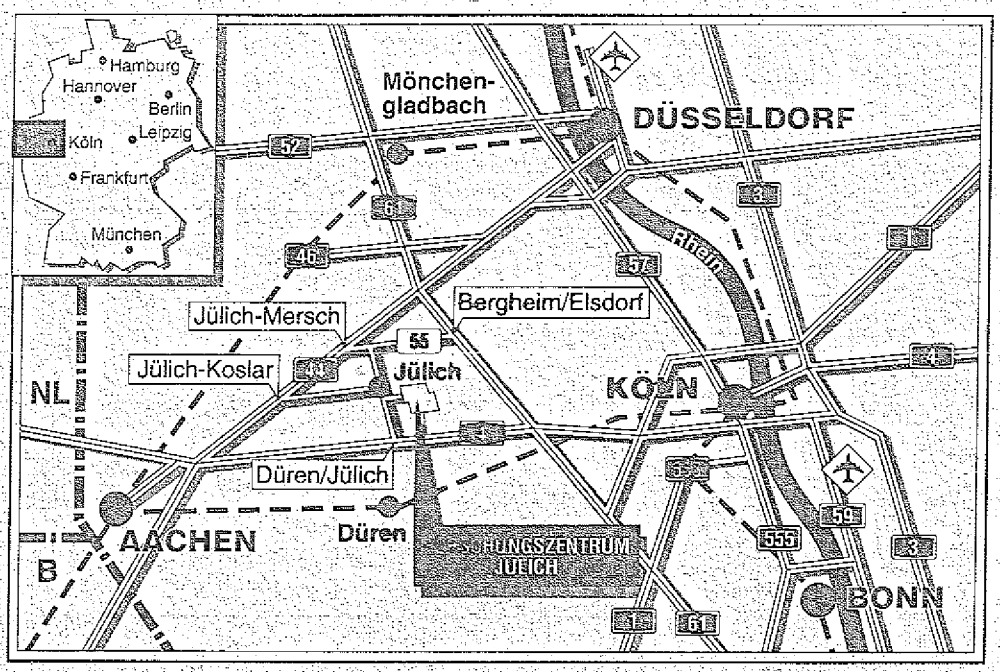
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports

Marcella Gutmann



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2836
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-2836
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports

Marcella Gutmann

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American type culture collection
B	Base
BPAB	Bromphenacylbromid
CCCP	Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Desintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
GDH	Glutamatdehydrogenase
GOGAT	Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase
INT	Jodnitrotetrazolium-Violett
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MTT	Thiazolyl-Blau; 3-(4',5'-dimethyl-thiazolyl-2-)-2,4-(diphenyltetrazoliumbromid)
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
OD_{600}	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
P_i	Anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PES(H)	5-Methylphenazinium-ethylsulfat
PP_i	Pyrophosphat
S	Säure
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TPP	Tetraphenylphosphoniumbromid
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
$\Delta\Psi$	Membranpotential
ΔpH	pH-Gradient
Δp	Protonenmotorische Kraft

I. EINLEITUNG

Glutamat-produzierende Organismen wurden 1957 erstmalig beschrieben (Kinoshita et al., 1957). Es handelt sich dabei um eine Gruppe von nahe verwandten, Gram-positiven, nicht Sporen-bildenden und unbeweglichen Bakterien, die als Gattung *Corynebacterium* der Familie Corynebacteriaceae zusammengefaßt wurden (Kinoshita und Tanaka, 1972). *Corynebacterium glutamicum* (früher *Micrococcus glutamicus*), *C. melassecola*, *C. callunae*, *Brevibacterium flavum*, *B. lactofermentum* und *B. ammoniagenes* sind einige bekannte Vertreter dieser Familie. Die früher genutzte Methode zur Gewinnung von Glutamat, die saure Hydrolyse von Weizengluten und Sojabohnenprotein, konnte durch den Einsatz dieser Mikroorganismen in einer Fermentation ersetzt werden. Als Ausgangssubstrate für die Glutamatfermentation können Kohlenhydrate und Kohlenwasserstoffe dienen. 1992 wurden mehr als 400 000 t L-Glutamat ausschließlich durch die Fermentation der genannten Bakterien hergestellt. Glutamat findet hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie als Würzmittel und Geschmacksverstärker Verwendung.

I.1. Glutamatproduktion durch *Corynebacterium glutamicum*

Glutamat wird von Wildtypzellen coryneformer Bakterien produziert, jedoch erfolgt die Produktion erst nachdem die Zellen einer besonderen Behandlung unterzogen wurden. Es wird angenommen, daß alle, im folgenden näher erläuterten Methoden zur Auslösung der Glutamatproduktion zu einer Veränderung der physikalischen Eigenschaften der Cytoplasmamembran der Zellen führen. Die Biotin-Limitierung der Biotin-auxotrophen Bakterien ist die zuerst entdeckte und wohl bekannteste Methode zur Auslösung der Glutamatproduktion. Biotin dient carboxylierenden und decarboxylierenden Enzymen als prosthetische Gruppe zur Übertragung aktivierter CO_2-Gruppen (Knowles, 1989). Es ist so auch an der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA beteiligt. Diese durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase katalysierte Reaktion liefert den Grundbaustein zur Fettsäurebiosynthese. Biotinmangel hat daher bei *C. glutamicum* eine Hemmung der Fettsäurebiosynthese zur Folge, die sich in einer ungefähr 50%igen Reduktion des Phospholipidgehalts der Cytoplasmamembran unter Glutamatproduktionsbedingungen bemerkbar macht (Takinami et al., 1968).

Die Notwendigkeit zur Kontrolle der Biotinversorgung ist dafür verantwortlich, daß zur Glutamatproduktion ausgelöst durch Biotinmangel nur Biotin-freie Medienbestandteile

und Kohlenstoffsubstrate verwendet werden können. Um auch billige, jedoch mit Biotin verunreinigte C-Quellen wie z.B. Zuckerrohr- bzw. Zuckerrübenmelasse und Stärkehydrolysate einsetzen zu können, wurden weitere auch in Anwesenheit eines Überschußes von Biotin durchzuführende Methoden zur Auslösung der Glutamatproduktion entwickelt. So führt auch die Anzucht von Glycerin- bzw. Ölsäure-auxotrophen Mutanten unter Glycerin- bzw. Ölsäuremangel zur Glutamatproduktion (Kikuchi et al., 1972; Kitano et al., 1972), wobei ebenso wie bei der Anzucht des Wildtyps unter Biotinmangel eine Verarmung der Membran an Phospholipiden beobachtet wurde (Kikuchi und Nakao, 1973a,b). Die Behandlung der Zellen mit Oberflächen-aktiven Substanzen stellt eine weitere Möglichkeit zur Auslösung der Glutamatproduktion dar. Erfolgreich eingesetzt werden kationische, aliphatische Amine wie Dodecylammoniumacetat und Dodecyltrimethylammoniumbromid (Asahi, französisches Patent, 1964; Duperray et al., 1992), nicht-ionische Detergenzien wie die Polyoxyethylensorbitan-, Polyoxyethylenglycol- und Saccharose-ester gestättigter Fettsäuren wie auch diese Fettsäuren selbst (Kinoshita und Tanaka, 1972). Im Fall der Fettsäuren und ihrer Derivate hängt die Effektivität bezgl. der Glutamatproduktion entscheidend von der Länge der Kohlenstoffkette ab. Die besten Ergebnisse wurden mit Kettenlängen von 12 bis 18 Kohlenstoffatomen erzielt. Für das Wirkungsprinzip der Detergenzien auf die Cytoplasmamembran coryneformer Bakterien finden sich in der Literatur unterschiedliche Modellvorstellungen. Im Fall der aminierten, positiv-geladenen Detergenzien wird eine sofortige Permeabilitätsänderung der Zellmembran durch Integration in die Lipiddoppelschicht vorgeschlagen (Duperray et al., 1992). Bei Einsatz von Fettsäurederivaten konnte der Einbau der Fettsäureanteile in die Phospholipide der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden. Der dadurch hervorgerufene Anstieg des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren in der Membran und eine Hemmung der Phospholipidsynthese werden für die Auslösung der Glutamatproduktion verantwortlich gemacht (Huchenq et al., 1984).

Wachstum in Gegenwart von Penicillin führt bei *C. glutamicum* ebenfalls zu Glutamatausscheidung ins Medium (Nunheimer et al., 1970). Eine Veränderung der Struktur der Cytoplasmamembran durch die Penicillinbehandlung ist nicht direkt einsichtig. Der primäre Angriffsort des Antibiotikums Penicillin ist die Zellwand, wo es die Quervernetzung des Peptidoglukansakkulus durch Peptidbrücken verhindert. Besonders sensitiv gegenüber Penicillin sind daher wachsende Zellen, da sie bei Vergrößerung des Zellvolumens und Zellteilung auf die fortwährende, kontrollierte Aufspaltung und Neubildung dieser Peptidbrücken angewiesen sind. Die Beobachtung, daß durch Penicillinbehandlung zur Glutamatproduktion angeregte Zellen neben UDP-N-Acetylhexosaminen, aktivierten Vorstufen der Zellwandsynthese, auch Phospholipide ins Kulturmedium abgeben (Kikuchi et al., 1973) deutet darauf hin, daß neben dem Stoffwechsel der Zellwand auch derjenige der Zellmembran durch Penicillin beeinträchtigt wird. Weiterhin kann die für Penicillin-behandelte Zellen beschriebene Abhängigkeit der Glutamatproduktion vom extrazellulären osmo-

tischen Druck (Kinoshita und Tanaka, 1972) als Hinweis auf einen indirekten Einfluß der destabilisierten Zellwand auf die Cytoplasmamembran gewertet werden. Die Produktivität der Zellen steigt mit fallender Osmolarität des Kulturmediums an, also bei verstärktem Wassereinstrom in die Zellen und verstärkter Membranspannung.

Die beschriebene enge Beziehung zwischen Membranstatus und Glutamatproduktion wurde in der Literatur vielfach als Argument für die Hypothese gewertet, der zufolge der Glutamatefflux auf einfacher Diffusion durch eine durchlässig gewordene Zellmembran beruhen soll (Demain und Birnbaum, 1968; Kikuchi und Nakao, 1986). Es wurde angenommen, daß es durch den Glutamatefflux zum Absinken der intrazellulären Glutamatkonzentration kommt, was die Aufhebung der Rückkopplungshemmung von Enzymen des Glutamatbiosyntheseweges bzw. der Repression ihrer Synthese durch Glutamat und so dessen kontinuierliche Bildung und kontinuierlichen Efflux ermöglichen könnte. Als Argument für diese mit dem Stichwort "leak" bezeichnete Modellvorstellung wurde z.B. die Beobachtung angeführt, daß sich durch Waschen Biotin-limitierter Zellen ein deutlich höherer Anteil intrazellulärer Aminosäuren aus den Zellen entfernen läßt als bei nicht-limitierten Zellen (Shiio et al., 1962). Auf eine detaillierte Analyse der Kinetik des Effluxprozeßes konnte sich das Modell jedoch nicht stützen.

Den experimentellen Zugang zu Kinetik und Energetik der Glutamatbildung ermöglichte erst die Einführung der sogenannten Kurzzeitfermentation (Hoischen und Krämer, 1989). Durch die Überführung von Zellen im Produktionszustand in frisches Medium konnte der Effluxprozeß innerhalb kurzer Zeiträume, bei niedrigen Zelldichten und niedrigen externen Glutamatkonzentrationen untersucht werden. Dieser Ansatz lieferte Daten, die nicht mit der Hypothese eines Diffusions-getriebenen Efflux in Einklang zu bringen sind. So konnte gezeigt werden, daß Biotin-limitierte, Glutamat-produzierende Zellen von *Corynebacterium glutamicum* im Vergleich zu Biotin-versorgten Zellen eine nur leicht erniedrigte interne Glutamatkonzentration und vergleichbare Werte anderer zellulärer und energetischer Parameter wie z.B. des Membranpotentials und des Kaliumgradienten aufweisen. Zusätzlich fanden sich Hinweise, daß der Efflux energieabhängig und regulierbar ist. Es wurde daher vorgeschlagen, daß ein spezifischer Glutamatexportcarrier den Glutamatefflux Biotin-limitierter Zellen von *C. glutamicum* katalysiert. Bei Charakterisierung von Enzymen des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum* konnte auch die durch das "leak"-Modell postulierte Rückkopplungshemmung der Glutamatdehydrogenase und die Repression der Synthese von PEP-Carboxylase und Citratsynthase durch Glutamat nicht belegt werden (B. Eikmanns, persönliche Mitteilung).

Auch die Hypothese, daß der Glutamatefflux durch das unter Produktionsbedingungen in umgekehrter Richtung arbeitende Glutamataufnahmesystem katalysiert wird (Clément et al., 1984; Clément und Lanéelle, 1986), muß vor dem Hintergrund neuerer experimenteller Daten zurückgewiesen werden. Die Glutamataufnahme erfolgt in *C. gluta-*

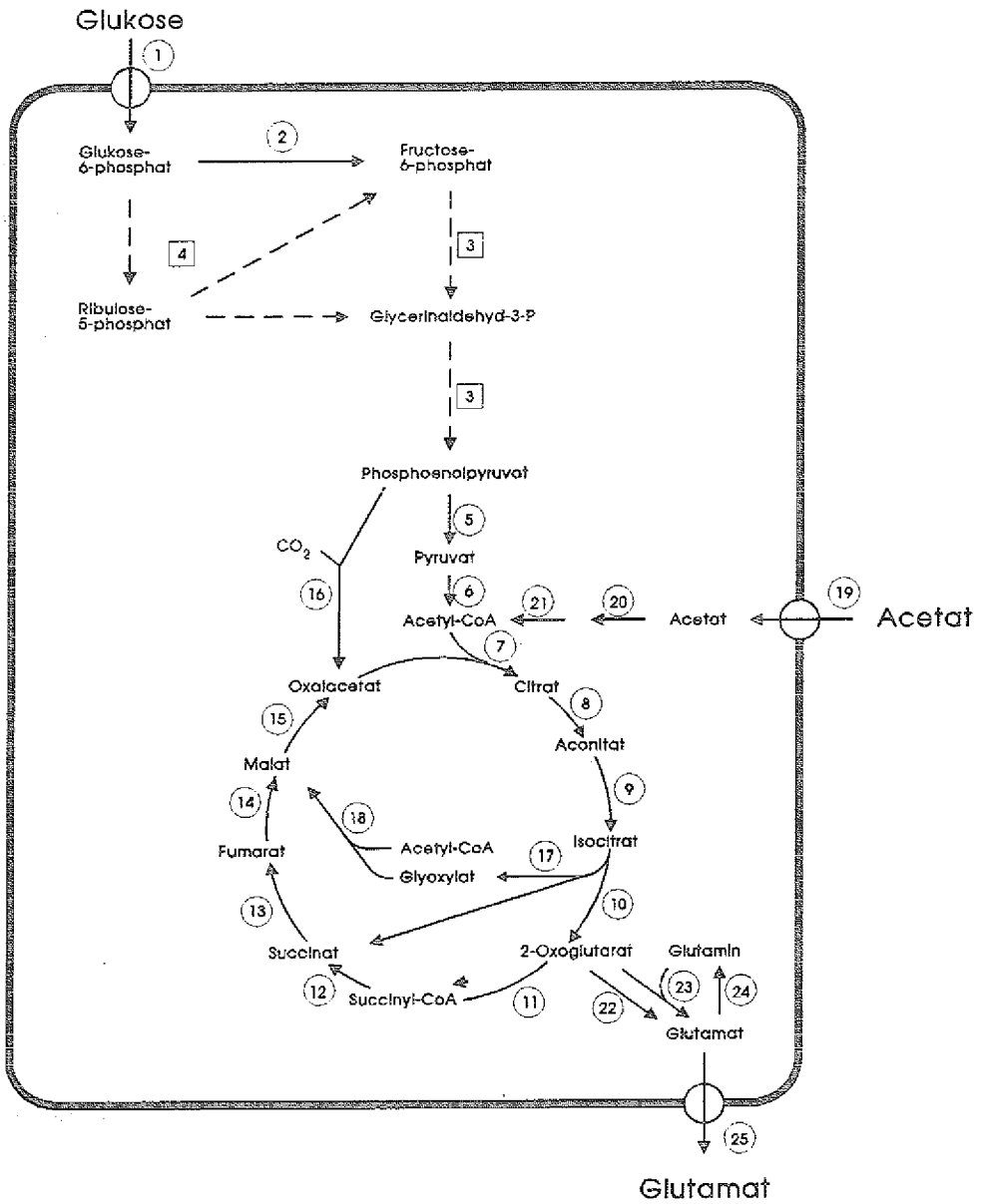


Abb.I

Reaktionen und Enzyme des Zentralstoffwechsels und der Glutamatbiosynthese bei *Corynebacterium glutamicum*

(1) Glukose-Phosphotransferasesystem; (2) Glukosephosphat-Isomerase; (3) Reaktionen des Embden-Meyerhof-Parnas-Weges; (4) Reaktionen des Pentosephosphat-Weges; (5) Pyruvat-Kinase; (6) Pyruvat-Dehydrogenase; (7) Citratsynthase; (8) + (9) Aconitat-Hydratase; (10) Isocitrat-Dehydrogenase; (11) α-Ketoglutarat-Dehydrogenase; (12) Succinat-Thiokinase; (13) Succinat-Dehydrogenase; (14) Fumarase; (15) Malat-Dehydrogenase; (16) Phosphoenolpyruvat-Carboxylase + Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; (17) Isocitratlyase; (18) Malat-Synthase; (19) Acetataufnahmesystem; (20) Acetat-Kinase; (21) Phosphotransacetylase; (22) Glutamat-Dehydrogenase; (23) Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase; (24) Glutamin-Synthetase; (25) Glutamatexportsystem.

micum durch einen primären, ATP als Energiequelle nutzenden Carrier (Krämer und Lambert, 1990). Die Umkehr dieses ATP-getriebenen Transportes ist aus energetischen Gründen nicht möglich. Außerdem wird die Expression des Glutamataufnahmesystems bei *C. glutamicum* durch die Anzucht des Organismus mit Glutamat als einziger C-Quelle induziert (Krämer et al., 1990), es ist daher in Glutamat-produzierenden Zellen, denen zumeist Kohlenhydrate als C-Quelle angeboten werden, nur schwach exprimiert.

Zur Überproduktion von Glutamat bedarf es der kontinuierlichen Nachlieferung des Glutamats durch den Stoffwechsel. Abbildung I gibt einen Überblick über die an der Biosynthese von Glutamat in *Corynebacterium glutamicum* beteiligten Reaktionen. Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α-Ketoglutarat, eines Intermediates des Citratzyklus, gebildet. Seine Synthese ist daher eng an den Kohlenstofffluß im Zentralstoffwechsel geknüpft. Als Kohlenstoffquellen zur Produktion von Glutamat können Kohlenhydrate, z.B. Saccharose, Maltose, Glukose, Fructose, Ribose und Xylose, und eine Reihe anderer Substanzen wie Acetat, Ethanol und Kohlenwasserstoffe eingesetzt werden (Kinoshita und Tanaka, 1972; Kinoshita, 1985). Zur Aufnahme der Kohlenstoffsubstrate durch Glutamat-bildende Bakterien liegen nur wenige Untersuchungen vor. Für die Glukoseaufnahme wurde bei *C. glutamicum* ein PEP-abhängiges Phosphotransferasesystem beschrieben (Malin und Bourd, 1991), die Acetataufnahme wird im selben Organismus durch einen Protonen-cotransportierenden, sekundären Carrier vermittelt (Ebbighausen et al., 1991). Der Umsatz sowohl von C_6- als auch von C_5-Zuckern und Gluconat macht deutlich, daß in Glutamat-bildenden Bakterien der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg und der Pentosephosphatweg zum Abbau von C_6- zu C_3-Verbindungen beschritten wird. Die Schlüsselenzyme beider Abbauwege wurden in Glutamat-bildenden Organismen nachgewiesen (Shiio et al., 1961; Tanaka et al., 1959). Durch die Reaktion der Pyruvatdehydrogenase wird schließlich aus der C_3-Verbindung Pyruvat Acetyl-CoA gebildet, welches in den Citratzyklus eingeschleust wird. Bei Wachstum mit Acetat als C-Quelle wird dieses durch die Reaktionen von Acetatkinase und Phosphotransacetylase zu Acetyl-CoA aktiviert (Shiio et al., 1969).

Im Citratzyklus konkurriert die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase, die α-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA umsetzt, mit den Glutamat-bildenden Enzyme um das gemeinsame Ausgangssubstrat. Die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase ist ein sehr instabiles und daher nur schwer nachweisbares Enzym (Shiio und Ujigawa-Takeda, 1980; J. Schwinde, persönliche Mitteilung). Es liegt in *Brevibacterium flavum* mit einer ungefähr 100-fach niedrigeren spezifischen Aktivität vor als die Glutamat-Dehydrogenase (GDH), die α-Ketoglutarat zu Glutamat umsetzt. Neben dem letztgenannten Enzym kann die reduktive Aminierung von α-Ketoglutarat zu Glutamat in coryneformen Bakterien auch von Glutamin-Synthethase (GS) und Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) katalysiert werden (Oshima et al., 1964; Tochikura, 1987). Obwohl die Aktivität des GS/GOGAT-Systems deutlich niedriger liegt als die der GDH vermag es in GDH-negativen Mutanten, ausreichend Gluta-

mat für Wachstum und Überproduktion zur Verfügung zu stellen (Börmann-El Kholy et al., 1993). Sowohl GDH als auch GOGAT sind NADP abhängige Enzyme. Zur Reduktion des α-Ketoglutarats kann so das NADPH verwendet werden, das zuvor bei der oxidativen Decarboxylierung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat, katalysiert durch die ebenfalls NADP abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, entsteht.

An der Auffüllung des Citratzyklus, dem durch Anabolismus und Aminosäureproduktion kontinuierlich Intermediate entzogen werden, ist bei Umsatz von Kohlenhydraten die PEP-Carboxylase beteiligt (Shiio et al., 1960). Untersuchungen an PEP-Carboxylase-negativen Mutanten haben jedoch gezeigt, daß zumindest ein weiteres Enzym, die PEP-Carboxykinase, diese Funktion ebenfalls ausführen kann (Peters-Wendisch et al., 1993). Werden Acetat oder andere als C_2-Körper in den Zentralstoffwechsel eingeschleuste Kohlenstoffquellen verwertet, so erfüllen die Reaktionen des induzierbaren Glyoxylatzyklus diese Aufgabe (Shiio et al., 1959).

I.2. Bakterielle Exportsysteme

In den letzten Jahren vermehrt durchgeführte Untersuchungen zur Ausscheidung von Substanzen durch Bakterien haben gezeigt, daß in einer Vielzahl von Fällen die Ausscheidung genau wie die Aufnahme durch Transportproteine katalysiert wird (Konings et al., 1992). Es wurden Exportcarrier für so unterschiedliche Substanzen wie organische Solute, anorganische Ionen, Antibiotika, Polysaccharide und Proteine identifiziert. Meist ist die Bedeutung der Exportsysteme für den bakteriellen Metabolismus leicht einsichtig. So sorgen Exportcarrier bei gärenden Organismen für die Entfernung der Gärungsprodukte aus dem Cytoplasma (Otto et al., 1980). Bakteriozide Substanzen, z.B. toxische, organische Kationen (Lomovskaya und Lewis, 1992), Schwermetallionen (Nies und Silver, 1989) oder Antibiotika (Yamaguchi et al., 1991), die über passiven Einstrom oder als Substrate unspezifisch arbeitender Aufnahmesysteme in die Zellen gelangen, können aktiv wieder nach außen gepumpt werden. Effluxcarrier für kompatible Solute und Kaliumionen sind an der Osmoregulation in Bakterien beteiligt (Koo et al., 1991; Bakker et al., 1987). Als letztes Beispiel sei der Natriumexport bei neutro- und alkalophilen Bakterien genannt, der durch einen Na^+/H^+-Antiporter katalysiert wird und der Aufrechterhaltung eines neutralen, cytoplasmatischen pH-Wertes dient (McMorrow et al., 1989).

Viele der Transportmechanismen, die für Aufnahmesysteme beschrieben wurden, finden sich auch bei bakteriellen Exportsystemen. Die Nutzung der elektrochemischen Gradienten der Transportsubstrate zum Antrieb des Exports, also ein sekundärer Transportmechanismus, ist weit verbreitet. So erfolgt die Ausscheidung von Laktat häufig im

Symport mit Protonen. Es ist einigen Organismen daher möglich, den nach außen gerichteten, treibenden Gradienten des Stoffwechselendprodukts Laktat zum Aufbau eines Protonengradient, d.h. zur Energiekonservierung einzusetzen (Konings, 1985). Wird ein Solut im Antiport gegen Protonen exportiert, wie im Fall des Exports von Tetrazyklin bei *Escherichia coli* (Kaneko et al., 1985), so dient das zuvor durch andere Mechanismen aufgebaute elektrochemische Protonenpotential als Energiequelle des Exports. Die Kopplung des Efflux von Stoffwechselendprodukten mit der Aufnahme von Substraten stellt ein weiteres Beispiel eines Antiportmechanismus dar (Poolman, 1990). Erleichterte Diffusion, d.h. ein Uniportmechanismus, wurde bisher nur für den Laktatefflux bei *Lactobacillus helveticus* beschrieben (Gätje et al., 1991). Bei sekundären Transportsystemen wird die Transportrichtung ausschließlich durch Größe und Richtung der elektrochemischen Gradienten aller beteiligten Substrate bestimmt. Die Richtung ist daher durch entsprechende Veränderung der Gradienten umkehrbar. Dort wo Aminosäuresequenzen sekundärer Exportproteine bekannt sind, zeigen sie Homologien zu der großen Gruppe sekundärer Aufnahmesystem, die sich strukturell durch zwölf membranspannende α-Helices auszeichnen (Rouch et al., 1990; Marger et al., 1993).

Bei einem primären Transportmechanismus wird der Translokationsschritt durch die Kopplung mit einer exergonen chemischen Reaktion z.B. der ATP-Hydrolyse angetrieben. Auch für einen solchen Mechanismus existieren Beispiele unter bakteriellen Exportsystemen. Der Cadmiumexport bei *Staphylococcus aureus* wird durch eine Efflux-ATPase katalysiert, die Ähnlichkeit zu bakteriellen Kaliumaufnahme-ATPasen besitzt (Nucifora et al., 1989). Die Mitglieder der als P-Typ- oder E_1E_2-ATPasen bezeichneten Carrierklasse sind charakterisiert durch große, globuläre, cytoplasmatische Domänen, die die ATPase-Aktivität tragen, und membranständige Domänen mit bis zu 12 hydrophoben α-Helices, die wahrscheinlich den Transportkanal bilden (Silver et al., 1989; Epstein et al., 1990). Andere primäre Exportsysteme weisen Ähnlichkeit zu den bakteriellen Bindeprotein-abhängigen Aufnahmesystemen auf. Hier sind z.B. die Exportsysteme für Arsenat (Kaur und Rosen, 1992) und sec-unabhängig ausgeschiedene Proteine (Fath et al., 1991) zu nennen. Diese nutzen ebenfalls die Energie der ATP-Hydrolyse zum Export und tragen eine hochkonservierte ATP-Bindungs-Cassette, die der Familie der ABC-Transporter den Namen gibt. Charakteristisch ist hier der Aufbau aus zwei Membran-ständigen Domänen mit je 5-6 α-Helices und zwei cytoplasmatischen Domänen mit je einer ATP-Bindungs-Cassette (Hyde et al., 1990).

Die Ausscheidung von Aminosäuren wurde bisher nur in wenigen Fällen zum Thema genauer mechanistischer Untersuchungen gemacht, obwohl sie eine Voraussetzung für die industriell in großem Maßstab durchgeführte Produktion der Aminosäuren ist. Da Aminosäuren wertvolle Nährstoffe sind, die in Bakterien entweder durch spezifische Transportsysteme aufgenommen oder mit hohem Energieaufwand synthetisiert werden,

erscheint ihr Export nicht sinnvoll. Naheliegend ist daher die Annahme, daß der Aminosäureefflux ein für die Zellen unerwünschtes Ereignis ist. Als mögliche Mechanismen für den Efflux wurden passive Diffusion oder ein, durch Umkehrung der Gradienten, in Exportrichtung arbeitendes, sekundäres Aufnahmesystem postuliert (Milner et al., 1987; Konings et al., 1992). Tatsächlich läßt sich Diffusion besonders von hydrophoben Aminosäuren durch die Cytoplasmamembran von Bakterien mit Hilfe von Membranvesikeln nachweisen (Driessen et al., 1987). Auch die Prolinproduktion durch *E. coli* scheint Diffusions-vermittelt zu sein (Rancourt et al., 1983). Aminosäureexport durch ein Aufnahmesystem konnte bisher noch für kein Beispiel überzeugend nachgewiesen werden. Für den Effluxprozeß von Isoleucin und Lysin bei *Corynebacterium glutamicum* konnte gezeigt werden, daß spezifische, vom Aufnahmesystem für die jeweilige Aminosäure eindeutig zu unterscheidende Exportcarrier beteiligt sind (Ebbighausen et al., 1989; S. Zittrich, 1992; Bröer und Krämer, 1991a,b). Dabei wurde deutlich, daß sich der Efflux des hydrophoben Isoleucins aus einer Carrier-abhängigen und einer Diffusions-abhängigen Komponente zusammensetzt. Lysin wird ausschließlich Carrier-vermittelt ausgeschieden. Der Mechanismus des Exports konnte im Detail aufgeklärt werden. Es handelt sich um einen sekundären Carrier, der Lysin im Symport mit 2 OH^--Ionen exportiert. Sekretion von Lysin und Isoleucin kann bei *Corynebacterium glutamicum* nur dann beobachtet werden, wenn intrazellulär hohe Konzentrationen der Aminosäuren akkumulieren. In den industriell eingesetzten Produktionsstämmen sind dafür Mutationen verantwortlich, die den Kohlenstoffluß zur gewünschten Aminosäure verstärken (Tosaka et al., 1978; Bröer et al., 1993). Erhöhte, intrazelluläre Lysin- bzw. Isoleucinkonzentrationen können auch erzielt werden, indem der Wildtyp in Medien, die Lysin- bzw. Isoleucin-haltige Peptide enthalten, angezogen wird (Erdmann et al., 1993). Da Lysin und Isoleucin nur als Proteinbausteine nicht aber zur Synthese anderer Metabolite dienen, könnte die Funktion der Exportsysteme darin bestehen, die intrazelluläre Aminosäurekonzentration zu regulieren.

I.3. Der "overflow"-Metabolismus

Die in I.1. beschriebenen Manipulationen zur Auslösung effizienten Glutamateffluxes bei Corynebakterien führen immer auch zu einer Einschränkung der Vermehrungsfähigkeit der Zellen. Fermentationen der Organismen zur Produktion von Glutamat werden daher nur in Batchkulturen durchgeführt, die durch zwei distinkte Phasen gekennzeichnet sind: In der ersten Phase werden die Kulturen bis zur gewünschten Zelldichte angezogen, in der zweiten Phase erfolgt dann die Glutamatproduktion durch die stationären Zellen.

Eine Kopplung von Produktbildung und Wachstumslimitierung, wie sie bei der Glutamatproduktion beobachtet wird, tritt auch bei anderen Fällen bakterieller Metabolitüberproduktion auf. Am besten untersucht ist dies für *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*, die in kontinuierlicher Kultur unter aeroben Bedingungen immer dann unvollständig oxidierte Abbauprodukte der C-Quelle in das Kulturmedium ausscheiden, wenn das Wachstum der Zellen nicht durch die C-Quelle, sondern durch andere Nährstoffe wie Stickstoff, Kalium, Magnesium, oder Sulfat limitiert wird (Neijssel und Tempest, 1979; Tempest und Neijssel, 1987). An Stelle der ausschließlichen Bildung von CO_2 und neuen Zellen unter Kohlenstofflimitierung, können bei Überschuß der C-Quelle eine ganze Reihe von organischen Säuren (z.B. Pyruvat, Acetat, α-Ketoglutarat oder Gluconat) oder Exopolysaccharide produziert werden. Auch anaerobe Chemostatkulturen bilden unter Kohlenstoffüberschuß häufig Fermentationsprodukte in größerem Umfang und mit größerem Spektrum als unter Kohlenstofflimitierung (Teixeira de Mattos und Tempest, 1983). Die Überproduktion von Metaboliten ist mit einer verminderten Wachstumseffizienz der Zellen verbunden. Dies spiegelt sich in erniedrigten Zellerträgen bezogen auf den Verbrauch von C-Quelle und (unter aeroben Bedingungen) Sauerstoff wieder. Zusätzlich setzen einige Organismen die C-Quelle bei Kohlenstoffüberschuß schneller um als bei Kohlenstofflimitierung.

Der Begriff des "overflow"-Metabolismus beschreibt das Verhalten von Zellen, die, wie oben erläutert, eine angebotene C-Quelle nur unvollständig zu Energiegewinnung und Biomasseproduktion ausnutzen und statt dessen energiereiche Metabolite in das Kulturmedium ausscheiden (Neijssel und Tempest, 1979). Die Art eines unter "overflow"-Bedingungen überproduzierten Metaboliten wird sowohl durch die gewählten Kulturparameter als auch durch die besonderen Eigenschaften des jeweiligen Organismus bestimmt. Neben einem Überangebot des Kohlenstoffsubstrates sind die Art der C-Quelle und des Nährstoffs, der zur Wachstumslimitierung der Kultur eingesetzt wird, von Bedeutung. Letzterer bestimmt den metabolischen Engpaß, auf den der Organismus entsprechend der Eigenarten seines Metabolismus mit der Akkumulation eines Metaboliten reagiert. Schlechte Regulation des Aufnahmesystems für die Kohlenstoffquelle unterstützt die Akkumulation. Unverzichtbare Voraussetzung für die Überproduktion ist weiterhin, daß der gebildete Metabolit über die Cytoplasmamembran in das extrazelluläre Medium gelangen kann. Explizite Untersuchungen zu Effluxmechanismen von "overflow"-Metaboliten existieren nicht. Es ist daher unklar, ob der Efflux durch einfache Diffusion oder durch ein Transportsystem katalysiert erfolgt.

Die Analyse der energetischen und metabolischen Konsequenzen einer Limitierung im Baustoffwechsel ist Grundlage für Überlegungen, die versuchen, den "overflow"-Metabolismus als vom Standpunkt des Organismus aus sinnvolles Verhalten zu beschreiben (Tempest und Neijssel, 1992). In Abbildung II ist der Kohlenstoff- und Energiefluß für ein

aerobes Bakterium bei unlimitiertem und limitiertem Wachstum skizziert. Bei ungehemmtem Wachstum sind Katabolismus und Anabolismus strikt miteinander verknüpft. Die durch den Katabolismus verfügbar gemachten Metabolite, die Energie- und Reduktionsäquivalente werden für den Anabolismus verbraucht. Überträgermoleküle wie Acetyl-CoA, die Pyridine- und Adeninnukleotide werden auf diese Weise regeneriert. Eine Speicherung von Reduktionskraft und Energie auf der Ebene der Überträgermoleküle ist auf Grund ihrer geringen Poolgröße nicht möglich. Aktivität des Katabolismus bei gleichzeitiger Hemmung des Anabolismus, also eine Entkopplung der beiden, ist daher abhängig davon, ob der Organismus über andere Möglichkeiten zur Regeneration der Überträgermoleküle verfügt. So könnte die unter einer Reihe von Limitierungen häufig beobachtete Bildung von Acetat den Bakterien dazu dienen, den zyklischen Umsatz des Coenzym A aufrechtzuerhalten und sich gleichzeitig nicht benötigter intermediärer Metabolite zu entledigen. Im Fall der Produktion von Exopolysacchariden konnte gezeigt werden, daß der Energiegewinn bei

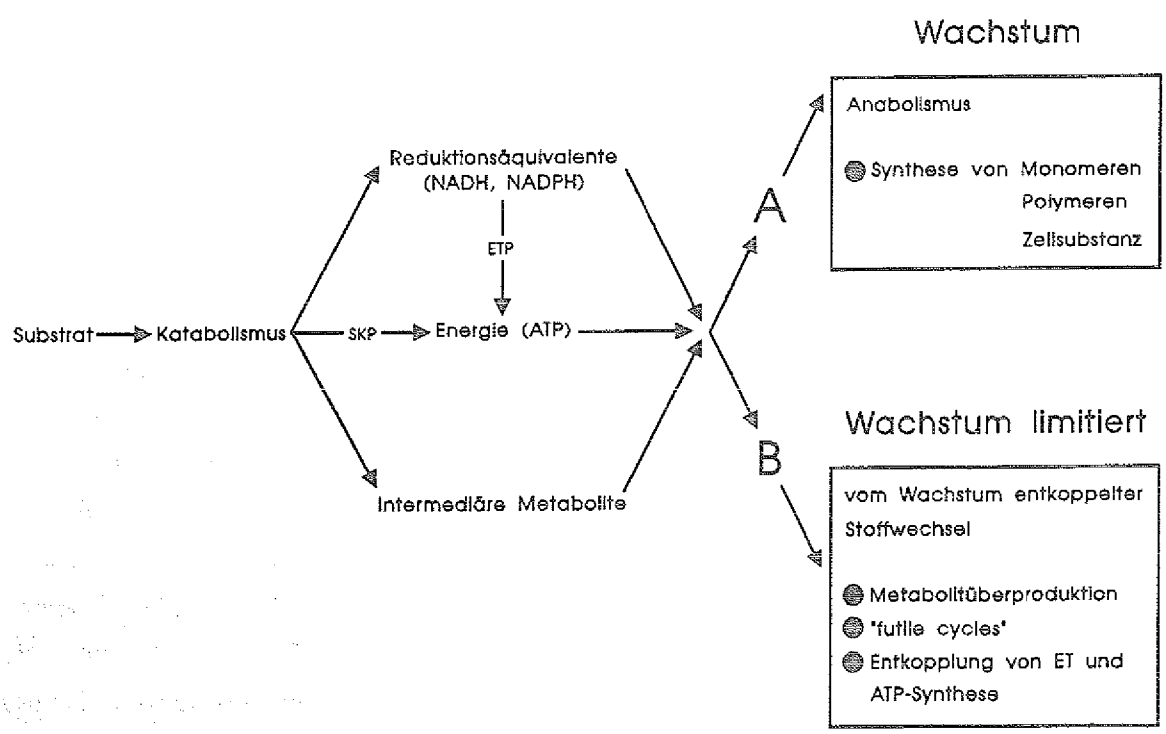


Abb.II

Kohlenstoff- und Energiefluß eines aeroben Bakteriens bei ungehemmtem (A) oder limitiertem (B) Wachstum (Limitation im Anabolismus)

SKP: Substratkettenphosphorylierung
ETP: Elektronentransportphosphorylierung

Bildung der Saccharidmonomere durch den Energieaufwand bei Synthese der Polymere aus diesen Monomeren ausgeglichen wird (Linton, 1990). Auch hier ermöglicht die Metabolitproduktion also die Dissipation von Kohlenstoffquelle und Energie, wenn das Kohlenstoffsubstrat über die Bedürfnisse der Zellbiosynthese hinaus aufgenommen wird. Eine gänzlich andere Situation liegt im Fall der Produktion von Gluconat durch wachstumslimitierte Zellen von *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* vor. Die Produktbildung erfolgt hier gerade als Reaktion auf unerwünschte Energiedissipation. Ein energiezehrender Zyklus von Kaliumaufnahme durch ein hochaffines Aufnahmesystem und Kaliumefflux durch ein niedrigaffines Aufnahmesystem (Mulder et al., 1986; Neijssel et al., 1990) oder ein erhöhter Energieaufwand für die pH-Homöostase nach Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Neijssel, 1977) sind hier zu nennen. Eine Verstärkung der ATP-Bildungsrate erreichen die Zellen unter diesen Bedingungen durch höheren Glukoseumsatz und die Oxidation der Glukose zur Gluconat über eine membranständige, Pyrrolochinidinchinon (PQQ) als prosthetische Gruppe tragende Glukoseoxidase (Van Schie et al., 1985). Dieses Enzym speist die Elektronen auf der Ebene des Chinons in die Elektronentransportkette ein und umgeht so die NADH-Dehydrogenase, die in der normalen Atmungskette die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion limitiert.

Als Ausgangspunkt für das Verständnis bakterieller Metabolitüberproduktion ist die Vorstellung des "overflow"-Metabolismus überaus hilfreich. Die Analyse einzelner Beispiele zeigt jedoch, daß mit diesem Begriff eine ganze Reihe von mikrobiellen Reaktionen auf Stoffwechsellimitationen zusammengefaßt sind, die sich in ihrer metabolischen und energetischen Bedeutung für den jeweiligen Organismus deutlich unterscheiden. Es muß daher in jedem Fall die Bedeutung der Limitation für Metabolismus und Energetik und der Ausweg, der sich dem Organismus in der Überproduktion von Metaboliten eröffnet, neu analysiert werden.

I.4. Ziel der Arbeit

Die primäre Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des Mechanismus der Carrier-vermittelten Glutamatsekretion bei Biotin-limitierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum*. Es wurde zum einen die Bedeutung des Zusammenspiels von Wachstumslimitierung und Membranveränderung für die Auslösung der Glutamatsekretion analysiert. Zum zweiten sollte über die Charakterisierung des energetischen Zustands von Zellen im Produktionszustand und dessen Manipulation die zum Antrieb der Sekretion genutzte zelluläre Energiequelle identifiziert werden. Die erhaltenen Daten werden in Hinblick auf die Theorie des "overflow"-Metabolismus diskutiert.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben wurden Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, oder Boehringer, Mannheim, in p. A. Qualität verwendet.

Sigma, St. Louis, USA	CCCP
	Valinomycin
	Nigericin
	DCCD
	INT
	Luciferin/Luciferase
Amersham International	[U-^{14}C]-Acetat
	[U-^{14}C]-Benzoat
	[C^{14}] Methylamin-Hydrochlorid
	Inulin-[^{14}C]-carboxylsäure
	$^{3}H_2O$
	Rubidium-86
NEN	Tetra-[^{14}C]-phenylphosphoniumbromid

II.2. Organismen

Es wurden folgende Stämme von *Corynebacterium glutamicum* verwendet:

- *C. glutamicum* ATCC 13032: Wildtyp
- *C. glutamicum* ATCC 14310: Leucin auxotrophe Mutante; durch UV-Mutagenese vom Wildtyp abgeleitet; Die Auxotrophie beruht auf einem Defekt der Isopropylmalat-Synthase (Patek et al., 1993).
- *C. glutamicum* Nr. 9910 und Nr. 9087: Stämme der Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan. Die Stämme wurden durch Selektion auf Glutamatbildung in Anwesenheit eines Biotinüberschußes erhalten.

Wenn nicht extra angemerkt wurden die Experimente mit dem Wildtyp durchgeführt.

II.3. Kulturmedien

Die Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte stets in Mineralsalzmedium, dem nach der Sterilisation eine C-Quelle (getrennt autoklaviert) und Biotin (steril filtriert) in den jeweils gewünschten Konzentrationen zugesetzt wurde.

Mineralsalzmedium I (modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972)

$(NH_4)_2SO_4$	5	g/l
Harnstoff	5	g/l
KH_2PO_4	2	g/l
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	2	g/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,25	g/l
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,01	g/l
$MnSO_4 \times H_2O$	0,01	g/l
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0,01	g/l
Spurenelementlösung	3	ml/l

Einstellung des pH-Wertes mit 6 N KOH auf 7,0; Sterilisation durch Autoklavieren

Spurenelementlösung

$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	10	mg/l
H_3BO_3	30	mg/l
$CoCl_2 \times 6\ H_6O$	20	mg/l
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,9	mg/l
$NiCl_2 \times 6\ H_2O$	2	mg/l
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	3	mg/l

Glukose als C-Quelle

Zur Anzucht mit Glukose als C-Quelle wurde dem beschriebenen Medium 50 g/l Glukose zugesetzt. Wenn nicht anders angegeben wurde Glukose als C-Quelle eingesetzt.

Acetat als C-Quelle

Anzucht mit Acetat als C-Quelle erforderte eine stärkere Pufferung des Mediums. Diese erfolgte entweder durch Verstärkung des Kaliumphosphatpuffers (150 mM) oder durch Zugabe von 180 mM MOPS. Acetat wurde in einer Konzentration von 20 g/l zugesetzt.

II.4. Kulturbedingungen

Kulturgefäße

Die Anzucht von *Corynebacterium glutamicum* erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Als normale Füllmenge wurden 100 ml Kulturmedium eingesetzt. Im Falle von Wachstumsuntersuchungen wurde diese zur Gewährleistung einer optimalen Belüftung auf 70 ml reduziert.

Inkubation

Die Inkubation der Kulturen erfolgte auf einem Rotationsschüttler (130 Upm) bei 30°C.

Stammhaltung

Als Vorkulturen für die Anzucht von *C. glutamicum* wurden auf Mineralsalzmedium mit 10 µg/l Biotin gewachsene Kulturen verwendet. Diese wurden nach Einstellung des Wachstums, bei einem externen pH-Wert von ca. 6 mit 15% Glycerin versetzt und portioniert bei -20°C eingefroren und aufbewahrt. Jeweils 0,5-3,0 ml dieser Glycerinkulturen dienten zur Inokulation von 100 ml Medium.

Wachstum von Bakterienkulturen

Das Wachstum einer Bakterienkultur wurde verfolgt durch Bestimmung der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) in einem Spectrophotometer (Novospec II, Pharmacia LKB) mit Wasser als Referenz. Durch Trockengewichtsbestimmungen gewaschener Zellen wurden folgende Konversionsfaktoren für die Beziehung Zelltrockengewicht/OD_{600} ermittelt:

-Exponentiell wachsende Kultur: 0,36 mg TG ml^{-1}/OD 1

-Auf Grund von Biotinmangel stationäre Kultur: 0,34 mg TG ml^{-1}/OD 1

II.5. Kurzzeitfermentation

Zur Analyse von Stoffumsatz- und Produktbildungsraten bei verschiedenen Zelltypen wurde das experimentelle System der Kurzzeitfermentation (Hoischen und Krämer, 1989) verwendet. Dazu wurden die Zellen in der jeweils interessierenden Wachstumsphase geerntet, gewaschen und erneut resuspendiert. Die Zelldichte in der Kurzzeitfermentation und die Zusammensetzung des zur Resuspension verwendeten Mediums konnten so frei

gewählt werden. Wenn nicht anders vermerkt, wurde auch in der Kurzzeitfermentation das Mineralsalzmedium I benutzt. Das Angebot der C-Quelle wurde möglichst niedrig gewählt, so daß die enzymatische Bestimmung der C-Quelle im Medium mit hoher Genauigkeit erfolgen konnte und es gleichzeitig im Verlauf des Experimentes nicht zu vollständigem Verbrauch der C-Quelle kam. Wurde zusätzlich auch die Atmungsrate der Zellen gemessen, so war die maximal einsetzbare Zelldichte durch den Meßbereich der Sauerstoffelektrode begrenzt. In der Kurzzeitfermentation wurde die Belüftung der Zellsuspension durch Rühren (650 rpm) mittels eines Magnetrührers gewährleistet.

Für Untersuchungen an wachsenden Zellen wurden Kulturen verwendet, die in Anwesenheit eines Überschußes von Biotin (200 µg/l) bis zu einer Zelldichte von OD_{600}=4-10 herangezogen wurden. Glutamat-sekretierende Zellen wurden nach Einstellung des Wachstums durch Verbrauch des angebotenen Biotins (0,5-1,0 µg/l) und nach Akkumulation von mindestens 5 mM Glutamat im extrazellulären Raum in die Kurzzeitfermentation transferriert.

II.6. Silikonölzentrifugation

Die Trennung von Zellen und extrazellulärem Medium sowie das gleichzeitige, sofortige Abstoppen des Stoffwechsels der Zellen erfolgte durch die Siliconölzentrifugation (Klingenberg und Pfaff, 1967). Dazu wurden zu definierten Zeiten entnommene Proben einer Zellsuspension in Reaktionsgefäße mit übereinanderliegenden Schichten von 30%iger Perchlorsäure und Siliconöl überführt und diese Gefäße anschließend zentrifugiert. Auf Grund der Dichteunterschiede zwischen Kulturmedium und Zellen verbleibt das Kulturmedium auf der Siliconölschicht, während die Zellen schnell durch die Öl- in die Perchlorsäureschicht wandern, wo sie sofort inaktiviert werden. Die so erhaltenen zellfreien Kulturüberstände wurden direkt zur Bestimmung der extrazellulären Konzentrationen verschiedener Metabolite und Mess-Sonden (s. II.9. und II.10.) eingesetzt. Zur Ermittlung der intrazellulären Konzentrationen der genannten Substanzen wurden diese aus den Zellsedimenten der Siliconölzentrifugation extrahiert. Die erhaltenen wässrigen Extrakte dienten dann ebenfalls als Proben für die jeweiligen Nachweistests.

<u>Durchführung der Silikonölzentrifugation</u>

- Vorbereitung der Silikonölröhrchen: Bestückung von Beckmann-Reaktionsgefäßen (300 µl) mit 30 µl 20% Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl, spezifische Dichte d=1,03 oder 1,04, je nach Dichte des benutzten Kulturmediums
- Probenvolumen: 100 oder 200 µl Zellsuspension pro Röhrchen

- Mehrfachbestimmung: je 3 Silikonölröhrchen pro Meßpunkt
- Zentrifugation: 30 Sekunden in einer Beckmann Microfuge bei maximaler Geschwindigkeit

Extraktion der Zellsedimente für die Bestimmung intrazellulärer Metabolite

- Überführung der Zellsedimente und der gesamten Perchlorsäurephase in 750 µl Reaktionsgefäße durch Durchtrennung der Röhrchen in der Siliconölschicht
- Extraktion noch zellgebundener Metabolite durch Beschallung im Ultraschallbad (5 Minuten)
- Zugabe von 10 µl Siliconöl d=1,07 zur Erhöhung der spezifischen Dichte des mitgeschleppten Siliconöls
- Neutralisation und Pufferung der Extrakte durch Zugabe von 25 µl 5 M KOH und 1 M Triäthanolamin
- Präzipitation von Kaliumperchlorat auf Eis
- Zentrifugation der Extrakte (Eppendorf-zentrifuge, 14 000 Upm, 5 Minuten) zur Sedimentation von Zellfragmenten, Kaliumperchlorat und Silikonöl

Extraktion der Zellsedimente für die Ermittlung der zellassoziierten Mengen radioaktiv-markierter Mess-Sonden

- Überführung der Zellsedimente und der gesamten Perchlorsäurephase in Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Zugabe von 750 µl H_2O
- Resuspension der Zellsedimente
- Extraktion noch zellgebundener Substanzen durch Beschallung im Ultraschallbad (5 Minuten)
- Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge, 14000 Upm, 5 min)

II.7. Bestimmung des cytoplasmatischen Volumens einer Zellsuspension

Kenntnis des cytoplasmatischen Volumens einer Zellsuspension ist die Voraussetzung zur Berechnung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen. Die Messung der internen Räume erfolgte mit Hilfe von zwei, mit unterschiedlichen Isotopen radioaktiv markierten Sonden (Rottenberg, 1979; Kashket, 1985), von denen die eine die Cytoplasmamembran der Zellen durchdringen kann (^3H_2O), die andere jedoch nicht (Inulin-[^{14}C]-carboxylsäure). Nach Inkubation eines Aliquots einer Zellsuspension mit diesen Sonden

wurde die Suspension einer Silikonölzentrifugation unterzogen. Dadurch erreicht man im Zellsediment der Silikonölröhrchen eine starke Erhöhung des Verhältnisses von intrazellulärem zu extrazellulärem Raum im Vergleich zur Zellsuspension. Im Zellsediment wurde die vorhandene Menge der beiden Sonden durch Szintillationszählung bestimmt. Aus diesen Werten lassen sich, mit Hilfe der eingesetzten Volumenaktivitäten der Sonden, die von den beiden Substanzen im Zellsediment eingenommenen Räume berechnen. Dabei zeigt die membrangängige Sonde das Gesamtvolumen, die membranimpermeabele Sonde nur das extrazelluläre Volumen des Zellsedimentes an. Das intrazelluläre Volumen berechnet sich als Differenz dieser beiden Räume.

Für wachsende Zellen von *Corynebacterium glutamicum* wurden intrazelluläre Räume von 2,0 ± 0,2 µl/mg TG, für biotinlimitierte Zellen von 1,6 ± 0,2 µl/mg TG gefunden. In den Sedimenten der Siliconölzentrifugation betrug das Verhältnis von extrazellulärem zu intrazellulärem Raum ungefähr 2:1.

Durchführung

- Volumenaktivität der Sonden im Raumbestimmungsansatz:
  ^3H_2O: ca. 100 KBq/ml
  Inulin-[^{14}C]-carboxylsäure: ca. 25 KBq/ml
- Probenvolumen: 500 µl Zellsuspension, OD_{600}=5-20
- 1,5minütige Inkubation der Zellsuspension mit den Sonden bei Raumtemperatur
- Silikonölzentrifugation: 5 x 100 µl
- Exakte Bestimmung der eingesetzten Volumenaktivitäten der Sonden:
  Auszählung der Radioaktivität in 20 µl Aliquots der Überstände in einem Flüssig-Szintillationszähler (Rackbeta 1214, LKB) nach einem Programm für Doppelmarkierungen
- Extraktion der Sedimente der Silikonölzentrifugation wie unter (II.6.) beschrieben
- Bestimmung der Sondenmengen im Sediment der Silikonölzentrifugation:
  Auszählung der Radioaktivität in 650 µl Aliquots der Extrakte (Gesamtvolumen: 780 µl)

Berechnung des intrazellulären Volumens

Zu messende Größen

- VA ^3H : Volumenaktivität des ^3H_2O, [dpm/µl]
- VA ^{14}C : Volumenaktivität des [^{14}C]-Inulin, [dpm/µl]

- $^3H_{Sed}$: ^3H-Radioaktivität in 780 µl extrahierten Sediments, [dpm/100 µl Zellsuspension]
- $^{14}C_{Sed}$: ^{14}C-Radioaktivität in 780 µl extrahierten Sediments, [dpm/100 µl Zellsuspension]

Zu berechnende Größen

- V_{gesamt} $= {}^3H_{Sed}/VA\ {}^3H$
- V_{extern} $= {}^{14}C_{Sed}/VA\ {}^{14}C$
- V_{intern} $= V_{gesamt} - V_{extern}$

- V_{gesamt} : Gesamtvolumen des Sediments, [µl/100 µl Zellsuspension]
- V_{extern} : Extrazelluläres Volumen des Sediments, [µl/100 µl Zellsuspension]
- V_{intern} : Intrazelluläres Volumen des Sediments, [µl/100 µl Zellsuspension]

II.8. Berechnung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen

Bei bekanntem, intrazellulärem Volumen einer Zellsuspension konnten intrazelluläre Metabolitkonzentrationen berechnet werden, indem der Quotient aus zellassoziierter Metabolitmenge (pro x µl Zellsuspension) und intrazellulärem Volumen (pro x µl Zellsuspension) gebildet wurde. Lag der Metabolit, dessen intrazelluläre Konzentration zu berechnen war, auch im externen Medium vor, so mußte die im Sediment der Siliconölzentrifugation vorgefundene Metabolitmenge um die durch das extrazelluläre Volumen im Sediment eingeführte Menge korrigiert werden. Bei Bestimmung des intrazellulären Glutamat-Pools von *Corynebacterium glutamicum* wurde diese Korrektur erst bei externen Glutamatkonzentration ≥10 mM vorgenommen. Unterlassung der Korrektur bei niedrigeren externen Konzentrationen führt auf Grund des hohen intrazellulären Glutamat-Pools von *Corynebacterium glutamicum* nicht zu einem signifikanten Fehler der Bestimmung.

II.9. Messung des Membranpotentials

Zur Ermittlung des elektrischen Potentials über der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* wurde das lipophile Kation TPP^+ als Sonde eingesetzt (Rottenberg, 1979; Kashket, 1985). Diese Sonde vermag die Cytoplasmamembran von Zellen zu durchdringen und wird in Anwesenheit eines elektrischen Potentials über dieser Membran (innen negativ) auf Grund seiner positiven Ladung im Innern der Zellen akkumuliert. Im Gleichgewicht

entspricht das chemische Potential der Sonde dem elektrischen Potential über der Membran, und letzteres kann mit Hilfe der experimentell bestimmbaren intra- und extrazellulären Sondenkonzentration berechnet werden.

$$\Delta\Psi = -2{,}303\ RT \log([TPP^+_{in}]/[TPP^+_{ex}])$$

Voraussetzung für eine genaue Bestimmung des Membranpotentials ist der Einsatz der Sonde in sehr niedriger Konzentration, so daß der Abbau des zu messenden Membranpotentials durch die Äquilibrierung der Sonde vernachlässigbar gering ist. Diese Voraussetzung wurde erfüllt, indem radioaktiv markiertes TPP^+ mit hoher spezifischer Aktivität verwendet wurde. Die Bestimmung der intra- und extrazellulären TPP^+-Konzentrationen erfolgte dann

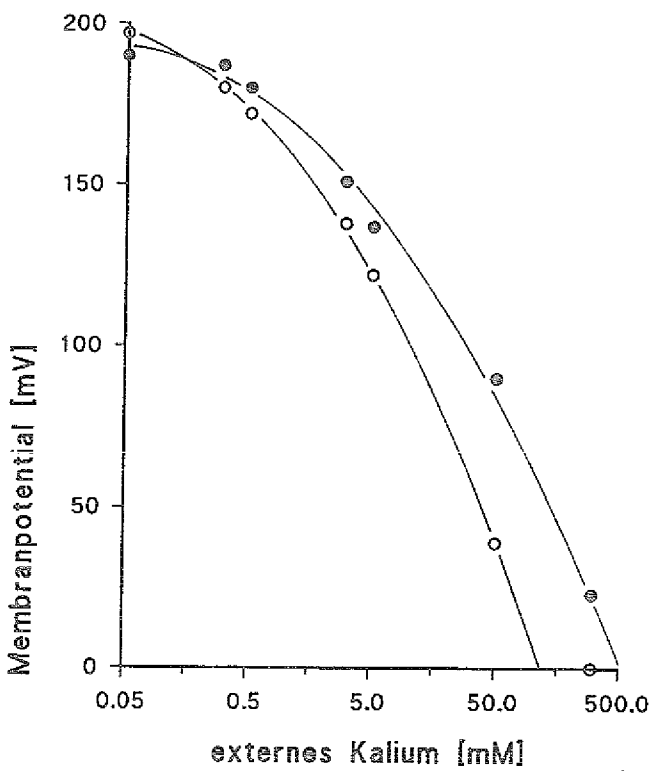


Abb. 1

Eichkurve zur Korrektur der Membranpotentialbestimmung mit TPP^+ als Sonde

Die $\Delta\Psi$-Messung mit TPP^+ (●) und Rubdium-86 (O) wurde in Anwesenheit von 25 µM Valinomycin bei externen Kaliumkonzentrationen von 50 µM bis 300 mM durchgeführt. Es wurden Biotin-limitierte, in Puffer (50 mM Mes /Tris, 10 mM NaCl, 5 % Glukose, pH 8,5) gewaschene und resuspendierte Zellen eingesetzt.

über Szintillationszählung bei niedriger chemischer Konzentration an TPP^+.

Sein lipophiler Charakter ist dafür verantwortlich, daß TPP^+ stark an Membranen bindet. Durch Messung der Menge zellassoziierten TPP^+s wird daher die intrazelluläre TPP^+-Konzentration überschätzt. Eine Korrektur der TPP^+-Meßwerte wurde durch Vergleich von $\Delta\Psi$-Messungen mit TPP^+ und Rubidium-86 als Sonden vorgenommen. Rubidium, das von vielen Kaliumtransportsystemen und -ionophoren als Substrat akzeptiert wird, zeigt keine Bindung an zelluläre Strukturen. Es vermag analog zu TPP^+, ein Membranpotential anzuzeigen, wenn die Membran zuvor durch Einbau von Valinomycin für Kalium und Rubidium permeabel gemacht wurde. Potentiale unterschiedlicher Größe wurden in Anwesenheit von Valinomycin durch Variation der externen Kaliumkonzentration vorgegeben (Kaliumdiffusionspotentiale) und dann mit beiden Sonden bestimmt. Die erhaltene Eichkurve (Abb.1) diente der Korrektur der TPP^+-Meßwerte. Im Bereich niedriger Meßwerte weist die $\Delta\Psi$-Messung generell einen großen methodischen Fehler auf. Stark erniedrigte Meßwerte wurden daher als $\leq$ -50 mV angegeben.

Durchführung

- Verwendete Sonden:
  1. $[^{14}C]$-TPP^+-Bromid: 710 MBq/mMol
     Konzentration im Ansatz: 7,8 µM, 5,5 KBq/ml
  2. Rb^+-86-Chlorid: 45 MBq/mMol
     Konzentration im Ansatz: 100 µM, 4,5 KBq/ml
- Probenvolumen: 500 µl Zellsuspension OD_{600}=5-20
- Eichkurve: + 25 µM Valinomycin
- 1,5minütige Inkubation der Zellen mit der Sonde bei 30°C, Belüftung der Zellen durch Rühren
- Silikonölzentrifugation: 3 x 100 µl
- Szintillationszählung:
  1. 3 x 50 µl Überstand der Silikonölzentrifugation
  2. 3 x 50 µl Zellsuspension

Berechnung des Membranpotentials

Zu messende Größen

- VA_{gesamt} : Radioaktivität des Gesamtansatzes der Zellsuspension [dpm/100µl Zellsuspension]

- VA_{extern} : Radioaktivität im Überstand [dpm/100 µl]
  = Extrazelluläre Volumenaktivität der Sonde
- V_{intern} : Intrazelluläres Volumen [µl/100 µl Zellsuspension]

Zu berechnende Größen

- A_{intern} $= VA_{gesamt} - VA_{extern}$
- VA_{intern} $= A_{intern}/V_{intern}$
- $\Delta\Psi$ $= -2{,}303\ RT \log (VA_{intern}/VA_{extern})$

- A_{intern} : Zellassoziierte Radioaktivität [dpm/100 µl Zellsuspension]
- VA_{intern} : Intrazelluläre Volumenaktivität der Sonde [dpm/µl]
- $\Delta\Psi$: Membranpotential [mV]

II.10. Bestimmung des pH-Gradienten

Auch der pH-Gradient über der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* wurde mit Hilfe radioaktiv markierter, in niedriger Konzentration eingesetzter Sonden bestimmt (Rottenberg, 1979; Kashket, 1985). Je nach Richtung des pH-Gradienten wurde entweder eine schwache Säure ($pH_{in} \geq pH_{ex}$, $\Delta pH \geq 0$) oder eine schwache Base als Sonde ($pH_{in} \leq pH_{ex}$, $\Delta pH \leq 0$) verwendet. Die ungeladenen und damit lipophilen Formen dieser schwachen Säure bzw. Base können die Cytoplasmamembran passieren. Liegt ein positiver bzw. negativer pH-Gradient über der Membran vor, so wird die durch Diffusion in die Zelle gelangte, ungeladene Form der Säure verstärkt deprotoniert bzw. die der Base protoniert. Da die Membran für die geladenen Formen der Sonden undurchlässig ist, kommt es zur Akkumulation dieser Formen im Cytoplasma. Das Ausmaß der Akkumulation wird bestimmt durch die Größe des pH-Gradienten.
Im Gleichgewicht gilt:

$$[HS_{in}] = [HS_{ex}]$$
$$[S^-_{in}]/[S^-_{ex}] = [H^+_{ex}]/[H^+_{in}]$$

bzw.

$$[B_{in}] = [B_{ex}]$$
$$[BH^+_{ex}]/[BH^+_{in}] = [H^+_{ex}]/[H^+_{in}]$$

Liegt der extra- und intrazelluläre pH-Wert mehr als eine Einheit über bzw. unter dem pK_S-Wert der schwachen Säure bzw. Base so gilt näherungsweise für interne und externe Sondenkonzentrationen:

$$[S^-] \approx [S^-] + [SH] = [S_{gesamt}]$$

bzw.

$$[BH^+] \approx [BH^+] + [B] = [B_{gesamt}]$$

Entsprechend kann das Verhältnis der Konzentrationen der geladenen Sonden im internen und externen Raum und somit auch das Verhältnis von internem zu externem pH durch die Messung der Gesamtkonzentrationen der Sonden (protoniert und unprotoniert) ermittelt werden. Nur diese Gesamtkonzentrationen sind der Messung zugänglich.

Alle ΔpH-Messungen wurden stets mit beiden Sonden durchgeführt. Zur Korrektur der intrazellulären Sondenkonzentrationen gegen mitgeschleppte extrazelluläre Sonde und an Zellstrukturen gebundene Sonde wurde auch je eine ΔpH-Messung an Zellen vorgenommen, deren pH-Gradient durch Zusatz der Ionophore CCCP und Nigericin abgebaut worden war.

Durchführung

- Verwendete Sonden:
  1. [^{14}C]-Benzoat: $pK_S = 4{,}3$; Verwendung bis pH_{ex}=5,3; 2,04 GBq/mMol; Konzentration im Ansatz: 9,8 µM, 20,0 KBq/ml
  2. [^{14}C]-Methylamin: $pK_S = 9{,}3$; Verwendung bis pH_{ex}=8,3; 2,07 GBq/mMol; Konzentration im Ansatz: 8,0 µM, 16,6 KBq/ml
- Korrekturansatz: + 20 µM CCCP, 20 µM Nigericin
- Probenvolumen: 500 µl Zellsuspension, OD_{600} = 5-20
- 1,5minütige Inkubation der Zellen mit den Sonden bei 30°C
- Siliconölzentrifugation: 3 x 100 µl
- Aufarbeitung der Zellsedimente wie unter II.6. beschrieben
- Szintillationszählung:
  1. Überstände: 3 x 50 µl
  2. Extrakte der Zellsedimente: 3 x 650 µl

Berechnung

Zu messende Größen

- VA_{extern} : extrazelluläre Volumenaktivität [dpm/µl]
- $A_{intern,M}$: Radioaktivität in 780 µl extrahierten Sediments, Meßansatz, [dpm/100 µl Zellsuspension]

- $A_{intern,K}$: Radioaktivität in 780 µl extrahierten Sediments, Korrekturansatz, [dpm/100 µl Zellsuspension]
- V_{intern} : Intrazelluläres Volumen [µl/100 µl Zellsuspension]

Zu berechnende Größen

- VA_{intern} $= [A_{intern,M} - A_{intern,K} + (V_{intern} \times VA_{extern})]/V_{intern}$
- ΔpH $= pH_{in} - pH_{ex} = \log([H^+]_{ex}/[H^+]_{in})$
- ΔpH $= \log(VA_{intern}/VA_{extern})$ (schwache Säure)

bzw.

- ΔpH $= \log(VA_{extern}/VA_{intern})$ (schwache Base)

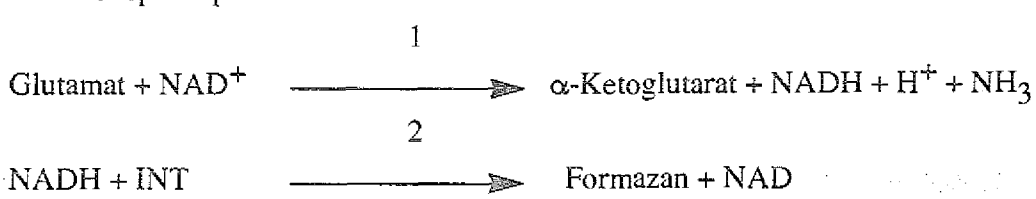
- VA_{intern} : Intrazelluläre Volumenaktivität [dpm/µl]
- ΔpH : pH-Gradient

II.11. Optisch-Enzymatische Tests zum Nachweis von Metaboliten

II.11.1. Glutamatbestimmung

Die Glutamatbestimmung erfolgte modifiziert nach Beutler und Michal (1974) wie bei Hoischen (1990) beschrieben. Zum quantitativen Umsatz des Glutamats zu α-Ketoglutarat wurde die Glutamat-Dehydrogenase zusammen mit einem weiteren Enzym, der Diaphorase, eingesetzt. Letzteres Enzym überträgt die aus der oxidativen Deaminierung des Glutamats stammenden Reduktionsäquivalente auf Jodnitrotetrazolium-Violett unter Bildung eines gefärbten Formazans.

- Reaktionsprinzip:



1: Glutamat-Dehydrogenase
2: Diaphorase

- Photometrischer Nachweis des gebildeten Formazans bei 492 nm
- Meßbereich: 2-20 µM im Testansatz

II.11.2. Glukosebestimmung

Glukosekonzentrationen im Kulturüberstand wurden mit Hilfe der Testkombination für D-Glukose der Firma Boehringer ermittelt.

- Reaktionsprinzip:

$$\text{D-Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow{1} \text{Glukose-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glukose-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{2} \text{6-Phosphogluconat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

1: Hexokinase
2: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

- Photometrischer Nachweis des gebildeten NADPHs bei 340 nm
- Meßbereich: 7-92 µM im Testansatz

II.11.3. Acetatbestimmung

Die Essigsäure-Testkombination der Firma Boehringer wurde zum quantitativen Nachweis von Acetat eingesetzt.

- Reaktionsprinzip:

$$\text{Acetat} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightarrow{1} \text{Acetyl-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{Oxalacetat} \xrightarrow{2} \text{Citrat CoA}$$

$$\text{Malat} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{3} \text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

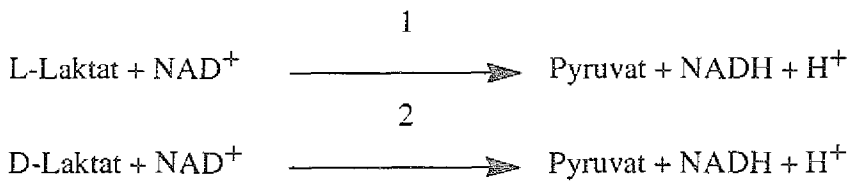
1: Acetyl-CoA-Synthetase
2: Citrat-Synthase
3: Malat-Dehydrogenase

- Nachweis von Acetat über die photometrische Bestimmung des in der vorgeschalteten Indikatorreaktion (Malat-Dehydrogenase) gebildeten NADHs bei 340 nm
- Meßbereich: 5-77 µM im Testansatz

II.11.4. Laktatbestimmung

Auch zum Nachweis von Laktat wurde eine Testkombination der Firma Boehringer eingesetzt.

- Reaktionsprinzip:



1: L-Laktat-Dehydrogenase
2: D-Laktat-Dehydrogenase

- Photometrische Bestimmung des NADHs bei 340 nm
- Meßbereich: 10-100 µM im Testansatz

II.11.5. α-Ketoglutaratbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von α-Ketoglutarat erfolgte wie beschrieben (Burlina, 1985) durch quantitativen Umsatz des α-Ketoglutarats zu Glutamat mit Hilfe der Glutamat-Dehydrogenase. In Anwesenheit eines Überschußes an Ammonium liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf Seiten des Glutamats.

- Reaktionsprinzip:

1: Glutamat-Dehydrogenase

- Photometrischer Nachweis der NADH-Abnahme bei 340 nm
- Meßbereich: 10-120 µM im Testansatz

II.12. Bestimmung der intrazellulären Kaliumkonzentration

Die quantitative Bestimmung von Kaliumkonzentrationen wurde über Atomabsorptions-Spektrometrie von der Zentralabteilung für chemische Analysen des Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Während für Messungen extrazellulärer Konzentrationen die zell-

freien Überstände der Silikonölzentrifugation eingesetzt wurden, dienten Zellextrakte speziell durchgeführter Siliconölzentrifugationen als Proben für die Ermittlung intrazellulärer Konzentrationen. Zur Vermeidung von Fehlern durch Kalium-Verunreinigung der Perchlorsäure erfolgte die Sedimentation der Zellen ausschließlich in Siliconöl. Der Aufschluß der Zellen wurde dann durch das Detergenz CTAB vorgenommen.

Durchführung

- Vorbereitung der Siliconölröhrchen: Vorlage von 65 µl Silikonöl, spezifische Dichte d=1,03
- Probenvolumen: 3 x 200 µl Zellsuspension
- Zentrifugation: siehe II.6.
- Überführung der Zellsedimente mit möglichst geringer Ölmenge in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Resuspension der Sedimente in 200 µl 0,2% CTAB
- Extraktion der Sedimente durch Beschallung im Ultraschallbad (5 min)
- Sedimentation von Zelltrümmern und Öl durch Ultrazentrifugation (20 min, 140 000 g, 4°C)
- Verwendung der Überstände für die Atomabsorptionsspektrometrie

II.13. Bestimmung der Adeninnukleotide

Die Lichtemission bei Umsatz von ATP durch das Luciferin/Luciferase-System bildet die Grundlage des Nachweises der Adeninnukleotide ATP und ADP (modifiziert nach Lundin et al., 1976; Schimz et al., 1981):

$$ATP + Luciferin + O_2 \longrightarrow Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + h \cdot \upsilon$$

Das verwendete Luciferin/Luciferase-Rohextrakt liefert keine zeitlich konstante Lichtemission wie hochgereinigte Extrakte, so daß statt der Emissionsrate die Lichtemission während der ersten 20 Sekunden nach Start der Reaktion bestimmt wurde. Die Proportionalität dieses Meßwertes zum ATP-Gehalt der Probe wurde mit Hilfe eines ATP-Standards überprüft. ATP-Standardlösungen wurden ebenfalls zur internen Standardisierung der Messung verwendet. Zur Bestimmung von ADP wurde dieses in Anwesenheit von Phosphoenolpyruvat durch die Reaktion der Pyruvatkinase (PK) zu ATP umgesetzt und dann ebenfalls entspechend des oben genannten Prinzips als ATP nachgewiesen.

Extraktion und Probenvorbereitung

- Extraktion durch direktes Einspritzen der Zellsuspension in Dimethylsulfoxid (DMSO); Probenvolumen: 40 oder 80 µl, je nach Zelldichte
- Σ Probe + DMSO = 400 µl
- + 1,6 ml H_2O (kalt)
- Aufbewahrung der Extrakte bei -18°C

Umsetzung von ADP zu ATP

- Puffer (10fach): 0,5 M $MgSO_4$ x 7 H_2O, 2 M KCl, 10 mM Tris, pH alkalisch (nicht verändern), + 50 mM Phosphoenolpyruvat (stets frisch ansetzen)
- Ansatz: 500 µl Extrakt, 45 µl Puffer, 5 µl Pyruvatkinase (2000 U/ml)
- Reaktionszeit: 20 min, danach sofortige Messung des ATP-Gehalts

Durchführung der Messung

- Testpuffer : 50 mM Tris-H_2SO_4, 3,5 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O, 2,5 mM K_2SO_2, O,6 mM EDTA, pH 7,4
- ATP-Standard : 1 µM in Testpuffer
- Luciferin/Luciferase : Suspension von 50 mg Lyophylisat (Sigma, Buffered Firefly Lantern Extract, FLE-50) in 10-30 ml H_2O, je nach Aktivität, Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Filtrieren
- Testansatz : 20-200 µl Extrakt
  ± 50 µl ATP-Standard
  + H_2O Σ 250 µl
- Start der Reaktion : + 250 µl Luciferin/Luciferase
  + 2250 µl Testpuffer
- Messung : Anzahl der Lichtblitze (counts) während der ersten 20 Sekunden nach Start der Reaktion mit einem Bio-luminescenzanalysator (XP 2000, Skan AG Basel, CH)

Berechnung intrazellulärer ATP- bzw. ADP-Konzentrationen

Zu messende Größen

- $Count_E$: Counts pro X µl Extrakt, [Counts]
- $Count_{E+S}$: Counts pro X µl Extrakt + 50 µl Standard 1 µM (= 0,05 nMol), [Counts]
- VF_I : Verdünnungsfaktor Zellsuspension = Gesamtvolumen Extrakt/Volumen Zellsuspension
- V_i : Intrazelluläres Volumen [µl/1000µl Zellsuspension]

Zu berechnende Größen

- $Count_S$ $= (Count_{E+S} - Count_E)/0{,}05$ nMol
- C_E $= Count_E/(Count_S \cdot X)$
- C_{intern} $= (C_E \cdot VF_I)/V_i$

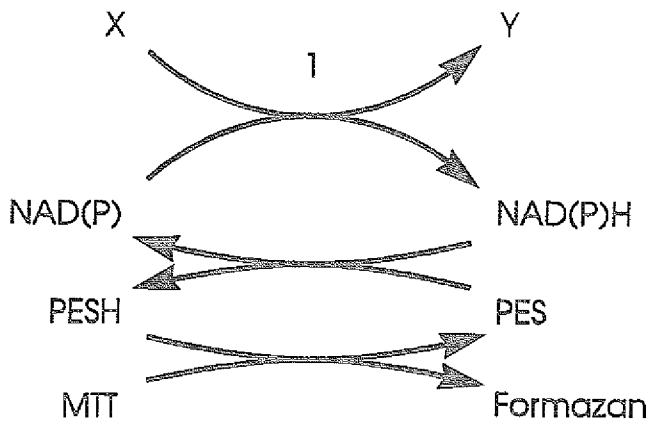
- $Count_S$: Counts Standard [counts/nMol]
- C_E : Nukleotidkonzentration im Extrakt [mM]
- C_{intern} : Intrazelluläre Nukleotidkonzentration [mM]

ATP-Messung und Berechnung wurden nach Umsetzung des ADPs der Extrakte zu ATP wie beschrieben nochmals durchgeführt. Die Verdünnung der Extrakte durch die Umsetzung (Verdünnungsfaktor 1,1) ist bei der Berechnung zu berücksichtigen. Die intrazellulären ADP-Konzentrationen ergeben sich als Differenz der ATP-Konzentrationen vor und nach Umsatz des ADPs.

II.14. Zyklischer Test zur Messung der Nicotinamid-adenin-dinukleotide

Ähnlich wie zur Bestimmung der Adeninnukleotide bedarf es zum Nachweis der Pyridinnukleotide NAD(H) und NADP(H) eines sehr empfindlichen Tests, da die intrazellulären Konzentrationen dieser Coenzyme nur einige mM betragen und zudem ihr schneller Umsatz eine Ankonzentrierung der Zellen (z.B. durch Sedimentierung) vor dem Aufschluß unmöglich macht. Extrahierte Proben von Zellsuspensionen aus Kurzzeitfermentationen (OD_{600}= 5-15) enthielten NAD(P)(H)-Konzentrationen von 0,1-5,0 µM, die mit Hilfe des zyklischen Tests (Bernofsky und Swan, 1973) quantitativ nachgewiesen werden konnten.

Reaktionsprinzip:



1	: Alkohol-Dehydrogenase bzw. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
X	: Alkohol bzw. Glukose-6-Phosphat
Y	: Acetalydehyd bzw. 6-Phosphogluconat
PES(H)	: 5-Methylphenazinium-ethylsulfat, oxidiert/reduziert
MTT	: Thiazolyl-Blau, 3-(4',5'-dimethyl-thiazolyl-2-)-2,4-(diphenyltetrazolium-bromid)

Das in geringen Mengen vorhandene Coenzym wird in der ersten, enzymkatalysierten Reaktion reduziert. Seine Reoxidation führt im Anschluß über zwei nichtenzymatische Schritte zur Reduktion von MTT und damit zur Bildung eines Formazans, das bei 570 nm photometrisch nachgewiesen werden kann. Liegt die Konzentration des zu bestimmenden Coenzyms unter dem K_M-Wert des Eingangsenzyms und stellt die enzymkatalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktionsfolge dar, so ist die der Messung zugängliche Bildungsrate des Formazans der Coenzymkonzentration direkt proportional. Die Eichung der Messung kann mit Hilfe von NAD bzw. NADP-Standardlösungen erfolgen. Der Einsatz entweder der NAD-spezifischen Alkoholdehydrogenase oder der NADP-spezifischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erlaubt die Differenzierung zwischen NAD und NADP. Die Unterscheidung zwischen oxidierter und reduzierter Form des jeweiligen Coenzyms ist jedoch nur möglich, wenn die beiden Formen getrennt in unterschiedlichen Proben angeboten werden.

Zur Trennung von oxidierter und reduzierter Form der Coenzyme kann deren unterschiedliche pH-Stabilität ausgenutzt werden: Während die oxidierten Formen bei alkalischem pH schnell zerstört werden und im sauren und neutralen pH-Bereich stabil sind, sind umgekehrt die reduzierten Formen im Sauren instabil, können aber im Alkalischen stabil gehalten werden. Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen aller vier Formen der Pyridinnukleotide wurden daher für jeden Meßwert jeweils ein saurer und ein alkalischer Extrakt durch Vermischung der Zellsuspension mit Aliquots konzentrierter Säure bzw. Base hergestellt. Vor der photometrischen Messung wurde wieder ein neutraler

Tab. 1

NAD(P)(H)-Bestimmung: Überprüfung des Extraktionserfolges

Es wurden saure (pH 1,0) und alkalische (pH 12,4) Extrakte einer Zellsuspension von *C. glutamicum* ohne und mit Zusatz von Standardlösungen der 4 Nicotinamid-adenindinukleotide (Konzentration im Extrakt 2-4 µM) hergestellt. Aufgeführt sind die im zyklischen Test gemessenen Aktivitäten der NAD(H)-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase bzw. der NADP(H)-abhängigen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase für Standardnukleotid, das dem Extraktionsprotokoll (s. Text) unterworfen wurde (+ Extraktion) oder nicht unterworfen wurde (- Extraktion).

Nucleotid	Enzymaktivität $[10^{-3} \cdot \Delta E_{570nm} \cdot min^{-1} \cdot pMol^{-1}]$	
	- Extraktion	+ Extraktion
Saurer Extrakt:		
NAD^+	1,64	1,70
NADH	1,58	0,00
$NADP^+$	3,42	3,60
NADPH	2,92	0,12
Alkalischer Extrakt:		
NAD^+	1,32	0,00
NADH	1,02	0,94
$NADP^+$	3,18	0,00
NADPH	2,68	2,44

pH-Wert eingestellt. Zellfreie Überstände, die nach der gleichen Extraktionsprozedur behandelt wurden, dienten der Kontrolle des Hintergrundes der Messung. Im Falle der alkalischen Extrakte mußte die Messung sofort nach der Neutralisation erfolgen, da die Stabilität der reduzierten Formen bei neutralem pH begrenzt ist (Abbau: 10% pro Stunde; Klingenberg et al., 1985). pH-Wert, Temperatur und Dauer der Extraktion wurden für den sauren und den alkalischen Extrakt getrennt optimiert. Die besten Ausbeuten wurden im sauren Extrakt bei pH 1,0, im alkalischen Extrakt bei pH 12,4 erhalten. Anschließende Inkubation der Extrakte für 5 min (alkalische Extrakte) bzw. 8 min (saure Extrakte) bei 55°C führte zu vollständigem Aufschluß der Zellen und Zerstörung der jeweils nicht gewünschten Form der Pyridinnukleotide. Der Erfolg der gewählten Extraktionsbedingungen wurde durch Zusatz von Standardlösungen der vier Nicotinamid-Nukleotide zu sauren

und alkalischen Extrakten vor deren Inkubation bei 55°C überprüft (Tab.1). Eichung der Messungen mit Hilfe derselben Standardlösungen zeigte, daß sich im sauren Extrakt zugesetztes NAD und NADP nach Abschluß der Extraktion zu 100% wiederfindet, während NADH und NADPH nahezu vollständig abgebaut werden. Entsprechend ist dem alkalischen Extrakt zugesetztes NAD und NADP nach Abschluß der Extraktion nicht mehr nachweisbar, NADH und NADPH werden zu mehr als 90% wiedergefunden.

Durchführung der Extraktion

- Probenvolumen : 1 ml Zellsuspension, $OD_{600} \geq 5$
- Vorlage : 1 M $HCLO_4$ (saure Extrakte, 80-130 µl für pH 1,0)
  1 M KOH, 50% v/v EtOH (alkalische Extrakte, 160-260 µl für pH 12,4)
- Inkubation : 55°C, 5 min (alkalische Extrakte), 8 min (saure Extrakte); danach Abkühlung im Eisbad
- Neutralisation : Einstellung von pH 7,4 durch langsamen, tröpfchenweisen Zusatz von 2 M KOH (saure Extrakte) bzw. 1 M HCl (alkalische Extrakte) bei gleichzeitigem Rühren der Extrakte mit einem Magnetrührer

Katalytischer Test

- Testansatz
  1. 500 µl Testpuffer 2fach: 0,2 M Glycylglycin
     0,2 M Nicotinsäureamid pH 7,4
  2. 100 µl PES 4 mg/ml
  3. 25 µl MTT 5 mg/ml

	NAD(H)-Bestimmung	NADP(H)-Bestimmung
4.	40 µl EtOH	25 µl Glukose-6-Phosphat 15 mM 10 µl $MgSO_4$ 5 mM
5.	X µl Extrakt Zellsuspension Y µl H_20 Extrakt zellfreier Überstand + Z µl H_2O Σ X+Y konstant bei Einsatz unterschiedlicher Extraktvolumina Σ X+Y+Z = 325 µl	Σ X+Y+Z = 330 µl

- Start der Reaktion durch Zugabe von 10 µl Alkoholdehydrogenase, 4500 U/ml bzw. 10 µl Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 140 U/ml

- Messung von ΔE/min bei 570 nm über einen Zeitraum von 7 min
- Eichung : interne Standardisierung durch Zugabe von NAD(P)-Standardlösungen (20-50 µl 5 µM) zu Zellextrakten, Messung ± Standardlösung

Überprüfung der NAD- und NADP-Standardlösungen

1. Optisch-Enzymatischer Test für NAD (Klingenberg et al., 1985)
   - Meßprinzip: Quantitativer Umsatz von NAD zu NADH und dessen photometrischer Nachweis bei 340 nm, molarer Extinktionskoeffizient NADH $\varepsilon = 6{,}3\ mM^{-1}cm^{-1}$
   - Testansatz: 1. 500 µl Testpuffer: 0,2 M Na_2HPO_4
     45 mM Semicarbazidhydrochlorid pH 8,8
     2. 500 µl H_2O
     3. 10 µl EtOH
     4. Probe: 10-50 µl 2 mM NAD
   - Start der Reaktion durch Zugabe von 10 µl Alkohol-Dehydrogenase (9000 kU/ml, 1:30 mit 3,2 M $(NH_4)_2SO_4$ verdünnt)
   - Reaktionszeit: 10 min
   - Messung: $\Delta E_{340\ nm}$, d.h. Differenz der Extinktion vor Start und nach Abschluß der Reaktion
2. Optisch-Enzymatischer Test für NADP (Klingenberg et al., 1985)
   - Meßprinzip und Ausführung der Messung analog zum NAD-Test
   - Testansatz: 1. 1000 µl Testpuffer: 0,1 M Triethanolamin/HCL pH 7,4
     2. 5 µl 1 M $MgSO_7$
     3. 25 µl 0,2 M Glukose-6-Phosphat
     4. Probe: 10-50 µl 2 mM NADP
   - Start der Reaktion durch Zugabe von 10 µl Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (140 U/ml, 1:30 mit 3,2 M $(NH_4)_2SO_4$ verdünnt)
   - Reaktionszeit: 20 min

Berechnung

Zu messende Größen

A_{Z+H} : Enzymaktivität pro Y µl Extrakt [min^{-1}]
A_H : Enzymaktivität pro Y µl zellfreier Überstand [min^{-1}]
A_{S+H} : Enzymaktivität Y µl zellfreier Extrakt + 20 µl 5 µM Standard (100 pMol) [min^{-1}]

Zu berechnende Größen

A_Z : Enzymaktivität pro Y µl Extrakt, korrigiert [min^{-1}]
A_S : Enzymaktivität für Standard [$min^{-1} \cdot pMol^{-1}$]
C_{Ext} : Nukleotidkonzentration im Extrakt [pMol/µl]
C_{in} : Intrazelluläre Nukleotidkonzentration [mM]
VF : Verdünnungsfaktor der Zellsuspension durch Ansäuerung/Alkalisierung und Neutralisation
V_i : Intrazelluläres Volumen [µl/1000 µl]

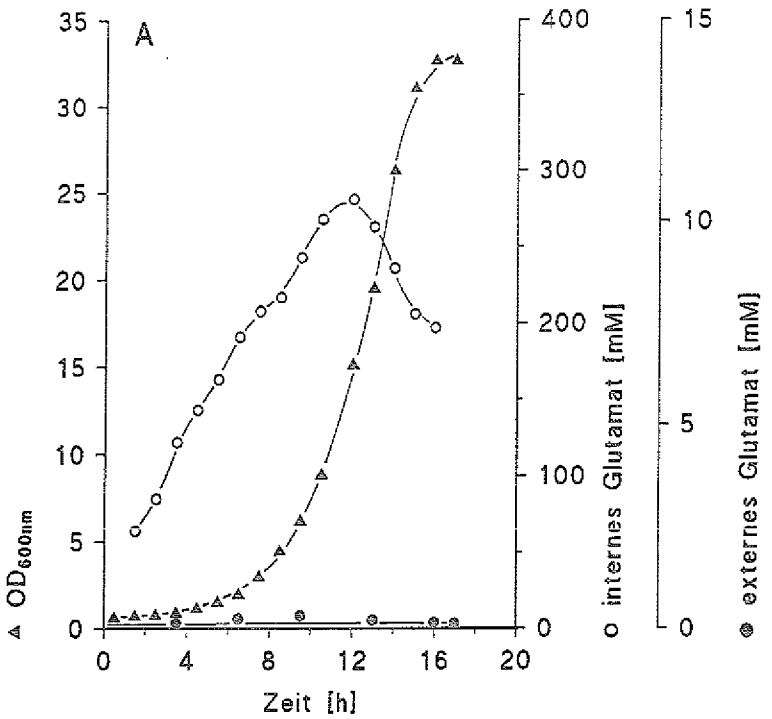
$A_Z = A_{Z+H} - A_H$
$A_S = (A_{S+H} - A_H)/100$ pMol
$C_{Ext} = A_Z/A_S \cdot Y$
$C_{in} = C_{Ext} \cdot VF/V_i$

II.15. Messung der Atmungsaktivität

Die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Bachhofer, Reutlingen) gemessen. Kathode (Platin) und Anode (Silber) der Sauerstoffelektrode tauchen in eine halbgesättigte KCl-Lösung und sind von der Probenlösung durch eine für Sauerstoff durchlässige Teflonmembran getrennt. Bei Anlegen einer Polarisationsspannung (ca. 0,8 V) fließt in der Elektrode durch Oxidation von Silber an der Anode und Reduktion von O_2 an der Kathode ein Strom, dessen Größe der Sauerstoffkonzentration in der Probenlösung direkt proportional ist.

Zur Messung der Atmungsaktivität von Zellsuspensionen wurden Proben von jeweils 500 µl aus der Kurzzeitfermentation in die auf 30°C temperierte Meßkammer der Sauerstoffelektrode überführt. Mittels eines Magnetrührers wurde die Zellsuspension kontinuierlich durchmischt. Die Probenkammer wurde so verschlossen, daß sich kein Luftraum über der Zellsuspension befand. Unter diesen Bedingungen kann die Abnahme des Sauerstoffgehaltes in der Probe durch die Atmungsaktivität der Zellen gemessen und mittels eines Schreibers registriert werden.

Zur Kalibrierung der Messung wurde der Schreiberausschlag nach Einfüllung Luftgesättigten, auf 30°C temperierten Wassers (0,23 µMol O_2/ml) und nach vollständiger Reduktion des vorhandenen Sauerstoffs mit Natriumdithionit notiert.



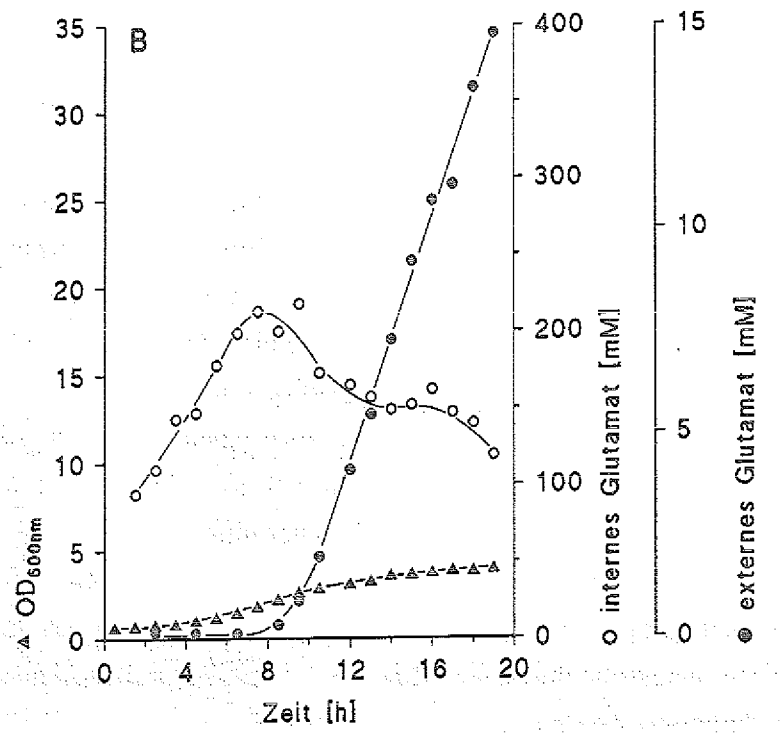


Abb.2

Wachstum, intrazelluläre und extrazelluläre Glutamatkonzentration von *C. glutamicum* bei Wachstum mit 5% Glukose und 200 µg Biotin/l (A) bzw. 0,5 µg Biotin/l (B)

Wachstum, OD_{600} (▲), die intra- (○) und extrazelluläre (●) Glutamatkonzentration wurden als Funktion der Zeit verfolgt.

III. ERGEBNISSE

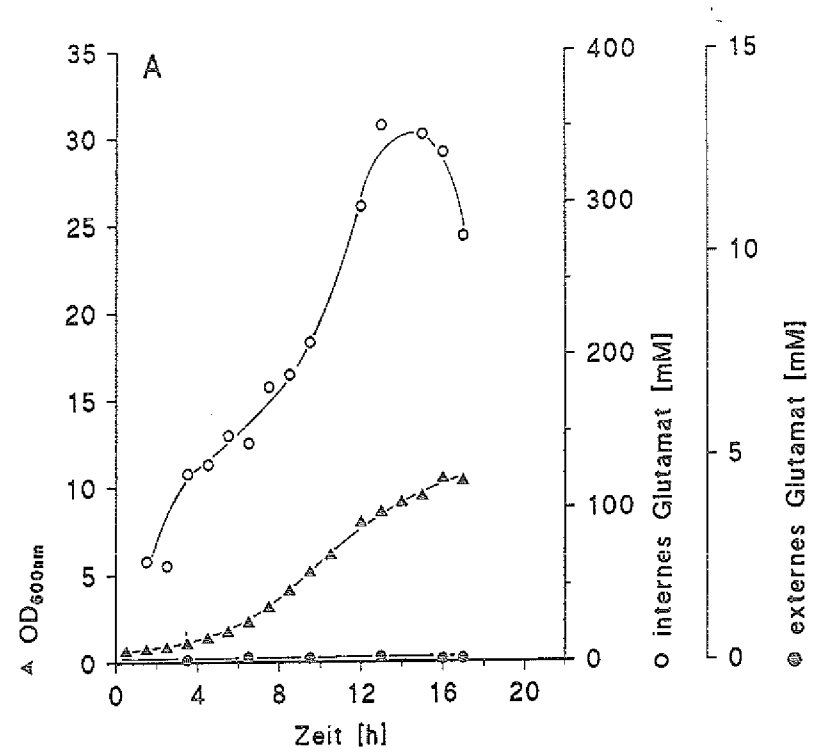
III.1. *Corynebacterium glutamicum*: Wachstum und Metabolitüberproduktion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstum und die Glutamatsekretion von *Corynebacterium glutamicum* ausgehend von Glukose oder Acetat als C-Quelle bei Biotin-Versorgung und Biotin-Mangel untersucht. Zum Einstieg wurden daher Wachstum, Substratumsatzraten und Produktbildungsraten des Organismus mit diesen beiden C-Quellen in Abhängigkeit des Biotinangebots quantifiziert.

III.1.1. Kontrolle von Wachstum und Glutamatproduktion durch die Verfügbarkeit von Biotin

Corynebacterium glutamicum ist auxotroph für Biotin. In Batchkulturen (Mineralsalzmedium) wird daher bei niedrigen Biotinkonzentrationen von 0-3 µg/l das Wachstum der Zellen durch die Verfügbarkeit des Biotins limitiert. Die maximal erreichbare Zelldichte ist dann proportional zur Menge des zur Verfügung gestellten Biotins. Wie in der Literatur vielfach beschrieben stellt die Limitation des Wachstums durch den Biotinmangel eine derjenigen Kulturbedingungen dar, die die Produktion von Glutamat im *C. glutamicum* Wildtyp auslösen (Kinoshita und Tanaka, 1972, Hirose et al, 1985).

Wachstum und Glutamatbildung des *C. glutamicum* Wildtyps ATCC 13032 mit Glukose als C-Quelle und entweder 200 µg oder 0,5 µg Biotin/l sind in Abbildung 2 dargestellt. In Anwesenheit eines Überschußes von Biotin wuchs der Organismus bis zu einer Zelldichte von 12 mg TG/ml und sekretierte kein Glutamat ins Medium. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden intrazelluläre Glutamatkonzentrationen von bis zu 300 mM erreicht. Wurde nur 0,5 µg Biotin/l angeboten, so kam das Wachstum nach einer kurzen exponentiellen Wachstumsphase zum Stillstand. Mit Beginn der stationären Phase begannen die Zellen, Glutamat ins Medium abzugeben. Die intrazelluläre Glutamatkonzentration während der Glutamatsekretion lag mit 100-150 mM deutlich niedriger als während des Wachstums. Mit Acetat als C-Quelle (Abb.3) zeigt *C. glutamicum* qualitativ das gleiche Verhalten in Bezug auf Wachstum und Glutamatproduktion wie bei Verstoffwechselung von Glukose. Allerdings ist die Biotinabhängigkeit der Zellen reduziert. Bei gleicher, limitierender Biotinkonzentration wird mit Acetat im Vergleich zu Glukose eine etwa doppelt so hohe Zelldichte erreicht.



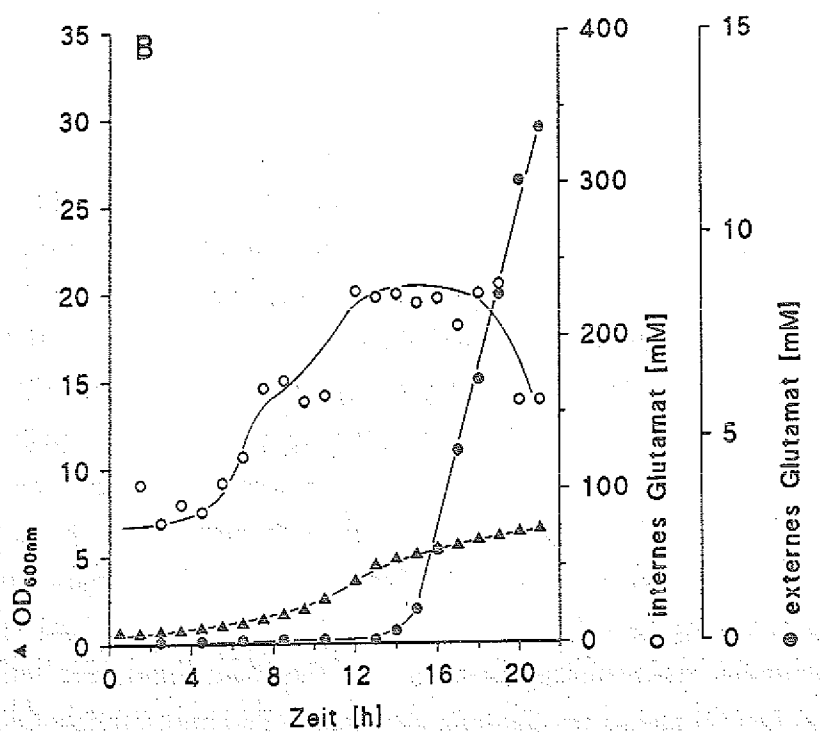


Abb.3

Wachstum, intrazelluläre und extrazelluläre Glutamatkonzentration von *C. glutamicum* bei Wachstum mit 2% Acetat und 200 µg Biotin/l (A) bzw. 0,5 µg Biotin/l (B)

Wachstum, OD_{600} (▲), die intra- (O) und extrazelluläre (●) Glutamatkonzentration wurden als Funktion der Zeit verfolgt.

Zur genauen Analyse der Glutamatsekretion wurden Zellen, die nach Verbrauch des Biotins das Wachstum eingestellt und mit der Glutamatproduktion begonnen hatten, in frischem Medium resuspendiert. Die Kurzzeitfermentation erlaubte es dann, die Glutamatsekretion bei niedrigen externen Glutamatkonzentrationen zu verfolgen. Im Experiment von Abbildung 4 wurde in einer solchen Kurzzeitfermentation Biotin-limitierten, Glutamatsekretierenden Zellen erneut Biotin zugesetzt. Das Wachstum der Zellen setzte erst nach einer Lag-Phase von ungefähr 40 min ein. Während dieses Zeitraums wurde weiterhin Glutamat ins Medium ausgeschieden, jedoch mit einer im Vergleich zur Rate vor Biotinzugabe um ungefähr 30% reduzierten Rate. Mit Zugabe von Biotin konnte ein Anstieg der intrazellulären Glutamatkonzentration beobachtet werden. Nachdem die Zellen die Sekre-

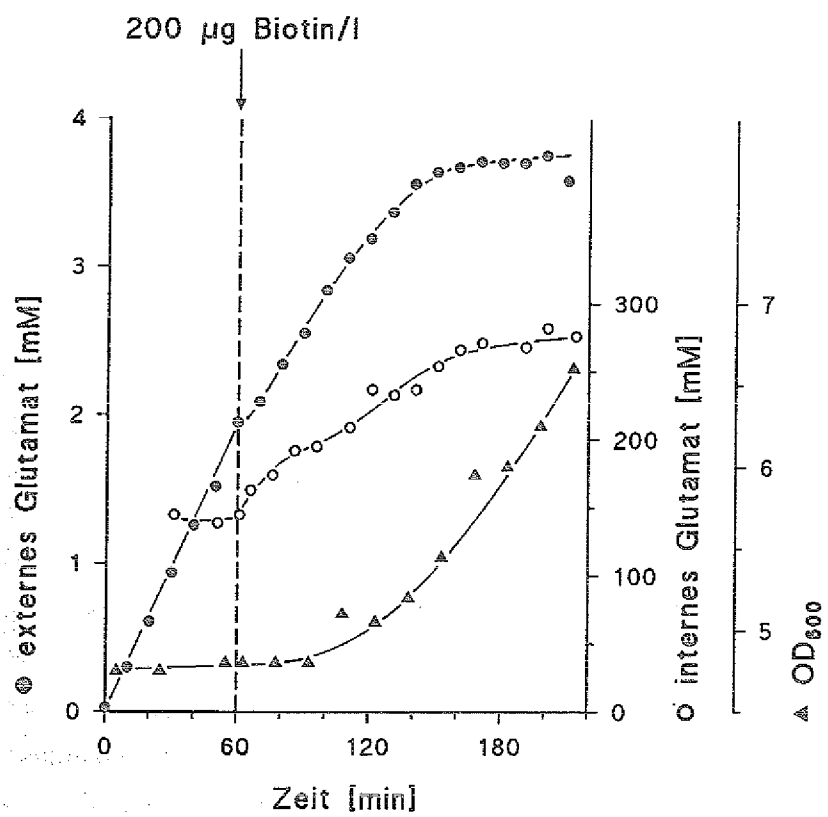


Abb.4

Reaktion Glutamat-sekretierender Zellen auf die Zugabe von Biotin

Während einer Kurzzeitfermentation wurde einer Kultur Biotin-limitierter Zellen 60 Minuten nach Start des Experiments 200 µg Biotin·l^{-1} zugesetzt. OD_{600} (▲), die intra- (○) und die extrazelluläre (●) Glutamatkonzentration wurden als Funktion der Zeit verfolgt.

tion eingestellt und das Wachstum wieder aufgenommen hatten wiesen sie auch wieder die für wachsende Zellen typische interne Glutamatkonzentration von größer 200 mM auf.

In Batchkulturen kann die Glutamatsekretion über einen Zeitraum von 20-25 Stunden mit konstanten Raten von 20-30 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ TG beobachtet werden. Die kontinuierlich fortschreitende Ansäuerung des Mediums während der Glutamatproduktionsphase führt schließlich zum Abbruch der Sekretion. Es werden Endkonzentrationen von 40-50 mM Glutamat erreicht.

III.I.2. Stoffumsatz unter Wachstumsbedingungen

Tabelle 2 faßt die Daten zusammen, die zu Wachstum und Stoffumsatz von *C. glutamicum* in Gegenwart eines Überschußes von Biotin ermittelt wurden. Bei guter Stickstoffversorgung wuchs *C. glutamicum* mit Glukose als C-Quelle mit einer Rate von 0,41 h^{-1}. Mit Acetat war das Wachstum mit 0,24 h^{-1} dagegen deutlich langsamer, obwohl der Umsatz des Acetats (ausgedrückt als Umsatz von C_6-Einheiten) mit 80% der Rate des Glukoseumsatzes erfolgte. Gleichzeitig war die Atmungsrate der Acetat-verstoffwechselnden Zellen um den Faktor zwei höher als diejenige der Glukose-verstoffwechselnden Zellen.

Der Zellertrag von 0,48 g TG/g Substrat, der für Glukose verstoffwechselnde Zellen von *C. glutamicum* ermittelt wurde, stimmt mit Literaturangaben für Zellerträge von Aerobiern bei Nutzung von Zuckern als C- und Energiequelle (0,5 g TG/g Substrat; Neidhardt et al., 1990) gut überein. Aus dem Zellertrag läßt sich abschätzen, zu welchem Anteil die umgesetzte C-Quelle zur Bildung von Zellsubstanz eingesetzt wurde. Ungefähr 50% der Zelltrockenmasse besteht aus Kohlenstoff. Zur Bildung von 0,24 g zellulärem Kohlenstoff wurde also 1 g Glukose umgesetzt. Die Umrechnung dieser Werte in molare Mengen (1 Mol Kohlenstoff C_6 = 72 g; 1 Mol Glukose = 180 g; 0,24 g C_6 = 3,33 mMol; 1 g Glukose = 5,56 mMol; 3,33/5,56= 0,6) ergibt, daß etwa 60% der verbrauchten Glukose zur Zellsubstanzsynthese verwendet wurde. Zellgebundener Kohlenstoff ist in seinem Oxidationsgrad identisch mit dem Kohlenstoff in Glukose oder auch Acetat. Der Sauerstoffumsatz der Zellen muß daher auf die Oxidation der nicht zur Zellsubstanzsynthese eingesetzten Glukose zurückgehen. Für diese Glukose ergibt sich ein O_2/C_6-Verhältnis von 4,2, während bei vollständiger Oxidation von Glukose zu CO_2 ein Verhältnis von O_2/C_6=6 zu erwarten ist. Von der nicht assimilierten Glukose (40% des gesamten Glukoseumsatzes = 29 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$) wurden also nur maximal 69% (20 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$) zu CO_2 oxidiert.

Mit Acetat als C-Quelle lag der Wachstumsertrag bei 0,37 g TG/g Substrat. Eine weitere Auswertung der Daten ist, wie für die Glukose-verstoffwechselnden Zellen im

Tab.2

Wachstums- und Verbrauchsraten von C-Quelle und Sauerstoff von *C. glutamicum* bei ausreichender Biotinversorgung

Die Anzucht erfolgte mit 200 µg Biotin l^{-1} und Glukose bzw. Acetat als C-Quelle. Die Experimente wurden jeweils in An- und Abwesenheit von 75 mM $(NH_4)_2SO_4$ als N-Quelle durchgeführt.

C-Quelle/ N-Quelle	Wachstums-rate	Wachstums-ertrag	Verbrauchsrate	
	[h^{-1}]	[g TG·g Substrat^{-1}]	[nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}]	
			C-Quelle (C_6)	O_2
Glukose +N	0,41	0,48	72	120
Glukose - N	0	0	11	35
Acetat +N	0,24	0,37	64	213
Acetat - N	0	0	23	110

Detail ausgeführt, möglich (pro g Acetat wurde 0,185 g zellgebundener Kohlenstoff gebildet; 1 Mol Kohlenstoff C_2 = 24 g; 1 Mol Acetat = 60 g; 0,185 g C_2 = 7,7 mMol; 1 g Acetat = 16,7 mMol; 7,7/16,7 = 0,46). Ungefähr 46% des umgesetzten Acetats (29 nMol·min^1 mg TG^{-1}) wurde assimiliert. Für die verbleibenden 54% des Acetats (35 nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}) ergibt sich ein O_2/CO_2-Quotient von 6,1; dieses Acetat wurde also vollständig zu CO_2 oxidiert. Bei Wachstum auf Acetat ist offensichtlich der Energiestoffwechsel gegenüber der Substratassimilierung verstärkt.

Wurde *Corynebacterium glutamicum* die Stickstoffquelle entzogen, so kam das Wachstum der Zellen zum Erliegen und der Umsatz des Kohlenstoffsubstrates ging deutlich zurück. Bei Verstoffwechselung von Acetat betrug die Substratumsatzrate noch 36%, bei Verstoffwechselung von Glukose nur noch 15% der Rate wachsender Zellen. Aus der Atmungsaktivität der Zellen kann abgeleitet werden, daß es nicht zur vollständigen Oxidation des verbrauchten Substrates kam. Zu CO_2 oxidiert wurden maximal 55% des Glukoseumsatzes (6 nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}) bzw. 78% des Acetatumsatzes (18 nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}).

Tab.3

Produktion von Glutamat und α-Ketoglutarat durch *C. glutamicum* ATCC 13023 unter Biotinmangel

Die Zellen wurden mit 1 µg·Biotin l^{-1} angezogen und nach Beendigung des Wachstums und Einsetzen der Glutamatproduktion in die Kurzzeitfermentation überführt. Die Experimente wurden über einen Zeitraum von 3 Stunden in 150 mM Kaliumphosphatpuffer mit 75 mM $(NH_4)_2SO_4$ oder ohne N-Quelle durchgeführt.

C-Quelle	N-Quelle	Verbrauchsrate [nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}]		Bildungsrate [nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}]	
		C-Quelle (C_6)	O_2	Glutamat	α-Keto-glutarat
Glukose	+	43	70	21	≤ 0,5
Glukose	-	7	45*	≤ 0,1	3
Acetat	+	38	115	24	≤ 0,3
Acetat	-	7	95*	≤ 0,1	3

* Meßwert nach 2-stündiger Fermentation

III.1.3. Stoffumsatz unter Glutamat-Produktionsbedingungen

Substratumsatzraten und Produktbildungsraten von *C. glutamicum* Zellen nach vollständigem Verbrauch des nur in geringer Menge zur Verfügung gestellten Biotins sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß *C. glutamicum* unter Biotinmangel und bei ausreichender Versorgung mit C- und N-Quelle Glukose und Acetat mit ungefähr 60% der Rate wachsender Zellen (vergl. Tab.2) verbrauchte, obwohl unter den genannten Bedingungen die Zellen nicht mehr wuchsen. 50-60% der C-Quelle wurde zu Glutamat umgesetzt. Über den Weg der nicht zu Glutamat umgesetzten C-Quelle läßt sich Aufschluß gewinnen durch Bildung der O_2/C_6-Quotienten nach Abzug von zur Glutamatbildung verbrauchtem Sauerstoff (O_2/Glutamat: 1,5/1) und verbrauchter Glukose (Glukose/Glutamat: 1/1). Dabei ergab sich in den gezeigten Experimenten für Acetat wiederum ein höherer O_2/C_6-

Quotient (5,6) als für Glukose (1,8). Die nicht zu Glutamat umgesetzte C-Quelle wurde also im Fall von Acetat maximal zu 94% (13 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$) im Fall von Glukose maximal zu 29% (6,4 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$) vollständig oxidiert. In den Kulturüberständen der Glukose-verstoffwechselnden Kulturen konnte jedoch neben Glutamat kein anderes unvollständig oxidiertes Produkt in größeren Mengen nachgewiesen werden. Pyruvat, Succinat, α-Ketoglutarat und Acetat wurden nur in geringen Konzentrationen gefunden. Die Produktionsraten lagen unter 1 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$. Bei guter Sauerstoffversorgung wurde weder für Biotin-limitierte noch für wachsende Zellen die Bildung von Laktat beobachtet.

Auf Stickstoffmangel reagierten Biotin-limitierte Zellen mit einer Reduktion des Umsatzes der C-Quelle um mehr als 80%. Die Zellen produzierten kein Glutamat. Statt dessen bildeten sie α-Ketoglutarat, das bei guter Stickstoffversorgung nur in sehr geringer Konzentration im Kulturmedium erscheint. Die Produktionsrate des α-Ketoglutarats betrug 3 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$. Etwa 43% der C-Quelle wurde zu α-Ketoglutarat umgesetzt. Die Atmungsraten der Zellen unter Stickstoffmangel sanken im Verlauf der Experimente kontinuierlich ab (angegeben sind nach ca. 2 stündiger Fermentation gemessene Werte). Sie waren jedoch stets noch so hoch, daß sich für die O_2/C_6-Quotienten von deutlich größer 6 ergaben. Dies ist nur unter der Annahme zu erklären, daß die Zellen Speicherstoffen verstoffwechselten.

III.I.4. Charakterisierung der Stämme Nr. 9910 und Nr. 9087 (Kyowa Hakko Kogyo Co.)

Die vom *Corynebacterium glutamicum* Wildtyp abgeleiteten Stämme Nr. 9910 und Nr. 9087 wurden von der Kyowa Hakko Kogyo Co. zur Verfügung gestellt. Nach Angaben der Firma sind die Stämme durch Selektion auf Glutamatausscheidung auch in Gegenwart von Biotin erhalten worden, wobei Stamm Nr. 9910 den Elternstamm von Stamm Nr. 9087 darstellt. Die beiden Stämme wurden in Bezug auf Wachstum und Glutamatproduktion im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Wie in Tabelle 4 gezeigt, wuchs der Stamm Nr. 9910 in Anwesenheit von 200 µg Biotin/l mit identischer Rate wie der Wildtyp und zeigte unter diesen Bedingungen ebenfalls keine Glutamatproduktion. Die intrazelluläre Glutamatkonzentration des Stammes lag jedoch während der exponentiellen Wachstumsphase mit 370 mM deutlich über derjenigen des Wildtyps. Unter Biotinlimitierung zeigten beide Stämme eine etwa gleich hohe interne Glutamatkonzentration, der Stamm Nr. 9910 sezernierte Glutamat jedoch mit einer nahezu doppelt so hohen Rate wie der Wildtyp. Ein ganz anderes Verhalten wies der Stamm Nr. 9087 auf. Er wuchs auch in Anwesenheit von 200 µg Biotin/l nur mit erheblich vermin-

Tab.4

Vergleich der Glutamatproduktion des Wildtyps und der Stämme Nr. 9910 und Nr. 9087 (Kyowa Hakko Kogyo Co.)

Die drei genannten Stämme wurden mit Glukose als C-Quelle in Anwesenheit von 200 und 1 µg·Biotin/l angezogen. Alle Messungen wurden direkt an Zellen aus dem Anzuchtgefäß durchgeführt. Die Angaben zu intrazellulären Glutamatkonzentrationen geben die Höhe des Pools während der exponentiellen Wachstumsphase (Anzucht mit 200 µg Biotin/l) bzw. während der frühen Sekretionsphase (Anzucht mit 1 µg Biotin/l) wieder.

Stamm	[Biotin]	Wachstums-rate	Glutamatsekretion	[Glutamat] intern
	[$\mu g \cdot l^{-1}$]	[h^{-1}]	[$nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$]	[mM]
ATCC 13023	200	0,21	0	235
	1	0	24	149
Nr. 9910	200	0,20	0	375
	1	0	47	179
Nr. 9087	200	0,08	22	184
	1	0	20	133

derter Rate. Weder mit 200 noch mit 1 µg Biotin/l wurde im Verlauf der über fünf Tage durchgeführten Fermentation die beim Wildtyp zum Einstetzen der Glutamatsekretion notwendige Zelldichte erreicht. Trotzdem wurde in beiden Fällen unabhängig von der Biotinkonzentration im Medium Glutamat mit einer Rate von ca. 20 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ sezerniert.

Die Arbeiten mit den beiden Stämmen wurden nicht fortgesetzt, da entweder keine vom Wildtyp grundsätzlich verschiedene Situation gefunden wurde (Stamm Nr. 9910) oder das langsame Wachstum und die geringe erreichbare Zelldichte die Handhabung der Zellen erheblich behinderte (Stamm Nr. 9087).

III.1.5. Wachstumslimitierung als generelle Voraussetzung der Glutamatproduktion

Primäre Wirkung des Biotinmangels bei *C. glutamicum* ist die Verarmung der Cytoplasmamembran an Phospholipiden. Als Reaktion darauf kommt es zur Limitierung des Wachstums der Zellen (siehe III.1.3.). Für die Glutamatproduktion unter Biotinmangel ist es daher nicht möglich zu unterscheiden, ob die in ihren physikalischen Eigenschaften veränderte Zellmembran oder die Wachstumslimitierung für die Auslösung der Glutamatsekretion entscheidend ist. Die Reaktion von *C. glutamicum* auf eine Wachstumslimitierung, die nicht zu einer Veränderung der Zellmembran führt, wurde mit Hilfe des Leucin-auxotrophen Stamms ATCC 14310 untersucht (Abb.5). Nach einer vierstündigen Zwischeninkubation der Zellen in Leucin-freiem Medium zeigten die Zellen in der Kurzzeitfermentation in Abwesenheit von Leucin nahezu kein Wachstum, während durchgehend mit Leucin versorgte Zellen mit einer Rate von 0,39 h^{-1} wuchsen (Abb.5A). Diese wachsenden Zellen schieden im Verlauf der ersten zwei Stunden des Experiments, bei der normalen Inkubationstemperatur von 30°C, kein Glutamat ins Medium aus (Abb.5B). Die Leucin-gehungerten Zellen zeigten jedoch Glutamatsekretion mit einer Rate von 3 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$. Die intrazelluläre Glutamatkonzentration lag bei beiden Kulturen mit ca. 200 mM in gleicher Höhe.

Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30 auf 39°C führte zu einer Steigerung der Aktivität der Glutamatsekretion der Leucin-gehungerten Zellen auf 12 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$. Die Geschwindigkeit des Glukoseverbrauchs (nicht gezeigt) stieg gleichzeitig von 7,4 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ auf 15 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ an, so daß sich die molare Glutamatausbeute von 41% bei 30°C auf 80% bei 39°C erhöhte. Gleichzeitig mit Erhöhung der Sekretionsrate sank die intrazelluläre Glutamatkonzentration dieser Zellen von 200 mM auf eine neue Gleichgewichtskonzentration von ca. 120 mM ab. Die Leucin-supplementierten Zellen setzten bei 39°C ihr Wachstum noch für ungefähr eine Stunde mit leicht erniedrigter Rate fort (0,36 h^{-1}), bevor es dann langsam zum Erliegen kam. Als Reaktion auf die Temperaturerhöhung konnte nun auch bei diesen Zellen Glutamatsekretion, jedoch mit vierfach niedrigerer Rate (3 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$) als bei den Leucin-gehungerten Zellen beobachtet werden. Die Geschwindigkeit des Glukoseumsatzes (Daten nicht gezeigt) stieg durch die Temperaturerhöhung von 28 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ für einen Zeitraum von 45 min auf 54 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ an, ging dann jedoch auf eine Rate von nur 10 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ zurück. Im Gegensatz zu den Leucin-gehungerten Zellen kam es durch die Temperaturerhöhung bei den Leucin-supplementierten Zellen zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Glutamatkonzentration bis auf 350 mM. Es stellte sich eine neue Gleichgewichtskonzentration von 270 mM ein.

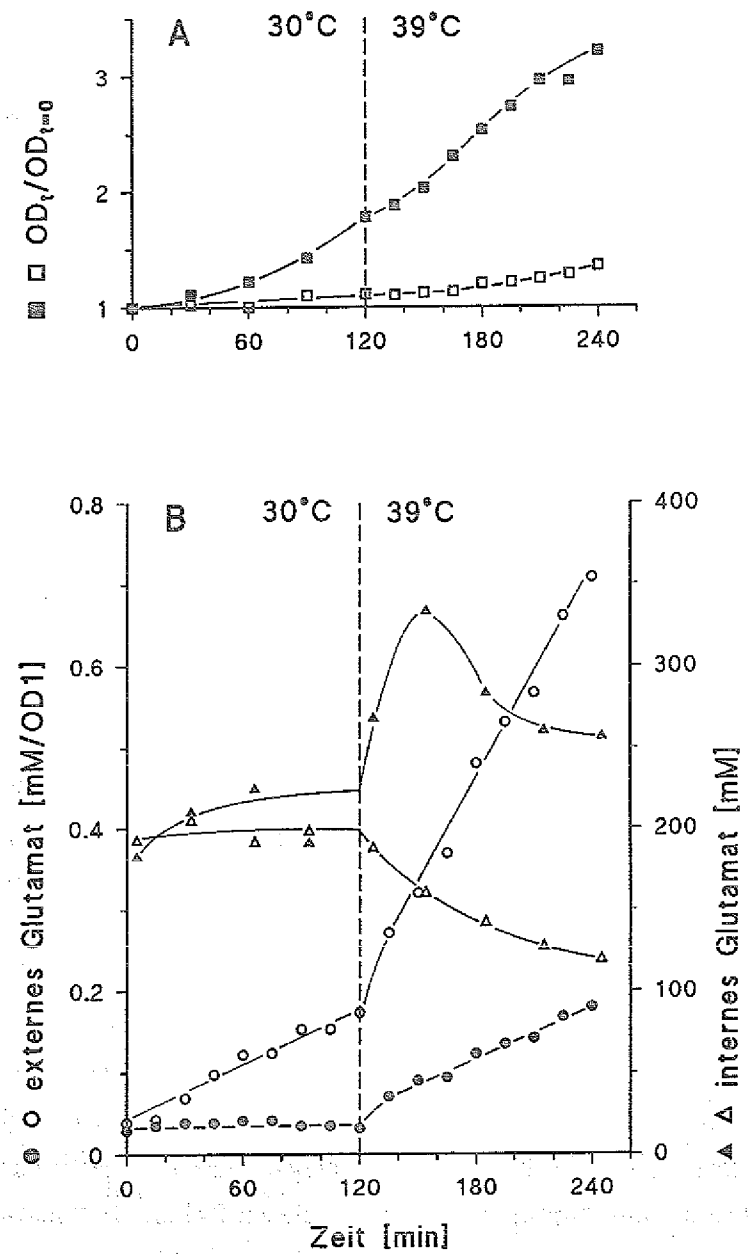


Abb.5

Verhalten des Leucin-auxotrophen Stamms *C. glutamicum* ATCC 14310 in Anwesenheit (ausgefüllte Symbole) und Abwesenheit (offene Symbole) von Leucin

In Teil A ist der relative Zuwachs der OD_{600} ($OD_t/OD_{t=0}$; Quadrate), in Teil B die externe Glutamatkonzentration (bezogen auf OD_{600}=1; Kreise) und die intrazelluläre Glutamatkonzentration (Dreiecke) dargestellt. Zur genauen Durchführung des Experiments siehe Text.

III.2. Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion

Vorangegangene Arbeiten von Hoischen und Krämer (1989) hatten gezeigt, daß die Glutamatsekretion Biotin-limitierter Zellen von *C. glutamicum* nicht über einfache Diffusion durch eine unspezifisch permeable Membran erfolgen kann. Die Energieabhängigkeit und die Spezifität des Effluxes deuteten auf einen Carrier-vermittelten Prozeß hin. Durch die im Folgenden beschriebenen Experimente sollte diese Annahme erhärtet und ein Einblick in Mechanismus und Energiekopplung des Glutamattransportes gewonnen werden.

III.2.1. Der Einfluß des Glutamatkonzentrationsgradienten auf die Sekretionsrate

Mit einer intrazellulären Glutamatkonzentration Biotin-limitierter Zellen von ungefähr 150 mM steht zu Beginn der Produktionsphase, bei niedrigen externen Glutamatkonzentrationen, ein beachtlicher Konzentrationsgradient zur Verfügung, der als Triebkraft der Glutamatsekretion genutzt werden könnte. Zur experimentellen Überprüfung eines derartigen, sekundären Transportmechanismus wurde der Effekt der Variation des Konzentrationsgradienten auf die Transportrate untersucht. Da keine Möglichkeit zur gezielten Veränderung der intrazellulären Glutamatkonzentration von *C. glutamicum* besteht, konnte dies nur durch Variation der externen Glutamatkonzentration erreicht werden. Abbildung 6 zeigt den zeitlichen Verlauf von extra- und intrazellulärer Glutamatkonzentration von Kulturen, denen zu Beginn des Versuches 0 mM, 80 mM bzw. 160 mM Glutamat vorgelegt worden war. Um die Sekretion einer signifikanten Menge von Glutamat ins Medium zu erlauben, wurde das Experiment bei einer verhältnismäßig hohen Zelldichte (3,2 mg TG/ml) und über einen Zeitraum von 8 Stunden durchgeführt. Bei Vorlage von 160 mM Glutamat konnte die Höhe des intrazellulären Glutamatgehaltes nicht mehr ermittelt werden, da der Fehler der Bestimmungen (Verunreinigung der Sedimente der Silikonölzentrifugation durch mitgeschlepptes externes Medium) zu groß war. Trotz der methodischen Probleme der Versuchsanordnung lieferte das Experiment in Abbildung 6 ein eindeutiges Ergebnis: Die Glutamatsekretion erfolgte mit identischer Rate (ungefähr 40 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$) unabhängig von der Höhe der externen Glutamatkonzentration. Die Sekretionsrate verminderte sich auch dann nicht, wenn die extrazelluläre Glutamatkonzentration über der intrazellulären lag, eine Situation die im zweiten, zu Beginn mit 80 mM externem Glutamat bestückten Fermentationsansatz nach ungefähr fünf Stunden eintrat. Es ist mit diesem Experiment also gezeigt, daß die Glutamatsekretion auch entgegen eines Konzentrationsgradienten erfolgen und zur externen Akkumulation von Glutamat führen kann.

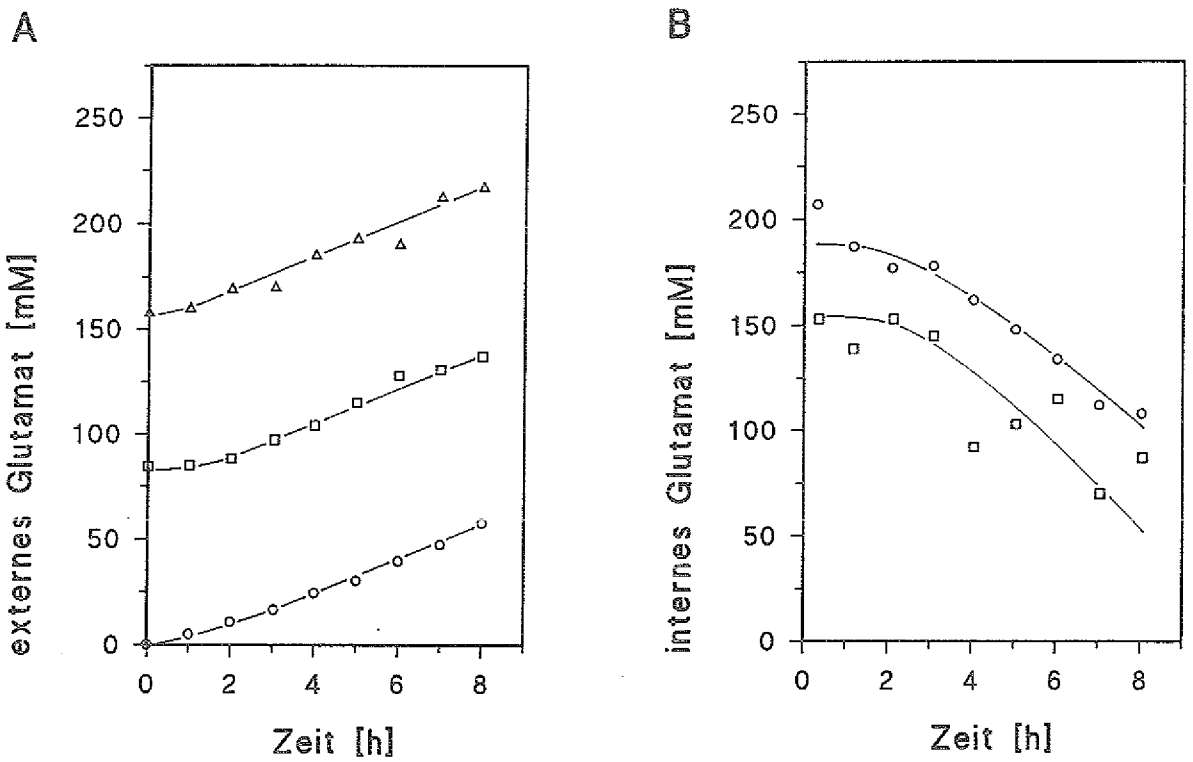


Abb.6

Glutamatsekretion (A) und intrazelluläre Glutamatkonzentration (B) von *C. glutamicum* Zellen, die bei unterschiedlichen externen Glutamatkonzentrationen inkubiert wurden

Glutamat-sekretierende Zellen wurden in 3 unabhängigen Ansätzen in frisches Medium mit 0 mM (o), 80 mM (□) und 160 mM (△) vorgelegtem Kaliumglutamat überführt. Zur Angleichung der Ionenstärke wurde Kaliumchlorid zugegeben, so daß zu Beginn des Experiments die Summe der Konzentrationen von Kaliumglutamat und Kaliumchlorid in jedem der Ansätze 160 mM betrug.
Zelldichte: 3,2 mg TG/ml.

III.2.2. Die Rolle monovalenter Kationen für die Glutamatsekretion

Für den Export von Glutamat wäre auch ein Symportmechanismus mit monovalenten Kationen denkbar. Der Konzentrationsgradient der Kationen über der Cytoplasmamembran könnte dann eine Energiequelle des Exports darstellen. Ob Glutamat selbst als Anion oder aber, durch Symport mit einem Kation, als neutrales Molekül transportiert wird ist von entscheidender Bedeutung auch für spätere Experimente, die sich mit der Beeinflussung des Sekretionsprozeßes durch das elektrische Potential über der Membran befassen (s.

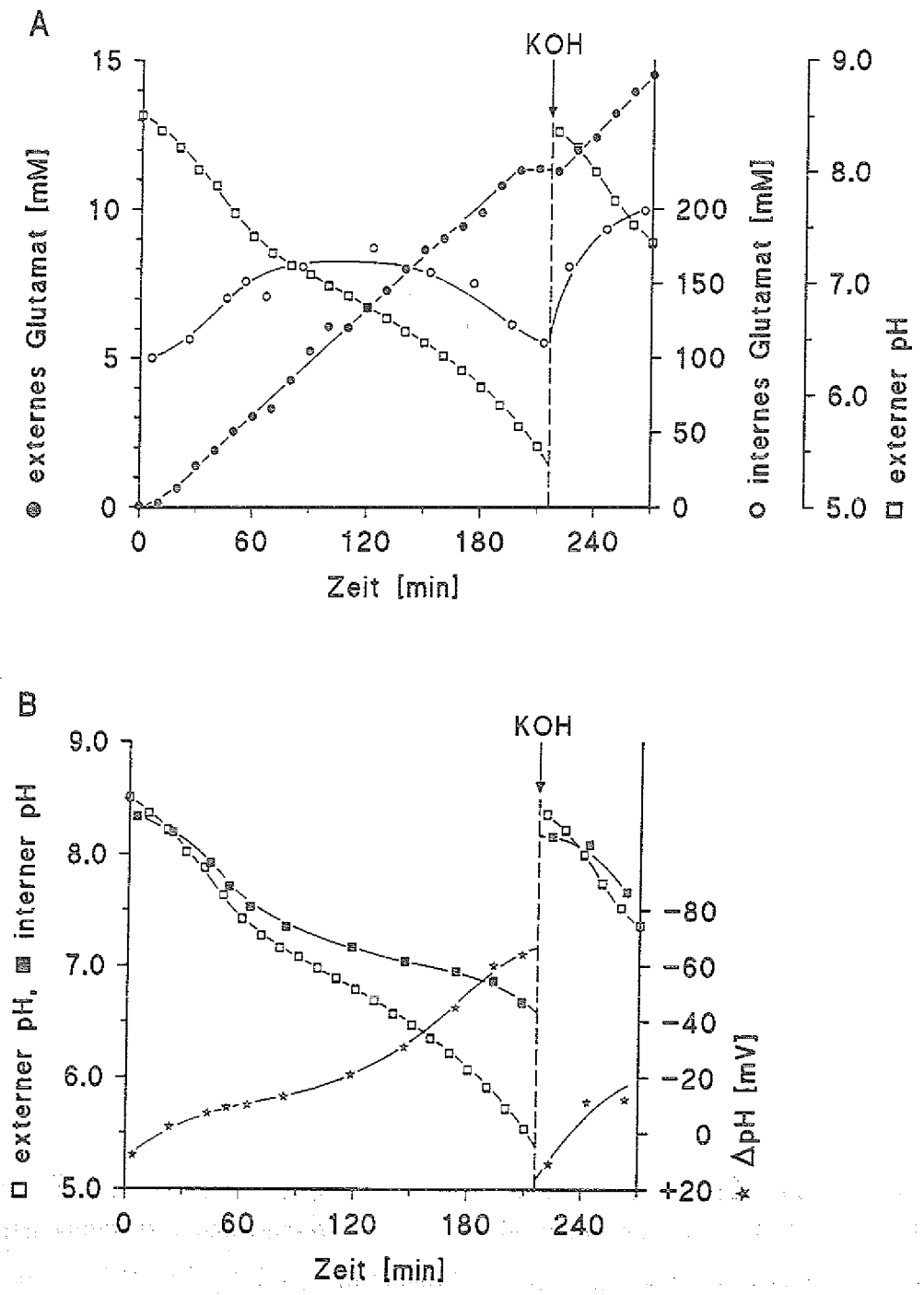


Abb.7

Glutamatsekretion (●), intrazelluläre Glutamatkonzentration (○) und externer pH-Wert (□) in einer Kurzzeitfermentation mit *C. glutamicum* in Medium ohne Harnstoff (A). In (B) ist der externe pH-Wert (□), der interne pH-Wert (■) und der daraus resultierende pH-Gradient (*) für die gleiche Zellsuspension gezeigt.

Als N-Quelle diente Ammoniumsulfat (10 g/l). Der kontinuierliche Abfall des externen pH-Wertes beruhte auf der metabolischen Aktivität der Zellen. Zelldichte: 2 mg TG/ml

Abschnitt III.2.3.). Als mögliche Symport-Ionen wurden Protonen und Kaliumionen in Bezug auf ihre Rolle für die Glutamatsekretion untersucht.

Der direkte Nachweis eines Glutamat-Protonen-Symports durch Messung einer Ansäuerung des externen Mediums bei laufender Glutamatsekretion ist unter Produktionsbedingungen nicht möglich. Die Pufferung sowie die auf andere metabolische Aktivitäten zurückgehende pH-Veränderungen des Kulturmediums lassen eine derartige Messung nicht zu. Es wurde daher eine indirekte Methode gewählt, die den Einfluß einer Veränderung des Protonengradienten über der Cytoplasmamembran auf die Sekretionsaktivität überprüft. In Abbildung 7A ist die Glutamatsekretion und die intrazelluläre Glutamatkonzentration Biotin-limitierter Zellen von *C. glutamicum* gezeigt, die im Verlauf einer 3,5 stündigen Fermentation einem kontinuierlichen Abfall des externen pH-Wertes von 8,5 auf 5,4 ausgesetzt waren. Dem Medium wurde kein Harnstoff zugesetzt, als N-Quelle diente ausschließlich Ammoniumsulfat. Spaltung des Harnstoffes durch die Urease von *C. glutamicum* sorgt bei Kurzzeitfermentation im üblichen Mineralsalzmedium für eine rasche Alkalisierung auf pH 8,0 bis 8,5, die über einen Zeitraum von 2-3 Stunden aufrechterhalten wird. In Abwesenheit von Harnstoff kam es durch die metabolische Aktivität der Zellen zur Ansäuerung des Mediums. Bis zu einem pH-Wert von 5,7 hatte diese Ansäuerung jedoch keinen Effekt auf die Aktivität der Glutamatsekretion. Erst unter pH 5,7 kam es zu einem plötzlichen Stopp des Exports. Wurde der externe pH-Wert durch Zugabe konzentrierter KOH wieder auf 8,3 angehoben, so wurde auch die Sekretion wieder mit der ursprünglichen Rate fortgesetzt. Der intrazelluläre pH-Wert der Zellen sank im Verlauf des Experimentes von 8,3 auf 6,5 ab (Abb.7B). Aus internem und externem pH-Wert läßt sich der pH-Gradient über der Membran der Zellen in mV berechnen. Er veränderte sich im Lauf des ersten Teils des Experiments von +8 mV auf -65 mV. Das Ausbleiben einer Reaktion der Glutamatsekretion auf die Variation des pH-Gradienten zwischen +8 mV und -53 mV schließt den Antrieb der Sekretion durch den chemischen Protonengradienten aus.

Neben dem pH-Gradienten wurde auch das elektrische Potential über der Cytoplasmamembran der Zellen im dargestellten Experiment bestimmt. Es ist an Hand der Daten möglich, die protonenmotorische Kraft der Zellen unter Bedingungen der Glutamatproduktion als Funktion des externen pH-Wertes zu beschreiben (Abb.8). Im pH-Bereich von 5,5 bis 7,6 lag der Wert der protonenmotorischen Kraft zwischen 140 und 160 mV. Während sich die protonenmotorische Kraft im sauren pH-Bereich aus Beiträgen von sowohl pH-Gradient als auch elektrischem Potential zusammensetzte, war im neutralen und alkalischen pH-Bereich nahezu kein pH-Gradient meßbar. Entsprechend wurde die protonenmotorische Kraft hier von der Höhe des Membranpotentials bestimmt und stieg mit diesem auf bis zu 180 mV an.

Die Variation des Kaliumgradienten durch Veränderung der externen Kaliumkonzentration (KCl-Zugabe) wirkte sich im Vergleich zur Variation des Protonengradienten

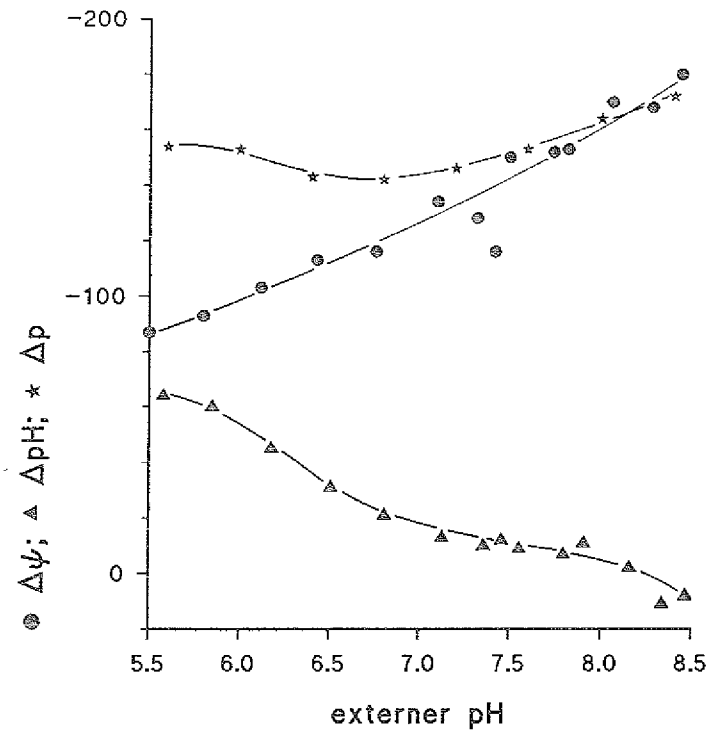


Abb.8

Die protonenmotorische Kraft und ihre Komponenten unter Glutamatproduktionsbedingungen

Dargestellt sind Δp (*), ΔpH (▲) und ΔΨ (●) in mV als Funktion des externen pH-Wertes. Die Daten entstammen dem Experiment in Abbildung 7.

deutlich auf die Aktivität der Glutamatsekretion aus (Abb.9). Die höchsten Sekretionsraten wurden bei etwa 30 mM externem Kalium beobachtet. Das entspricht der Kaliumkonzentration des Mineralsalzmediums. Während die Sekretionsaktivität bei Reduktion der Kaliumkonzentration auf 0,4 mM nur um etwa 30% abfiel, führte eine Erhöhung der Konzentration auf 300 bzw. 600 mM zu einer 44 bzw. 72%igen Hemmung der Sekretion. Es war im Weiteren nun zu prüfen, ob die Hemmung der Sekretion auf dem Abbau des Kaliumgradienten, als einer ihrer Triebkräfte, beruhte.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde zunächst der intrazelluläre Kaliumgehalt wachsender und Glutamat-sezernierender Zellen verglichen. Wie in Abbildung 10 gezeigt, fanden sich keine markanten Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. Im Verlauf der vierstündigen Fermentation sank der Kaliumgehalt beider Zelltypen von anfangs 360-390 mM kontinuierlich ab. Bei den Glutamat-sekretierenden Zellen wurde nach 2 Stunden mit ungefähr 160 mM eine gegenüber den wachsenden Zellen um 50 mM niedrigere Steady-

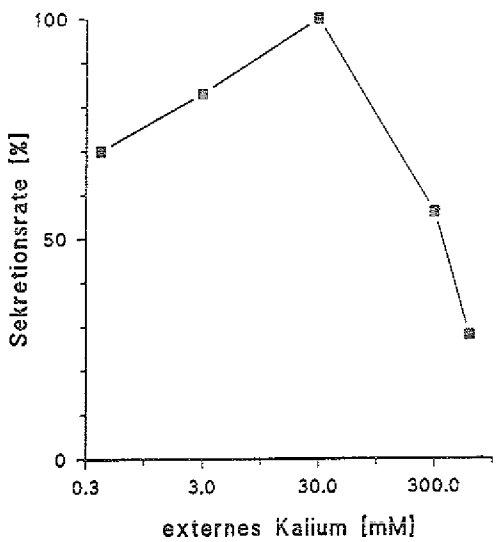


Abb.9

Glutamatsekretionsaktivität in Abhängigkeit der externen Kaliumkonzentration

Gezeigt ist die Sekretionsaktivität (in % des Maximalwertes = 16,9 nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}) als Funktion der externen Kaliumkonzentration. Die Experimente wurden in NaP$_i$ gepuffertem Mineralsalzmedium unter Zusatz von 0,4 bis 600 mM KCl durchgeführt.

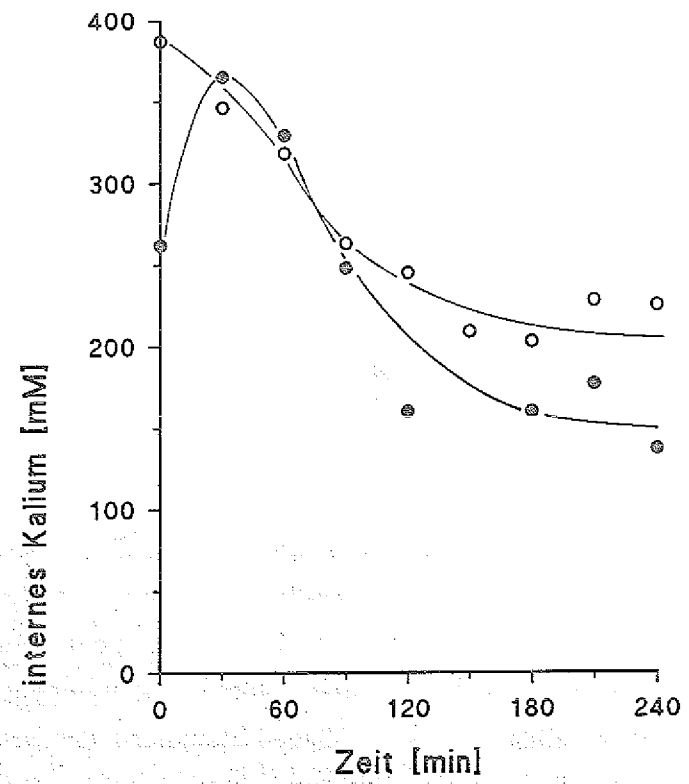


Abb.10

Der intrazelluläre Kaliumgehalt wachsender (○) und Glutamat-sekretierender Zellen (●)

Mit 200 bzw. 1 µg Biotin·l^{-1} angezogene Zellen wurden nach einmaligem Waschen in Mineralsalzmedium (NaP$_i$-gepuffert, + 10 mM KCl) im gleichen Medium resuspendiert. In der Biotin-limitierten Kultur sekretierten die Zellen Glutamat mit einer Rate von 22 nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}, während die Zellen in Anwesenheit von 200 µg Biotin·l^{-1} mit einer Rate von 0,3 h^{-1} wuchsen und kein Glutamat sekretierten.

state-Konzentration erreicht. Bemerkenswert war, daß die Biotin-limitierten Zellen durch den dem Experiment vorausgegangenen Waschschritt einen größeren Anteil ihres internen Kaliumgehaltes verloren hatten als die wachsenden Zellen.

Eine Reaktion der internen Steady-state-Konzentration des Kaliums auf einen mit dem Glutamatexport gekoppelten Kaliumexport ist nicht notwendigerweise zu fordern. Die Aktivität eines effizienten Kaliumaufnahmesystems könnte den Kaliumexport kompensieren und die interne Kaliumkonzentration so konstant halten. Es wurde daher versucht, gezielt nur die auswärts gerichtete Komponente der Kaliumbewegungen während der Glutamatsekretion zu messen. Als Sonde für Kaliumbewegungen wurde ein radioaktives Isotop des

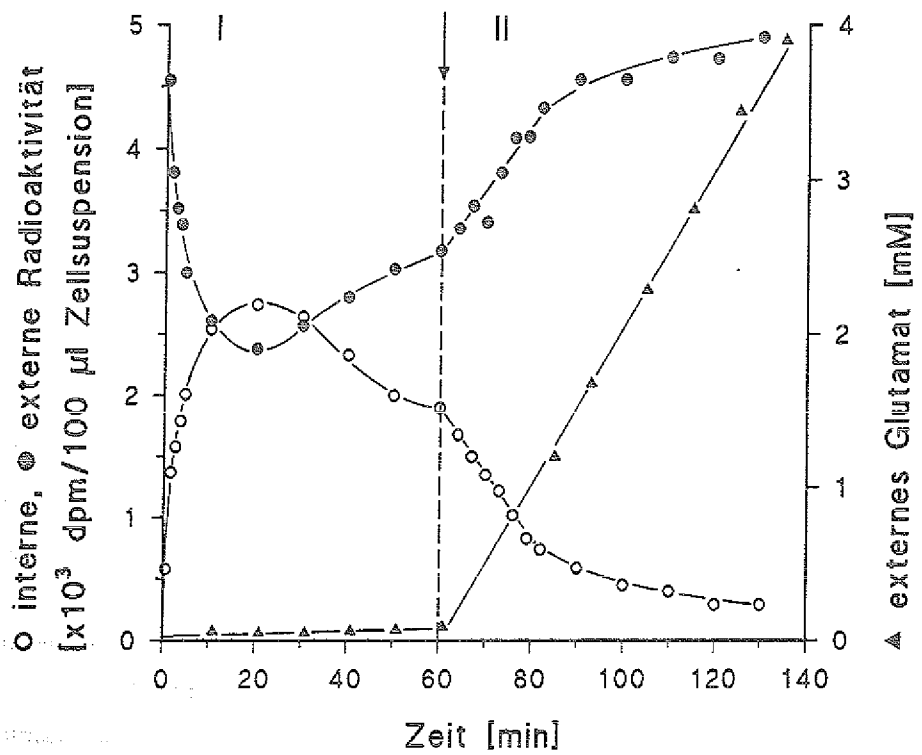


Abb.11

Kaliumefflux Glutamat-sekretierender Zellen von *C. glutamicum*

Gezeigt sind intra- (O) und extrazelluläre (●) Rubidium-Radioaktivität sowie die extrazelluläre Glutamatkonzentration (▲, in getrenntem aber identisch behandeltem Ansatz gemessen) als Funktion der Zeit. Zelldichte: 1,6 mg TG/ml.
Phase I: Aufladung der Zellen mit Rubidium, 0,5 mM KCl, 0,5 mM Glukose
Phase II: Rubidiumefflux, Pfeil: Zugabe von 30 mM KCl, 100 mM Glucose

Tab.5

Glutamatsekretion und Kaliumefflux Biotin-limitierter und wachsender Zellen von *C. glutamicum*

Die Messungen wurden jeweils an unabhängig angezogenen Kulturen durchgeführt. Die reduzierte Glutamatsekretionsrate von 5 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ wurde durch Zugabe eines Überschußes an Biotin erhalten. Beladung der Zellen mit ^{86}Rb und Ermittlung des ^{86}Rb-Effluxes aus den Zellen wurde wie im Text und Abbildung 11 beschrieben durchgeführt.

Biotinkonzentration während der Anzucht der Zellen	Glutamatsekretion	Kaliumefflux
$[\mu g \cdot l^{-1}]$	$[nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}]$	
1	34	5,1
	23	2,9
	5	3,4
200	≤ 0,1	0,5

Rubidiumions ($^{86}Rb^{+}$) eingesetzt, das in der Regel von Kaliumtransportsystemen und -ionophoren als Substrat akzeptiert wird (Bakker, 1983). In Abbildung 11 ist der Ablauf eines Experiments zu Bestimmung der Rate des Kaliumeffluxes Glutamat-sekretierender Zellen mit Hilfe von Rubidium dargestellt. Im ersten Abschnitt des Experiments erfolgte die Aufladung der Zellen mit Rubidium bei niedriger externer Kaliumkonzentration (0,5 mM). Der schnelle Anstieg der intrazellulären $^{86}Rb^{+}$-Radioaktivität deutet darauf hin, daß auch bei *C. glutamicum* ein Rubidium akzeptierendes Kaliumaufnahmesystem existiert. Aus der Aufnahmekinetik des Rubidiums kann bei bekannter spezifischer Aktivität des Rubidiums/Kaliums die Kaliumaufnahmeaktivität berechnet werden. Für Biotin-limitierte Zellen wurde so bei 0,5 mM KCl eine Kalium/Rubidiumaufnahme von 40-50 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$, für wachsende Zellen dagegen nur von 5 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ ermittelt. Diese Unterschiede in der Kaliumaufnahme sind in Zusammenhang zu sehen mit der Beobachtung, daß der interne Kaliumgehalt Biotin-limitierter Zellen durch Waschschritte stärker reduziert werden konnte als derjenige wachsender Zellen (vergl. Abb.10).

Die erhöhte Kaliumaufnahme der Biotin-limitierten Zellen könnte dem Ausgleich eines erhöhten Kaliumverlusts dienen. In Abbildung 11 zeigt der langsame Abfall der zellassoziierten Rubidium-Radioaktivität der Biotin-limitierten Zellen nach Durchmarkierung des internen Kaliums den Abfall der internen Kaliumkonzentration an (vergl. Abb.10). Wurde in der ersten Phase des Experiments die Glutamatsekretion durch Vorlage von nur 0,5 mM Glukose unterdrückt, so wurde sie in der zweiten Phase durch Zugabe von 100 mM Glukose in vollem Umfang ermöglicht. Die gleichzeitige Gabe von 30 mM KCl setzte die spezifische Radioaktivität im externen Medium so stark herab, daß nun der Kalium/Rubidiumefflux unabhängig von der Kalium/Rubidiumaufnahme beobachtet werden konnte. Kenntnis der internen Kaliumkonzentration zum Zeitpunkt des Kaliumzusatzes erlaubte die Berechnung der Kaliumeffluxrate. Die Durchführung des beschriebenen Experiments in analoger Weise für wachsende und Glutamat-sekretierende Zellen von *C. glutamicum* lieferte die in Tabelle 5 zusammengefaßten Daten. Bei wachsenden Zellen erfolgte der Kaliumefflux mit ungefähr 10fach geringerer Rate als bei Biotin-limitierten Zellen. Jedoch lag auch unter Glutamatproduktionsbedingungen der Kaliumefflux um einen Faktor von mindestens fünf unter der Glutamatsekretionsrate. Unterschiede in der Effizienz der Glutamatsekretion fanden keine Entsprechung in Veränderungen der Kaliumeffluxrate.

Die dargestellten Experimente geben keine Hinweise auf eine Beteiligung von Protonen oder Kaliumionen an der Glutamatsekretion. Es muß daher angenommen werden, daß *C. glutamicum* Glutamat in Form des Anions ins Medium transportiert. Der beschriebene hemmende Effekt erhöhter Kaliumkonzentrationen im Medium auf die Rate der Glutamatsekretion muß als unspezifischer Effekt der hohen Salzkonzentration gewertet werden.

III.2.3. Das Membranpotential als mögliche treibende Kraft der Glutamatsekretion

Das auch unter den Bedingungen der Glutamatproduktion hohe Membranpotential von *Corynebacterium glutamicum* (innen negativ) (Hoischen und Krämer, 1989) stellt für den Export des Glutamatanions eine mögliche Energiequelle dar. Es wurde daher untersucht, ob der Abbau des Membranpotentials einen Einfluß auf die Aktivität der Glutamatsekretion hat (Abb.12). Die Zugabe von CCCP, eines Protonophors, zu Glutamatsekretierenden Zellen (C-Quelle: Glukose) führte wie erwartet zu einer drastischen Reduktion des Membranpotentials. Die Rate der Glutamatsekretion wurde dadurch jedoch nicht beeinflußt. Die intrazelluläre Glutamatkonzentration der Zellen stieg nach dem Zusatz von CCCP leicht an, die Konzentrationen von ATP und ADP blieben nahezu unverändert.

Wurde an Stelle von CCCP der Kaliumionophor Valinomycin in Anwesenheit von

300 mM KCl eingesetzt (Abb.13), so konnte auch hier beobachtet werden, daß die Glutamatsekretion bei drastisch reduziertem Membranpotential fortgesetzt wurde. Die Sekretion, die auf Grund der hohen Kaliumkonzentration verlangsamt war (ungefähr 10 nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}), schnellte nach Zugabe von Valinomycin für einen Zeitraum von 15 Minuten auf ca 30 nMol·min^{-1}·mg TG^{-1} hoch, um dann wieder auf die Anfangsrate abzusinken. Die Beschleunigung der Sekretionsrate war begleitet von einem kontinuierlichen Abfall der intrazellulären Glutamatkonzentration von ungefähr 190 mM auf unter 50 mM im Verlauf von 60 min. Diese unerwartete Reaktion der Zellen deutet darauf hin, daß der Kaliumionophor neben der Zerstörung des Membranpotentials noch weitere Effekte

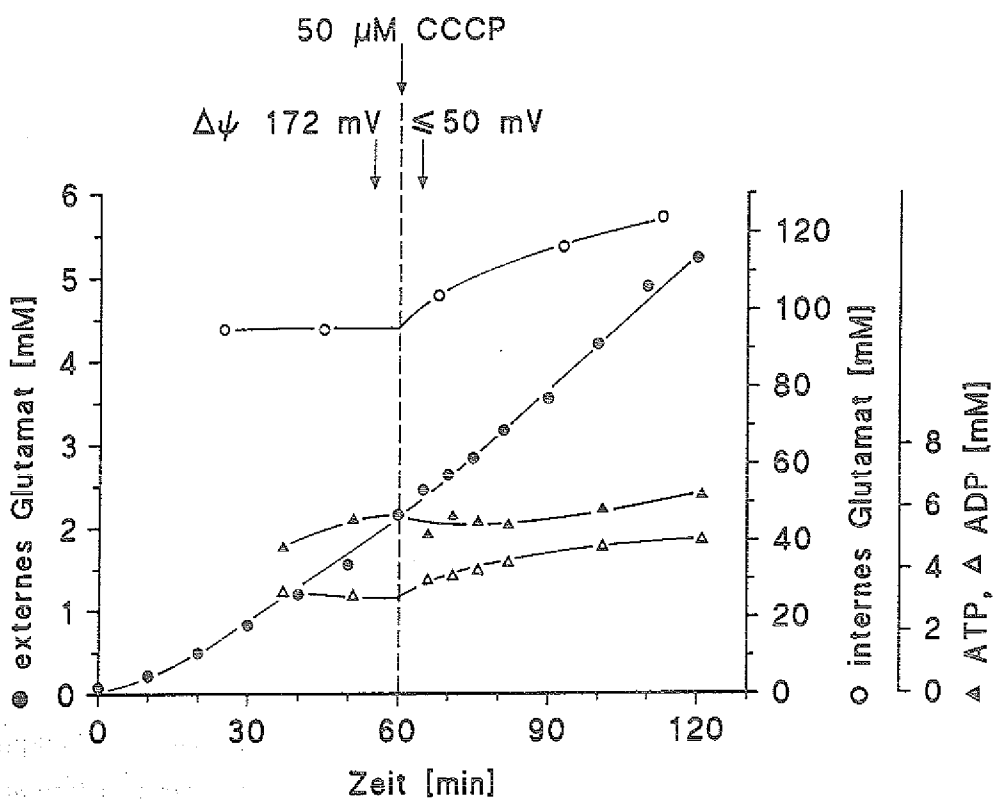


Abb.12

Einfluß des Protonophors CCCP auf die Glutamatsekretion von *C. glutamicum* (C-Quelle Glukose)

Die CCCP-Zugabe erfolgte 60 min nach Beginn des Experiments. Die Sekretion von Glutamat ins externe Medium (●), die intrazellulären Glutamat- (○), ATP- (▲) und ADP-Konzentrationen (△) sowie das Membranpotential wurden als Funktion der Zeit bestimmt. Zelldichte: 1,5 mg TG/ml.

auf den Zellmetabolismus hat. Eine Permeabilisierung der Cytoplasmamembran durch Valinomycin auch für Ammoniumionen könnte hier beteiligt sein. So wurde beobachtet, daß der Einsatz von Valinomycin bei Zellen, die in Ammonium-reichem Medium suspendiert wurden, auch bei niedrigen externen Kaliumkonzentrationen zu einer starken Reduktion des Membranpotentials führte (Daten nicht gezeigt), während Valinomycin bei Zellen, die in Ammonium-freiem Puffer suspendiert wurden, die Einstellung von Kaliumdiffusionspotentialen als Funktion der externen Kaliumkonzentration erlaubte (vergl. Abb.1).

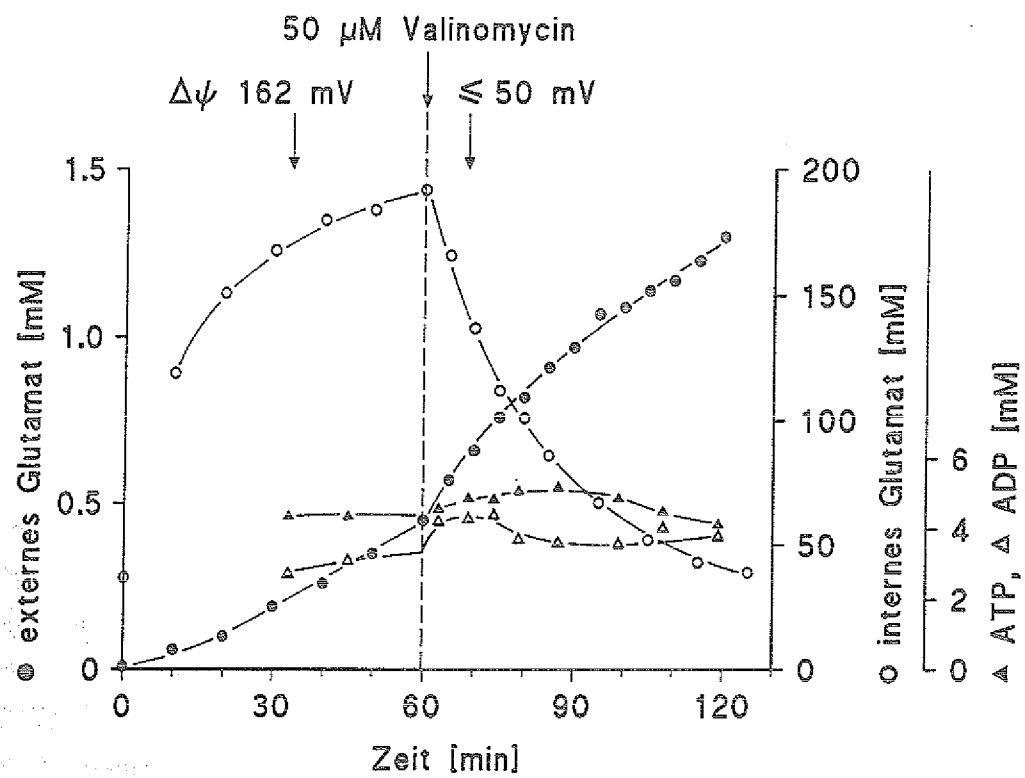


Abb.13

Einfluß des K^+-Ionophors Valinomycin auf die Glutamatsekretion von *C. glutamicum*

Das Experiment wurde bei einer externen KCl-Konzentration von 300 mM durchgeführt. Ablauf des Experiments und bestimmte Parameter waren analog zu Experiment in Abbildung 12.
Zelldichte: 0,8 mg TG/ml.

III.2.4. Versuche zur Variation der intrazellulären ATP-Konzentration Glutamat-sekretierender Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der elektrochemische Gradient des Glutamatanions, gemäß eines sekundären Transportmechanismus nicht als Triebkraft des Glutamatexportes fungiert, muß auch ein primärer Transportmechanismus in Betracht gezogen werden. Eine Kopplung des Transportschrittes an die Hydrolyse von ATP wäre denkbar. Es wurden daher Versuche unternommen, den intrazellulären ATP-Gehalt Glutamat-sekretierender Zellen zu variieren, um eine mögliche Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Sekretionsaktivität zu überprüfen. Die ATP-Bildung erfolgt in aeroben Organismen durch Substratkettenphosphorylierung und Elektronentransportphosphorylierung. Bei letzterer dient das durch den Elektronentransport aufgebaute elektrochemische Protonenpotential einer membranständigen ATPase als Energiequelle für die Phosphorylierung von ADP zu ATP. Zur Reduktion des ATP-Gehalts von *C. glutamicum* wurden daher das Membranpotential und die F_0F_1-ATPase als Angriffspunkte gewählt.

Bei Zellen, die unter Biotin-Mangel Glukose zu Glutamat umsetzten, wurde durch den Abbau des Membranpotentials nahezu keine Änderung des intrazellulären ATP-Gehalts beobachtet (vergl. Abb.12 und 13). Dies ist bemerkenswert, da ja das elektrochemische Protonenpotential, wie oben erwähnt, den Energiespeicher darstellt, der zwischen Elektronentransport durch die Atmungskette und ATP-Synthese durch die membranständige F_0F_1-ATPase vermittelt. Durch Vergleich der Reaktion wachsender und Glutamat-sekretierender Zellen auf die Entkopplung durch CCCP wurde überprüft, ob es sich bei der beobachteten Stabilität des cytoplasmatischen ATP-Pools um eine für den Produktionszustand von *C. glutamicum* charakteristische Eigenschaft handelt. Wie in Tabelle 6 gezeigt führte die CCCP-Behandlung bei wachsenden Zellen von *Corynebacterium glutamicum* (C-Quelle: Glukose) zu einem deutlichen Abfall der cytoplasmatischen ATP-Konzentration um mehr als 40%. Nach CCCP-Gabe erfolgte kein Wachstum mehr. Gleichzeitig verdoppelte sich die Atmungsrate der Zellen, während ihr Glukoseumsatz um 15% zurückging. Bei den ohnehin nicht mehr wachsenden, Glutamat-sekretierenden Zellen wurde wie bereits beschrieben keine signifikante Reduktion des ATP-Gehalts durch die CCCP-Gabe (Abnahme um ≤10%) beobachtet. Bei unveränderter Geschwindigkeit des Glukoseumsatzes stieg die Atmungsaktivität der Zellen um nur 24% an. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß während des Umsatzes von Glukose die Elektronentransport-Phosphorylierung bei Biotin-limitierten Zellen in viel geringerem Maß am Aufbau des intrazellulären ATP-Pools beteiligt ist als bei wachsenden Zellen.

In Übereinstimmung mit dieser Interpretation führte auch die Hemmung der F_0F_1-ATPase durch den ATPase-Hemmstoff DCCD nicht zu einer Reduktion des intrazellulären ATP-Gehalts Glutamat-sekretierender Zellen (Abb.14). Die vorübergehende Hyperpolari-

Tab.6

Reaktion wachsender und Glutamat-sekretierender Zellen von *C. glutamicum* auf die Entkopplung der Elektronentransport-Phosphorylierung (C-Quelle: Glukose)

Die aufgeführten Daten entstammen Experimenten, die analog zu dem in Abbildung 12 gezeigten Experiment durchgeführt wurden. Die Verbrauchsraten von Glukose und Sauerstoff, die Glutamatsekretionsrate sowie der intrazelluläre ATP-Gehalt der Zellen wurden während einer 60-90 minütigen Inkubation vor und während eines Zeitraumes von 60 min nach Zugabe von 50 µM CCCP gemessen. Unter [Biotin] ist die zur Anzucht der Zellen eingesetzte Biotinkonzentration genannt.

[Biotin]	CCCP	Verbrauchs-raten		Bildungs-rate	[ATP]
[$\mu g \cdot l^{-1}$]		[$nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$]			[mM]
		Glukose	O_2	Glutamat	
200	-	72	120	0	6,8
	+	61	232	0	3,9
1	-	39	79	27	5,5
	+	39	98	27	5,0

sation der Membran von 180 mV auf 195 mV nach DCCD-Gabe belegte, daß DCCD tatsächlich den Protonentransport durch die F_0F_1-ATPase blockiert hatte. Etwa 10 Minuten nach DCCD-Zugabe wurde eine Hemmung der Glutamatsekretionsaktivität um mehr als 90% beobachtet, die jedoch nicht auf fehlendes ATP zurückgeführt werden kann. Es muß aus diesem Ergebnis geschlossen werden, daß DCCD neben der Hemmung der F_0F_1-ATPase noch weitere Wirkungen hat.

Mit Acetat als C-Quelle ist ATP-Synthese ausschließlich durch Elektronentransportphosphorylierung möglich. Der cytoplasmatische ATP-Gehalt Acetat-verstoffwechselnder Zellen sollte daher gegenüber einem Abbau des Membranpotentials empfindlich sein. Diese Annahme wurde durch Anwendung des Protonophors CCCP auf Acetat-umsetzende, Glutamat-sekretierende Zellen überprüft. Damit *C. glutamicum* in der Kurzzeitfermentation Acetat als C-Quelle verwerten kann ist es notwendig, die Zellen vorher auf Acetat anzuzie-

hen, da Enzyme für die Acetatverwertung induziert werden müssen. In Abbildung 15 ist die Wirkung von CCCP auf Zellen gezeigt, die mit Acetat als C-Quelle unter Biotin-Limitierung angezogen wurden, denen in der Kurzzeitfermentation dann entweder Acetat (Abb.15A) oder Glukose (Abb.15B) angeboten wurde. Bei Acetat-verstoffwechselnden Zellen führte CCCP zu einem sofortigen und dauerhaften Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration der Zellen um 50% von 4 mM auf 2 mM. Gleichzeitig kam es zum Anstieg der ADP-Konzentration um ungefähr den gleichen Betrag. Die Glutamatsekretion wurde sofort um mehr als 90% gehemmt. Da das Membranpotential in *C. glutamicum* als Energiequelle des Acetataufnahmesystems dient (Ebbighausen et al., 1991), muß der Abbau des

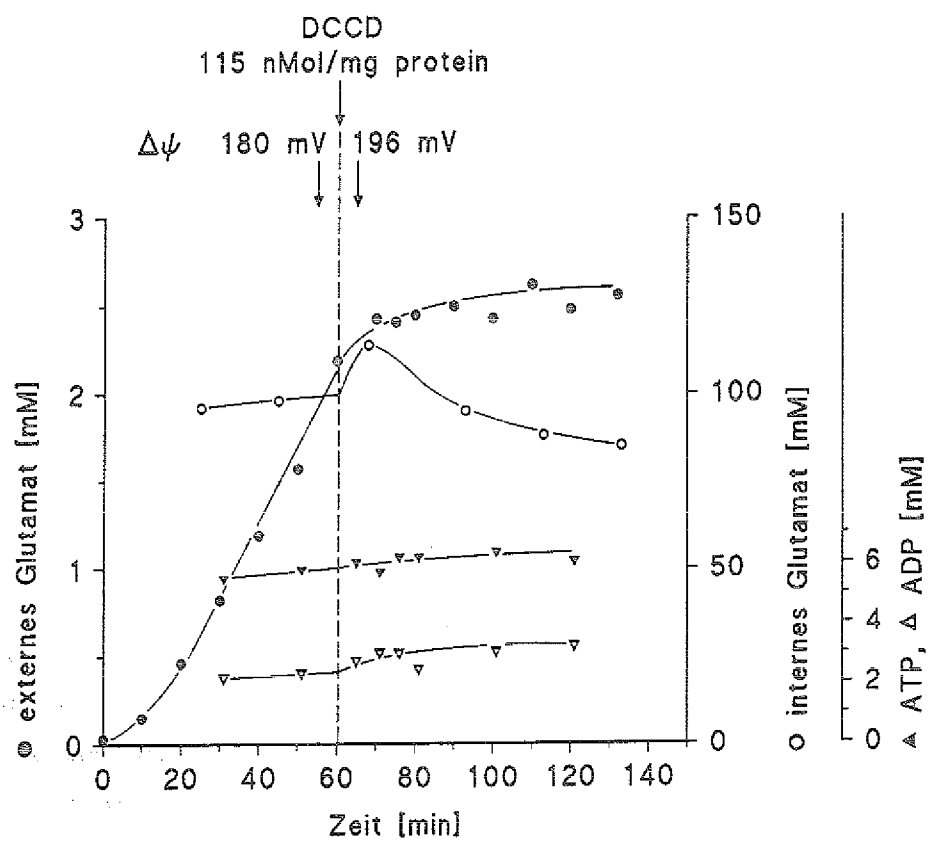
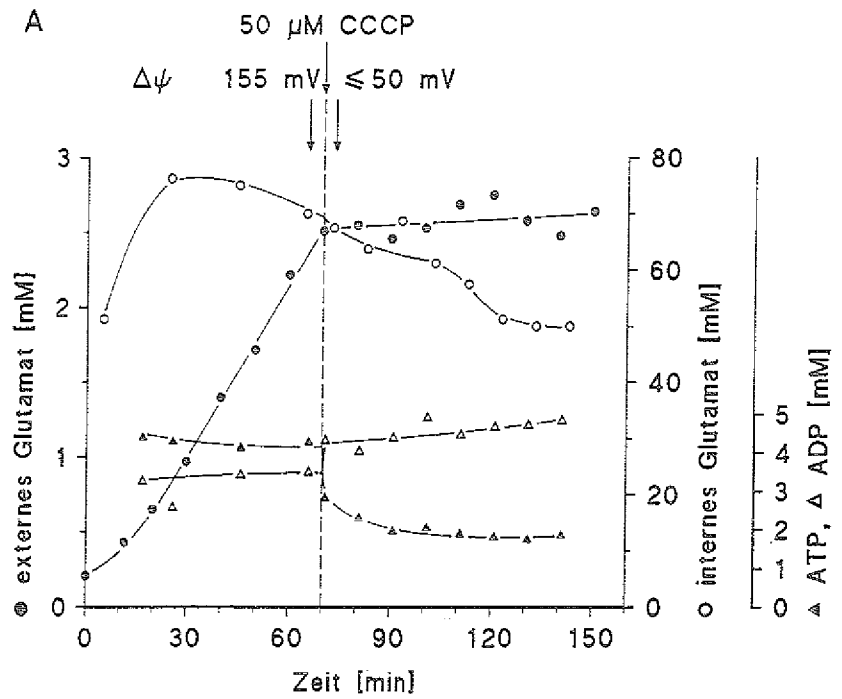


Abb.14

Einfluß von DCCD auf die Glutamatsekretionsaktivität von *C. glutamicum*

In der Kurzzeitfermentation mit Glukose als C-Quelle wurde nach Ablauf von 60 min DCCD zugesetzt und die Wirkung auf die Sekretion von Glutamat ins Medium (●) und die intrazellulären Konzentrationen von Glutamat (○), ATP (▽) und ADP (▽) sowie das Membranpotential verfolgt.
Zelldichte: 1,9 mg TG/ml



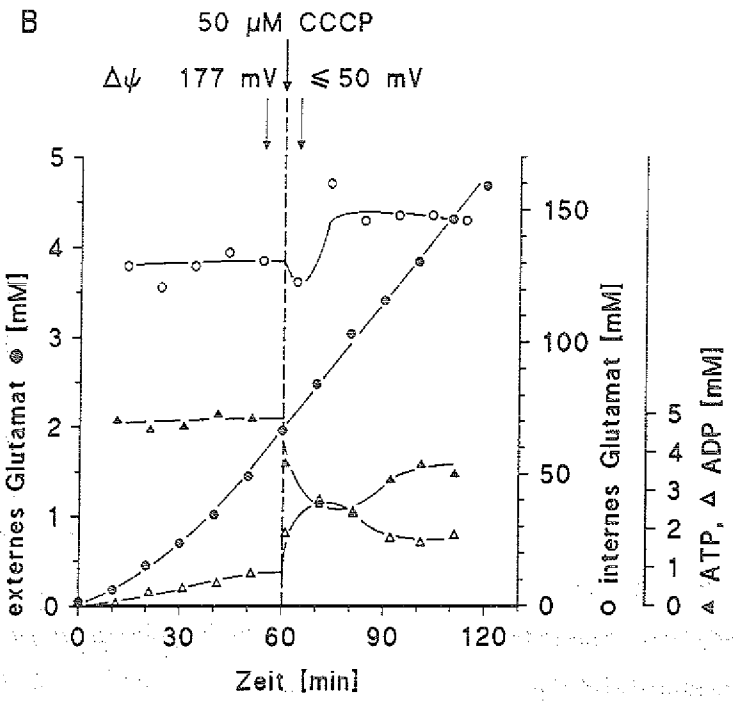


Abb.15

Wirkung des Protonophors CCCP auf die Glutamatsekretion Acetat-gezogener Zellen von *C. glutamicum* ausgehend von Acetat (A) bzw. von Glukose (B) als C-Quelle.

Ablauf des Experiments und bestimmte Parameter waren analog zum Experiment in Abbildung 12. Zelldichte: (A) 1,8 mg TG/ml, (B) 2,2 mg TG/ml.

Membranpotentials auch zu einer stark verminderten Versorgung der Zellen mit Acetat führen. Die nach CCCP-Zugabe noch hohe und nur langsam absinkende interne Glutamatkonzentration der Zellen machte jedoch deutlich, daß die Hemmung der Glutamatsekretion nicht auf einer Glutamatverarmung der Zellen beruhen konnte. Wurde den auf Acetat angezogenen Zellen in der Kurzzeitfermentation Glukose als C-Quelle angeboten (Abb.15B), so konnte nach CCCP-Gabe auch hier eine vorübergehende Absenkung des ATP-Gehalts bzw. des ATP/ADP-Quotienten in gleichem Ausmaß wie bei den Acetat-verstoffwechselnden Zellen (vergl. Abb.15A) beobachtet werden. Die Zellen setzten jedoch die Glutamatsekretion auch nach Abbau des Membranpotentials mit unveränderter Rate fort. In Bezug auf die Reaktion der Glutamatsekretion verhielten sich diese Zellen also wie solche, die ausschließlich Glukose als C-Quelle erhalten hatten (vergl. Abb.12), die Reaktion ihres ATP-Gehaltes zeigte Ähnlichkeit zu derjenigen von Zellen, die ausschließlich Acetat verstoffwechselten (vergl. Abb.15A).

Die gezeigten Experimente lassen keine Abhängigkeit der Sekretionsaktivität von der cytoplasmatischen ATP-Konzentration der Zellen erkennen. Die in zwei Fällen beobachtete Hemmung der Sekretion kann an Hand der vorliegenden Daten nicht erklärt werden.

III.2.5. Veränderung der Sekretionsaktivität durch Variation von Kulturbedingungen

Die optimale Versorgung von *C. glutamicum* mit C-Quelle und Sauerstoff stellt unter Produktionsbedingungen eine notwendige Voraussetzung dafür dar, daß der Organismus Glutamat mit hoher Effizienz und Ausbeute bildet (Hirose et al., 1985). Dies ist verständlich, da zum einen die C-Quelle als Energiequelle dient und das Kohlenstoffgerüst des Glutamats liefert und da es sich zum anderen beim Umsatz einer C-Quelle wie Glukose oder Acetat zu Glutamat um einen oxidativen Prozeß handelt. Die Reaktion von Biotin-limitierten *C. glutamicum* Zellen auf Glukose- bzw. Sauerstoffmangel wurde in der Kurzzeitfermentation verfolgt (Abb.16 und 17). Ziel war es, die Veränderungen der Sekretionsaktivität, der intrazellulären Glutamatkonzentration und energetischer Parameter direkt nach Verbrauch von Glukose bzw. Sauerstoff zu beschreiben. Die Zugabe einer geringen Menge von Glukose zu in Glukose-freiem Medium suspendierten Zellen führte zu sofortigem Einsetzen der Glutamatsekretion (Abb.16). Diese kam nach 30 Minuten, nach Verbrauch der Glukose (nicht gezeigt) wieder zum Stillstand. Die intrazelluläre Glutamatkonzentration der Zellen lag auch nach dem Stopp der Sekretion mit ungefähr 130 mM nur um 50 mM unter der Konzentration der sekretierenden Zellen. Ein ähnliches Verhalten zeigten die Zellen als Reaktion auf den Wechsel von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen (Abb.17). Der sofortige Stopp der Sekretion nach Entzug des Sauerstoffs war von einem

Abfall der intrazellulären Glutamatkonzentration von ungefähr 30% begleitet. In beiden Experimenten konnte während der Sekretion ein etwa doppelt so hoher ATP-Gehalt der Zellen beobachtet werden wie bei gestoppter Sekretion. Diese Reaktion kann jedoch nicht für die Veränderungen der Sekretionsaktivität verantwortlich gemacht werden, da in vorausgegangenen Experimenten (vergl. Kapitel III.2.4.) keine Korrelation zwischen der Höhe des ATP-Gehalts der Zellen und der Aktivität der Glutamatsekretion gefunden wurde.

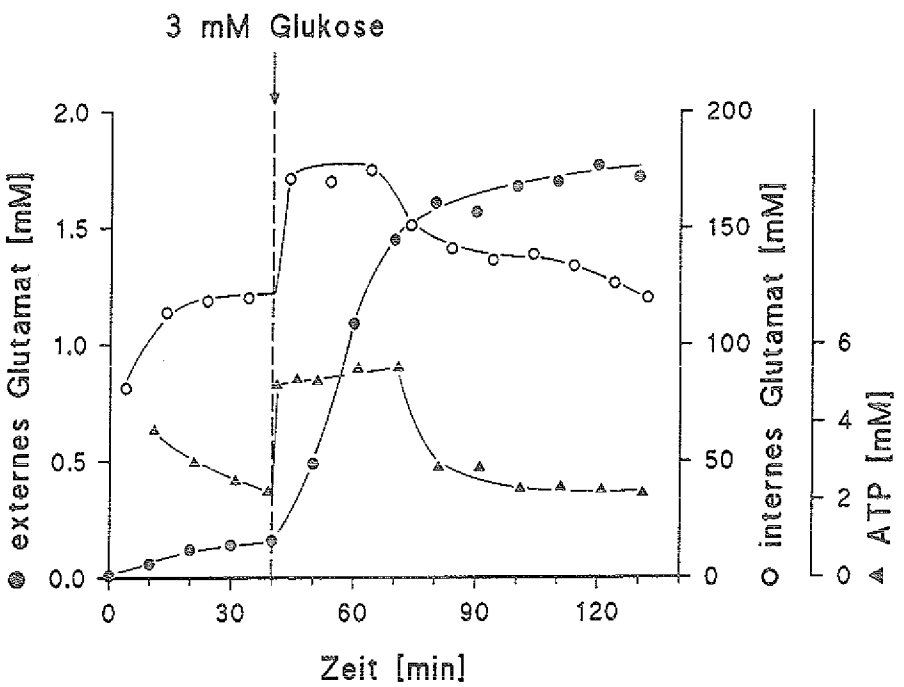


Abb.16

Glutamatsekretion (●), interne Glutamat- (○) und ATP-Konzentration (▲) von *C. glutamicum* vor und nach Zugabe einer geringen Glukosemenge

Nach zweimaligem Waschen und anschließender Resuspension der Biotin-limitierten Zellen in Glukose-freiem Medium wurde in der Kurzzeitfermentation nach 30 min 3 mM Glukose zugegeben.
Zelldichte: 1,8 mg TG/ml.

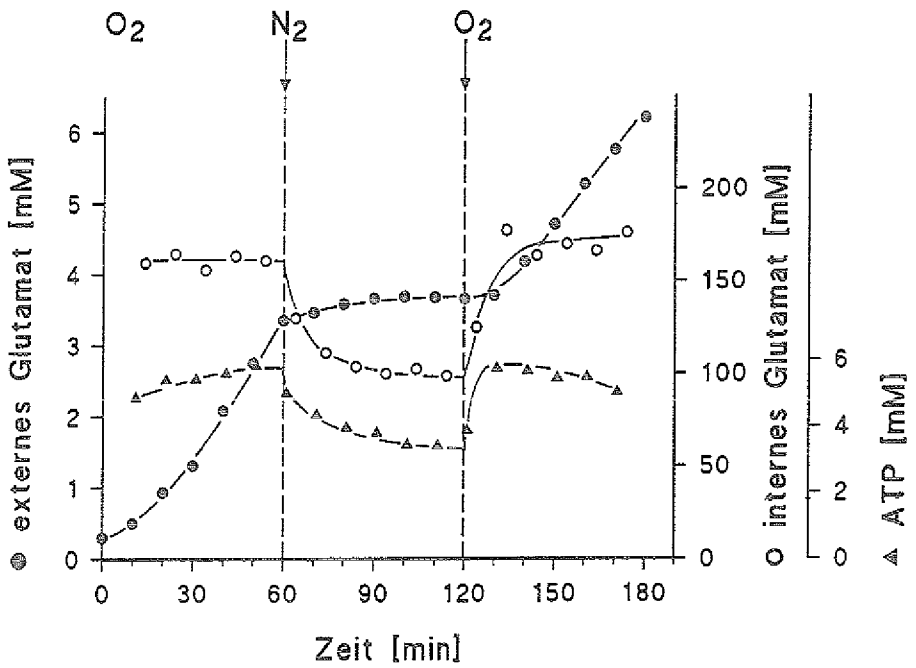


Abb.17

Einfluß des Wechsels von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen auf die Glutamatsekretion

In der Kurzzeitfermentation wurde nach Ablauf von 60 min von aeroben auf anaerobe Kulturbedingungen umgestellt, indem die Kultur mit N_2 übergast und nur noch sehr langsam durchmischt wurde. Nach weiteren 60 min wurden wieder aerobe Bedingungen eingestellt, d.h. starke Durchmischung der Kultur in Kontakt mit Luft. Die gemessenen Parameter waren analog zum Experiment in Abbildung 16.
Zelldichte: 1.9 mg TG/ml.

III.3. Regulation der Glutamatsekretion

Durch Eingriffe in die Energetik Glutamat-sekretierender Zellen konnte bisher in vier Fällen ein deutlicher Einfluß auf die Aktivität der Sekretion ausgeübt werden (siehe Kapitel III.2.4. und III.2.5.). Es war jedoch nicht möglich, die beobachteten Änderungen der Sekretionsaktivität mit variierten Werten eines zellulären, energetischen Parameters zu korrelieren. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die beobachtete Reduktion der Sekretionsaktivität nicht das Ergebnis eines Eingriffs in die Energetik des Transportprozeßes ist, sondern eine regulatorische Antwort der Zellen auf die veränderten Bedingungen darstellt.

III.3.1. Substratumsatz und Produktbildung bei gehemmter Glutamatsekretion

Zum Verständnis der Stoffwechselumstellungen, die bei Biotin-limitierten Zellen durch die Hemmung der Glutamatsekretion hervorgerufen werden, wurden Substratumsatz und Produktbildung der Zellen in dieser Situation mit denjenigen sekretierender Zellen verglichen. Die Analyse des Stoffumsatzes wurde für alle bisher beschriebenen Fälle einer Hemmung der Sekretionsaktivität durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Am einfachsten zu beschreiben ist die Situation unter Glukosemangel. Mit Verbrauch der Glukose (Experiment 1) im Medium kam die Sekretion zum Erliegen. Die Atmungsrate der Zellen sank sofort um ungefähr 80% ab. Unter anaeroben Bedingungen (Experiment 2), also bei vollständiger Unterdrückung der Atmung, setzten Biotin-limitierte Zellen Glukose noch mit 40% der unter aeroben Bedingungen ermittelten Rate um. Die Glukose wurde fast quantitativ zu Laktat verstoffwechselt. Nach Zusatz von DCCD zu Glutamat-sekretierenden Zellen (Experiment 3) kam es auch hier, bei nur leicht vermindertem Glukoseverbrauch, zur Bildung von Laktat nach Stopp der Glutamatsekretion. Gleichzeitig wurde eine Reduktion der Atmungsaktivität der Zellen um mehr als 60% beobachtet. Dies könnte auf eine direkte Hemmung der Atmungskette durch DCCD hindeuten. Für eine Einschränkung der Atmungskapazität der Zellen durch DCCD spricht auch das Auftreten der Laktatbildung. Beispiele für DCCD sensitive Komponenten von Atmungsketten sind in der Literatur beschrieben (Solioz, 1984). Da DCCD in jedem Fall auch auf die F_0F_1-ATPase wirkt, könnte die verminderte Aktivität der Protonen-pumpenden Atmungskette aber auch eine Reaktion auf die Verhinderung des Protonenrückfluß ins Cytoplasma der Zellen und den sich daraus ergebenden Protonenrückstau sein. Die vorübergehende Hyperpolarisation der Membran nach DCCD-Zugabe (vergl. Kapitel III.2.4.) belegt die Existenz eines solchen Protonenrückstaus. Da dessen Auflösung durch Zugabe des Protonophors CCCP jedoch nicht zu einer Reaktivierung der Atmungsaktivität führte (Daten nicht gezeigt), muß von einer direkten Wirkung des DCCDs auf die Atmungskette ausgegangen werden. Die Hemmung der Glutamatsekretion Acetat-verstoffwechselnder Zellen nach Abbau ihres Membranpotentials (Experiment 4) war mit einer mehr als 80%igen Reduktion der Umsatzrate des Acetats verbunden. Dies ist verständlich, da das Acetataufnahmesystem von *C. glutamicum* vom elektrochemischen Protonenpotentials über der Cytoplasmamembran angetrieben wird (Ebbighausen et al., 1991). In allen vier beschriebenen Fällen der Hemmung der Sekretionsaktivität sank der intrazelluläre Glutamatgehalt der Zellen durch die Hemmung nur um weniger als 40% ab (vergl. Abb.16,17,14 und 15A).

Die Analyse von Substratumsatz und Produktbildung bei gehemmter Sekretion zeigt, daß zwei unterschiedliche Situationen unterschieden werden müssen: 1. Hemmung der

Tab.7.

Veränderungen von Substratumsatz und Produktbildung durch *C. glutamicum* nach Hemmung der Glutamatsekretion

Die Raten von Substrat- und Sauerstoffumsatz sowie die Bildungsraten von Glutamat und Laktat wurden vor und nach Hemmung der Glutamatsekretion, hervorgerufen durch die in den Abbildungen 16, 17, 14 und 15A vorgestellten Bedingungen, gemessen.

Experiment		Verbrauchsraten [nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}]		Bildungsraten [nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}]	
		C-Quelle (C_6)	O_2	Glutamat	Laktat
Glukosemangel (C-Quelle: Glukose s. Abb.16)	vor	32	67	17	n.b.
	nach	0	13	≤1	n.b.
O_2-Mangel (C-Quelle: Glukose s. Abb.17)	vor	50	n.b.	19	0
	nach	20	0	≤1	36
DCCD-Zusatz (C-Quelle: Glukose s. Abb.14)	vor	33	67	15	0
	nach	29	25	≤1	38
CCCP-Zusatz (C-Quelle: Acetat s. Abb.15A)	vor	41	85	22	n.b.
	nach	8	76	≤1	n.b.

n.b. nicht bestimmt

Sekretion durch drastische bzw. vollständige Unterdrückung der Substrataufnahme (Experiment 1+4) und 2. Hemmung der Sekretion durch die teilweise bzw. vollständige Umlenkung des Stoffflußes zum Laktat (Experiment 2+3). Gemeinsam ist beiden Situationen, daß es bei signifikant hoher intrazellulärer Glutamatkonzentration zu einer Verminderung des Stoffflußes in den Citratzyklus und damit zum Glutamat kommt. Eine schnelle Regulation der Sekretionsaktivität je nach Stärke des Kohlenstoffflußes in den Citratzyklus erscheint sinnvoll, da so ein Auslaufen des intrazellulären Glutamatpools verhindert werden

kann. Als Regulator der Aktivität des Glutamatsekretionscarriers muß ein zellulärer Parameter angenommen werden, der in seiner Größe je nach Stärke des Kohlenstoffflußes in den Citratzyklus variiert.

III.3.2. Untersuchung einer möglichen Regulation der Glutamatsekretion durch den anabolen Reduktionsgrad (NADPH/NADP+NADPH)

Wachsende Zellen von *C. glutamicum* sind auf einen effizienten Zentralstoffwechsel angewiesen, der für die Bereitstellung von Energie, Grundbausteinen und Reduktionsäquivalenten zur Zellsubstanzsynthese sorgt. Ist durch Biotinmangel das Wachstum des Organismus limitiert, so muß sein Bedarf an den Produkten des Zentralstoffwechsels drastisch reduziert sein. Da jedoch auch unter Biotinlimitierung noch ein recht hoher Umsatz des Kohlenstoffsubstrats erfolgt (vergl. Kapitel III.1.3.), ist es denkbar, daß es hier zu Ungleichgewichten im Zentralstoffwechsel kommt, so z.B. zu einer unausgeglichenen Bilanz zwischen Bereitstellung und Verbrauch von Reduktionsäquivalenten für den Baustoffwechsel (NADPH). NADP wird im reduktiven Pentose-Phosphat-Zyklus durch die Enzyme Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, sowie im Citratzyklus durch die Isocitrat-Dehydrogenase reduziert. Der Kohlenstofffluß durch den Pentose-Phosphat-Zyklus ist bei Glutamat-produzierenden Zellen von *C. glutamicum* deutlich reduziert (Ishino et al., 1991, K. Sonntag, persönliche Mitteilung). Eine Transhydrogenase, die Reduktionsäquivalente von NADPH auf NAD überträgt und damit der Atmungskette zuführt, konnte für *C. glutamicum* bisher nicht nachgewiesen werden (Kinoshita und Tanaka, 1972; Valino, 1991). Demnach könnte Kohlenstofffluß in den Citratzyklus bei Biotin-limitierten, nicht wachsenden Zellen von *C. glutamicum* zu einem Anstieg des Reduktionsgrades des NADP-Pools führen. Glutamatbildung durch die NADPH verbrauchenden Enzyme Glutamat-Dehydrogenase und Glutamin-Synthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase und der Export des gebildeten Glutamats, in seiner Aktivität reguliert über den anabolen Reduktionsgrad (NADPH/NADP+NADPH), würden einer übermäßigen Reduktion des NADPs entgegenwirken. Die Hypothese, daß der anabole Reduktionsgrad als Sensor des Kohlenstoffflußes in den Citratzyklus und als Regulator des Glutamatsekretionssystems fungiert, wurde durch Messung des Nicotinamid-Nukleotid-Gehalts von *C. glutamicum* unter verschiedenen Bedingungen experimentell überprüft.

Die Ergebnisse des Vergleichs von wachsenden und Glutamat-sekretierenden Zellen von *C. glutamicum* bezgl. ihres NAD(H)- und NADP(H)-Gehalts sind in Tabelle 8 dargestellt. Der NAD(H)-Gehalt (NAD+NADH) wachsender Zellen betrug 2,45 nMol·mg TG^{-1} und war damit um den Faktor zwei höher als ihr NADP(H)-Gehalt (NADP+NADPH).

Tab.8

Gehalt der Pyridinnukleotide NAD(H) und NADP(H) von wachsenden und Biotin-limitierten *C. glutamicum* Zellen

Die Messungen wurden mit wachsenden Zellen (200 µg Biotin·l^{-1}) während der logarithmischen Wachstumsphase und mit Biotin-limitierten Zellen (1 µg Biotin·l^{-1}) nach Einsetzen der Glutamatproduktion durchgeführt. Als C-Quelle wurde Glukose eingesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte von vier unabhängigen Messungen.
CRC: Kataboler Reduktionsgrad; NADH/NAD+NADH
ARC: Anaboler Reduktionsgrad; NADPH/NADP+NADPH

[Biotin]	NAD	NADH	NADP	NADPH	CRC	ARC
[µg·l^{-1}]		[nMol·mg TG^{-1}]				
200	1,70 ±0,29	0,76 ±0,28	0,56 ±0,07	0,71 ±0,09	0,30	0,56
1	1,44 ±0,10	0,22 ±0,09	0,80 ±0,08	0,25 ±0,05	0,13	0,24

Nur durchschnittlich 30% des NADs lagen in reduzierter Form vor, während für den NADP-Pool ein Reduktionsgrad von annähernd 60% ermittelt wurde. Die Bestimmung des NAD(P)(H)-Gehalts Biotin-limitierter Zellen ergab im Vergleich zu wachsenden Zellen um 32% (NAD(H)) bzw. 17% (NADP(H)) niedrigere Werte. Auch das Ausmaß der Reduktion beider Coenzyme lag mit nur 13% (NAD(H)) bzw. 24% (NADP(H)) deutlich unter demjenigen der wachsenden Zellen.

Eine mögliche Korrelation der Aktivität der Glutamatsekretion mit der Höhe des anabolen Reduktionsgrads wurde an Hand der in Tabelle 9 zusammengefaßten Experimente überprüft. Bei Verbrauch der Glukose, wie beschrieben mit sofortigem Stopp der Glutamatsekretion verbunden, konnte tatsächlich eine Abnahme des anabolen Reduktionsgrads der Biotin-limitierten Zellen um 50% beobachtet werden. Der äußerst niedrige katabole Reduktionsgrad der Zellen blieb unverändert. Die Hemmung der Glutamatsekretion unter anaeroben Bedingungen hatte nahezu keinen Effekt auf den Reduktionsgrad des NADPs. Die Unterbindung der Atmung führte jedoch wie zu erwarten zu einem deutlichen Anstieg des Anteils reduzierten NADs. In einem dritten Experiment wurde die Reaktion des anabolen Reduktionsgrads auf die Auslösung der Glutamatsekretion beim Leucin-auxo-

Tab.9

Reaktion des Reduktionsgrads von NAD und NADP auf Veränderungen der Glutamatsekretionsaktivität

Die Veränderungen der Glutamatsekretionsaktivität erfolgte durch Variation der Glukose- bzw. Sauerstoffversorgung von Wildtypzellen (vergl. Abb.16 und 17) bzw. über Leucin-Versorgung und Inkubationstemperatur des Leucin-auxotrophen Stamms ATCC 14310 (vergl. Abb.5).
CRC: Kataboler Reduktionsgrad; NADH/NAD+NADH
ARC: Anaboler Reduktionsgrad; NADPH/NADP+NADPH

Experiment		Glutamatsekretion [nMol·min^{-1}·mg TG^{-1}]	CRC	ARC
C. glutamicum ATCC 13023				
+ Glukose		23	0,08	0,19
- Glukose		0	0,08	0,10
+ O_2		24	0,11	0,30
- O_2		0	0,33	0,34
C. glutamicum ATCC 14310				
+ Leucin	30°C	0	0,14	0,43
	39°C	3	0,12	0,44
- Leucin	30°C	3	0,14	0,45
	39°C	12	0,12	0,44

trophen *C. glutamicum* Stamm ATCC 14310 untersucht (vergl. Kapitel III.1.5. und Abb.5). Hier konnte jedoch kein Unterschied im Reduktionsgrad des NADPs zwischen den nicht sekretierenden Leucin-versorgten Zellen und den mit niedriger Rate sekretierenden Leucin-gehungerten Zellen festgestellt werden. Auch nach Erhöhung der Inkubationstempe-

ratur der Kulturen auf 39°C, die den Unterschied in der Sekretionsfähigkeit der beiden Zelltypen noch verstärkte, änderte sich daran nichts. Der leichte Abfall des katabolen Reduktionsgrads durch die Temperaturerhöhung dürfte auf der Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit der Atmungskette beruhen.

Zusammengenommen deuten die in den Tabellen 8 und 9 gezeigten Daten nicht darauf hin, daß für *C. glutamicum* die Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Redoxbilanz unter Biotinlimitierung ein Problem darstellt. Vielmehr muß angenommen werden, daß der Organismus auch dann zur Koordination von Reduktionsäquivalenten-liefernden und -verbrauchenden Reaktionen in der Lage ist, wenn kein Wachstum stattfindet. Die Hypothese einer Regulation der Glutamatsekretionsaktivität über den anabole Reduktionsgrad konnte damit nicht belegt werden.

IV. DISKUSSION

Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen stützen die bereits früher von Hoischen und Krämer (1989) aufgestellte Hypothese, daß die Sekretion von Glutamat bei Biotin-limitierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum* durch einen spezifischen Effluxcarrier vermittelt wird. Es wurde eine detaillierte Analyse des Energiestatus Glutamat-sekretierender Zellen vorgenommen und die Energiekopplung des Glutamatexports durch gezielte Manipulation zellulärer Energiespeicher untersucht. Auf diese Weise konnte ein Antrieb des Exports durch die Energie elektrochemischer Gradienten, also ein sekundärer Mechanismus, ausgeschlossen und Hinweise auf einen primären Transportmechanismus erhalten werden. Die Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion Biotin-limitierter Zellen wurden veröffentlicht (Gutmann et al., 1992).

Stärkstes Argument für die Beteiligung eines Carriers und gegen einfache Diffusion als Grundlage der Sekretion stellt die Tatsache dar, daß eine Variation des elektrochemischen Gradienten des Glutamatanions keinen Einfluß auf die Sekretionsaktivität hat. Die chemische und elektrische Komponente des Gradienten konnte sowohl einzeln (diese Arbeit, Abb.6 und 12) als auch zugleich abgebaut werden (C. Hoischen, 1990), ohne eine Verminderung der Sekretionsrate zu bewirken. Dieses Verhalten spricht ebenfalls gegen erleichterte Diffusion als Exportmechanismus, d.h. gegen einen Carrier, der Glutamat im Uniport entsprechend seines elektrochemischen Potentials über die Cytoplasmamembran transportiert. Auf Grund des völligen Fehlens einer Reaktion der Sekretionsaktivität auf den Abbau oder die Umkehrung der Gradienten, kann bereits an dieser Stelle postuliert werden, daß die zum Antrieb der Sekretion genutzte freie Energie deutlich größer ist als diejenige, die in Form elektrochemischer Gradienten gespeichert werden kann. Auch der Energiegehalt der chemischen Gradienten von Protonen und Kaliumionen, Ionen, die als mögliche Cosubstrate des Glutamatcarriers in Frage kommen, wird nicht als Energiequelle des Exports genutzt. Wie im Fall des Glutamatkonzentrationsgradienten beeinflußte die Variation des Protonengradienten über der Cytoplasmamembran die Sekretionsrate in weitem Bereich nicht (Abb. 7). Bei Veränderung des Kaliumkonzentrationsgradienten durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration kam es zwar zu einer deutlichen Verminderung der Sekretionsrate (Abb.9), es konnte jedoch keine stöchiometrische Kopplung von Kalium- und Glutamatefflux bei Glutamat-sekretierenden Zellen festgestellt werden (Tab.5). Die Geschwindigkeit des Kaliumeffluxes lag stets um mindestens den Faktor 5 unter der Geschwindigkeit des Glutamateffluxes. Es ist daher anzunehmen, daß die hemmende Wirkung einer erhöhten externen Kaliumkonzentration auf die Glutamatsekretionsaktivität Folge eines unspezifischen Effekts der erhöhten Salzkonzentration ist.

Die Verstärkung sowohl der Kaliumaufnahme als auch des Kaliumeffluxes bei Biotin-limitierten im Vergleich zu wachsenden Zellen ist bemerkenswert. Das Auftreten eines massiven Kaliumefflux mit Einsetzen der Glutamatsekretion haben Duperray et al. (1992) für *C. glutamicum* Zellen beschrieben, die durch die Behandlung mit Detergenzien, hier mit aliphatischen Aminen, zur Glutamatsekretion gebracht wurden. Die Rate des Kaliumeffluxes lag 5-10fach höher als diejenige des Glutamateffluxes, so daß auch diese Autoren eine mechanistische Kopplung zwischen Glutamat- und Kaliumefflux ausschlossen. In den von Duperray et al. gezeigten Experimenten führte die Detergenzbehandlung der Zellen innerhalb eines kurzen Zeitraums zur völligen Entleerung der cytoplasmatischen Glutamat- und Kaliumpools und zum Abbruch der Sekretion, obwohl die gleiche Methode auch industriell zur kontinuierlichen Produktion von Glutamat eingesetzt wird. Es ist daher anzunehmen, daß die von Dupperay et al. angewendeten Bedingungen weit drastischer waren als diejenigen, die zur kontinuierlichen Produktion von Glutamat führen. Festzuhalten ist jedoch, daß es offensichtlich unter Glutamatproduktionsbedingungen, unabhängig ob durch Biotinlimitierung oder Detergenzbehandlung herbeigeführt, zu einer verstärkten Durchlässigkeit der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* für Kaliumionen kommt. Die Kaliumverluste durch passiven Kaliumausstrom können jedoch von Biotin-limitierten Zellen durch eine Erhöhung der Kaliumaufnahme kompensiert werden. Auf diese Weise ist es diesen Zellen möglich, eine intrazelluläre Kaliumkonzentration in vergleichbarer Höhe wie Biotin-versorgte Zellen aufrechtzuerhalten.

Die direkt gemessenen, niedrigen Kaliumeffluxraten bei Biotin-limitierten Zellen erlauben es, einen Cotransport des Glutamatanions mit Kaliumionen definitiv auszuschließen, unabhängig davon ob dem Glutamatefflux ein sekundärer oder ein primärer Transportmechanismus zu Grunde liegt. Die Frage nach einem Cotransport mit Protonen kann nicht in diesem Sinn endgültig beantwortet werden. Die weitgehende Unabhängigkeit der Sekretionsaktivität vom Protonengradienten über der Cytoplasmamembran schließt einen sekundären, nicht jedoch einen primären Glutamat/Protonen-Cotransport aus. Die Kopplung des Exports z.B. mit der Hydrolyse von ATP könnte die hemmende Wirkung eines dem Protonenexport entgegengerichteten Protonengradienten überspielen, da der Betrag der freien Energie, der bei der Hydrolyse der Säureanhydridbindung des ATPs unter physiologischen Bedingungen verfügbar wird (≈-50 kJ/Mol) weit höher ist als derjenige, der in Form eines chemischen Protonengradienten gespeichert werden kann (-5,7 kJ/Mol bei einem Konzentrationsverhältnis über der Membran von 1:10).

Bei Alkalisierung des Cytoplasmas auf pH 8,3, wodurch die intrazelluläre Konzentration der protonierten Form des Glutamats auf unter 20 µM absinken mußte, trat keine Hemmung der Sekretionsaktivität auf (Abb.7). Dies kann bedeuten, daß entweder die protonierte Säure nicht das Substrat des Exportcarriers darstellt oder aber, daß die Konzentration von 20 µM noch deutlich über dessen K_M-Wert liegt. Ein K_M-Wert unter 20 µM

erscheint jedoch für das Glutamatexportsystem unwahrscheinlich, da es stets mit intrazellulären Glutamatkonzentrationen von größer 100 mM konfrontiert ist. Es ist daher davon auszugehen, daß Glutamat als Anion exportiert wird.

Eine Bestimmung der Substrataffinität des Glutamatexportsystems konnte nicht durchgeführt werden, da es nicht möglich war, die intrazelluläre Glutamatkonzentration ganzer Zellen über einen größeren Bereich zu variieren. Für die Lysin- und Isoleucinexportsysteme von *C. glutamicum*, beides sekundäre Transportsysteme, wurden K_M-Werte im millimolaren Bereich bestimmt (Bröer und Krämer, 1991a; S. Zittrich, persönliche Mitteilung). K_M-Werte primärer Transportsysteme wurden bisher nur für Aufnahmesysteme ermittelt. Diese besitzen sinnvollerweise eine sehr niedrige Substrataffinität von meist unter 1 µM (Ames, 1988), da ihre Funktion in der effizienten Aufnahme von Substraten auch bei sehr niedrigen externen Konzentrationen besteht.

Der abrupte Abbruch der Glutamatsekretion bei Absenkung des externen pH-Wertes unter 5,7 (Abb.7) könnte auf der Hemmung des Exportcarriers durch die gleichzeitig erfolgende Ansäuerung des Cytoplasmas beruhen. Für die Glutamataufnahmesysteme von *C. glutamicum* (Krämer et al., 1990), *Streptococcus lactis* (Poolman et al., 1987) und *Streptococcus mutans* (Noji et al., 1988) wurde eine derartige Regulation der Transportaktivität durch den cytoplasmatischen pH beschrieben. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Kalnenieks et al. (1989) wurde eine schlechte pH-Homöostase von *C. glutamicum* bei alkalischen pH-Werten gefunden, so daß bei einem externen pH über 7,0 der interne pH-Wert der Zellen mit dem pH des Mediums identisch ist.

Wird das Glutamatanion exportiert so muß das elektrische Potential (innen negativ), das über der Cytoplasmamembran der Zellen anliegt, eine Kraft auf das geladene Transportsubstrat ausüben. Wie bereits erwähnt beeinflußt eine Veränderung des Membranpotentials die Sekretionsaktivität jedoch nicht. Ein gezielter Abbau des Membranpotentials gelang bei Glukose-verstoffwechselnden Zellen von *C. glutamicum* durch Einsatz des Protonophors CCCP (Abb.12). Es kam dabei nicht zur Störung des Zentralstoffwechsels, da die Glukoseaufnahme des Organismus unabhängig vom Membranpotential durch ein Phosphotransferasesystem erfolgt (Malin und Bourd, 1991). Das Ausbleiben einer Reaktion der Glutamatsekretionsaktivität auf den Abbau des Membranpotentials verdeutlicht einmal mehr, daß die Glutamatsekretion mit einer chemischen Reaktion gekoppelt sein muß. Für einen solchen primären Transportmechanismus stellt ATP eine mögliche Energiequelle dar. Der Beweis für eine direkte Beteiligung von ATP an der Glutamatsekretion kann mit Experimenten an ganzen Zellen nicht erbracht werden. In Versuchen zur Senkung der intrazellulären ATP-Konzentration Glutamat-sekretierender Zellen wurde maximal eine 50%ige Reduktion erreicht (Abb.15,16,17). Zudem waren Veränderungen der Sekretionsaktivität nicht eindeutig mit der Höhe des ATP-Pools korreliert, d.h. die Abnahme des ATP-Gehalts um 50% führte in einigen jedoch nicht in allen Fällen zur Verminderung der Exportrate

(vergl. Abb.15 A+B). Die Analyse der Energiekopplung anderer primärer Transportsysteme wie z.B. bakterieller, Bindeprotein-abhängiger Aufnahmesysteme, hat gezeigt, daß der endgültige Nachweis der Hydrolyse von ATP im Verlauf des Transportprozeßes nur mit Membranvesikeln (Ames et al., 1989) oder durch Rekonstitution des isolierten Carriers in Proteoliposomen zu erbringen ist (Bishop et al., 1989). An intakten Zellen durchgeführte Bestimmungen der Transportaktivität als Funktion der intrazellulären ATP-Konzentration erbrachte für verschiedene, erwiesenermaßen nach einem primären Transportmechanismus arbeitende Carrier ganz unterschiedliche Ergebnisse. Die Transportaktivität der Histidinpermease von *E. coli* blieb auch bei 90%iger Reduktion des ATP-Gehalts der Zellen auf ca. 0,2 mM unverändert hoch, so daß ein sehr niedriger K_M-Wert dieses Transportsystems für ATP postuliert wurde (Joshi et al., 1989). Für die ebenfalls ATP-getriebene Glutamataufnahme in *C. glutamicum* (Krämer und Lambert, 1990) und das Transportsystem, das den Efflux eines Fluoreszenzindikators bei *Lactococcus lactis* katalysiert (Molenaar et al., 1992), konnte hingegen eine direkte Abhängigkeit der Transportaktivität von der intrazellulären ATP-Konzentration zwischen 1 und 5 mM beobachtet werden. Somit ist auch im Fall, daß die Glutamatsekretion bei *C. glutamicum* wie vorgeschlagen durch ein primäres Transportsystem katalysiert wird, eine Korrelation von Transportaktivität und ATP-Gehalt in dem engen, experimentell einstellbaren ATP-Konzentrationsbereich nicht notwendigerweise zu fordern.

Bei der Glutamatsekretion unter Biotinmangel ist das Auftreten der Sekretion sowohl mit der Begrenzung des Wachstums als auch mit einer Veränderung der Struktur der Cytoplasmamembran verbunden. Das zur Erklärung der Sekretion lange Zeit weitgehend uneingeschränkt akzeptierte Modell eines passiven Sekretionsmechanismus hat dazu geführt, daß der Membraneffekt als Auslöser der Glutamatsekretion stets in den Vordergrund gerückt wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß *C. glutamicum* auch durch eine nicht Membran-wirksame, rein metabolische Limitation zur Sekretion von Glutamat veranlaßt werden kann. So sezernierte der Leucin-auxotrophe Stamm ATCC 14310 bei guter Biotinversorgung mit einer geringen aber signifikanten Rate Glutamat, wenn sein Wachstum durch den Entzug von Leucin verhindert wurde (Abb.5). Es ist daher notwendig, als Modulatoren der Aktivität des postulierten Sekretionscarriers Membraneffekt und die Veränderungen im Stoffwechsel, die als Reaktion auf eine Wachstumslimitierung auftreten, gleichberechtigt zu nennen. Entsprechend könnten für die Fähigkeit des Stammes Nr. 9087 (Kyowa Hakko Kogyo Co.), auch in Anwesenheit eines Überschußes von Biotin Glutamat mit hoher Rate zu sezernieren (Tab.4), Mutationen verantwortlich sein, die die Membran und/oder den Stoffwechsel betreffen.

Die Erhöhung der Inkubationstemperatur, die bei Fermentation des Stammes ATCC

14310 die Glutamatsekretion der Leucin-gehungerten Zellen deutlich steigerte und eine geringe Sekretion auch bei den Leucin-versorgten Zellen hervorrief, hat sicherlich einen Effekt auf die Membran der Zellen. So nimmt mit steigender Temperatur die Fluidität von Phospholipidmembranen gegebener Zusammensetzung zu (Melchior, 1982). Für die beobachtete Aktivitätssteigerung des Glutamatsekretionscarriers könnte daher eine Fluidisierung der Cytoplasmamembran verantwortlich gemacht werden. Eine Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Membranfluidität wurde für einige membranständige Proteine beschrieben (McElhaney, 1982). Auch eine unspezifische Permeabilisierung der Membran wäre als Grundlage des erhöhten Glutamateffluxes denkbar. Es gibt jedoch Argumente, die dagegen sprechen, daß die beobachtete Sekretionssteigerung nach Erhöhung der Inkubationstemperatur durch veränderte Eigenschaften der Membran vermittelt wird. Eine unspezifische Permeabilisierung der Zellen bei 39°C ist aus ganz offensichtlichen Gründen auszuschließen. Zum einen sind die Leucin-versorgten Zellen auch bei der erhöhten Temperatur noch in der Lage zu wachsen. Daß tatsächlich bereits eine spezifische Permeabilisierung der Membran für Protonen das Wachstum von *C. glutamicum* vollständig verhindert, konnte bei Gabe des Protonophors CCCP beobachtet werden. Außerdem erfolgte kein Leerlaufen des intrazellulären Glutamatpools der Zellen nach der Temperaturerhöhung. Dies tritt erst bei Erhöhung der Inkubationstemperatur über 40°C auf (R. Krämer, persönliche Mitteilung). Eine Aktivierung des Sekretionscarriers durch gesteigerte Membranfluidität erscheint unwahrscheinlich, da sich die Cytoplasmamembran von Zellen, die durch herkömmliche Methoden zur Sekretion von Glutamat veranlaßt wurden, im Vergleich zur Membran wachsender Zellen gerade nicht durch eine erhöhte Fluidität auszeichen. Neubeck et al. (1993) nahmen Fluiditätsmessungen an einem coryneformen Bakterium durch Bestimmung der Anisotropie einer in die Membran inkorporierten Fluoreszenzsonde vor und konnten keinen Unterschied in der Fluidität der Membranen wachsender und Biotin-limitierter Zellen ermitteln. Es bestehen jedoch Zweifel an der Aussagekraft dieser Messungen, da hier mit intakten Zellen gearbeitet wurde und der Einbau der Fluoreszenzsonde in die Cytoplasmamembran nicht überzeugend belegt werden konnte. Direkt an isolierten Membranen von *C. glutamicum* vorgenommene Fluiditätsmessungen durch Elektronenspinresonanz unter Verwendung eines Fettsäurespinlabels lieferten für Biotin-limitierte Zellen sogar niedrigere Fluiditätswerte als für wachsende Zellen (A. Erdmann, persönliche Mitteilung). In Einklang mit diesem Ergebnis steht die Beobachtung, daß es bei Auslösung der Glutamatsekretion durch Biotinmangel und auch durch Detergenzbehandlung zur Zunahme des Anteils gesättigter Fettsäuren am Gesamtfettsäuregehalt der Membranen kommt (Hoischen und Krämer, 1990; Huchenq et al., 1984). Vermehrter Einbau gesättigter Fettsäuren in die Phospholipide setzt die Fluidität der entsprechenden Phospholipidmembran herab, ein Effekt der von Bakterien zur Stabilisierung ihrer Membran bei erhöhter Temperatur ausgenutzt wird (Russell, 1984).

Der Effekt der Temperaturerhöhung auf den Metabolismus des Stammes *C. glutamicum* ATCC 14310 besteht wahrscheinlich primär in einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit aller Stoffwechselreaktionen, wie der verdoppelte Glukoseverbrauch sowohl der Leucin-versorgten als auch der Leucin-gehungerten Zellen nach der Temperaturerhöhung belegt. Zugleich kommt es zu einer Aktivierung der Glutamatsekretion. Der Unterschied in der Stärke der Sekretion, mit der die beiden Zelltypen auf die verstärkte Glukosezufuhr reagieren, kann nur so gedeutet werden, daß die Sekretion den Zellen dazu dient, sich überschüssigen Kohlenstoffs zu entledigen. Während die Leucin-versorgten Zellen in der Lage sind zu wachsen und so aufgenommenes Substrat in erster Linie zur Bildung von Zellsubstanz einzusetzen, steht den Leucin-gehungerten Zellen diese Möglichkeit nicht offen. Auf die Hemmung des Wachstums bei zugleich ausreichender Kohlenstoffversorgung hatten diese Zellen bei 30°C ihren Glukoseumsatz im Vergleich zu den Leucin-versorgten Zellen bereits um den Faktor vier reduziert. Bei erneuter Erhöhung der Glukoseaufnahme durch die Anhebung der Temperatur sezernierten die Zellen dann Glutamat mit einer Rate, die immerhin halb so hoch war wie die Sekretionsrate effizient sekretierender, Biotin-limitierter Zellen des Wildtyps.

Die Beobachtung, daß Glutamatsekretion auch in gänzlicher Abwesenheit einer Membranveränderung offensichtlich ausgelöst durch eine bestimmte metabolische Situation der Zellen auftritt, war Anlaß dazu, auch bei Biotin-gehungerten Zellen die metabolischen Effekte, im Gegensatz zu den sonst meist betonten strukturellen Effekten dieser Stoffwechsellimitierung genauer zu untersuchen. Um die Besonderheiten des Stoffwechsels unter Biotinlimitierung hervorzuheben wird das Verhalten Biotin-limitierter Zellen im Folgenden im Vergleich zu demjenigen wachsender Zellen diskutiert.

Bei ausreichender Biotinversorgung vermag *C. glutamicum* in der Batchkultur über einen längeren Zeitraum exponentiell zu wachsen. Der Zellertrag des Organismus hängt von der Art des verwendeten Kohlenstoffsubstrats ab. Bei Umsatz von Acetat liegt der Zellertrag um ungefähr 30% niedriger als bei Umsatz von Glukose (Tab.2). Die Oxidation der beiden Substrate zu CO_2 macht, dank identischen Oxidationsgrads des Kohlenstoffs, den gleichen Betrag freier Energie für die Zellen verfügbar. Der niedrigere Zellertrag der Acetat-verstoffwechselnden Zellen ist daher Ausdruck dafür, daß hier diese Energie weniger effizient zur Synthese von Zellmasse eingesetzt werden kann. Verantwortlich dafür ist die Tatsache, daß eine Reihe von Stoffwechselleistungen mit höheren energetischen Kosten verbunden ist wenn Acetat an Stelle von Glukose als C-Quelle dient. So ist der Energieaufwand zur Synthese von Proteinen und Nukleinsäuren ausgehend von Acetat etwa doppelt so hoch wie ausgehend von Glukose (Tempest und Neijssel, 1987). Während Glukose im Verlauf der Aufnahme durch ein Phosphotransferasesystem phosphoryliert wird

und so in bereits aktivierter Form als Glukose-6-Phosphat ins Cytoplasma gelangt, kommt im Falle von Acetat zu dem Energieaufwand für die Aufnahme noch derjenige für die Aktivierung des Acetats zu Acetyl-CoA hinzu. In Gegenwart von Acetat muß zudem auch ein höherer Energiebetrag zur Aufrechterhaltung der protonenmotorischen Kraft über der Cytoplasmamembran aufgewendet werden, da die protonierte Form der Essigsäure membran-permeabel ist und als Entkoppler wirkt (Neijssel und Tempest, 1979). Um diesem zusätzlichen Energiebedarf Rechnung zu tragen verstärkt *C. glutamicum* bei Wachstum mit Acetat als C-Quelle den Energiestoffwechsel auf Kosten der Substratassimilation, so daß im Vergleich zu Zellen, die mit Glukose als C-Quelle wachsen eine nahezu doppelt so große Menge des Substrats zu CO_2 oxidiert wird.

Die Geschwindigkeit, mit der wachsende Zellen Glukose bzw. Acetat verbrauchen (60-70 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$, bezogen auf den Umsatz von C_6-Einheiten) liegt deutlich höher als auf Grund publizierter Daten zur Maximalgeschwindigkeit der beteiligten Aufnahmesysteme zu erwarten. Zur Charakterisierung des Glukoseaufnahmesystems von *C. glutamicum* verwendeten Malin und Bourd (1991) das nicht-metabolisierbare Glukoseanalogon Methyl-α-glucosid. Es ist anzunehmen, daß die Diskrepanz zwischen der so ermittelten Maximalgeschwindigkeit der Glukoseaufnahme (21 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$) und dem tatsächlichen Glukoseverbrauch wachsender Zellen in schlechterem Transport des unphysiologischen Substrats Methyl-α-Glucosid begründet ist. Die Acetataufnahme von *C. glutamicum* wurde bisher nur für Zellen bestimmt, die mit Glukose als C-Quelle angezogen worden waren (10 $nMol\ C_6 \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$; Ebbighausen et al., 1991). Der um den Faktor 6 höhere Acetatumsatz Acetat-gezogener Zellen deutet darauf hin, daß das Acetataufnahmesystem in Anwesenheit von Acetat induziert oder durch die Anwesenheit von Glukose reprimiert wird. Unter denselben Bedingungen werden auch die an der Verstoffwechselung von Acetat beteiligten Enzyme (Acetatkinase, Phosphotransacetylase, Isocitratlyase und Malatsynthase) etwa 10-50-fach induziert (D. Reinscheid, pers. Mitteilung). Daß die Acetataufnahmeaktivität Glukose-gezogener Zellen auf Grund limitierender Verstoffwechselung des Acetats unterbestimmt wurde erscheint jedoch unwahrscheinlich, da keine Akkumulation von Acetat in diesen Zellen beobachtet wurde (Ebbighausen et al., 1991).

Auf den Entzug der Stickstoffquelle und die resultierende Wachstumslimitierung vermag *C. glutamicum* mit der Reduktion der Verbrauchsraten von Glukose und Acetat um bis zu 85% zu reagieren. Dies zeigt, daß der Organismus unter diesen Bedingungen durchaus dazu in der Lage ist, den Substratumsatz den Wachstumsverhältnissen anzupassen. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen, deren Wachstum einzig durch die Versorgung mit Biotin limitiert wird, keine derartige, drastische Regulation des Substratverbrauchs (Tab.3). Sie setzen die Substrate Glukose und Acetat mit 50-60% der Raten wachsender Zellen um. Ein großer Teil des Kohlenstoffs und des Energiegehalts der Substrate wird jedoch in Form von

Glutamat wieder ausgeschieden. Entsprechend des Stoffwechselweges zur Biosynthese von Glutamat sollte die Glutamatbildung aus Glukose bzw. Acetat im Verhältnis (Glutamat:C_6) von 1:1, also mit 100% molarer Ausbeute möglich sein. Tatsächlich wurden jedoch molare Glutamatausbeuten von nur 50-60% gefunden, ein Wert, der auch mit Ausbeuten industrieller Produktionsprozesse übereinstimmt (Kinoshita und Tanaka, 1972). Neben Glutamat wurden keine weiteren unvollständig oxidierten Abbauprodukte der C-Quelle in den Kulturüberständen gefunden. Die Bildung von Nebenprodukten im Verlauf des Glutamatproduktionsprozeßes wird in der Literatur ausschließlich mit Bezug auf nicht optimale Fermentationsbedingungen wie z.B. mangelnde oder übermäßige Sauerstoff- oder Stickstoffversorgung diskutiert (Kinoshita und Tanaka, 1972; Hirose et al., 1985). Auf eine vollständige Analyse des Kohlenstoffflußes während der Glutamatbildung können sich auch Dominguez et al. (1993) nicht stützen, die vorschlagen, die Glutamatausbeute werde durch die anaplerotische Oxalacetatbildung limitiert. Eine Begrenzung der Ausbeute durch die Kapazität des Exportsystems erscheint unwahrscheinlich, da es in Biotin-limitierten Zellen nicht zu einem Anstau von Glutamat kommt. Die Glutamatproduktion stellt für die nicht mehr wachsenden Zellen vielmehr einen zusätzlichen Abfluß für intrazelluläres Glutamat dar. Dies zeigt sich darin, daß die intrazelluläre Glutamatkonzentration während der Glutamatsekretion um 100-150 mM unter derjenigen wachsender Zellen liegt.

Stickstoffmangel wird von Biotin-limitierten Zellen wie von Biotin-versorgten Zellen als Signal zur Einschränkung des Substratumsatzes erkannt. Die Ausscheidung von α-Ketoglutarat, die bei zugleich Biotin- und Stickstoff-limitierten Zellen beobachtet wird, ist entsprechend langsam. Sie erfolgt mit nur durchschnittlich 13% der Rate der Glutamatbildung. Die auf den Substratverbrauch (C_6) bezogene α-Ketoglutaratausbeute ist jedoch mit 40% vergleichbar zur Glutamatausbeute. Die industrielle Fermentation von *C. glutamicum* zur α-Ketoglutarat-Produktion wird ebenfalls mit Biotin-limitierten Zellen durchgeführt. Sie ist begleitet von der Bildung von Citrat, Succinat und Gluconat als Nebenprodukten und einer verstärkten Neigung der Zellen zu lysieren (Kinoshita und Tanaka, 1972).

Die Bildung von α-Ketoglutarat als Reaktion auf mangelnde Stickstoffversorgung wird bei vielen Organismen wie z.B. *Klebsiella aerogenes* (Neijssel und Tempest, 1975) oder *Escherichia coli* (Tempest und Neijssel, 1987) beobachtet. Jedoch liegen die Ausbeuten hier meist unter 20%. Es wird angenommen, daß N-Limitierung zu einem intrazellulären Anstau von α-Ketoglutarat führt. Untersuchungen zum Mechanismus des α-Ketoglutarateffluxes liegen nicht vor. Den Sinn einer Erhöhung der intrazellulären α-Ketoglutaratkonzentration sehen Neijssel et al. (1993) in der Verbesserung der Chance, begehrtes Ammonium über die Glutamat-bildenden Enzyme zu binden. Unklar bleibt dabei, wie die Organismen die weitere Oxidation des α-Ketoglutarats durch den Citratzyklus unterbinden. Bei coryneformen Bakterien wurde für die mangelnde Oxidation der C-Quelle

und somit die Produktion von Glutamat bzw. α-Ketoglutarat unter Biotin-Mangel lange Zeit ein Fehlen der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase verantwortlich gemacht (Kinoshita und Tanaka, 1972). Das sehr instabile Enzym konnte jedoch von Shiio und Ujigawa-Takeda (1980) in *Brevibacterium flavum* nachgewiesen werden. Die für Biotin-limitierte Zellen ermittelte Aktivität des Enzyms sollte zur Oxidation des anfallenden α-Ketoglutarats ausreichen. Daß es unter Biotinlimitierung trotzdem bevorzugt zur Glutamatbildung kommt, führten Shiio und Ujigawa-Takeda auf die im Vergleich zur α-Ketoglutarat-Dehydrogenase ungefähr 100fach höhere spezifische Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase (GDH) zurück. In Experimenten mit einem GDH-negativen Stamm konnte jedoch gezeigt werden, daß die Glutamatbildung durch diesen Stamm mit gleicher Rate und Ausbeute erfolgt wie durch den GDH-positiven Wildstamm (Börmann-El Kholy et al., 1993). Im GDH negativen Stamm wird Glutamat über das GS/GOGAT-System gebildet, wobei die spezifische Aktivität der GOGAT nur noch etwa fünffach höher liegt als die Aktivität der α-Ketoglutarat-Dehydrogenase. Die Argumentation von Shiio und Ujigawa-Takeda kann in diesem Fall daher nicht mehr aufrechterhalten werden.

Aus den hier vorgelegten Daten zu Substrat- und O_2-Verbrauch sowie zur Produktbildung von Biotin-versorgten und Biotin-gehungerten Zellen von *C. glutamicum* kann abgeschätzt werden, daß die Menge vollständig oxidierter C-Quelle bei Glutamat-sekretierenden Zellen tatsächlich um ungefähr den Faktor drei niedriger liegt als bei wachsenden Zellen. Dies muß einen drastischen Effekt auf die Energieausbeute des katabolen Stoffwechsels dieser beiden Zelltypen haben, da der überwiegende Anteil (im Falle von Acetat die Gesamtmenge) der zur ATP-Synthese durch Elektronentransport-(ET)-Phosphorylierung eingesetzten Reduktionsäquivalente erst durch die Oxidation von Acetyl-CoA zu CO_2 im Citratzyklus verfügbar wird. Das Membranpotential weist bei beiden Zelltypen vergleichbare Größe auf (Hoischen und Krämer, 1989), es sollte also von beiden zur Phosphorylierung von ATP genutzt werden können. Da der Abbau des Potentials bei Verstoffwechselung von Glukose jedoch nur bei wachsenden Zellen zu einer deutlichen Reduktion des cytoplasmatischen ATP-Gehalts führt muß gefolgert werden, daß auch nur diese Zellen in größerem Maße ATP über ET-Phosphorylierung bilden. Die Einschränkung der ET-Phosphorylierung bei Biotin-limitierten, Glukose-verstoffwechselnden Zellen könnte auf der oben diskutierten, verminderten Fähigkeit dieser Zellen beruhen, Glukose vollständig zu oxidieren. Wiederum für einen Engpass im Citratzyklus Biotin-limitierter Zellen spricht, daß sie auf den Abbau des Membranpotentials nicht wie die Biotin-versorgten Zellen mit einer drastischen Erhöhung der Atmungsaktivität, d.h. der Substratoxidation reagierten.

Bei Wachstum mit Acetat als C-Quelle kann *C. glutamicum* nicht völlig auf die ET-Phosphorylierung verzichten, da die Möglichkeit zur ATP-Synthese über Substratkettenphosphorylierung, die Glukose-umsetzenden Zellen offensteht, bei Verstoffwechselung von

Acetat wegfällt. Die Beteiligung der ET-Phosphorylierung an der ATP-Synthese kann bei Acetat-umsetzenden Zellen jedoch nicht belegt werden, indem die Reaktion des ATP-Gehalts auf den Abbau des Membranpotentials untersucht wird. Die Potentialabhängigkeit der Acetataufnahme muß notwendigerweise zur Abnahme der ATP-Konzentration dieser Zellen führen. Als Nachweis der Nutzung der ET-Phosphorylierung zur ATP-Bildung bei diesen Zellen kann jedoch angeführt werden, daß die Entkopplung von Zellen, die mit Acetat gezogen dann jedoch mit Glukose als C-Quelle versorgt wurden, zu einer deutlichen Reduktion der ATP-Konzentration führte (Abb.15B). Offensichtlich wird unter diesen Bedingungen die bei Umsatz von Acetat unabhängig von der Biotinversorgung verstärkte vollständige Oxidation der C-Quelle beibehalten und entsprechend auch ein größerer Anteil des ATPs durch ET-Phosphorylierung gebildet als bei den durchweg mit Glukose gezogenen Zellen.

Nimmt man die vorgestellten Daten zusammen so ergibt sich das folgende Bild der metabolischen und energetischen Situation von *C. glutamicum* Zellen während der Glutamatsekretion: Mangel eines essentiellen, jedoch nicht mit dem zentralen Energie- oder Kohlenstoffmetabolismus assoziierten Nährstoffes verhindert das Wachstum und reduziert so den Verbrauch von Energie- und Reduktionsäquivalenten sowie von intermediären Kohlenstoffverbindungen für den Aufbau von Zellsubstanz drastisch. Die Fähigkeit zur vollständigen Oxidation des Kohlenstoffsubstrats ist auf bisher nicht geklärte Weise limitiert. Gleichzeitig wird die Geschwindigkeit der Substrataufnahme nur in beschränktem Maß reduziert. In dieser Lage muß es zu einem Anstau der aus dem Substrat gebildeten und normalerweise für das Wachstum benötigten Intermediate kommen, wenn kein zusätzlicher Abfluß für sie besteht. Ein derartiger Abfluß wird offensichtlich durch die Aktivierung des Glutamatexportsystems eröffnet. Dessen energetische Kopplung erlaubt es, gleichzeitig mit der Entfernung überschüssiger Kohlenstoffintermediate aus der Zelle auch zelluläre Energieträger zu regenerieren.

Die Anwendung des Begriffs des "overflow"-Metabolismus auf die Glutamatsekretion von *C. glutamicum* erscheint auf Grund der vorgelegten Analyse berechtigt. Ähnlichkeit zeigt die Überproduktion von Glutamat am ehesten zur Bildung von Polysacchariden als "overflow"-Produkten, die bei einer ganzen Reihe von obligat aeroben, Gram-negativen Organismen unter Stickstofflimitierung beobachtet wird (Linton und Rye, 1989). Auch diese Bakterien können auf die Limitierung nur mit einer offensichtlich ungenügenden Reduktion der Substrataufnahme reagieren und nutzen die energieaufwendige Synthese der Polysaccharide zur Vergeudung überschüssiger Energie.

Sofort abgeschaltet wurde die Glutamatsekretion von Biotin-limitierten, also prinzipiell zur Sekretion befähigten Zellen, immer dann, wenn durch einen Eingriff in den Stoff-

wechsel der Kohlenstofffluß in den Citratzyklus vermindert wurde. Dies konnte durch Reduktion der Substrataufnahme geschehen, etwa durch den vollständigen Entzug des Substrats (Abb.16) oder, bei Verstoffwechselung von Acetat, durch Abbau des Membranpotentials, der treibenden Kraft der Acetataufnahme (Abb.15A). In analoger Weise führt die Hemmung der Substrataufnahme Biotin-limitierter Zellen durch das SH-Reagenz BPAB zum Abbruch der Sekretion (Giessen, 1993). Die Glutamatsekretion wurde aber auch unter anaeroben Bedingungen (Abb.17) und nach Zugabe von DCCD (Abb.14) sofort eingestellt. Sauerstoffmangel oder die Einschränkung der Atmungskapazität, die aus der Modifikation einer Elektronentransportkomponente durch DCCD resultierte, führte zur Bildung von Laktat und somit zu einer Umlenkung des Kohlenstoffflußes vor Eintritt in den Citratzyklus. Laktat wird von *C. glutamicum* offensichtlich über einen effizienten Mechanismus ausgeschieden, so daß auch unter anaeroben Bedingungen noch ein recht schneller Substratumsatz erfolgen kann. Da die intrazelluläre Glutamatkonzentration nach Stopp der Sekretion niemals um mehr als 30% unter dem Wert bei laufender Sekretion lag und zudem die Veränderung der Sekretionsaktivität nicht mit einem zellulären Energieparameter korreliert war, ist auszuschließen, daß der Abbruch der Sekretion auf der Erschöpfung der sie treibenden Energiequelle beruhte. Denkbar ist die Existenz eines Mechanismus zur Regulation der Exportaktivität. Entsprechend der vorgeschlagenen Funktion des Sekretionscarriers ist Glutamatexport immer dann unverzichtbar, wenn ein Überangebot an Kohlenstoffintermediaten besteht. Würde der Export auch weiterlaufen, wenn die Nachlieferung der Intermediate unterbleibt, so käme es zu einem völligen Verlust intrazellulären Glutamats. Durch das beobachtete Abschalten der Sekretion bei gedrosseltem Kohlenstofffluß in den Citratzyklus wird dies verhindert.

Von C. Hoischen (1990) ist ein schnelles Abschalten der Glutamatsekretion nach Zugabe von Biotin zu bis dahin Biotin-limitierten Zellen beschrieben worden. Diese Beobachtung konnte nicht bestätigt werden. In dem in dieser Arbeit vorgestellten Experiment (Abb. 4) ging die Sekretionsaktivität nach Zugabe von Biotin nur langsam und in dem Maße zurück, in dem die Zellen das Wachstum wieder aufnahmen. Da C. Hoischen im Gegensatz zu dem oben besprochenen Regulationsphänomen niemals eine 100%ige Reduktion der Sekretion, sondern stets noch eine Restaktivität von ungefähr 5 $nMol \cdot min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ beobachtete, ist davon auszugehen, daß dies durch nicht optimale Fermentationsbedingungen, wahrscheinlich durch unzureichende Sauerstoffzufuhr bedingt war.

Als Parameter, der in seiner Größe den jeweils vorliegenden Kohlenstofffluß in den Citratzyklus abbilden und damit als Regulator der Aktivität des Glutamatsekretionscarriers dienen könnte, erschien der Reduktionsgrad des Coenzyms NADP naheliegend. Dieser Hypothese zu Grunde lag die Überlegung, daß *C. glutamicum* im Fall einer Wachstumslimitierung mit einem Überangebot an Reduktionsäquivalenten für den Baustoffwechsel,

also in Form von NADPH, konfrontiert sein sollte. Da *C. glutamicum* offensichtlich keine Transhydrogenase besitzt (Kinoshita und Tanaka, 1972; Valino, 1991), können diese Reduktionsäquivalente nicht der Atmungskette zugeführt werden. Die Verstärkung des Glukoseabbaus über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg an Stelle des Pentose-Phosphat-Weges, die bei Biotin-limitierten Zellen beobachtet wurde (Ishino et al., 1991; K. Sonntag, persönliche Mitteilung), kann daher als Strategie zur Verminderung der NADPH-Bildung gedeutet werden. NADP-Reduktion durch die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase im Citratzyklus ist jedoch bei aerobem Stoffwechsel nicht zu vermeiden. Die Glutamatbildung durch Glutamat-Dehydrogenase oder Glutamin-Synthetase/Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase würde in dieser Situation die einzige NADPH-verbrauchende Reaktion darstellen. Es wäre denkbar, daß bei Biotin-limitierten Zellen Kohlenstofffluß in den Citratzyklus zu einer schnellen, vollständigen Reduktion des gesamten NADP-Pools führt. Ein hoher Reduktionsgrad des NADPs könnte als Signal zur Aktivierung des Glutamatexportcarriers dienen.

Diese Hypothese konnte jedoch durch Messung des anabolen Reduktionsgrads (NADPH/NADP+NADPH) in Biotin-limitierten Zellen nicht bestätigt werden. Der Reduktionsgrad des NADPs lag in Biotin-limitierten Zellen deutlich niedriger als in wachsenden Zellen (Tab.8). Variationen der Glutamatsekretionsaktivität waren nicht mit entsprechenden Veränderungen des Reduktionsgrads verknüpft (Tab.9). Eine regulatorische Funktion wird dem Reduktionsgrad von NAD oder NADP in einer Reihe von Fällen zugesprochen, in denen es zu einer grundlegenden Veränderung des Stoffwechselmodus eines Bakteriums kommt. Als Beispiele seien hier der Wechsel von der acidogenen zur solventogenen Fermentationsphase bei Clostridien (Grupe und Gottschalk, 1992) und die Veränderungen des Stoffflußes im Zentralstoffwechsel von *Enterococcus faecalis* bei Wechsel von aeroben zu anaeroben Kulturbedingungen genannt (Snoep et al., 1992). Die Regulation der Aktivität eines Carriers durch NAD bzw. NADH wurde bisher nur für das Glukose-Phosphotransferase-System von *Escherichia coli* beschrieben (Dannelly und Roseman, 1992).

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der Carrier-vermittelten Glutamatsekretion Biotin-limitierter Zellen von *Corynebacterium glutamicum* und die Rolle der Sekretion im Stoffwechsel untersucht.

1. Die Glutamatsekretion ist energieabhängig und wird von der Zelle reguliert. Diese Eigenschaften belegen die Beteiligung eines Transportproteins.

2. Glutamat wird als Anion, offensichtlich durch die Aktivität eines primären Transportsystems exportiert. Ein sekundärer Transportmechanismus konnte ausgeschlossen werden. Der elektrochemische Gradient des Glutamatanions dient nicht als Triebkraft des Transports. Kaliumionen oder Protonen werden nicht cotransportiert.

3. Für effiziente Glutamatsekretion müssen zwei Voraussetzungen gegeben sein: (i) eine Wachstumshemmung durch eine Limitation im Baustoffwechsel bei gleichzeitig guter Versorgung mit Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und (ii) ein veränderter Membranstatus. Unter Biotin-Mangel sind beide Voraussetzungen erfüllt. Auch unter Mangelbedingungen, die keinen Effekt auf den Membranstatus haben, erfolgt Glutamatsekretion, jedoch mit geringer Effizienz.

4. Biotin-limitierte Zellen von *C. glutamicum* setzen trotz der Wachstumshemmung die Kohlenstoffquelle mit hoher Rate um. 50 % des Substrats wird zu Glutamat umgewandelt und dieses ausgeschieden. Die Fähigkeit zur vollständigen Oxidation des Substrats ist vermindert.

5. Der Sekretionscarrier wird reguliert. Unter Bedingungen, die zur Verminderung des Kohlenstoffflußes in den Citratzyklus führen, wird der Carrier trotz unverändert hoher intrazellulärer Glutamatkonzentration abgeschaltet. Es konnte gezeigt werden, daß der Reduktionsgrad von NADP oder NAD nicht den regulierenden Parameter darstellt.

6. Im Sinne der Theorie des "overflow"-Metabolismus kann die Glutamatsekretion als Mechanismus interpretiert werden, der es *C. glutamicum* erlaubt, Synthese und Verbrauch von intermediären Metaboliten und Energie zu koordinieren, wenn eine Limitation im Baustoffwechsel das Wachstum verhindert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Ames, G. F.-L. 1988. Structure and mechanism of bacterial periplasmic transport systems. J. Bioenergetics Biomembranes 20:1-18.

Ames, G. F.-L., Nikaido, K., Groarke, J., and J. Petithory. 1989. Reconstitution of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles. J. Biol. Chem. 264: 3998-4002.

Asahi. 1964. Französisches Patent Nr. 1371 926

Bakker, E.P. 1983. pH-dependent transport of rubidium by the constitutive potassium uptake system TrkA of *Escherichia coli* K-12. FEMS Microbiol. Lett. 16:229-233.

Bakker, E.P., Booth, I.R., Dinnbier, U., Epstein, W., and A. Gajewska. 1987. Evidence for multiple K^+-export systems in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169:3743-3749.

Bernofsky, C., and M. Swan. 1973. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. Analytical Biochemistry 53:452-458

Beutler, H. O., und G. Michal. 1974. L-Glutamatbestimmung mit Glutamat-Dehydrogenase, Diaphorase und Tetrazoliumsalzen. In: H. U. Bergmeyer (ed.), Methoden der enzymatischen Analyse, Band II, S. 1753-1759. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.

Bishop, L., Agbayani, R., Ambudkar, S.V., Maloney, P.C., and G. F.-L. Ames. 1989. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6953-6957.

Börmann-El-Kholy, E., Eikmanns, B.J., Gutmann, M., and H. Sahm. 1993. Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. 59:2329-2331.

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

Bröer, S., and R. Krämer. 1991a. Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. I. Identification of a specific carrier system. Eur. J. Biochem. 202:131-135.

Bröer, S., and R. Krämer. 1991b. Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. II. Energetics and mechanism of the transport system. Eur. J. Biochem. 202:136-142.

Burlina, A. 1985. 2-Oxoglutarate. In: Bergmeyer (ed.) Methods of enzymatic analysis, III. Edition, Vol. VII, Chapter 1.3, pp. 20-24. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, FRG.

Clément, Y., Escoffier, B., Trombe, M.C., and G. Lanéelle. 1984. Is Glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. J. Gen. Microbiol. 130:2589-2594.

Clément, Y., and G. Lanéelle. 1986. Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. J. Gen. Microbiol. 132:925-929.

Danelly, H.K., and S. Roseman. (1992) NAD^+ and NADH regulate an ATP-dependent kinase that phosphorylates enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11274-11276.

Demain, A.L., and J. Birnbaum. 1968. Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. Current Topics Microbiol. Immunol. 46:1-25.

Dominguez, H., Nezondet, C., Lindley, N.D., and M. Cocaign. 1993. Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. Biotechnol. Lett. 15:449-454.

Driessen, A.J.M., Hellingwerf, K.J., Konings, W.N. 1987. Mechanism of energy coupling to entry and exit of neutral and branched chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. J. Biol. Chem. 262:12438-12443.

Duperray, F., Jezequel, D., Ghazi, A., Letellier, L., and E. Shechter. 1992. Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. Biochim. Biophys. Acta 1103:250-258.

Ebbighausen, H., Weil, B., and R. Krämer. 1989. Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:184-190.

Ebbighausen, H., Weil, B., and R. Krämer. 1991. Carrier-mediated acetate uptake in *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. 155:505-510.

Epstein, W., Walderhaug, M.O., Polarek, J.W., Hesse, J.E., Dorus, E., and J.M. Daniel. 1990. The bacterial Kdp K^+-ATPase and its relation to other transport ATPases, such as the Na^+/K^+- and Ca^+-ATPases in higher organisms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 326:479-487.

Erdmann, A., Weil, B., and R. Krämer. 1993. Lysine secretion by *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. In Druck.

Fath, M.J., Skvirsky, R.C., and R. Kolter. 1991 Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and *Erwinia* protease. J. Bacteriol. 173:7549-7556.

Gätje, G., Müller, V., and G. Gottschalk. 1991. Lactic acid excretion via carrier-mediated facilitated diffusion in *Lactococcus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:778-782.

Giessen. 1993. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf. Vergleich und Charakterisierung von zwei unterschiedlichen Methoden zur Auslösung der Glutamatsekretion in *Corynebacterium glutamicum*.

Grupe, H., and G. Gottschalk. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. Appl. Environ. Microbiol. 58:3896-3902.

Gutmann, M., Hoischen, C., Krämer, R. 1992. Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. Biochim. Biophys. Acta 1112:115-123.

Hirose, Y., Enai, H., and H. Shibai. 1985. L-Glutamic acid fermentation. In: Moo-Young, M., Blanch, W. H., Drew, S., and I.C. Wang (eds.), Comprehensive Biotechnology, Vol. 3, Chapter 26, pp. 593-600. Pergamon Press. Oxford.

Hoischen, C. 1990. Dissertation, Universität Düsseldorf. Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion in *Corynebacterium glutamicum*.

Hoischen, C., and R. Krämer. 1989. Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. 151:342-347.

Hoischen, C., and R. Krämer. 1990. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 172:3409-3416.

Huchenq, A., Marquet, M., Welby, M., Montrozier, H., Goma, G., and G. Laneelle. 1984. Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 135 B:53-67.

Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., and C.F. Higgins. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature 346:362-365.

Ishino, S., Shimomura, J., Yamaguchi, K., Shirahata, K., and K. Araki. 1991. ^{13}C Nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in L-glutamic acid and L-lysine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. J. Gen. Appl. Microbiol., 37:157-165.

Joshi, A.K., Ahmed, S., and G. F.-L. Ames. 1989. Energy coupling in bacterial periplasmic transport systems. J. Biol. Chem. 264-2126-2133.

Kalnenieks, U.Z., Saulitis, J.B., Galinina, N.I., Liepins, E.E., and J.E. Shvinka. 1989. Protonmotive force in *Brevibacterium flavum*: the lack of intracellular pH homeostasis. Arch. Microbiol. 151:213-219.

Kaneko, M., Yamaguchi, A., and T. Sawai. 1985. Energetics of tetracycline efflux system encoded by Tn*10* in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 193:194-198.

Kase, H., and K. Nakayama. 1972. Production of L-threonine by analog-resistant mutants. Agric. Biol. Chem. 36:1611-1621.

Kashket, E. R. 1985. The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. Ann. Rev. Microbiol. 39:219-242.

Kaur, P., and B.P. Rosen. 1992. Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. Plasmid 27:29-40.

Kikuchi, M., Doi, M., Suzuki, M., and Y. Nakao. 1972. Culture conditions for the production of L-glutamic acid from n-parafins by glycerol auxotroph GL-21. Agric. Biol. Chem. 36:1141-1146.

Kikuchi, M., Kanamaru, T., and Y. Nakao. 1973. Relation between the extracellular accumulation of L-glutamic acid and the excretion of phospholipids by penicillin-treated *Corynebacterium alkanolyticum*. Agr. Biol. Chem. 37:2405-2408.

Kikuchi, M., and Y. Nakao. 1973a. Relation between cellular phospholipids and the excretion of L-glutamic acid by a glycerolauxotroph of *Corynebacterium alkanolyticum*. Agric. Biol. Chem. 37:509-514.

Kikuchi, M., and Y. Nakao. 1973b. Relation between cellular phospholipids and the excretion of L-glutamic acid by a glycerolauxotroph of *Corynebacterium alkanolyticum*. Agric. Biol. Chem. 37:515-519.

Kikuchi, M., and Y. Nakao. 1986. Glutamic acid. In: Aida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Takinami, K., and H. Yamada (eds), Progress in industrial microbiology, Vol. 24, Biotechnology of amino acid production, Chapter 9. Kodanasha LTD, Tokyo; Elsevier, Amsterdam.

Kinoshita, S. 1985. Glutamic acid bacteria. In: Demain, A. and N. Solomon (eds), Biology of industrial microorganisms, Chapter 5, pp. 115-142. The Benjamin/Cummings Publishing Company.

Kinoshita, S., and K. Tanaka. 1972. Glutamic acid. In: Yamada, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T., and K. Aida (eds.), The microbial production of amino acids, Chapter 10, pp. 263-324. Kodansha, Tokyo; John Wiley and Sons, New York.

Kinoshita, S., Udaka, S., and M. Shimono. 1957. Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol., 3:193-205.

Kitano, K., Sugiyama, Y., and T. Kanzaki. 1972. L-glutamate fermentation with acetic acid by an oleic acid requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. J. Ferment. Technol. 50:182-191.

Klingenberg, M., Cox, C. and K. Wulff. 1985. Nicotinamide-adenine dinucleotides and dinucleotide phosphates. In: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., and M. Graßl (eds), Methods of enzymatic analysis, Vol. VII, pp. 251-283. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse.

Klingenberg, M., and E. Pfaff. 1967. Means of terminating reactions. Methods in Enzymology, Vol. X:680-684.

Knowles, J.R. 1989. The mechanism of biotin-dependent enzymes. Annu. Rev. Biochem. 58:195-221.

Konings, W.N. 1985. Generation of metabolic energy by end-product efflux. TIBS 8:317-319.

Konings, W.N., Poolmanm, B., and A.J.M. Driessen. 1992. Can the excretion of metabolites by bacteria be manipulated? FEMS Microbiol. Rev. 88:93-108.

Koo, S., Higgins, C.F., and I.R. Booth. 1991. Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. J. Gen. Microbiol. 137:2617-2625.

Krämer, R., and C. Lambert. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. Eur. J. Biochem. 194:937-944.

Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C., and H. Ebbighausen. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. Eur. J. Biochem. 194:929-935.

Linton, J.D. 1990. The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism. FEMS Microbiol. Rev. 75:1-18.

Linton, J.D., and A.J. Rye. 1989. The relationship between the energetic efficiency in different micro-organisms and the rate and type of metabolite overproduced. J. Industrial Microbiol. 4:85-96.

Lomovskaya, O., and K. Lewis. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8938-8942.

Lundin, A., A. Rickardson, and A. Thore. 1976. Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. Anal. Biochem. 75:611-620.

Malin, G.M., and G.I. Bourd. 1991. Phosphotransferase-dependent glucose transport in *Corynebacterium glutamicum*. J. Appl. Bacteriol. 71:517-523.

Marger, M.D., and M.H. Saier. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. TIBS 18:13-20.

McElhaney, R.N. 1982. Effects of membrane lipids on transport and enzyme activities. Current Topics in Membranes and Transport 17:317-380.

McMorrow, I., Shuman, H.A., Sze, D., Wilson, D.M., and H.T. Wilson. 1989. Sodium/proton antiport is required for growth of *Escherichia coli* at alkaline pH. Biochim. Biophys. Acta 981:21-26.

Melchior, D.L. 1982. Lipid phase transitions and regulation of membrane fluidity in prokaryotes. Current Topics in Membranes and Transport 17:263-316.

Milner, J.L., Vink, B., and J.M. Wood. 1987. Transmembrane amino acid flux in bacterial cells. CRC Critical Rev. Biotechnol. 5:1-47.

Molenaar, D., Bolhuis, H., Abee, T., Poolman, B., and W.N. Konings. 1992. The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 174:3118-3124.

Mulder, M.M., Teixeira de Mattos, M.J., Postma, P.W., and K. Van Dam. 1986. Energetic consequences of multiple K^+ uptake systems in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 851:223-228.

Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., and M. Schaechter. 1990. Physiology of the bacterial cell. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Neijssel, O.M. 1977. The effect of 2,4-Dinitrophenol on the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic cultures. FEMS Letters 1:47-50.

Neijssel, O.M., Buurman, E.T., and M.J. Teixeira de Mattos. 1990. The role of futile cycles in the energetics of bacterial growth. Biochim. Biophys. Acta 1018:252-255.

Neijssel, O.M., and D.W. Tempest. 1975. The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms growing in chemostat culture. Arch. Microbiol. 106:251-258.

Neijssel, O.M., and D.W. Tempest. 1979. The physiology of metabolite overproduction. Microbial Technology. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 29:53-82.

Neijssel, O.M., Teixeira de Mattos, M.J., and D.W. Tempest. 1993. Overproduction of metabolites. In: Rehm, H.-J., and G. Reed (eds), Biotechnology, Vol. 1, Chapter 4, pp. 163-188. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Neubeck, M., Prenner, E., Horvat, P., Bona, R., Hermetter, A., and A. Moser. 1993. Membrane fluidity in glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium* sp. ATCC 13869. Arch. Microbiol. 160:101-107.

Nies, D.H., and S. Silver. 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 171:896-900.

Noji, S., Sato, Y., Suzuki, R., and S. Taniguchi. 1988. Effect of intracellular pH and potassium ions on a primary transport system for glutamate/aspartate in *Streptococcus mutans*. Eur. J. Biochem. 175:491-495.

Nucifora, G., Chu, L., Misra, T.K., and S. Silver. 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3544-3548.

Nunheimer, T.D., Birnbaum, J., Ihnen, E.D., and A.L. Demain. 1970. Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. Appl. Microbiol. 20:215-217.

Oshima, K., Tanaka, K., and S. Kinoshita. 1964. Studies on glutamic acid fermentation. XI. Purification and properties of L-glutamic acid dehydrogenase from *Micrococcus glutamicus*. Agric. Biol. Chem. 28:714-722.

Otto, R., Sonnenberg, A.S.M., Veldkamp, H., and W.N. Konings. 1980. Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5502-5506.

Patek, M., Krumbach, K., Eggeling, L., and H. Sahm. 1993. Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Enzyme activities, structure of *leu A* and effects of *leu A* inactivation on lysine synthesis. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Peters-Wendisch, P.G., Eikmanns, B.J., Thierbach, G., and H. Sahm. 1993. Phospho-enolpyruvat carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. In Druck.

Poolman, B. 1990. Precursor/product antiport in bacteria. Mol. Microbiol. 4:1629-1636.

Poolman, B., Hellingwerf, K.J., and W.N. Konings. 1987. Regulation of the glutamate-glutamine transport system by intracellular pH in *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 169:2272-2276.

Rancourt, D.E., Stephenson, J.T., Vickell, G.A., and J.M. Wood. 1983. Proline excretion by *Escherichia coli* K12. Biotechnol. Bioeng. XXVI:74-80.

Rottenberg, H. 1979. The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. Methods in Enzymology, vol. 55:547-569.

Rouch, D.A., Cram, D.S., DiBerardino, D., Littlejohn, T.G., and R.A. Skurray. 1990. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. Mol. Microbiol. 4:2051-2062.

Russell, N.J. 1984. Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. TIBS 9:108-112.

Schimz, K. L., B. Rütten, and M. Tretter. 1981. Determination of adenosine nucleotides with luciferin/lucifase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyser. Adv. Biotechnol. 1:457-462.

Shiio, I., Momose, H., and A. Oyama. 1969. Genetic and biochemical studies on bacterial formation of L-glutamate. I. Relationship between isocitrate lyase, acetate kinase and phosphate acetyltransferase levels and glutamate production in *Brevibacterium flavum*. J. Gen. Appl. Microbiol. 15:27-40.

Shiio, I., Otsuka, S., and M. Takahashi. 1961. Glutamic acid formation from glucose by bacteria. V. Oxidative metabolism of glucose in *Brevibacterium flavum* No. 2247. J. Biochem 49:398-403.

Shiio, I., Otsuka, S., and M. Takahashi. 1962. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. J. Biochem. 51:56-62.

Shiio, I., Otsuka, S., and T. Tsunoda. 1959. Glutamic acid formation from glucose by bacteria. I. Enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, the Krebs Cycle, and the glyoxylate bypass in cell extracts of *Brevibacterium flavum* No. 2247. J. Biochem. 46:1303-1311.

Shiio, I., Otsuka, S., and T. Tsunoda. 1960. Glutamic acid formation from glucose by bacteria, IV. Carbon dioxide fixation and glutamate formation in *Brevibacterium flavum* No. 2247. J. Biochem. 48:110-120.

Shiio, I., and K. Ujigawa-Takeda. 1980. Presence and regulation of α-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 44:1897-1904.

Silver, S., Nucifora, G., Chu, L., and T.K. Misra. 1989. Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. TIBS 14:76-80.

Snoep, J.L., de Graaf, M.R., Teixeira de Mattos, M.J., and O.M. Neijssel. 1992. Pyruvate catabolism during transient state conditions in chemostat cultures of *Enterococcus faecalis* NCTC 775: importance of internal pyruvate concentrations and $NADH/NAD^+$ ratios. J. Gen. Microbiol. 138:2015-2020.

Solioz, M. 1984. Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. TIBS 9:309-312.

Takinami, K., Yoshii, H., Yamada, Y., Okada, H., and K. Kinoshita. 1968. Control of L-glutamic acid fermentation by biotin and fatty acid. Amino Acid Nucl. Acid 18:120-160.

Tanaka, K., Akita, S., Kimura, K., and S. Kinoshita. 1959. Studies on L-glutamic acid fermentation, Part IV. Amino Acids, 1:62-70.

Teixeira de Mattos, M.J., and D.W. Tempest. 1983. Metabolic and energetic aspects of the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glucose in anaerobic chemostat culture. Arch. Microbiol. 134:80-85.

Tempest, D.W., and O.M. Neijssel. 1987. Growth yield and energy distribution. In: F.C. Neidhardt (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Chapter 52, pp. 797-806. ASM, Washington D.C.

Tempest, D.W., and O.M. Neijssel. 1992. Physiological and energetic aspects of bacterial metabolite overproduction. FEMS Micriobiol. Lett. 100:169-176.

Tochikura, T. 1987. A glutamine synthetase-glutamate synthase system of *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum* and its application. In Neijssel, O.M., van der Meer, R.R., and K.C.A.M. Luyben (eds.), Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology, vol IV, pp. 719-723. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Tosaka, O., Takinami, K., and Y. Hirose. 1978. L-Lysine production by S-(2-aminoethyl)L-cysteine and α-amino-ß-hydroxyvaleric acid resistant mutants of *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. Tokyo 42:745-752.

Valino, J.J. 1991. PhD Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology. Identification of branch-point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network perturbation.

Van Schie, B.J., Hellingwerf, K.J., van Dijken, J.P., Elferink, M.G.L., van Dijl, J.M., Kuenen, J.G., and W.N. Konings. 1985. Energy transduction by electron transfer via a pyrrolo-quinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* and *Acinetobacter calcoaceticus* (var. *lwoffi*). J. Bacteriol. 163:493-499.

Yamaguchi, A., Iwasaki-Ohba, Y., Ono, N., Kaneko-Ohdera, M., and T. Sawai. 1991. Stoichiometry of metal tetracycline/H^+ antiport mediated by transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 282:415-418.

Zittrich, S. 1992. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf. Biochemische und molekulargenetische Untersuchungen zur Isoleucinsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*.

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Krämer für die Überlassung des Themas. Er hat meine Arbeit durch zahlreiche Hilfestellungen und seine stete Bereitschaft zur Diskussion unterstützt und begleitet und so zu ihrem Gelingen maßgeblich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Bei Herrn Dr. C. Hoischen bedanke ich mich für die Einführung in die Arbeitsmethoden.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Eckhard Boles, Angelika Bröer, Stefan Bröer, Holger Ebbighausen, Andreas Erdmann, Thomas Dierks, Stefanie Gießen, Klaus Herick, Camille Lambert, Luigi Palmieri, Norbert Peekhaus, Jutta Ruhrmann, Ruth Siewe, Reiner Stappen, Brita Weil und Stefan Zittrich möchte ich für das gute Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft danken.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2836
November 1993
ISSN 0944-2952