



Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität
anaplerotischer Stoffwechselwege
in *Corynebacterium glutamicum* mittels
¹³C-Markierungstechnik**

Sören Petersen

**Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität
anaplerotischer Stoffwechselwege
in *Corynebacterium glutamicum* mittels
¹³C-Markierungstechnik**

Sören Petersen

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3875
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3875
D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2001)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-52 20 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Kurzfassung der Dissertation von Dipl.-Biotechnol. Sören Petersen

Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität anaplerotischer Stoffwechselwege in *Corynebacterium glutamicum* mittels ^{13}C -Markierungstechnik

Corynebacterium glutamicum wird technisch zur Herstellung der Aminosäure L-Lysin eingesetzt. Oxalacetat, das Vorläufermetabolit der Lysinsynthese ist, wird in *C. glutamicum* durch die anaplerotischen Enzyme Pyruvat-Carboxylase und Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxylase gebildet. Darüber hinaus sind die Enzyme PEP-Carboxykinase, Oxalacetat-Decarboxylase und Malat-Enzyme vorhanden, die Oxalacetat bzw. Malat zu PEP bzw. Pyruvat decarboxylieren. Das Ziel der Dissertation Arbeit war die Quantifizierung der einzelnen anaplerotischen Enzymaktivitäten in *C. glutamicum* und die Untersuchung von deren Regulation *in vivo*.

Es wurde ein neuartiges, auf ^{13}C -NMR-Spektroskopie basierendes Markierungsverfahren zur Quantifizierung der anaplerotischen Metabolitflüsse *in vivo* entwickelt, bei dem der Organismus auf einer Mischung ^{13}C -markierter Glucose-Isotopomere sowie markiertem Lactat kultiviert wurde. Diese Stoffflußanalysen ergaben, daß sowohl im *C. glutamicum*-Wildtyp als auch im Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B beide Carboxylasen *in vivo* aktiv sind, wobei die Pyruvat-Carboxylase das überwiegend aktive Enzym ist.

Ein überraschendes Ergebnis war eine hohe *in vivo* Aktivität der PEP-Carboxykinase in beiden Stämmen von z.T. dem doppelten Betrag des anaplerotischen Nettoflusses. Diese verursacht einen zyklischen Fluß zwischen den Metaboliten PEP/Pyruvat und Oxalacetat, dessen physiologische Funktion möglicherweise in der Regulation der intrazellulären Oxalacetatkonzentration besteht. Auf die Lysinproduktion hat die Aktivität der PEP-Carboxykinase einen eindeutig nachteiligen Einfluß, wie Untersuchungen an Stämmen mit unterschiedlicher Expression des PEP-Carboxykinase-Gens *pck* zeigten. Eine *pck*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* MH20-22B wies eine gegenüber dem Ausgangsstamm um 60% erhöhte Lysinproduktionsrate sowie deutlich erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Oxalacetat, L-Aspartat, α -Ketoglutarat und Pyruvat auf. Überexpression von *pck* hatte entgegengesetzte Effekte.

Die Ergebnisse der Aktivitätsanalysen sowie die *in vivo* gemessenen Metabolitkonzentrationen wurden in ein mathematisches Modell integriert. Mit Hilfe dieses Modells wurden Oxalacetat und α -Ketoglutarat als Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase *in vivo* identifiziert, während L-Aspartat als signifikanter Inhibitor ausgeschlossen wurde. Die Wirkung dieser Metabolite auf die Pyruvat-Carboxylase konnte wegen der Instabilität des Enzyms *in vitro* zuvor nicht untersucht werden. Aus der mathematischen Modellierung ließen sich Ansätze für die weitere Entwicklung lysinproduzierender *C. glutamicum*-Stämme gewinnen: (i) Deletion der PEP-Carboxykinase. (ii) Deregulation der Pyruvat-Carboxylase in bezug auf die Inhibitoren Oxalacetat und α -Ketoglutarat. (iii) Schritte zur Senkung der intrazellulären α -Ketoglutaratkonzentration. Letzteres stellt einen neuartigen Ansatz dar, mit dem sich nicht nur die Hemmung der Pyruvat-Carboxylase verringern, sondern auch das Gleichgewicht der Transaminierung von Oxalacetat zu L-Aspartat zugunsten von Aspartat, d.h. zugunsten der Lysinproduktion, verschieben ließe.

Investigation of anaplerotic pathway activities in *Corynebacterium glutamicum* using ^{13}C labeling techniques.

Corynebacterium glutamicum is an industrially important producer of the amino acid L-lysine. Metabolic precursors of lysine biosynthesis are oxaloacetate and pyruvate. Oxaloacetate itself is synthesized by the anaplerotic enzymes pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase. In addition, *C. glutamicum* possesses the enzymes PEP carboxykinase, oxaloacetate decarboxylase and malic enzyme, which catalyze the decarboxylation of oxaloacetate or malate back to PEP or pyruvate.

To quantify these individual fluxes within the anaplerosis *in vivo*, *C. glutamicum* was grown on a mixture of differently ^{13}C -labeled glucoses and ^{13}C -labeled lactate as a cosubstrate. Experimental ^{13}C labeling patterns of proteinogenic amino acids were used in a computer-based estimation procedure to yield intracellular metabolic fluxes.

The results showed that pyruvate carboxylase is the principal anaplerotic enzyme *in vivo* carrying 70 - 90% of the anaplerotic flux. The results further showed that 40 - 70% of anaplerotically synthesized oxaloacetate was decarboxylated by PEP carboxykinase, constituting an enzymatic substrate cycle involving the metabolites PEP, pyruvate and oxaloacetate. Oxaloacetate decarboxylase and malic enzyme were inactive *in vivo*.

The effect of PEP carboxykinase activity on central metabolism and amino acid production was investigated in mutant strains of L-lysine producing *C. glutamicum* MH20-22B with altered expression of the *pck* gene encoding this enzyme. *pck* deletion resulted in increased intracellular concentrations of oxaloacetate, L-aspartate, α -ketoglutarate, pyruvate and L-lysine, and in a 60% enhanced flux towards L-lysine biosynthesis, whereas *pck* overexpression had opposite effects. Hence, PEP carboxykinase activity has a clearly adverse influence on lysine production.

Intracellular flux and concentration data were combined with enzyme activity measurements to elucidate the *in vivo* regulation of anaplerotic reactions in *C. glutamicum*, and an appropriate mathematical model was developed. By means of this model, oxaloacetate and α -ketoglutarate could be identified as inhibitors of pyruvate carboxylase, whereas aspartate was ruled out as a significant inhibitor under *in vivo* conditions. To date, the effect of these metabolites on the pyruvate carboxylase of *C. glutamicum* could not be determined *in vitro* due to the instability of this enzyme.

Implications for the engineering of amino acid-producing strains are discussed.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	7
2.2 Chemikalien	7
2.3 Medien und Kulturbedingungen	8
2.4 Analytik	11
2.5 Bestimmung von ^{13}C -Markierungsdaten	15
2.5.1 Isolierung von Aminosäuren aus Zellprotein	15
2.5.2 NMR-spektroskopische Messungen	15
2.6 Bestimmung von spezifischen Enzymaktivitäten	16
2.7 Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen	20
3 Ergebnisse	22
3.1 Modellierung der Zusammenhänge zwischen anaplerotischen Stoffflüssen und ^{13}C -Markierungsdaten	22
3.1.1 Wahl der ^{13}C -markierten Substrate	22
3.1.2 Unterscheidung und Quantifizierung der <i>in vivo</i> Aktivitäten von PEP-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase	23
3.1.3 Quantifizierung der <i>in vivo</i> Aktivitäten von PEP-Carboxykinase, Oxalacetat-Decarboxylase und Malat-Enzym	28
3.2 Anaplerotische Stoffflüsse im Wildtyp von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	35
3.3 Anaplerotische Stoffflüsse im Lysinproduzenten <i>Corynebacterium glutamicum</i> MH20-22B	45
3.3.1 Einfluß der Kohlendioxidkonzentration auf die <i>in vivo</i> Aktivitäten der carboxylierenden Enzyme und die Lysinproduktion	45
3.3.2 Einfluß der Wachstumsrate auf die anaplerotischen Enzymaktivitäten und die Lysinproduktion	49

3.4 Stoffwechselanalysen bei Stämmen mit veränderter Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	56
3.5 Bedeutung der PEP-Carboxykinase-Aktivität für die Energetik von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	64
3.6 Modellierung der <i>in vivo</i> Regulation der anaplerotischen Reaktionen in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	69
3.6.1 Kinetische Gleichungen der involvierten Enzyme	69
3.6.2 Berechnung der Oxalacetatkonzentration	75
3.6.3 Bestimmung von Modellparametern aus Teilmodellen	77
3.6.4 Aufbau des Gesamtmodells und Parameteroptimierung	84
3.6.5 Validierung des Gesamtmodells	93
3.6.6 Identifikation von limitierenden Faktoren der Lysinsynthese am Modell ...	95
4 Diskussion	99
5 Zusammenfassung	115
6 Literaturverzeichnis	117
7 Anhang	130
7.1 Computerbasierte Auswertung von ¹³ C-Markierungsdaten und Bestimmung intrazellulärer Stoffflüsse	130
7.2 Vollständige Datensätze der ¹³ C-gestützten Stoffflußanalysen	135
7.3 Zusammenfassung des mathematischen Regulationsmodells der Anaplerosis von <i>C. glutamicum</i> und Computerprogramm zur Berechnung von Stoffflüssen und Metabolitkonzentrationen	146
7.4 Symbolverzeichnis	152

Abkürzungen

Metabolite und Chemikalien

(Ac)CoA	(Acetyl-)Coenzym A
AMP/ADP/ATP	Adenosin-Mono/Di/ Triphosphat
Ala	L-Alanin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-4P	Erythrose-4-phosphat
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
GDP/GTP	Guanosin-Di/Triphosphat
Glc	D-Glucose
Glu	L-Glutamat
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]- piperazin-N'-[2-ethan- sulfonsäure]
IDP/ITP	Inosin-Di/Triphosphat
Lact	L-Lactat
Lys	L-Lysin
NAD(P) ⁺ / NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin- Dinukleotid(phosphat), oxidiert/reduziert
OAA	Oxalacetat
P	Phosphatgruppe
P _i	Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phe	L-Phenylalanin
PPG	Polypropylenglycol
Pyr	Pyruvat
Ser	L-Serin
S-7P	Sedoheptulose-7-phosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
TSP	Natrium-2,2,3,3-D ₄ - trimethylsilylpropionat
Val	L-Valin
α-KG	α-Ketoglutarat

Gene

<i>pck</i>	PEP-Carboxykinase
<i>ppc</i>	PEP-Carboxylase
<i>pyc</i>	Pyruvat-Carboxylase

Enzyme

AAT	L-Aspartat- Aminotransferase
CS	Citrat-Synthase
ICDH	Isocitrat-Dehydrogenase
ME	Malat-Enzym
OAADCx	Oxalacetat-Decarboxylase
PCx	Pyruvat-Carboxylase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PEPCx	PEP-Carboxylase
PEPCK	PEP-Carboxykinase
PK	Pyruvat-Kinase
PTS	Phosphotransferasesystem

sonstige Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
C- <i>i</i>	Kohlenstoffposition <i>i</i>
dd	Doublett von Doubletts
d ₁ /d ₊₁	Doublett der Kopplung zur nächstniedrigeren/ nächsthöheren C-Position
EC	Enzyme Collection
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single- quantum correlation</i>
Inh.	Inhibitor
MCA	<i>Metabolic Control Analysis</i>
n.b.	nicht bestimmt
n.e.	nicht ermittelbar
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
n.n.	nicht nachweisbar
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ppm	<i>parts per million</i>
s	Singulett
ssp.	Subspecies
U	Internationale Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
var.	variabel
1D/2D	ein-/zweidimensional

1 Einleitung

Corynebacterium glutamicum ist der wichtigste Organismus für die biotechnische Herstellung von L-Aminosäuren (Liebl, 1991). Das gram-positive, nicht pathogene Bakterium wurde von Kinoshita *et al.* (1957) als L-Glutamat-Produzent aus Bodenproben isoliert. Unter Biotinmangel scheidet dieser Mikroorganismus große Mengen L-Glutamat aus (Shiio *et al.*, 1962; Gutmann *et al.*, 1992), welches in der Nahrungsmittelindustrie als Geschmacksverstärker Verwendung findet. Durch Mutagenese wurden Stämme für die Produktion weiterer L-Aminosäuren wie Lysin, Threonin, Isoleucin, Tyrosin und Phenylalanin erhalten (Liebl 1991; Leuchtenberger, 1996). Diese für Mensch und Tier essentiellen Aminosäuren haben als Tierfutterzusätze große kommerzielle Bedeutung (Kleemann *et al.* 1985). Als chirale Verbindungen sind sie aber auch als Ausgangsstoffe für Synthesen von Pharmaprodukten von großem Interesse.

Die Produktivität von Aminosäuren der Produzentenstämme konnte durch gezielte genetische Modifikationen (*metabolic design*) weiter verbessert werden (Eikmanns *et al.*, 1993; Sahm *et al.*, 1995; Krämer, 1996). So führte die Überexpression der Gene für eine *feedback*-resistente Aspartat-Kinase und für die Dihydrodipicolinatsynthase zu einer erhöhten Lysinproduktion (Cremer *et al.*, 1990; Eggeling *et al.*, 1998). Auch die Limitation des Lysinexports (Bröer *et al.*, 1993) ließ sich durch Überexpression des Exportergens aufheben (Vrljic *et al.*, 1996).

Neben den Enzymen des Biosyntheseweges besitzt auch der Zentralstoffwechsel einen großen Einfluß auf die Lysinproduktion, da dieser die Vorstufen der Lysinsynthese, Oxalacetat und Pyruvat, sowie Reduktionsäquivalente (NADPH) und Energie (ATP) liefert (Gottschalk, 1986). Bisherige Untersuchungen kamen zu dem Schluß, daß insbesondere die Verfügbarkeit von Aspartat, das durch Transaminierung aus Oxalacetat gebildet wird, für die Lysinproduktion wichtig ist (Menkel *et al.*, 1989; Schruppf, 1991), während Pyruvat, NADPH und ATP als mögliche limitierende Faktoren eine geringere Rolle spielen (Vallino, 1991; Vallino & Stephanopoulos, 1994; Coccagn-Bousquet *et al.*, 1996; Marx, 1997).

Oxalacetat selbst wird in *Corynebacterium glutamicum* aus den C₃-Metaboliten Phosphoenolpyruvat (PEP) oder Pyruvat über anaplerotische Carboxylierungsreaktionen gebildet, die von den Enzymen PEP-Carboxylase bzw. Pyruvat-Carboxylase katalysiert werden (Shiio & Ujigawa, 1978; Eikmanns *et al.*, 1989; Peters-Wendisch *et al.*, 1997). Darüber hinaus besitzt das Bakterium die drei Enzyme PEP-Carboxykinase, Malat-Enzym und Oxalacetat-Decarboxylase, welche die Rückreaktion, d.h. Decarboxylierung von Oxalacetat oder Malat, katalysieren (Jetten & Sinskey, 1993; Jetten & Sinskey, 1995; Coccagn-Bousquet *et al.*, 1996). Die anaplerotischen Reaktionen in *C. glutamicum* sind damit Teil eines komplizierten Netzes aus insgesamt fünf verschiedenen Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen zwischen den Metaboliten PEP, Pyruvat, Oxalacetat und Malat (**Abbildung 1**).

Die PEP-Carboxylase galt bis zum Nachweis der Pyruvat-Carboxylase durch Peters-Wendisch *et al.* (1996 und 1997) als das einzige anaplerotische Enzym in *C. glutamicum* für Wachstum auf Glucose (Ozaki & Shiio, 1969; Mori & Shiio, 1985). Die PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* wird allosterisch durch Aspartat gehemmt und durch Acetyl-CoA aktiviert (Ozaki & Shiio, 1969; Mori & Shiio, 1985). In einem Stamm von *C. glutamicum* ssp. *flavum* mit einer deregulierten Aspartat-Kinase führte eine durch ungerichtete Mutagenese erzielte Aufhebung der Aspartat-Hemmung der PEP-Carboxylase bei gleichzeitig reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität zu einer Steigerung der Lysin-Produktion um 50% (Yokota & Shiio, 1988). Die Überexpression des PEP-Carboxylase-Gens im Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B erhöhte die Lysinausbeute um 10 bis 20% (Cremer *et al.*, 1991).

Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ist offenbar instabil und kann deshalb nicht im Rohextrakt nachgewiesen werden. Peters-Wendisch (1996) gelang der Nachweis dieses Enzyms in permeabilisierten Zellen. Das Enzym ist auf Biotin als Cofaktor angewiesen (Peters-Wendisch, 1996), für das *Corynebacterium glutamicum* auxotroph ist (Kinoshita *et al.*, 1957). Unter Biotinmangel und mit Glucose als Substrat synthetisiert *C. glutamicum* MH20-22B 60% weniger Lysin, was auf eine wichtige Funktion auch der Pyruvat-Carboxylase bei der Bereitstellung von Oxalacetat für die Aminosäureproduktion hinweist (Peters-Wendisch, 1996).

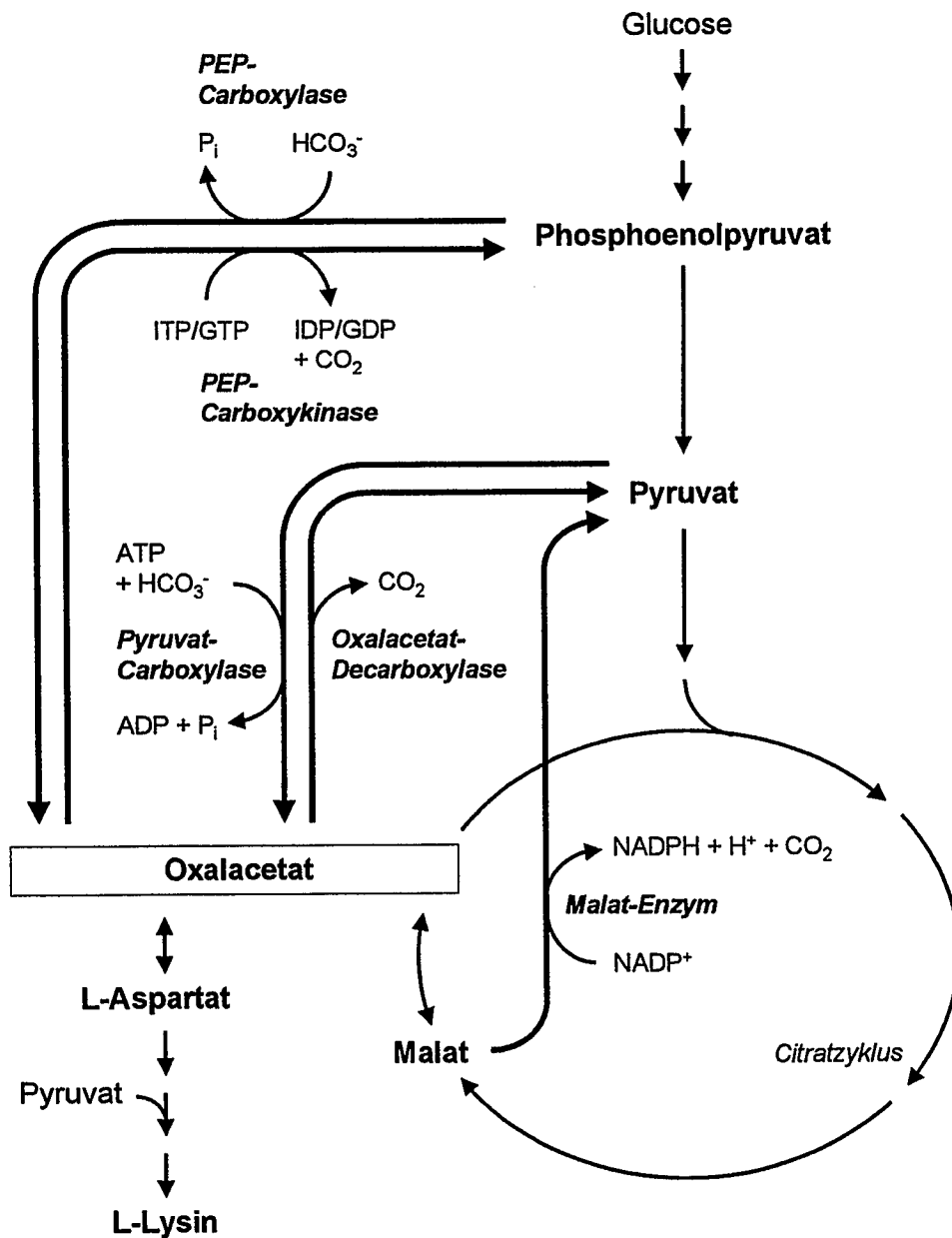


Abbildung 1: Anaplerotische Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen in *Corynebacterium glutamicum*. Carboxylierende (Oxalacetat synthetisierende) Enzyme: Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxylase (EC 4.1.1.31) und Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1). Decarboxylierende Enzyme: PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.32), Oxalacetat-Decarboxylase (EC 4.1.1.3) und Malat-Enzym (EC 1.1.1.40).

Neben den C₃-Carboxylierungen besitzt *C. glutamicum* den Glyoxylatweg mit den Enzymen Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase als weitere anaplerotische Sequenz. Diese Enzyme werden bei Wachstum auf Glucose jedoch praktisch nicht synthetisiert (Reinscheid *et al.*, 1994a und 1994b).

Die in *C. glutamicum* GTP/ITP-abhängige PEP-Carboxykinase decarboxyliert Oxalacetat zu PEP (Jetten & Sinskey, 1993; Peters-Wendisch, 1996). Da in *C. glutamicum* keine PEP-Synthetase-Aktivität, d.h. direkte Bildung von PEP aus Pyruvat, nachgewiesen werden kann, ist die PEP-Carboxykinase nach derzeitigem Erkenntnisstand das einzige der drei C₄-decarboxylierenden Enzyme, das eine gluconeogenetische Funktion besitzt (Peters-Wendisch, 1996).

Das Malat-Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat und ist in *C. glutamicum* strikt NADP⁺-abhängig (Peters-Wendisch, 1996). In Kombination mit Pyruvat-Carboxylase und Malat-Dehydrogenase ergibt sich ein Zyklus, der als Nettoreaktion Reduktionsäquivalente von NADH auf NADP⁺ überträgt, und damit einen Ersatz für die in *C. glutamicum* nicht vorhandene Transhydrogenase (Kinoshita & Tanaka, 1972; Vallino, 1991) darstellt. Nach Coccaign-Bousquet *et al.* (1996) übt das Malat-Enzym diese Funktion vermutlich dann aus, wenn der Fluß durch den oxidativen Pentosephosphatweg nicht ausreicht, um den Bedarf an NADPH zu decken. Dies ist der Fall bei Wachstum auf den Substraten Lactat oder Fructose, da diese nur zu einem geringen Teil über den oxidativen Pentosephosphatweg verstoffwechselt werden (Coccaign-Bousquet & Lindley, 1995; Dominguez *et al.*, 1998), nicht jedoch bei Wachstum auf Glucose (Coccaign-Bousquet *et al.*, 1996).

Die physiologische Bedeutung der Oxalacetat-Decarboxylase von *C. glutamicum* ist noch wenig untersucht. Eine mögliche Funktion des Enzyms besteht in der Generierung von Pyruvat bei Wachstum auf Acetat oder C₄-Substraten (Vallino, 1991; Jetten & Sinskey, 1995).

Eine direkte Bestimmung der von diesen fünf C₃-carboxylierenden bzw. C₄-decarboxylierenden Enzymen katalysierten Stoffflüsse *in vivo* erfolgte bislang nicht. Auf der Technik der Metabolitbilanzierung (Varma & Palsson, 1994) beruhende Stoffflußanalysen von *C. glutamicum* (Vallino & Stephanopoulos, 1990; Vallino, 1991) eigneten sich nicht für die Quantifizierung der anaplerotischen Stoffflüsse, da sich über

diese Verfahren nur der Nettofluß von PEP und Pyruvat nach Oxalacetat ermitteln ließ. Dagegen ist eine Auflösung bidirektionaler Reaktionen, wie sie innerhalb der Anaplerosis von *C. glutamicum* vorliegen, mit Hilfe der ^{13}C -Markierungstechnik prinzipiell möglich (Wiechert & de Graaf, 1997). Bei dieser Technik kommen mit dem stabilen Kohlenstoffisotop ^{13}C markierte Substrate zum Einsatz. Intrazelluläre Stoffflüsse lassen sich anschließend anhand der ^{13}C -Markierungsmuster der beteiligten Metabolite quantifizieren. Sonntag *et al.* (1995) und Marx (1997) zeigten mit Hilfe ^{13}C -gestützter Stoffflußanalysen, daß in *C. glutamicum* während des Wachstums auf Glucose stets die C_3 -carboxylierende und die C_4 -decarboxylierende Richtung innerhalb der Anaplerosis gleichzeitig aktiv sind, allerdings ohne diese Aktivitäten individuellen Enzymen zuordnen zu können. Darüber hinaus wiesen die Arbeiten von Marx *et al.* (1996, 1997 und 1999) auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität anaplerotischer Reaktionen *in vivo* und der Lysinausbeute hin. Insbesondere korrelierte dabei eine hohe Lysinausbeute mit einem geringen C_4 -Decarboxylierungsfluß und umgekehrt (Abbildung 2).

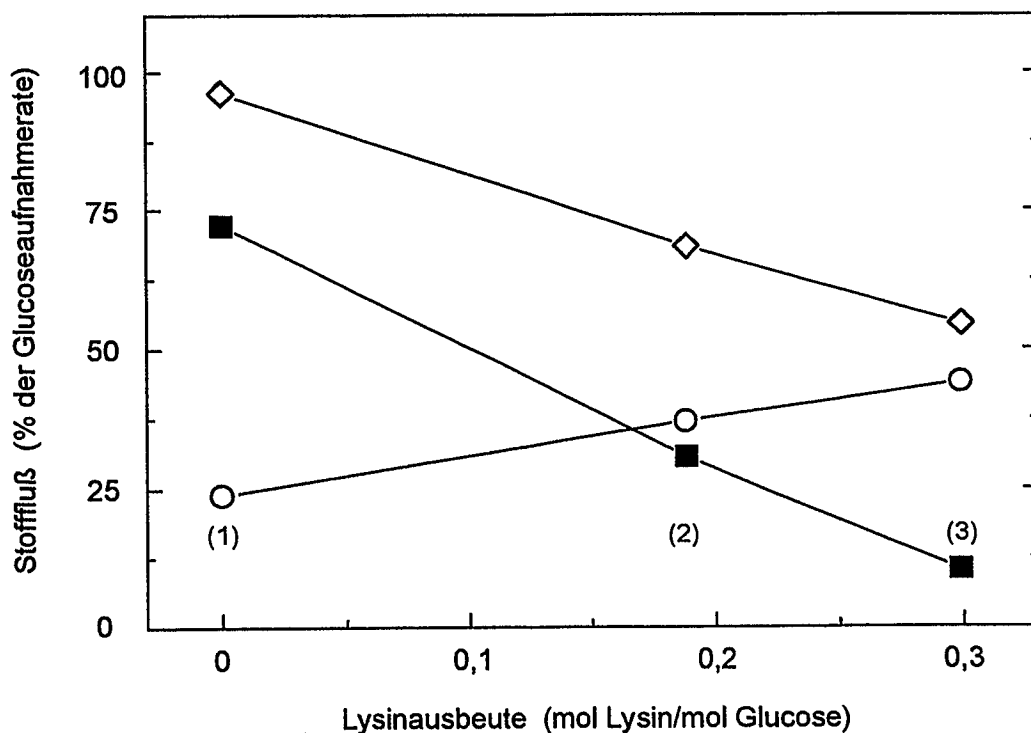


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen anaplerotischen Stoffflüssen und Lysinausbeute nach Marx *et al.* (1996, 1997 und 1999). Stoffflüsse: $\diamond$ C_3 -Carboxylierung; $\blacksquare$ C_4 -Decarboxylierung; $\circ$ anaplerotischer Nettofluß. Stämme: (1) *C. glutamicum* LE4; (2) *C. glutamicum* MH20-22B; (3) *C. glutamicum* MH20-22B $\Delta\text{gdh}(\text{NADP})$ pEK::*gdh*(NADP).

Während die vorgenannten Arbeiten ausschließlich die ^{13}C -Anreicherungsgrade einzelner Kohlenstoffpositionen als Markierungsinformationen nutzten, besteht auch die Möglichkeit, die als ^{13}C -Markierungsmuster in ganzen Molekülen bzw. Molekülfragmenten enthaltene Information als Grundlage für Stoffflußbestimmungen zu verwenden (Szyperski, 1995). Mit dieser sogenannten Isotopomerenanalyse waren Sauer *et al.* (1997) imstande, die *in vivo* Aktivitäten von PEP-Carboxykinase und Malat-Enzym in *Bacillus subtilis* abzuschätzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Quantifizierung der individuellen Flüsse innerhalb der Anaplerosis von *Corynebacterium glutamicum in vivo*. Zu diesem Zweck wurde ein ^{13}C -Markierungsverfahren entwickelt, das die vorhandenen Techniken der Analyse von ^{13}C -Anreicherungsgraden und der ^{13}C -Isotopomerenanalyse in einem Ansatz vereint. Die Bestimmung der Markierungsdaten erfolgte mittels NMR-Spektroskopie.

Mit Hilfe der Stoffflußanalysen sollte aufgeklärt werden, welches anaplerotische Enzym *in vivo* welchen Anteil zur Synthese von Oxalacetat beiträgt, welches Enzym *in vivo* die C_4 -Decarboxylierung katalysiert, und ob es in der Flußverteilung Unterschiede zwischen dem Wildtyp und einem Lysinproduzenten gibt. Nach Identifikation der *in vivo* aktiven decarboxylierenden Reaktion sollten anhand von Stämmen mit veränderten Aktivitäten des entsprechenden Enzyms die Fragen beantwortet werden, wie diese Rückreaktion, die stets auch einen Energieverlust (*futile cycling*) bedeutet, die Verfügbarkeit von Oxalacetat beeinflußt, und welche Auswirkungen dies auf die Lysinsynthese hat. Außerdem wurde dem bisher kaum untersuchten Einfluß der Hydrogencarbonat- bzw. CO_2 -Konzentration auf die anaplerotischen Aktivitäten nachgegangen. Zur Erstellung eines Modells der Regulation der anaplerotischen Reaktionen *in vivo* wurden neben den Stoffflüssen auch spezifische Enzymaktivitäten und intrazelluläre Metabolitkonzentrationen bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *Corynebacterium glutamicum*-Stämme und Plasmide sind mit ihren relevanten Eigenschaften in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tabelle 1: *Corynebacterium glutamicum*-Stämme und Plasmide.

	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>Stämme</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	American Type Culture Collection (ATCC)
MH20-22B	Lysin-Produzent, <i>lysC_{FBR}</i> , <i>leuCD</i>	Schrumpf <i>et al.</i> (1992)
MH20-22B Δpck 20	<i>pck</i> -Defektmutante von MH20-22B	C. Riedel, Universität Ulm (1999)
<i>Plasmide</i>		
pEK0	<i>C. glutamicum</i> / <i>Escherichia coli</i> -Pendel- und Expressionsvektor, Km ^r , <i>ori</i> pBL1, <i>ori</i> colE1	Eikmanns <i>et al.</i> (1991)
pEK0- <i>pck</i> B	pEK0 mit <i>pck</i> -Gen (PEP-Carboxykinase) aus <i>C. glutamicum</i>	D. Rittmann, Forschungszentrum Jülich (1998)

2.2 Chemikalien

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien sind im Folgenden aufgelistet. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Biomol, Hamburg: ADP; NADH; NADP⁺

Boehringer Mannheim: Dithiothreitol (DTT); Ethylendiamintetraacetat (EDTA); L-Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3); L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27); L-Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37); Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40)

Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts, USA: [1-¹³C]Glucose (99% isotopische Anreicherung); [¹³C₆]Glucose (> 98% isotopische Anreicherung)

Deutero, Kastellaun: Deuteriumoxid (99,98%)

Difco, Detroit, Michigan, USA: Brain-Heart-Infusion-Medium

Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich: L-[3-¹³C]Lactat (Natriumsalz, 99% isotopische Anreicherung)

Fisher Scientific, Loughborough, UK: Methanol

Fluka, Buchs, Schweiz: Polypropylenglycol P1200

Sigma-Aldrich, Deisenhofen: Acetyl-Coenzym A; Acetylpyridin-Adenin-Dinukleotid (APAD); Biotin; Glutamat (Ammoniumsalz); IDP; Kanamycin-Monosulfat; Phosphoenolpyruvat (PEP, Kaliumsalz); Pyruvat (Natriumsalz); Rinderserumalbumin; Triethylamin; 2,2,3,3-D₄-trimethylsilylpropionat (TSP, Natriumsalz)

2.3 Medien und Kulturbedingungen

Vorkultur. Alle Stämme wurden in je 100 ml 3,7% Brain-Heart-Infusion-Komplexmedium mit 20 g/l Glucose, bei *C. glutamicum* MH20-22B pEK0 und MH20-22B pEK0-*pck* B zusätzlich mit 25 mg/l Kanamycin-Monosulfat (Eikmanns *et al.*, 1991), in 500 ml-Schikanenkolben bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von mindestens 10 vorkultiviert. Zur Gewinnung des Inokulums für die Hauptkultur wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4000 g, 4 °C) und zweimal in Puffer mit 50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris·HCl) und 50 mM NaCl, pH 6,8 gewaschen.

Hauptkultur. Die Stoffflußanalysen und Metabolitpoolbestimmungen erfolgten in Bakterien, die in kontinuierlicher Kultur unter Kohlenstofflimitation in einem KLF 2000-Bioreaktor (Bioengineering, Wald, Schweiz) gezüchtet wurden. Das Bioreaktorsystem war mit einem Dosierautomaten YFC 01Z (Sartorius, Göttingen) für die Mediumszufuhr ausgestattet. Das verwendete Minimalmedium (Tabelle 2) basierte auf Weuster-Botz *et al.* (1997). Die Kohlenstoffquelle (Glucose mit L-Lactat als Cosubstrat) bestand aus entweder unmarkierten Verbindungen oder zur ^{13}C -Markierung aus einer Mischung aus 4,2 mM [$1\text{-}^{13}\text{C}$]Glucose, 2,1 mM [$^{13}\text{C}_6$]Glucose und 14,7 mM unmarkierter Glucose sowie 4 mM Natrium-L-[$3\text{-}^{13}\text{C}$]Lactat. In einem Fall (Punkt 3.3.2) wurden die doppelten Konzentrationen der unmarkierten Substrate Glucose (42 mM) und L-Lactat (8 mM) eingesetzt, um bei der geringen Durchflußrate von $0,025\text{ h}^{-1}$ die spezifischen Stoffwechselraten besser bestimmen zu können.

Der pH-Wert wurde durch automatische Dosierung von 2 N NaOH auf 6,8 konstant gehalten. Das Kulturvolumen betrug 600 ml und wurde mittels Waage und Abflußpumpe geregelt. Für alle Flüssigkeitsbewegungen wurden Schlauchpumpen 101U (Watson-Marlow, Falmouth, UK) verwendet. Die Kultivierungstemperatur betrug $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Belüftung erfolgte mit synthetischer Luft (80% N_2 und 20% O_2) und einer Rate von 46 l/h ($1,28\text{ l/l}\cdot\text{min}$), bezogen auf Normbedingungen ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 1 bar). Für die Stoffflußanalyse bei erhöhtem Kohlendioxidpartialdruck (Punkt 3.3.1) wurden der Zuluft außerdem noch 5% CO_2 zugemischt. Der Absolutdruck im Bioreaktor betrug ca. 1100 mbar.

Das Inokulum mit gewaschenen Zellen aus der Vorkultur wurde stets so bemessen, daß die optische Dichte im Bioreaktor zu Beginn der Kultivierung bei etwa 1 lag. Nach der Anwuchsphase im *batch*-Betrieb bis zum Verbrauch des vorgelegten, unmarkierten Substrats wurde der kontinuierliche Chemostat-Betrieb mit der gewünschten Durchflußrate des zunächst ebenfalls noch unmarkierten Mediums gestartet. Nach Stabilisierung (*steady-state*) der optischen Dichte, der CO_2 -Produktionsrate und bei den Lysin produzierenden Stämmen auch der Lysinproduktionsrate über mindestens drei Verweilzeiten wurde mit den Probenahmen für die Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten und intrazellulärer Metabolite begonnen. Für ^{13}C -Markierungsexperimente wurde das unmarkierte Substrat durch die oben beschriebene Markierungsmischung ersetzt und die Kultivierung über drei Verweilzeiten fortgesetzt. Die so markierte Biomasse wurde anschließend geerntet,

zweimal gewaschen, gefriergetrocknet und zur Bestimmung der ^{13}C -Markierungsdaten wie in Abschnitt 2.5 beschrieben aufgearbeitet.

Neben der Erfassung von pH und Kulturvolumen wurden zwei weitere Parameter *online* gemessen:

Sauerstoffpartialdruck in der Kulturflüssigkeit. Der O_2 -Partialdruck wurde mit einer amperometrischen Elektrode (Mettler-Toledo, Steinbach) bestimmt.

Kohlendioxidgehalt der Abluft. Die Konzentrationen von $^{12}\text{CO}_2$ und $^{13}\text{CO}_2$ in der Abluft des Bioreaktors wurden mit Hilfe einer COI-Abgasanalytik (Fischer Analysen, Leipzig) getrennt erfaßt.

Tabelle 2: Medium für Hauptkulturen.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	g/l	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	130	$\mu\text{g/l}$
K_2HPO_4	0,5	g/l	$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	43	$\mu\text{g/l}$
KH_2PO_4	0,5	g/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	65	$\mu\text{g/l}$
NaCl	0,5	g/l	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	28	$\mu\text{g/l}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,285	g/l	$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	20	$\mu\text{g/l}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05	g/l	H_3BO_3	50	$\mu\text{g/l}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	28,5	mg/l	Biotin	850	$\mu\text{g/l}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	11,2	mg/l	L-Leucin ¹	1,3	g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	6,3	mg/l	$\text{EDTA} \cdot 2 \text{Na} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1	g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,76	mg/l	PPG P1200	0,02	% (v/v)
Glucose ²	21	mM	Kanamycin-Monosulfat ³	25	mg/l
Natrium-L-Lactat ²	4	mM	pH ad 6,8 mit NaOH		

¹ nicht bei *C. glutamicum* ATCC 13032.

² ^{13}C -Markierung der Kohlenstoffquellen siehe Text.

³ nur bei *C. glutamicum* MH20-22B pEK0 und MH20-22B pEK0-*pck* B.

Abkürzungen: EDTA, Ethylendiamintetraacetat; PPG, Polypropylenglycol.

2.4 Analytik

Die Bestimmung der folgenden Parameter erfolgte *offline* nach Probenahme aus dem Bioreaktor:

Biomassekonzentration. Die Bestimmung der optische Dichten der Kultur wurde mit einem Spektrophotometer UV 160A (Shimadzu, Tokyo, Japan) bei 600 nm durchgeführt. Die Proben wurden zuvor so verdünnt, daß die gemessene optische Dichte zwischen 0,1 und 0,3 lag. Zur Trockengewichtsbestimmung wurden die Zellen aus 10 ml Kulturflüssigkeit abzentrifugiert (5 min, 4000 g), zweimal mit 20 mM Ammoniumacetat gewaschen und gefriergetrocknet. Es ergab sich ein konstantes Verhältnis von 0,30 g/l Trockengewicht je Einheit der optischen Dichte, so daß die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) als Maß für die Biomassekonzentration verwendet werden konnte.

Glucose, Lactat und Ammonium. Die Glucose- Lactat- und Ammoniumkonzentrationen im Kulturüberstand wurden mit enzymatischen Tests (Boehringer Mannheim) bestimmt (Kunst *et al.*, 1984; Noll, 1984; Bergmeyer & Beutler, 1985).

Aminosäuren. Die Aminosäuren im Kulturüberstand wurden mittels *reversed-phase*-HPLC bestimmt (Lindroth & Mopper, 1979; Jones & Gilligan, 1983). Dazu wurden 2,5 µl der entsprechend verdünnten Probe mit ortho-Phthaldialdehyd in einer computergesteuerten HPLC-Anlage HP 1090A (Hewlett-Packard, Waldbronn) derivatisiert und anschließend auf einer ODS-5µ-C₁₈-Kieselgelsäule (Chromatographie-Service, Langerwehe) bei 40 °C getrennt. Für die Elution wurde ein Gradient aus 80% bis 20% 0,1 M Natriumacetat, pH 7,2, und Methanol (*ad* 100%) mit einer Durchflußrate von 0,55 ml/min verwendet (Wendisch, 1997). Die Detektion der fluoreszierenden Aminosäure-Derivate erfolgte bei 243 nm Anregungs- und 436 nm Emissionswellenlänge.

Nebenprodukte. Zum Nachweis von Nebenprodukten wurden je 25 ml Kulturüberstand lyophilisiert, in 700 µl Deuteriumoxid mit 2 mM Natrium-2,2,3,3-D₄-trimethylsilylpropionat (TSP) aufgenommen und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert.

Kohlenstoffgehalt der Biomasse. Der Gesamtkohlenstoffgehalt der gefriergetrockneten Biomasse wurde durch das Zentrallabor für chemische Analysen des Forschungszentrums Jülich mit einem Element-Analysator CHNS 932 (Leco, St. Joseph, Michigan, USA) bestimmt.

Bestimmung der Kohlendioxidkonzentration in der Kulturflüssigkeit

Da es sich bei den anaplerotischen Carboxylierungen um Hydrogencarbonat fixierende Reaktionen handelt (Scrutton & Young, 1972), wobei Hydrogencarbonat im Gleichgewicht mit gelöstem Kohlendioxid steht, waren die Einstellung und Bestimmung der Hydrogencarbonatkonzentration bzw. des CO₂-Partialdrucks in der Kulturflüssigkeit von besonderem Interesse. Darüber hinaus war die Kenntnis dieser Werte für eine korrekte Kohlenstoffbilanz des Kultivierungsprozesses notwendig (Zeng, 1995).

Da eine Messung nach Probenahme problematisch war, denn der Stoffwechsel der Zellen produzierte zunächst weiter CO₂ und verschob damit unmittelbar das Gleichgewicht, und der verwendete Bioreaktor keine CO₂-Sonde besaß, wurde wie nachstehend beschrieben die Konzentration gelösten Kohlendioxids aus den *online* verfügbaren Daten der Abgasanalyse und der Rührerdrehzahl bestimmt. Dabei wurde während einer Chemostat-Kultivierung stufenweise die Drehzahl des Rührers erhöht und mit Hilfe der Abgasanalyse die Menge des aus der Flüssigphase ausgetriebenen Kohlendioxids erfaßt (**Abbildung 3A**).

Für jeden Schritt der Drehzahlerhöhung wurde die Änderung des CO₂-Partialdrucks in der Kulturflüssigkeit $\Delta p_{\text{CO}_2(l)}$ berechnet:

$$\Delta p_{\text{CO}_2(l)} = - \frac{F_g}{V_g} \cdot \frac{H_{\text{CO}_2}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{\text{aCO}_2}}} \cdot \text{Int}_{\text{CO}_2} = - 0,47 \frac{\text{bar}}{\text{min}} \cdot \text{Int}_{\text{CO}_2} \quad (1)$$

Dabei ist H_{CO_2} die Henry-Konstante für Kohlendioxid von 34 mbar/mM (Schumpe *et al.*, 1982). pK_{aCO_2} ist der pK_a -Wert der Dissoziation von wässrig gelöstem CO₂ in HCO₃⁻ und H⁺ von 6,3 (Bailey & Ollis, 1986). F_g ist die Belüftungsrate des Biorektors (1,28 l/l·min), und V_g ist das Normvolumen von 22,4 l/mol (Mirow, 1991). Int_{CO_2} ist das Integral der über die *steady-state*-Produktion hinausgehenden Kohlendioxidmenge (in ppm·min) in der Abgasanalyse als Maß für die aus der Flüssigphase ausgetriebene Kohlendioxidmenge (schraffierte Flächen in **Abbildung 3A**). Während der Ausgasungsprozedur wurde der pH

konstant auf 6,8 gehalten, so daß das ausgetriebene Kohlendioxid stets anteilig aus gelöstem CO_2 und HCO_3^- stammte; dies wurde in Gleichung (1) berücksichtigt.

Um aus den Partialdruckänderungen den Partialdruck selbst berechnen zu können, wurden der Literatur folgende Proportionalitätsbeziehungen zwischen der Partialdruckdifferenz über die Phasengrenze $p_{\text{CO}_2(\text{l})} - p_{\text{CO}_2(\text{g})}$, der Rate des CO_2 -Transports r_{CO_2} , dem Stofftransportkoeffizienten k_1a , dem Leistungseintrag durch den Rührer P sowie der Drehzahl rpm entnommen:

$$p_{\text{CO}_2(\text{l})} - p_{\text{CO}_2(\text{g})} \propto \frac{r_{\text{CO}_2}}{k_1a} \quad (\text{Bailey \& Ollis, 1986}) \quad (2)$$

$$k_1a \propto P \quad (\text{Robinson \& Wilke, 1973}) \quad (3)$$

$$P \propto \text{rpm}^n \quad \text{mit } n \approx 3 \quad (\text{Rushton et al., 1950}) \quad (4)$$

r_{CO_2} ist bei konstanter Belüftungsrate proportional zum CO_2 -Gehalt der Abluft $p_{\text{CO}_2(\text{g})}$, so daß die Beziehungen (2) bis (4) zu folgender Gleichung zusammengefaßt werden konnten:

$$p_{\text{CO}_2(\text{l})} - p_{\text{CO}_2(\text{g})} = \text{const.} \cdot p_{\text{CO}_2(\text{g})} \cdot \text{rpm}^{-n} \quad (5)$$

Auf $p_{\text{CO}_2(\text{g})}$ normiert und logarithmiert ist diese Beziehung linear:

$$\log [p_{\text{CO}_2(\text{l})}/p_{\text{CO}_2(\text{g})} - 1] = \log [\text{const.}] - n \cdot \log [\text{rpm}] \quad (6)$$

Integration der experimentell ermittelten Werte von $\Delta p_{\text{CO}_2(\text{l})}/\Delta \text{rpm}$ über die Drehzahl mit der Randbedingung der theoretisch vollständigen Gleichgewichtseinstellung $p_{\text{CO}_2(\text{l})} = p_{\text{CO}_2(\text{g})}$ bei $\text{rpm} \rightarrow \infty$ ergab daraufhin die gesuchte Funktion nach Gleichung (5). In **Abbildung 3B** ist das Ergebnis für die in dieser Arbeit benutzten Parameter in der logarithmierten Form nach Gleichung (6) dargestellt. Für den gesamten untersuchten Drehzahlbereich von 500 bis zum Maximum von 3000 min^{-1} wies das System die Linearität nach Gleichung (6) auf. Für n wurde der Wert 2,9 und für $\log [\text{const.}]$ der Wert 8,62 ermittelt.

Aus dieser Beziehung ließen sich nicht nur die CO_2 - und HCO_3^- -Konzentrationen in der Kulturflüssigkeit berechnen, ohne dazu jedes Mal die Ausgasungsprozedur wiederholen zu müssen, sondern der CO_2 -Partialdruck im *steady state* konnte auch, mit Ausnahme des Experiments bei 60 mbar CO_2 (Punkt 3.3.1), über Anpassung der Drehzahl auf einen gewünschten Wert eingestellt werden. Wegen der ^{13}C -Markierungstechnik war diese Möglichkeit von Vorteil gegenüber der CO_2 -Zumischung zur Zuluft.

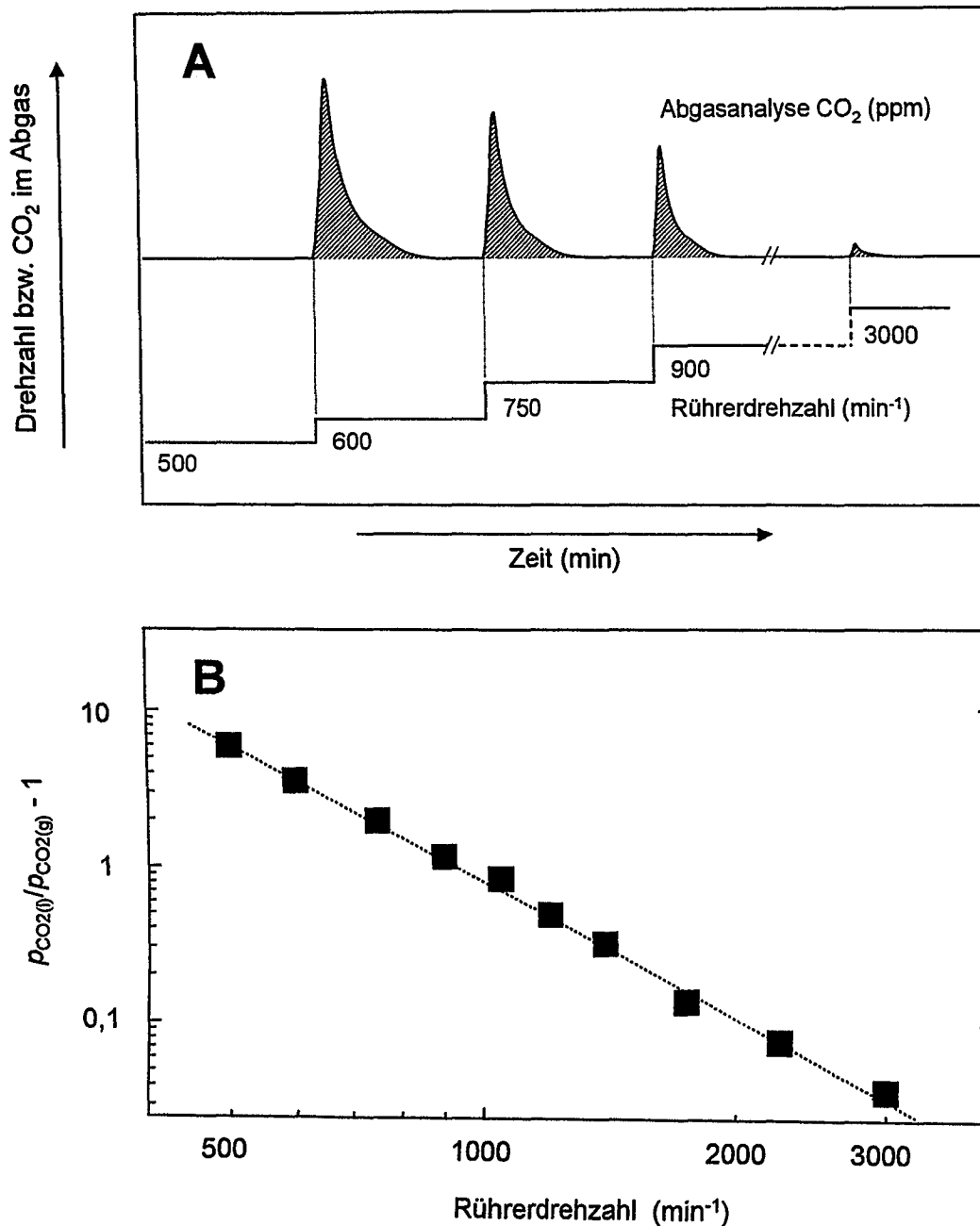


Abbildung 3: **A** Schematische Darstellung des Prinzips der CO₂-Bestimmung. Die schraffierten Flächen stellen die CO₂-Mengen dar, die jeweils als Folge der Erhöhung der Rührerdrehzahl aus der Kulturflüssigkeit ausgetrieben wurden. **B** Auftragung der normierten Kohlendioxid-Partialdruckdifferenz zwischen Kulturflüssigkeit und Abluft des Bioreaktors ($p_{\text{CO}_2(l)}/p_{\text{CO}_2(g)} - 1$) gegen die Rührerdrehzahl.

2.5 Bestimmung von ^{13}C -Markierungsdaten

Die Umsetzung der ^{13}C -markierten Substrate zu Intermediaten des Zentralstoffwechsels und weiter zu markierten Aminosäuren des Zellproteins bildete die Grundlage der intrazellulären Stoffflußanalysen. Um die ^{13}C -Markierungsmuster proteinogener Aminosäuren zu bestimmen, wurden diese aus markierter Biomasse isoliert und anschließend NMR-spektroskopisch vermessen.

2.5.1 Isolierung von Aminosäuren aus Zellprotein

250 mg lyophilisierter Biomasse wurden in 12 ml 6,0 N HCl aufgenommen und bei 105 °C über 12 Stunden hydrolysiert (Marx, 1997). Das Hydrolysat wurde mit 20 ml Wasser verdünnt und filtriert. 15 ml Hydrolysat wurden lyophilisiert und in 2 mL 0,2 M Triethylamin/Formiat-Puffer, pH 3,0 aufgenommen. Die präparative Trennung der Aminosäuren erfolgte über Kationen-Austauschchromatographie (Sonntag *et al.*, 1993; Marx *et al.*, 1996) auf einer Ultrapac 11 μ -Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg) mit einem FPLC-System (Sykam, Gilching). Als Eluent wurde 0,2 M Triethylamin/Formiat-Puffer mit einem von pH 3,0 auf pH 10,5 ansteigenden pH-Gradienten verwendet. Es wurden 0,8 ml-Fractionen gesammelt und diese mittels HPLC auf die enthaltenen Aminosäuren hin untersucht. Die Fractionen mit den Aminosäuren Alanin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Lysin, Phenylalanin, Serin, Threonin und Valin wurden nach Zusatz von 1 ml 25% Ammoniaklösung lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in je 700 μ l Deuteriumoxid mit 2 mM Natrium-2,2,3,3- D_4 -trimethylsilylpropionat (TSP) aufgenommen und in 5 mm NMR-Proberöhrchen überführt. Für 2D-NMR-Messungen wurden 15 ml Biomassehydrolysat lyophilisiert und ohne chromatographische Trennung in 700 μ l D_2O mit 2 mM TSP aufgenommen.

2.5.2 NMR-spektroskopische Messungen

Die NMR-Messungen wurden mit einem AMX400-WB-NMR-Spektrometersystem (Bruker Analytik, Karlsruhe) durchgeführt. Die ^{13}C -Anreicherungen einzelner Kohlenstoffatome wurden mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt (Sonntag *et al.*, 1993;

Tabelle 17: Experimentell bestimmte PEP- und Aspartatkonzentrationen sowie v_{PEPCx} , $v_{PEPCx,max}$, v_{PK} und $v_{PK,max}$ mit den daraus berechneten Werten von f_{PEP} ([Asp]).

Größe in Gleichungen (37) bzw. (41)	<i>C. glutamicum</i> -Stamm und Wachstumsrate			
	MH20-22B $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	MH20-22B $\Delta pck 20$ $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	MH20-22B pEK0- <i>pck B</i> $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	MH20-22B $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
[PEP] (mM)	$0,33 \pm 0,19$	$0,20 \pm 0,18$	$0,27 \pm 0,22$	$< 0,17$
[Asp] (mM)	$0,64 \pm 0,08$	$1,45 \pm 0,11$	$0,61 \pm 0,13$	$1,28 \pm 0,27$
v_{PEPCx} (mmol $\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$0,69 \pm 0,14$	$0,14 \pm 0,06$	$2,13 \pm 0,36$	$0,56 \pm 0,14$
$v_{PEPCx,max}$ (mmol $\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$3,8 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,8$	$4,2 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,6$
v_{PK} (mmol $\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$1,43 \pm 0,14$	$0,50 \pm 0,11$	$1,24 \pm 0,12$	$1,71 \pm 0,24$
$v_{PK,max}$ (mmol $\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$7,5 \pm 1,9$	$6,6 \pm 1,7$	$2,6 \pm 0,5$	$5,7 \pm 1,3$
f_{PEP} ([Asp]) (-)	$0,41 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,11$	$0,22 \pm 0,04$

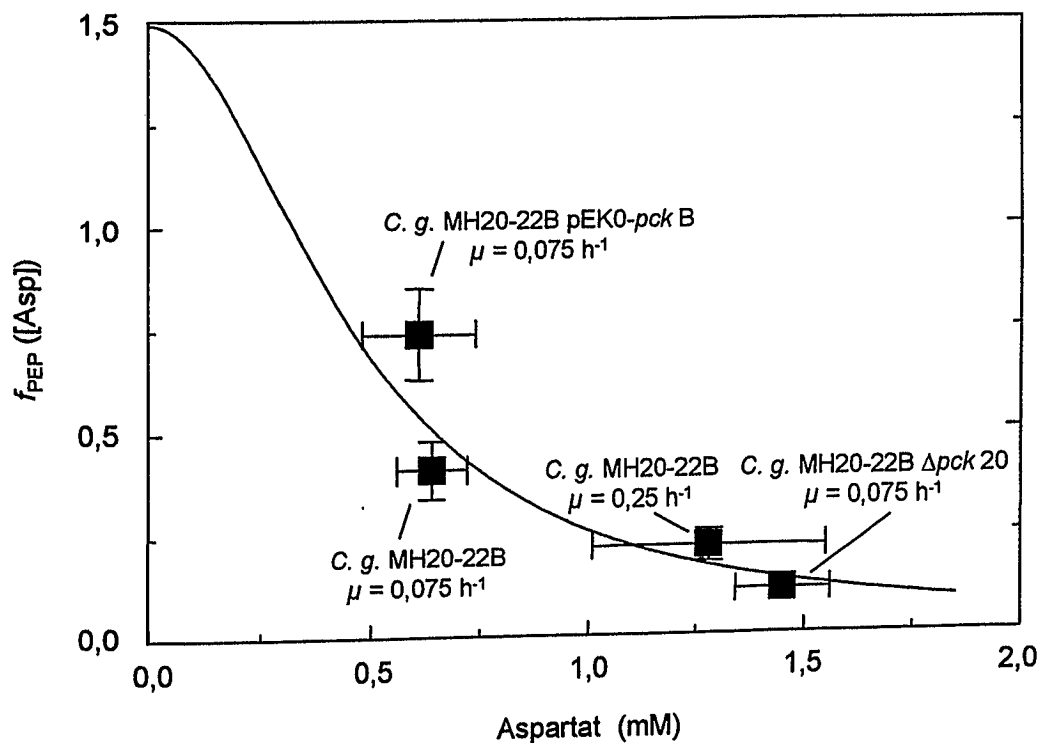


Abbildung 21: f_{PEP} ([Asp]) aus Gleichung (41). ■ Experimentelle Werte aus $v_{PEPCx}/v_{PEPCx,max}$ und $v_{PK}/v_{PK,max}$. Linie: angepaßte Funktion $I_{Asp,PEPCx} \cdot k_{PEP}$.

Pyruvat-Carboxylase. Aspartat, α -Ketoglutarat und Oxalacetat sind mögliche Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum*, deren Einflüsse bislang nicht untersucht werden konnten, da diese Metabolite selbst Teil des Testsystems zur Messung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität mit permeabilisierten Zellen waren (Peters-Wendisch, 1996). Ziel war es, mit den Daten der vorliegenden Arbeit, den Einfluß dieser Metabolite auf die Pyruvat-Carboxylase *in vivo* zu untersuchen.

Dazu wurde die Geschwindigkeitsgleichung (28) der Pyruvat-Carboxylase wie folgt umgeformt:

$$v_{PCx} = \frac{v'_{PCx, \max}}{1 + \frac{K_{mPyr, PCx}}{[Pyr]}} \cdot I_{PCx}([Inh.]) \quad (43)$$

$$\text{mit } v'_{PCx, \max} = v_{PCx, \max} \cdot f_{PCx}([ATP], [ADP], [AMP], [HCO_3^-], [AcCoA]) = \text{const.} \quad (44)$$

Um den Inhibitionsterm $I_{PCx}([Inh.])$ bestimmen zu können, wurden die *in vivo* Flüsse über die Pyruvat-Carboxylase (v_{PCx}) mit Hilfe der gemessenen Pyruvatkonzentrationen (vgl. Abbildungen 12, 13, 15 und 16) und des bekannten Werts $K_{mPyr, PCx} = 1,3 \text{ mM}$ (Peters-Wendisch, 1996) auf Pyruvatsättigung des Enzyms extrapoliert:

$$I_{PCx}([Inh.]) = \frac{v_{PCx}^*}{v'_{PCx, \max}} = \frac{v_{PCx}}{v'_{PCx, \max}} \cdot \left(1 + \frac{K_{mPyr, PCx}}{[Pyr]} \right) \quad (45)$$

Die Auftragung von $1/v_{PCx}^*$ gegen die gemessenen Konzentrationen von Aspartat und α -Ketoglutarat (Tabellen 11 und 14) sowie die geschätzte Oxalacetatkonzentration ("Dixon-Plots"; Segel, 1975) ist in **Abbildung 22** gezeigt.

Wie aus **Abbildung 22** ersichtlich ist, wiesen nur die Konzentrationen von Oxalacetat und weniger stark α -Ketoglutarat eine systematische Korrelation mit dem extrapolierten Pyruvat-Carboxylase-Fluß v_{PCx}^* auf.

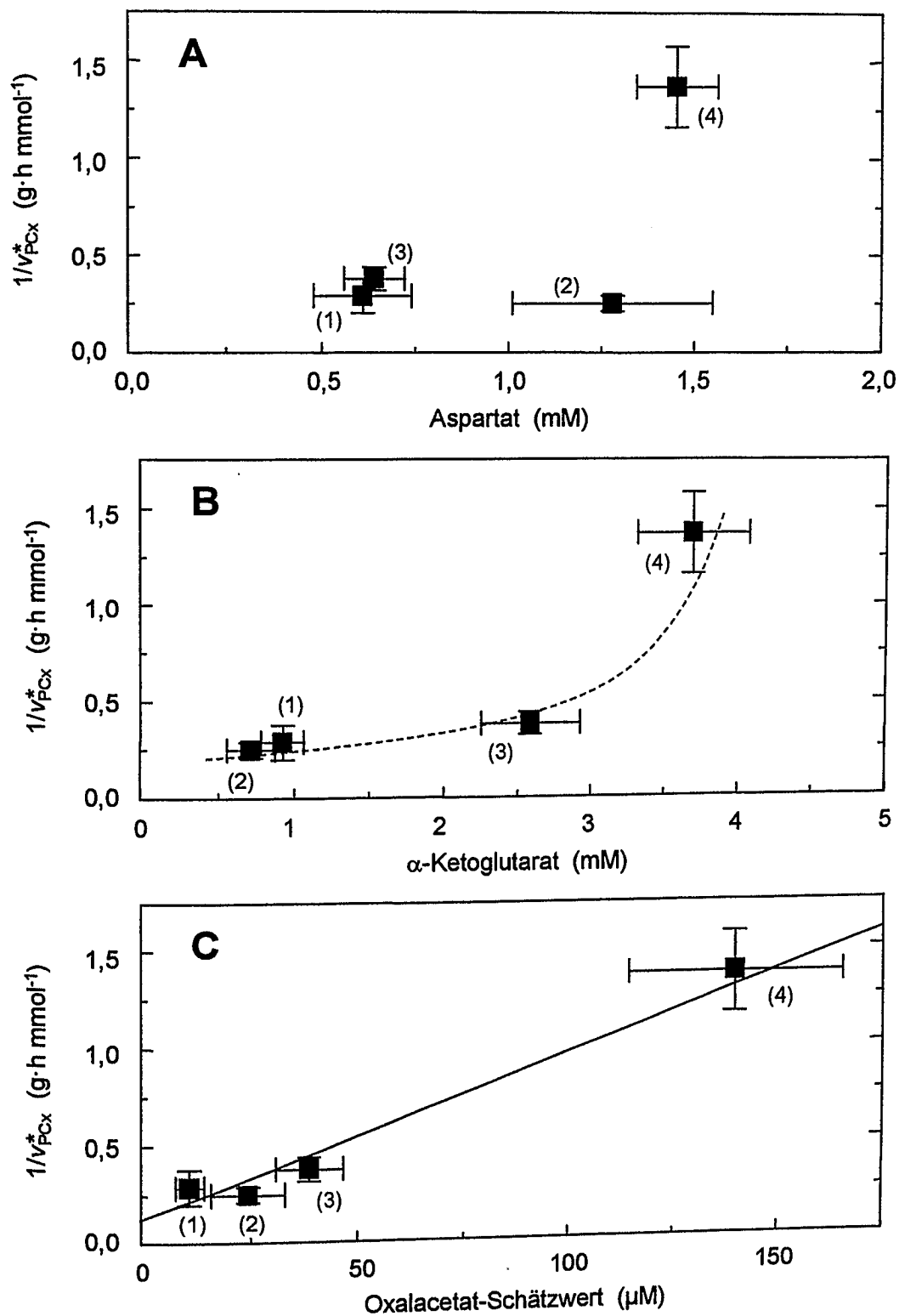


Abbildung 22: Dixon-Plots des auf Substratsättigung extrapolierten Pyruvat-Carboxylase-Flusses (v_{PCx}^*) gegen die Konzentrationen von Aspartat (A), α -Ketoglutarat (B) und Oxalacetat (C). (1) *pck*-Überexprimierer bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$; (2) u. (3), *C. glutamicum* MH20-22B bei $0,25 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,075 \text{ h}^{-1}$; (4) *pck*-Deletionsmutante bei $0,075 \text{ h}^{-1}$.

Als Funktion für die Hemmung der Pyruvat-Carboxylase durch Oxalacetat und α -Ketoglutarat wurde für die Modellierung der folgende allgemeine Inhibitionsterm gewählt:

$$I_{PCx}([Inh.]) = \frac{1}{\left(1 + \frac{[OAA]}{K_{iOAA,PCx}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[\alpha KG]}{K_{i\alpha KG,PCx}}\right)} \quad (46)$$

wobei die Inhibitionskonstanten für Oxalacetat $K_{iOAA,PCx}$ und α -Ketoglutarat $K_{i\alpha KG,PCx}$ im Rahmen der Anpassung des Gesamtmodells an die Meßdaten (Punkt 3.6.4) bestimmt wurden.

PEP-Carboxykinase. Unter der zentralen Annahme (s.o.), daß die nicht direkt von der Anaplerosis beeinflussten Konzentrationen der Nucleosidphosphate (ATP, ADP etc.) konstant seien, wurde in der Geschwindigkeitsgleichung der PEP-Carboxykinase

$$v_{PEPCK} = v_{PEPCK,max} \cdot f_{PEPCK} \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_{mOAA,PEPCK}}{[OAA]}} \quad (29)$$

der Term $f_{PEPCK}([ITP], [GTP], [ATP], [ADP])$ als konstant angesehen.

Aus der Auftragung der experimentell ermittelten Verhältnisse von v_{PEPCK} zu $v_{PEPCK,max}$ (Tabelle 18) gegen die Oxalacetat-Schätzwerte wurde f_{PEPCK} mit $0,55 \pm 0,11$ bestimmt (Abbildung 23). Die Auftragung zeigt eine aufgrund des hohen K_m -Wertes von 1,0 mM (Jetten & Sinskey, 1993) erwartete lineare Proportionalität.

Tabelle 18: Geschätzte Oxalacetatkonzentrationen sowie experimentell bestimmte Werte von v_{PEPCK} und $v_{\text{PEPCK,max}}$ mit den daraus berechneten relativen Flüssen $v_{\text{PEPCK}}/v_{\text{PEPCK,max}}$.

Größe in Gleichung (29)	<i>C. glutamicum</i> -Stamm und Wachstumsrate		
	MH20-22B	MH20-22B pEK0- <i>pck</i> B	MH20-22B
	$\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
[OAA] (μM)	39 ± 8	11 ± 3	24 ± 9
v_{PEPCK} ($\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$1,31 \pm 0,15$	$2,55 \pm 0,36$	$0,87 \pm 0,17$
$v_{\text{PEPCK,max}}$ ($\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	66 ± 14	460 ± 40	62 ± 10
$v_{\text{PEPCK}}/v_{\text{PEPCK,max}}$ (%)	$2,0 \pm 0,5$	$0,55 \pm 0,09$	$1,4 \pm 0,4$

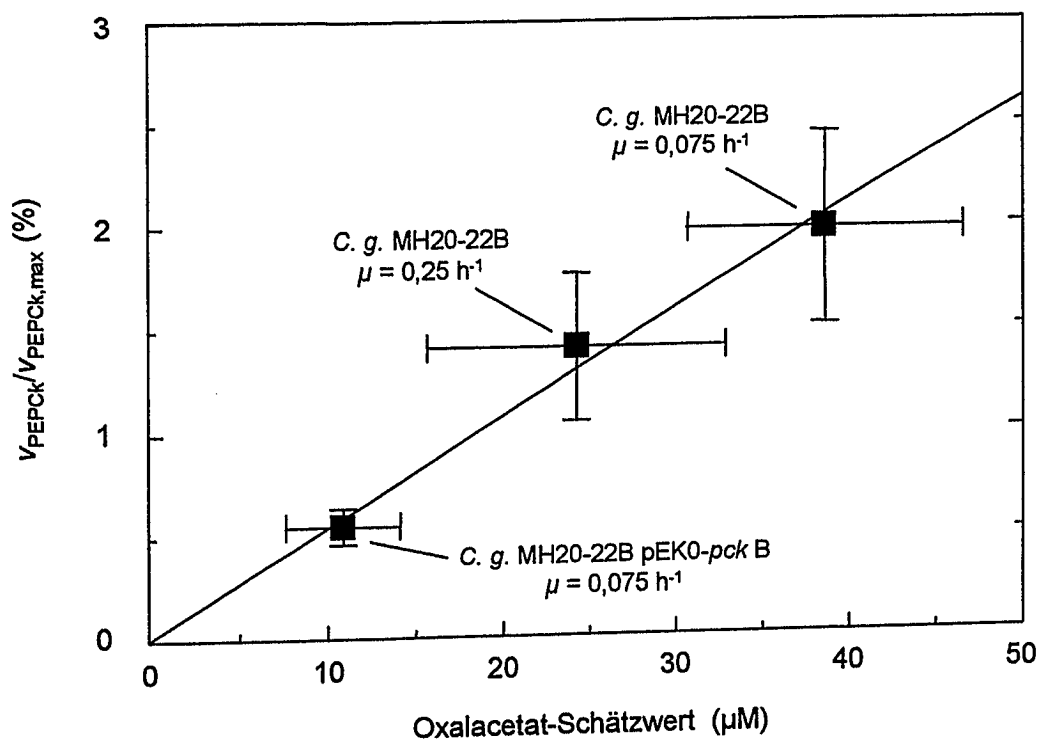


Abbildung 23: Relativer Fluß über die PEP-Carboxykinase, bezogen auf die spezifische Aktivität, als Funktion der Oxalacetatkonzentration. ■ Experimentelle Werte. Durchgezogene Linie: Anpassung der Modellfunktion an die experimentellen Werte.

3.6.4 Aufbau des Gesamtmodells und Parameteroptimierung

Aus den in Punkt 3.6.3 erstellten kinetischen Beziehungen für die Enzyme Pyruvat-Carboxylase, PEP-Carboxykinase, PEP-Carboxylase und Pyruvat-Kinase können bei bekannten Konzentrationen der Metabolite Oxalacetat, Aspartat, Pyruvat und α -Ketoglutarat die anaplerotischen Flüsse berechnet werden, wenn zumindest auch der glycolytische Fluß, wegen der gemeinsamen Modellierung von PEP-Carboxylase und Pyruvat-Kinase, bekannt ist.

Das Ziel bestand jedoch darin, mit dem Regulationsmodell Berechnungen von anaplerotischen Flüssen und Lysinausbeuten für hypothetische Stammkonstrukte durchführen zu können. In diesem Fall sind die Poolgrößen nicht mehr gegeben; sie hängen von den Stoffflüssen ab, und umgekehrt hängen die Stoffflüsse von den Poolgrößen ab. Das Ziel des Gesamtmodells, die Berechnung der anaplerotischen Flüsse auch in diesem Fall zu ermöglichen, wurde durch Einbetten der Teilmodelle in die Stöchiometrie des Zentralstoffwechsels ermöglicht. Das dazu notwendige Stoffwechselnetzwerk ist in **Abbildung 24** dargestellt.

Die aus der Stöchiometrie folgenden Bilanzgleichungen der Nettoflüsse sind direkt aus **Abbildung 24** ableitbar und sind im Folgenden aufgelistet:

Für den glycolytischen Fluß von 3-Phosphoglycerat nach PEP gilt:

$$v_{C3} = \frac{6 \cdot q_{\text{Glc}} - v_{\text{PP}} - 11,42 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu}{3} \quad (47)$$

wobei v_{PP} die Abspaltung von CO_2 im oxidativen Pentosephosphatweg berücksichtigt und der Term 11,42 mmol/g den gesamten Kohlenstoffbedarf aus Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, den Pentose-5-phosphaten, Erythrose-4-phosphat, den Triosephosphaten und 3-Phosphoglycerat als Vorläufermetaboliten der Biomassesynthese darstellt (Marx *et al.*, 1996).

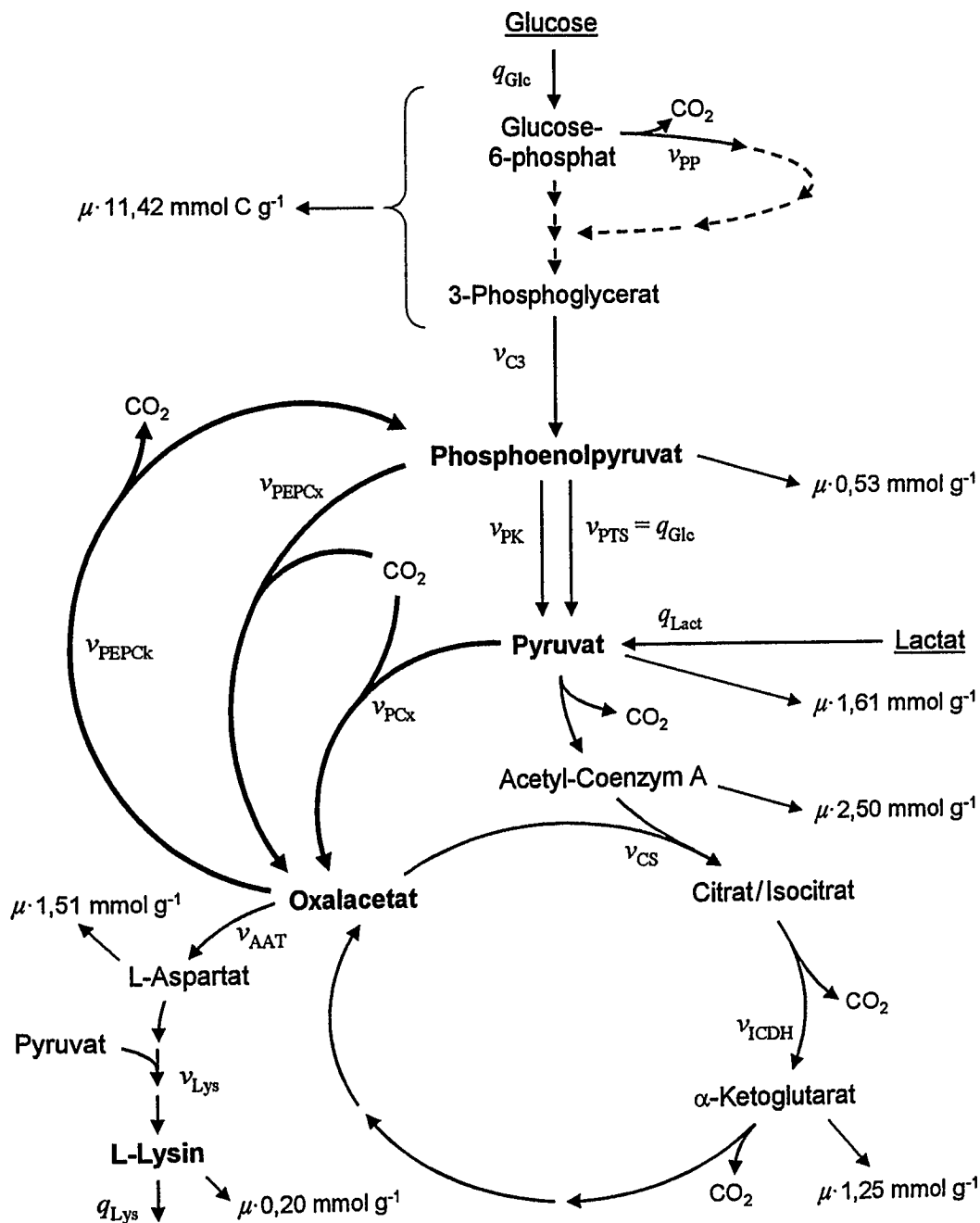


Abbildung 24: Stöchiometrie des Zentralstoffwechsels und der Lysinbiosynthese zur Einbindung des anaplerotischen Regulationsmodells. Stoffflüsse: q_{Glc} , Glucose-Einbindungsrate; q_{Lact} , Lactataufnahmerate; v_{PP} , oxidativer Pentosephosphatweg; v_{C3} , glycolytischer Fluß von C_3 -Körpern; v_{PEPCK} , PEP-Carboxylase; v_{PCx} , Pyruvat-Carboxylase; v_{PEPCK} , PEP-Carboxykinase; v_{PK} , Pyruvat-Kinase; v_{PTS} , Phosphotransferasesystem; v_{CS} , Citrat-Synthase; v_{ICDH} , Isocitrat-Dehydrogenase; v_{AAT} , Aspartat-Aminotransferase; v_{Lys} , Lysinsyntheserate; q_{Lys} , Lysinüberproduktionsrate.

In analoger Weise, jeweils unter Berücksichtigung der Vorläuferbedarfs nach Marx *et. al.* (1996), ließen sich weitere Bilanzgleichungen aufstellen (Abbildung 24):

$$v_{C3} + v_{PEPCK} = v_{PEPCx} + v_{PK} + v_{PTS} + 0,53 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (48)$$

$$\text{mit } v_{PTS} = q_{Glc} \quad (49)$$

$$q_{Lact} + v_{PK} + v_{PTS} = q_{Lys} + v_{PCx} + v_{CS} + 4,31 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (50)$$

$$v_{AR} = v_{PEPCx} + v_{PCx} - v_{PEPCK} = v_{AAT} + 1,25 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (51)$$

$$q_{Lys} = v_{Lys} - 0,20 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (52)$$

dabei ist v_{CS} der Fluß von Acetyl-Coenzym A in den Citratzyklus (Citrat-Synthase); dieser ist gleich dem Fluß über die Isocitrat-Dehydrogenase v_{ICDH} (Abbildung 24). v_{AR} ist der anaplerotische Nettofluß.

Die Bilanz um den Metaboliten Aspartat wurde bereits weiter oben beschrieben:

$$v_{AAT} = 1,71 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu + q_{Lys} \quad (35)$$

Ebenfalls zur Stöchiometrie kann die in Abschnitt 3.5 ermittelte energetische Beziehung zwischen Wachstumsrate, Lysinproduktion und Substrataufnahmerate gezählt werden:

$$q_C = \frac{\mu}{Y_{X/C}} + \frac{q_{Lys}}{Y_{Lys/C}} + m_C \quad (25)$$

wobei der Erhaltungskoeffizient m_C aus der linearen Regression der Daten in Abbildung 19 bestimmt wurde:

$$m_C = 1,63 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1} + 0,46 \cdot v_{PEPCK} \quad (53)$$

Aufgrund des vorgegebenen Konzentrationsverhältnisses von Glucose und Lactat im Medium von 21 zu 4 mM (138 mM Gesamtkohlenstoff) und der praktisch vollständigen Substrataufnahme in kohlenstofflimitierter Kultur gilt für die Glucoseaufnahmerate q_{Glc} und die Lactataufnahmerate q_{Lact} :

$$q_{Glc} = \frac{21}{138} \cdot q_C \quad (54)$$

$$q_{\text{Lact}} = \frac{4}{138} \cdot q_{\text{C}} \quad (55)$$

Der Fluß über den oxidativen Pentosephosphatweg v_{PP} , der zwar nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, jedoch aufgrund der Stöchiometrie im Modell berücksichtigt werden mußte, wurde mit Hilfe der NADPH-Bilanz approximiert:

$$2 v_{\text{PP}} + v_{\text{ICDH}} = \frac{\mu}{Y_{\text{X/NADPH}}} + \frac{q_{\text{Lys}}}{Y_{\text{Lys/NADPH}}} + m_{\text{NADPH}} \quad (56)$$

wobei die linke Seite von Gleichung (56) die Erzeugung von NADPH in den Reaktionen des oxidativen Pentosephosphatwegs (v_{PP}) und durch die Isocitrat-Dehydrogenase (v_{ICDH}) darstellt (Marx, 1997). Die rechte Seite stellt den NADPH-Bedarf für die Biomassebildung von 14,9 mmol/g Trockengewicht ($Y_{\text{X/NADPH}} = 0,067$ g/mmol; Marx, 1997) und für die Lysinproduktion von 4 mmol NADPH je mmol Lysin ($Y_{\text{Lys/NADPH}} = 0,25$; Neidhardt *et al.*, 1990) dar. Der Term m_{NADPH} bezeichnet einen von Marx (1997) festgestellten NADPH-Umsatz von durchschnittlich $0,4 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, der nicht an die Synthese von Biomasse bzw. Produkten gekoppelt ist.

Zusammengefaßt und nach dem Fluß in den Pentosephosphatweg aufgelöst ergeben Gleichungen (47)-(52) und (56):

$$v_{\text{PP}} = \frac{18 q_{\text{Lys}} + 79 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu + 1,2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1} - q_{\text{C}}}{5} \quad (57)$$

Die Modellstöchiometrie besaß bei gegebener Wachstumsrate drei Freiheitsgrade. Dies bedeutet: Waren drei Stoffflüsse bekannt, z.B. die Aktivitäten von Pyruvat-Carboxylase, PEP-Carboxylase und Lysinbiosynthese, so ließen sich alle anderen Flüsse über die stöchiometrischen Gleichungen (47) bis (57) sowie (35) berechnen. Die von der Stöchiometrie unabhängigen Metabolitpools von Pyruvat, Oxalacetat, α -Ketoglutarat, Glutamat und Aspartat stellten fünf weitere Freiheitsgrade dar.

Diesen insgesamt acht Freiheitsgraden standen mit den drei Teilmodellen aus Punkt 3.6.3, der Geschwindigkeitsgleichung der Aspartat-Aminotransferase (30) sowie der Näherungsfunktion der Lysinsynthese nach Gleichungen (32) und (33) allerdings nur fünf

kinetische Beziehungen gegenüber, so daß noch drei Randbedingungen, d.h. weitere Zusammenhänge zwischen den Modellgrößen, zu formulieren waren. Diese bestanden in der mathematischen Beschreibung der Konzentrationen von Pyruvat, α -Ketoglutarat und Glutamat, die nicht mit Hilfe der kinetischen Gleichungen berechnet werden konnten.

Für die Konzentrationen von Pyruvat und α -Ketoglutarat ließen sich Korrelationen der experimentell bestimmten Werte mit der Oxalacetat-Konzentration bzw. der Wachstumsrate finden (Abbildung 25).

Da sich die Frage nach der genauen Wirkungsweise von Oxalacetat auf die Poolgrößen von α -Ketoglutarat und Pyruvat mit den experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit nicht beantworten ließ, wurden die Korrelationen zwischen diesen Metabolitkonzentrationen als empirische Gleichungen in das Modell aufgenommen. Der für Pyruvat lineare Zusammenhang (Abbildung 25A) wurde mit zwei Parametern $k_{\text{Pyr},1}$ und $k_{\text{Pyr},2}$ ausgedrückt:

$$[\text{Pyr}] = k_{\text{Pyr},1} \cdot \left(1 + \frac{[\text{OAA}]}{k_{\text{Pyr},2}} \right) \quad (58)$$

Die Abhängigkeit des α -Ketoglutaratpools von der Oxalacetatkonzentration und der Wachstumsrate (Abbildung 25B) ließ sich durch eine Funktion mit drei Parametern $k_{\alpha\text{KG},1}$, $k_{\alpha\text{KG},2}$ und $k_{\alpha\text{KG},3}$ beschreiben:

$$[\alpha\text{KG}] = \frac{k_{\alpha\text{KG},1}}{(1 + k_{\alpha\text{KG},2} / [\text{OAA}]) (1 + k_{\alpha\text{KG},3} \cdot \mu)} \quad (59)$$

Als dritte Randbedingung wurde die unter Chemostatbedingungen offenbar wenig veränderliche Größe des Glutamatpools (Tabellen 11 und 14) auf den konstanten Wert von 60 mM gesetzt.

Mit den kinetischen Gleichungen (29)-(46), den stöchiometrischen Beziehungen (25), (35) und (47)-(57) sowie den Randbedingungen (58) und (59) war das Regulationsmodell der anaplerotischen Reaktionen vollständig lösbar, d.h. für eine simulierte Chemostatkultivierung mit gegebener Wachstumsrate ließen sich sämtliche Stoffflüsse (Abbildung 24)

sowie die Metabolitkonzentrationen von Pyruvat, α -Ketoglutarat, Oxalacetat und Aspartat berechnen. Der vollständige Rechengang des Modells ist als Computerprogramm in Abschnitt 7.3 im Anhang beschrieben.

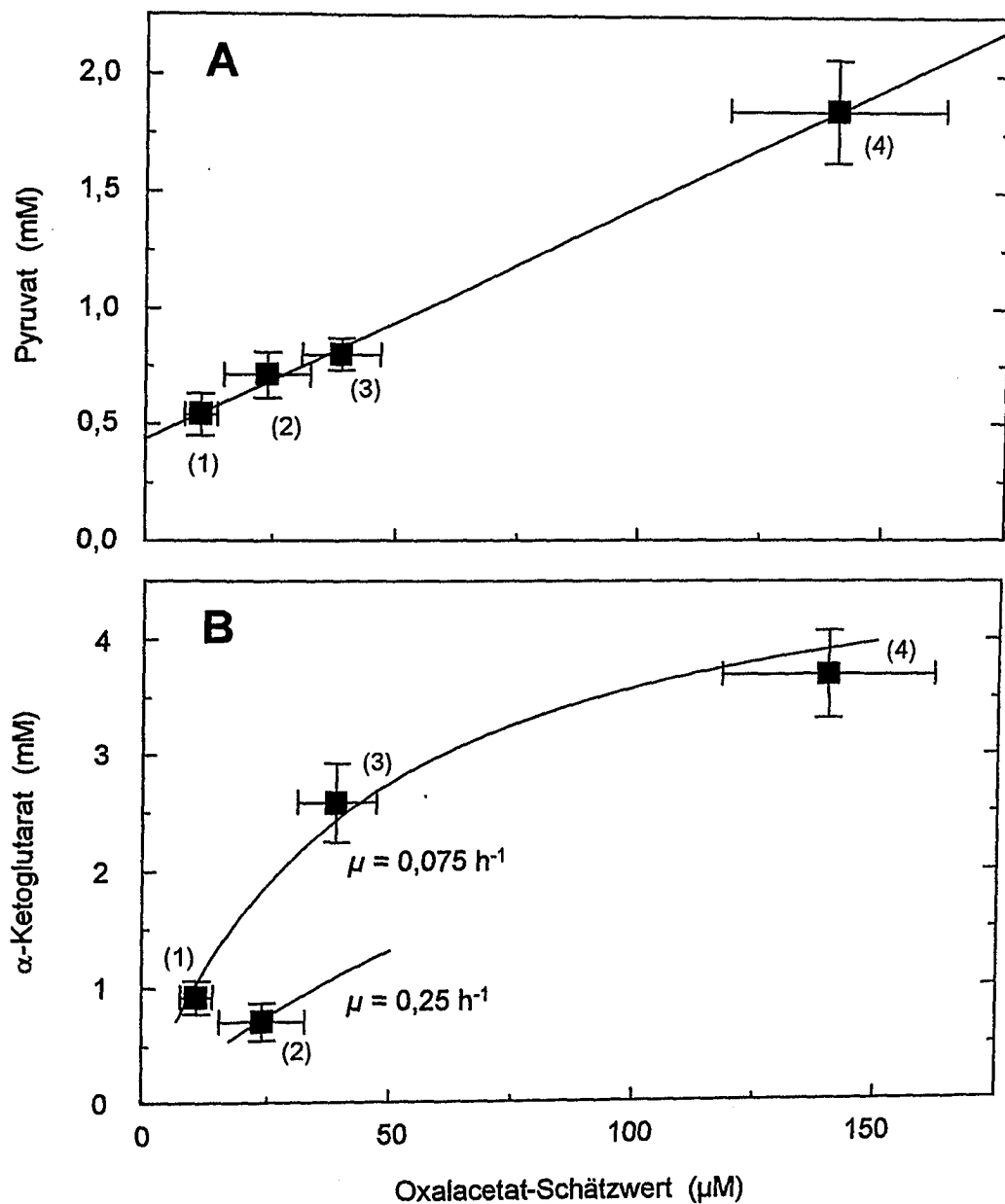


Abbildung 25: A Korrelation der intrazellulären Konzentrationen von Pyruvat und Oxalacetat. B Korrelation der α -Ketoglutaratkonzentration mit dem Oxalacetatpool und der Wachstumsrate. (1) *pck*-Überexprimierer bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$; (2) u. (3), *C. glutamicum* MH20-22B bei $0,25 \text{ h}^{-1}$ bzw. $0,075 \text{ h}^{-1}$; (4) *pck*-Defektmutante bei $0,075 \text{ h}^{-1}$.

Die Werte der in **Tabelle 19** zusammengefaßten Modellparameter wurden durch Anpassung der nach dem Modell berechneten Stoffflüsse und Metabolitkonzentrationen an die experimentellen Daten ermittelt. Grundlage dieser Parameteroptimierung waren die vier in **Tabelle 20** aufgeführten Kultivierungen dieser Arbeit, für die sowohl Informationen über Stoffflüsse als auch über Metabolitpools und spezifische Enzymaktivitäten vorlagen. Zielvorgabe der Anpassung war eine minimierte Quadratsumme der relativen Abweichungen der berechneten von den im Experiment bestimmten Werten. Die Optimierung erfolgte mit dem Programm *Scientist* (MicroMath, Salt Lake City, Utah, USA).

Das Ergebnis zeigte, daß Oxalacetat mit einer Inhibitionskonstanten von $K_{iOAA,PCx} \approx 70 \mu\text{M}$ gegenüber α -Ketoglutarat mit $K_{i\alpha\text{KG},PCx} \approx 1 \text{ mM}$ der eindeutig stärkere Inhibitor der Pyruvat-Carboxylase von *Corynebacterium glutamicum* ist (Tabelle 19).

Der scheinbare K_m -Wert der Lysinsynthese für Aspartat ($K'_{mAsp,Lys}$) befand sich mit $0,9 \pm 0,4 \text{ mM}$ im Bereich der experimentell ermittelten Aspartatkonzentrationen. Dagegen lag der scheinbare K_m -Wert für Pyruvat ($K'_{mPyr,Lys}$) mit weniger als $0,3 \text{ mM}$ deutlich unterhalb der gemessenen Pyruvatkonzentrationen. Darüber hinaus wies der deutlich von null verschiedene Wert des Parameters k_{Lys} ($1,77 \pm 0,32 \text{ mmol g}^{-1}$) auf eine Zunahme der maximalen Lysinsyntheserate mit der Wachstumsrate hin.

Die im Rahmen der Teilmodelle bereits abgeschätzten Parameter $K_{iAsp,PEPCx}$, k_{PEP} und f_{PEPCx} wurden bei der Optimierung des Gesamtmodells erneut zur Optimierung freigegeben. Für keinen der drei Werte ergab sich dabei eine signifikante Abweichung, für k_{PEP} und f_{PEPCx} allerdings eine verbesserte Genauigkeit (Tabelle 19).

Tabelle 19: Berechnete Parameter des Gesamtmodells. Die Werte der Modellparameter wurden in einem computergestützten Optimierungsprozeß durch Anpassung des anaplerotischen Regulationsmodells an die experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit erhalten.

Parameter	identifizierter Wert	Parameter	identifizierter Wert
<i>PEP-Carboxylase/Pyruvat-Kinase</i>		<i>Korrelation Oxalacetat/Pyruvat</i>	
$K_{iAsp,PEPCx}$	$0,57 \pm 0,17 \text{ mM}$	$k_{Pyr,1}$	$0,38 \pm 0,13 \text{ mM}$
k_{PEP}	$1,03 \pm 0,30$	$k_{Pyr,2}$	$34 \pm 11 \text{ } \mu\text{M}$
<i>Pyruvat-Carboxylase</i>		<i>Korrelation Oxalacetat/α-Ketoglutarat</i>	
$v'_{PCx,max}$	$9,9 \pm 3,0 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$k_{\alpha KG,1}$	$9,9 \pm 3,8 \text{ mM}$
$K_{i\alpha KG,PCx}$	$0,89 \pm 0,57 \text{ mM}$	$k_{\alpha KG,2}$	$53 \pm 17 \text{ } \mu\text{M}$
$K_{iOAA,PCx}$	$67 \pm 40 \text{ } \mu\text{M}$	$k_{\alpha KG,3}$	$13,3 \pm 6,2 \text{ h}$
<i>PEP-Carboxykinase</i>		<i>Lysinsynthese</i>	
f_{PEPCk}	$0,55 \pm 0,09$	v_{Lys0}	$0,32 \pm 0,12 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
		k_{Lys}	$1,77 \pm 0,32 \text{ mmol g}^{-1}$
		$K'_{mAsp,Lys}$	$0,87 \pm 0,42 \text{ mM}$
		$K'_{mPyr,Lys}$	$< 0,26 \text{ mM}$

Wie Tabelle 20 zeigt, wurde für die meisten Modellgrößen eine sehr gute Anpassung mit relativen Fehlern von weniger als 10% erreicht. Größere Abweichungen gab es nur zum Teil bei einigen Metabolitkonzentrationen.

Es existiert somit ein einheitliches Modell, daß in der Lage ist, die anaplerotischen Stoffflüsse und Metabolitkonzentrationen für alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten lysinproduzierenden *C. glutamicum*-Stämme zufriedenstellend zu beschreiben.

Tabelle 20: Vergleich der experimentell bestimmten Flüsse und Metabolitpools mit den durch das Regulationsmodell nach Anpassung der Parameter (Tabelle 19) berechneten Werten. Die berechneten Werte sind in Klammern angegeben.

Größe	<i>C. glutamicum</i> -Stamm und Wachstumsrate			
	MH20-22B $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	MH20-22B $\Delta pck 20$ $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	MH20-22B pEK0- <i>pck B</i> $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	MH20-22B $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
<i>Flüsse (mmol g⁻¹ h⁻¹)</i>				
Pyruvat-Carboxylase	1,01 ± 0,14 (0,83)	0,43 ± 0,06 (0,36)	1,00 ± 0,28 (1,18)	1,41 ± 0,20 (1,36)
PEP-Carboxylase	0,69 ± 0,14 (0,58)	0,14 ± 0,06 (0,14)	2,13 ± 0,36 (2,12)	0,56 ± 0,14 (0,49)
PEP-Carboxykinase	1,31 ± 0,15 (1,01)	< 0,04 (0,00)	2,55 ± 0,36 (2,95)	0,87 ± 0,17 (0,76)
Kohlenstoffaufnahme	7,83 ± 0,15 (7,72)	8,16 ± 0,15 (8,25)	7,95 ± 0,15 (8,11)	18,66 ± 0,36 (18,33)
Lysinproduktion	0,17 ± 0,01 (0,18)	0,27 ± 0,02 (0,28)	0,13 ± 0,01 (0,13)	0,35 ± 0,03 (0,35)
<i>Metabolitpools (mM)</i>				
L-Aspartat	0,64 ± 0,08 (0,72)	1,45 ± 0,11 (1,66)	0,61 ± 0,13 (0,45)	1,28 ± 0,27 (1,11)
Pyruvat	0,80 ± 0,07 (0,70)	1,85 ± 0,27 (2,14)	0,54 ± 0,09 (0,51)	0,71 ± 0,10 (0,64)
α-Ketoglutarat	2,59 ± 0,34 (1,73)	3,70 ± 0,38 (3,71)	0,92 ± 0,14 (0,90)	0,71 ± 0,16 (0,69)
Oxalacetat (geschätzt)	0,039 ± 0,008 (0,028)	0,14 ± 0,03 (0,16)	0,011 ± 0,003 (0,012)	0,024 ± 0,009 (0,023)

3.6.5 Validierung des Gesamtmodells

Nächstes Ziel war es, die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen von lysinproduzierenden *C. glutamicum*-Stämmen, in denen die Gene der anaplerotischen Enzyme PEP-Carboxylase (*ppc*) bzw. Pyruvat-Carboxylase (*pyc*) jeweils überexprimiert oder deletiert waren, mit Modellsimulationen zu vergleichen. Da jedoch ausschließlich *batch*-Kultivierungen entsprechender Stämme mit den jeweiligen Lysinakkumulationen dokumentiert waren (Cremer *et al.*, 1991; Peters-Wendisch *et al.*, 1993 und 2000), mußte sich die Validierung darauf beschränken, die Effekte der genetischen Modifikationen auf die Lysinausbeute in Experiment und Modell zu vergleichen.

Für die Simulationen wurden die optimierten Parameter nach Tabelle 19 und folgende einheitliche spezifische Enzymaktivitäten verwendet: PEP-Carboxylase ($v_{\text{PEPCx,max}}$) 4 mmol g⁻¹ h⁻¹; Pyruvat-Kinase ($v_{\text{PK,max}}$) 7 mmol g⁻¹ h⁻¹; PEP-Carboxykinase ($v_{\text{PEPCK,max}}$) 60 mmol g⁻¹ h⁻¹; Aspartat-Aminotransferase ($v_{\text{AAT,max}}$) 22 mmol g⁻¹ h⁻¹. Diese Aktivitäten entsprachen mittleren Werten aus den Kultivierungen der vorliegenden Arbeit nach Umrechnung auf die Einheit mmol g⁻¹ h⁻¹. Überexpression und Deletion eines Gens wurden dadurch simuliert, daß im Modell die entsprechende Enzymaktivität (für die Pyruvat-Carboxylase der Modellparameter $v'_{\text{PCx,max}}$) auf den zehnfachen Wert erhöht bzw. gleich null gesetzt wurde. Um eventuelle Abhängigkeiten der simulierten Effekte von der Wachstumsrate beurteilen zu können, wurden Simulationen sowohl bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$ als auch bei $0,25 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt.

Tabelle 21 zeigt die Simulationsergebnisse im Vergleich mit den Literaturdaten. Außerdem ist die jeweils simulierte Veränderung der Verfügbarkeit von Aspartat gegenüber dem Ausgangsstamm angegeben. Die Eigenschaften des Ausgangsstamms bei den Simulationen waren ein Aspartatpool von 0,71 mM bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$ bzw. 0,97 mM bei $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ und eine Lysinausbeute von 0,137 mol Lysin-C/mol Substrat-C bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$ bzw. 0,107 mol/mol bei $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$.

Tabelle 21: Effekte genetischer Modifikationen im Bereich der Anaplerosis auf die Aspartatkonzentration und die Lysinausbeute. Modellsimulationen im Vergleich mit experimentellen Daten der angegebenen Referenzen. Die Änderungen beziehen sich jeweils auf den Ausgangsstamm unter gleichen Bedingungen.

Genetische Modifikation	Modellaussagen (Simulation)			Effekt auf Lysinausbeute, experimenteller Vergleichswert
	für μ (h ⁻¹)	Effekt auf Aspartatpool	Effekt auf Lysinausbeute	
<i>ppc</i> -Überexpression	0,075	+ 78%	+ 17%	+ 23 ± 8% ¹ [1]
	0,25	+ 71%	+ 22%	
<i>ppc</i> -Defekt	0,075	- 20%	- 9%	kein Effekt ² [2]
	0,25	- 24%	- 13%	
<i>pyc</i> -Überexpression	0,075	+ 150%	+ 19%	+ 47 ± 10% ¹ [3]
	0,25	+ 340%	+ 42%	
<i>pyc</i> -Defekt	0,075	- 50%	- 32%	- 59 ± 4% ¹ [3]
	0,25	n.b.	n.b.	
<i>pck</i> -Defekt	0,075	+ 150%	+ 49%	+ 15 ± 5% ² [4]
	0,25	+ 78%	+ 29%	

¹ Ausgangsstamm *C. glutamicum* DG 52-5; ² Ausgangsstamm *C. glutamicum* MH20-22B.

[1] Cremer *et al.*, 1991

[2] Peters-Wendisch *et al.*, 1993

[3] Peters-Wendisch *et al.*, 2000

[4] Riedel *et al.*, 2000

Die Ergebnisse zeigten eine allgemein gute Konsistenz der simulierten Effekte mit den experimentellen Vergleichswerten. Insbesondere die bei $\mu = 0,25$ h⁻¹ simulierten Wirkungen der Überexpression des *ppc*- bzw. des *pyc*-Gens auf die Lysinausbeute stimmten auch nahezu quantitativ mit den entsprechenden Experimenten überein. Das experimentelle Ergebnis, daß die Deletion von *ppc* ohne Einfluß auf die Lysinproduktion ist (Peters-Wendisch *et al.*, 1993), wurde vom Modell zumindest qualitativ korrekt wiedergegeben.

Der simulierte Effekt war hier mit ca. 10% Abnahme der Lysinausbeute vergleichsweise gering. Deutlich größeren Einfluß, sowohl im Experiment als auch im Modell, hatte dagegen die Deletion des Gens für die Pyruvat-Carboxylase. Generell zeigten die Simulationsergebnisse bei $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ eine bessere Übereinstimmung mit den zur Validierung herangezogenen Experimenten als die Berechnungen für $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$, was eventuell darauf zurückzuführen war, daß unter kohlenstofflimitierten Bedingungen, für die das Modell *per se* nur gültig war, eine hohe Wachstumsrate noch am ehesten mit den Verhältnissen während einer *batch*-Kultivierung verglichen werden kann. Allerdings war das Modell bei simulierter *pyc*-Deletion für $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ nicht lösbar, da hier wegen einer sehr geringen Aspartatkonzentration die simulierte Rate der Lysinbiosynthese v_{Lys} nicht ausreichte, um den Lysinbedarf für Biomassessynthesen ($0,05 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) zu decken. Das Modell findet offensichtlich seine Grenzen in der Extrapolation auf metabolische Extremsituationen, wie sie das völlige Fehlen der Pyruvat-Carboxylase darstellt.

Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, daß das erstellte Regulationsmodell in der Lage ist, die Wirkung veränderter spezifischer Aktivitäten der anaplerotischen Enzyme auf die Lysinproduktion zumindest qualitativ korrekt zu beschreiben.

3.6.6 Identifikation von limitierenden Faktoren der Lysinsynthese am Modell

Um mit Hilfe des Regulationsmodells potentielle limitierende Faktoren der Aminosäuresynthese ausfindig machen zu können, wurden die im Modell enthaltenen spezifischen Enzymaktivitäten und Parameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die berechnete Lysinproduktionsrate untersucht. Die dabei gemachten Aussagen dürften prinzipiell aber auch für andere Aminosäuren der Aspartat-Familie Gültigkeit besitzen, da die Lysinproduktion im Modell bei gegebener Wachstumsrate praktisch nur von der Aspartatkonzentration abhängig war.

Nach der Theorie der *Metabolic Control Analysis* (MCA; Kacser & Burns, 1973; Heinrich & Rapoport, 1974; Fell, 1998) lassen sich mögliche limitierende Faktoren einer Stoffwechselleistung durch den Vergleich ihrer differentiellen Einflüsse auf den entsprechenden Metabolitfluß bewerten. Für einen gegebenen Modellparameter läßt sich dessen Einfluß auf die Lysinsyntheserate q_{Lys} daher wie folgt formulieren:

$$C_{\text{Parameter}}^{q_{\text{Lys}}} = \frac{\partial q_{\text{Lys}}}{q_{\text{Lys}}} \cdot \frac{\text{Parameter}}{\partial \text{Parameter}} = \frac{\partial \ln q_{\text{Lys}}}{\partial \ln \text{Parameter}} \quad (60)$$

Dabei bedeutet beispielsweise ein Wert des differentiellen Koeffizienten bzw. sogenannten Kontrollkoeffizienten $C_{\text{Parameter}}^{q_{\text{Lys}}}$ von 0,2, daß eine Veränderung des entsprechenden Parameters um 1% eine Veränderung der Lysinproduktionsrate um 0,2% bewirkt.

Die Kontrollkoeffizienten der MCA sind keine Konstanten, sondern hängen von den jeweiligen Ausgangsbedingungen ab (Kacser & Burns, 1973). **Tabelle 22** zeigt die am Modell ermittelten Werte daher exemplarisch für *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B bei den Wachstumsraten 0,075 h⁻¹ und 0,25 h⁻¹ sowie für die *pck*-Defektmutante *C. glutamicum* MH20-22B Δpck 20 bei $\mu = 0,075$ h⁻¹. Koeffizienten für die Konzentrationen von Oxalacetat bzw. Aspartat wurden nicht berechnet, weil diese Metabolitpools selbst implizit von den anderen Modellparametern abhingen. Die Limitationen im Lysinsyntheseweg waren bereits Gegenstand ausführlicher experimenteller Untersuchungen (z.B. Cremer *et al.*, 1991; Schrumpf, 1991; Eggeling *et al.*, 1998).

Soweit es die anaplerotischen Enzyme betraf, wiederholte das Ergebnis in Tabelle 22 im wesentlichen das Bild der Modellvalidierung (Tabelle 21). Die Pyruvat-Carboxylase wurde mit einem gegenüber der PEP-Carboxylase im Mittel dreifach höheren Flußkontrollkoeffizienten (0,18 bis 0,34 gegenüber 0,07 bis 0,11) als das anaplerotische Enzym mit dem größten Einfluß auf die Lysinproduktion erkannt. Erwartungsgemäß wurde für die PEP-Carboxykinase, deren Aktivität die Lysinproduktion nachteilig beeinflusste, ein negativer Koeffizient (-0,17) bestimmt. Der Kontrollkoeffizient der Pyruvat-Kinase lag nach den Modellrechnungen stets nahe bei null (-0,03 bis -0,05). Dieses Enzym besaß damit zumindest im Bereich kleiner Aktivitätsänderungen keinen wesentlichen Einfluß auf die Lysinproduktion.

Signifikante Auswirkungen auf die Lysinproduktivität besaßen im Modell auch die Deregulation der Pyruvat-Carboxylase bezüglich ihrer Inhibitoren Oxalacetat und α -Ketoglutarat sowie die Deregulation der PEP-Carboxylase in bezug auf Aspartat, was aus den positiven Kontrollkoeffizienten für die Inhibitionskonstanten $K_{i\text{OAA},\text{PCx}}$, $K_{i\alpha\text{KG},\text{PCx}}$ bzw. $K_{i\text{Asp},\text{PEPCx}}$ geschlossen werden konnte (Tabelle 22).

Interessanterweise wies die Aspartat-Aminotransferase einen Flußkontrollkoeffizienten von bis zu 0,29 auf. Dieses Ergebnis bedeutete, daß die Umsetzung von Oxalacetat zu Aspartat, obwohl nahe am Gleichgewicht, *in vivo* möglicherweise für die Aspartatverfügbarkeit und damit für die Lysinproduktion limitierend sein könnte. Die Ergebnisse zeigen weiter, daß die Bedeutung dieses Enzyms in *C. glutamicum* MH20-22B Δpck 20 wegen der bereits erhöhten Aspartatkonzentration sehr viel geringer war.

Aus den berechneten differentiellen Koeffizienten der Einflüsse der Metabolitpools von Pyruvat, α -Ketoglutarat und Glutamat auf die Lysinproduktion (Tabelle 22) ließ sich die qualitative Aussage ableiten, daß sowohl die Steigerung der Konzentrationen von Pyruvat und Glutamat (positive Koeffizienten) als auch die Senkung der α -Ketoglutarat-Konzentration (negativer Koeffizient) in der Lage sind, die Lysinproduktion positiv zu beeinflussen. In den Modellsimulationen wirkte sich die Steigerung der Pyruvatkonzentration allerdings nicht direkt auf die Lysinsynthese, für die Pyruvat keinen limitierenden Faktor darstellte, sondern indirekt über eine Erhöhung des Pyruvat-Carboxylase-Flusses auf die Verfügbarkeit von Aspartat aus. Die Senkung der α -Ketoglutarat-Konzentration im Modell verschob zum einen das Gleichgewicht der Aspartat-Aminotransferase-Reaktion in Richtung von Aspartat und hatte zum anderen eine geringere Hemmung der Pyruvat-Carboxylase zur Folge. Die Konzentration von Glutamat wirkte sich ebenfalls auf die Transaminierung von Oxalacetat zu Aspartat aus. Auf welche Weise die Beeinflussung der Konzentrationen von Pyruvat oder α -Ketoglutarat *in vivo* zu erreichen wäre, ließ sich mit dem erstellten Modell wegen der empirischen Ausdrücke für diese Metabolitpools allerdings nicht beantworten.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, daß die Verfügbarkeit von Aspartat unter kohlenstofflimitierten Bedingungen von zentraler Bedeutung für die Lysinproduktion ist. Die Pyruvat-Carboxylase wurde in Übereinstimmung mit experimentellen Befunden (Peters-Wendisch *et al.*, 2000; siehe Tabelle 21) als das für die Lysinproduktion wichtigste anaplerotische Enzym identifiziert. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß bei der Aspartat-Aminotransferase sowie bei den Poolgrößen von Pyruvat, α -Ketoglutarat und Glutamat ein deutliches Potential zur Erhöhung des Flusses in die Aminosäuresynthesen der Aspartatfamilie liegt.

Tabelle 22: Differentielle Koeffizienten (Kontrollkoeffizienten) des Einflusses von Modellparametern auf die simulierte Lysinproduktionsrate in *C. glutamicum* MH20-22B und in der *pck*-Defektmutante *C. glutamicum* MH20-22B Δpck 20. Bestimmt wurden die differentiellen Koeffizienten für spezifische Enzymaktivitäten, für die Inhibitionskonstanten der anaplerotischen Enzyme sowie für die im Modell explizit ausgedrückten (empirischen) Konzentrationen von Pyruvat, α -Ketoglutarat und Glutamat.

Modellparameter	Differentieller Koeffizient $C_{\text{Parameter}}^{qLys}$		
	<i>C. g.</i> MH20-22B		<i>C. g.</i> MH20-22B Δpck 20
	bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$	bei $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$	bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$
<i>Enzymaktivitäten</i>			
PEP-Carboxylase ($v_{\text{PEPCx,max}}$)	+ 0,11	+ 0,10	+ 0,07
Pyruvat-Carboxylase ($v'_{\text{PCx,max}}$)	+ 0,18	+ 0,34	+ 0,27
PEP-Carboxykinase ($v_{\text{PEPCK,max}}$)	- 0,17	- 0,16	-
Pyruvat-Kinase ($v_{\text{PK,max}}$)	- 0,05	- 0,05	- 0,03
Asp-Aminotransferase ($v_{\text{AAT,max}}$)	+ 0,16	+ 0,29	+ 0,04
<i>Inhibitionskonstanten</i>			
$K_{i\text{Asp,PEPCx}}$	+ 0,14	+ 0,15	+ 0,12
$K_{i\alpha\text{KG,PCx}}$	+ 0,12	+ 0,15	+ 0,21
$K_{i\text{OAA,PCx}}$	+ 0,06	+ 0,09	+ 0,18
<i>Metabolitpools</i>			
Pyruvat ($k_{\text{Pyr},1}$)	+ 0,18	+ 0,29	+ 0,13
α -Ketoglutarat ($k_{\alpha\text{KG},1}$)	- 0,62	- 0,59	- 0,39
Glutamat	+ 0,42	+ 0,34	+ 0,16

4 Diskussion

¹³C-gestützte Stoffflußanalyse der anaplerotischen Reaktionen

Ziel intrazellulärer Stoffflußanalysen ist es, die Aktivitäten von Stoffwechselwegen *in vivo* zu bestimmen, die sich von den spezifischen Aktivitäten der beteiligten Enzyme in der Regel erheblich unterscheiden. Stoffflußanalysen sind daher eine notwendige Voraussetzung, um gezielte Eingriffe in den Stoffwechsel biotechnologisch bedeutsamer Organismen (*metabolic design*) vornehmen zu können, sowie ein wichtiges Mittel zur Erfolgskontrolle derartiger Eingriffe (Bailey, 1991; Varma & Palsson, 1994; Sahm *et al.*, 1995).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges ¹³C-gestütztes Verfahren entwickelt, welches es erlaubt, in einem einzigen Experiment die Stoffflüsse durch parallele anaplerotische C₃-carboxylierende und C₄-decarboxylierende Reaktionen aufzulösen und zu quantifizieren. Die Strategie zur Bestimmung der carboxylierenden Flüsse besteht dabei im gezielten Einsatz ¹³C-markierten Lactats als Cosubstrat und der daraus resultierenden differentiellen Markierung von Pyruvat gegenüber Phosphoenolpyruvat. Das Hauptsubstrat Glucose besteht aus einer computeroptimierten Mischung dreier unterschiedlich markierter Isotopomere, auf deren Basis die Quantifizierung der decarboxylierenden Flüsse erfolgt. Das computergestützte Stoffflußanalyseverfahren kombiniert die Vorteile der Bestimmung von ¹³C-Anreicherungen (Marx *et al.*, 1996) und der ¹³C-Isotopomerenanalyse (Szyperski, 1995). Die aus NMR-Messungen zur Verfügung stehende Markierungsinformation wird somit optimal zur Quantifizierung der Stoffflüsse genutzt.

Wegen der in vielen Organismen existierenden parallelen C₃-carboxylierenden bzw. C₄-decarboxylierenden Enzymreaktionen (Kornberg, 1966), waren die anaplerotischen Reaktionen für Stoffflußanalysen bisher schwer zugänglich. Bisherige ¹³C- oder ¹⁴C-gestützte Stoffflußanalysen, bei denen C₃-carboxylierende und C₄-decarboxylierende Flüsse innerhalb der Anaplerosis *in vivo* bestimmt wurden, wurden entweder an Organismen durchgeführt, die nur einen möglichen Stofffluß je Richtung aufwiesen (z.B. Raugi *et al.*,

1975; Malloy *et al.*, 1988; Des Rosiers *et al.*, 1994), waren auf Annahmen über unterschiedliche Kompartimentierung von Parallelreaktionen angewiesen, um diese aufzulösen (z.B. Rabkin & Blum, 1985; Baranyai & Blum, 1989; Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1995), oder faßten parallele Reaktionen zusammen (z.B. Sonntag *et al.*, 1995; Marx *et al.*, 1996; Jucker *et al.*, 1998). Park *et al.* (1997) schätzten die Anteile der von PEP bzw. Pyruvat ausgehenden carboxylierenden Stoffflüsse in *Corynebacterium glutamicum* auf der Basis von Deletionsmutanten ab; dieses Vorgehen repräsentierte jedoch nicht die Situation im Ausgangsstamm, da der Organismus auf Störungen der Flußverteilung sehr flexibel reagieren kann (Marx *et al.*, 1997 und 1999). Erstmals gelang es Sauer *et al.* (1997), mittels ^{13}C -Isotopomerenanalyse die *in vivo* Aktivität der PEP-Carboxykinase von *Bacillus subtilis* auf $\pm 30\%$ abzuschätzen und gleichzeitig eine Obergrenze für die *in vivo* Aktivität des Malat-Enzyms zu ermitteln.

Die Stoffflußanalysen der vorliegenden Arbeit stellen somit die ersten *in vivo* Aktivitätsstudien dar, in denen sowohl parallele C_3 -carboxylierende als auch parallele C_4 -decarboxylierende Stoffflüsse in einem Mikroorganismus, *Corynebacterium glutamicum*, quantifiziert wurden. Dabei wurde mit dem neuentwickelten ^{13}C -Markierungsverfahren eine für intrazelluläre Stoffflußanalysen hohe Genauigkeit von ca. $\pm 10\%$ des jeweils stärksten anaplerotischen Flusses erreicht.

Bedeutung zweier Enzyme für die Synthese von Oxalacetat

Mit der Pyruvat-Carboxylase und der PEP-Carboxylase besitzt *C. glutamicum* zwei redundante anaplerotische Enzyme für das Wachstum auf Glucose (Peters-Wendisch, 1996). Die Existenz zweier C_3 -carboxylierender Enzyme wurde auch für *Azotobacter vinelandii* und Arten von *Pseudomonas* beschrieben (Scrutton & Taylor, 1974; Milrad de Forchetti & Cazzulo, 1976; O'Brien *et al.*, 1977), wohingegen *Bacillus subtilis* nur die Pyruvat-Carboxylase (Diesterhaft & Freese, 1973) und *Escherichia coli* nur die PEP-Carboxylase (Chao & Liao, 1993) besitzt.

Die Stoffflußanalysen der vorliegenden Arbeit zeigten einerseits, daß in *C. glutamicum* vorrangig die Pyruvat-Carboxylase *in vivo* aktiv ist, andererseits aber auch, daß die PEP-Carboxylase flexibler auf die Störungen des Stoffwechsels reagierte, die durch Aktivitätserhöhung bzw. Ausschalten der PEP-Carboxykinase verursacht wurden. Das

Vorhandensein beider Enzyme erhöht daher offenbar die Flexibilität des Organismus unter verschiedenen Umweltbedingungen.

Der in diesem Zusammenhang wichtigste Punkt ist wegen der Biotin-Auxotrophie von *C. glutamicum* (Kinoshita *et al.*, 1957) wahrscheinlich die Biotinabhängigkeit der Pyruvat-Carboxylase (Scrutton & Young, 1972). Peters-Wendisch *et al.* (1997) zeigten, daß ein PEP-Carboxylase-negativer *C. glutamicum*-Stamm bei Wachstum auf Glucose einen gegenüber dem Wildtyp erhöhten Biotinbedarf aufweist. Bei Biotin-Überschuß dagegen zeigten PEP-Carboxylase-negative Mutanten von *C. glutamicum* keine signifikanten Unterschiede in Wachstum und Aminosäureproduktion im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen (Peters-Wendisch *et al.*, 1993). Dies bedeutet, daß die Pyruvat-Carboxylase allein in der Lage ist, den Bedarf an Oxalacetat zu decken, allerdings nur bei ausreichender Biotin-Verfügbarkeit.

Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Carboxylasen deutlich in ihrer Regulation. Im Gegensatz zur PEP-Carboxylase benötigt die Pyruvat-Carboxylase ATP als Cofaktor und wird von AMP und ADP gehemmt (Peters-Wendisch *et al.*, 1997). Die Aufteilung des anaplerotischen Flusses auf die beiden Enzyme hängt somit offenbar von der Energieladung ab. Des weiteren wird die PEP-Carboxylase durch Acetyl-Coenzym A aktiviert, die Pyruvat-Carboxylase dagegen inhibiert (K_i 110 μM ; Peters-Wendisch, 1996). Die Funktion dieser gegenläufigen Regulation ist bislang noch unklar. Für das Wachstum auf Glucose scheint der Einfluß von Acetyl-Coenzym A auf die Pyruvat-Carboxylase wegen dessen geringer Konzentration auf diesem Substrat (ca. 20 μM ; Spies, 1996) allerdings von untergeordneter Bedeutung zu sein (Peters-Wendisch, 1996). Letztlich unterscheidet sich auch die Hemmung der PEP-Carboxylase durch Aspartat (Ozaki & Shiio, 1969) von der Hemmung der Pyruvat-Carboxylase durch Oxalacetat (s.u.). Zwar sind wegen des weitgehenden Gleichgewichts zwischen Oxalacetat und Aspartat deren Einflüsse auf die anaplerotischen Enzyme gleichgerichtet, diese können jedoch je nach Lage des Gleichgewichts unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So scheint die Aspartat-Hemmung der PEP-Carboxylase dafür verantwortlich zu sein, daß der Ausfall der Pyruvat-Carboxylase zwar kaum das Wachstum, aber in erheblichem Maße die Lysinproduktion beeinträchtigt (P. Peters-Wendisch, pers. Mitteilung 2000; Peters-Wendisch *et al.*, 2000).

Zusammenfassend betrachtet besitzt die PEP-Carboxylase die Vorteile, sowohl von ATP als auch von Biotin unabhängig zu sein, während ein Vorteil der von der Pyruvat-Carboxylase katalysierten Reaktion gegenüber der Reaktion der PEP-Carboxylase darin besteht, daß ein höherer Anteil des Phosphoenolpyruvats für die Phosphotransferasesysteme und damit für den Substrattransport zur Verfügung steht. Die unterschiedliche Regulation der beiden carboxylierenden Enzyme könnte demnach die Funktion haben, je nach Biotinverfügbarkeit, Energieladung und Bedarf an Oxalacetat die bestmögliche Kombination dieser Vorteile zu erzielen.

Funktion des Rückflusses von Oxalacetat über die PEP-Carboxykinase

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß der mit der *in vivo* Aktivität der PEP-Carboxykinase verbundene Energiebedarf in *C. glutamicum* einen erheblichen Teil (ca. 25%) des Erhaltungskoeffizienten ausmacht. Diese Situation in *C. glutamicum* steht in krassem Gegensatz zu anderen Bakterien wie z.B. *Escherichia coli*, in denen strikte Kontrollmechanismen enzymatische Zyklen unterbinden (Chambost & Fraenkel, 1980; Daldal & Fraenkel, 1983; Chao & Liao, 1994). Es stellt sich für *C. glutamicum* damit die Frage nach einer physiologischen Funktion der PEP-Carboxykinase-Aktivität bei Wachstum auf nicht-gluconeogenetischen Substraten.

Bereits im Zusammenhang mit den Stoffflußanalysen bei verschiedenen Wachstumsraten fiel auf, daß *C. glutamicum* sich an den etwa dreifachen Unterschied im Oxalacetatbedarf, der zwischen den Wachstumsraten von $0,075 \text{ h}^{-1}$ und $0,25 \text{ h}^{-1}$ bestand, mit relativ geringen Änderungen der Flüsse über Pyruvat-Carboxylase und PEP-Carboxykinase von ca. 40% anpaßte (Abbildungen 12 und 13). Weiterhin ergab die Modellierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit, daß die *in vivo* Aktivitäten von Pyruvat-Carboxylase und PEP-Carboxykinase in entgegengesetzter Weise von der Oxalacetatkonzentration abhängen (Abbildungen 22 und 23). Und schließlich war die geschätzte Oxalacetatkonzentration bei $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ auch nur um 40% gegenüber $0,075 \text{ h}^{-1}$ verringert (Tabelle 16). Aus diesen Ergebnissen läßt sich daher eine Hypothese ableiten, nach der entgegengerichteten Aktivitäten der beiden Enzyme der weitgehenden Konstanthaltung des Oxalacetatpools unabhängig vom Oxalacetatbedarf dienen könnten. Augenfällig deutlich wird diese mögliche regulative Bedeutung der PEP-Carboxykinase beim Vergleich der berechneten

Zusammenhänge zwischen Oxalacetatkonzentration und Wachstumsrate mit und ohne PEP-Carboxykinase-Aktivität (**Abbildung 26**). Obgleich insgesamt erhöht, zeigt der Oxalacetatpool im PEP-Carboxykinase-negativen Stamm eine starke Abhängigkeit von der Wachstumsrate, d.h. vom Oxalacetatbedarf. Im PEP-Carboxykinase-positiven Stamm ist die Konzentration dieses Metaboliten dagegen nahezu konstant. Die physiologische Bedeutung eines konstanten Oxalacetatpools mag darin liegen, daß dieser bei der Regulation weiterer zentraler Metabolitpools, wie z.B. Pyruvat oder α -Ketoglutarat, eine Rolle spielt (**Abbildung 25**). Außerdem beeinflusst die Oxalacetatkonzentration direkt das Redoxpotential der Malat-Chinon-Oxidoreduktase (Molenaar *et al.*, 1998); sie könnte daher auch eine Funktion in der Regulation der Atmungskette haben.

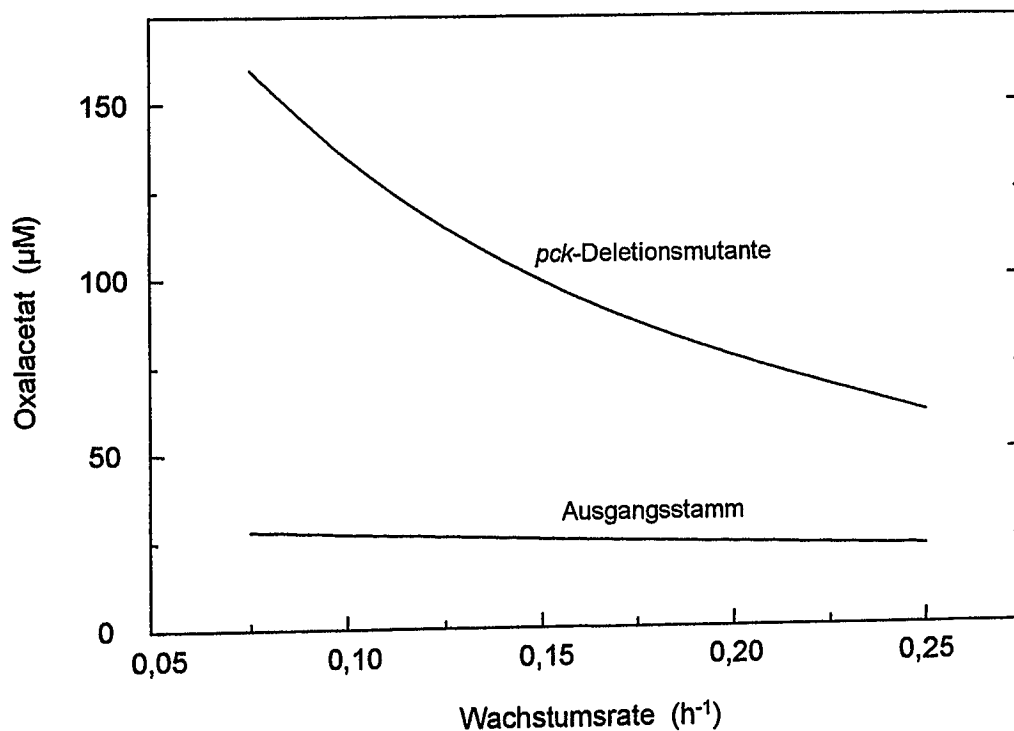


Abbildung 26: Mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Regulationsmodell berechnete intrazelluläre Oxalacetatkonzentrationen in Abhängigkeit von der Wachstumsrate beim Ausgangsstamm *C. glutamicum* MH20-22B und der *pck*-Deletionsmutante.

Eine weitere Bedeutung der PEP-Carboxykinase-Aktivität könnte für *C. glutamicum* darin bestehen, aus einer Situation der Limitierung heraus möglichst schnell auf die plötzliche Verfügbarkeit eines Substrats reagieren zu können, dessen Aufnahme von einem PEP-gekoppelten Phosphotransferasesystem abhängig ist. Von *E. coli* ist bekannt, daß ein Glucosepuls nach Kohlenstofflimitierung den Phosphoenolpyruvatpool in weniger als einer Sekunde auf Konzentrationen nahe null zurückgehen läßt, während die katabole Neubildung von PEP erst nach ca. zehn Sekunden erfolgt (Schaefer *et al.*, 1999). In *C. glutamicum* dagegen könnte PEP aus Pyruvat über die Pyruvat-Carboxylase und die PEP-Carboxykinase erheblich schneller regeneriert werden. Ob dieser mögliche Vorteil für den Organismus tatsächlich eine Rolle spielt, ließe sich in Konkurrenzexperimenten zeigen, bei denen der *C. glutamicum*-Wildstamm und eine PEP-Carboxykinase-Deletionsmutante zusammen in glucose-gepulster Kultur untersucht würden.

Mehrfach wurde vorgeschlagen, daß *futile cycles* wie auch sonstige Entkopplungsvorgänge tatsächlich dazu dienen, Energie zu verbrauchen (Neijssel & Tempest, 1976; Rognstad, 1996; Teixeira de Mattos & Neijssel, 1997). Neijssel & Teixeira de Mattos (1994) argumentierten, daß die starren Stöchiometrien, die ohne Entkopplungsmechanismen im Stoffwechsel bestünden, es einem Organismus nicht erlaubten, flexibel genug auf seine Umwelt zu reagieren. Nach Bond & Russel (1998) trägt ein erhöhter Energieumsatz dazu bei, eine hohe Energieladung aufrechtzuerhalten; diese sei wichtiger als die aus thermodynamischer Sicht optimale Ausnutzung der Energiequelle. Dabei stellen eine hohe Energieladung und eine Limitierung der Kohlenstoffquelle nicht notwendigerweise einen Widerspruch dar. Neijssel & Tempest (1976) schlossen aus dem Vergleich glucose- und gluconatlimitierter Kulturen von *Klebsiella aerogenes*, daß Glucoselimitierung im wesentlichen Kohlenstofflimitierung, nicht jedoch Energielimitierung bedeute. Darauf, daß dies auch für *Corynebacterium glutamicum* gelten könnte, deutet die Tatsache hin, daß sich der Erhaltungskoeffizient von *C. glutamicum* in kohlenstofflimitierter Kultur nicht von dem bei Leucinlimitierung unterscheidet (Abbildung 18). Alleine die bei der sehr niedrigen Wachstumsrate von $0,025 \text{ h}^{-1}$ gefundenen Abweichungen im Erhaltungstoffwechsel und bei einigen Enzymaktivitäten ließen sich dann mit einer Umstellung des Stoffwechsels infolge einer wirklichen Energielimitierung in Verbindung bringen.

Malat-Enzym und Oxalacetat-Decarboxylase

In keinem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme von *C. glutamicum* konnte eine signifikanter Fluß von Oxalacetat nach Pyruvat und damit eine *in vivo* Aktivität des Malat-Enzyms bzw. der Oxalacetat-Decarboxylase festgestellt werden. Da sich die beiden Enzyme jedoch im Rohextrakt nachweisen ließen (Tabellen 10 und 13), stellt sich die Frage nach ihrer Regulation.

Das Malat-Enzym von *C. glutamicum* spielt als NADPH-regenerierendes Enzym bei Wachstum auf Lactat oder Fructose eine Rolle, da diese Substrate nicht oder nur zu einem kleinen Teil über den oxidativen Pentosephosphatweg metabolisiert werden (Cocaign-Bousquet & Lindley, 1995; Dominguez *et al.*, 1998; Gourdon *et al.*, 2000). Die spezifische Aktivität des Malat-Enzyms ist von der Kohlenstoffquelle abhängig (Gourdon *et al.*, 2000). Der Grund dafür, daß auch die in der vorliegenden Arbeit gemessene geringe Enzymmenge von ca. 25 mU/mg Protein keinen nennenswerten Fluß katalysiert, ist offensichtlich die geringe Größe des Malatpools bei Kohlenstofflimitierung, die mit weniger als 0,2 mM (A. de Graaf, pers. Mitteilung 2000) deutlich unterhalb des K_m -Wertes des Enzyms für Malat (3,8 mM; Gourdon *et al.*, 2000) liegt. In *batch*-Kulturen von *C. glutamicum* liegt die intrazelluläre Malatkonzentration dagegen in der Größenordnung von 4 mM (A. de Graaf, pers. Mitteilung 2000), so daß das Malat-Enzym hier durchaus *in vivo* aktiv sein könnte. Die Tatsache, daß der NADPH-Bedarf des Stoffwechsels bei Wachstum auf Glucose zumindest rechnerisch bereits durch den oxidativen Pentosephosphatweg und durch die Isocitrat-Dehydrogenase gedeckt wird (Moritz, 2000), weist auf eine weitere Regulation des Malat-Enzyms auf Aktivitätsebene hin.

Anders als beim Malat-Enzym wurden bei der Oxalacetat-Decarboxylase hohe spezifische Aktivitäten von ca. 300 mU/mg Protein bestimmt. Jedoch ist die Affinität dieses Enzyms für Oxalacetat mit einem K_m -Wert von 2,1 mM (Jetten & Sinskey, 1995) so gering, daß bei einer angenommenen Oxalacetatkonzentration von 30 μ M *in vivo* eine Aktivität von gerade 4 mU/mg Protein bzw. 0,12 mmol g⁻¹ h⁻¹ erreicht würde; dies entspricht in etwa der Genauigkeit der Stoffflußanalysen. Zudem wird das Enzym nicht unerheblich von ADP (K_i 1,2 mM), GDP (K_i 1,8 mM) und Succinat (K_i 2,8 mM) gehemmt (Jetten & Sinskey, 1995). Die Inaktivität des Enzyms bei Wachstum auf Glucose ist somit ausreichend

erklärbar. Möglicherweise spielt die Oxalacetat-Decarboxylase eine Rolle bei der Metabolisierung von C₄-Substraten, und auch eine Funktion des Enzyms im Zusammenhang mit dem Acetat-Stoffwechsel wurde bereits vermutet (Vallino, 1991; Jetten & Sinskey, 1995).

Einfluß von Kohlendioxid auf Anaplerosis und Lysinsynthese

Bushell & Bull (1981) konnten durch Steigerung der Hydrogencarbonatkonzentration von 0,7 auf 2,8 mM die Biomassesynthese in Chemostatkulturen von *Aspergillus nidulans* um 22% verbessern, und stellten damit fest, daß die CO₂- bzw. HCO₃⁻-Konzentration einen Einfluß auf die Biosyntheseleistung des Stoffwechsels, möglicherweise mit Wirkung über die anaplerotischen Reaktionen, haben kann.

Mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals auch für *Corynebacterium glutamicum* ein Einfluß der CO₂-Konzentration auf die *in vivo* Aktivitäten der C₃-carboxylierenden Enzyme gezeigt (Tabelle 8), allerdings blieb die Aktivitätszunahme bei Erhöhung des CO₂-Partialdrucks auf die PEP-Carboxylase beschränkt. Daß der Fluß über die Pyruvat-Carboxylase dagegen sogar abnahm, deutete auf eine eher indirekte Wirkung des Kohlendioxids hin. Interessanterweise hatte der erhöhte CO₂-Partialdruck als weiteren Effekt eine verminderte Lysinsynthese über den Succinylaseweg zur Folge. Dieser Weg unterscheidet sich von dem parallelen Dehydrogenaseweg in der Beteiligung von Succinyl-Coenzym A und in einer von Glutamat ausgehenden Transaminierung (Eggeling, 1994). Eine Erklärung des CO₂-Effekts auf die Lysinsynthese könnte daher in einer Produkthemmung des α -Ketoglutarat-Dehydrogenasekomplexes durch CO₂ liegen, die zu einer verringerten Konzentration von Succinyl-Coenzym A und/oder zu einem erhöhten α -Ketoglutaratpool führt. Dieser wiederum würde das Gleichgewicht des Transaminierungsschrittes im Succinylaseweg negativ beeinflussen. Schließlich wäre eine höhere Konzentration des Inhibitors α -Ketoglutarat auch die Erklärung für die geringere Aktivität der Pyruvat-Carboxylase.

Insgesamt wird deutlich, daß die Kohlendioxidkonzentration einen wichtigen Parameter im Stoffwechsel von *C. glutamicum* mit großem Einfluß auf die Aminosäureproduktion darstellt. Diese Erkenntnis dürfte nicht nur für das *metabolic design*, sondern vor allem für die verfahrenstechnische Auslegung der Produktionsprozesse von Nutzen sein.

Ist *C. glutamicum* MH20-22B in der Anaplerosis verändert?

Der Stamm *C. glutamicum* MH20-22B wurde durch ungerichtete Mutagenese aus dem *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 erzeugt und weist neben den bekannten Veränderungen, u.a. in Lysinbiosynthese und Lysinexport, noch eine Anzahl nicht identifizierter Mutationen auf (Schrumpf *et al.*, 1992). Ob anaplerotische Reaktionen von der Mutagenese betroffen sind, war bisher nicht bekannt. Lediglich für die PEP-Carboxylase, die in beiden Stämmen die gleiche spezifische Aktivität und das gleiche Regulationsverhalten zeigte, konnte dies ausgeschlossen werden (Schrumpf *et al.*, 1992).

Interessanterweise ergab der Vergleich des Stamms MH20-22B mit dem Wildtyp in der vorliegenden Arbeit für kein anaplerotisches Enzym mit Ausnahme der PEP-Carboxylase einen signifikanten Unterschied in der *in vivo* Aktivität. Der in *C. glutamicum* MH20-22B gegenüber dem Wildtyp etwa dreifach erhöhte Fluß über die PEP-Carboxylase war offensichtlich eine Folge der durch die Lysinproduktion veränderten Stoffwechselsituation. Darüber hinaus waren die beim Wildtyp ermittelten gesamten C₃-carboxylierenden und C₄-decarboxylierenden Flüsse ($1,28 \pm 0,14$ bzw. $0,99 \pm 0,13$ mmol g⁻¹ h⁻¹) praktisch gleich dem Ergebnis der Stoffflußanalyse, die Marx (1997) mit dem kein Lysin überproduzierenden, aber sonst mit *C. glutamicum* MH20-22B identischen Stamm *C. glutamicum* LE4 durchgeführt hatte ($1,17 \pm 0,16$ bzw. $0,88 \pm 0,15$ mmol g⁻¹ h⁻¹).

Insgesamt ergaben sich somit keine Hinweise auf eine genetisch bedingte Veränderung der anaplerotischen Funktion in *C. glutamicum* MH20-22B gegenüber dem Wildtyp.

Identifikation von Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase *in vivo*

Die meisten Pyruvat-Carboxylasen werden durch mindestens einen der Metabolite L-Aspartat, α -Ketoglutarat oder Oxalacetat gehemmt. (Cazzulo *et al.*, 1970; Scrutton & Young, 1972; Osmani *et al.*, 1981; Modak & Kelly, 1995; Pronk *et al.*, 1996). Es lag daher nahe, einen Einfluß dieser Metabolite auch für die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* anzunehmen, für die wegen ihrer Labilität bislang kein *in vitro* Testsystem existiert.

Nachdem sich die potentiellen Einflüsse ebenfalls nicht an permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* untersuchen ließen (Peters-Wendisch, 1996), konnten im Rahmen der

vorliegenden Arbeit anhand der Korrelation von *in vivo*-Daten Oxalacetat und α -Ketoglutarat als wahrscheinliche Inhibitoren identifiziert werden, während L-Aspartat zumindest keinen starken Inhibitor darstellt (Abbildung 22). Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Peters-Wendisch (1996) überein, die einen Einfluß von L-Aspartat auf die Pyruvat-Carboxylase zumindest bis Konzentrationen von 300 μ M ausschließen konnte. Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* wird ebenfalls nicht durch Aspartat inhibiert (Tosaka *et al.*, 1979).

Die *in vivo* gewonnenen Stoffwechseldaten erlaubten zwar keine Rückschlüsse auf den genauen Hemmtyp von Oxalacetat und α -Ketoglutarat, jedoch ließen sich die Größenordnungen der Inhibitionskonstanten für Oxalacetat auf 30-100 μ M und für α -Ketoglutarat auf ca. 1 mM abschätzen. Die Literatur enthält nur wenige Vergleichswerte anderer mikrobieller Pyruvat-Carboxylasen. Die Inhibitionskonstante der Pyruvat-Carboxylase von *Saccharomyces cerevisiae* für Oxalacetat wird von Pronk *et al.* (1996) mit 220 μ M angegeben. Der K_i -Wert des Enzyms von *Aspergillus nidulans* für α -Ketoglutarat wurde von Osmani *et al.* (1984) mit 6,0 mM bestimmt. Modak & Kelly (1985) fanden für die Pyruvat-Carboxylase von *Rhodobacter capsulatus* eine Hemmung von 60% durch 5 mM α -Ketoglutarat, was einem K_i -Wert von ca. 3-4 mM entspricht. Die niedrigeren Inhibitionskonstanten des Enzyms von *C. glutamicum* deuten demnach auf eine vergleichsweise starke Regulation durch Oxalacetat und α -Ketoglutarat hin.

Regulationsmodell der anaplerotischen Reaktionen in *C. glutamicum* und Ansätze für das weitere *Metabolic Design* von *C. glutamicum*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung anaplerotischer Stoffflüsse mit Messungen intrazellulärer Metabolitkonzentrationen sowie spezifischer Enzymaktivitäten kombiniert. Die Stoffflußanalysen wurden somit zu Stoffwechselanalysen erweitert.

Die Zusammenhänge zwischen diesen experimentellen Daten wurden auf der Grundlage der größtenteils bereits bekannten kinetischen Eigenschaften der anaplerotischen Enzyme von *C. glutamicum* in einem einheitlichen mathematischen Modell zusammengefaßt. Dieses stellt in bezug auf die Regulation der anaplerotischen Enzyme ein makrokinetisches Modell dar, während die über das Verständnis der Anaplerosis hinausgehenden Zusammenhänge empirisch beschrieben werden. Das Modell ist nicht nur in der Lage, die in der vorliegenden

Arbeit ermittelten Stoffflüsse und Metabolitkonzentrationen quantitativ wiederzugeben, sondern reproduziert auch die in der Literatur beschriebenen Effekte genetischer Modifikationen auf die Lysinproduktion (Cremer *et al.*, 1991; Peters-Wendisch *et al.*, 1993 und 2000; Riedel *et al.*, 2000) in korrekter Weise. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die mathematische Modellierung der vorliegenden Arbeit die *in vivo* wesentlichen Regulationsmechanismen zutreffend beschreibt.

Mit diesem Modell wurden erstmals die anaplerotischen Reaktionen von *C. glutamicum* und deren Regulationsmechanismen nach Gesichtspunkten der *Metabolic Control Analysis* (MCA; Kacser & Burns, 1973; Heinrich & Rapoport, 1974) bewertet. Die Anwendung dieser an sich leistungsfähigen Theorie auf die Anaplerosis von *C. glutamicum* konnte im direkten Experiment bisher nicht stattfinden, da die benötigten differentiellen Änderungen von Enzymaktivitäten bzw. kinetischen Parametern *in vivo* im allgemeinen nicht realisierbar sind (Fell, 1992).

Das mittels MCA analysierte Regulationsnetzwerk ist in **Abbildung 27** schematisch zusammengefasst. Neben den anaplerotischen Enzymen selbst und der Pyruvat-Kinase wurde auch die L-Aspartat-Aminotransferase berücksichtigt. Dies war notwendig, da Aspartat sowie das an der Transaminierungsreaktion beteiligte α -Ketoglutarat wichtige Effektoren der PEP- bzw. Pyruvat-Carboxylase sind. Im Rahmen der Modellierung konnte die Rate der Lysinsynthese auf die Verfügbarkeit von Aspartat zurückgeführt werden, was im Einklang mit experimentellen Befunden steht (Menkel *et al.*, 1989; Schrumpf, 1991). Die Analyse bewertete bereits existierende Vorschläge und ergab darüber hinaus eine Reihe neuer Ansätze für das *metabolic design* von *C. glutamicum*, die über die bereits bekannten Effekte der Deletion bzw. Überexpression der anaplerotischen Enzyme hinausgehen (**Tabelle 23**). Diese werden im Folgenden diskutiert.

Deregulation der Pyruvat-Carboxylase. Mit der Identifikation von Oxalacetat und α -Ketoglutarat als Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase in der vorliegenden Arbeit ist eine Voraussetzung für die gezielte Deregulation dieses Enzyms gegeben. Laut MCA sollte die Deregulation der Pyruvat-Carboxylase bezüglich α -Ketoglutarat dabei einen stärker positiven Effekt auf die Lysinproduktion haben als die Deregulation in bezug auf Oxalacetat (**Tabelle 23**).

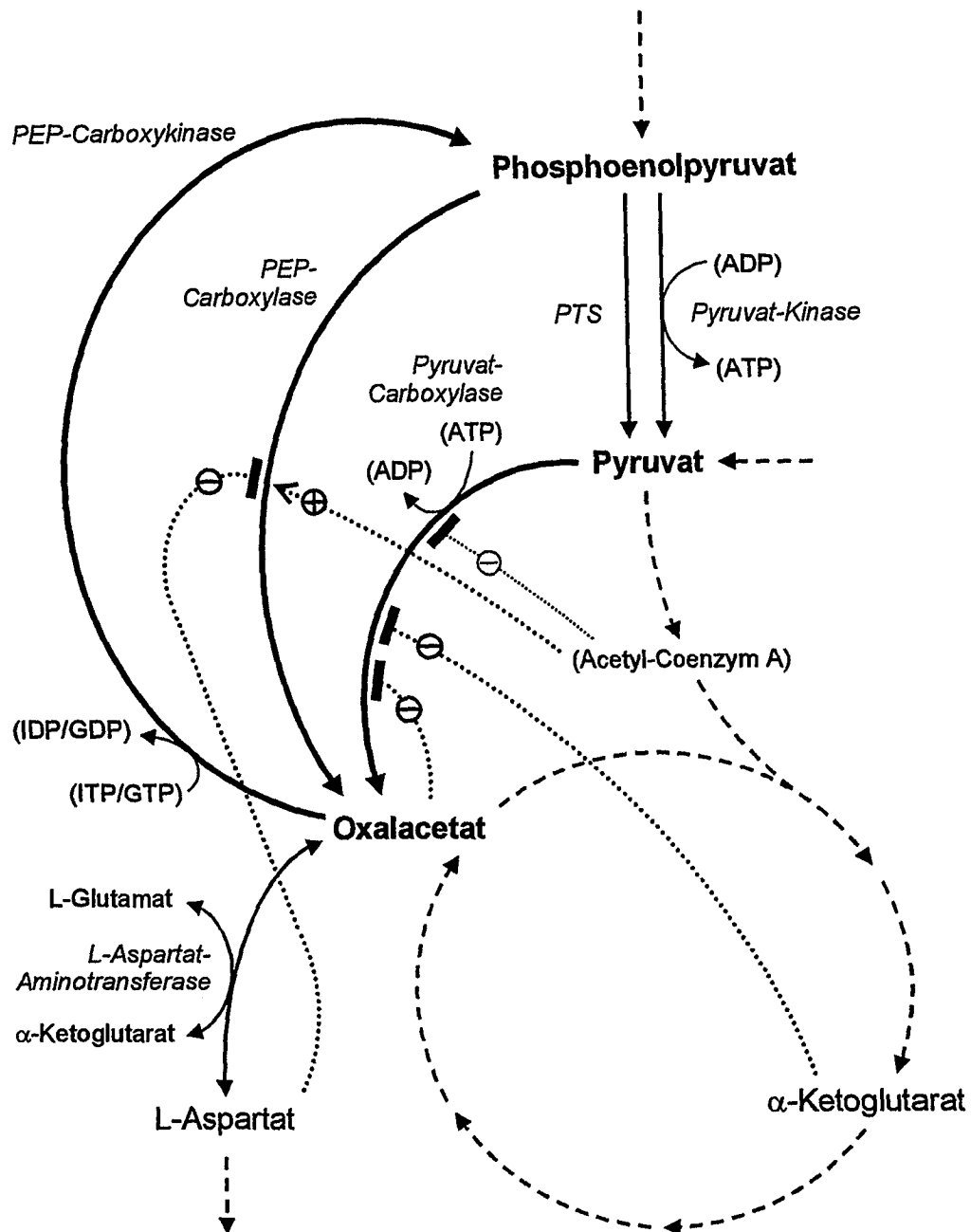


Abbildung 27: Regulation der anaplerotischen Reaktionen in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose. Das Schema beinhaltet die in kohlenstofflimitierter Kultur wesentlichen Mechanismen. ⊖ Inhibitoren, ⊕ Aktivatoren. Die Einflüsse der in Klammern dargestellten Metabolite sowie sämtlicher nicht dargestellter Effektoren wurden für das mathematische Modell der vorliegenden Arbeit als konstant angenommen.

Tabelle 23: Mögliche Ansätze des *metabolic design* von *C. glutamicum* im Hinblick auf die Lysinproduktion sowie deren Bewertung mittels *Metabolic Control Analysis*. Die angegebenen differentiellen Koeffizienten wurden als Mittelwerte für *C. glutamicum* MH20-22B den Ergebnissen in Tabelle 22 entnommen.

Ansatz des <i>metabolic design</i>	Differentieller Einfluß auf die Lysin- produktion laut MCA
Deregulation der Pyruvat-Carboxylase bzgl. Oxalacetat	0,08
Deregulation der Pyruvat-Carboxylase bzgl. α -Ketoglutarat	0,14
Deregulation der PEP-Carboxylase bzgl. L-Aspartat	0,15
Erhöhung der spezifischen Aktivität der L-Aspartat-Aminotransferase	0,23
Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Pyruvat	0,24
Senkung der intrazellulären Konzentration von α -Ketoglutarat	0,61
Erhöhung der intrazellulären Konzentration von L-Glutamat	0,38

Deregulation der PEP-Carboxylase. Die PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* wird durch Aspartat inhibiert (Ozaki & Shii, 1969; Abbildung 27). Deregulation dieses Enzyms bezüglich Aspartat wurde bereits von Stephanopoulos & Vallino (1991) als Mittel zur Verbesserung der Lysinproduktion vorgeschlagen, damals allerdings noch unter der Annahme, daß die PEP-Carboxylase das einzige C_3 -carboxylierende Enzym in *C. glutamicum* wäre. Die Steigerung der Lysinsynthese um 50% in *C. glutamicum* ssp. *flavum*, die von Yokota & Shii (1988) mit einer bezüglich Aspartat deregulierten PEP-Carboxylase in Verbindung gebracht wird, stellt allerdings kein eindeutiges Ergebnis dar, da der entsprechende, durch klassische Mutagenese erzeugte Stamm ebenfalls eine verminderte Aktivität der Citrat-Synthase aufwies. Der Analyse der vorliegenden Arbeit zufolge ließe sich mit der Deregulation der PEP-Carboxylase in bezug auf Aspartat ein ähnlich starker Effekt erzielen wie mit der Deregulation der Pyruvat-Carboxylase bezüglich α -Ketoglutarat (Tabelle 23).

Einfluß der spezifischen Aktivität der Pyruvat-Kinase. Bezüglich des Einflusses der Pyruvat-Kinase-Aktivität auf die Lysinbildung enthält die Literatur widersprüchliche Angaben. Shiiro *et al.* (1987) erzielten durch Ausschalten dieses Enzyms in *C. glutamicum* ssp. *flavum* eine bis zu 37%ige Verbesserung der Lysinproduktion. Dagegen fanden Gubler *et al.* (1994) bei Pyruvat-Kinase-negativen Mutanten von *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* eine Reduktion der Lysinbildung um 40%. Während die Modellanalyse der vorliegenden Arbeit für die Pyruvat-Kinase einen Kontrollkoeffizienten nahe null (Tabelle 22) ergibt und damit keine der beiden Möglichkeiten favorisiert, bleibt durchaus nicht ausgeschlossen, daß sich die beschriebenen Unterschiede auf die verwendeten Unterarten von *C. glutamicum* zurückführen lassen.

Erhöhung der intrazellulären Pyruvatkonzentration. Nach den Ergebnissen der MCA hat die Größe des Pyruvatpools über die *in vivo* Aktivität der Pyruvat-Carboxylase einen großen Einfluß auf die Lysinproduktion (Tabelle 23).

Ein überraschendes Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist in diesem Zusammenhang die auffällige lineare Korrelation zwischen den Konzentrationen von Pyruvat und Oxalacetat (Abbildung 25A). Erklären ließe sich dies mit einer Hemmung des Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes durch Oxalacetat. Coccagn-Bousquet & Lindley (1995) stellten fest, daß die Pyruvat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* stets auf einen konstanten Grad der Pyruvatsättigung hin reguliert wird. Dies ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einer konstanten Pyruvatkonzentration; stattdessen müßte nach Segel (1975) bei Anwesenheit eines angenommenen kompetitiven Inhibitors Oxalacetat gelten:

$$[\text{Pyr}] \cdot \frac{1}{1 + \frac{[\text{OAA}]}{K_{\text{IOAA,PDH}}}} = \text{const.} \quad (61)$$

bzw.

$$[\text{Pyr}] = \text{const.} \cdot \left(1 + \frac{[\text{OAA}]}{K_{\text{IOAA,PDH}}} \right) \quad (62)$$

Dies entspricht exakt dem linearen Zusammenhang nach Gleichung (58). Die Inhibitions-konstante der Pyruvat-Dehydrogenase bezüglich Oxalacetat ($K_{\text{IOAA,PDH}}$) wäre somit gleich dem Modellparameter $k_{\text{Pyr},2}$ von 34 µM. Dieser Wert stimmt zudem bemerkenswert gut mit

dem K_i -Wert der Pyruvat-Dehydrogenase von *Escherichia coli* in bezug auf das Oxalacetat-Analogon Brompyruvat überein (28 μ M; Bisswanger, 1981).

Die Schlußfolgerung, daß die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase über die Pyruvatkonzentration die Lysinproduktion beeinflußt, wird durch ein experimentelles Ergebnis von Vallino (1991) gestützt, der bei einem *C. glutamicum*-Stamm mit abgeschwächter Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität eine Verbesserung der Lysinausbeute um 30% feststellte. Die Einstellung der intrazellulären Pyruvatkonzentration über die kinetischen Eigenschaften der Pyruvat-Dehydrogenase stellt daher ebenfalls einen vielsprechenden Ansatz des *metabolic design* dar.

Erhöhung der spezifischen Aktivität der L-Aspartat-Aminotransferase. Die Aspartat-Aminotransferase gehört wie auch die Pyruvat-Kinase und die Pyruvat-Dehydrogenase zwar nicht zur Anaplerosis selbst, ist aber in ihrer Funktion eng mit den anaplerotischen Reaktionen verknüpft (Abbildung 27). Die vorliegende Arbeit zeigt (Tabelle 23), daß die spezifische Aktivität dieses Enzyms einen möglicherweise nicht zu vernachlässigen Einfluß auf die Aspartatverfügbarkeit hat, da sich der Reaktionsquotient der Transaminierungsreaktion, entsprechend den geschätzten Oxalacetatkonzentrationen, noch ca. 50% vom Gleichgewicht entfernt befindet (Tabelle 16). Eine genaue Beurteilung des Einflusses der Aspartat-Aminotransferase wird indes erst nach einer vollständigen Charakterisierung des Enzyms von *C. glutamicum* möglich sein, da die vorliegende Arbeit anstelle der nicht bekannten K_m -Werte der Aspartat-Aminotransferase von *C. glutamicum* für Aspartat und α -Ketoglutarat ersatzweise die Parameter des Enzyms von *Escherichia coli* verwendet. Die Bedeutung dieser Werte zeigt beispielsweise eine Abschätzung mit den deutlich von *E. coli* verschiedenen K_m -Werten aus *Saccharomyces cerevisiae* (0,11 mM für Aspartat, 0,16 mM für α -Ketoglutarat; Yagi *et al.*, 1982). Mit diesen ergibt sich ein Abstand des Reaktionsquotienten vom Gleichgewicht von nur noch 25% (Daten nicht gezeigt).

Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen Oxalacetat und L-Aspartat. Eine neuartige Strategie zur Erhöhung der Aspartatverfügbarkeit und damit zur Verbesserung der Lysinproduktion stellte es dar, nicht nur die Annäherung der Transaminierungsreaktion an ein gegebenes Gleichgewicht zu verbessern, sondern das Gleichgewicht insgesamt zugunsten von Aspartat zu verschieben. Die MCA ergab, daß dies über eine Erhöhung der

Glutamatkonzentration oder eine Senkung der α -Ketoglutaratkonzentration erfolgen kann (Tabelle 23). Von der intrazellulären Glutamatkonzentration ist bekannt, daß sie mit der Art und Verfügbarkeit der Stickstoffquelle zusammenhängt. (Schrumpf, 1991; Tesch, 1998). Die intrazelluläre Konzentration von α -Ketoglutarat korreliert, ähnlich wie die von Pyruvat, mit der Oxalacetatkonzentration (Abbildung 25B), was zum Teil in der Hemmung des α -Ketoglutarat-Dehydrogenasekomplexes von *C. glutamicum* durch Oxalacetat (Shiio & Ujigawa-Takeda, 1980) begründet liegen könnte. Der α -Ketoglutarat-Dehydrogenasekomplex kommt daher auch als Gegenstand des *metabolic design* in Frage.

Allerdings kann die Oxalacetat-Hemmung der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase die beobachtete Korrelation der Oxalacetat- und α -Ketoglutarat-Konzentrationen (Abbildung 25B) nur unvollständig erklären, da der Zusammenhang keinem bekannten Inhibitionstyp entspricht. Vielmehr spricht die Tatsache, daß α -Ketoglutarat zusammen mit Glutamat an vielen Transaminierungsreaktionen beteiligt ist (Tesch, 1998), dafür, daß die Größe des α -Ketoglutaratpools stark mit dem Stickstoff-Stoffwechsel zusammenhängt. Darauf deuten auch experimentelle Befunde hin. So bewirkt die Überexpression des Gens für die Glutamat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* MH20-22B eine Steigerung der Lysinausbeute um über 50% sowie eine *in vivo* stark verringerte C₄-Decarboxylierungsrate (Marx, 1997; Werte (3) in Abbildung 2). Neueste Untersuchungen zeigen, daß dieser Stamm zwar einen unveränderten Glutamatpool, jedoch eine erheblich verringerte intrazelluläre α -Ketoglutaratkonzentration sowie eine höhere Aspartatkonzentration aufweist, die für die verbesserte Lysinproduktion ursächlich zu sein scheint (C. Mack, pers. Mitteilung 2000). Die geringere Rate der C₄-Decarboxylierung deutet zudem darauf hin, daß mit der Verschiebung des Transaminierungsgleichgewichts nicht nur die Aspartatkonzentration erhöht, sondern auch die Oxalacetatkonzentration gesenkt wurde.

Insgesamt zeigen die Analysen der vorliegenden Arbeit eine starke Interaktion der anaplerotischen Reaktionen mit anderen Bereichen des Stoffwechsels, vor allem mit dem Citratzyklus, was die Wichtigkeit eines umfassenden Modellierungskonzepts belegt. Der in dieser Arbeit gewählte neue Ansatz, Ergebnisse von Stoffflußanalysen und Metabolitpoolmessungen in ein makrokinetisches Modell mit empirischen Komponenten zu integrieren, hat somit zu einem ersten "*predictive tool*" für das *metabolic design* von *Corynebacterium glutamicum* geführt.

5 Zusammenfassung

Corynebacterium glutamicum wird großtechnisch zu Herstellung der Aminosäure L-Lysin eingesetzt. Vorläufermetabolite der Lysinsynthese sind Oxalacetat und Pyruvat. Oxalacetat selbst wird in *C. glutamicum* durch die anaplerotischen Enzyme Pyruvat-Carboxylase und Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxylase gebildet. Darüber hinaus besitzt dieses Bakterium die Enzyme PEP-Carboxykinase und Oxalacetat-Decarboxylase, die Oxalacetat zu PEP bzw. Pyruvat decarboxylieren, sowie das Malat-Enzym, das die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat katalysiert. Das Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der einzelnen anaplerotischen Enzymaktivitäten in *C. glutamicum* und die Untersuchung von deren Regulation *in vivo*.

1. Es wurde ein neues ^{13}C -Markierungsverfahren zur Bestimmung der anaplerotischen Metabolitflüsse *in vivo* entwickelt und etabliert, bei dem der Organismus im Chemostaten auf einer Mischung unterschiedlich ^{13}C -markierter Glucose-Isotopomere sowie ^{13}C -markiertem L-Lactat kultiviert wurde. Die Bestimmung der ^{13}C -Markierungsmuster von Metaboliten erfolgte mittels NMR-Spektroskopie.
2. Stoffflußanalysen ergaben, daß sowohl im *C. glutamicum*-Wildtyp als auch im Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B beide Carboxylasen *in vivo* aktiv sind, wobei die Pyruvat-Carboxylase das überwiegend aktive Enzym ist. Bei einer Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$ betrug die *in vivo* Aktivität der Pyruvat-Carboxylase $1,2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, die der PEP-Carboxylase je nach Lysinproduktion $0,1$ bis $0,4 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.
3. Ein überraschendes Ergebnis war, daß eine starke Aktivität der PEP-Carboxykinase von ca. $1 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in beiden Stämmen gefunden wurde. Dieser Rückfluß von Oxalacetat nach PEP verursacht einen energieverbrauchenden Zyklus zwischen den Metaboliten PEP/Pyruvat und Oxalacetat, dessen Energiebedarf 25% des Erhaltungsstoffwechsels ausmacht. Eine Funktion dieses Zyklus besteht möglicherweise in der Regulation der intrazellulären Oxalacetatkonzentration. Oxalacetat-Decarboxylase und das Malat-Enzym waren *in vivo* inaktiv.

4. Die Aktivität der PEP-Carboxykinase hat einen eindeutig nachteiligen Einfluß auf die Lysinproduktion. Dies ergaben Untersuchungen von Stämmen mit veränderter Expression des PEP-Carboxykinase-Gens *pck*. Eine *pck*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* MH20-22B zeigte eine gegenüber dem Ausgangsstamm um 60% erhöhte Lysinproduktionsrate sowie deutlich erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Oxalacetat, L-Aspartat, α -Ketoglutarat und Pyruvat. Überexpression von *pck* hatte entgegengesetzte Effekte auf die Lysinproduktion und die Metabolitkonzentrationen.
5. Die *in vivo* und *in vitro* gemessenen Aktivitäten der anaplerotischen Enzyme sowie die intrazellulären Konzentrationen von Oxalacetat, L-Aspartat, α -Ketoglutarat und Pyruvat wurden in ein mathematisches Modell integriert. Mit Hilfe dieses Modells wurden Oxalacetat (K_i 30-100 μ M) und α -Ketoglutarat (K_i ca. 1 mM), als Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase *in vivo* identifiziert. L-Aspartat wurde als signifikanter Inhibitor ausgeschlossen. Die Wirkung dieser Metabolite auf die Pyruvat-Carboxylase konnte wegen der Instabilität des Enzyms *in vitro* bislang nicht untersucht werden.
6. Mit Hilfe des mathematischen Modells wurden neue Ansätze für das weitere *metabolic design* von *C. glutamicum* gewonnen: (i) Deletion der PEP-Carboxykinase. (ii) Deregulation der Pyruvat-Carboxylase in bezug auf die Inhibitoren Oxalacetat und α -Ketoglutarat. (iii) Schritte zur Senkung der intrazellulären α -Ketoglutaratkonzentration. Letzteres stellt einen neuartigen Ansatz dar, mit dem sich nicht nur die Hemmung der Pyruvat-Carboxylase verringern, sondern darüber hinaus auch das Gleichgewicht der Transaminierung von Oxalacetat zu L-Aspartat zugunsten von Aspartat, d.h. zugunsten der Lysinproduktion, verschieben ließe.

6 Literaturverzeichnis

- Bailey, J. E. (1991)** Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-1675.
- Bailey, J. E. & Ollis, D. F. (1986)** Biochemical engineering fundamentals, 2nd Ed., McGraw-Hill, New York.
- Baranyai, J. M. & Blum, J. J. (1989)** Quantitative analysis of intermediary metabolism in rat hepatocytes incubated in the presence and absence of ethanol with a substrate mixture including ketoleucine. *Biochem J.* **258**, 121-140.
- Bentle, L. A. & Lardy, H. A. (1976)** Interactions of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **251**, 2916-2921.
- Benziman, M., Russo, A., Hochman, S. & Weinhouse, H. (1978)** Purification and regulatory properties of the oxaloacetate decarboxylase of *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **134**, 1-9.
- Bergmeyer, H. U. & Beutler, H.-O. (1985)** Ammonia. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. VIII, pp. 454-461. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Bergmeyer, H. U., Scheibe, P. & Wahlefeld, A. W. (1978)** Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* **24**, 58-73.
- Bisswanger, H. (1981)** Substrate specificity of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**, 815-822.
- Bond, D. R. & Russell, J. B. (1998)** Relationship between intracellular phosphate, proton motive force, and rate of nongrowth energy dissipation (energy spilling) in *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 976-981.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bröer, S., Eggeling, L. & Krämer, R. (1993)** Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 316-321.
- Burlina, A. (1985)** 2-Oxoglutarate. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. VII, pp. 20-24. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.

- Bushell, M. E. & Bull, A. T. (1981)** Anaplerotic metabolism of *Aspergillus nidulans* and its effect on biomass synthesis in carbon limited chemostats. *Arch. Microbiol.* **128**, 282-287.
- Cazzulo, J. J., Sundaram, T. K. & Kornberg, H.L. (1970)** Properties and regulation of pyruvate carboxylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **176**, 1-19.
- Chambost, J. P. & Fraenkel, D. G. (1980)** The use of 6-labeled glucose to assess futile cycling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 2867-2869.
- Chao, Y.-P. & Liao, J. C. (1993)** Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4261-4265.
- Chao, Y.-P. & Liao, J. C. (1994)** Metabolic responses to substrate futile cycling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 5122-5126.
- Cocaign, M., Monnet, C. & Lindley, N. D. (1993)** Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrate mixtures to localise metabolic bottlenecks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 526-530.
- Cocaign-Bousquet, M. & Lindley, N. D. (1995)** Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 260-267.
- Cocaign-Bousquet, M., Guyonvarch, A. & Lindley, N. D. (1996)** Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 429-436.
- Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1988)** Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 3221-3229.
- Cremer, J., Eggeling, L. & Sahm, H. (1990)** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 478-480.
- Cremer, J., Eggeling, L. & Sahm, H. (1991)** Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1746-1752.
- Daldal, F. & Fraenkel, D. G. (1983)** Assessment of a futile cycle involving reconversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate during gluconeogenic growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**, 390-394.

- de Graaf, A. A. (2000)** Use of ^{13}C labelling and NMR spectroscopy in metabolic flux analysis. In: *NMR in Microbiology: Theory and Applications*, pp. 73-103. Barbotin, J.-N. & Portais, J.-C. (Eds.), Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- de Koning, W. & van Dam, K. (1992)** A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal. Biochem.* **204**, 118-123.
- Des Rosiers, C., Fernandez, C. A., David, F. & Brunengraber, H. (1994)** Reversibility of the mitochondrial isocitrate dehydrogenase reaction in the perfused rat liver. Evidence from isotopomer analysis of citric acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* **269**, 27179-27182.
- Diesterhaft, M. D. & Freese, E. (1973)** Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **248**, 6062-6070.
- Dieuaide-Noubhani, M., Raffard, G., Canioni, P., Pradet, A. & Raymond, P. (1995)** Quantification of compartmented metabolic fluxes in maize root tips using isotope distribution from ^{13}C - or ^{14}C -labeled glucose. *J. Biol. Chem.* **270**, 13147-13159.
- Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerquin-Kern, J.-L., Coccagn-Bousquet, M. & Lindley, N. D. (1998)** Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* **254**, 96-102.
- Eggeling, L. (1994)** Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* **6**, 261-272.
- Eggeling, L., Oberle, S. & Sahm, H. (1998)** Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 24-30.
- Eikmanns, B. J., Follettie, M. T., Griot, M. U. & Sinskey, A. J. (1989)** The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 330-339.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahm, H. (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**, 93-98.

- Eikmanns, B. J., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993) Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie v. Leeuwenhoek* **64**, 145-163.
- Fell D. A. (1992) Metabolic Control Analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem. J.* **286**, 313-330.
- Fell, D. A. (1998) Increasing the flux in metabolic pathways: a metabolic control analysis perspective. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 121-124.
- Fujii, H. & Miwa, S. (1983) Pyruvate Kinase. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. III, pp. 496-501. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Gottschalk, G. (1986) Bacterial metabolism, 2nd Ed., Springer, New York.
- Gourdon, P., Baucher, M.-F., Lindley, N. D. & Guyonvarch, A. (2000) Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2981-2987.
- Gubler, M., Jetten, M., Lee, S. H. & Sinskey, A. J. (1994) Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2494-2500.
- Gutmann, M., Hoischen, C. & Krämer, R. (1992) Carrier mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**, 115-123.
- Heinrich, R. & Rapoport, T. A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains; general properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89-95.
- Helmstetter, C. E. (1996) Timing of synthetic activities in the cell cycle. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, 2nd Ed., Vol. 2, pp. 1627-1639. Neidhardt, F. C. (Ed.), ASM Press, Washington, D. C.
- Jetten, M. S. M. & Sinskey, A. J. (1993) Characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 183-188.
- Jetten, M. S. M. & Sinskey, A. J. (1995) Purification and properties of oxaloacetate decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie v. Leeuwenhoek* **67**, 221-227.
- Jetten, M. S. M., Gubler, M. E., Lee, S. H. & Sinskey, A. J. (1994) Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2501-2507.

- Jones, B. M. & Gilligan, J. P. (1983)** *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatography* **266**, 471-482.
- Jucker, B. M., Lee, J. Y. & Shulman, R. G. (1998)** *In vivo* ^{13}C NMR measurements of hepatocellular tricarboxylic acid cycle flux. *J. Biol. Chem.* **273**, 12187-12194.
- Kacser, H. & Burns, J. A. (1973)** The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**, 65-104, Nachdruck in *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 341-366 (1995).
- Kelle, R. (1996)** Substratgeregelte Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation RWTH Aachen.
- Kelle, R., Laufer, B., Brunzema, C., Weuster-Botz, D., Krämer, R. & Wandrey, C. (1996)** Reaction engineering analysis of L-lysine transport by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 40-50.
- Kinoshita, S. & Tanaka, K. (1972)** Glutamic acid. In: *The microbial production of amino acids*, pp. 263-324. Yamada, K. (Ed.), Wiley, New York.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono, M. (1957)** Studies of the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**, 193-205.
- Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe, B. & Tanner, H. (1985)** Amino acids. In: *Ullmanns' encyclopedia of industrial chemistry*, Vol. 2A, pp. 57-97. Gerhartz, W. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Kornberg, H. L. (1966)** Anaplerotic sequences and their role in metabolism. In: *Essays in Biochemistry*, Vol. II, pp. 1-31. Campbell, P. N., and Greville, G. D. (Eds.), Academic Press, New York.
- Krämer, R. (1996)** Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J. Biotechnol.* **45**, 1-21.
- Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1984)** D-Glucose. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. VI, pp. 163-172. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Lamprecht, W. & Heinz, F. (1984a)** D-glycerate 2-phosphate and phosphoenolpyruvate. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. VI, pp. 555-561. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.

- Lamprecht, W. & Heinz, F. (1984b)** Pyruvate. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. VI, pp. 570-577. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Leuchtenberger, W. (1996)** Amino acids - technical production and use. In: *Biotechnology*, Vol. 6, Products of primary metabolism, pp. 465-502. Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Liebl, W. (1991)** The genus *Corynebacterium* - nonmedical. In: *The procaryotes*, Vol. 2, pp. 1157-1171. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (Eds.), Springer, New York.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979)** High-performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**, 1167-1174.
- Malloy, C. R., Sherry, A. D. & Jeffrey, F. M. H. (1988)** Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ^{13}C NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **263**, 6964-6971.
- Mandelstam, J. & McQuillen, K. (1973)** *Biochemistry of Bacterial Growth*, 2nd Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Marx, A. (1997)** Bestimmung des Kohlenstoffflusses im Zentralstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum* mittels ^{13}C -Isotopenanalyse. Dissertation Universität Bonn. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3459 (ISSN 0944-2952).
- Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L. & Sahm, H. (1996)** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 111-129.
- Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A. A., Sahm, H. & Eggeling, L. (1997)** Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 168-180.
- Marx, A., Eikmanns, B. J., Sahm, H., de Graaf, A. A. & Eggeling, L. (1999)** Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metabolic Eng.* **1**, 35-48.
- Mavrides, C. & Orr, W. (1975)** Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 4128-4133.
- Mavrovouniotis, M. L. (1991)** Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. *J. Biol. Chem.* **266**, 14440-14445.

- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. & Sahm, H. (1989)** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 684-688.
- Milrad de Forchetti, S. R. & Cazzulo, J. J. (1976)** Some properties of the pyruvate carboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* **93**, 75-81.
- Mirow, B. (1991)** Physik-Formeln, Dümmler, Bonn.
- Modak, H. V. & Kelly, D. J. (1995)** Acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*: rapid and efficient purification using dye-ligand affinity chromatography. *Microbiology* **141**, 2619-2628.
- Molenaar, D., van der Rest, M. E. & Petrovic, S. (1998)** Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* **254**, 395-403.
- Möllney, M., Wiechert, W., Kownatzki, D. & de Graaf, A. A. (1999)** Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optimal design of isotopomer labeling experiments. *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 86-103.
- Mori, M. & Shiio, I. (1985)** Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J. Biochem.* **97**, 1119-1128.
- Moritz, B. S. (2000)** Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatweges in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3743 (ISSN 0944-2952).
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. & Schaechter, M. (1990)** Physiology of the bacterial cell, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Neijssel, O. M. & Teixeira de Mattos, M. J. (1994)** The energetics of bacterial growth: a reassessment. *Mol. Microbiol.* **13**, 179-182.
- Neijssel, O. M. & Tempest, D. W. (1976)** The role of energy-spilling reactions in the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic chemostat culture. *Arch. Microbiol.* **110**, 305-311.
- Nelder, J. A. & Mead, R. (1965)** A simplex method for function minimization. *Computer J.* **7**, 308-313.
- Noll, F. (1984)** L-(+)-Lactate. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. VI, pp. 582-588. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.

- O'Brien, R. W., Chuang, D. T., Taylor, B. L. & Utter, M. F. (1977) Novel enzymic machinery for the metabolism of oxalacetate, phosphoenolpyruvate, and pyruvate in *Pseudomonas citronellolis*. *J. Biol. Chem.* **252**, 1257-1263.
- Osmani, S. A., Marston, F. A. O., Selmes, I. P., Chapman, A.G. & Scrutton, M. C. (1981) Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Regulatory properties. *Eur. J. Biochem.* **118**, 271-278.
- Osmani, S. A., Mayer, F., Marston, F. A. O., Selmes, I. P. & Scrutton, M. C. (1984) Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Effects of regulatory modifiers on the structure of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **139**, 509-518.
- Ozaki, H. & Shiio, I. (1969) Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. II. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *J. Biochem.* **66**, 297-311.
- Park, S. M., Shaw-Reid, C., Sinskey, A. J. & Stephanopoulos, G. (1997) Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via ^{13}C -NMR spectroscopy and GC-MS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 430-440.
- Peters-Wendisch, P. G. (1996) Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3259 (ISSN 0944-2952).
- Peters-Wendisch, P. G., Eikmanns, B. J., Thierbach, G., Bachmann, B. & Sahm, H. (1993) Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**, 269-274.
- Peters-Wendisch, P. G., Wendisch, V. F., de Graaf, A. A., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1996) C_3 -carboxylation as an anaplerotic reaction in phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **165**, 387-396.
- Peters-Wendisch, P. G., Wendisch, V. F., Paul, S., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1997) Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **143**, 1095-1103.
- Peters-Wendisch, P. G., Schiel, B., Wendisch, V. F., Katsoulidis, E., Möckel, B., Sahm, H. & Eikmanns, B. J. (2000) Significance of pyruvate carboxylase for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Veröffentlichung in Vorbereitung.
- Pronk, J. T., Steensma, H. Y. & van Dijken, J. P. (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 1607-1633.

- Rabkin, M. & Blum, J. J. (1985)** Quantitative analysis of intermediary metabolism in hepatocytes incubated in the presence and absence of glucagon with a substrate mixture containing glucose, ribose, fructose, alanine and acetate. *Biochem J.* **225**, 761-786.
- Raugi, G. J., Liang, T. & Blum, J. J. (1975)** A quantitative analysis of metabolite fluxes along some of the pathways of intermediary metabolism in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biol. Chem.* **250**, 5866-5876.
- Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1994a)** Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.* **176**, 3474-3483.
- Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J. & Sahm, H. (1994b)** Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology* **140**, 3099-3108.
- Rej, R. (1985)** Oxaloacetate, UV-method. In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. VII, pp. 59-67. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Riedel, C., Rittmann, D., Möckel, B. & Eikmanns, B. (2000)** The role of PEP carboxykinase for growth and amino acid production of *Corynebacterium glutamicum*. Vortrag auf dem 1. gemeinsamen Kongreß der DGHM, ÖGHMP und VAAM "Microbiology 2000", München, 12. - 16. März 2000.
- Robinson, C. W. & Wilke, C. R. (1973)** Oxygen absorption in stirred tanks: a correlation for ionic strength. *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 755.
- Rognstad, R. (1996)** Futile cycles in carbohydrate metabolism I. Background and current controversies on pyruvate cycling. *Biochem. Arch.* **12**, 71-83.
- Rushton, J. H., Costich, E. W. & Everett, H. J. (1950)** Power characteristics of mixing impellers, Part 2. *Chem. Eng. Prog.* **46**, 467.
- Russel, J. B. (1991)** A re-assessment of bacterial growth efficiency: the heat production and membrane potential of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. *Arch. Microbiol.* **155**, 559-565.
- Russell, J. B. & Cook, G. M., (1995)** Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* **59**, 48-62.
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B. J. & Krämer, R. (1995)** Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 243-252.

- Santruckowa, H. & Simek, M. (1994) Soil microorganisms at different CO₂ and O₂ tensions. *Folia Microbiol.* **39**, 225-230.
- Sanwal, B. D., Wright, J. A. & Smando, R. (1968) Allosteric control of the activity of malic enzyme in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 623-627.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M., Szyperski, T. & Wüthrich, K. (1997) Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnol.* **15**, 448-452.
- Schaefer, U., Boos, W., Takors, R. & Weuster-Botz, D. (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal. Biochem.* **270**, 88-96.
- Schrumpf, B. (1991) Lysinbildung mit *Corynebacterium glutamicum*: Analyse des Metabolitflusses durch Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen und enzymatische Untersuchungen. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 2478 (ISSN 0366-0885).
- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Eggeling, L. & Sahm, H. (1991) A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **173**, 4510-4516.
- Schrumpf, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992) Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 566-571.
- Schumpe, A., Quicker, G. & Deckwer, W.-D. (1982) Gas solubilities in microbial culture media. *Adv. Biochem. Eng.* **24**, 1-38.
- Scrutton, M. C. & Taylor, B. L. (1974) Isolation and characterization of pyruvate carboxylase from *Azotobacter vinelandii* OP. *Arch. Biochem. Biophys.* **164**, 641-654.
- Scrutton, M. C. & Young, M. R. (1972) Pyruvate carboxylase. In: The enzymes, Vol. 6, pp. 1-35. Boyer, B. D. (Ed.), Academic Press, New York.
- Segel, I. H. (1975) Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, Wiley, New York.
- Shiio, I. & Ujigawa, K. (1978) Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **84**, 647-657.

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

Shiio, I., Otsuka, S. I. & Takahashi, M. (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. *J. Biochem.* **52**, 108-116.

Shiio, I., Mori, M. & Ozaki, H. (1982) Amino acid aminotransferases in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Bio. Chem.* **46**, 2967-2977.

Shiio, I., Yokota, A. & Sugimoto, S. (1987) Effect of pyruvate kinase deficiency on L-lysine productivities of mutants with feedback-resistant aspartokinases. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2485-2493.

Sonntag, K., Eggeling, L., de Graaf, A. A. & Sahm, H. (1993) Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Quantification by ^{13}C - and ^1H -NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1325-1331.

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

Spies, M. (1996) Nachweis und Quantifizierung von CoA und CoA-Derivaten und Untersuchungen zur Rolle von Acetyl-CoA bei der Regulation des Acetat-Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit Fachhochschule Jülich.

Stephanopoulos, G. & Vallino, J. J. (1991) Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* **252**, 1675-1681.

Stitt, M. (1984) Citrate synthase (condensing enzyme). In: *Methods of enzymatic analysis*, 3rd Ed., Vol. IV, pp. 353-358. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim.

Stoscheck, C. M. (1990) Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* **182**, 50-68.

Stryer, L. (1988) Biochemistry, 3rd Ed., W. H. Freeman Co., New York.

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

Teixeira de Mattos, M. J. & Neijssel, O. M. (1997) Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low nutrient environments. *J. Biotechnol.* **59**, 117-126.

- Tempest, D. W. & Neijssel, O. M. (1984)** The status of Y_{ATP} and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**, 459-486.
- Tesch, M., de Graaf, A. A. & Sahm, H. (1999)** *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by ^{15}N nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1099-1109.
- Tosaka, O., Morioka, H. & Takinami, K. (1979)** The role of biotin-dependent pyruvate carboxylase in L-lysine production. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1513-1519.
- Vallino, J. J. (1991)** Identification of branch-point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network perturbations. Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts.
- Vallino, J. J. & Stephanopoulos, G. (1990)** Flux determination in cellular bioreaction networks: application to lysine fermentation. In: *Frontiers in bioprocessing*, pp. 205-219. Sikdar, S. K., Bier, M., Todd, P. (Eds.), CRC Press, Boca Raton.
- Vallino, J. J. & Stephanopoulos, G. (1994)** Carbon flux distributions at the glucose 6-phosphate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnol. Prog.* **10**, 327-334.
- Varma, A. & Palsson, B. O. (1994)** Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio/Technol.* **12**, 994-998.
- Vrljic, M., Sahm, H. & Eggeling, L. (1996)** A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**, 815-826.
- Wendisch, V. F. (1997)** Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich* 3397 (ISSN 0944-2952).
- Wendisch, V. F., Spies, M., Reinscheid, D. J., Schnicke, S., Sahm, H. & Eikmanns, B. J. (1997)** Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch. Microbiol.* **168**, 262-269.
- Weuster-Botz, D., Kelle, R., Frantzen, M. & Wandrey, C. (1997)** Substrate controlled fed-batch production of L-lysine with *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Prog.* **13**, 387-393.

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

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

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

Yagi, T., Kagamiyama, H. & Nozaki, M. (1982) Aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase from bakers' yeast: crystallization and characterization. *J. Biochem.* **92**, 35-43.

Yokota, A. & Shiio, I. (1988) Effects of reduced citrate synthase activity and feedback-resistant phosphoenolpyruvate carboxylase on lysine productivities of *Brevibacterium flavum* mutants. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 455-463.

Zeng, A.-P. (1995) Effect of CO₂ absorption on the measurement of CO₂ evolution rate in aerobic and anaerobic continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 688-691.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

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

7 Anhang

7.1 Computerbasierte Auswertung von ^{13}C -Markierungsdaten und Bestimmung intrazellulärer Stoffflüsse

Biochemisches ^{13}C -Markierungsmodell. Das für die Stoffflußanalysen verwendete Markierungsmodell des Zentralstoffwechsels von *Corynebacterium glutamicum* ist in Abbildung 28 (Reaktionsschema) und Abbildung 29 (Umsetzungen der Kohlenstoffatome) dargestellt. Das Modell wurde im wesentlichen von Marx (1997) übernommen. Für die vorliegende Arbeit wurden zusätzlich mehrfache anaplerotische Reaktionen berücksichtigt. Die verschiedenen C_3 -Carboxylierungs- und C_4 -Decarboxylierungsreaktionen wurden mathematisch als zwei reversible Umsetzungen behandelt; eine zwischen PEP und Oxalacetat/Malat ($v_{\text{AR-1}}$), die andere zwischen Pyruvat und Oxalacetat/Malat ($v_{\text{AR-2}}$). Abbildung 30 zeigt die Umsetzungen der Kohlenstoffatome in den Biosynthesewegen der für die NMR-Messungen verwendeten Biomasse-Bestandteile, d.h. der proteinogenen Aminosäuren sowie von Glycerin aus der Hydrolyse von Lipiden (Sonntag *et al.*, 1993; Szyperski, 1995).

Bestimmung der Stoffflüsse im Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum*. Die Flußbestimmung erfolgte mit Hilfe der kürzlich von Wiechert *et al.* (1999) und Möllney *et al.* (1999) entwickelten mathematischen Lösung von Isotopomer-Markierungssystemen. Dazu wurde das oben beschriebene Markierungsmodell, welches ein solches Markierungssystem darstellt, in einem computergestützten Verfahren an die NMR-Daten angepaßt, d.h., es wurde die Quadratsumme aus den Abweichungen zwischen simulierten (Wiechert *et al.*, 1999) und gemessenen Markierungen minimiert. Diese Abweichungen wurden dabei entsprechend den Meßgenauigkeiten gewichtet, so daß jeweils das Verhältnis aus Modellabweichung und Meßfehler den Beitrag zur Fehlerquadratsumme bestimmte. Dem Verfahren zur Flußidentifikation lag ein Simplex-Algorithmus nach Nelder und Mead (1965) zugrunde (M. Möllney, pers. Mitteilung 1998).

Als Randbedingungen für die intrazelluläre Flußbestimmung wurden die spezifischen Aufnahmeraten der Substrate Glucose und Lactat, die aus der Wachstumsrate folgenden Abflüsse von Metaboliten in die Biomassessynthese (Marx, 1997; Tabelle 24) sowie bei den lysinproduzierenden Stämmen auch die Lysinproduktionsrate verwendet. Für die Umsetzung von PEP zu Pyruvat wurde ein Minimalwert in Höhe der Glucoseaufnahme festgesetzt, da *C. glutamicum* Glucose über ein PEP-abhängiges Phosphotransferasesystem aufnimmt (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Krämer, 1996). Die Markierung im dritten Kohlenstoffatom von Serin wurde für die Anpassung nicht berücksichtigt, da diese Position, wahrscheinlich aufgrund eines Rückflusses von Glycin nach Serin über die Serin-Hydroxymethyltransferase (Stryer, 1988) starke Inkonsistenzen mit dem Modell aufwies.

Tabelle 24: Bedarf an Vorläufermetaboliten für die Biomassessynthese in *C. glutamicum* nach Marx (1997).

Metabolit	Bedarf (mmol/g TG)	Metabolit	Bedarf (mmol/g TG)
Glucose-6-phosphat	0,21	Phosphoenolpyruvat	0,53
Fructose-6-phosphat	0,07	Pyruvat	2,69 (1,81 ¹)
Pentose-5-phosphate	0,88	Acetyl-Coenzym A	2,94 (2,50 ¹)
Erythrose-4-phosphat	0,27	α -Ketoglutarat	1,25
Triosephosphate	0,13	Oxalacetat	1,71
3-Phosphoglycerat	1,29		

¹ abweichender Vorläuferbedarf in *C. glutamicum* MH20-22B infolge der Leucin-Auxotrophie dieses Stammes

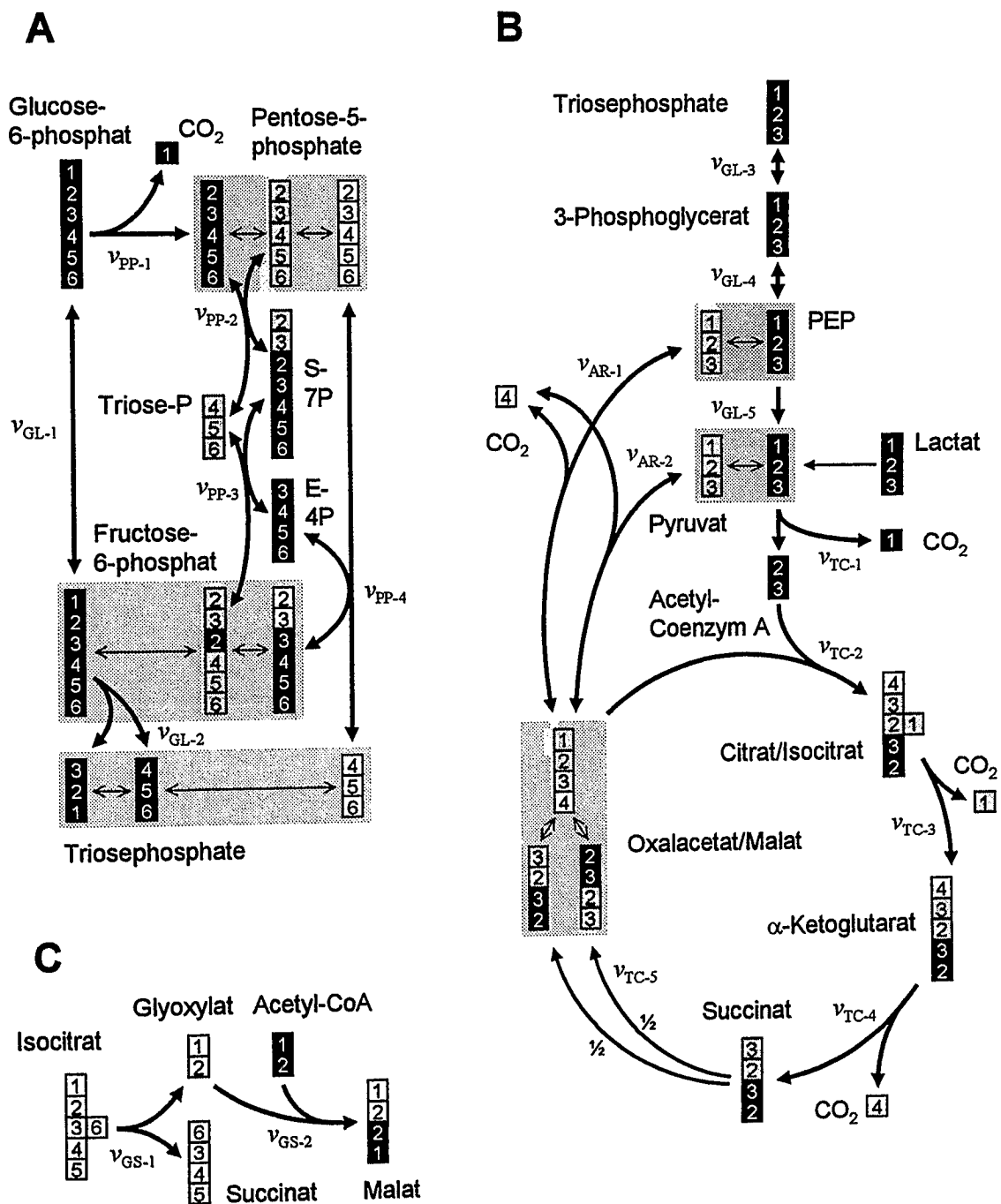


Abbildung 29: Umsetzungen der Kohlenstoffatome in den Reaktionen des Zentralstoffwechsels. **A** Pentosephosphatweg und Glycolyse bis zu den Triosephosphaten (Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat). **B** Glycolyse ab Triosephosphate, Citratzyklus und anaplerotische Carboxylierungen/Decarboxylierungen. **C** Glyoxylatweg.

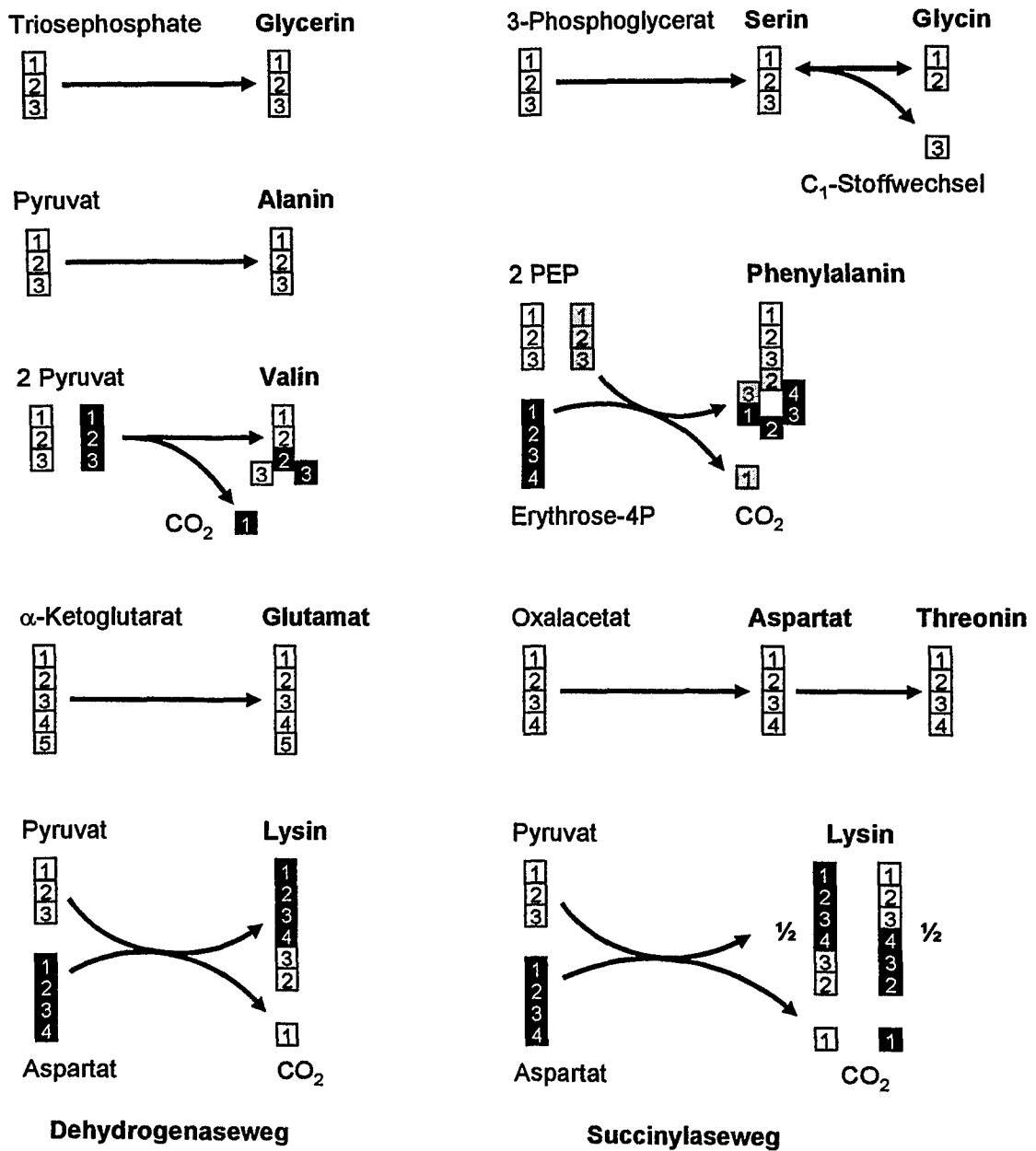


Abbildung 30: Umsetzungen der Kohlenstoffatome in den Biosynthesewegen der für die NMR-Messungen verwendeten Aminosäuren sowie Glycerin. Die Lysinsynthese in *Corynebacterium glutamicum* verzweigt in den Dehydrogenase- und den Succinylaseweg.

7.2 Vollständige Datensätze der ^{13}C -gestützten Stoffflußanalysen

Die ^{13}C -Markierung der Chemostatkulturen wurde stets über die Dauer von drei Verweilzeiten durchgeführt, was 95% ($= 1 - e^{-3}$) isotopischer Gleichgewichtseinstellung der markierten Biomassebestandteile entspricht. Die folgenden Tabellen wie auch alle weiteren Angaben zu ^{13}C -Markierungen in der vorliegenden Arbeit geben bereits die auf vollständiges isotopisches Gleichgewicht extrapolierten Daten wieder.

Tabelle 25: Markierungsdaten des *C. glutamicum*-Wildtyps. Erläuterung der Feinstrukturen s, d₁, d₊₁ und dd siehe Abbildung 9. n.b., nicht bestimmt.

Verbindung	C-Atom	^{13}C (%)	Feinstrukturen (% des ^{13}C -Signals)			
			s	d ₁	d ₊₁	dd
Glycerin	1	n.b.	41,0 ± 0,7		59,0 ± 0,8	
	2	n.b.	14,5 ± 0,7	15,6 ± 0,4 ²		69,9 ± 1,1
L-Serin	2	12,0 ± 0,4	20,2 ± 0,7 ³	17,6 ± 0,7 ³	11,1 ± 0,9 ³	51,1 ± 2,1 ³
Glycin	2	n.b.	31,4 ± 0,3	68,6 ± 0,3		
L-Phenylalanin	2	12,2 ± 0,4	21,4 ± 0,8	7,8 ± 0,7	10,9 ± 0,9	59,9 ± 1,7
	3	19,9 ± 1,6	51,5 ± 0,9	35,7 ± 0,7	7,5 ± 0,6	5,3 ± 0,6
	5, 9 ¹	17,8 ± 0,4				
	6, 7, 8 ¹	9,5 ± 1,0				
L-Alanin	2	11,6 ± 0,3	22,3 ± 0,3	8,6 ± 0,3	12,2 ± 0,4	56,9 ± 0,4
	3	25,3 ± 0,6	67,2 ± 1,0	32,8 ± 0,8		
L-Valin	4	n.b.	68,5 ± 0,3	31,6 ± 0,5		
	5	n.b.	88,0 ± 0,4	12,0 ± 0,6 ⁴		
L-Aspartat	2	n.b.	41,2 ± 0,6	18,4 ± 0,5	13,8 ± 0,4	26,6 ± 0,7
	3	22,7 ± 0,4	56,4 ± 0,3	21,0 ± 0,4	16,5 ± 0,3	6,1 ± 0,3
L-Threonin	3	23,4 ± 1,4		n.b.		
	4	15,3 ± 0,4	66,6 ± 0,3	33,4 ± 0,3		
L-Glutamat	2	23,3 ± 0,2	57,7 ± 1,4	16,9 ± 0,5	20,3 ± 0,5	5,1 ± 0,7
	3	15,4 ± 0,4	43,7 ± 1,5	46,0 ± 1,4 ²		10,3 ± 1,0
	4	26,7 ± 0,4	58,4 ± 0,6	11,9 ± 0,5	24,6 ± 0,4	5,1 ± 0,4

Tabelle 25 (Fortsetzung)

Verbindung	C-Atom	^{13}C (%)	Feinstrukturen (% des ^{13}C -Signals)			
			s	d ₁	d ₊₁	dd
L-Lysin	3	20,3 ± 0,8	53,3 ± 0,6	43,1 ± 0,9 ²		3,6 ± 1,1
	4	n.b.	43,5 ± 2,5	40,5 ± 2,2 ²		16,0 ± 3,2
	5	n.b.	57,2 ± 1,9 ⁵	42,8 ± 3,6 ²		n.b.
	6	12,8 ± 0,8	41,7 ± 0,3	58,4 ± 0,7		
CO ₂ (Abgas)	1	14,5 ± 0,6				

¹ Mittelwert der angegebenen Positionen.

² Summe von d₁ und d₊₁ (gleiche oder fast gleiche Kopplungskonstanten).

³ Von Serin C-2 wurden stets nur die Summen aus s und d₊₁ sowie d₁ und dd berücksichtigt, da die dritte Position von der Reaktion der Serin-Hydroxymethyltransferase beeinflusst wird.

⁴ Kopplung zu Kohlenstoffatom 3.

⁵ Summe aus s und dd/2.

Tabelle 26: Intrazelluläre Kohlenstoffflüsse im *C. glutamicum*-Wildtyp. Es sind nur die nicht bereits in Abbildung 11 enthaltenen Flüsse angegeben. Die Fehlergrenzen entsprechen 90% Konfidenz nach statistischer Analyse (Wiechert *et al.*, 1997; Möllney *et al.*, 1999). n.e., nicht ermittelbar.

Flußbezeichnung (siehe Abb. 28)	Nettofluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)		Austauschfluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	
v _{PP-1}	0,29	± 0,13	-	
v _{PP-2}	0,08	± 0,04	< 0,18	
v _{PP-3}	0,08	± 0,04	n.e.	
v _{PP-4}	0,05	± 0,04	< 0,79	
v _{GL-1}	0,82	± 0,13	n.e.	
v _{GL-2}	0,94	± 0,15	-	
v _{GL-3}	1,91	± 0,08	2,2	± 0,7
v _{GL-4}	1,79	± 0,08	8,2	± 3,8
v _{TC-5}	0,96	± 0,12	0,20	± 0,16

Der Anteil des Succinylasewegs an der Lysinsynthese betrug 60 ± 5%.

Tabelle 27: Markierungsdaten aus der Kultivierung von *C. glutamicum* MH20-22B bei $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ und 4 mbar CO_2 .

Verbindung	C-Atom	^{13}C (%)	Feinstrukturen (% des ^{13}C -Signals)			
			s	d_1	d_{+1}	dd
Glycerin	1	n.b.	$40,7 \pm 0,3$		$59,3 \pm 0,4$	
	2	n.b.	$12,9 \pm 1,5$		$16,6 \pm 1,2^2$	$70,5 \pm 2,4$
L-Serin	2	$11,8 \pm 0,8$	$21,1 \pm 0,6$	$21,5 \pm 0,6$	$11,8 \pm 1,0$	$45,6 \pm 1,7$
Glycin	2	$10,0 \pm 2,0$			n.b.	
L-Phenylalanin	2	$12,6 \pm 0,3$	$21,5 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,4$	$12,9 \pm 0,6$	$58,3 \pm 0,6$
	3	$19,3 \pm 0,3$			n.b.	
	5, 9 ¹	$17,1 \pm 1,0$				
	6, 7, 8 ¹	$9,8 \pm 0,4$				
L-Alanin	2	$11,6 \pm 0,3$	$22,4 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,3$	$13,5 \pm 0,3$	$55,9 \pm 0,3$
	3	$25,1 \pm 0,3$	$67,7 \pm 0,8$	$32,3 \pm 0,6$		
L-Aspartat	2	$16,2 \pm 0,5$	$39,5 \pm 0,3$	$18,2 \pm 0,3$	$14,1 \pm 0,4$	$28,2 \pm 0,5$
	3	$21,7 \pm 0,5$	$53,4 \pm 0,3$	$22,1 \pm 0,3$	$17,3 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,3$
L-Threonin	3	$22,7 \pm 0,5$			n.b.	
	4	$15,5 \pm 0,9$			n.b.	
L-Glutamat	2	$21,5 \pm 0,5$	$54,3 \pm 0,3$	$17,3 \pm 0,3$	$22,1 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,3$
	3	$15,6 \pm 0,3$	$45,0 \pm 0,9$		$45,3 \pm 1,1^2$	$9,7 \pm 0,8$
	4	$25,2 \pm 0,3$	$58,0 \pm 0,7$	$11,5 \pm 0,6$	$25,4 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,4$
L-Lysin	2	n.b.	$31,3 \pm 1,9$	$16,3 \pm 1,1$	$14,2 \pm 1,1$	$38,2 \pm 2,1$
	3	n.b.	$53,0 \pm 1,4$		$41,0 \pm 1,4^2$	$6,0 \pm 1,7$
	4	n.b.	$46,2 \pm 3,0$		$41,6 \pm 2,6^2$	$12,2 \pm 3,8$
	5	n.b.	$54,3 \pm 1,2$		$39,1 \pm 1,5^2$	$6,6 \pm 0,9$
	6	n.b.	$41,8 \pm 0,6$	$58,2 \pm 0,5$		
CO_2 (Abgas)	1	$14,4 \pm 0,5$				

¹ Mittelwert.² Summe aus d^{-1} und d^{+1} .

Tabelle 28: Markierungsdaten aus der Kultivierung von *C. glutamicum* MH20-22B bei $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ und 60 mbar CO_2 .

Verbindung	C-Atom	^{13}C (%)	Feinstrukturen (% des ^{13}C -Signals)			
			s	d_1	d_{+1}	dd
Glycerin	1	n.b.	$41,4 \pm 0,8$		$58,6 \pm 1,1$	
	2	n.b.	$14,8 \pm 0,9$	$17,7 \pm 0,6^2$		$67,5 \pm 1,2$
L-Serin	2	$11,9 \pm 0,5$	$23,3 \pm 0,9$	$21,8 \pm 0,9$	$11,9 \pm 1,4$	$43,0 \pm 2,0$
Glycin	2	n.b.	$35,5 \pm 0,3$	$64,5 \pm 0,3$		
L-Phenylalanin	2	$13,5 \pm 0,3$	$23,0 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,3$	$13,7 \pm 0,4$	$56,5 \pm 0,6$
	3	$19,4 \pm 0,5$			n.b.	
	5, 9 ¹	$14,3 \pm 1,2$				
	6, 7, 8 ¹	$7,0 \pm 0,5$				
L-Alanin	2	n.b.	$23,6 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,3$	$14,6 \pm 0,5$	$53,6 \pm 0,5$
	3	$26,9 \pm 0,7$	$68,6 \pm 1,9$	$31,2 \pm 1,5$		
L-Valin	4, 5 ¹	$26,3 \pm 0,9$				
	4	n.b.	$71,1 \pm 0,3$	$28,9 \pm 0,6$		
	5	n.b.	$87,5 \pm 0,9$	$12,5 \pm 1,6^3$		
L-Aspartat	2	n.b.	$42,5 \pm 0,3$	$17,3 \pm 0,3$	$15,9 \pm 0,3$	$24,3 \pm 0,8$
	3	$23,0 \pm 0,6$	$60,4 \pm 0,4$	$25,2 \pm 0,5$	$10,4 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,4$
L-Threonin	4	$8,3 \pm 0,3$	$60,4 \pm 1,2$	$39,6 \pm 1,2$		
L-Glutamat	2	$22,9 \pm 0,8$	$59,4 \pm 0,7$	$11,5 \pm 0,4$	$23,9 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,6$
	3	$16,6 \pm 0,3$	$44,3 \pm 0,6$	$45,7 \pm 1,2$		$10,0 \pm 0,7$
	4	$26,7 \pm 0,4$	$58,0 \pm 1,3$	$13,1 \pm 0,8$	$23,3 \pm 0,6$	$5,5 \pm 0,7$
L-Lysin	2	n.b.	$37,3 \pm 0,7$	$15,3 \pm 0,9$	$15,5 \pm 0,6$	$31,9 \pm 1,1$
	3	n.b.	$60,8 \pm 0,8$	$36,2 \pm 1,7$		$3,0 \pm 0,7$
	4	n.b.	$43,6 \pm 1,3$	$44,8 \pm 2,1$		$11,6 \pm 1,4$
	5	n.b.	$61,3 \pm 0,6$	$34,8 \pm 0,6$		$3,9 \pm 1,1$
	6	n.b.	$42,2 \pm 0,3$	$57,8 \pm 0,6$		

¹ Mittelwert.

² Summe aus d^{-1} und d^{+1} .

³ Kopplung zu C-3.

Tabelle 29: Intrazelluläre Kohlenstoffflüsse in *C. glutamicum* MH20-22B bei CO₂-Partialdrücken von 4 und 60 mbar. Es sind nur die nicht bereits in Tabelle 8 enthaltenen Flüsse angegeben.

Fluß- bezeichnung	4 mbar CO ₂			60 mbar CO ₂		
	Nettofluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)		Austauschfluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Nettofluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)		Austauschfluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)
v _{PP-1}	0,50	± 0,23	-	0,56	± 0,35	-
v _{PP-2}	0,15	± 0,08	n.e.	0,17	± 0,12	< 0,77
v _{PP-3}	0,15	± 0,08	< 0,47	0,17	± 0,12	n.e.
v _{PP-4}	0,12	± 0,08	< 0,67	0,14	± 0,12	< 1,0
v _{GL-1}	0,84	± 0,23	n.e.	0,74	± 0,35	n.e.
v _{GL-2}	1,10	± 0,28	-	1,04	± 0,42	-
v _{GL-3}	2,30	± 0,10	3,7 ± 2,0	2,20	± 0,13	2,3 ± 0,7
v _{GL-4}	2,18	± 0,10	> 5,4	2,08	± 0,13	> 9,5
v _{GL-5}	2,85	± 0,11	-	2,55	± 0,14	-
v _{TC-1}	1,32	± 0,14	-	1,34	± 0,16	-
v _{TC-2}	1,07	± 0,15	-	1,08	± 0,18	-
v _{TC-3}	1,07	± 0,16	-	1,08	± 0,19	-
v _{TC-4}	0,95	± 0,16	-	0,96	± 0,19	-
v _{TC-5}	0,95	± 0,15	0,55 ± 0,19	0,96	± 0,18	0,67 ± 0,31

Der Anteil des Succinylasewegs an der Lysinsynthese betrug 70 ± 6% bei 4 mbar CO₂ und 57 ± 14% bei 60 mbar CO₂.

Tabelle 30: Markierungsdaten aus der Kultivierung von *C. glutamicum* MH20-22B bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ^{13}C -Signals)			
		s	d ₁	d ₊₁	dd
Glycerin	1	39,6 ± 1,7		60,4 ± 1,8	
	2	11,4 ± 0,8	18,1 ± 0,9 ¹		70,5 ± 1,1
L-Serin	2	23,3 ± 0,4	23,4 ± 0,5	10,5 ± 0,3	43,1 ± 0,7
Glycin	2	33,3 ± 0,5	66,7 ± 0,7		
L-Phenylalanin	2	22,0 ± 0,6	7,2 ± 0,7	11,4 ± 0,6	59,4 ± 0,7
	3	48,4 ± 0,5	45,9 ± 0,5 ¹		5,7 ± 0,7
L-Alanin	2	20,7 ± 0,4	7,0 ± 0,3	12,2 ± 0,5	60,1 ± 0,4
	3	67,0 ± 0,9	33,0 ± 0,7		
L-Aspartat	2	36,5 ± 0,4	16,9 ± 0,4	14,4 ± 0,5	32,2 ± 0,5
	3	54,4 ± 0,3	23,9 ± 0,3	15,3 ± 0,3	6,4 ± 0,3
L-Threonin	4	67,9 ± 2,2	32,1 ± 1,9		
L-Glutamat	3	40,5 ± 0,6	48,3 ± 0,7 ¹		11,2 ± 0,5
	4	57,7 ± 0,3	11,6 ± 0,5	26,3 ± 0,3	4,4 ± 0,4
L-Lysin	4	49,3 ± 0,9	41,7 ± 1,6 ¹		9,0 ± 0,7
	5	55,7 ± 0,8	37,4 ± 1,0 ¹		6,9 ± 0,9
	6	40,8 ± 1,0	59,2 ± 1,0		

¹ Summe aus d⁻¹ und d⁺¹.

Der ^{13}C -Gehalt des Kohlendioxids im Abgas des Bioreaktors betrug 14,3 ± 0,5%.

Tabelle 31: Markierungsdaten aus der Kultivierung von *C. glutamicum* MH20-22B bei $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$.

Verbindung	C-Atom	Feinstrukturen (% des ^{13}C -Signals)			
		s	d ₁	d ₊₁	dd
Glycerin	1	36,6 ± 0,5		63,4 ± 0,7	
	2	11,0 ± 0,9	15,3 ± 0,8 ¹		73,7 ± 1,3
L-Serin	2	13,9 ± 0,6	11,3 ± 0,5	11,2 ± 0,5	63,6 ± 1,0
Glycin	2	26,7 ± 0,3	73,3 ± 0,3		
L-Phenylalanin	2	20,0 ± 0,7	3,5 ± 0,7	16,0 ± 1,6	60,5 ± 1,2
	3	43,5 ± 0,3	49,6 ± 0,4 ¹		6,9 ± 0,4
L-Alanin	2	16,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4	12,1 ± 0,6	66,5 ± 0,6
	3	68,9 ± 0,3	31,1 ± 0,3		
L-Aspartat	2	39,8 ± 0,3	18,9 ± 0,3	15,2 ± 0,3	26,1 ± 0,3
	3	53,0 ± 0,4	22,5 ± 0,3	17,5 ± 0,3	7,0 ± 0,4
L-Threonin	3	54,1 ± 0,3	39,5 ± 0,5 ¹		6,4 ± 0,4
	4	63,6 ± 0,5	36,4 ± 1,1		
L-Glutamat	3	41,2 ± 0,9	46,1 ± 1,1 ¹		12,7 ± 1,0
	4	58,4 ± 0,5	12,2 ± 0,5	25,5 ± 0,4	3,9 ± 0,7
L-Lysin	4	42,5 ± 1,1	45,5 ± 2,0 ¹		12,0 ± 1,6
	5	56,6 ± 0,9	37,8 ± 0,9 ¹		5,6 ± 1,1
	6	39,3 ± 0,9	60,7 ± 0,8		

¹ Summe aus d⁻¹ und d⁺¹.Der ^{13}C -Gehalt des Kohlendioxids im Abgas des Bioreaktors betrug 15,3 ± 0,5%.

Tabelle 32: Intrazelluläre Kohlenstoffflüsse in *C. glutamicum* MH20-22B bei Wachstumsraten von 0,075 und 0,25 h⁻¹. Es sind nur die nicht bereits in Abbildungen 12 und 13 enthaltenen Flüsse angegeben.

Fluß- bezeichnung	$\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$		$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$	
	Nettofluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Austauschfluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Nettofluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Austauschfluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)
v_{PP-1}	< 0,48	-	1,10 ± 0,39	-
v_{PP-2}	< 0,14	n.e.	0,32 ± 0,13	n.e.
v_{PP-3}	< 0,14	n.e.	0,32 ± 0,13	< 3,4
v_{PP-4}	< 0,12	< 0,86	0,25 ± 0,13	< 3,8
v_{GL-1}	1,01 ± 0,31	n.e.	1,69 ± 0,40	n.e.
v_{GL-2}	1,06 ± 0,37	-	2,24 ± 0,48	-
v_{GL-3}	2,14 ± 0,12	1,6 ± 0,5	4,69 ± 0,21	n.e.
v_{GL-4}	2,04 ± 0,12	> 14	4,36 ± 0,21	6,4 ± 4,6
v_{TC-5}	1,26 ± 0,21	< 0,20	1,49 ± 0,31	1,8 ± 0,9

Der Anteil des Succinylasewegs an der Lysinsynthese betrug $65 \pm 12\%$ bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$ und $71 \pm 9\%$ bei $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$.

Tabelle 33: Markierungsdaten aus der Kultivierung der *pck*-Defektmutante *C. glutamicum* MH20-22B Δpck 20.

Verbindung	C-Atom	^{13}C (%)	Feinstrukturen (% des ^{13}C -Signals)			
			s	d ₁	d ₊₁	dd
Glycerin	1	n.b.	37,1 ± 0,3		62,9 ± 0,3	
	2	n.b.	12,4 ± 0,6	13,4 ± 0,5 ²		74,2 ± 0,5
L-Serin	2	11,1 ± 0,5	15,8 ± 0,3	21,7 ± 0,3	9,9 ± 0,3	52,6 ± 0,3
Glycin	2	11,4 ± 0,5	26,8 ± 0,6	73,2 ± 0,6		
L-Phenylalanin	2	10,8 ± 0,6	14,1 ± 0,4	1,2 ± 0,4	12,0 ± 1,2	72,7 ± 0,5
	3	16,6 ± 0,5	41,0 ± 1,0	52,4 ± 1,3 ²		6,6 ± 0,8
	5, 9 ¹	15,0 ± 1,2				
	6, 7, 8 ¹	9,2 ± 0,7				
L-Alanin	2	n.b.	14,8 ± 0,3	2,9 ± 0,3	12,4 ± 0,4	69,9 ± 0,3
	3	26,0 ± 0,4	69,3 ± 0,6	30,7 ± 0,5		
L-Valin	3	10,9 ± 2,0		n.b.		
	4, 5 ¹	24,6 ± 1,0				
L-Aspartat	2	n.b.	43,0 ± 0,3	19,8 ± 0,3	13,7 ± 0,3	23,5 ± 0,3
	3	22,6 ± 0,4	54,1 ± 0,4	20,7 ± 0,3	18,8 ± 0,3	6,4 ± 0,5
L-Threonin	4	n.b.	63,7 ± 0,3	36,3 ± 0,3		
L-Glutamat	2	23,4 ± 0,5		n.b.		
	3	17,0 ± 0,4	46,3 ± 0,5	43,4 ± 0,6 ²		10,3 ± 0,4
	4	26,4 ± 0,5	59,5 ± 0,5	10,7 ± 0,6	26,4 ± 0,4	3,5 ± 0,6
L-Lysin	4	n.b.	45,1 ± 1,2	44,7 ± 1,7 ²		10,2 ± 1,3
	5	n.b.	56,7 ± 1,1	37,2 ± 2,0 ²		6,1 ± 1,2
	6	n.b.	43,0 ± 0,6	57,0 ± 0,5		
CO ₂ (Abgas)	1	14,2 ± 0,5				

¹ Mittelwert.² Summe aus d⁻¹ und d⁺¹.

Tabelle 34: Markierungsdaten aus der Kultivierung des *pck*-Überexprimierers *C. glutamicum* MH20-22B pEK0-*pck* B.

Verbindung	C-Atom	¹³ C (%)	Feinstrukturen (% des ¹³ C-Signals)			
			s	d ₁	d ₊₁	dd
Glycerin	1	n.b.	42,5 ± 0,7		57,5 ± 1,5	
	2	n.b.	15,0 ± 1,3		17,3 ± 1,3 ²	67,7 ± 2,5
L-Serin	2	13,7 ± 0,5			n.b.	
Glycin	2	n.b.	39,2 ± 0,3	60,8 ± 0,3		
L-Phenylalanin	2	13,6 ± 0,5	27,4 ± 0,4	12,2 ± 0,7	13,5 ± 0,8	46,9 ± 0,6
	3	20,2 ± 0,7			n.b.	
	5, 9 ¹	16,1 ± 2,0				
	6, 7, 8 ¹	9,2 ± 1,5				
L-Alanin	2	12,0 ± 0,3	28,0 ± 1,1	12,2 ± 1,4	13,3 ± 1,8	46,5 ± 1,6
	3	28,1 ± 0,3	73,5 ± 0,7	26,5 ± 0,6		
L-Aspartat	2	n.b.	39,0 ± 1,5	16,2 ± 0,7	13,8 ± 0,7	31,0 ± 0,8
	3	22,0 ± 1,1	56,0 ± 0,3	24,3 ± 0,3	13,8 ± 0,3	5,9 ± 0,3
L-Glutamat	2	23,5 ± 0,5			n.b.	
	3	16,1 ± 0,5	41,0 ± 0,5	47,0 ± 0,7 ²		12,0 ± 0,7
	4	28,0 ± 0,5	63,6 ± 0,5	10,9 ± 0,9	21,3 ± 0,6	4,2 ± 1,0
L-Lysin	4	n.b.	49,7 ± 1,0	40,5 ± 2,0 ²		9,8 ± 1,0
	5	n.b.	58,8 ± 1,0	34,5 ± 0,6 ²		6,7 ± 0,9
	6	n.b.	47,6 ± 1,6	52,4 ± 2,2		
CO ₂ (Abgas)	1	14,4 ± 0,5				

¹ Mittelwert.² Summe aus d⁻¹ und d⁺¹.

Tabelle 35: Intrazelluläre Kohlenstoffflüsse in *C. glutamicum*-Stämmen mit veränderter PEP-Carboxykinase-Aktivität. Es sind nur die nicht bereits in Abbildungen 15 und 16 enthaltenen Flüsse angegeben.

Fluß- bezeichnung	<i>C. g.</i> MH20-22B Δpck 20			<i>C. g.</i> MH20-22B pEK0- <i>pck</i> B		
	Nettofluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)		Austauschfluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)	Nettofluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)		Austauschfluß (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)
v_{PP-1}	0,83	± 0,18	-	< 0,42		-
v_{PP-2}	0,26	± 0,06	n.e.	< 0,13		n.e.
v_{PP-3}	0,26	± 0,06	n.e.	< 0,13		n.e.
v_{PP-4}	0,24	± 0,06	< 1,3	< 0,11		< 1,1
v_{GL-1}	0,40	± 0,19	> 1,4	1,02	± 0,24	n.e.
v_{GL-2}	0,89	± 0,22	-	1,08	± 0,29	-
v_{GL-3}	2,02	± 0,09	n.e.	2,17	± 0,10	1,2 ± 0,7
v_{GL-4}	1,92	± 0,09	n.e.	2,08	± 0,10	> 9
v_{TC-5}	0,94	± 0,14	< 0,14	1,37	± 0,25	< 0,34

Der Anteil des Succinylasewegs an der Lysinsynthese betrug $82 \pm 6\%$ in der *pck*-Defektmutante (*C. glutamicum* MH20-22B Δpck 20) und mindestens 57% im *pck*-Überexprimierer (*C. glutamicum* MH20-22B pEK0-*pck* B).

7.3 Zusammenfassung des mathematischen Regulationsmodells der Anaplerosis von *C. glutamicum* und Computerprogramm zur Berechnung von Stoffflüssen und Metabolitkonzentrationen

Nachstehend sind die wesentlichen Gleichungen des anaplerotischen Regulationsmodells (Abschnitt 3.6) in komprimierter Form zusammengefaßt, wobei auf die Nummern der entsprechenden Gleichungen im Text verwiesen wird. Die Parameter des Modells sind in Tabelle 36 aufgelistet.

Modellstöchiometrie (vgl. Abbildung 24):

$$q_C = 6 \cdot q_{\text{Glc}} + 3 \cdot q_{\text{Lact}} \quad \text{mit} \quad \frac{q_{\text{Glc}}}{q_{\text{Lact}}} = \frac{21}{4} \quad (54), (55)$$

$$v_{\text{C3}} = \frac{6 \cdot q_{\text{Glc}} - v_{\text{PP}} - 11,42 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu}{3} \quad (47)$$

$$v_{\text{C3}} + v_{\text{PEPCK}} = v_{\text{PEPCx}} + v_{\text{PK}} + q_{\text{Glc}} + 0,53 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (48), (49)$$

$$q_{\text{Lact}} + v_{\text{PK}} + v_{\text{PTS}} = q_{\text{Lys}} + v_{\text{PCx}} + v_{\text{CS}} + 4,31 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (50)$$

$$v_{\text{PEPCx}} + v_{\text{PCx}} - v_{\text{PEPCK}} = v_{\text{AAT}} + 1,25 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (51)$$

$$v_{\text{AAT}} = 1,71 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu + q_{\text{Lys}} \quad (35)$$

$$v_{\text{Lys}} = q_{\text{Lys}} + 0,20 \text{ mmol g}^{-1} \cdot \mu \quad (52)$$

$$q_C = \frac{\mu}{Y_{\text{X/C}}} + \frac{q_{\text{Lys}}}{Y_{\text{Lys/C}}} + 1,63 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1} + 0,46 \cdot v_{\text{PEPCK}} \quad (25), (53)$$

$$2 v_{\text{PP}} + v_{\text{ICDH}} = \frac{\mu}{Y_{\text{X/NADPH}}} + \frac{q_{\text{Lys}}}{Y_{\text{Lys/NADPH}}} + m_{\text{NADPH}} \quad (56)$$

Enzymkinetische Zusammenhänge:

$$\frac{v_{\text{PEPCx}}}{v_{\text{PEPCx,max}}} \cdot \sqrt{\frac{v_{\text{PK,max}}}{v_{\text{PK}}}} = \frac{k_{\text{PEP}}}{1 + \left(\frac{[\text{Asp}]}{K_{i\text{Asp,PEPCx}}} \right)^2} \quad (37), (41)$$

$$v_{\text{PCx}} = \frac{v'_{\text{PCx,max}}}{1 + \frac{K_{m\text{Pyr,PCx}}}{[\text{Pyr}]}} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{[\text{OAA}]}{K_{i\text{OAA,PCx}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{[\alpha\text{KG}]}{K_{i\alpha\text{KG,PCx}}} \right)} \quad (43), (46)$$

$$v_{\text{PEPck}} = v_{\text{PEPck,max}} \cdot f_{\text{PEPck}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_{m\text{OAA,PEPck}}}{[\text{OAA}]}} \quad (29)$$

$$v_{\text{AAT}} = \frac{v_{\text{AAT,max(f)}} \cdot v_{\text{AAT,max(r)}} \left([\text{Glu}][\text{OAA}] - K_{\text{eq,AAT}}^{-1} [\text{Asp}][\alpha\text{KG}] \right)}{v_{\text{AAT,max(r)}} \left[[\text{Glu}][\text{OAA}] + K_{m\text{OAA,AAT}} \cdot [\text{Glu}] + K_{m\text{Glu,AAT}} \cdot [\text{OAA}] \left(1 + \frac{[\text{Asp}]}{K_{d\text{Asp,AAT}}} \right) \right] + v_{\text{AAT,max(f)}} \cdot K_{\text{eq,AAT}}^{-1} \left[[\text{Asp}][\alpha\text{KG}] + K_{m\alpha\text{KG,AAT}} \cdot [\text{Asp}] + K_{m\text{Asp,AAT}} \cdot [\alpha\text{KG}] \left(1 + \frac{[\text{Glu}]}{K_{d\text{Glu,AAT}}} \right) \right]} \quad (30)$$

$$v_{\text{Lys}} = (v_{\text{Lys0}} + k_{\text{Lys}} \cdot \mu) \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{K'_{m\text{Asp,Lys}}}{[\text{Asp}]} \right) \cdot \left(1 + \frac{K'_{m\text{Pyr,Lys}}}{[\text{Pyr}]} \right)} \quad (32), (33)$$

Empirische Korrelationen:

$$[\text{Pyr}] = k_{\text{Pyr,1}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{OAA}]}{k_{\text{Pyr,2}}} \right) \quad (58)$$

$$[\alpha\text{KG}] = \frac{k_{\alpha\text{KG,1}}}{(1 + k_{\alpha\text{KG,2}} / [\text{OAA}]) (1 + k_{\alpha\text{KG,3}} \cdot \mu)} \quad (59)$$

Tabelle 36: Parameter des Regulationsmodells. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Werten sind die Fehler angegeben.

<i>PEP-Carboxylase/Pyruvat-Kinase</i>			<i>PEP-Carboxykinase</i>		
$K_{iAsp,PEPCx}$	$0,57 \pm 0,17$	mM	$K_{mOAA,PEPCK}$	1,0	mM
k_{PEP}	$1,03 \pm 0,30$		f_{PEPCK}	$0,55 \pm 0,09$	
<i>Pyruvat-Carboxylase</i>			<i>Lysinbiosynthese</i>		
$v'_{PCx,max}$	$9,9 \pm 3,0$	mmol g ⁻¹ h ⁻¹	v_{Lys0}	$0,32 \pm 0,12$	mmol g ⁻¹ h ⁻¹
$K_{mPyr,PCx}$	1,3	mM	k_{Lys}	$1,77 \pm 0,32$	mmol g ⁻¹
$K_{i\alpha KG,PCx}$	$0,89 \pm 0,57$	mM	$K'_{mAsp,Lys}$	$0,87 \pm 0,42$	mM
$K_{iOAA,PCx}$	67 ± 40	μM	$K'_{mPyr,Lys}$	$0,05 \pm 0,21$	mM
<i>Aspartat-Aminotransferase</i>			<i>empirische Parameter</i>		
$K_{eq,AAT}$	1,0		$k_{Pyr,1}$	$0,38 \pm 0,13$	mM
$K_{mGlu,AAT} (K_{dGlu,AAT})$	24	mM	$k_{Pyr,2}$	34 ± 11	μM
$K_{mOAA,AAT}$	0,11	mM	$k_{\alpha KG,1}$	$9,9 \pm 3,8$	mM
$K_{mAsp,AAT} (K_{dAsp,AAT})$	4,4	mM	$k_{\alpha KG,2}$	53 ± 17	μM
$K_{m\alpha KG,AAT}$	71	μM	$k_{\alpha KG,3}$	$13,3 \pm 6,2$	h
<i>wahre Ausbeutekoeffizienten</i>			<i>NADPH-Bedarf</i>		
$Y_{X/C}$	19,4	g (mol C) ⁻¹	$Y_{X/NADPH}$	67	g mol ⁻¹
$Y_{Lys/C}$	0,10	mol (mol C) ⁻¹	$Y_{Lys/NADPH}$	0,25	
			m_{NADPH}	0,4	mmol g ⁻¹ h ⁻¹

Das folgende Programm zur Berechnung von Stoffflüssen und Metabolitkonzentrationen bei gegebener Wachstumsrate sowie gegebenen spezifischen Enzymaktivitäten ist mit der Software *Scientist 2.0* (MicroMath, Salt Lake City, Utah, USA) lauffähig. Die Konzentrationen der Metabolite Oxalacetat und L-Aspartat wurden iterativ berechnet. Die Bezeichnung der Parameter und Variablen entspricht den im Ergebnisteil verwendeten Symbolen. Die Einheiten sind mmol g⁻¹ h⁻¹ für Enzymaktivitäten und Stoffflüsse sowie mM für Konzentrationen. "my" ist die Wachstumsrate μ in h⁻¹.

Independent Variable: x // Dummyvariable für die Iteration (s.u.)

Dependent Variables: OAA, lnOAA, Asp, lnAsp, Pyr, aKG, vPEPCk, vLys, qLys, mC, qC, qGlc, qLact, vPP, vC3, vAR, vPEPCxPK, IAspPEPCx, RPEP, vPEPCx, vPCx1, vPCx2, vAAT1, vAAT2

Parameters: my, kPyr1, kPyr2, kaKG1, kaKG2, kaKG3, vPEPCkmax, KmOAAPEPCk, KmGluAAT, KmOAAAAT, KmAspAAT, KmAKGAAT, Glu, YXC, YLysC, fPEPCk, KmAspLys, KmPyrLys, vLys0, kLys, KiAspPEPCx, vPEPCxmax, vPKmax, kPEP, vPCxmax, KiOAAPCx, KiAKGPCx, vAATmax

// Startwerte für [OAA] und [Asp]

OAA = exp(lnOAA)

Asp = exp(lnAsp)

// berechne [Pyr] und [αKG] nach Gleichung (58) bzw. (59)

Pyr = kPyr1*(1+OAA/kPyr2)

aKG = kaKG1/(1+kaKG2/OAA)/(1+kaKG3*my)

// berechne v_{PEPCk} nach Gleichung (29)

vPEPCk = vPEPCkmax*fPEPCk*OAA/(OAA+KmOAAPEPCk)

// berechne v_{Lys} nach Gleichungen (32) und (33)

vLys = (vLys0+kLys*my)*Asp/(Asp+KmAspLys)*Pyr/(Pyr+KmPyrLys)

// berechne q_{Lys} und v_{AR} nach Gleichung (52) bzw. (35) und (51)

qLys = vLys-0.20*my

vAR = qLys+2.96*my

// berechne q_C aus μ, q_{Lys} und v_{PEPCk} nach Gleichungen (25) und (53)

mC = 1.63+0.46*vPEPCk

qC = my/YXC+qLys/YLysC+mC

// berechne q_{Glc} und q_{Lact} aus q_C nach Gleichung (54) bzw. (55)

qGlc = 21/138*qC

qLact = 4/138*qC

// berechne v_{PP} nach Gleichung (57) und v_{C3} nach Gleichung (47)

vPP = (18*qLys+79*my+1.2-qC)/5

vC3 = (6*qGlc-vPP-11.42*my)/3

// berechne die Summe von v_{PEPCx} und v_{PK} nach Gleichung (48) und (49)

vPEPCxPK = vC3+vPEPCk-qGlc-0.53*my

// berechne v_{PEPCx} aus (v_{PEPCx} + v_{PK}) durch Auflösung der Gleichungen (37) und (41)

IAspPEPCx = 1/(1+(Asp/KiAspPEPCx)^2)

RPEP = (vPEPCxmax*kPEP*IAspPEPCx)^2/vPKmax

vPEPCx = -RPEP/2+sqrt(RPEP^2/4+RPEP*vPEPCxPK)

// berechne v_{PCx} über die kinetischen Gleichungen (43) und (46) und über die stöchiometrische

// Beziehung (51)

vPCx1 = vPCxmax/(1.3/Pyr+1)/(1+OAA/KiOAAPCx)/(1+aKG/KiAKGPCx)

vPCx2 = vAR+vPEPCk-vPEPCx

// berechne v_{AAT} über die kinetische Gleichung (30) und über die stöchiometrische Beziehung (35)

```
vAAT1 = vAATmax * (Glu * OAA - Asp * aKG)
/ (Glu * OAA + KmOAAAAT * Glu + KmGluAAT * OAA * (1 + Asp / KmAspAAT)
+ Asp * aKG + KmAKGAAT * Asp + KmAspAAT * aKG * (1 + Glu / KmGluAAT))
vAAT2 = vLys + 1.51 * my
```

// Iteration, ausgeführt als Differentialgleichungen;

// um negative Werte von [OAA] bzw. [Asp] zu vermeiden, werden deren Logarithmen iteriert

```
lnOAA' = vPCx1 - vPCx2
lnAsp' = vAAT1 - vAAT2
```

// Bereich der Laufvariablen x , mit dem ein auf mindestens vier Stellen genaues Ergebnis erreicht

// wird (für die Simulationen der vorliegenden Arbeit waren 100 Einheiten stets ausreichend)

```
0 < x < 100
x = 0
```

// Startwerte für $\ln$ [OAA] und $\ln$ [Asp], entsprechen hier [OAA] $\approx$ 0,03 mM; [Asp] $\approx$ 1,2 mM

```
lnOAA = -3.5
lnAsp = 0.2
```

// Wachstumsrate

```
my = 0.075
```

// spezifische Enzymaktivitäten

```
vPEPCkmax = 60
vPEPCxmax = 4
vPKmax = 7
vAATmax = 22
```

// Modellparameter Aspartat-Aminotransferase

```
KmOAAPEPCk = 1.0
KmGluAAT = 24
KmOAAAAT = 0.11
KmAspAAT = 4.4
KmaKGAAT = 0.071
Glu = 60
```

// Modellparameter Energetik

```
YXC = 0.0194
YLysC = 0.1
```

// Modellparameter PEP-Carboxylase/Pyruvat-Kinase

```
KiAspPEPCx = 0.57
kPEP = 1.03
```

// Modellparameter Pyruvat-Carboxylase

```
vPCxmax = 9.9
KiaKGPCx = 0.89
KiOAAPCx = 0.067
```

// Modellparameter PEP-Carboxykinase

```
fPEPCk = 0.55
```



```
// Modellparameter Pyruvat-Korrelation
```

```
kPyr1 = 0.38
```

```
kPyr2 = 0.034
```

```
// Modellparameter  $\alpha$ -Ketoglutarat-Korrelation
```

```
kaKG1 = 9.9
```

```
kaKG2 = 0.053
```

```
kaKG3 = 13.3
```

```
// Modellparameter Lysinbiosynthese
```

```
vLys0 = 0.32
```

```
kLys = 1.77
```

```
KmAspLys = 0.87
```

```
KmPyrLys = 0.05
```

```
***
```

7.4 Symbolverzeichnis

Stoffflüsse und Enzymaktivitäten

q_C	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Kohlenstoffaufnahme
$q_{\text{Metabolit}}$	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	extrazelluläre Rate (Aufnahme oder Produktion) eines Metaboliten
v_{AR}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Nettoaktivität der anaplerotischen Reaktionen
v_{AR-1}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Stofffluß zwischen PEP und Oxalacetat
v_{AR-2}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Stofffluß zwischen Pyruvat und Oxalacetat
v_{C3}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Fluß von C_3 -Körpern in der Glycolyse
v_{C4}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Fluß von C_4 -Körpern im Citratzyklus
v_{GL-i}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Flüsse in der Glycolyse ($i = 1$ bis 5)
v_{GS-i}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Flüsse im Glyoxylatweg ($i = 1$ bzw. 2)
v_{Lys}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Lysinsyntheserate
$v_{Lys,max}$	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	maximale Lysinsyntheserate
v_{Enzym}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	<i>in vivo</i> Aktivität eines Enzyms
$v_{\text{Enzym},max}$	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	maximale bzw. spezifische Enzymaktivität
$v_{\text{Enzym},max(f/r)}$	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	maximale Enzymaktivität in Vorwärts- bzw. Rückwärtsrichtung
v_{PCx}^*	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	<i>in vivo</i> Aktivität der Pyruvat-Carboxylase, auf Pyruvatsättigung des Enzyms extrapoliert
$v_{PCx,max}'$	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	scheinbare Maximalgeschwindigkeit der Pyruvat-Carboxylase <i>in vivo</i>
v_{PP}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Fluß durch den oxidativen Pentosephosphatweg
v_{PP-i}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Flüsse im Pentosephosphatweg ($i = 1$ bis 4)
v_{TC-i}	$\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Flüsse im Citratzyklus ($i = 1$ bis 5)

kinetische Parameter

$f_{\text{Enzym}}([\text{Metabolite}])$	-	Effektoreinflüsse der angegebenen Metabolite auf ein Enzym
$I_{\text{Metabolit,Enzym}}$	-	Term der Inhibition eines Enzyms durch einen Metaboliten
$K_{d\text{Metabolit,Enzym}}$	mM	Dissoziationskonstante eines Enzyms bzgl. eines Metaboliten
$K_{eq,AAT}$	-	Gleichgewichtskonstante der Reaktion der L-Aspartat-Aminotransferase
$K_{i\text{Metabolit,Enzym}}$	mM, μM	Inhibitionskonstante eines Enzyms bzgl. eines Metaboliten
$K_{m\text{Metabolit,Enzym}}$	mM	Michaelis-Konstante eines Enzyms bzgl. eines Metaboliten
$K'_{m\text{Asp,Lys}}, K'_{m\text{Pyr,Lys}}$	mM	scheinbare K_m -Werte der Lysinsynthese bzgl. L-Aspartat bzw. Pyruvat <i>in vivo</i>
k_{PEP}	-	zusammengefaßte kinetische Parameter der PEP-Carboxylase
$K_{0,5\text{Metabolit,Enzym}}$	mM	Halbsättigungskonstante eines Enzyms bzgl. eines Metaboliten (bei Nicht-Michaelis-Menten-Kinetiken)
$n_{\text{Metabolit,Enzym}}$	-	Hill-Koeffizient eines Enzyms bzgl. eines Metaboliten

¹³C-Markierungsdaten

{Metabolit <i>i</i> }	- (%)	¹³ C-Anreicherung in der C- <i>i</i> -Position eines Metaboliten
{Metabolit [<i>i,j</i> ,...]}	- (%)	Anteil des [<i>i,j</i> ,...- ¹³ C _{<i>n</i>}]-Isotopomers eines Metaboliten
{Metabolit < <i>i</i> Feinstruktur>}	- (%)	Anteil der angegebenen Feinstruktur am ¹³ C-Signal der C- <i>i</i> -Position eines Metaboliten

sonstige Symbole

$C_{\text{Parameter}}^{\text{lys}}$	var.	Kontrollkoeffizient eines Modellparameters in bezug auf die Lysinproduktion
F_g	$\text{l l}^{-1} \text{ min}^{-1}$	Belüftungsrate des Bioreaktors
H_{CO_2}	mbar mM^{-1}	Henry-Konstante von Kohlendioxid
Int_{CO_2}	$\text{ppm} \cdot \text{min}$	Integral der CO ₂ -Konzentration über die Zeit (Abgasanalyse)
k_{ia}	h^{-1}	Stofftransportkoeffizient (CO ₂)
$k_{\text{Metabolit},i}$	var.	Korrelationsparameter zwischen Metabolitkonzentrationen
m_{C}	$\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Erhaltungskoeffizient
m_{NADPH}	$\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$	NADPH-Bedarf des Erhaltungsstoffwechsels
P	W	Leistungseintrag in den Bioreaktor
$p_{\text{CO}_2(\text{g})}, p_{\text{CO}_2(\text{l})}$	mbar	CO ₂ -Partialdruck im Abgas bzw. in der Kulturflüssigkeit
pK_{aCO_2}	-	pK _a -Wert (logarithmierte Dissoziationskonstante) von CO ₂
r_{CO_2}	$\text{mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	volumenspezifische CO ₂ -Produktionsrate
rpm	min^{-1}	Rührerdrehzahl
V_g	l mol^{-1}	Normvolumen eines Gases
$v_{\text{Lys0}}, k_{\text{Lys}}$	$\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mmol g^{-1}	Modellparameter der Wachstumsabhängigkeit der Lysinsynthese
$Y_{\text{Lys/C}}$	-	wahrer Ausbeutekoeffizient der Lysinsynthese
$Y_{\text{Lys/NADPH}}$	-	NADPH-Bedarf der Lysinsynthese (Kehrwert)
$Y_{\text{X/C}}$	g mmol^{-1}	wahrer Ausbeutekoeffizient der Biomassebildung
$Y_{\text{X/NADPH}}$	g mmol^{-1}	NADPH-Bedarf der Biomassebildung (Kehrwert)
$\Delta p_{\text{CO}_2(\text{l})}$	mbar	Änderung des CO ₂ -Partialdrucks bei Erhöhung der Rührerdrehzahl
μ	h^{-1}	Wachstumsrate
[Metabolit]	mM, μM	intrazelluläre Konzentration eines Metaboliten
[OAA] _{eq}	μM	Gleichgewichtskonzentration von Oxalacetat in bezug auf die Reaktion der Aspartat-Aminotransferase

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Ihm verdanke ich die Aufnahme ins Graduiertenkolleg "Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung" der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Seine Anregungen und Kritik waren mir stets eine wertvolle Hilfe.

Herrn Prof. Dr. M. K. Grieshaber danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die Mitbetreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs. Mein besonderer Dank gilt seinem Einsatz, mir die Wahl der Kollegialprüfung zur Promotion zu ermöglichen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. Albert de Graaf für die intensive persönliche Betreuung. Seine Erfahrung, seine stete Hilfsbereitschaft und die Begeisterung, mit der er sich mit mir über meine Ergebnisse freuen konnte, haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. W. Wiechert danke ich für seine großzügige Unterstützung bei der Darstellung und Beurteilung des Regulationsmodells. Seiner gesamten Arbeitsgruppe in Siegen gilt ein großes Dankeschön für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Stoffflußanalyse.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Eikmanns und Christian Riedel möchte ich mich herzlich für die Überlassung der *pck*-Mutanten bedanken. Die Zeit in Ulm hat mir viel Spaß gemacht.

Herrn Dr. Lothar Eggeling danke ich für unzählige anregende Diskussionen und gute Tips.

Christina und Käthe, die mich tatkräftig im Labor unterstützt haben, Achim, André, Anja, Bernd, Camille, Denny, Doris, Eva, A. Förstel, Nicole, Petra, Petra, Ralph, Siggi, Volker, Yvonne und allen ungenannten Institutsangehörigen danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre, ihre große Hilfsbereitschaft und manches aufmunternde Wort zur rechten Zeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für das Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs. Allen Mitgliedern des Kollegs sei an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme, die weiterführende Ausbildung und ihre Unterstützung gedankt.

Der Degussa-Hüls AG danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Mehr als Dank an meine Eltern und meinen Bruder Arne.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3875
Juni 2001
ISSN 0944-2952