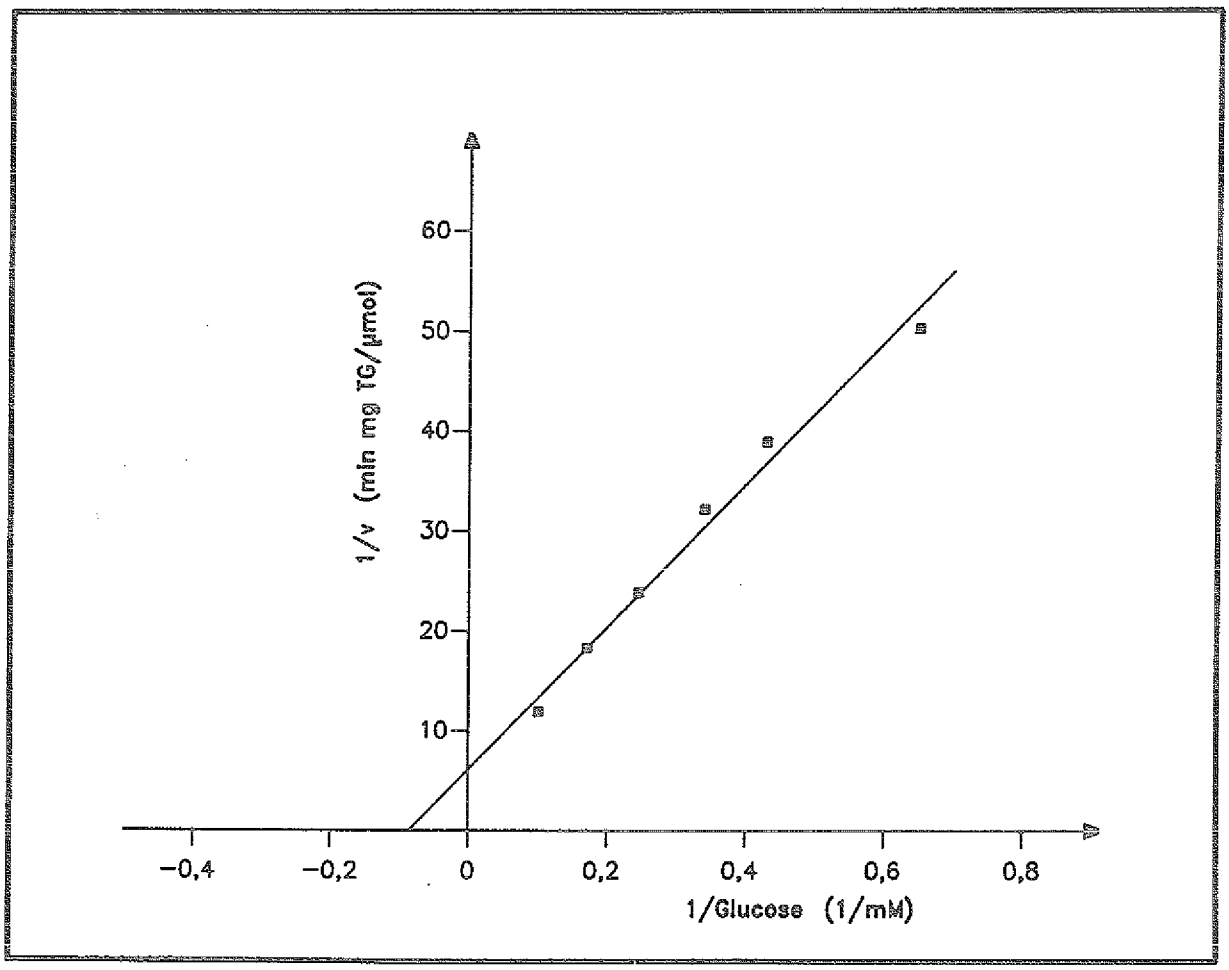


Abb. 3.9: Bestimmung der kinetischen Daten der Glucose-Aufnahme bei *Z. mobilis*.

Die Glucosekonzentrationen im Testansatz betrugen 1 - 50 mM (0,2 µCi). *Z. mobilis*-Zellen wurden in Vollmedium mit 5% (w/v) Glucose kultiviert.

Für die Bestimmung der Netto-Aufnahmerate ergibt sich für die hier durchgeführten Transportmessungen nach Cirillo (1968) folgender Zusammenhang:

$$V_{netto} = \frac{V_{Max} \cdot K_M (S_o - S_i)}{(S_o + K_M)(S_i + K_M)}$$

S_o = extrazelluläre Substratkonzentration
S_i = intrazelluläre Substratkonzentration

Wird die Substratkonzentration S_o gegenüber dem K_M-Wert deutlich erhöht, nimmt der V_{netto}-Wert stark ab. Der gegensätzliche Effekt tritt ein, wenn S_o gegenüber dem K_M-Wert klein wird. Allerdings bleibt bei dieser mathematischen Annäherung zur Beschreibung der Kinetik bei der erleichterten Diffusion eine weitere treibende Kraft unberücksichtigt, nämlich die Stoffwechselaktivität (gemessen als spezifische Glucose-Aufnahmerate q_s).

Die Stoffwechselaktivität der Zellen wird durch die Waschschritte (3 maliges Zentrifugieren und anschließende Resuspension im 50 mM MES- bzw. Kaliumphosphat-Puffer) so stark gesenkt, daß die gemessene Aufnahmerate nur noch 1/4 der normalen Rate unter Fermenterbedingungen mit Vollmedium ausmacht. Dies zeigten Versuche zur Kultivierung von Zellen in 50 mM MES-Puffer pH 6,0 nach erfolgter 3-maliger Zentrifugation. Diese Zellen erreichten lediglich eine maximale Glucose- Aufnahmerate von 3,1 g/g/h (= 287 nmol/min•mg TG, vgl. V_{Max} Transport von Glucose: 220 nmol/min•mg TG) und eine Produktivität von 1,44 g/g/h (Abb. 3.10). Diese Sachverhalte erklären die Unterbewertung der maximalen apparenten Transportgeschwindigkeit für Glucose.

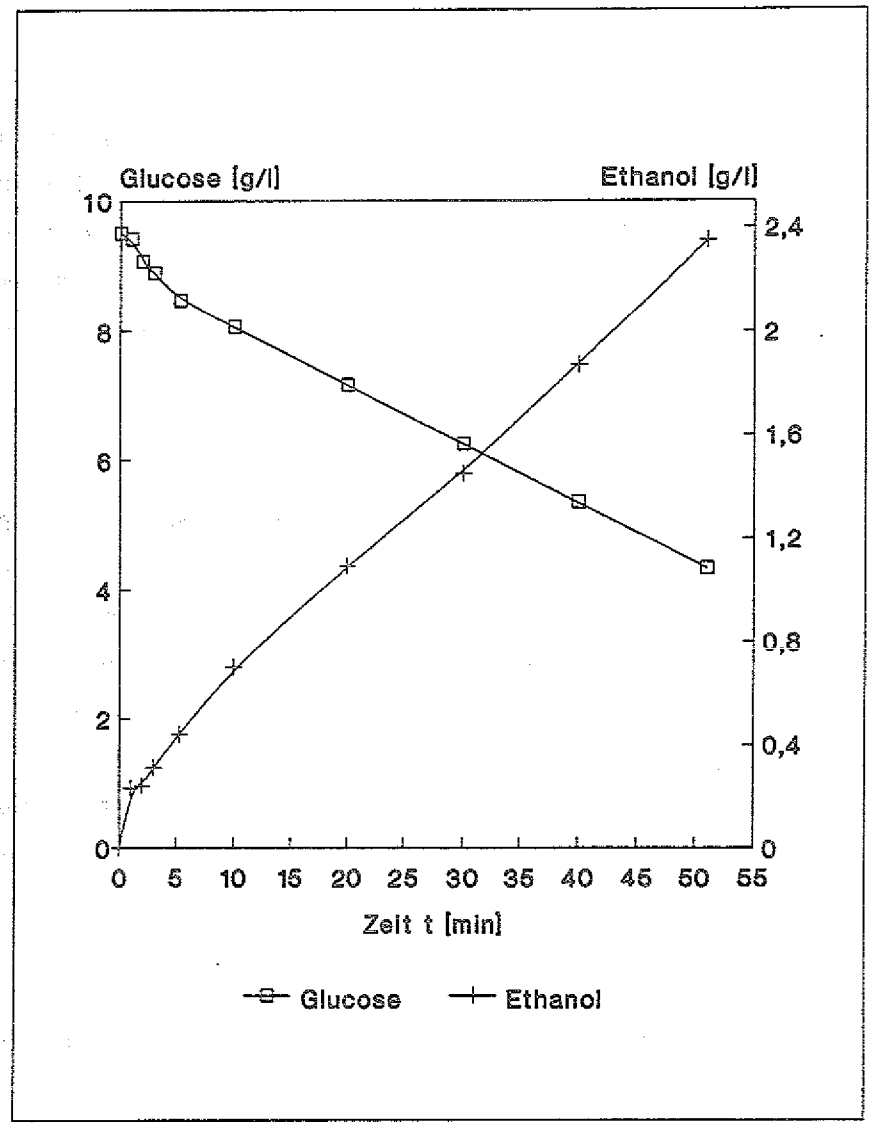


Abb. 3.10: Bestimmung der Glucose-Aufnahmerate und Ethanol-Produktivität von *Z. mobilis*-Zellen in MES-Puffer.

Die Kultivierung von *Z. mobilis*-Zellen wurde in 50 mM MES-Puffer, pH 6,0, 1 mM $MgCl_2$ und 5 % (w/v) Glucose nach dreimaligem Waschen der Zellen durchgeführt.

3.2.2 Untersuchungen zum Fructosetransport

Da *Z. mobilis* auch Fructose mit hoher Rate aufnimmt (10,4 g/g/h, Rogers et al. 1982; Lee et al. 1981) und hohe intrazelluläre Fructose-konzentrationen in der Zelle vorliegen, waren Untersuchungen zum Fructosetransport von Interesse. Um dabei durch den Katabolismus von Fructose bedingte Einflüsse ausschalten zu können, wurde zusätzlich mit einer Fructokinase-negativen Mutante gearbeitet.

Abbildung 3.11 zeigt, daß die Aufnahme von Fructose mit großer Geschwindigkeit erfolgt, so daß nach 20 s Inkubationsdauer der Fructose-Einstrom fast beendet war. Vergleicht man die gemessenen Fructose-Aufnahmeraten mit denen der Glucose, so ergibt sich jedoch für das Glucose-Transportsystem eine mindestens um den Faktor 2,5 höhere Aufnahmerate als für dasjenige von Fructose. In Analogie zum Glucosetransport konnte gezeigt werden, daß es sich um ein konstitutives Fructose-Transportsystem handelt, das also sowohl bei mit Glucose und mit Fructose gezogenen Zellen gleiche Transportraten lieferte.

Von den untersuchten Inhibitoren wirkte nur Glucose hemmend auf den Fructosetransport. Versuche mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (3 bzw. 20 mM Glucose) und variierenden Substratkonzentrationen (3, 6,7, 12,5, 20, 50 mM Fructose) ergaben eine Hemmung des Fructosetransports (Tab. 3.9). Dabei wurde bei hohen Glucosekonzentrationen ein besonders deutlicher Hemmeffekt erzielt. Langzeit-Experimente (0 - 12 Minuten Inkubationsdauer) von Di Marco und Romano (1985) ergaben ebenfalls einen stark inhibierenden Einfluß bei einem 20fachen Glucose-Überschuß.

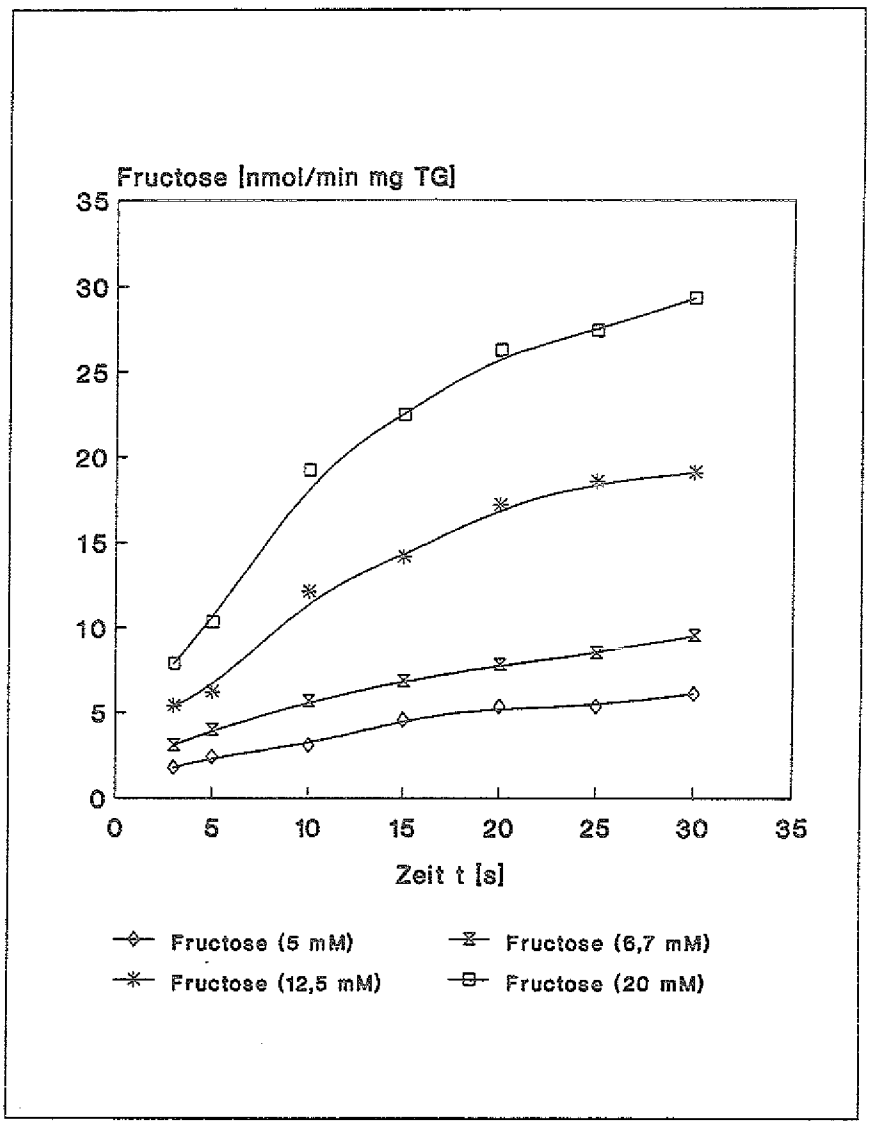


Abb. 3.11: Fructose-Aufnahmeraten bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

Zur Bestimmung der Aufnahmekinetik wurden 5-20 mM [U-^{14}C]-Fructose (0,2 µCi; 270 µCi/µmol) in 50 mM MES-Puffer, pH 6,0 mit 1 mM $MgCl_2$ eingesetzt. *Z. mobilis*-Zellen wurden in Vollmedium mit 5 % (w/v) Fructose kultiviert.

Tab. 3.9: Fructose-Aufnahme bei verschiedenen Glucosekonzentrationen im Testansatz.

Z. mobilis-Zellen wurden mit 3-50 mM [U-^{14}C]-Fructose (0,2 µCi; 270 µCi/µmol) inkubiert (Kontrolle) und zusätzlich mit 3 bzw. 20 mM Glucose als Inhibitor versetzt.

Inkubationszeit [s]	Fructose-Aufnahmerate [nmol/mg TG]		
	6,7 mM Frc	6,7 mM Frc + 3 mM Glc	6,7 mM Frc + 20 mM Glc
3	2,9	2,2	1,6
7	4,8	3,0	2,2
10	5,8	4,2	2,6
12	6,3	4,9	2,9
15	7,1	5,4	3,3
20	7,8	6,1	3,7
25	8,9	7,1	4,0

Wegen der hohen Fructose-Innenkonzentrationen wurde auch die Kinetik des Fructosetransports untersucht. Dazu wurde die Fructose-Aufnahmerate in Abhängigkeit von der Fructosekonzentration des Inkubationsansatzes gemessen. Aus Abbildung 3.12 ist zu ersehen, daß die Fructose-Aufnahmegeschwindigkeit einer Sättigungskurve folgt - analog enzymkatalysierten Reaktionen -, was auf das Vorhandensein eines Transport-Proteins hinweist.

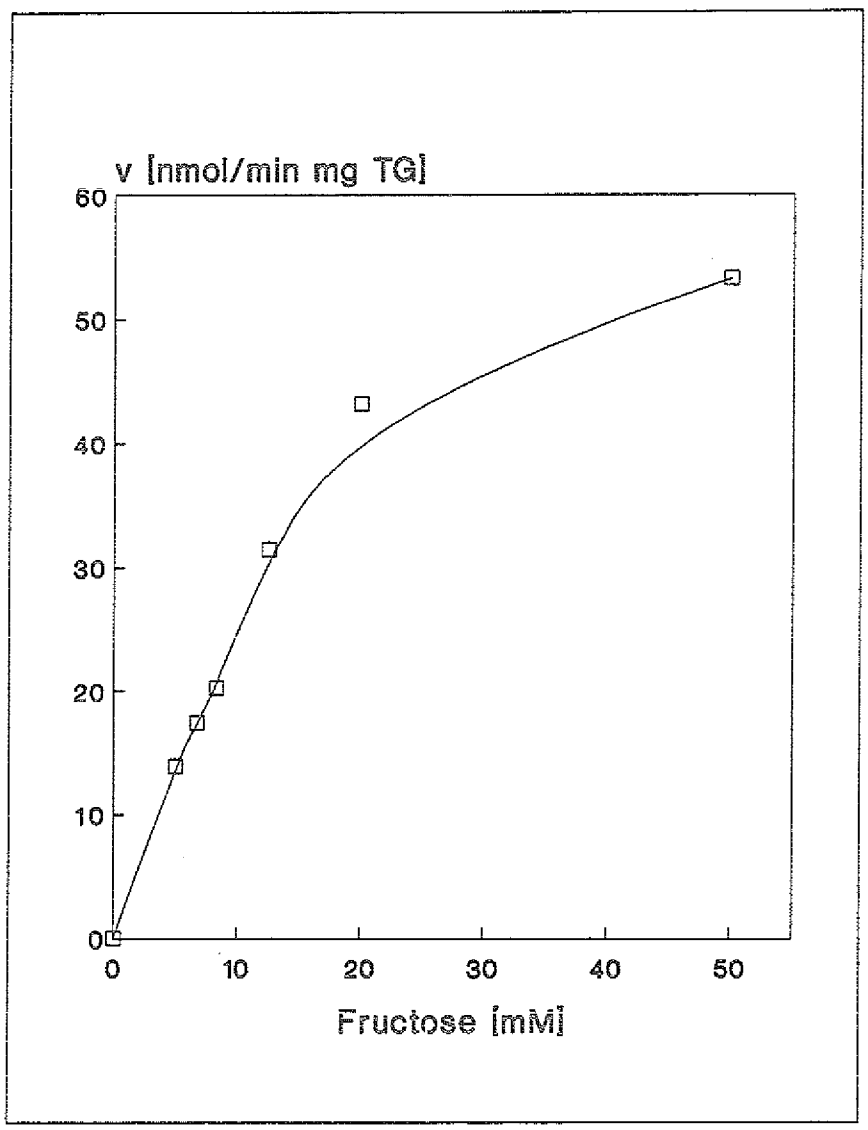


Abb. 3.12: Abhängigkeit der Fructose-Transportgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Z. mobilis wurde in Vollmedium mit 5 % (w/v) Glucose kultiviert. Die im Testansatz vorgelegten Substratkonzentrationen betrugen 3-50 mM (0,2 µCi; 270 µCi/µmol).

Die Auftragung der reziproken Werte von der Aufnahmegeschwindigkeit und Substratkonzentration im Lineweaver-Burk-plot (Abb. 3.13) ergab eine maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} von 90 - 110 nmol/min•mg TG und einem K_M-Wert von 27-30 mM Fructose. Vergleicht man den V_{Max}-Wert mit der in den Batch-Fermentationen gemessenen Fructose-Aufnahmerate q_s (962 nmol/

min•mg TG), so ist die maximale in vitro-Transportkapazität unterbewertet. Die Ursachen dieser Unterbewertung sind wahrscheinlich die gleichen wie für die Glucose-Transportversuche.

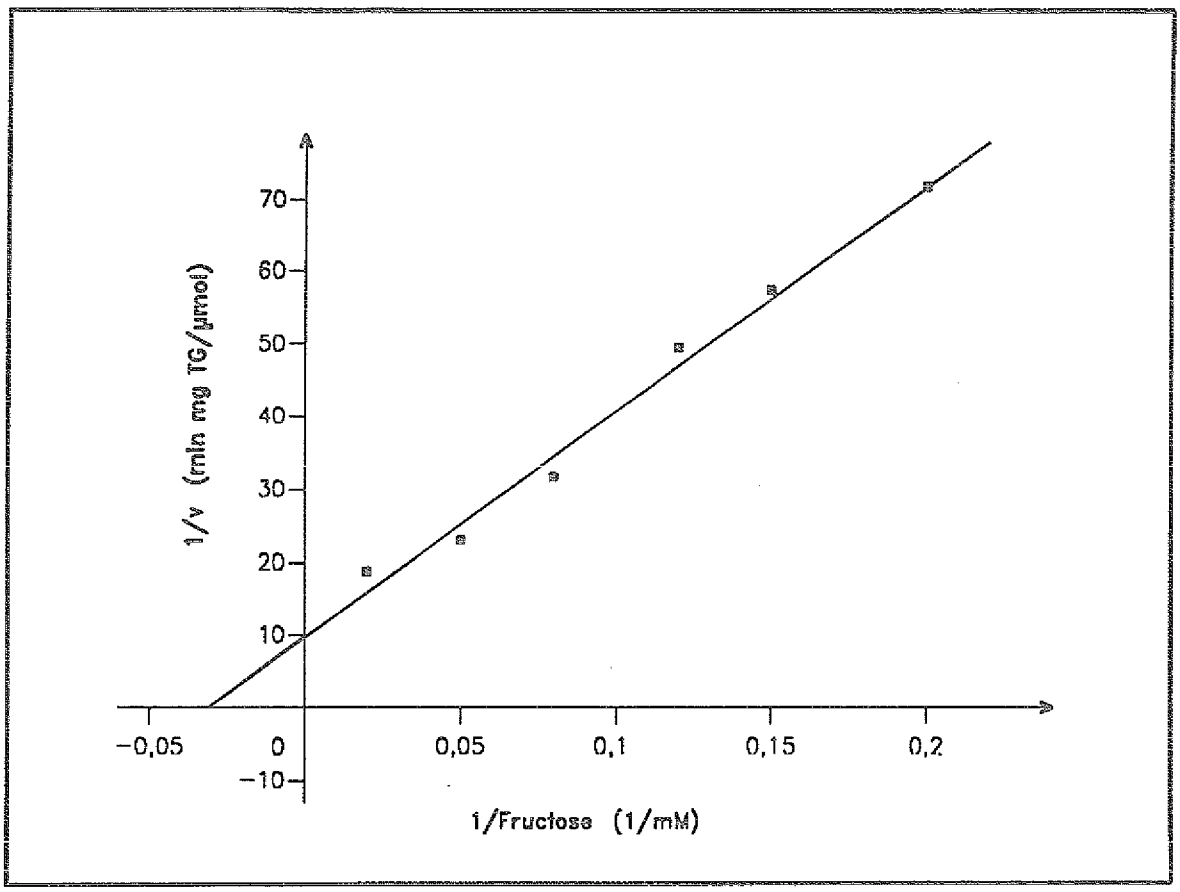


Abb. 3.13: Lineweaver Burk-Auftragung der kinetischen Daten des Fructosetransports bei *Z. mobilis*.

Die Fructosekonzentrationen im Testansatz betrugen 5 - 50 mM (0,2 µCi). *Z. mobilis*-Zellen wurden im Vollmedium mit 5 % (w/v) Glucose kultiviert.

3.3 Einfluß von Xylose und Maltose auf Wachstum und Cytoplasmavolumen

Der Einfluß transportierbarer und nicht-transportierbarer Zucker auf das Wachstum und die Cytoplasmavolumina von *Z. mobilis* wurde untersucht, um durch osmotische Gradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum Hinweise auf osmoregulatorische Mechanismen zu erhalten. Aus diesem Grunde wurden bei *Z. mobilis* zunächst Zucker hinsichtlich ihrer Transportierbarkeit und Metabolisierbarkeit getestet.

3.3.1 Versuche zur Aufnahme und Metabolisierbarkeit von Xylose und Maltose

Um einerseits mit Hilfe eines nicht-transportierbaren Zuckers einen hohen osmotischen Druck auf die Cytoplasmamembran auszuüben, andererseits durch Verwendung eines transportablen, nicht-metabolisierbaren Zuckers ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und Zelläußerem zu erreichen, wurden Zucker nach diesen Kriterien getestet. Unter dieser Voraussetzung wurden Maltose und Xylose für Inkubationsversuche eingesetzt. Maltose als Disaccharid wurde, wie Abbildung 3.14 zeigt, von *Z. mobilis* nicht aufgenommen und ist damit für die Herstellung eines osmotischen Gradienten geeignet. Dagegen können *Z. mobilis*-Zellen Xylose aufnehmen (Di Marco und Romano 1985), jedoch nicht auf Xylose wachsen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit eines metabolisierbaren Zuckers (Glucose, Fructose) reduziert *Z. mobilis* Xylose zu Xylitol (Feldmann 1991).

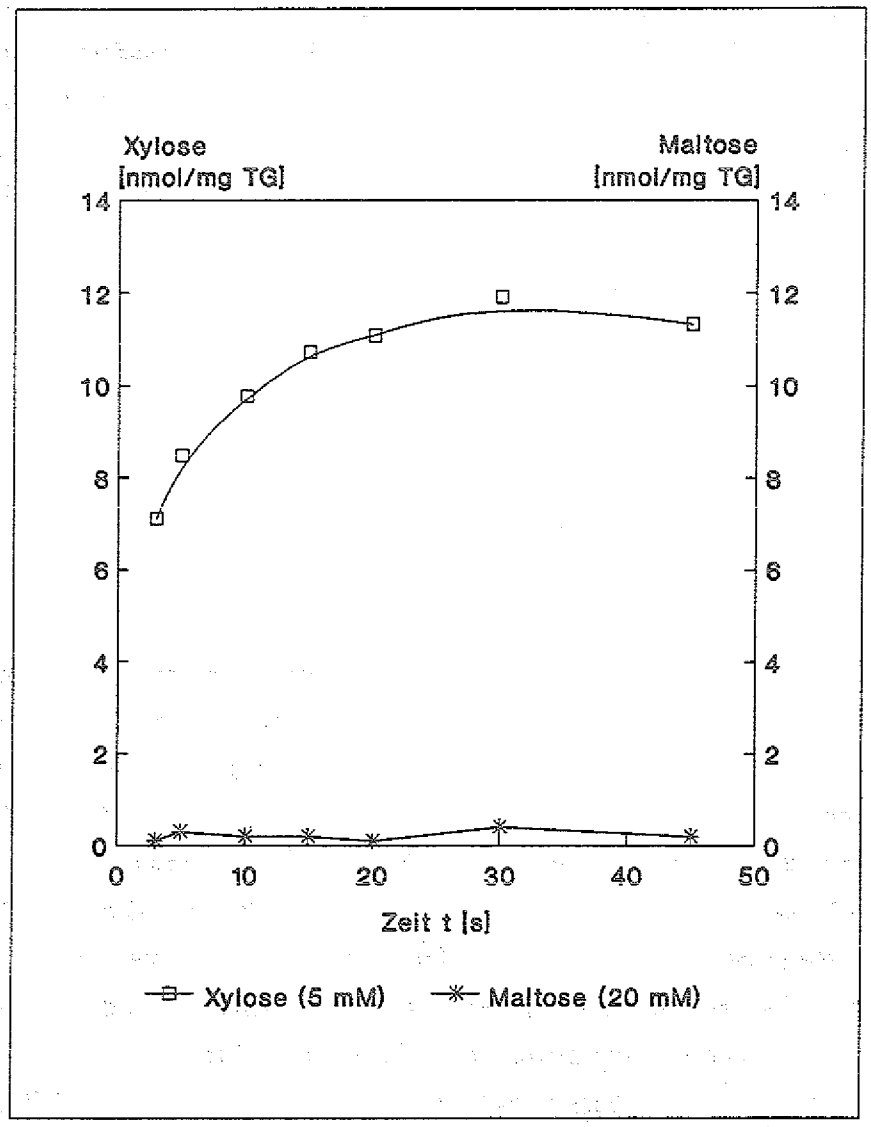


Abb. 3.14: Aufnahmekinetik von *Z. mobilis*-Zellen mit Xylose bzw. Maltose.

Z. mobilis-Zellen wurden in 50 mM MES-Puffer, pH 6,5, 1 mM $MgCl_2$ inkubiert. Die Versuche zur Zucker-Aufnahme wurden mit 5 mM [U-^{14}C]-Xylose (76 µCi/µmol) und 10 mM [U-^{14}C]-Maltose (540 µCi/µmol), je 0,2 µCi, durchgeführt. Die Zucker-Aufnahmeraten wurden zeitabhängig durch Zentrifugation ermittelt.

3.3.2 Einfluß von isoosmolalen Konzentrationen von Glucose, Maltose und Xylose auf *Z. mobilis*

Untersuchungen mit isoosmolalen Konzentrationen von Glucose, Xylose und Maltose wurden durchgeführt, um die Wirkung dieser verschiedenen Zucker auf das Wachstum, die Cytoplasmavolumina und intrazellulären Metabolitkonzentrationen vergleichen zu können. Deshalb wurde dem Vollmedium mit 15 g/l Glucose zusätzlich je 850 mOs/kg Maltose, Glucose bzw. Xylose zugegeben. Bei Wachstumsversuchen von *Z. mobilis* mit Glucose als einziger C-Quelle erfolgt jedoch besonders in der exponentiellen Phase eine starke Ethanolbildung, wodurch bei gleichzeitig abnehmender Glucosekonzentration die Gesamtosmolalität leicht ansteigt. Es war daher sinnvoller, das Wachstumsverhalten der Xylose/Glucose-Kultur mit dem der Maltose/Glucose-Kultur zu vergleichen, da während der Fermentation bei beiden Ansätzen nur sehr geringe Veränderungen in der Osmolalität des Mediums gemessen wurden.

Beim Maltose/Glucose-Ansatz wird durch hohe extrazelluläre Maltosekonzentrationen ein osmotischer Gradient zwischen Zellinnerem und Zelläußerem aufgebaut, was zu einem Wasserentzug aus dem Cytoplasma führt. Hohe extrazelluläre Xylosekonzentrationen (Xylose/Glucose-Ansatz) dagegen bedingen, daß Xylose ins Cytoplasma gelangt und der Glucose-Stoffwechsel verlangsamt wird. Die Hemmung des Glucose-Metabolismus im Maltose/Glucose- bzw. Xylose/Glucose-Ansatz tritt nicht bei dem Ansatz mit ausschließlich Glucose auf. Dies wird deutlich, wenn man die Wachstumsgeschwindigkeit von *Z. mobilis* auf Glucose als einziger C-Quelle mit dem Wachstum bei gleichzeitiger Anwesenheit von Maltose bzw. Xylose vergleicht. Während beim Wachstumsversuch mit ausschließlich Glucose die spezifische Wachstumsrate μ 0,234 betrug, wurden beim Maltose/Glucose- bzw. Xylose/Glucose-Ansatz mit $\mu = 0{,}176\ h^{-1}$ bzw $\mu = 0{,}110\ h^{-1}$ geringere Wachstumsraten gemessen. Dadurch, daß beim Ansatz mit Glucose/Maltose im Medium fortwährend ein Wasserverlust aus dem Cytoplasma verursacht wurde, waren vermutlich die für das Wachstum der Zellen wichtigen anabolen Enzyme in ihrer Ak -

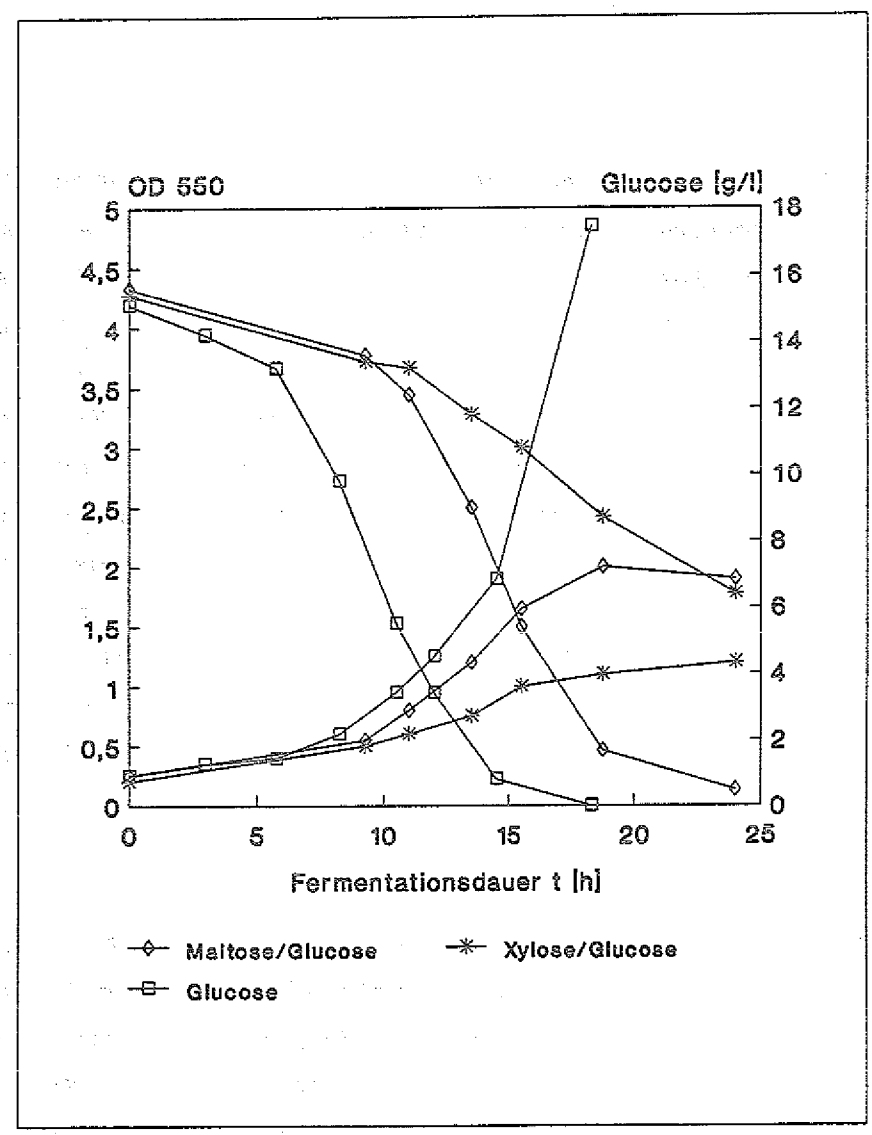


Abb. 3.15: Einfluß von isosmolalen Konzentrationen an Xylose bzw. Maltose auf das Wachstum und den Glucose-Verbrauch von *Z. mobilis* im Vergleich zum Ansatz mit ausschließlich Glucose.

Das Vollmedium zur Kultivierung von *Z. mobilis* enthielt neben 83 mM Glucose je 853 mOs/kg Glucose oder Maltose bzw. Xylose.

tivität gehemmt, was in einer niedrigen spezifischen Wachstumsrate für den Maltose-Ansatz resultierte. Die spezifische Glucose-Aufnahmerate beim Ansatz mit Maltose/Glucose (q_s = 6,18 g/g/h) lag nur geringfügig niedriger (- 15,5 %) als beim Glucose-Ansatz (q_s = 7,31 g/g/h). Offenbar blieb die Glucose-

Aufnahme und der Katabolismus von der hohen osmotischen Belastung des Mediums relativ unbeeinflußt.

Im Glucose/Maltose Medium gezogene Zellen wuchsen schneller als entsprechende Zellen im Glucose/Xylose Medium. Zur Erklärung dieser Beobachtung wurden Versuche zur intrazellulären Metabolitbestimmung durchgeführt (Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Bestimmung der intrazellulären Glucosekonzentration in Abhängigkeit von dem osmotischen Gradienten zwischen extra- und intrazellulärem Raum.

Z. mobilis-Zellen wurden im Vollmedium mit 83 mM Glucose kultiviert. Zusätzlich enthielt das Medium 453 ± 12 mOs/kg Maltose oder Xylose bzw. Glucose.

Zucker	Anfangs-Konzentration [mOs/kg]	$Glucose_{ex}$ [mM]	$Glucose_{in}$ 1) [mM]
Glucose	458	128,3 *	25 *
	+	37,8 **	≤ 2 **
	85		
Maltose	452		
+			
Glucose	85	32,4 **	47 **
Xylose	449		
+			
Glucose	85	28,5 **	≤ 2 **

* Mitte der exponentiellen Phase
** Ende der exponentiellen Phase
1) Meßwertschwankungen aus versuchstechnischen Gründen bis zu 21 %

Tabelle 3.10 zeigt, daß im Ansatz mit ausschließlich Glucose zum Zeitpunkt der Probenahme (bei 128,3 bzw. 37,8 mM extrazellulärer Glucose) nur eine geringe intrazelluläre Glucosekonzentration vorlag (25 bzw. ≤ 2 mM). Im Gegensatz dazu konnte bei dem Ansatz mit Glucose/Maltose eine höhere intrazelluläre Glucosekonzentration gemessen werden, die unter Berücksichtigung von Meßwert-Schwankungen jedoch nicht die extrazellulären Glucosekonzentrationen überschreitet. Beim Glucose/Xylose Ansatz war kein Xylose-Gradient vorhanden. Intrazelluläre Glucosekonzentrationen befanden sich im Bereich der Nachweisgrenze. Da vermutlich dasselbe Carrier-Protein für den Transport von Glucose und Xylose verantwortlich ist (Di Marco und Romano 1985), wurde durch die mehrfach höhere Xylosekonzentration im Medium Glucose als Substrat für das Transportprotein durch Xylose von den Substratbindungsstellen verdrängt.

Betrachtet man die unter isoosmolalen Versuchsbedingungen gemessenen Cytoplasmavolumina, so werden osmoregulatorische Aspekte weiter verdeutlicht (Tab. 3.11). Entscheidend dabei war, ob *Z. mobilis*-Zellsuspensionen im Medium mit oder ohne metabolisierbarer C-Quelle vorlagen. Mit Maltose als nicht-transportablem und nicht-verwertbarem Zucker wurde eine signifikante Abnahme des Cytoplasmavolumens beobachtet (bis zu 30 %). Fügte man jedoch demselben Testansatz 55 mM Glucose hinzu, wurde die Volumenreduktion teilweise wieder revertiert. Als Kontrolle dienten *Z. mobilis*-Zellen in einem Medium mit insgesamt 474 mM Glucose ohne Zusatz weiterer Zucker. Keine deutliche Änderung im Cytoplasmavolumen wurde ermittelt, wenn Xylose mit und ohne Glucose im Medium vorlag. Dies verdeutlicht, daß Xylose als permeabler Zucker in die Zellen von *Z. mobilis* gelangte und einen Ausgleich zwischen extra- und intrazellulären Konzentrationen ermöglichte, da Xylose nur bei Anwesenheit eines metabolisierbaren Zuckers geringfügig verstoffwechselt wird (Feldmann 1991). Der Zusatz von Glucose zum Testansatz verursachte keine signifikanten Volumenänderungen; die intrazellulären Glucosekonzentrationen lagen im Bereich der Nachweisgrenze.

Tab. 3.11: Einfluß von isoosmolalen Konzentrationen an Glucose, Xylose und Maltose auf das Cytoplasmavolumen.

Z. mobilis-Zellen wurden 20 min unter isoosmolalen Konzentrationen von Glucose, Maltose und Xylose inkubiert und anschließend zur Bestimmung des Cytoplasmavolumens der Silikonölzentrifugation unterworfen.

Zucker	Konzentration im Medium [mOs/kg]	[mM]	Cytoplasmavolumen [µl/mg TG]
Glucose	442	419	2,9
Xylose	451	427	2,8
Maltose	445	389	2,2
Glucose und	57	55	2,7
Maltose	451	400	

Um intrazelluläre Zuckerkonzentrationen und Cytoplasmavolumina ohne Einfluß der Stoffwechselaktivität bestimmen zu können, wurden Inkubationsansätze mit unterschiedlichen Xylosekonzentrationen (2-14% w/v) vorbereitet. Nach 20 Minuten Inkubationsdauer wurden die Xylose-Innen- und Außenkonzentrationen sowie die Cytoplasmavolumina gemessen. Abbildung 3.16 zeigt, daß während der Inkubationszeit relativ hohe Xylose-Innenkonzentrationen bestimmt wurden. Der Quotient aus extra- und intrazellulärer Xylose (≈ 1,2) unterlag zwar Schwankungen, lag aber im Durchschnitt niedriger als der entsprechende Quotient bei den Glucose-Ansätzen (≈ 1,7). Die Differenz zwischen Xylose-Innen- und Außenkonzentrationen ist also weitaus geringer als bei den Glucose-Ansätzen. Deshalb nahmen die Cytoplasmavolumina mit steigender Xylosekonzentration nur um maximal 10 % ab, während sich die Cyoplasmavolumina mit steigender Glucosekonzentration um bis zu 45 % verringerten (Abb. 3.2).

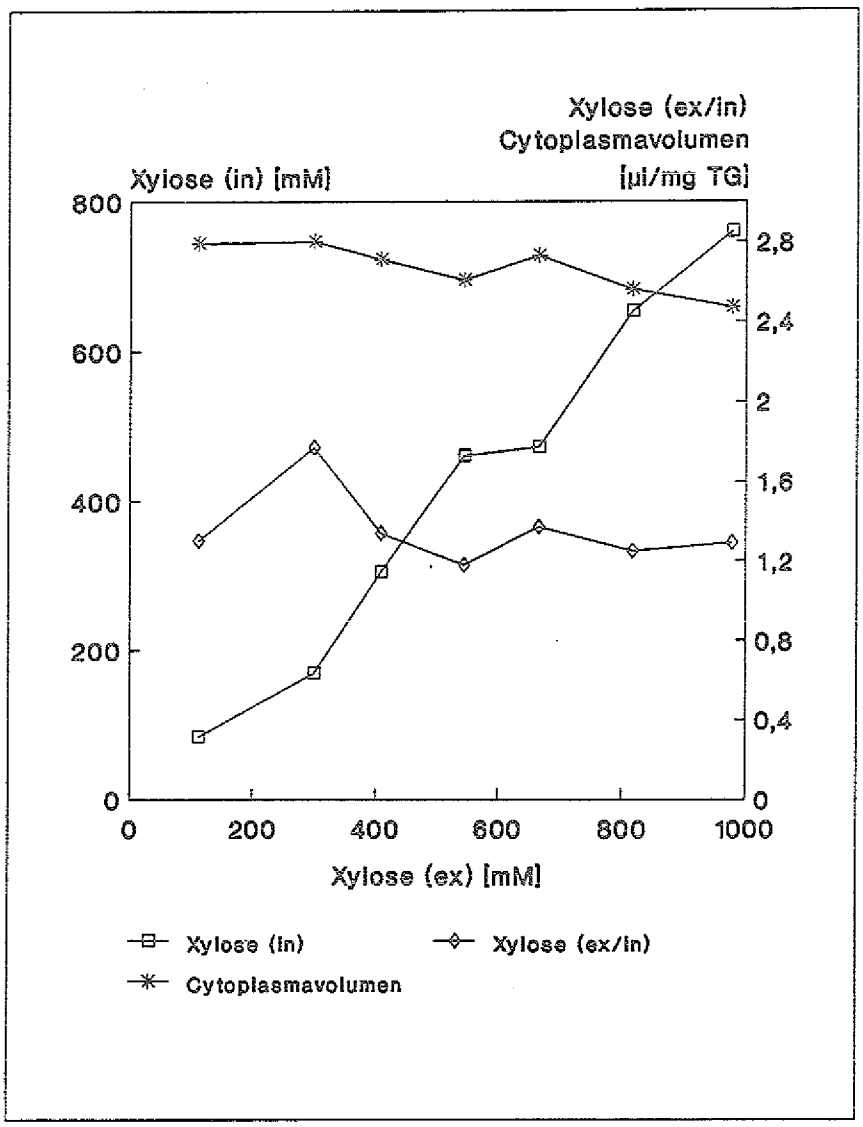


Abb. 3.16: Intrazelluläre Xylosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Xylosekonzentration des Mediums.

Z. mobilis-Zellen wurden in Vollmedium mit unterschiedlichen Xylosekonzentrationen (2 - 14 % w/v) kultiviert und nach einer Inkubationsdauer von 20 min zur intrazellulären Metabolitbestimmung zentrifugiert.

4. Diskussion

Zymomonas mobilis zeichnet sich durch eine stark ausgeprägte Toleranz für hohe extrazelluläre Zuckerkonzentrationen bis zu 40 % (w/v) aus, wohingegen dieses Bakterium schon durch NaCl-Konzentrationen von 2 % (w/v) völlig im Wachstum gehemmt wird (Swings und De Ley 1977). Zuckertoleranz ist bei Bakterien ein seltenes Phänomen. Lediglich *Streptococcus mutans* wächst in Medien mit bis zu 40 % (w/v) Saccharose (Sato et al. 1988). Demgegenüber haben unter den Eukaryonten zuckertolerante Mikroorganismen, wie z.B. xerotolerante Hefen, eine größere Verbreitung erfahren (Onishi 1957; Ingram 1957; Scarr und Rose 1966; Anand und Brown 1968; Pitt und Christian 1968; Hocking und Norton 1983).

Fermentationen von *Z. mobilis* in Medien mit verschiedenen Glucosekonzentrationen zeigen die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate μ von der Anfangs- Glucosekonzentration des Mediums (2 - 20 % w/v). Da die Glucose-Aufnahmerate q_s und die Ethanol-Produktivität q_p von verschiedenen Glucosekonzentrationen im Medium nicht beeinflußt wird, liegt der Schluß nahe, daß durch die hohen Glucosekonzentrationen ein inhibierender Einfluß auf anabole Enzyme des Stoffwechsels besteht. Eine inhibierende Wirkung des im Medium vorhandenen Ethanols auf den Glucose-Anabolismus ist insofern auszuschließen, als zum Zeitpunkt der Zellernten nur niedrige Ethanolkonzentrationen ($\leq$ 30 g/l) im Medium vorlagen. Der Einfluß hoher Glucosekonzentrationen auf den anabolen Stoffwechsel zeigt sich auch in der Verlängerung der Anwachsphase des Wachstums (lag-Phase) bei zunehmenden extrazellulären Glucosekonzentrationen. Obwohl inhibierende Effekte auf Enzyme des Stoffwechsels im Widerspruch zur Funktion und Wirkung kompatibler Solute stehen (Brown 1976), ist bereits in mehreren Fällen gezeigt worden, daß kompatible Solute auf die Aktivität verschiedener Enzyme Einfluß nehmen können. Beispielsweise hemmt Saccharose die Isocitrat-Dehydrogenase von zuckertoleranten Hefen und Pilzen, z.B. *Saccharomyces rouxii* (Brown 1976); Glucose inaktiviert die Isocitratlyase von *Phycomyces blakesleeanus* (Rua et al.

1989) und Fructose (0,9 M) verursacht nach Mathlouthi et al. (1989) die Denaturierung der Hefe-Alkohol-Dehydrogenase. Durch hohe intrazelluläre Solutkonzentrationen wird die Wasseraktivität im Cytoplasma reduziert, was die zur Aufrechterhaltung der aktiven Konformation von Proteinen erforderliche Hydratation beeinträchtigen kann (Low 1985; Brown 1976). Hohe intrazelluläre Zuckerkonzentrationen üben dagegen bei *Z. mobilis* keinen Einfluß auf die Aktivität kataboler Enzyme des Glucose-Stoffwechsels aus, was auch durch Versuche zur zellfreien Gärung bei *Z. mobilis* gezeigt wurde (Algar und Scopes 1985).

Die Ergebnisse der intrazellulären Metabolit-Bestimmung zeigen, daß die Anpassung von *Z. mobilis* an hohe Glucosekonzentrationen auf einem in die Zelle gerichteten raschen Einwärtstransport von Glucose beruht. Die intrazellulär vorhandene Glucose liegt nahezu ausschließlich in nichtphosphorylierter Form vor. Sowohl ^{31}P-NMR-Untersuchungen von Barrow et al. (1984a) als auch Versuche zur zellfreien Gärung (Algar und Scopes 1985) ergaben das Vorhandensein äußerst geringer Konzentrationen an intrazellulärem Glucose- bzw. Fructose-6-phosphat (≤ 8 mM bzw. ≤ 0,95 mM). Das Vorkommen signifikanter Konzentrationen intrazellulärer, nichtphosphorylierter Monosaccharide ist von mehreren Pilzen bekannt. Liegt ein Glucose-/Fructose-Gemisch mit niedriger Wasseraktivität z.B. bei *Penicillium chrysogenum*, *Chrysosporium fastidium* (Luard 1982a), *P. janczewskii*, *P. digitatum*, *Eurotium chevalieri*, *Xeromyces bisporus* und *Wallemia sebi* (Hocking und Norton 1983) im Medium vor, wurde einhergehend mit der extrazellulären Zuckerkonzentration eine Zunahme der intrazellulären Glucose- bzw. Fructosekonzentration festgestellt. Ähnlich wie bei *Z. mobilis* werden auch in diesen Beispielen die intrazellulären Solutkonzentrationen von der C-Quelle des Mediums bestimmt. Der Einsatz von Saccharose als Osmotikum (0 - 1,5 MPa) führt bei *Phytium debaryaum* zu steigenden Konzentrationen an intrazellulärer Glucose bzw. Fructose als Folge der Hydrolyse der Saccharose (Luard 1982b). Eine weitere Parallele haben die bei *Z. mobilis* erhaltenen Ergebnisse in der Osmoadaptation einiger Cyanobakterien (u.a. *Gloeothece*, *Calothrix*, *Scytonema*) erfahren, bei denen die intrazellulären Glucose-/Fructosekonzentrationen von

der Wasseraktivität des Mediums abhängig sind (Mackay et al. 1984).

In Analogie zu der Toleranz gegenüber Glucose beruht auch die Toleranz von *Z. mobilis* gegenüber hochkonzentrierten Fructose-lösungen auf einem raschen Influx von Fructose und dem Vorkommen hoher Konzentrationen an intrazellulärer Fructose. Wenn die extrazelluläre Fructosekonzentration ca. 200 mM überschritt, bestand eine Korrelation zwischen intra- und extrazellulärer Fructose. Der Anteil phosphorylierter Fructose war mit weniger als 0,5 mM äußerst gering, was durch ^{31}P-NMR Untersuchungen von Barrow et al. (1984a) in Einklang steht. Demnach beträgt die intrazelluläre Fructose-6-Phosphat-Konzentration 0,5 - 0,95 mM.

Legt man dagegen Glucose und Fructose in äquimolaren Konzentrationen als Substrate für *Z. mobilis* vor, liegt der Toleranz von *Z. mobilis* gegenüber diesen hochkonzentrierten Glucose-/Fructose-Gemischen eine Besonderheit zugrunde. Außer intrazellulären Glucose- bzw. Fructosekonzentrationen tragen dann auch intrazelluläre Sorbitkonzentrationen (≤ 157 mM) zum osmotischen Ausgleich bei. Möglicherweise steht die Sorbitbildung in Zusammenhang mit dem natürlichen Habitat von *Z. mobilis*, zuckerhaltige Fruchtsäfte, in denen Saccharose als natürliches Substrat durch Hydrolyse zu Glucose und Fructose genutzt wird (Swings und De Ley 1977). Auch bei einigen Algen kommt dem Sorbit eine besondere Bedeutung zu. Bei *Stichococcus bacillaris*, *S. chloranthus*, *Klebsormidium chloranthus* fungiert Sorbit als kompatibles Solut (Brown und Hellebust 1978; Wegmann 1986). Darüber hinaus wird dem Sorbit bei eukaryontischen Zellen der Medulla eine bedeutende osmoadaptive Funktion zugeschrieben (Burg 1988; Moriyama et al. 1989; Bagnasco et al. 1988; Burg und Kador 1988; Cowley et al. 1990). Sorbit konnte auch bei Fermentationen mit Glucose bzw. Fructose als einziger C-Quelle intrazellulär nachgewiesen werden, wenn die extrazellulären Glucose- oder Fructosekonzentrationen bestimmte Schwellenwerte (410 mM bzw. 530 mM) überschritten. Obwohl die intrazellulären Sorbitkonzentrationen unter diesen Voraussetzungen erheblich höher liegen als die externen Konzentrationen, d.h. Sorbit akkumuliert wird, ist in diesem Falle dem

Sorbit als osmotisch aktive Substanz nur eine geringe Bedeutung hinsichtlich der Gesamtosmolalität beizumessen. Dies trifft auch für die Hefe *S. cerevisiae* zu (Meikle et al. 1988). Anders als bei *S. cerevisae* ist für die Sorbitbildung bei *Z. mobilis* das Enzym Glucose-Fructose-Oxidoreduktase verantwortlich. Dieses Enzym setzt durch eine Oxidations-/Reduktionsreaktion Glucose zu Glucononlacton und Fructose zu Sorbit um. Eine Lactonase spaltet das Lacton zu Gluconsäure (Zachariou und Scopes 1986). Da die Glucose-Fructose-Oxidoreduktase vermutlich im Periplasma der Zelle lokalisiert ist (Rehr, persönliche Mitteilung), könnte das Vorkommen signifikanter intrazellulärer Sorbitkonzentrationen bei gleichzeitig äußerst geringen extrazellulären Sorbitkonzentrationen (≤ 1,3 mM) mit einem aktiven Sorbit-Aufnahmesystem erklärt werden. Während Sorbit von *Z. mobilis* nicht weiter metabolisiert wird, kann Gluconsäure von der Gluconatkinase phosphoryliert und damit in den Entner-Doudoroff-Weg eingeschleust werden (Strohdeicher et al. 1988). Intrazelluläre Gluconsäurekonzentrationen liegen infolgedessen unterhalb der Nachweisgrenze. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und Fructose wird zunächst nahezu ausschließlich Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg katabolisiert, da Glucose die Aktivität des Enzyms Fructokinase stark hemmt (Scopes et al. 1985; Doelle 1982a). Fructose steht somit neben Glucose dem Enzym Glucose-Fructose-Oxidoreduktase als Substrat zur Verfügung. Sinkt die extrazelluläre Glucosekonzentration unterhalb ca. 7 g/l, wird die Fructose über die Bildung von Fructose-6-phosphat katabolisiert und so dem Entner-Doudoroff-Weg zugeführt (Barrow et al. 1984b).

Im Gegensatz zum Sorbit erscheint bei *Z. mobilis* die Zuordnung der Zucker Glucose und Fructose zu den kompatiblen Soluten als wenig sinnvoll, weil Glucose und Fructose in der Zelle keine Akkumulation zeigen und dort als Substrate des Kohlenhydrat-Stoffwechsels metabolisiert werden. Außerdem ist bislang ein direkter Zusammenhang zwischen Struktur und osmotischen Eigenschaften von Zuckern nicht bekannt. Für Monosaccharide weisen Chirife et al. (1980) nur bei hohen Zuckerkonzentrationen auf eine signifikante Abweichung vom Idealverhalten nach Raoult hin. Demnach wird die Wasseraktivität stärker abgesenkt als dies nach dem Teilchengesetz für verdünnte Lösungen theo-

retisch zu erwarten ist. Im Gegensatz zu den Monosacchariden nimmt bei den Polyolen mit zunehmender Kettenlänge die osmotische Aktivität zu (Brown 1976). Dies läßt sich entsprechend der Anzahl der Hydroxylgruppen durch Bestimmung der osmotischen Koeffizienten in der Reihenfolge Glycerin, Erythrit und Sorbit bestätigen (Chirife et al. 1980).

Neben dem Einstrom der permeablen Zucker Glucose bzw. Fructose trägt als weiterer Mechanismus die Reduktion des Cytoplasmavolumens durch Wasserverlust zur Erhöhung des internen osmotischen Drucks bei. Das Schrumpfen der Zellen führt zu einem Anstieg der Konzentrationen von osmotisch aktiven Substanzen, bis die extrazelluläre Osmolalität ausgeglichen ist (Cram 1976). Dieser Mechanismus der Osmoadaptation ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn nicht-transportable Zucker anstelle von Glucose, Fructose bzw. Saccharose im Medium vorhanden sind. Unter diesen Bedingungen übersteigt der osmotische Druck auf die Zellwand - z.B. bedingt durch hohe Konzentrationen des nicht transportablen Zuckers Maltose - den intrazellulären osmotischen Druck. Durch Wasserverlust aus dem Cytoplasma kommt es dann zum Schrumpfen der Zellen, bis die intrazelluläre Osmolalität der Osmolalität des Mediums äquivalent ist. Auch bei *S. cerevisiae* wurde durch Einsatz eines hyperosmotischen Soluts eine bis zu 40%ige Reduktion des Zellvolumens nachgewiesen (Morris et al. 1983). Wird nach der hohen osmotischen Belastung mit hyperosmotischen Soluten das Medium wieder mit transportablen Zuckern supplementiert, wird bei *Z. mobilis* durch den intrazellulär vorhandenen Zucker ein weiterer Wasserverlust verhindert, d.h. die Cytoplasmavolumen-Reduktion größtenteils wieder revertiert. Derartige osmoregulatorische Mechanismen wurden auch von Morris et al. (1983) bei *S. cerevisiae* beschrieben und bestätigen die Reversion des reduzierten Zellvolumens durch Rehydrierung.

Der Zusammenhang zwischen Permeabilität und Cytoplasmavolumen ohne Beeinflussung durch den Katabolismus zeigt sich bei *Z. mobilis* bei dem Einsatz des transportablen, nicht-metabolisierbaren Zuckers Xylose (Di Marco und Romano 1985). Wenn ausschließlich Xylose als Zucker im Medium (2 - 14 % w/v) vorliegt, trägt die intrazellulär vorhandene Xylose fast voll-

ständig zu einem osmotischen Ausgleich zwischen extra- und intrazellulärem Milieu bei, so daß die Cytoplasmavolumina nur sehr geringen Schwankungen unterliegen.

Trotz signifikanter Konzentrationen intrazellulärer Glucose bzw. Fructose zur Stabilisierung des osmotischen Gradienten zwischen Medium und Cytoplasma nimmt das Cytoplasmavolumen bei *Z. mobilis* mit steigender extrazellulärer Zuckerkonzentration ab. Dieses Phänomen steht nicht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Zellstoffwechsel. Zwar sollte der für den Influx der Zucker erforderliche chemische Gradient zwischen Medium und Cytoplasma - bedingt durch ein sehr effizientes, mit hoher Geschwindigkeit arbeitendes kataboles Enzymsystem - zur Reduktion des Cytoplasmavolumens führen, jedoch auch bei niedriger Metabolisierungsrate (q_s: 4,5 g/g/h Glucose bzw. Fructose) ist eine Cytoplasmavolumen-Reduktion meßbar. Die zuckertolerante Hefe *Hansenula anomala* zeigt beim Wachstum auf Glucose ein ähnliches Phänomen (Van Eck et al. 1989). Mit dieser Hefe wurden maximales Zellvolumen und spezifische Wachstumsraten bei einer Wasseraktivität von 0,998 mit Glucose als C-Quelle gemessen. Bei Erniedrigung des Wasseraktivität auf 0,925 durch Erhöhung der Glucosekonzentration nahm das Zellvolumen linear ab. Damit einhergehend kam es zur Akkumulation der kompatiblen Solute Glycerin und Arabinose, wobei der Faktor für das Verhältnis zwischen extra- und intrazellulären Konzentrationen bis zu 10000 betrug (Van Eck et al. 1989). Der Zusammenhang zwischen Osmolalität des Mediums, Wachstumsphase der Zellen und Zellgröße wurde mit verschiedenen Organismen untersucht. Donachie und Robinson (1987) zeigten beispielsweise für *E. coli* eine Relation zwischen Wachstumsphase und Cytoplasmavolumen, wobei langsam wachsende Bakterien ein kleineres Zellvolumen besitzen als schnell wachsende Mikroorganismen. Für das Wachstum von *Ectothiorhodospira mobilis* unter salinen Bedingungen bestätigen Imhoff und Riedel (1989) einen derartigen Zusammenhang zwischen Wachstumsphase und Cytoplasmavolumen.

Für eine vollständige osmotische Äquilibrierung zwischen intra- und extrazellulären Raum tragen neben hohen intrazellulären Glucosekonzentrationen auch andere osmotisch aktive, cytoplasmatische Solute, d.h. ionische und nicht-ionische nie-

dermolekulare Bestandteile der Zelle mit einer Osmolalität von ca. 310 mOs/kg bei. Vergleichbare Werte für die zellinterne Osmolarität sind von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* bekannt (Stock et al. 1977).

Das Vorkommen signifikanter intrazellulärer Konzentrationen an Glucose bzw. Fructose ist entsprechend den Daten der Transportversuche und den Ergebnissen von Di Marco und Romano (1985) auf ein Zucker-Transportsystem mit hoher Geschwindigkeit und Kapazität zurückzuführen. Auch die zuckertolerante Hefe *S. rouxii* verfügt über ein sehr effizientes, mit hoher Geschwindigkeit arbeitendes Saccharose-Transportsystem. Dadurch werden intrazelluläre Saccharosekonzentrationen ermöglicht, die bis zu 40 % der extern vorgelegten Zuckerkonzentration ausmachen (Brown 1974).

Bakterien haben verschiedene Mechanismen zum Transport von Zuckern verwirklicht. Die erleichterte Diffusion (Abb. 4.1) ist als passiver Transportvorgang unabhängig von Stoffwechselenergie und daher deutlich vom aktiven Transport zu differenzieren. Bei Bakterien ist die erleichterte Diffusion häufig dem Transport von Glycerin zuzuordnen (Dills et al. 1980), was z.B. für *Pseudomonas* (Tsay et al. 1971), *Shigella* (Richey und Lin 1972), *Bacillus* (Saheb 1972), *Nocardia* (Calmes und Deal 1972) und *Escherichia* (Sweet et al. 1990; Alemohammad und Knowles 1974; Sanno et al. 1968) zutrifft. Der Acetattransport bei *Acetobacterium woodii* verläuft ebenfalls nach dem Mechanismus der erleichterten Diffusion (Boenigk et al. 1989).

Eine weitaus größere Verbreitung unter den Prokaryonten haben aktive Zucker-Transportsysteme erfahren. Während bei den primär aktiven Transportvorgängen der Translokationsschritt unmittelbar an eine chemische Reaktion gebunden ist, wird der sekundär aktive Transport gemäß der chemiosmotischen Hypothese (Mitchell 1972) durch die Proton Motive Force (elektrisches Potential, pH Gradient), Ionen-Gradienten oder durch den chemischen Gradienten des Substrats angetrieben (Mitchell 1970). Zum sekundär aktiven Transport gehört das Maltosebindeprotein-abhängige Transportsystem (Dills et al. 1980), sowie der

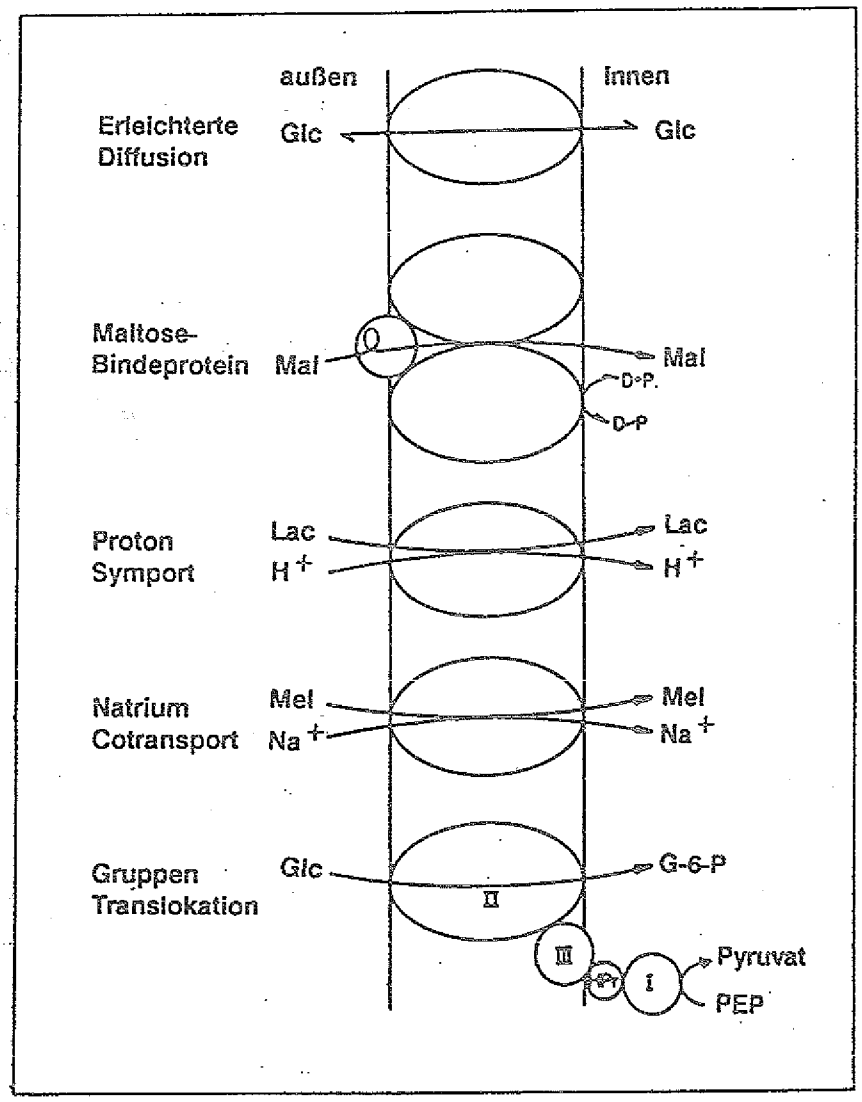


Abb. 4.1: Carrier-vermittelte Transportmechanismen (modifiziert nach Dills et al. 1980)

Abkürzungen: Glc, Glucose; G-6-P, Glucose-6-Phosphat; Lac, Lactose; Mal, Maltose; Mel, Melibiose; Na, Natrium; PEP, Phosphoenolpyruvat; D + P_i, nichtphosphorylierter Donor und anorganisches Phosphat; I, II, III, Enzym I-III

Natrium-Cotransport von Zuckern, z.B. für Melibiose (Stock und Roseman 1971). Beide Transportmechanismen (Abb. 4.1) sind bei *E. coli* vorhanden. Der Proton-Symport z.B. von Glucose bzw. Lactose ist für *Rhodotorulla* (Höfer 1989) und *E. coli* (Wilson 1978; Wilson et al. 1978) beschrieben. Besondere Beachtung verdient jedoch das Phosphotransferase-System (Abb. 4.1), das durch die Gruppenübertragung während des Transports gekennzeichnet ist (Thompson 1987, 1988; Danchin 1987; Postma und

Lengeler 1985; Saier 1985; Saier et al. 1988; Konings et al. 1989; Hengstenberg et al. 1989; Erni 1989; Driessen et al. 1987).

Im Gegensatz zu den Prokaryonten erfolgt in den meisten eukaryontischen Zellen der Glucosetransport nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion (Gould und Bell 1990; Mueckler 1990; Thorens et al 1990), wobei bislang mindestens 5 verschiedene integrale Glucose-Transportproteine beschrieben wurden (Mueckler et al. 1985; Birnbaum et al. 1986; Allard und Lienhard 1985). Hefen verfügen vielfach über verschiedene Glucose-Transportsysteme gleichzeitig, darunter auch oft ein für Glucose gering affines Transportsystem, das nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion arbeitet (Ramos et al. 1988; Cirillo 1989; Peinado et al. 1988; Loureiro-Dias 1987; Postma et al. 1988; Postma et al. 1989; Does und Bisson 1989).

Bei *Z. mobilis* handelt es sich um ein mit hoher Geschwindigkeit und Kapazität arbeitendes Transportsystem, das für auf Glucose bzw. Fructose kultivierte Zellen gleiche Transportraten liefert. Außdem konnte Substratspezifität nachgewiesen werden. Der Glucosetransport ist nicht durch CCCP hemmbar; Hinweise auf einen aktiven Transport von Glucose liegen nicht vor (Romano et al. 1979). Für den Glucosetransport konnte Stereospezifität und Gegentransport-Maximum gezeigt werden (Di Marco und Romano 1985). Dabei zeichnet sich *Z. mobilis* durch das einzige, bisher beschriebene, bakterielle Glucose-Transportsystem aus, das Glucose ausschließlich nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion (Abb. 4.1) transportiert. Inzwischen wurde auch für das Bakterium *Streptococcus bovis* zusätzlich zum Glucose Phosphotransferase-System ein Glucose-Transportsystem mit dem Mechanismus der erleichterten Diffusion vorgeschlagen (Russell 1990).

Versuche zum Fructosetransport bei *Z. mobilis* zeigen, daß das System Substratsättigung zeigt, was auf einen Carrier-vermittelten Transport hinweist. Ähnliche Überlegungen resultierten aus Messungen der Fructose-Aufnahmerate einer Fructokinase-negativen Mutante (Edye et al. 1990). Dadurch, daß auch für die Fructokinase-negative Mutante eine Fructose-Aufnahmerate

festgestellt wurde, wird nach Ansicht der Autoren deutlich, daß dieser Transport unabhängig vom Zucker-Phosphorylierungspotential möglich ist, was mit dem Mechanismus der erleichterten Diffusion vereinbar wäre. Ergebnisse der Fructosetransport-Versuche weisen darauf hin, daß der Fructosetransport durch Glucose inhibiert wird, insbesondere dann, wenn die Glucosekonzentration oberhalb der eingesetzten Fructosekonzentration liegt. Untersuchungen von Di Marco und Romano (1985) mit einem 20 fachen Glucose-Überschuß ergaben ähnliche Resultate. Es ist daher anzunehmen, daß Glucose und Fructose mit dem gleichen Carrier transportiert werden, wobei die Affinität für Glucose größer als die für Fructose ist. Auszuschließen ist auch nicht, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucose und Fructose eine nicht-kompetitive Inhibition der Fructose-Aufnahme durch Glucose erfolgt, wie dies bereits von anderen Mikroorganismen bekannt ist (Dills et al. 1980; Mc Ginnis und Paigen 1967).

Während funktionelle und strukturelle Eigenschaften des Zucker-Transportsystems Species-abhängig sind, deuten analoge Kennzeichen bei den verschiedenen Transportsystemen auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung und ähnlichen katalytischen Mechanismus hin (Mueckler et al. 1985; Birnbaum et al. 1986). Der katalytische Mechanismus des Glucosetransports ist jedoch von einer Kontroverse bestimmt. Bisher wurde eine Vielzahl von Transport-Modellen zur erleichterten Diffusion vorgeschlagen, wobei der Glucosetransport durch die Erythrozytenmembran als Prototyp der erleichterten Diffusion gilt (Helgerson und Carruthers 1989). Nach neueren Untersuchungen zur Bestimmung kinetischer Werte wird zunehmend das two-site Carrier-Modell favorisiert (Helgerson und Carruthers 1989). Dieses Modell ist dadurch gekennzeichnet, daß zwei Zuckermoleküle gleichzeitig (jeweils an der Influx- bzw. Efflux-Stelle) an den Carrier binden können und durch Kooperativität interagieren.

Nach Friedman (1986) versteht man unter erleichterter Diffusion einen passiven Vorgang, der durch einen Gradienten des chemischen oder elektrochemischen Solutpotentials angetrieben wird. Es bereitet jedoch Schwierigkeiten, die maximale Transportkapazität der erleichterten Diffusion zu quantifizieren,

da die Anfangs-Transportgeschwindigkeit derart hoch ist, daß sie mit den herkömmlichen experimentellen Methoden nicht auflösbar ist. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Fuhrmann et al. (1989) bei der kinetischen Analyse des Glucosetransports in Plasmamembranvesikeln aus *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen. Daten der Computersimulation ergaben für *S.cerevisiae* eine Unterbewertung der ermittelten apparenten Influx-/Efflux-Werte. Demnach ist es nicht möglich, realistische Anfangsgeschwindigkeiten zu bestimmen. Wegen des effizienten Transportsystems und der geringen Größe des Zellkompartiments werden in weniger als 1 sec hohe intrazelluläre Zuckerkonzentrationen erreicht. (Fuhrmann et al. 1989). Aufgrund dieser Einschränkung sind daher die apparenten V_{Max}-Werte der Glucose/Fructose-Aufnahmeversuche bei *Z. mobilis* unterbewertet. Legt man für Wachstumsversuche mit *Z. mobilis* eine durchschnittliche Glucose-Aufnahmerate von 7,7 g/g/h zugrunde, so impliziert dies eine Mindest-Glucose-Aufnahmerate von 712 nmol/min•mg TG. Aus kalorimetrischen Messungen des Glucose-Metabolismus bei *Z. mobilis* wird z.B. ein maximaler Glucoseumsatz von 816 nmol/min•mg TG beschrieben (Belaich et al. 1968).

Ungeachtet der Schwierigkeiten zur Bestimmung apparenter kinetischer Daten aus den Zuckertransport-Messsungen besteht ein Zusammenhang mit der Kinetik des Glucose-/Fructose-Phosphorylierungssystems. Vergleicht man die kinetischen Daten der Phosphorylierungssysteme mit denen der Transportsysteme, ergibt sich, daß die K_M-Werte der Transportsysteme (Glucose: 11 mM; Fructose: 27-30 mM) um mehr als eine Größenordnung höher liegen als die Werte der beiden Kinasen (Scopes et al. 1985). Die apparenten V_{Max}-Werte der Kinasen entsprechen nur unter günstigsten Voraussetzungen den Werten der Zucker-Aufnahmerate q_s von mindestens 712 nmol/min•mg TG (Scopes et al. 1985). Die Werte anderer Autoren liegen in diesem Fall um den Faktor 2-3 niedriger (Doelle 1982b; Di Marco und Romano 1985). Demnach ist bei extrazellulären Zuckerkonzentrationen im Sättigungsbereich des Transportsystems für Glucose und Fructose die Gluco- und Fructokinase völlig gesättigt. Der Zuckertransport wirkt unter diesen Bedingungen nicht limitierend, was mit dem Vorhandensein intrazellulärer, nichtphosphorylierter Glucose bzw. Fructose in Einklang steht.

Abgesehen von Ethanol und CO_2 gehen bei *Z. mobilis* Polymere bzw. Oligosaccharide als weitere Produkte aus dem Zuckerstoffwechsel hervor (Viikari 1988). Dazu gehört ein Fructose-Polymer, das sich u.a. durch seine Säurelabilität auszeichnet (Barrrow et al. 1984c). Im Gegensatz zu dem bei *Z. mobilis* ebenfalls vorhandenen Levan (Beker et al. 1990; Viikari und Linko 1986) und daraus abgeleiteten Fructooligosacchariden (Kennedy et al. 1989) sind die Fructose-Monomere dieses Polysaccharids α-2-1 und β-2-6 glykosidisch verknüpft (Barrow et al. 1984c). Auffällig ist, daß dieses Polymer der Membranfraktion zuzuordnen ist. Inwieweit diesem Polymer eine Funktion bei der Zellassoziation oder ggf. bei der Osmoadaptation beizumessen ist, ist noch unbekannt. Zwar ist von *Bradyrhizobium japonicum* ein extrazelluläres Polysaccharid bekannt, dem eine Funktion bei der Osmoregulation zugesprochen wird (Tully et al. 1990), das *Z. mobilis*-Polysaccharid ist aber konstitutiv vorhanden und unterliegt offenbar keinen regulatorischen Effekten. Die Beteiligung eines β-(1-2) Glucans von *Rhizobium meliloti* und *Agrobacterium tumefaciens* an der hypoosmotischen Adaptation wird von Dylan et al. (1990) und Cangelosi et al. 1990) gezeigt.

Z. mobilis war bislang für sein Wachstum in außergewöhlich hohen Zuckerkonzentrationen bekannt. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *Z. mobilis* aufgrund eines mit großer Geschwindigkeit arbeitenden Zucker-Transportsystems in Abhängigkeit von der extrazellulären Zuckerkonzentration auch intrazellulär signifikante Konzentrationen nichtphosphorylierter Monosaccharide aufweist. Ausgehend von der Klonierung der Glucose-Transportproteine (Barnell et al. 1990) sollten weiterführende Untersuchungen die Deletion der Gene für das Glucose-Transportsystem betreffen. Dadurch könnte gezeigt werden, ob *Z. mobilis* noch über andere Zuckercarrier für Hexosen verfügt, wobei durch Klonierung der Gene weiterer Zuckercarrier Hinweise auf deren Bedeutung für *Z. mobilis* erhältlich wären.

5. Zusammenfassung

Das ethanol-produzierende Bakterium *Zymomonas mobilis* zeichnet sich durch eine stark ausgeprägte Toleranz gegenüber hochkonzentrierten extrazellulären Zuckerlösungen (bis zu 40% w/v) aus. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Mechanismen der Toleranz von *Z. mobilis* gegenüber konzentrierten Glucose-, Fructose- und Glucose-/Fructoselösungen zu untersuchen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Wachstumsversuche von *Z. mobilis* mit konzentrierten Glucoselösungen (2-20 % w/v) zeigten, daß unabhängig von der Glucosekonzentration des Mediums die spezifische Produktivität q_p, die spezifische Glucose-Aufnahmerate q_s und die Ethanolausbeute $Y_{p/s}$ konstant blieben. Steigende Zuckerkonzentrationen (2-18 % w/v Glucose bzw. Fructose) im Medium ergaben eine signifikante Reduktion des Cytoplasmavolumens von 2,8 µl/mg TG (110 mM Zucker) auf 1,6 µl/mg TG (820 mM Zucker) sowie eine Abnahme der spezifischen Wachstumsrate µ und der Zellausbeute $Y_{x/s}$. Die Bestimmung intrazellulärer Glucose bzw. Fructose in Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration des Mediums ergab bei konstanter Glucose- bzw. Fructose-Aufnahmerate einen entsprechenden Anstieg intrazellulärer Konzentrationen an nichtphosphorylierter Glucose- bzw. Fructose. Oberhalb einer extrazellulären Konzentration von 410 mM Glucose bzw. 530 mM Fructose wurden bis zu 67 mM zellinternes Sorbit ermittelt, obgleich die extrazelluläre Sorbitkonzentration maximal 1,3 mM betrug. Legte man äquimolare Konzentrationen an Glucose und Fructose (je 1-9 % w/v) im Medium vor, trugen außer intrazellulärer Glucose und Fructose hohe intrazelluläre Sorbitkonzentrationen (≤ 157 mM) zur osmotischen Stabilisierung der Zelle bei.

2. Zuckertransport-Messungen ergaben für *Z. mobilis* ein nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion arbeitendes konstitutives Glucose-Transportsystem. Versuche zum Fructosetransport zeigten außer Substratsättigung und konstitutivem Vorkommen die Hemmbarkeit durch Glucose. Die Bestimmungen der apparenten kinetischen Daten für den Glucose- (K_M:11

mM; V_{Max}:220 nmol/min•mg TG) bzw. Fructosetransport (K_M:27-30 mM; V_{Max}:90-110 nmol/min•mg TG) weisen auf ein mit hoher Geschwindigkeit arbeitendes, wenig affines Glucose- bzw. Fructose-Transportsystem hin.

3. Untersuchungen zum Einfluß von osmotischen Gradienten auf das Wachstum und Cytoplasmavolumen von *Z. mobilis* zeigten, daß Maltose (impermeabel) eine signifikante Cytoplasmavolumen-Reduktion verursachte, die durch Zusatz von Glucose (57 mOs/kg) zum Testansatz mit Maltose (445 mOs/kg) fast vollständig revertiert werden konnte. Die Verwendung des permeablen, aber kaum metabolisierbaren Zuckers Xylose ergab unabhängig von den extrazellulären Xylosekonzentrationen (2-14 % w/v) ein weitgehend konstantes Cytoplasmavolumen (2,8 µl/mg TG), wobei der Gradient zwischen extra- und intrazellulärer Xylose 1,2 betrug.

6. Literaturverzeichnis

Adams, R., Bygraves, J., Kogut, M., Russell, N.J. (1987) The role of osmotic effects in haloadaptation of *Vibrio costicola*. J. Gen. Microbiol. 133:1861-1870

Adler, L., Gustafsson L. (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol. 124:123-130

Adler, L., Blomberg, A., Nilsson A. (1985) Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 162:300-306

Alemohammad, M.M., Knowles, C.J. (1974) Osmotically induced volume and turbidity changes of *Escherichia coli* due to salts, sucrose and glycerol, with particular reference to the rapid permeation of glycerol into the cell. J. Gen. Microbiol. 82:125-142

Algar, E.M., Scopes, R.K. (1985) Studies on cell-free metabolism: Ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 2:275-287

Allard, W.J., Lienhard, G.E. (1985) Monoclonal antibodies to the glucose transporter from human erythrocytes. J. Biol. Chem. 260:8668-8675

Anand, J.C., Brown, A.D. (1968) Growth rate patterns of so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. J. Gen. Microbiol. 52:205-212

André, L., Nilsson, A., Adler, L. (1988) The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Gen. Microbiol. 134:669-677

Bagnasco, S.M., Murphy, H.R., Bedford, J.J., Burg, M.B. (1988) Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. Am. J. Physiol. 254:C788-C792

Baratti, J.C., Bu'Lock, J.D. (1986) *Zymomonas mobilis*: a bacterium for ethanol production. Biotechnol Adv. 4:95-115

Barker, B.T.P., Hillier, V.F. (1912) Cider sickness. J. Agric. Sci. 5:67-85

Barnell, W.O., Yi, K.C., Conway, T. (1990) Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. J. Bacteriol. 172:7227-7240

Barron, A., Jung, J.U., Villarejo, M. (1987) Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 262:11841-11846

Barrow, K.D., Collins J.G., Norton R.S., Rogers P.L., Smith G.M. (1984a) ^{31}P Nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. J. Biol. Chem. 259:5711-5716

Barrow, K.D., Collins, J.G., Leigh, D.A., Rogers, P.L., Warr, R.G. (1984b) Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:225-232

Barrow, K.D., Collins, J.G., Rogers, P.L., Smith, G.M. (1984c) The structure of a novel polysaccharide isolated from *Zymomonas mobilis* determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Eur. J. Biochem. 145:173-179

Beker, M.J., Shvinka, J.E., Pankova, L.M., Laivenieks, M.G., Mezhbarde, N. (1990) A simultaneous sucrose bioconversion into ethanol and levan by *Zymomonas mobilis*. Appl. Biochem. Biotechnol. 24/25:265-274

Belaich, J.P., Senez J.C., Murgier M. (1968) Microcalorimetric study of glucose permeation in microbial cells. J. Bacteriol. 95:1750-1757

Ben Amotz, A., Avron, M. (1973) The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic algae *Dunaliella parva*. Plant Physiol. 51:875-878

Bental, M., Oren-Shamir, M., Avron, M., Degani, H. (1988) ^{31}P and ^{13}C-NMR studies of the phosphorus and carbon metabolites in the halotolerant alga, *Dunaliella salina*. Plant Physiol. 87:320-324

Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F., Stork, H. (1974a) D-Glucose-Bestimmung und Glucose-6-P-Dehydrogenase. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1241-1246

Bergmeyer, H.U., Gruber, W., Gutman, I. (1974b) D-Sorbit. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1368-1371

Bernt, E., Bergmeyer, H.U. (1974) D-Fructose. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1349-1352

Bernt, E., Gutman, I. (1974) Äthanol: Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogenase und NAD. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1545-1548

Birnbaum, M.J., Haspel, H.C., Rosen, O.M. (1986) Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporting protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5784-5788

Blomberg, A. (1988) Osmoregulation and osmotolerance in yeast. Dissertation, Universität Göteborg, Schweden.

Boenigk, R., Dürre, P., Gottschalk, G. (1989) Carrier-mediated acetate transport in *Acetobacterium woodii*. Arch. Microbiol. 152:589-593

Bringer S., Härtner T., Poralla K., Sahm H. (1985) Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 140:312-316

Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1988) Metabolic shifts in *Zymomonas mobilis* in response to growth conditions. FEMS Microbiol. Rev. 54:131-142

Bringer-Meyer, S., Schimz, K.L., Sahm, H. (1986) Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*, isolation and partial characterization. Arch. Microbiol. 146:105-110

Bringer-Meyer, S., Scollar, M., Sahm, H. (1985) *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:134-139

Brown, A.D. (1974) Microbial water relations: features of the intracellular composition of sugar-tolerant yeasts. J. Bacteriol. 118:769-777

Brown, A.D. (1975) Microbial water relations. Effects of solute concentrations on the respiratory activity of sugar-tolerant and non-tolerant yeasts. J. Gen. Microbiol. 86:241-249

Brown, A.D. (1976) Microbial water stress. Bacteriol. Rev. 40:803-846

Brown, A.D. (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. Adv. Microbial Physiol. 17:181-242

Brown, A.D., Edgley, M. (1980) Osmoregulation in yeast. In: Rains, D.W., Valentine, R.C., Hollaender, A. (Hrsg.) Genetic engineering of osmoregulation, Plenum Press, New York, S. 75-90

Brown, A.D., Johnson, B. (1970) Influence of the concentration of glucose and galactose on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 64:279-287

Brown, A.D., Simpson J.R. (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. J. Gen. Microbiol. 72:589-591

Brown, A.D., Mackenzie, K.F., Singh, K.K. (1986) Selected aspects of microbial osmoregulation. FEMS Microbiol. Rev. 39:31-36

Brown, L.M., Hellebust, J.A. (1978) Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in the green alga *Stichococcus bacillaris*. Can. J. Bot. 56:676-679

Brown, L.M., Hellebust, J.A. (1980) The contribution of organic solutes to osmotic balance in some green and eustigmatophyte algae. J. Phycol. 16:265-270

Buchholz, S.E., Dooley, M.M., Eveleigh, D.E. (1987) *Zymomonas* - an alcoholic enigma. TIBTECH 5:199-204

Burg, M.B. (1988) Role of aldose reductase and sorbitol in maintaining the medullary intracellular milieu. Kidney Int. 33:635-641

Burg, M.B., Kador, P.F. (1988) Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. J. Clin. Invest. 81:635-640

Button, D.K., Egan, J.B., Hengstenberg, W., Morse, M.L. (1973) Carbohydrate transport in *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52:880-885

Cairney, J., Booth, I.R., Higgins, C.F. (1985a) *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. J. Bacteriol. 164:1218-1223

Cairney, J., Booth, I.R., Higgins, C.F. (1985b) Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. J. Bacteriol. 164:1224-1232

Calmes, R., Deal, S.J. (1972) Glycerol transport by *Nocardia asteroides*. Can. J. Microbiol. 18:1703-1708

Cangelosi, G.A., Martinetti, G., Nester, E.W. (1990) Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β-1,2-glucan. J. Bacteriol. 172:2172-2174

Carey, V.C., Ingram, L.O. (1983) Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effects of ethanol and glucose. J. Bacteriol. 154:1291-1300

Chirife, J., Ferro-Fontan, C., Benmergui, E.A. (1980) The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods, a_w prediction in aqueous non-electrolyte solutions. J. Food Technol. 15:59-70

Cirillo, V.P. (1968) Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in Baker's yeast. J. Bacteriol. 95:603-611

Cirillo, V.P. (1989) Sugar transport in normal and mutant yeast cells. Meth. Enzym. 174:617-622

Converti, A., Perego, P., Lodi, A., Parisi, F., Borghi, M. (1985) A kinetic study of *Sacchromyces* strains: performance at high sugar concentrations. Biotechnol. Bioeng. 27:1109-1114

Cowley, B.J., Ferraris, J.D., Carper, D., Burg, M.B. (1990) In vivo osmoregulation of aldose reductase mRNA, protein, and sorbitol in renal medulla. Am. J. Physiol. 258:F154-F161

Cram, W.J. (1976) 11. Negative feedback regulation of transport in cells. The maintenance of turgor, volume and nutrient supply. In: Lüttge U., Pitman M.G. (Hrsg.) Encyclopaedia of plant physiology, New Series, Vol 2A. Springer Verlag, Berlin, S. 284-316

Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. 53:121-147

Danchin, A. (1987) Membrane integration of carbohydrate transport in bacteria. Microbiol. Sci. 4:267-269

Dawes, E.A., Ribbons, D.W. (1966) Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. Biochem. J. 98:804-812

Dills, S.S., Apperson, A., Schmidt, M.R., Saier Jr, M.H. (1980) Carbohydrate transport in bacteria. Microbiol. Rev. 44:385-418

Di Marco, A.A., Romano, A.H. (1985) D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 49:151-157

Doelle, H.W. (1982a) Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:241-246

Doelle, H.W. (1982b) The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15:20-24

Does, A.L., Bisson, L.F. (1989) Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. J. Bacteriol. 171:1303-1308

Donachie, W.D., Robinson, A.C. (1987) Cell division: parameter values and the process. In: Neidhardt, F.C. (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Bd. 2, American Society for Microbiology, Washington, DC, S. 1578-1593

Driessen, M., Postma, P.W., Van Dam, K. (1987) Energetics of glucose uptake in *Salmonella typhimurium*. Arch. Microbiol. 146:358-361

Duckworth, R.B. (1975) Water relations of foods. Academic Press, New York

Duguid, J.P. (1951) The demonstration of bacterial capsules and slime. J. Path. Bact. 63:673-685

Dunlap, V.J., Csonka, L.N. (1985) Osmotic regulation of L-proline transport in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 163:296-304

Dylan, T., Helinski, D.R., Ditta, G.S. (1990) Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β-(1->2)-glucan. J. Bacteriol. 172:1400-1408

Edgley, M., Brown, A.D. (1978) Response of xerotolerant and non-tolerant yeasts to water stress. J. Gen. Microbiol. 104:343-345

Edgley, M., Brown, A.D. (1983) Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. J. Gen. Microbiol. 129:3453-3463

Edye, L.A., Kositanont, C., Doelle, H.W. (1990) Fructose phosphorylation by *Zymomonas mobilis* glucokinase. Acta Biotechnol. 10:49-53

Eggstein, M., Kuhlmann, E. (1974) Triglyceride und Glycerin. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1871-1877

Erni, B. (1989) Glucose transport in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Rev. 63:13-24

Eveleigh, D.H., Stokes, H.W., Daily, E.L. (1983) Recombinant approaches for enhancing the ethanol productivity of *Zymomonas mobilis*. In: Wise, D.L. (Hrsg.) Organic chemicals from biomass, The Benjamin/Cummings Publishing Company, London, S. 70-91

Feldmann, S. (1991) Entwicklung eines Xylose verwertenden *Zymomonas mobilis* Stammes durch Expression der aus *Klebsiella pneumoniae* KAY2026 klonierten und charakterisierten Gene für Xyloseisomerase und Xylulokinase und des Transketolase-Gens aus *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Düsseldorf

Finn, R.K., Bringer, S., Sahm, H. (1984) Fermentation of arabinose to ethanol by *Sarcina ventriculi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:161-166

Fougère, F., Le Rudelier, D. (1990) Uptake of glycine betaine and its analogues by bacteroids of *Rhizobium meliloti*. J. Gen. Microbiol. 136:157-163

Friedmann, M.H. (1986) Principles and models of biological transport. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Fuhrmann, G.F., Völker, B., Potthast, M. (1989) Kinetic analysis and simulation of glucose transport in plasma membrane vesicles of glucose-repressed and derepressed *Saccharomyces cerevisiae* cells. Experientia 45:1018-1023

Fulda, S., Hagemann, M., Libbert, E. (1990) Release of glucosylglycerol from the cyanobacterium *Synechocystis* spec. SAG 92.79 by hypoosmotic shock. Arch. Microbiol. 153:405-408

Galinski, E. (1986) Salzadaptation durch kompatible Solute bei halophilen phototrophen Bakterien. Dissertation, Universität Bonn

Galinski, E.A., Herzog, R.M. (1990) The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). Arch. Microbiol. 153:607-613

Gibbs, M., De Moss, R.D. (1951) Ethanol formation in *Pseudomomnas lindneri*. Arch. Biochem. Biophys. 34:478-479

Gibbs, M., De Moss, R.D. (1954) Anaerobic dissimilation of ^{14}C- labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. J. Biol. Chem. 207:689-694

Gould, G.W., Bell, G.I. (1990) Facilitative glucose transporters: an expanding family. TIBS 15:18-23

Gowrishankar, J. (1985) Identification of osmoresponsive genes in *Escherichia coli*: evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. J. Bacteriol. 164:434-445

Goyal, A. (1989) Intracellular glycerol in *Dunaliella* is depleted by intracellular metabolism in response to hypoosmotic stress by dilution. FEMS Microbiol. Lett. 61:145-148

Gustafsson, L. (1979) The ATP pool in relation to the production of glycerol and heat during growth of the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol. 120:15-23

Gutman, I. (1974) Maltose. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1230-1233

Hagemann, M., Erdmann, N., Wittenburg, E. (1987) Synthesis of glucosylglycerol in salt-stressed cells of the cyanobacterium *Microcystis firma*. Arch Microbiol. 148:275-279

Helgerson, A.L., Carruthers, A. (1989) Analysis of protein-mediated 3-O-methylglucose transport in rat erythrocytes: rejection of the alternating conformation carrier model for sugar transport. Biochemistry 28:4580-4594

Hellebust, J.A. (1976) Osmoregulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 27:485-505

Hengstenberg, W., Reiche, B., Eisermann, R., Fischer, R., Keßler, U., Tarrach, A., De Vos, W.M., Kalbitzer, H.R., Glaser, S. (1989) Structure and function of proteins involved in sugar transport by the PTS of gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 63:35-42

Higgins, C.F., Sutherland, L., Cairney, J., Booth, I.R. (1987) The osmotically regulated *proU* locus of *Salmonella typhimurium* encodes a periplasmic betaine-binding protein. J. Gen. Microbiol. 133:305-310

Hocking, A.D. (1986) Effects of water activity and culture age on the glycerol accumulation patterns of five fungi. J. Gen. Microbiol. 132:269-275

Hocking, A.D. (1988) Strategies for microbial growth at reduced water activities. Microbiol. Sci. 5:280-284

Hocking, A.D., Norton, R.S. (1983) Natural-abundance ^{13}C nuclear magnetic resonance studies on the internal solutes of xerophilic fungi. J. Gen. Microbiol. 129:2915-2925

Höfer, M. (1989) Accumulation of electroneutral and charged carbohydrates by proton cotransport in *Rhodotorulla*. Meth. Enzym. 174:629-653

Hutkins, R.W., Ellefson, W., Kashket, E.R. (1987) Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 53:2275-2281

Imhoff, J.F. (1986) Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. FEMS Microbiol. Rev. 39:57-66

Imhoff, J.F., Riedel, T. (1989) Requirements for, and cytoplasmic concentrations of, sulphate and chloride, and cytoplasmic volume spaces in the halophilic bacterium *Ectothiorhodospira mobilis*. J. Gen. Microbiol. 135:237-244

Ingram, M. (1957) Micro-organisms resisting high concentrations of sugars or salts. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 7:90-133

Jennings, D.H. (1984) Polyol metabolism in fungi. Adv. Microbial Physiol. 25:149-193

Jones, R.P. (1987) Use of iso-osmolality plots to characterise yeast fermentative performance. J. Appl. Bacteriol. 62:349-359

Jones, R.P., Greenfield, P.F. (1986) Role of water activity in ethanol fermentations. Biotechnol. Bioeng. 28:29-40

Jovall, P.A., Tunblad-Johansson, I., Adler, L. (1990) ^{13}C-NMR analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol. 154:209-214

Kennedy, J.F., Stevenson, D.L., White, C.A., Viikari, L. (1989) The chromatographic behaviour of a series of fructooligosaccharides derived from levan produced by fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. Carbohydr. Polymer 10:103-113

Klingenberg, M., Pfaff, E. (1967) Means of terminating reactions. Meth. Enzymol. 10:680-684

Kluyver, A.J., Hoppenbrouwers, W.J. (1931) Ein merkwürdiges Gärungsbakterium: Linder's *Thermobacterium mobile*. Archiv für Mikrobiologie 2:245-260

Konings, W.N., Poolman, B., Driessen, A.J.M. (1989) Bioenergetics and solute transport in lactococci. CRC Crit. Rev. Microbiol. 16:419-476

Kubitschek, H.E. (1990) Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. J. Bacteriol. 172:94-101

Landfald, B., Strøm, A.R. (1986) Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 165:849-855

Lang, J.M., Cirillo, V.P. (1987) Glucose transport in a kinaseless *Saccharomyces cerevisiae* mutant. J. Bacteriol. 169:2932-2937

Larsen, P.I., Sydnes, L.K., Landfald, B., Strøm, A.R. (1987) Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. Arch. Microbiol. 147:1-7

Larsson, C., Morales, C., Gustafsson, L., Adler, L. (1990) Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. J. Bacteriol. 172:1769-1774

Lato, M., Brunelli, B., Ciuffini, G., Mezzetti, T. (1968) Bidimensional thin-layer chromatography of carbohydrates on silica gel impregnated with boric acid. J. Chromatog. 34:26-34

Lawford, H.G. (1988) A new approach to improving the performance of *Zymomonas mobilis* in continuous ethanol fermentations. Appl. Biochem. Biotechnol. 17:203-218

Lee, K.J., Rogers, P.L. (1983) The fermentation kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Chem. Eng. J. 27:B31-B38

Lee, K.J., Tribe, D.E., Rogers, P.L. (1979) Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. Biotechnol. Lett. 1:421-426

Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E., Rogers, P.L. (1980) Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 2:339-344

Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E., Rogers, P.L. (1981) The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on fructose and sucrose media. Biotechnol. Lett. 3:207-212

Le Rudelier, D., Valentine, R.C. (1982) Genetic engineering in agriculture: osmoregulation. TIBS 7:431-433

Le Rudelier, D., Strøm, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T., Valentine, R.C. (1984) Molecular biology of osmoregulation. Science 224:1064-1068

Lindner, P. (1928) Gärungsstudien über Pulque in Mexico. Ber. Westpreuss. Bot. Zool. Ver. 50:252-255

Low, P.S. (1985) Molecular basis of the biological compatibility of nature's osmolytes. In: Gilles, R., Gilles-Baillien, M. (Hrsg.) Transport processes - iono and osmoregulation, Springer Verlag, Berlin, S. 469-470

Loureiro-Días, M.C. (1987) Glucose and polyol transport systems in *Candida utilis* and their regulation. J. Gen. Microbiol. 133:2737-2742

Luard, E.J. (1982a) Accumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potential. J. Gen. Microbiol. 128:2563-2574

Luard, E.J. (1982b) Effect of osmotic shock on some intracellular solutes in two filamentous fungi. J. Gen. Microbiol. 128:2575-2581

Mackay, M.A., Norton, R.S., Borowitzka, L.S. (1984) Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 130:2177-2191

Maenz, D.D., Cheeseman, C.J. (1987) The Na^+ independant D-glucose transporter in the enterocyte basolateral membrane: orientation and cytochalasin B binding characteristics. J. Membrane Biol. 97:259-266

Mathlouthi, M., Larreta-Garde, V., Xu, Z.F., Thomas, D. (1989) Solute-solvent and water activity of small carbohydrates: application to the study of enzyme stability in aqueous sugar solutions. J. Carbohydrate Chemistry 8:233-245

May, G., Faatz, E., Villarejo, M., Bremer, E. (1986) Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. 205:225-233

Mc Gill, D.J., Dawes, E.A. (1971) Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*. Biochem. J. 125:1059-1068

Mc Ginnis, J.F., Paigen, K. (1967) Catabolite inhibition: a general phenomenon in the control of carbohydrate utilization. J. Bacteriol. 100:902-913

Meikle A.J., Reed R.H., Gadd G.M. (1988) Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 134:3049-3060

Mitchell, P. (1970) Membranes of cells and organelles: morphology, transport and metabolism. Symposium of the Society for General Microbiology 20:121-166

Mitchell, P. (1972) Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. Bioenergetics 3:5-24

Mitchell, P., Moyle, J. (1956) Osmotic function and structure in bacteria. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 6:150-180

Möllering, H., Bergmeyer, H.U. (1974) D-Gluconat. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1288-1292

Montenecourt, B.S. (1985) Zymomonas, a unique genus of bacteria. In: Demain, A.L., Solomon, N.A. (Hrsg.) Biology of industrial microorganisms, Benjamin-Cummings Publishing Co., Menlo Park, California, USA, S. 261-289

Moore, D.J., Reed, R.H., Stewart, W.D.P. (1987) A glycine betaine transport system in *Aphanothece halophytica* and other glycine betaine-synthesising cyanobacteria. Arch. Microbiol. 147:399-405

Moriyama, T., Garcia-Perez, A., Burg, M.B. (1989) Osmotic regulation of aldose reductase protein synthesis in renal medullary cells. J. Biol. Chem. 264:16810-16814

Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E., Clarke, K.J. (1983) Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 129:1023-2034

Mueckler, M. (1990) Family of glucose-transporter genes. Diabetes 39:6-11

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W., Lienhard, G.E., Lodish, H.F. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. Science 229:941-945

Nobre, M.F., Da Costa, M.S. (1985a) Factors favouring the accumulation of arabinitol in the yeast *Debaryomyces hansenii*. Can. J. Microbiol. 31:467-471

Nobre, M.F., Da Costa, M.S. (1985b) The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress. Can. J. Microbiol. 31:1061-1064

Noll, F. (1974) Bestimmung mit LDH, GPT und NAD. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1521-1525

Onishi, H. (1957) Studies on osmophilic yeasts. Salt-tolerance and sugar-tolerance of osmophilic soy yeasts. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 21:137-142

Onishi, H., Shiromaru, Y. (1984) Physiological changes induced by salt stress in a salt-tolerant soy-yeast, *Saccharomyces rouxii*. FEMS Microbiol Lett. 25:175-178

Peinado, J.M., Cameira-Dos-Santos, P.J., Loureiro-Días, M.C. (1988) Regulation of glucose transport in *Candida utilis*. J. Gen. Microbiol. 135:195-201

Perroud, B., Le Rudelier, D. (1985) Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. J. Bacteriol. 161:393-401

Pitt, J.I., Christian, J.H.B. (1968) Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. Appl. Microbiol. 16:1853-1858

Pocard, J.A., Bernard, T., Smith, L.T., Le Rudelier, D. (1989) Characterization of three choline transport activities in *Rhizobium meliloti*: modulation by choline and osmotic stress. J. Bacteriol. 171:531-537

Postma, P.W., Lengeler, J.W. (1985) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. Microbiol. Rev. 49:232-269

Postma, E., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P. (1988) Adaptation of the kinetics of glucose transport in the yeast *Candida utilis* CBS 621: a continuous-culture study. J. Gen. Microbiol. 134:1109-1116

Postma, E., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P. (1989) Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. Yeast 5:159-165

Prior, B.A., Kenyon, C.P., van der Veen, M., Mildenhall, J.P. (1987) Water relations of solute accumulation in *Pseudomonas fluorescens*. J. Appl. Bacteriol. 62:119-128

Ramos, J., Szkutnicka, K., Cirillo, V.P. (1988) Relationship between low- and high-affinity glucose transport of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 170:5375-5377

Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R., Stewart, W.D.P. (1984a) Osmotic adjustment in cyanobacteria from hypersaline environments. Arch. Microbiol. 138:333-337

Reed R.H., Richardson D.L., Warr S.R.C., Stewart W.D.P. (1984b) Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 130:1-4

Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R., Gadd, G.M. (1987) Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 53:2119-2123

Rehr, B., persönliche Mitteilung

Richey, D.P., Lin, E.C.C. (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 112:784-790

Rogers, P.L., Lee, K.J., Tribe, D.E. (1979) Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. Biotechnol. Lett. 1:165-170

Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E. (1982) Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem. Eng. 23:37-84

Romano, A.H., Trifone, J.D., Brustolon, M. (1979) Distribution of the phospho*enol*pyruvate: glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. J. Bacteriol. 139:93-97

Rottenberg, H. (1979) The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. Meth. Enzymol. 55:547-569

Rua, J., De Arriaga, D., Busto, F., Soler, J. (1989) Effect of glucose on isocitrate lyase in *Phycomyces blakesleeanus*. J. Bacteriol. 171:6391-6393

Russell, N.J. (1989) Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. J. Bioenerg. Biomembranes 21:93-113

Russell, J.B. (1990) Low-affinity, high capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. Appl. Environ. Microbiol. 56:3304-3307

Russell, N.J., Adams, R., Bygraves, J., Kogut, M. (1986) Cell envelope phospholipid changes in a moderate halophile during phenotypic adaptation to altered salinity and osmotic stress. FEMS Microbiol. Rev. 39:103-107

Saheb, S.A. (1972) Perméation du glycérol et sporulation chez *Bacillus subtilis*. Can. J. Microbiol. 18:1307-1313

Saier jr., M.H. (1985) Mechanisms and regulation of carbohydrate transport in bacteria. Academic Press, New York.

Saier jr., M.H., Yamada, M., Erni, B., Suda, K., Lengeler, J., Argos, P., Rak, B., Schnetz, K., Lee, C.A., Stewart, G.C., Breidt, F., Waygood, E.B., Peri, K.G., Doolittle, R.F. (1988) Sugar permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. FASEB J. 2:199-208

Sanno, Y., Wilson, T.H., Lin. E.C.C. (1968) Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32:344-349

Sato, M., Tsuchiya, H., Kato, M., Yamamoto, K., Kanematsu, N., Takagi, N., Namikawa, I (1988) Sucrose concentrations in the growth medium influence the membrane lipids of *Streptococcus mutans*. Lett. Appl. Microbiol. 6:69-73

Scarr, M.P., Rose, D. (1966) Study of osmophilic yeasts producing invertase. J. Gen. Microbiol. 45:9-16

Scheie, P.O., Rehberg, R. (1972) Response of *Escherichia coli* B/r to high concentrations of sucrose in a nutrient medium. J. Bacteriol. 109:229-235

Schimz, K.L., Irrgang, K., Overhoff, B. (1985) Trehalose, a cytoplasmic reserve polysaccharide of *Cellulomonas* sp. DSM20108: its identification, carbon-source-dependent accumulation, and degradation during starvation. FEMS Microbiol. Lett. 30:165-169

Schmidt, A., Bringer-Meyer, S., Poralla, K., Sahm, H. (1986) Effect of alcohols and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:32-36

Schmidt, A., Bringer-Meyer, S., Poralla, K., Sahm, H. (1989) Influence of ethanol on the activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A-reductase and squalene-hopene-cyclase in *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:170-175

Schobert, B. (1977) Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? J. Theor. Biol. 68:17-26

Schreder, K., Brunner, R., Hampe, R. (1934) Die anaerobe und aerobe Gärung von *Pseudomonas lindneri* Kluyver in glucosehaltiger anorganischer Nährlösung. Biochem. Z. 273:223-242

Scopes, R.K., Griffiths-Smith, K. (1986) Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glycolytic enzymes. Biotechnol. Lett. 8:653-656

Scopes, R.K., Testolin, V., Stoter, A., Griffiths-Smith, K., Algar, E.M. (1985) Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 228:627-634

Scott, W.J. (1957) Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Food Res. 7:83-127

Stahl, E. (1962) Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag, Berlin.

Stal, L.J., Reed, R.H. (1987) Low molecular mass carbohydrate accumulation in cyanobacteria from a marine microbial mat in response to salt. FEMS Microbiol. Ecol. 45:305-312

Stock, J.B., Roseman, S. (1971) A sodium dependant sugar co-transport system in bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44:132-138

Stock, J.B., Rauch, B., Roseman, S. (1977) Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 252:7850-7861

Strohdeicher, M., Schmitz, B., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1988) Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:378-382

Strøm, A.R., Falkenberg, P., Landfald, B. (1986) Genetics of osmoregulation in *Escherichia coli*: uptake and biosynthesis of organic osmolytes. FEMS Microbiol. Rev. 39:79-86

Sweet, G., Gandor, C., Voegele, R., Wittekindt, N., Beuerle, J., Truniger, V., Lin, E.C.C., Boos, W. (1990) Glycerol facilitator of *Escherichia coli*: cloning of *glpF* and identification of the *glpF* product. J. Bacteriol. 172:424-430

Swings J., De Ley J. (1977) The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev. 41:1-46

Thompson, J. (1987) Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 46:221-231

Thompson, J. (1988) Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms. Biochemie 70:325-336

Thorens, B., Charron, M.J., Lodish, H.F. (1990) Molecular physiology of glucose transporters. Diabetes Care 13:209-218

Tsay, S.S., Brown K.K., Gaudy, E.T. (1971) Transport of glycerol by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 108:82-88

Tully, R.E., Keister, D.L., Gross, K.C. (1990) Fractionation of the β-linked glucans of *Bradyrhizobium japonicum* and their response to osmotic potential. Appl. Environ. Microbiol. 56:1518-1522

Uezato, T., Fujita, M. (1988) Cytochalasin B-sensitive, sodium ion-dependent glucose transport in intestinal microvillous membrane. Biochimie 70:1775-1779

Van Eck, J.H., Prior, B.A., Brandt, E.V. (1989) Accumulation of polyhydroxy alcohols by *Hansenula anomala* in response to water stress. J. Gen. Microbiol. 135:3505-3513

Van Zyl, P.J., Prior, B.A. (1990) Water realtions of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:12-17

Viikari, L. (1984) Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:118-123

Viikari, L. (1986) By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. Dissertation, Universität Helsinki

Viikari, L. (1988) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. CRC Critical Rev. Biotechnol. 7:237-261

Viikari, L., Gisler, R. (1986) By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas*-strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:240-244

Viikari, L., Korhola, M. (1986) Fructose metabolism of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:471-476

Viikari, L., Linko, M. (1986) Rate and yield limiting factors in continuous fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 8:139-144

Waffenschmidt, S., Jaenicke, L. (1987) Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate. Anal. Biochem. 165: 337-340

Walter, R.P., Morris, J.G., Kell, D.B. (1987) The roles of osmotic stress and water activity in the inhibition of the growth, the glycolysis and glucose phosphotransferase system of *Clostridium pasteurianum*. J. Gen. Microbiol. 133:259-266

Wasseff, M.K. (1977) Fungal lipids. Adv. Lipid Res. 15:159-232

Wegmann, K. (1986) Osmoregulation in eukaryotic algae. FEMS Microbiol. Rev. 39:37-43

Wieland, O., Witt, I. (1974) Dihydroxyaceton. In: Bergmeyer H.U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1487-1490

Williams, S.A., Birnbaum, M.J. (1988) The rat facilitated glucose transporter gene. J. Biol. Chem. 263:19513-19518

Wilson, D.B. (1978) Cellular transport mechanisms. Annu.Rev. Biochem. 47:933-965

Wilson, T.H., Flagg, J.L., Wilson, D. M. (1978) H^+-sugar cotransport in bacteria. Acta Physiol. Scand. Special Suppl. 1978:389-397

Yagi, T. (1988) Intracellular levels of glycerol for initation of growth under salt-stresed conditions in a salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*. FEMS Microbiol. Lett. 49:25-30

Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science 217:1214-1222

Zachariou M., Scopes R.K. (1986) Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bacteriol. 167:863-869

Zidan, M.A., Abdel-Mallek, A.Y. (1987) Effect of NaCl on the accumulation of glycerol by three *Aspergillus* species. J. Basic Microbiol. 27:393-397

Zimmermann, U. (1978) Physics of turgor and osmoregulation. Ann. Rev. Physiol. 29:121-148

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

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Krämer bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates sowie für zahlreiche anregende Diskussionen und wertvolle Hinweise.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Bringer-Meyer und Herrn Dr. B. Neuß für die Betreuung, ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und vielen Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Dr. H. Ebbighausen bedanke ich mich für die Einführung in die Silikonölzentrifugation. Für die Unterstützung bei der Durchführung von Zuckeranalysen und wertvolle Diskussionen danke ich Herrn Dr. K.-L. Schimz.

Bei allen Mitarbeitern des *Zymomonas* Labors, insbesondere Frau D. Rittmann, Frau Ing. M. Hermans und Herrn Dipl. Biol. M. Strohdeicher bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern des Instituts, die mich durch Anregungen und praktische Hilfe unterstützt haben.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2674
September 1992
ISSN 0366-0885