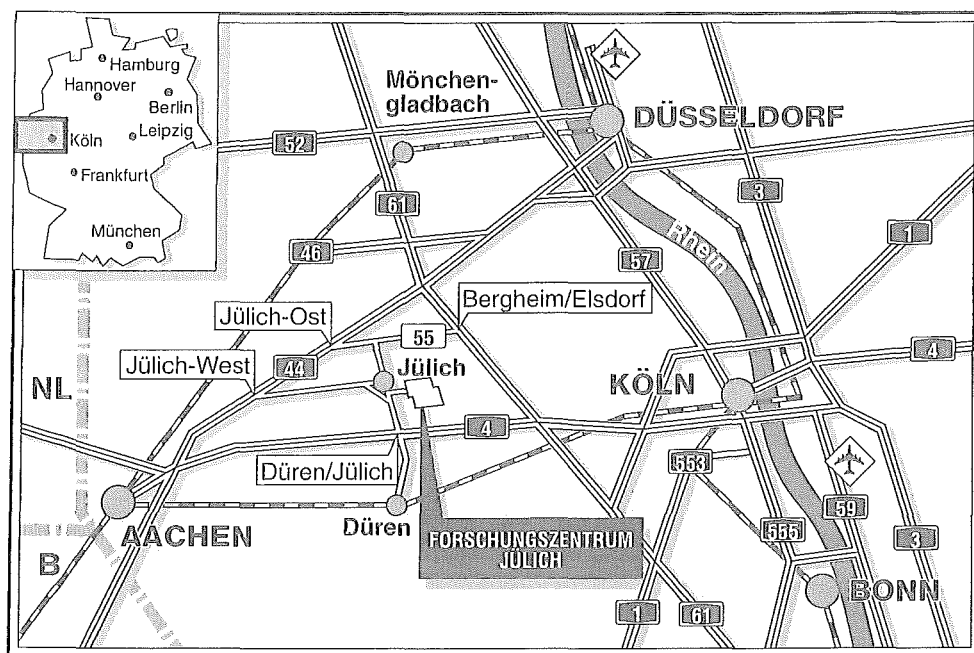


Institut für Biotechnologie

***In vivo-¹⁵N-NMR-Untersuchungen
zur Ammoniumassimilation
in *C. glutamicum****

Martin Tesch



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3496

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3496

D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

***In vivo-¹⁵N-NMR-Untersuchungen
zur Ammoniumassimilation
in C. glutamicum***

Martin Tesch

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
	7
2.1. Mikrobiologische Methoden	
2.1.1. Verwendete Bakterienstämme	7
2.1.2. Stammhaltung	7
2.1.3. Vorkulturen	7
2.1.4. Verwendete Nährmedien	8
2.2. Enzymologische Methoden	9
2.2.1. Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung	9
2.2.2. Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität	10
2.2.3. Bestimmung der Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase-Aktivität	10
2.2.4. Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität	11
2.3. Kontinuierliche Hochzelldichtefermentation und <i>in vivo</i>-¹⁵N-NMR	12
2.3.1. Der <i>in vivo</i> -NMR-Bioreaktor	12
2.3.2. Hochzelldichtefermentationen mit <i>Corynebacterium glutamicum</i>	16
2.3.3. <i>In vivo</i> - ¹⁵ N-NMR-Experimente mit <i>Corynebacterium glutamicum</i>	18
2.4. Physiologische Methoden	19
2.4.1. Charakterisierung des Bakterienwachstums	19
2.4.2. Bestimmung der Glucose- und Ammoniumkonzentration in Kulturüberständen	19
2.4.3. Ethanolische Zellextraktion	20
2.4.4. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren in Zellextrakten und Kulturüberständen	20
2.4.5. Präparative Reinigung von Aminosäuren aus ethanolischen Zellextrakten zur quantitativen Bestimmung der ¹⁵ N-Markierung	21
2.4.6. Die Silikonölzentrifugation	22
2.4.7. Bestimmung des Cytoplasmavolumens	22

2.5. Kernresonanzspektroskopische-(NMR)-Methoden	23
2.5.1. <i>In vivo</i> - ¹⁵ N-NMR-Messungen	23
2.5.2. ¹⁵ N-NMR-Vermessung von ethanolischen Zellextrakten	24
2.5.3. ¹ H-NMR zur Bestimmung des ¹⁵ N/ ¹⁴ N-Markierungsgrades von Ammonium	25
2.5.4. ¹ H-NMR zur Bestimmung des ¹⁵ N/ ¹⁴ N-Markierungsgrades von gereinigten Aminosäuren	25
2.6. Mathematisches Modell der Stickstoffflüsse in <i>C. glutamicum</i>	27
3. Ergebnisse	30
3.1. Enzymatik und Regulation der Ammoniumassimilation von <i>C. glutamicum</i>	31
3.1.1. Wachstum von <i>C. glutamicum</i> mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen	31
3.1.2. Enzyme der Ammoniumassimilation in <i>C. glutamicum</i>	33
3.1.2. Inhibitorische Wirkung von DL-Methionin-DL-Sulfoximin auf die Enzyme des GS/GOGAT-Weges in <i>C. glutamicum</i>	33
3.1.3. Regulation der Ammoniumassimilation in <i>C. glutamicum</i>	35
3.2. Quantitative Untersuchung der Ammoniumassimilation in <i>C. glutamicum</i> mittels <i>in vivo</i>-¹⁵N-NMR	44
3.2.1. Untersuchung der Ammoniumassimilation von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mittels <i>in vivo</i> - ¹⁵ N-NMR	44
3.2.2. Untersuchung der Ammoniumassimilation von <i>C. glutamicum</i> EB1 mittels <i>in vivo</i> - ¹⁵ N-NMR	54
3.2.3. Untersuchung der Ammoniumassimilation in dem lysinproduzierenden Stamm MH20-22B von <i>C. glutamicum</i> mittels <i>in vivo</i> - ¹⁵ N-NMR	61
4. Diskussion	70
5. Zusammenfassung	79
6. Verwendete Literatur	80

1. Einleitung

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges Bodenbakterium. Die Aminosäureproduktion mit *C. glutamicum* ist ein etabliertes, biotechnologisches Herstellungsverfahren. Die wichtigsten industriell hergestellten Aminosäuren sind L-Glutamat und L-Lysin.

Die Assimilation einer Stickstoffquelle wie Ammonium ist eine Schlüsselreaktion bei Wachstum und Aminosäureproduktion. In den meisten Organismen sind die Aminosäuren L-Glutamat und L-Glutamin die ersten Ammoniumassimilationsprodukte. Da Glutamat und Glutamin auch die zentralen Aminogruppendonatoren im Stoffwechsel sind, stellen sie die zentrale Verbindung von Kohlenstoff- und Stickstoffstoffwechsel dar (Gottschalk 1986).

In Mikroorganismen gibt es zwei verschiedene Wege zur Biosynthese von L-Glutamat. Das Intermediat des Tricarbonsäurezyklus 2-Ketoglutarat wird durch die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) reduktiv zu Glutamat aminiert. Die GDH benötigt als Cofaktor entweder NADH oder NADPH. Glutamat-Dehydrogenasen sind allosterische Enzyme, die ubiquitär verbreitet sind. Ferner wird Glutamat durch die Glutaminsynthetase (GS) über einen ATP-abhängigen Einbau von NH_4^+ zu Glutamin umgesetzt. Glutaminsynthetasen sind ebenfalls in den meisten Organismen enthalten. Die Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) oder Glutamatsynthase bildet aus einem 2-Ketoglutarat und einem Glutamin unter Verbrauch eines NADPH oder NADH zwei Moleküle Glutamat. Weiterhin ist in photosynthetischen Organismen eine Ferredoxin-abhängige GOGAT vorhanden. Die GOGAT ist ein Eisen-Schwefel-Flavoprotein und wurde bislang nur in Mikroorganismen und Pflanzen nachgewiesen. Der erste Weg zur Glutamatbiosynthese wird GDH-Weg genannt; der zweite zyklische Weg setzt sich aus der GS- und der GOGAT-Reaktion zusammen (GS/GOGAT-Weg) (Gottschalk, 1986).

Die Enzyme der Ammoniumassimilation von aminosäureproduzierenden Bakterien wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die GDH in aminosäureproduzierenden Bakterien wurde zuerst in *Brevibacterium flavum* beschrieben (Kimura 1962, Oshima *et al.* 1964).

Effektoren und enzymkinetische Parameter der GDH und der GS aus *B. flavum* wurden am gereinigten Enzym charakterisiert (Shiio und Ozaki 1970, Tachiki *et al.* 1981, Sung *et al.* 1984). Die GOGAT wurde erstmals von Tochikura *et al.* aus *B. flavum* gereinigt (Tochikura *et al.* 1984). Die GDH, GS und GOGAT in dem glutamatproduzierenden *Corynebacterium callunae* wurden von H. Ertan 1992 charakterisiert (Ertan 1992). Eine Übersicht über die Reaktionen der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme in aminosäureproduzierenden Bakterien ist in Abbildung 1 gezeigt.

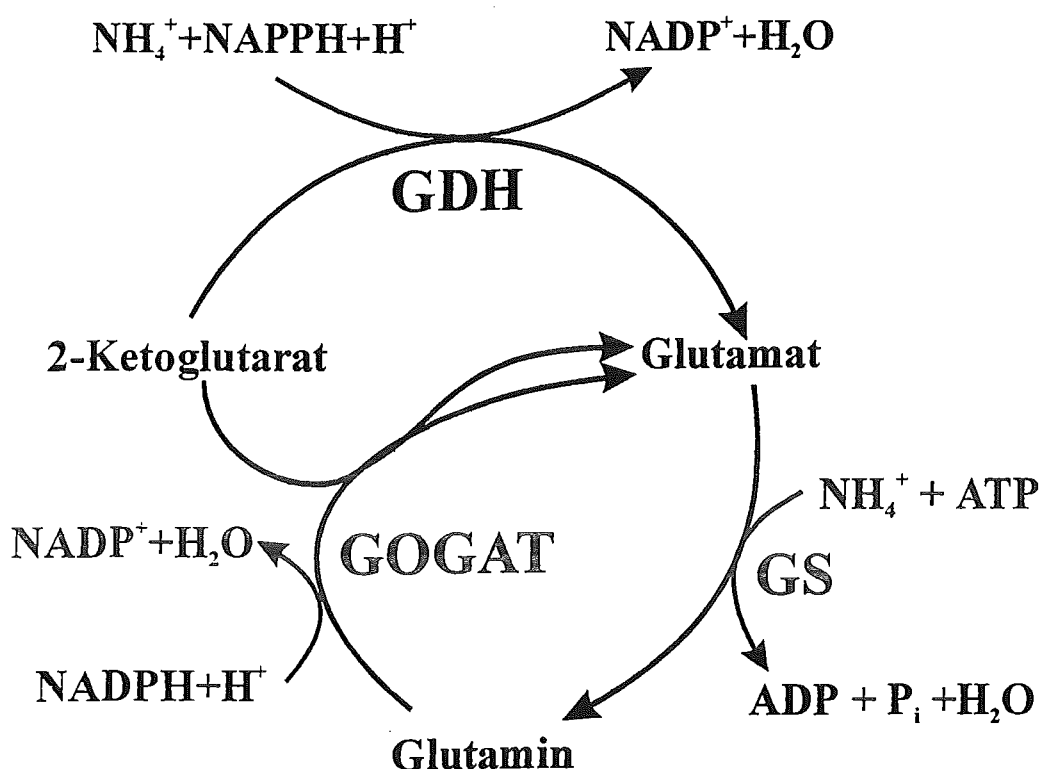


Abbildung 1: Übersicht über die Reaktionen der bekannten, ammoniumassimilierenden Enzyme in aminosäureproduzierenden Bakterien. **GDH:** Glutamatdehydrogenase (aminiert 2-Ketoglutarat reduktiv) **GS:** Glutaminsynthetase (amidiert Glutamat ATP-abhängig) **GOGAT:** Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase (reduktive Aminierung eines 2-Ketoglutarat mit einem Glutamin zu zwei Glutamat)

Das *gdh*-Strukturgen aus *C. glutamicum* wurde von Börmann *et al.* kloniert und charakterisiert (Börmann *et al.* 1992, Börmann 1994). Es wurde mit der definierten GDH-Defektmutante *C. glutamicum* EB1 erstmals gezeigt, daß die GDH für die Glutamatproduktion nicht essentiell war (Börmann-El Kholy *et al.* 1993). Damit wurden Modelle widerlegt, nach denen die GDH das einzige funktionelle Enzym der Glutamatbiosynthese in *C. glutamicum* wäre.

Im Widerspruch hierzu wurden GDH-negative Mutanten von *C. glutamicum ssp. flavum*, die mit klassischer chemischer Mutagenese erzeugt waren, als glutamatauxotroph (Shiio und Ujigawa 1978) beziehungsweise sehr schwach glutamatproduzierend beschrieben (Sung *et al.* 1985).

Ob nun der GDH- oder GS/GOGAT-Weg zur NH_4^+ -Assimilation genutzt wird, hängt bei vielen Organismen unter anderem von der NH_4^+ -Verfügbarkeit ab (Review: Merrick und Edwards 1995). Im Bereich der Mikroorganismen ist diese Regulation besonders gut in Gram-negativen Enterobakterien wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Klebsiella aerogenes* untersucht (Reitzer und Magasanik 1987). So wird die GDH in *E. coli* und *S. typhimurium* unabhängig von der NH_4^+ -Konzentration exprimiert (Pahel *et al.* 1978, Brenchley *et al.* 1975), in *K. aerogenes* jedoch bei niedriger NH_4^+ -Verfügbarkeit reprimiert (Brenchley *et al.* 1973). Die Expression der GOGAT wird in diesen Organismen durch ihr Produkt Glutamat reprimiert (Meers *et al.* 1970). Im Falle der GS wurde eine mehrstufige Kaskade von regulativen Proteinen entdeckt, die die Aktivität dieses Enzyms bei steigender NH_4^+ -Verfügbarkeit herabsetzt und dessen Expression verhindert (Reitzer & Magasanik 1987).

Im Gegensatz zu den gut untersuchten biochemischen und molekularen Grundlagen der NH_4^+ -Assimilation ist sehr wenig über die quantitativen Verhältnisse im N-Stoffwechsel bekannt. Dies hängt vor allem mit dem schwierigen experimentellen Zugang zur Bestimmung von Reaktionswegen und Umsatzraten stickstoffhaltiger Metabolite in lebenden Zellen zusammen. Generell werden bei qualitativen und quantitativen Untersuchungen von biochemischen Stoffumsätzen markierte Tracermoleküle verwendet. Im Gegensatz zu den Elementen C, H und P existiert kein biochemisch nutzbares, über Radioaktivität leicht meßbares, Stickstoffisotop. Das radioaktive ^{13}N hat eine Halbwertszeit von nur 9,5 min und ist aufgrund dieser Instabilität bei physiologischen Studien nur begrenzt von Nutzen. Dennoch wurden mit diesem Isotop Studien zum Stickstoffstoffwechsel verschiedener Organismen durchgeführt (Kim und Hollocher 1982, Kenealy *et al.* 1982, Berry *et al.* 1990).

Die nicht radioaktiven Stickstoffisotope ^{14}N und ^{15}N sind über Kernresonanz- (Nuclear Magnetic Resonance (NMR)) Spektroskopie detektierbar. Die hohe natürliche Häufigkeit von ^{14}N (98,9 %) schränkt die Verwendung dieses Isotops als spezifische Sonde bei biologischen Experimenten stark ein (Lundberg *et al.* 1989).

So verwendete man für qualitative und quantitative Untersuchungen zum Stickstoffstoffwechsel der Zelle mit markierten Molekülen vornehmlich das ^{15}N -Isotop (Reviews: Kanamori und Roberts 1983, Martin 1985, von Philipsborn und Müller 1986). Moleküle, die mit diesem Isotop angereichert sind, sind über ^{15}N -NMR- und $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -NMR-Kopplungsexperimente erfaßbar. Begrenzt wird der Einsatzbereich von ^{15}N als biochemische Sonde durch dessen schlechte NMR-Sensitivität; ^{15}N liefert bei gleicher Konzentration nur ein Tausendstel des ^1H -NMR-Signals (Günther 1992).

^{15}N -Markierungsversuche waren wichtige Schritte bei der Aufklärung der zellulären NH_4^+ - und NO_3^- -Assimilation. Das erste *in vivo*- ^{15}N -Spektrum von intakten lebenden Zellen veröffentlichten Llias *et al.* 1975, die den Pilz *Ustilago sphaerogena* auf ^{15}N -Ammoniumacetat als alleinige Stickstoffquelle kultivierten und die ^{15}N -NMR-Signale von zellinternen Aminosäuren gemessen haben (Llia *et al.* 1975).

Grundlegende ^{15}N -NMR-Untersuchungen zur Stickstoffassimilation von Prokaryoten und Pilzen wurden von K. Kanamori, R. Weiss und J. F. Roberts durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe zeigte mit ^{15}N -Markierungsversuchen an intaktem Pilzmycel von *Neurospora crassa*, daß die Alanin- bzw. die Glutaminsynthese in Abhängigkeit der Kulturbedingungen um das Substrat Glutamat konkurrierten (Kanamori *et al.* 1982). Mit Hilfe von ^{15}N -Markierungsversuchen wurde von Kanamori *et al.* aufgeklärt, daß der N_2 -fixierende *Bacillus azotofixans* vornehmlich den GS/GOGAT-Weg zur N_2 und NH_4^+ -Assimilation nutzte (Kanamori *et al.* 1987 III). Darin unterschied sich *B. azotofixans* von den ebenfalls N_2 -fixierenden *Bacillus macerans* und *Bacillus polymyxa*, die vornehmlich den GDH-Weg nutzten (Kanamori *et al.* 1987 I, II). In weiterführenden ^{15}N -NMR-Arbeiten konnten Kanamori *et al.* bei *Chlostridium kluyverii* und *Chlostridium butyricum* zeigen, daß bei Fixierung von molekularem Stickstoff der GS/GOGAT-Weg beschritten wurde und bei der Verwertung von NH_4^+ die GDH funktionell war (Kanamori *et al.* 1989). Die qualitative Erkennung der *in vivo* aktiven NH_4^+ -Assimilationswege in diesen *Bacillus*- und *Chlostridium*-Stämmen erfolgte durch die *ex vivo*-Messung von ^{15}N -Einbaukinetiken in Zellextrakten. Eine Quantifizierung der Beiträge beider Wege zur NH_4^+ -Assimilation erfolgte nicht.

Die ersten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Untersuchungen mit dem glutamatproduzierenden *Brevibacterium lactofermentum* wurden 1983 von Haran, Kahana und Lapidot durchgeführt (Haran *et al.* 1983). In dieser Arbeit wurden ^{15}N -NMR-Spektren von ^{15}N -markierten *B. lactofermentum*-Suspensionen publiziert, die unter verschiedenen Fermentationsbedingungen aus dem Fermenter geerntet wurden.

Die prominenten ^{15}N -NMR-Signale von $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat und $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin in den ^{15}N -NMR-Spektren dieser „packed cell“-Versuche (Haran *et al.* 1983) waren deutliche Hinweise auf hohe Konzentrationen dieser primären NH_4^+ -Assimilationsprodukte in *B. lactofermentum*. Haran *et al.* zeigten weiterhin, daß in sauerstofflimitierten Kulturen verstärkt Aminogruppen von Glutamat nach Alanin übertragen wurden (Haran *et al.* 1983). Bei *B. lactofermentum*-Suspensionen, die unter Glutamatproduktionsbedingungen geerntet wurden, stellten Haran *et al.* 1983 fest, daß alle ^{15}N -Aminosäuresignale, mit Ausnahme des von ^{15}N -Glutamat, schwächer ausgeprägt waren als in einer wachsenden Kultur. Dies wurde durch die Permeabilität der Cytoplasmamembran unter diesen Fermentationsbedingungen erklärt (Haran *et al.* 1983). Quantitative Ergebnisse zur NH_4^+ -Assimilation konnten mit dem experimentellen Ansatz von Haran *et al.* 1983 nicht gewonnen werden.

Weitere Versuche zur biotechnologischen Synthese von ^{15}N -Glutamat mit *Brevibacterium flavum* wurden von Walker und London 1987 publiziert; die Physiologie der Ammoniumassimilation wurde hierbei jedoch nicht bearbeitet (Walker und London 1987).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde auch der Stickstoffstoffwechsel des Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B untersucht. Dieser Stamm wurde durch chemische Mutagenese und Selektion erzeugt (Schrumpf *et al.* 1992). Lysin gehört zur Aspartat-Familie der Aminosäuren (Hirose und Okada 1979). Eine Besonderheit der corynebakteriellen Lysinbiosynthese sind die zwei alternativen Endsynthesewege (Misono 1979, Ishino *et al.* 1984, Misono 1986). Beim Diaminopimelat-Dehydrogenase-Weg (DDH-Weg) wird die terminale Aminogruppe des Lysins direkt aus NH_4^+ gebildet. Diese Aminogruppe wird bei dem anderen Weg (Succinyldiaminopimelat-Weg) über Transaminierung durch Glutamat in das Lysin eingebaut. Welcher dieser beiden Biosynthesewege vornehmlich zur Lysinbiosynthese benutzt wird, hängt von der in der Fermentation eingesetzten NH_4^+ -Konzentration ab; bei steigenden NH_4^+ -Konzentrationen erhöht sich der Anteil des über den DDH-Weg synthetisierten Lysins (Sonntag *et al.* 1993).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen *in vivo*- ^{15}N -NMR-Markierungsversuche unter definierten Kulturbedingungen durchzuführen, um die Stickstoffflüsse bei deren Ammoniumassimilation über die Messung von *in vivo*- ^{15}N -Einbaukinetiken zu quantifizieren.

Die prominenten Signale der γ -Amidogruppe von cytoplasmatischem Glutamin und der intrazellulären α -Aminogruppen in den publizierten *in vivo*- ^{15}N -Spektren von *B. lactofermentum* (Haran *et al.* 1983) berechtigten zu der Annahme, die Einbaukinetiken von $^{15}\text{NH}_4^+$ in diese Aminosäurepools in der vorliegenden Untersuchung *in vivo*, im nahe verwandten *C. glutamicum* messen zu können. Hierzu mußte ein ausreichend sensitives Meßsystem etabliert werden, um die *in vivo*- ^{15}N -Markierungskinetiken in guter zeitlicher Auflösung zu erfassen. Aus den gemessenen ^{15}N -Einbaukinetiken in die primären NH_4^+ -Assimilationsprodukte würden sich dann die *in vivo*-Reaktionsgeschwindigkeiten (*in vivo*-Stickstoffflüsse) quantifizieren lassen. Publierte ^{15}N -Markierungskinetiken, die *ex vivo* in Zellextrakten aus verschiedenen Organismen gemessen wurden (Kanamori *et al.* 1987 I, 1987 II, 1989, Warren *et al.* 1994, Jones und Bellion 1991), ergaben eine notwendige zeitliche Auflösung von ca. 10 min pro Spektrum zur kinetischen Charakterisierung von ^{15}N -Einbaukinetiken. Grundlage zur Realisierung dieser Meßempfindlichkeit eines *in vivo*-NMR-Versuchsaufbaus war die von Hartbrich *et al.* 1995 abgeschlossene Entwicklung eines *in vivo*-NMR-Hydrozyklonfermenters (Hartbrich *et al.* 1996). Das System war in hervorragender Weise auf die *in vivo*-NMR-Bestimmung von ^{13}C - und ^{31}P -markierten Metaboliten in hochzellichten Bakterienkulturen ausgelegt (Hartbrich *et al.* 1996). Zur Erfassung von aussagekräftigen ^{15}N -NMR-Spektren mußte das systembedingte Meßrauschen jedoch nochmals um etwa den Faktor 10 gesenkt werden, was sowohl durch Geräte- als auch durch Verfahrensmodifikationen erreicht wurde.

2. Material und Methoden

2.1. Mikrobiologische Methoden:

2.1.1. Verwendete Bakterienstämme:

In der vorliegenden Arbeit wurden die in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführten *Corynebacterium glutamicum*-Stämme verwendet.

Tabelle 1: Verwendete *C. glutamicum*-Stämme und deren Eigenschaften

Stamm	Eigenschaften	Zitat
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> 1967
<i>Corynebacterium glutamicum</i> EB1 *	Definierte GDH-Deletionsmutante des Wild- typs	Börmann <i>et al.</i> 1993
<i>Corynebacterium glutamicum</i> MH20-22B	Leucinauxotropher Lysinüberproduzent	Schrumpf <i>et al.</i> 1992

* rekombinanter Stamm

2.1.2. Stammhaltung:

Eine Übernachtskultur der Bakterienstämme in BHI-Medium (Difco) wurde mit 20 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt, in 2 ml Portionen aliquotiert und bei - 70°C eingefroren.

2.1.3. Vorkulturen:

Zur Kultivierung wurde die eingefrorene Kultur auf BHI-Agarplatten (18g/l Agar (Difco)) ausgestrichen. Rekombinante Stämme mit einer eingeführten Kanamycinresistenz wurden auf BHI-Platten mit 25 µg/l Kanamycin (Boehringer, Mannheim) ausplattiert.

Von der Agarplatte wurde eine Einzelkolonie in 5 ml BHI-Medium übertragen und ca. 12 h bei 30°C mit 120 rpm inkubiert. Diese 5 ml BHI Vorkultur wurde dann in 50 ml BHI-Medium gegeben und in einem 2-Schikanen-Erlenmeyerkolben über Nacht bei 120 rpm inkubiert. Die Zellen aus dieser Vorkultur wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min, 6000g) und zweimal in 30-50 ml kalter Saline (9 g/l NaCl) gewaschen. Bei Wachstumsexperimenten im Schüttelkolben wurden 2,5 ml dieser gewaschenen Zellen als Inoculum für 50 ml Medium verwendet. Der *in vivo*-NMR Fermenter wurde mit gewaschenen Zellen (in 50 ml Saline) aus 400 ml Vorkultur im Schüttelkolben angeimpft.

2.1.4. Verwendete Nährmedien:

Die Zusammensetzungen der verwendeten Minimalmedien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete synthetische Nährmedien zur Kultivierung von *C. glutamicum*.

Bestandteil	CgC-Medium	Schüttelkolben- medium mit NH_4^+ als allei- nige N-Quelle	Hochzell- dichte- fermentations- medium	Lysinproduktions- medium für kontinuierliche Hochzelldichte- fermentation
Quelle	Eikmanns <i>et al.</i> (1989)	Diese Arbeit	Diese Arbeit	Kelle <i>et al.</i> (1996)
Glucose	25 g/l	25 g/l	100 g/l	125 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/l	6 g/l	10-15 g/l *	46 g/l *
Harnstoff	5 g/l			
KH_2PO_4	0,5 g/l	0,5 g/l	0,75 g/l	0,5 g/l
K_2HPO_4	0,5 g/l	0,5 g/l	0,75 g/l	0,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l	0,25 g/l	0,285 g/l	0,285 g/l
KCl			1 g/l	1 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g/l	0,01 g/l	0,05 g/l	0,05 g/l
Citronensäure $\cdot \text{H}_2\text{O}$			0,1 g/l	0,1 g/l
EDTA			0,1 g/l	0,1 g/l
MOPS	37 g/l	50 g/l		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l	10 mg/l	28,5 mg/l	28,5 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l	10 mg/l	16,5 mg/l	16,5 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,763 mg/l	0,763 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/l	1 mg/l	6,3 mg/l	6,3 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$			0,13 mg/l	0,13 mg/l
$\text{NiCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	20 $\mu\text{g/l}$	20 $\mu\text{g/l}$	42,5 $\mu\text{g/l}$	42,5 $\mu\text{g/l}$
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$			65 $\mu\text{g/l}$	65 $\mu\text{g/l}$
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$			0,19 mg/l	0,19 mg/l
H_3BO_3			50 $\mu\text{g/l}$	50 $\mu\text{g/l}$
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$			50 $\mu\text{g/l}$	50 $\mu\text{g/l}$
$\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$			50 $\mu\text{g/l}$	50 $\mu\text{g/l}$
Antischaum			PPG 1200 (1: 10)**	PPG 1200 (1: 10)**
Biotin	0,2 mg/l	0,1 mg/l	0,5 mg/l	0,85 mg/l
L-Leucin				1,2 g/l
PH	6,3 mit 2N NaOH	7,4 mit 2 N NaOH	7,0 geregelt mit 6 N NaOH	7,0 geregelt mit 6 N NaOH

* Durch separate Zudosierung während des Prozesses variierbar.

** Nach Bedarf automatisch zudosiert

2.2. Enzymologische Methoden :

2.2.1. Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung:

50 ml einer Bakterienkultur wurden in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (10 min, 6000 g) geerntet. Nach der Zellernte wurden die Bakterien zweimal in 40 ml der unten aufgeführten Puffer gewaschen.

Wurden ammoniumlimitierte Zellen angezogen, so wurden jeweils 6 identisch behandelte Schüttelkulturen nach dem ersten Zentrifugationsschritt vereinigt. Dieses Vorgehen war aufgrund der niedrigen Zellausbeuten in batch-Kulturen mit niedrigen NH_4^+ -Konzentrationen notwendig.

Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Zellpellet in ca. 1 ml des jeweiligen Aufschlußpuffers (s.u.) resuspendiert. Die OD_{600} dieser dichten Suspension für den Zellaufschluß sollte ca. 300 betragen. Das Zellpellet konnte nun bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C eingefroren werden.

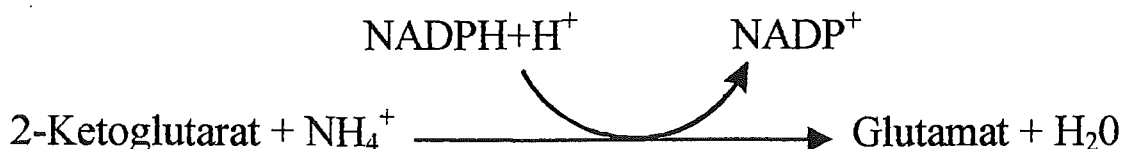
Tabelle 3: Übersicht über die bei Enzymaktivitätsbestimmungen verwendeten Puffersysteme

Durchzuführende Enzymbestimmung	Waschpuffer	Aufschlußpuffer
Glutamatdehydrogenase	200 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0	50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM L-Cystein, 10 μM 2-Ketoglutarat
Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase	50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5	50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM L-Cystein, 10 μM 2-Ketoglutarat
Glutaminsynthetase	100 mM Imidazol-Puffer pH 7.15	100 mM Imidazol-Puffer pH 7.15

Der Zellaufschluß mittels Ultraschall (Ultraschallprozessor UP 200 S, Dr. Hielscher GmbH) wurde in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Eiskühlung durchgeführt. Die Zellen wurden 5 min diskontinuierlich mit einer Zykluszeit von 0.5 und einer Amplitude von 55 % beschallt. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation sedimentiert (13000 rpm, 30 min, 4°C). Der zellfreie Extrakt konnte nun in die entsprechenden Enzymtests eingesetzt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erfolgte nach der Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) mit Rinder-Serumalbumin (Boehringer, Mannheim) als Standard.

2.2.2. Bestimmung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität (GDH):

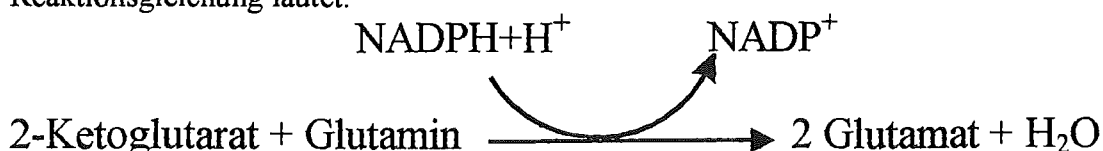
Die GDH katalysiert die reduktive Aminierung von 2-Ketoglutarat zu Glutamat unter gleichzeitiger Oxidation eines $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Die Reaktionsgleichung lautet:



Zur Bestimmung der spezifischen GDH-Aktivität wurde eine modifizierte Methode nach Meers *et al.* (1970) verwendet. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl (ICN, Aurora Ohio) pH 8,0, 20 mM NH_4Cl (Merck, Darmstadt), 0,25 mM $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Natriumsalz, Sigma, München) und 50 μl Rohextrakt in einer geeigneten Verdünnung. Das Volumen des Testansatzes wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 1 ml ergänzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM 2-Ketoglutarat gestartet. Da bei dieser Reaktion $\text{NADPH} + \text{H}^+$ verbraucht wird, konnte die dadurch bedingte Extinktionsabnahme bei 340 nm über 2 min (30°C) verfolgt werden. Die Verdünnung des Rohextraktes wurde so gewählt, daß die Extinktionsdifferenz pro Minute nicht mehr als 0,1 betrug.

2.2.3. Bestimmung der Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase-Aktivität (GOGAT):

Die GOGAT katalysiert den reduktiven Transfer der Amidogruppe des Glutamins auf 2-Ketoglutarat unter Verbrauch eines $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Es entstehen 2 Moleküle Glutamat. Die Reaktionsgleichung lautet:

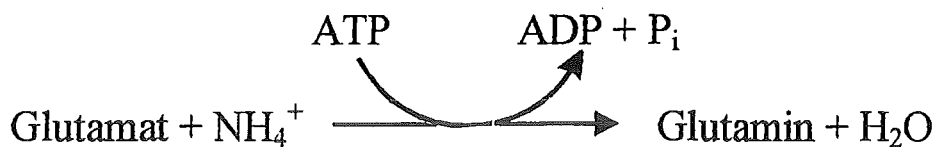


Die spezifische GOGAT-Aktivität wurde ebenfalls mit einer modifizierten Methode nach Meers *et al.* (1970) bestimmt. Um die GDH-Konkurrenzreaktion der GOGAT bei deren Enzymtest auszuschließen, war es nötig, verbliebenes Ammonium aus dem Rohextrakt zu entfernen. Hierzu wurde der zellfreie Extrakt einem gelchromatographischen Schritt unterworfen. Die Trennsäule zur Molekularsiebchromatographie (PD10, Pharmacia, Freiburg) wurde mit 25 ml des eiskalten GOGAT-Aufschlußpuffers äquilibriert. Der Rohextrakt wurde auf die Trennsäule aufgebracht und in 3 ml des Aufschlußpuffers eluiert. Durch diesen Schritt wurde der zellfreie Extrakt etwa um den Faktor 3 mit dem Aufschlußpuffer verdünnt. Daher wurde das Eluat durch eine anschließende Membranfiltration (Centricon 10, Amicon) auf ein Drittel seines Volumens eingengt.

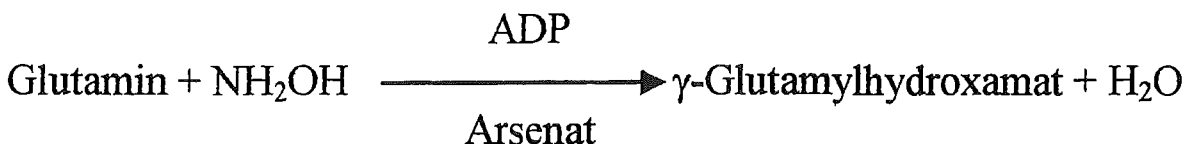
Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 20mM NH_4Cl , 0.25 mM $\text{NADPH}+\text{H}^+$ (Natriumsalz), 10 mM 2-Ketoglutarat und 50 μl Rohextrakt. Das Volumen des Testansatzes wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 1 ml ergänzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Glutamin (Sigma, München) gestartet. Da bei dieser Reaktion $\text{NADPH}+\text{H}^+$ verbraucht wird, konnte die dadurch bedingte Extinktionsabnahme bei 340 nm über 2 min (30°C) verfolgt werden. Die Verdünnung des Rohextraktes wurde so gewählt, daß die Extinktionsdifferenz pro Minute nicht mehr als 0.1 betrug.

2.2.4. Bestimmung der Glutamin-Synthetase-Aktivität (GS):

Neben ihrer physiologischen Reaktion kann die Glutaminsynthetase bei der Anwesenheit von ADP und Arsenat auch die charakteristische Transferreaktion von Glutamin und Hydroxylamin zu γ -Glutamylhydroxamat katalysieren. Die Reaktionsgleichung der physiologischen GS-Reaktion lautet:



Die Reaktionsgleichung der GS-Nachweisreaktion:



Die Messung dieser Transferase-Aktivität der Glutamin-Synthetase erfolgte diskontinuierlich nach einer modifizierten Methode von Shapiro und Stadtman (1970). 400 μl des frisch angesetzten Testgemisches (135 mM Imidazol/HCl (Merck, Darmstadt), pH 7.15, 18 mM NH_2OH (Sigma, München), 0.27 mM MnCl_2 (Merck, Darmstadt) 25 mM KHSO_4 (Sigma, München), 0,36 mM ADP (Boehringer, Mannheim) und verdünnter Rohextrakt (1-50 μl)) wurden 5 min bei 30°C äquilibriert. Anschließend wurde die GS-Transferasereaktion durch die Zugabe von 20 mM Glutamin gestartet. Nach 10 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 ml Stop-Lösung (55 mg/ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt) 20 mg/ml Trichloressigsäure (Sigma, München), 21 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 37%ige HCl) beendet. Zur Entfernung von Präzipitat wurden die Proben zentrifugiert (2 min, 13000 rpm, RT) und das gebildete γ -Glutamyl-Hydroxamat wurde bei 540 nm photometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte über eine ebenso behandelte γ -Glutamyl-Hydroxamat (Sigma, München) Eichreihe.

2.3. Kontinuierliche Hochzelllichtfermentation und *in vivo*- ^{15}N -NMR

Ziel der *in vivo*-NMR-Methode war die Messung von $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken in die primären Assimilationsprodukte einer definierten *C. glutamicum*-Kultur. Entwicklungen aus drei technologischen Bereichen wurden zu der in dieser Arbeit verwendeten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Methode kombiniert. Verfahrenstechnische Grundlage für die kontinuierliche Fermentation war der von Hartbrich *et al.* 1996 entwickelte *in vivo*-NMR-Zyklonbioreaktor mit Biomasserückhaltung. Weiterhin wurden Fermentationsverfahren entwickelt, um die zu untersuchenden *C. glutamicum*-Stämme kontinuierlich bei sehr hohen Zelldichten unter definierten Bedingungen zu vermehren. Schließlich wurden NMR-Parameter erarbeitet, die eine *in vivo*- ^{15}N -NMR-Untersuchung dieser Kultur ermöglichten.

2.3.1. Der *in vivo*-NMR-Bioreaktor:

Das eingesetzte *in vivo*-NMR-Bioreaktorsystem wurde im Zeitraum von 1993 bis 1996 am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich GmbH von A. Hartbrich *et al.* entwickelt (Hartbrich *et al.* 1996). Das Fermentersystem war für *in vivo*-Messungen mit den NMR-aktiven Elementen ^{13}C und ^{31}P ausgelegt. Zur Durchführung von *in vivo*-Markierungsexperimenten mit dem im NMR-Experiment 10-fach insensitiveren Element ^{15}N wurde die Sensitivität des Meßsystems im Zuge dieser Arbeit etwa um den Faktor 19 gesteigert. Diese Maximierung der NMR-Signalintensität wurde durch die Summe der unten aufgeführten konstruktiven und prozeßtechnischen Maßnahmen erreicht. Die Maximierung der NMR-Signalstärke entsprach einer Minimierung der Meßzeit pro Spektrum bei der Erfassung von *in vivo*- ^{15}N -Einbaukinetiken.

Erster Faktor zur Erhöhung der NMR-Signalausbeute bei lebenden Zellen war die Anwendung der Hochzelllichtfermentation. Durch Einsatz eines keramischen Filtrationsmoduls zur Zellrückhaltung wurden die Verweilzeiten von Medium und Biomasse entkoppelt und reproduzierbar Biotrockenmassekonzentrationen von 50 g/l erreicht.

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Steigerung der NMR-Signalintensität war die effektive Entgasung der Kulturflüssigkeit vor der NMR-Messung. Gasblasen verringerten die Zellkonzentration in der NMR-Meßzelle und die paramagnetischen Eigenschaften von O_2 verschlechterten die NMR-Meßbedingungen drastisch. Daher wurde das Glasgefäß vor der NMR-Meßzelle als Hydrozyklon gestaltet, der eine gute Gasabtrennung aus der belüfteten Kultur gewährleistete.

Um die aeroben Kulturbedingungen trotz der hohen Zelldichte und der zeitweisen Gasblasenabtrennung zu gewährleisten, wurde der pO_2 nach Durchlauf der Kultur durch den Hydrozyklon gemessen und über die Luftzufuhr geregelt. Der Gaseintrag in das Fermentationssystem wurde durch Verwendung von 50 % O_2/N_2 (v/v) minimiert.

Zur weiteren Optimierung der NMR-Signalausbeute wurden entstörende elektronische π -Filter (Bruker, Karlsruhe) zur Verringerung des elektromagnetischen Meßrauschens in die an den Glaskessel führenden Meßstromleitungen eingefügt. Die Betriebsparameter (Umlaufgeschwindigkeit der Kultur, Füllstand) des Fermenters wurden so eingestellt, daß das günstigste Signal zu Rauschen-Verhältnis bei den NMR-Messungen erhalten wurde.

Die Abbildungen 2A und 2B zeigen ein Foto des etablierten *in vivo*-NMR-Bioreaktors mit dem NMR-Spektrometer im Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich GmbH und ein Fließschema des Systems. Ausgehend von der Hauptförderpumpe des Fermenters wurden die weiteren Bauteile des Reaktors in Flußrichtung der Kulturbrühe in nachstehender Reihenfolge (Tabelle 4 A) angeordnet. In Tabelle 4 B sind die Bauelemente und die Verschaltung der Fermenterperipherie spezifiziert.

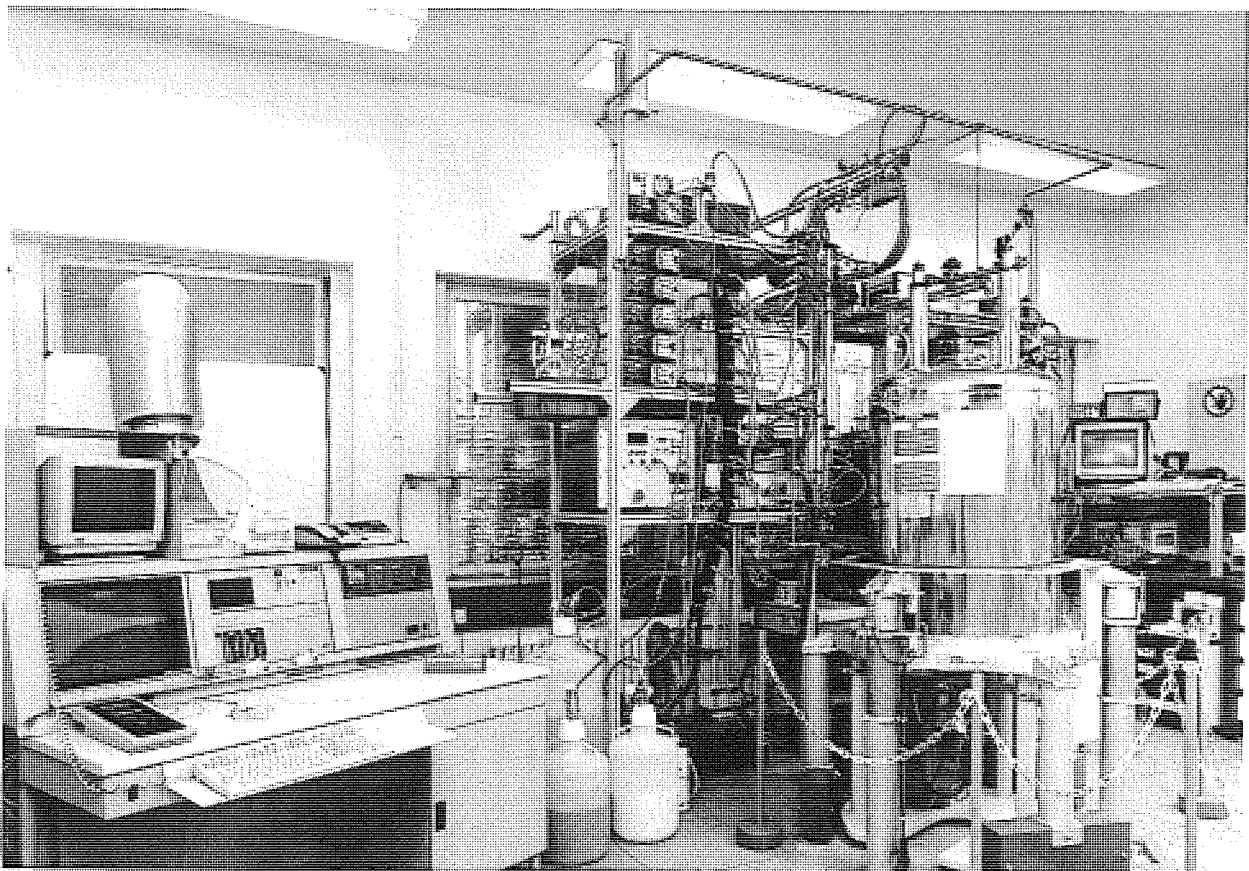


Abbildung 2A: *In vivo*-NMR-Fermenter und NMR-Spektrometer (Bruker AMX 400) im Institut für Biotechnologie 1 an der Forschungszentrum Jülich GmbH.

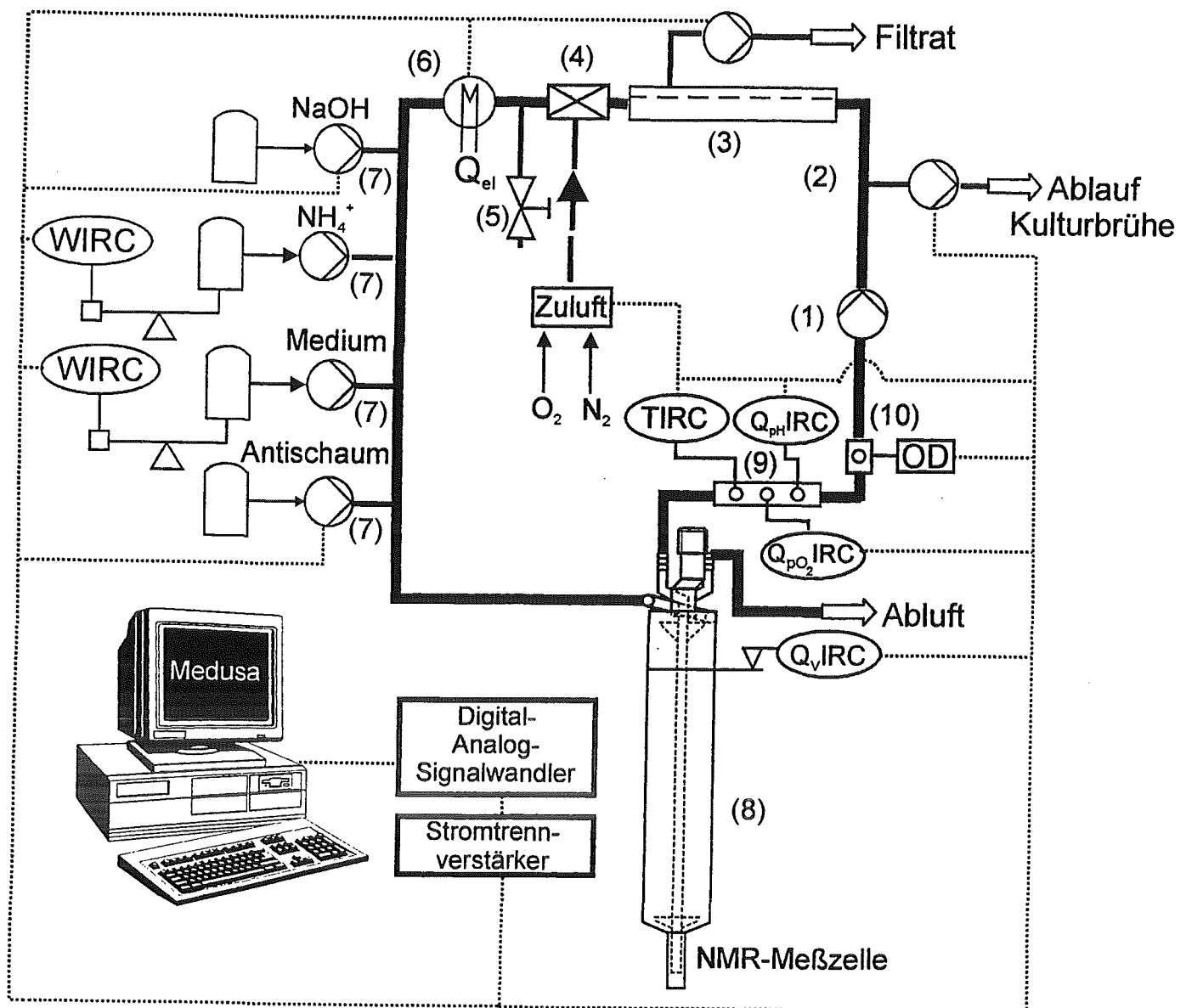


Abbildung 2B: Fließschema des *in vivo*-NMR-Bioreaktors. Anordnung der Bauteile in Flußrichtung der Kulturbrühe ausgehend von der Hauptförderpumpe (1) - (10) (Spezifizierung in Tabelle 4 A).

Funktionsüberblick über geschaltete Regelkreise nach DIN 30600 (Tabelle 4B): I: indication; R: record; C: control; T: temperature; W: weight; Q: quality; V: volume

Tabelle 4 A: Anordnung und Spezifizierung der *in vivo*-Fermenterbauteile in Flußrichtung der Kulturbrühe, ausgehend von der Förderpumpe und deren Bezeichnung in der Übersichtsskizze 6 B.

Bezeichnung in der Übersichtsskizze 5 B und Position im Fermenterkreislauf	Bauteil und Spezifizierung
(1)	Förderpumpe (Johnson Classic, IC-Range, Modell 10/0005)
(2)	Luftblasenfreier Ablauf der Kulturbrühe
(3)	Mikrofiltrationsmodul (Milipore)
(4)	Belüftungseinheit aus Sinterstahl (Krebshöge / FZ-Jülich)
(5)	Probenahme und Entleerungsventil (Membranventil Bioengineering)
(6)	Wärmetauscher zur Temperierung (FZ-Jülich)
(7)	Zuflüsse von Medium, pH-Korrekturmittel, Antischaummittel
(8)	Glasgefäß (FZ-Jülich-ZAT) mit Hydrozyklon und <i>in vivo</i> -NMR-Durchflußmeßzelle, Füllstandsonde (FAFNIR, Hamburg), Gegenelektrode und Schaumdetektor
(9)	Thermoelement (Pt 100) , pH-Elektrode (Ingold), pO ₂ -Elektrode (Ingold) und Sondenträger (FZ-Jülich-ZAT)
(10)	Durchflußmeßkammer des on line-Photometers (Eurocontrol)

Tabelle 4B: Spezifizierung der verwendeten Bauteile der Fermenterperipherie und deren Bezeichnung in der Übersichtsskizze 5 B. Funktionsüberblick über geschaltete Regelkreise. Bezeichnung nach DIN 30600.

Ansteuerung	Bauteil und Spezifizierung	Bezeichnung in der Übersichtsskizze 5 B
MEDUSA	Pumpe zum Ablauf der Kultur (Watson Marlow 504 U)	Bleed
MEDUSA Geregelt über Füllstandsonde	Filtratpumpe (Watson Marlow 504 U)	Q_{IRC} + Filtrat
MEDUSA Geregelt über pO ₂ -Sonde	Gasmischeinheit mit O ₂ - und N ₂ -Anschlüssen und MassFlow-Metern (Brooks, 5850 SE, 0-20 l/h)	Q_{pO2}IRC + AIR
Geregelt über Thermoelement	Kühl- und Heizfähiges Wasserbad zum externen Betrieb (Haake K), Thermoelement (pT100)	TIRC + Q_e
Gravimetrische Regelung	Dosierstrecken mit Waagen (Sartorius YFL02Z) und zu- und abführenden Pumpen (Watson Marlow 504 U)	WIRC
Geregelt über pH-Meter	pH-Korrekturmittel und Dosierpumpe, pH-Meter (Bioengineering)	Q_{pH}IRC + NaOH
Geschaltet über Schaumsonde	Antischaummittel und Dosierpumpe (Watson Marlow 504U)	Antischaum
	Trennverstärker zur Massentrennung der Meß- und Regelströme (Gossen-Metrawatt)	Stromtrennverstärker
	Digital/Analog-Wandler (Siemens SMP)	Digital-Analog-Wandler
	Personal Computer (Sontag, Waldfeucht) zur Prozesssteuerung und Datenerfassung mittels MEDUSA (IBT)	MEDUSA

2.3.2. Hochzelldichtefermentationen mit *Corynebacterium glutamicum* :

Der zu untersuchende *C. glutamicum*-Stamm wurde im *in vivo*-NMR-Bioreaktor (s.o.) kontinuierlich vermehrt. Dadurch stand für den Zeitraum der *in vivo*-NMR-Messung (ca. 3h) eine konstant definierte Kultur zur Verfügung.

Die pH- und die pO_2 -Sonde wurden vor der Sterilisation in den Fermenter eingebaut und das pH-Meter wurde geeicht. Der *in vivo*-NMR-Fermenter wurde drucklos mit heißem Dampf sterilisiert. Hierzu wurde ein Kleindampferzeuger (Strobel, München), der 1,2 bar Sattdampf aus VE-Wasser lieferte, an die Abluftstrecke des Fermenters angeschlossen. Der Glaskessel wurde so angeordnet, daß das Probenahmeventil am tiefsten Punkt des Systems lag, damit entstehendes Kondenswasser entweichen konnte. Der Bioreaktor wurde nun abschnittsweise mit dem Wasserdampf für ca. 25 h durchströmt. Die Temperatur im Fermenter betrug ca. 100°C. Der Dampf wurde an allen Ein- und Ausgängen des Systems durch ein Sammelrohr in die Atmosphäre abgeleitet, um eine Kondensation von Wasser im NMR-Raum zu vermeiden. Diese Sterilisationsmethode erwies sich als zuverlässig; es traten keine Kontaminationsprobleme auf.

Nach der Sterilisation des Systems wurde die separat autoklavierte Fermenterperipherie angeschlossen und in Betrieb genommen. Der Fermenter wurde mit dem entsprechenden Hochzelldichtefermentationsmedium befüllt und die pO_2 -Meßeinrichtung wurde durch Begasung mit N_2 oder synthetischer Luft (20% O_2 / 80 % N_2) kalibriert. Das Medium wurde beimpft, danach wurde das Photometer zur on-line-Messung der optischen Dichte auf einen Wert von ca. 2 % eingestellt.

Die *C. glutamicum*-Kulturen wurden von Fermentationsbeginn an kontinuierlich betrieben, wobei die Durchflußrate des Mediums $0,1 \text{ h}^{-1}$ betrug. Das Fermentervolumen bei 80 % regeltem Füllstand betrug 1,4 l. Die 140 ml h^{-1} zufließendes Medium unterteilten sich mit Hilfe von zwei separaten Dosierstrecken in 112 ml h^{-1} stickstofffreies Medium und 28 ml h^{-1} $(NH_4)_2SO_4$ -Stammlösung. Dadurch wurde die Möglichkeit geschaffen, die NH_4^+ -Konzentration im steady state einer *C. glutamicum*-Kultur durch die entsprechenden Dosierstrecke zu variieren. Bei großen Veränderungen der NH_4^+ -Konzentration des Mediums (etwa bei Aufhebung einer N-Limitierung) wurde die $(NH_4)_2SO_4$ -Vorlage ausgetauscht. Die Verdünnung des stickstofffreien Mediums durch die $(NH_4)_2SO_4$ -Stammlösung während des Prozesses wurde bei der Einwaage berücksichtigt.

Der pH-Wert des vorgelegten stickstofffreien Mediums wurde mit HCl_{konz} auf ca. 2,5 eingestellt. Dies gewährleistete die Löslichkeit der eingesetzten Spurenelemente und verhinderte ein „Zurückwachsen“ der *C. glutamicum*-Kultur aus dem Fermenter in die Dosierstrecke des Mediums. Der pH-Wert des Mediums wurde während der Fermentation im Bioreaktor stetig mit ca. 6N NaOH auf $7,0 \pm 0,1$ titriert.

Die aus der kontinuierlichen Kultur abgeführte Flüssigkeit unterteilt sich aufgrund der Zellrückhaltung in zwei Flüsse. Die Hälfte ($70 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$) der kontinuierlich entnommenen Flüssigkeit wurde als Kulturbrühe mit Zellen entnommen, die andere Hälfte ($70 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$) wurde zellfrei als Filtrat durch die Mikrofiltration abgeführt. Damit verhielten sich der Kulturabfluß zum Filtratstrom 1:1, was bedeutet, daß die Verweilzeit der Biomasse im Fermenter doppelt so lange war wie die Verweilzeit des Mediums. Daher betrug die Wachstumsrate von *C. glutamicum* in diesem System bei einer Durchflußrate des Mediums ($0,1 \text{ h}^{-1}$) lediglich $0,05 \text{ h}^{-1}$. Zur Prozessführung und -kontrolle kam ein Personal Computer mit dem Computerprogramm MEDUSA (IBT, Hartbrich 1995) zum Einsatz.

Im Laufe der Fermentation wurden folgende Parameter on-line gemessen und von dem Prozessdatenerfassungsprogramm MEDUSA gespeichert: Umlaufgeschwindigkeit der Kultur (1 h^{-1}), Dosierung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung ($\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}$), Dosierung des stickstofffreien Mediums ($\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}$), Temperatur ($^{\circ}\text{C}$), pH-Wert, pO_2 -Wert (% Luftsättigung), Zuluft (1 h^{-1}), Fördermenge des Kulturablaufes ($\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}$), Fördermenge der Filtratpumpe ($\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}$), relative optische Dichte der Kultur (%), O_2 in der Zuluft (1 h^{-1}), N_2 in der Zuluft (1 h^{-1}), Füllstand (%). Folgende Parameter der kontinuierlichen *C. glutamicum*-Kultur wurden geregelt: pH-Wert (7.0), pO_2 (20% Luftsättigung), Temperatur (30°C), Füllstand (80%).

Off-line wurden gemessen: pH-Wert, NH_4^{+} -, Glucose- und Aminosäurekonzentration des Kulturüberstandes, Biomassekonzentration, *in vitro* Enzymaktivitäten der ammonium-assimilierenden Enzyme.

Nach Beendigung der Fermentation wurde die Peripherie abgebaut und gereinigt und der Reaktor gründlich mit VE-Wasser durchgespült. Die Reinigung erfolgte mit dem alkalischen Reinigungsmittel P3 (Henkel, Düsseldorf) für 24 h bei 50°C . Das Reinigungsmittel wurde wiederum mit VE-Wasser aus dem Fermenter gespült, bis der pH-Wert des Waschwassers neutral war.

2.3.3. *In vivo*- ^{15}N -NMR-Experimente mit *Corynebacterium glutamicum*:

Das zur Untersuchung der NH_4^+ -Assimilation gewünschte Fließgleichgewicht der *C. glutamicum*-Kultur wurde eingestellt und dieser steady state wurde mindestens 50 h (5 Verweilzeiten bei einer Durchflußrate von 0,1) bis zum Beginn des ^{15}N -NMR-Markierungsexperimentes in allen Parametern konstant gehalten.

Vor Beginn des ^{15}N -Markierungsexperimentes wurde die Umlaufgeschwindigkeit der Kulturbrühe im Fermenter von 600 l h^{-1} auf 800 l h^{-1} gesteigert. Diese Anhebung der Umlaufgeschwindigkeit blieb ohne Einfluß auf die Parameter der kontinuierlichen Kultur, hatte aber großen Einfluß auf die Güte der NMR-Messungen (bessere Entgasung und schneller Durchfluß der Kultur durch die NMR-Meßzelle). Die physikalischen Belastungen für die Fermentationsanlage aus dieser höheren Umlaufgeschwindigkeit waren während des langen Fermentationszeitraumes der kontinuierlichen Kultur aus Sicherheitsgründen nicht akzeptabel.

Der Glaskessel des *in vivo*-NMR-Fermenters wurde in den Magneten des NMR-Spektrometers abgesenkt, so daß dessen Durchfluß-NMR-Meßkammer in den 20 mm-Meßkopf eingeführt wurde.

Zur Erhaltung der Volumenkonstanz wurde der Ablauf der Kulturbrühe aus der kontinuierlichen Kultur während des ^{15}N -NMR-Experimentes abgestellt. Das während des ^{15}N -Markierungsexperimentes aus dem Reaktor durch die ethanolische Extraktion entnommene Probenvolumen entsprach dem Kulturablauf quantitativ. Das NMR-Spektrometer wurde auf die Vermessung der Kultur im *in vivo*-NMR-Bioreaktor eingestellt und die benötigte Pulssequenz wurde programmiert (siehe NMR-Methoden).

Dann wurde ein definierter $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puls (Cambridge Isotopic Laboratories, $(^{15}\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$:99%+) von 100 mM NH_4^+ (bezogen auf das Fermentervolumen von 1,4 l) gegeben und das *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experiment wurde gestartet. 5 min vor Gabe des $^{15}\text{NH}_4^+$ -Pulses wurde mit der ethanolischen Extraktion von Proben aus der kontinuierlichen *C. glutamicum*-Kultur begonnen, die während des Experimentes fortgeführt wurde (siehe Physiologische Methoden). Während des ^{15}N -NMR-Experimentes wurden auch Proben zur späteren Bestimmung der *in vitro*-Enzymaktivitäten der ammonium-assimilierenden Enzyme genommen. Nach Ende des ^{15}N -Markierungsexperimentes wurde die kontinuierliche Fermentation beendet.

2.4. Physiologische Methoden

2.4.1. Charakterisierung des Bakterienwachstums:

Das Wachstum von *C. glutamicum* wurde über Extinktionsmessung oder eine Trockengewichtsbestimmung der Kultur verfolgt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen Wasser gemessen (Shimadzu Spektralphotometer UV-160A). Dabei wurde die Verdünnung so gewählt, daß ein Extinktionswert von 0,2 nicht überschritten wurde.

Die Trockengewichtsbestimmung von hochzellichten Kulturen erfolgte gravimetrisch. In einem vorgewogenen Eppendorf-Cup wurde die Biomasse aus 1 ml Kultur durch Zentrifugation vom Kulturüberstand getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurden die Zellen bei 60°C ca. 40 h bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend gewogen.

2.4.2. Bestimmung der Glucose- und Ammoniumkonzentration in Kulturüberständen:

Während der kontinuierlichen Fermentation wurde die Glucose- bzw. Ammoniumkonzentration mit Schnellteststreifen überwacht (Glucose: Diabur 5000 (Boehringer, Mannheim), Ammonium: Merckoquant NH_4^+ -Test 10-400 mg/l (Merck, Darmstadt)). Diese Schnelltests eigneten sich gut zur Feststellung der jeweiligen Wachstumslimitierung, die Meßgenauigkeit dieser Systeme ist aber zur Erfassung von Substratkonzentrationen nicht ausreichend. Daher wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus der Kultur entnommen, die Biomasse wurde durch Zentrifugation (10 min, 13200 g) entfernt und der Kulturüberstand wurde bei – 20°C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Die genauen Glucose- bzw. Ammoniumkonzentrationen wurden mit enzymatischen Testkits (Boehringer, Mannheim) bestimmt.

2.4.3. Ethanolische Zellextraktion:

Bei den *in vivo*- ^{15}N -NMR Markierungsexperimenten wurden die im Cytoplasma von *C. glutamicum* gelösten Metabolite zur Konzentrationsbestimmung extrahiert. Aufgrund der Säurelabilität des wichtigen NH_4^+ -Assimilationsproduktes Glutamin konnten Verfahren wie der bewährte Zellaufschluß mit Perchlorsäure nicht angewandt werden. Daher wurden die *C. glutamicum* Zellen folgendermaßen, in Abwandlung des von Kanamori *et al.* (Kanamori *et al.* 1987) angewandten Verfahrens, in kochendem Ethanol aufgeschlossen:

In Falcon-Tubes, deren Deckel zum Druckausgleich durchstoßen waren, wurden 30 ml absolutes Ethanol (Merck, Darmstadt) vorgelegt und im Wasserbad auf ca. 80°C erhitzt. 5 min vor Start des Markierungsexperimentes und in regelmäßigen Abständen nach Start des Markierungsexperimentes wurden 10 ml Kultur zu diesem kochenden Ethanol gegeben. Die Zeitpunkte der Probennahme nach Gabe des $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pulses waren nach 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 und 180 min. Der so gewonnene Zellaufschluß wurde 5 min im Wasserbad bei 80°C erhitzt und dann im Eisbad abgekühlt. Danach wurde der Feststoffanteil durch Zentrifugation (6000 g, 20 min, 4°C) abgetrennt. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand bei -80°C eingefroren. Nach der Gefriertrocknung des ethanolischen Zellextraktes (Lyovac GT2, Leybold, Köln) wurde der Rückstand in 4 ml H_2O aufgenommen, filtriert und mit 0,2 N HCl auf pH 3 eingestellt. Diese Proben wurden anschließend ^{15}N -NMR- und HPLC-Untersuchungen zur Bestimmung der ^{15}N -Markierung und der Aminosäurepoolgröße unterzogen.

2.4.4. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren in Zellextrakten und Kulturüberständen:

Zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren in Zellextrakten und Kulturüberständen wurde eine LC 1090 HPLC-Anlage der Firma Hewlett Packard (Waldbronn) mit einem Fluoreszenzdetektor (HP 1046) verwendet. Über eine automatische Vorsäulen-Derivatisierung mit *ortho*-Phtaldialdehyd (OPA) und 2-Mercaptoethanol wurden die primären Aminogruppen zu fluoreszierenden Isoindolen umgesetzt (Ogden & Földi, 1986). Die chromatographische Trennung der Aminosäure-Derivate erfolgte auf einem *REVERSED-PHASE*-Säulenmaterial (RP-18: C-18 Kieselgel, ODS-5 μ , Vorsäule 3 mm x 30 mm, Hauptsäule 3 mm x 150 mm) mit folgenden Elutionsbedingungen: 40°C, Eluent A (0,1 M Natriumacetat, pH 7,2), Eluent B (Methanol) und einer Durchflußrate von 0,55 ml/min.

Die Eluenten wurden nach folgendem zeitlichen Profil gemischt: 80 % Eluent A und 20 % Eluent B zu Beginn der Trennung, lineare Zunahme des Eluenten B von 20% auf 22% bis 1 min, auf 40% bis 29 min, auf 55% bis 29,1 min, auf 60% bis 37 min, auf 80% bis 39 min. 80 % Eluent B wurden beibehalten bis 42 min und auf 20 % abgesenkt bis 42,5 min. 20 % Eluent B wurden bis zum Ende der Trennung bei 43 min beibehalten. Die Detektion der fluoreszierenden Aminosäure-Derivate erfolgte bei einer Wellenlänge von 243 nm und einer Emissionswellenlänge von 436 nm. Die Auswertung erfolgte über eine Vergleichstrennung einer 200µM Aminosäurestandardlösung (SIGMA AA-S-18, 1:11,5 verdünnt mit H₂O), der 200µM Glutamin zugesetzt wurden. Zur Standardisierung der Aminosäurebestimmungen wurden den Proben 200 µM L-Ornithin als interner Standard zugesetzt.

2.4.5. Präparative Reinigung von Aminosäuren aus ethanolischen Zellextrakten zur quantitativen Bestimmung der ¹⁵N-Markierung:

Ein Aliquot der ethanolischen Zellextrakte wurde erneut gefriergetrocknet (Lyovac GT2, Leybold, Köln) und der Rückstand wurde in 0,2 M Triethylamin/Formiat, pH 3,2 aufgenommen. Über eine Kationenaustausch-Chromatographie mit einer Ultrapac-11µ-Säule (Pharmacia, Freiburg) wurden 2 ml dieser Lösung auf einer FPLC-Anlage (Sykam, Gilching) aufgetrennt. Dabei wurde bei einer Flußrate von 0,5 ml/min ein Gradient aus Eluent A (0,2 M Triethylamin/Formiat, pH 3,2) und Eluent B (0,2 M Triethylamin/Formiat, pH 10,5) verwendet (Sonntag *et al.* 1993). Das Fraktionenvolumen wurde auf 1 ml festgelegt. Die Identifikation der jeweiligen Fraktion erfolgte mittels HPLC (s.o.). Fraktionen, die gleiche Aminosäuren enthielten, wurden vereinigt und mit 8 % NH₃ (v/v) versetzt, um die Puffersubstanz Diethylamin zu verflüchtigen. Zur Abtrennung der Puffersubstanz wurde erneut lyophilisiert. Die Probenvorbereitung zur NMR-Quantifizierung des ¹⁵N-Aminogruppengehaltes der jeweiligen Aminosäure ist bei der entsprechenden NMR-Methode beschrieben.

2.4.6. Die Silikonölzentrifugation:

Die Silikonölzentrifugation wurde bei der Zellvolumenbestimmung angewendet. Sie bewirkte eine Trennung der Zellen vom umgebenden Medium und einen gleichzeitigen Aufschluß der Zellen (Klingenberg & Pfaff, 1967). Bei der Silikonölzentrifugation wurden 100 µl Zellsuspension in 300 µl-Beckmann-Reaktionsgefäße gegeben, in denen zuvor 30 µl 20%ige Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl (Dichte $d=1,04$ (Gemisch aus PN200, Roth ($d=1,03$) und Aldrich ($d=1,05$)) vorgelegt wurden. Bei der anschließenden Zentrifugation der Reaktionsgefäße (30 s bei maximaler Geschwindigkeit in einer Beckmann-Zentrifuge) wurden aufgrund des Dichteunterschiedes zwischen Zellen und umgebenden Kulturmedium die Zellen durch das Silikonöl getrieben, während das Medium im Überstand verblieb.

2.4.7. Bestimmung des Cytoplasmavolumens:

Zur Poolgrößenbestimmung von intrazellulären Aminosäuren wurde das cytoplasmatische Volumen von *C. glutamicum* nach der Methode von Rottenberg (1979) bestimmt. Dieses Meßverfahren beruht auf den Konzentrationsbestimmungen einer für die Cytoplasmamembran permeablen Substanz ($^3\text{H}_2\text{O}$) (Hartmann, Braunschweig) und einer nicht permeablen Substanz (Inulin- ^{14}C -Carboxylsäure) (Hartmann, Braunschweig). Die gemessene Konzentration der permeablen Substanz zeigte das Gesamtvolumen des Ansatzes an, die bestimmte Konzentration der nicht permeablen Substanz entsprach dem extrazellulären Volumen. Das intrazelluläre Volumen ergibt sich aus der Differenz beider Volumina. Nach Inkubation (1 min) der zu untersuchenden *C. glutamicum*-Zellsuspension (500 µl, ca. OD 5) mit beiden radioaktiv markierten Sonden wurde eine Silikonölzentrifugation (5 Proben à 100 µl) durchgeführt. Die Konzentrationsverteilung der permeablen und der nicht permeablen Substanz wurde aus einem Aliquot der Probe mit 4 ml Scintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard, Groningen, NL) in einem Flüssig-Scintillationszähler (Rackbeta 1214, LKB, Schweden) gemessen. Aus der Differenz des „ $^3\text{H}_2\text{O}$ -Raumes“ und des „ ^{14}C -Inulin-Raumes“ ergab sich das cytoplasmatische Volumen.

2.5. Kernresonanzspektroskopische-(NMR)-Methoden

Die NMR-Experimente wurden mit einem Bruker AMX-400 WB NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) ausgeführt.

2.5.1. *In vivo*- ^{15}N -NMR-Messungen:

Der Fermenteraufbau und die Versuchsdurchführung der *in vivo*-NMR-Experimente wurde bereits erläutert (s.o.). Die NMR-Meßzelle des *in vivo*-NMR-Bioreaktors wurde in einen speziell für diesen Zweck angefertigten 20 mm $^{31}\text{P}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -NMR-Probenkopf (Bruker Spectrospin, Faellanden, Schweiz) eingefügt. Die *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experimente wurden bei 40,5 MHz ausgeführt. Die Magnetfeldhomogenität wurde anhand des $^1\text{H}_2\text{O}$ -Signals mit zirkulierender Kulturbrühe eingestellt, welches mit der ^1H -Entkopplungsspule gemessen wurde. Routinemäßig konnten für ^{15}N Linienbreiten von 10-12 Hz erreicht werden. Die extrem langen longitudinalen Relaxationszeiten von ^{15}N erforderten die kontinuierliche ^1H -Entkopplung unter Ausnutzung der großen negativen „Nuclear-Overhauser-Effekte“ (NOE). So wurde die Relaxationszeit von $^{15}\text{NH}_4^+$ mit über 50 s bestimmt. Obwohl sich unter den realisierten Durchflußbedingungen nur ein Bruchteil des theoretisch maximalen NOE im wirksamen Bereich der Entkopplungsspule aufbauen konnte, war die Sensitivität des Meßsystems auf diese Weise wesentlich besser als ohne Ausnutzung des NOE (Blomberg und Rüterjans 1983).

Folgende NMR-Geräteeinstellungen wurden benutzt: 90° -Pulse (70 μs) in Wiederholungszeiträumen von 200 ms, 20,8 kHz Spektralbreite, 2048 komplexe Datenpunkte, kontinuierliche Waltz-16 Breitbandentkopplung (90° ^1H -Puls: 200 μs). 4440 (bei Untersuchung von *C. glutamicum* ATCC 13032) bzw. 2220 Scans (bei Untersuchung von *C. glutamicum* EB1 und *C. glutamicum* MH20-22B) pro ^{15}N -Spektrum. Dies war gleichbedeutend mit einer zeitlichen Auflösung von 15 min bzw. 7,5 min bei der Messung der $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken. Die Aufnahme der aufeinanderfolgenden Spektren bei den kinetischen ^{15}N -NMR-Messungen begann direkt nach der Gabe von 17,7 g $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ in die kontinuierliche Kultur. Die Endkonzentration betrug ca. 100 mM zusätzliches $^{15}\text{NH}_4^+$ zu dem im Reaktor vorhandenem $^{14}\text{NH}_4^+$ -Überschuß. Ein erstes ^{15}N -NMR-Spektrum der Kultur wurde unmittelbar vor der Gabe des $^{15}\text{NH}_4^+$ -Pulses aufgenommen (0-Werte). Die gesamte Meßzeit einer $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetik betrug 3 h. Während dieser Messungen wurde keine Linienverbreiterung der NMR-Spektren beobachtet. Die Peakflächen wurden mit der UXNMR-Software des Spektrometers (Bruker, Karlsruhe) ermittelt.

2.5.2. ^{15}N -NMR-Vermessung von ethanolischen Zellextrakten:

Zur Messung der ^{15}N -NMR-Spektren dieser zu verschiedenen Zeitpunkten des ^{15}N -Markierungsexperimentes gewonnenen Extrakte wurden 2,6 ml in ein 10 mm NMR-Röhrchen vorgelegt und der pH-Wert auf 7 eingestellt. In diesem 10 mm NMR-Röhrchen wurde nun ein 5 mm NMR-Röhrchen coaxial fixiert, welches 1M K^{15}NO_3 (Aldrich) in D_2O (pH 1) enthielt. Diese ^{15}N -Nitratlösung diente in der darauffolgenden ^{15}N -NMR-Messung als Shift-Referenz und interner Konzentrationsstandard.

Die ^{15}N -NMR-Spektren der Extrakte wurden mit folgenden NMR-Geräteeinstellungen bestimmt: 90° -Puls (15 μs) in Wiederholungszeiträumen von 6 s, 20,8 kHz Spektralbreite, 32768 komplexen Datenpunkten, kontinuierlicher Waltz-16 Breitbandentkopplung (90° ^1H -Puls: 200 μs). 4000 Scans wurden pro ^{15}N -Spektrum akkumuliert. Dies war gleichbedeutend mit einer Meßzeit von 13,7 h pro Spektrum. Routinemäßig wurden Linienbreiten von 1 Hz erreicht. Die Peakflächen wurden durch interaktive Integration mit der UXNMR-Software (Bruker, Karlsruhe) ermittelt. Wenn es durch Peak-Überlappungen notwendig war, wurde die Gauss-Transformation zur Auflösungsverbesserung angewandt.

Zur Kalibrierung der NMR-Methoden bezüglich der Signalausbeute aus den biogenen ^{15}N -Aminosäuren wurden ^{15}N -Aminosäuren in bekannten Konzentrationen als Standardsubstanzen (^{15}N -Glutamat & $^{15}\text{N}_2$ -Glutamin, ^{15}N :98%+, Cambridge Isotope Laboratories (CIL)) zu dem Extrakt, der 10 min nach Gabe des $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pulses im ^{15}N -Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032 gewonnen wurde, gegeben. Dieser Extrakt zeichnete sich dadurch aus, daß die biogenen ^{15}N -Aminosäuresignale zwar klar definiert waren, aber noch keine großen Peakflächen aufwiesen. So wurde zuerst der native Extrakt vermessen, dann wurden 25 mM ^{15}N -Glutamat (CIL) zugegeben und erneut das ^{15}N -Spektrum erfaßt. Die Differenz im $^{15}\text{N}_\alpha$ -Signal des Glutamats wurde errechnet und es wurden 50 mM $^{15}\text{N}_2$ -Glutamin (CIL) zugeben. Nach weiterer Messung des ^{15}N -Spektrums wurden wiederum die Differenzen der Peakflächen von $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin und $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin gebildet. Erstaunlicherweise nahm bei der Zugabe von $^{15}\text{N}_2$ -Glutamin auch das $^{15}\text{N}_\alpha$ -Signal des Glutamats zu, was auf eine Verunreinigung der Standardsubstanz durch ^{15}N -Glutamat hinwies. Die Zuordnung der verschiedenen ^{15}N -Signale der *in vivo*- und *ex vivo*-Spektren zu den biogenen Aminosäuren erfolgte anhand von Literaturdaten (Kuesel *et al* 1989, Altenburger *et al.* 1991).

2.5.3. ^1H -NMR zur Bestimmung des $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Markierungsgrades von Ammonium:

Zur Messung der prozentualen ^{15}N -Anreicherung des Gesamtammoniums in Kulturüberständen oder ethanolischen Zellextrakten aus den ^{15}N -Markierungsexperimenten wurden jeweils 600 μl in ein 5 mm NMR-Röhrchen vorgelegt und der pH-Wert wurde mit 25%iger HCl auf ca. 1 eingestellt.

Ein Einzelscan-Protonenspektrum wurde mit folgenden NMR-Parametern aufgenommen: 90° -Puls (10 μs), 8 kHz Spektralbreite, 8192 complex data points.

Die prozentuale ^{15}N -Anreicherung der NH_4^+ -Pools wurde dann nach der von Preece und Cerdan 1993 veröffentlichten Methode bestimmt.

2.5.4. ^1H -NMR zur Bestimmung des $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Markierungsgrades von gereinigten

Aminosäuren:

Zu bestimmten Zeitpunkten eines ^{15}N -Markierungsexperimentes wurden die relativen ^{15}N -Markierungen an allen N-Positionen der ersten NH_4^+ -Assimilationsprodukte Glutamat und Glutamin bestimmt. Dazu mußten diese Aminosäuren aus den betreffenden ethanolischen Zellextrakten mit der bereits beschriebenen FPLC-Methode (s.o.) präparativ gereinigt werden. Das aufgereinigte biogene Glutamat und Glutamin aus der Gefriertrocknung wurden in 700 μl D_2O aufgenommen, filtriert (0,2 μm -Dyna Gard Filter, Microcon Inc., USA) und in ein 5 mm NMR-Röhrchen überführt.

Die ^{15}N -Anreicherungen von Glutamat und Glutamin wurden über ^1H -NMR mit einem Heteronuklearen-Spin-Echo-Differenz-Experiment (SPEED) gemessen. Die Methode wurde durch Abwandlung von Protokollen von Street *et al.* (1993) und Wendisch *et al.* (1997) entwickelt.

Die Basispulssequenz dieser ^1H -Methode lautet:

$$\begin{array}{l}
 ^1\text{H}: \quad 90_x^0 - T_H - (90_y^0 - \tau_A - 90_{-y}^0) - \quad T_H \quad - \text{Acquire} \\
 ^{15}\text{N}: \quad \quad \quad - \Delta T - (90_x^0 - \tau_B - 90_{-x}^0) - T_N -
 \end{array}$$

Die zwei voneinander unabhängigen Spin Echo Verzögerungen T_H und T_N für ^1H und ^{15}N wurden zur getrennten Bestimmung von homonuklearen und heteronuklearen $^3J_{\text{NH}}$ skalaren Kopplungsmodulationseffekten genutzt, um optimale Signal-zu-Rauschen-Verhältnisse zu erhalten. Für jede Bestimmung wurden zwei Spektren aufgenommen, wobei der ^{15}N -selektive 180 Puls ($90^\circ_x - \tau_B - 90^\circ_{-x}$) nur im zweiten Spektrum zur Anwendung kam. Die Anwendung dieses Pulses führt, im Vergleich zum ersten Spektrum, zur selektiven Inversion der ^{15}N -gekoppelten Protonensignale. Der Wirkungsgrad dieser Inversion wurde mit den ^{15}N -Glu- und $^{15}\text{N}_2$ -Gln Reinsubstanzen kalibriert und betrug in der Regel 85 %. Das Differenzspektrum dieser beiden Protonenspektren zeigt nur die ^{15}N -gekoppelten Protonen. Die optimalen Pulssequenzparameter für diese NMR-Meßmethode sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: NMR-Pulssequenzparameter der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SPEED-NMR Methode zur Bestimmung der relativen ^{15}N -Anreicherung in allen Positionen von biogenem Glutamat und Glutamin.

Meßgröße	^1H - Carrier- Position (ppm)	^{15}N -Carrier- Position (ppm)	T_H (ms)	τ_A (ms)	T_N (ms)	τ_B (ms)
$^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat	2,48	- 264	203	3,7	170	0,173
$^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin	2,44	- 264	220	4,2	170	0,173
$^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin	2,14	- 335	548	4,2	544	0,173

Die NMR-Spektren wurden mit folgenden NMR-Parametern bestimmt:

8 kHz Spektralbreite, 16384 komplexe Datenpunkte, 15 s Wiederholungszeitraum, 32-64 Pulse pro Spektrum. Die Peakflächen wurden durch interaktive Integration mit der UXNMR-Software (Bruker, Karlsruhe) ermittelt.

2.6. Mathematisches Modell der Stickstoffflüsse in *C. glutamicum*

Zur Berechnung der Stickstoffflüsse aus den *in vivo* gemessenen $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken in den Glutamat- und Glutaminpool von *C. glutamicum* wurde ein mathematisches Modell des Ammoniumstoffwechsels erstellt. Die kinetischen Verhältnisse bei der NH_4^+ -Fixierung wurden durch Differentialgleichungen und bilanzierende Gleichungen erfaßt. Die zu ermittelnden *in vivo*-Stickstoffflüsse wurden als Lösungen des Modells durch iterative Anpassung der Modellparameter an die betreffenden ^{15}N -Assimilationskinetiken ermittelt.

Folgende biochemische Reaktionen wurden in dem Modell mathematisch formuliert (Abbildung 3):

- Die Ammoniumaufnahme der Zelle über die Cytoplasmamembran geschieht ungehindert durch Diffusion. Sie wurde im Modell durch konstante Influx- und Effluxraten (K_{in} , K_{ex}) charakterisiert.
- Die Netto- NH_4^+ -Aufnahme der Zelle ist im steady state konstant. Im mathematischen Modell resultierte dies in einem konstanten NH_4^+ -Zufluß im Primärstoffwechsel (F_0)
- Die GDH-Reaktion ist prinzipiell reversibel, das Reaktionsgleichgewicht liegt aber stark auf der Glutamatseite. Der entsprechende im Modell formulierte Stickstofffluß (F_1X) wurde ebenfalls reversibel gehalten. Zusätzlich zu diesem bidirektionalen Stofffluß wurde auch der unidirektionale GDH-Nettofluß von 2-Ketoglutarat nach Glutamat (F_1) berechnet.
- Die GOGAT-Reaktion ist prinzipiell ebenfalls reversibel, das Reaktionsgleichgewicht liegt aber auf der Glutamatseite. Der entsprechende im Modell formulierte Stickstofffluß (F_2X) wurde ebenfalls reversibel gehalten. Gleichermaßen wurde auch der unidirektionale GOGAT-Nettofluß von Glutamin nach Glutamat (F_2) berechnet.
- Die GS-Reaktion ist als ATP-abhängige Reaktion unter physiologischen Bedingungen irreversibel. Daher wurde hier nur der unidirektionale Netto-Stickstofffluß F_3 formuliert.
- Der Einbau von Stickstoff in die Biomasse war in der kontinuierlichen Kultur als irreversibel.
- Glutamat wird im Stoffwechsel in Proteine eingebaut und bei vielen Biosynthesen als $[\text{NH}_3]$ -Donator verwendet. Da diese Abflüsse aus dem Glutamatpool in der Bilanz nicht zu unterscheiden waren, wurden sie im mathematischen Modell als ein Stofffluß F_4 ausgedrückt.

- Glutamin wird in Proteine eingebaut. In diesem Fall müssen beide N-Atome des Glutamins durch Neusynthese ersetzt werden. Dieser Stickstofffluß wurde F_5 genannt.
- Wird Glutamin durch glutaminabhängige Transaminasen zu Biosynthesen verbraucht, so entsteht dabei ein Glutamat. Es wird nur der Stickstoff der Amidogruppe durch Biosynthese ersetzt. Dieser Stickstoffabfluß aus der γ -Position von Glutamin wurde F_6 genannt.

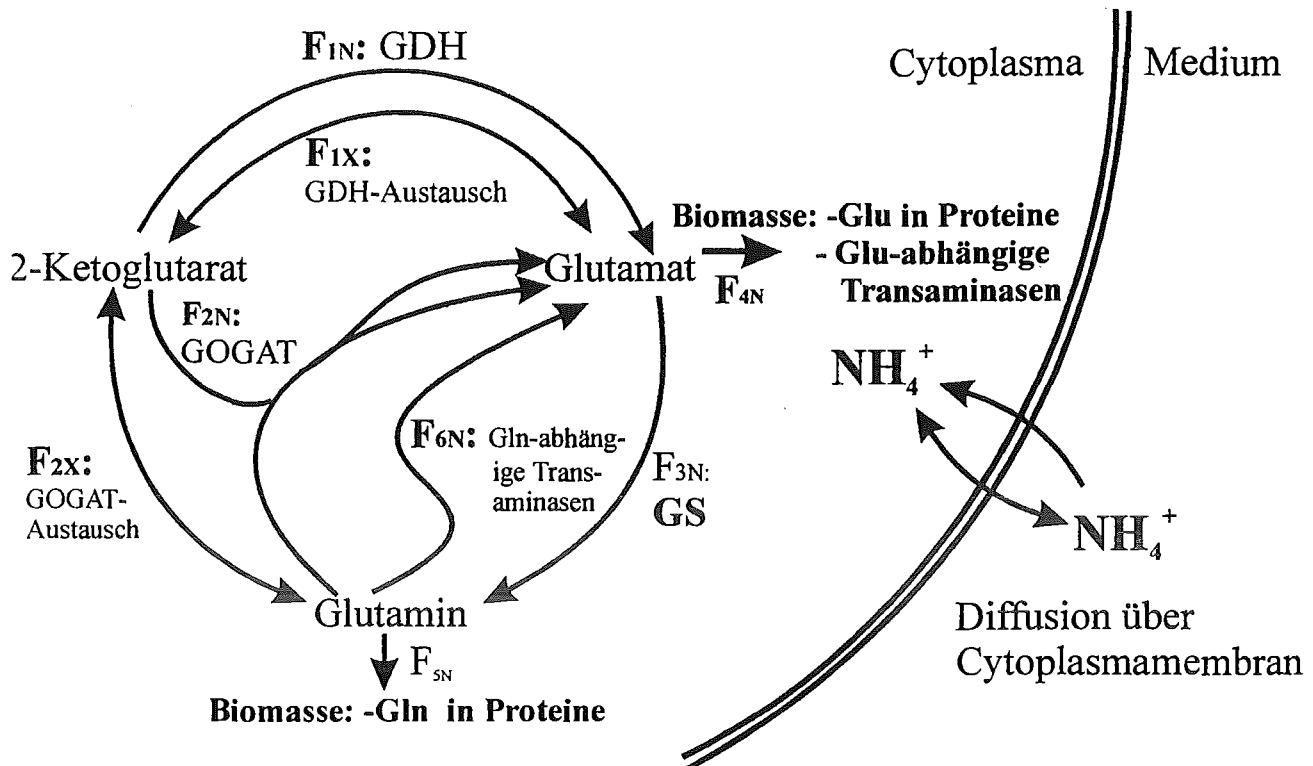


Abbildung 3: Übersicht über die im mathematischen Modell der NH_4^+ -Assimilation von *C. glutamicum* formulierten *in vivo*-Stickstoffflüsse.

Das zeitliche ^{15}N -Markierungsverhalten in jede Position von Glutamat und Glutamin ($\text{N}_\alpha\text{-Glu}$, $\text{N}_\alpha\text{-Gln}$, $\text{N}_\gamma\text{-Gln}$) bei der Ammoniumassimilation wurde nun durch eine Differentialgleichung beschrieben. Die Berechnung des jeweiligen ^{15}N -Gehaltes erfolgte aus der Differenz der zu- und abfließenden Reaktionen des jeweiligen Pools ($\text{N}_\alpha\text{-Glu}$, $\text{N}_\alpha\text{-Gln}$, $\text{N}_\gamma\text{-Gln}$).

Die Differentialgleichung zur Beschreibung der ^{15}N -Einbaukinetik in die α -Position von

$$\text{Glutamin lautete: } \frac{d^{15}N_{\alpha}G\ln}{dt} = [F_3 + F_{2x}] \frac{^{15}N_{\alpha}Glu}{Glu} - [F_2 + F_{2x} + F_5 + F_6] \frac{^{15}N_{\alpha}G\ln}{G\ln}$$

Die Differentialgleichung zur Beschreibung der ^{15}N -Einbaukinetik in die γ -Position von

$$\text{Glutamin lautete: } \frac{d^{15}N_{\gamma}G\ln}{dt} = F_3 \frac{^{15}NH_4}{NH_4} + F_{2x} \frac{^{15}N_{\alpha}Glu}{Glu} + [F_2 + F_{2x} + F_5 + F_6] \frac{^{15}N_{\gamma}G\ln}{G\ln}$$

Die Differentialgleichung zur Beschreibung der ^{15}N -Einbaukinetik in die α -Position von

Glutamat lautete:

$$\frac{d^{15}N_{\alpha}Glu}{dt} = [F_1 + F_{1x}] \frac{^{15}NH_4}{NH_4} + [F_2 + F_{2x} + F_6] \frac{^{15}N_{\alpha}G\ln}{G\ln} + [F_2 + F_{2x}] \frac{^{15}N_{\gamma}G\ln}{G\ln} - [F_{1x} + 2F_{2x} + F_3 + F_4] \frac{^{15}N_{\alpha}Glu}{Glu}$$

Zu Beginn der Simulation der ^{15}N -Markierung der primären Ammoniumacceptoren wurden die ^{15}N -Gehalte von intrazellulärem Glutamat, Glutamin und Ammonium gleich Null gesetzt. Diese Annahme wurde experimentell bestätigt (siehe Ergebnisse). Der Wert für die extrazelluläre NH_4^+ -Konzentration wurde zu Beginn dieser Simulation gleich der gemessenen $^{15}\text{NH}_4^+$ -Konzentration nach Gabe des $^{15}\text{NH}_4^+$ -Pulses mit dem entsprechenden $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis gesetzt.

Die jeweiligen Metabolitpools (Glutamat, Glutamin) wurden im Zeitraum des ^{15}N -Markierungsexperimentes als konstant angesehen, was auch experimentell belegt wurde (siehe Ergebnisse).

Aus dem Stoffwechsel-Netzwerk (Abb. 7) ergaben sich für die *in vivo*-Stickstoffflüsse folgende lineare Zusammenhänge:

- $F_1 + F_3 = F_0$ (d.h. es gibt außer GS und GDH keine weiteren NH_4^+ -Assimilationsenzyme)
- $F_1 + 2F_2 + F_6 = F_3 + F_4$ (d.h. der Glutamatpool bleibt konstant)
- $F_3 = F_2 + F_5 + F_6$ (d.h. der Glutaminpool bleibt konstant)

Als Konstanten gingen folgende Parameter in das Modell ein:

- ^{15}N -Markierungsgrad des NH_4^+ -Pools ($^{14}\text{NH}_4^+ + ^{15}\text{NH}_4^+ / ^{15}\text{NH}_4^+$)
- Spezifische NH_4^+ -Aufnahmerate (F_0)
- Netto-Verbrauch von Glutamat und Glutamin zur Proteinbiosynthese (Diese wurden aus der Sequenzinformation der bekannten *C. glutamicum*-Gene abgeschätzt („Codon-Usage“: Eikmanns 1992))

Dieses Modell des NH_4^+ -Stoffwechsels in *C. glutamicum* wurde auf einem IBM-Personal Computer durch das Computerprogramm Scientist (MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, USA) durch die darin enthaltene „least-squares-fit“-Funktion an die experimentellen Daten angepaßt.

Die iterativ angepaßten Parameter waren im einzelnen:

- Einer der zwei unidirektionalen *in vivo*-Stickstoffflüsse F_1 oder F_3 .
 - Einer der zwei unidirektionalen *in vivo*-Stickstoffflüsse F_2 oder F_6 .

}

Einer der beiden *in vivo* Stickstoffflüsse wurde durch die linearen Gleichungen (s.o) festgelegt
- Die zwei bidirektionalen *in vivo*-Stickstoffflüsse F_{1X} und F_{2X} .
- Die cytoplasmatischen Poolgrößen von Glutamat und Glutamin. (Diese durften aber nicht mehr als 10 % von den experimentell ermittelten Daten abweichen.)
- Der Verlust von Biomasse aus dem Bioreaktor durch die Probenahme während des ^{15}N -Markierungsexperimentes.

Für die GDH-Defektmutante *C. glutamicum* EB 1 wurden F_1 und F_{1X} zu Beginn der Simulation gleich Null gesetzt.

Als Lösungen dieses iterativen Anpassung des mathematischen Modells der NH_4^+ -Assimilation an die *in vivo*- ^{15}N -Markierungsdaten wurden die *in vivo*-Stickstoffflüsse im Rahmen deren statistischer Genauigkeit ermittelt. Der jeweilige statistische Fehler ist als Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Enzymatik und Regulation der Ammoniumassimilation in *C. glutamicum*

3.1.1. Wachstum von *C. glutamicum* mit verschiedenen Ammoniumkonzentrationen:

Zur Untersuchung von ammoniumabhängigen Effekten in *C. glutamicum* wurde ein Kulturmedium entwickelt, dessen einzige Stickstoffquelle aus $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bestand. Wachstumsversuche bei verschiedenen NH_4^+ -Konzentrationen mit *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB1 wurden unternommen um den Einfluß der NH_4^+ -Konzentration auf das Wachstumsverhalten beider Stämme zu charakterisieren.

C. glutamicum ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB 1 zeigten in batch-Kulturen auf einem Komplexmedium (BHI, 5 % Glucose) keinen Unterschied im Wachstum (Daten nicht gezeigt). Auf Minimalmedium (CgC), dessen verfügbare N-Quelle zu 50 % aus Harnstoff bestand, wuchsen beide Stämme ebenfalls gleich (Börmann-El Kholy, 1995).

Bei einer hohen anfänglichen NH_4^+ -Konzentration (90 mM) in dem Medium mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als einzige N-Quelle zeigte *C. glutamicum* ATCC 13032 einen signifikanten Wachstumsvorteil in batch-Kulturen gegenüber der GDH-Mutante (Abb. 4). Bei niedrigen NH_4^+ -Konzentrationen ($< 5\text{mM}$) wurde kein Unterschied im Wachstum beider Stämme beobachtet.

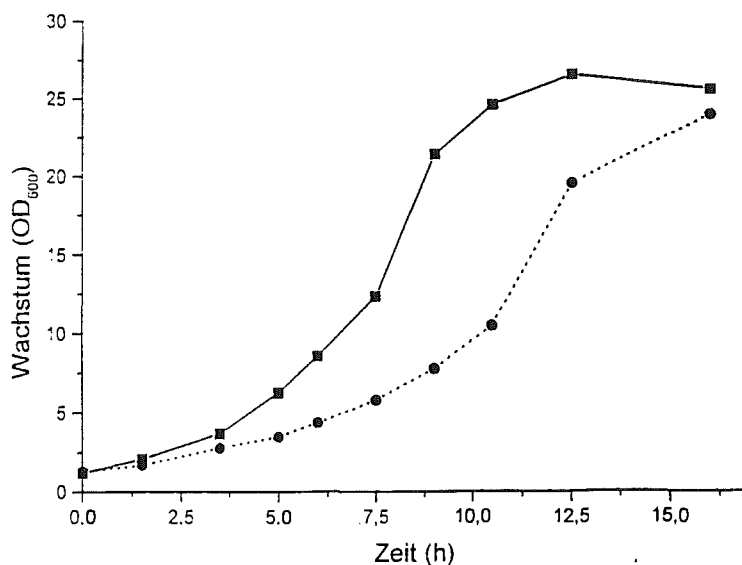


Abbildung 4: Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp (■) und der definierten GDH-Mutante *C. glutamicum* EB 1 (●) in Minimalmedium mit 90 mM NH_4^+ als einzige N-Quelle.

Durch weitere vergleichende Wachstumsexperimente mit *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB 1, bei denen die anfänglich angebotene NH_4^+ -Konzentration über einen weiten Konzentrationsbereich variiert wurde, wurde der Phänotyp der GDH-Mutante weiter charakterisiert.

Unterhalb einer anfänglichen NH_4^+ -Konzentration von ca. 5 mM unterschied sich das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* EB 1 und *C. glutamicum* ATCC 13032 nicht. Wurde die Ammoniumkonzentration zu Beginn der batch-Fermentation über ca. 10 mM erhöht, so wuchs die GDH-Mutante mit einer maximalen Wachstumsrate μ von ca. $0,22 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ (Verdopplungszeit 3,15 h), während der Wildtyp mit einer maximalen Wachstumsrate μ von ca. $0,35 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$ (Verdopplungszeit 1,98 h) wuchs. Bei weiterer Erhöhung des NH_4^+ -Angebotes (bis 90 mM) änderten sich die Wachstumsraten dieser beiden Stämme nicht (Abb. 5).

Daraus wurde geschlossen, daß die GDH im Wildtyp an der Ammoniumassimilation bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen beteiligt war. Weiterhin wurde das identische Wachstumsverhalten beider Stämme bei niedrigen NH_4^+ -Konzentrationen als Hinweis auf ein, in beiden Stämmen unter diesen Bedingungen identisches, Ammoniumassimilationssystem gewertet.

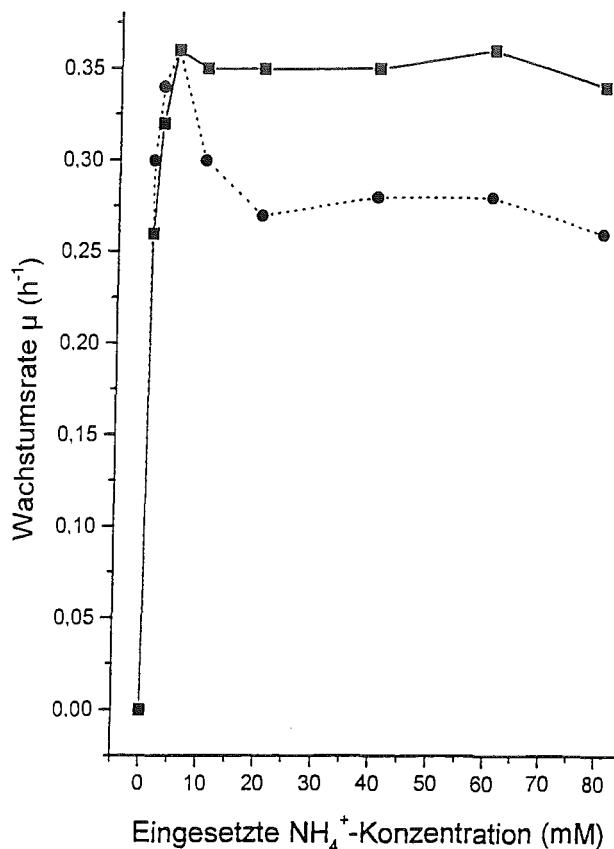


Abbildung 5: Verschiedene Wachstumsraten μ von *C. glutamicum* ATCC 13032 (■) und *C. glutamicum* EB 1 (●) in Minimalmedium mit verschiedenen NH_4^+ -Konzentrationen.

3.1.2. Enzyme der Ammoniumassimilation in *C. glutamicum*

Zur Untersuchung der Enzyme der NH_4^+ -Assimilation in *C. glutamicum* wurden die spezifischen Aktivitäten der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme (GDH, GS, GOGAT) in Rohextrakten bestimmt. In zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* ATCC 13032, die in Minimalmedium mit 90 mM NH_4^+ wuchsen, waren die Enzymaktivitäten von GDH (ca. 2,5 U/mg Protein) und GS (ca. 0,1 U/mg Protein) nachweisbar. Eine spezifische GOGAT-Aktivität war unter diesen Bedingungen in *C. glutamicum* ATCC 13032 nicht meßbar.

In Zellextrakten von *C. glutamicum* EB 1 waren die GS (ca. 300 mU/mg Protein) und die GOGAT (ca. 40 mU/mg Protein) nachweisbar. In *C. glutamicum* EB 1 war keine GDH-Aktivität feststellbar. Die Ergebnisse zeigten, daß in den beiden Stämmen wahrscheinlich verschiedene NH_4^+ -Assimilationsenzyme funktionell waren.

Der K_m -Wert der GDH für NH_4^+ aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde mit einem Wert von $8,6 \pm 1,1$ mM bestimmt. Die geringe NH_4^+ -Affinität der GDH für NH_4^+ wurde als weiterer Hinweis auf die Beteiligung dieses Enzyms bei der Ammoniumassimilation bei hohen Ammoniumkonzentrationen gewertet. Eine K_m -Wert Bestimmung der GS für NH_4^+ war durch die Verwendung der unphysiologischen Testreaktion nicht möglich. Der K_m -Wert der GS aus *C. glutamicum* für NH_4^+ (50 μM) wurde von Wakisaka *et al.* mit dem gereinigten Enzym bestimmt (Wakisaka *et al.* 1986). NADH konnte im Widerspruch zu den Ergebnissen zu Vandecasteele *et al.* nicht als Cofaktor der GOGAT aus *C. glutamicum* fungieren (Vandecasteele *et al.* 1975).

3.1.3. Inhibitorische Wirkung von DL-Methionin-DL-Sulfoximin auf die Enzyme des GS/GOGAT-Weges in *C. glutamicum*

Da der GS/GOGAT-Weg zur Glutamatbiosynthese über die Aminosäure Glutamin verläuft, wurde postuliert, daß Substratanaloga zu Glutamin die Enzyme dieses Stoffwechselweges hemmen. Somit könnte eine Inhibition des GS/GOGAT-Weges in *C. glutamicum* EB1 zeigen, ob es neben diesem NH_4^+ -Assimilationsweg weitere NH_4^+ -assimilierende Enzyme in diesem Stamm gibt. Ein bekanntes Analogon zu Glutamin und ein Inhibitor der GS ist DL-Methionin-DL-Sulfoximin (MSX) (Manning *et al.* 1969, Weisbrod und Meister 1973, Chalot *et al.* 1991, Mora *et al.* 1987, Amancio *et al.* 1991).

Zuerst wurden Dosis-Wirkungs-Analysen von GDH, GS und GOGAT mit steigenden MSX-Konzentrationen im entsprechenden Enzymtest durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 A und 6 B dargestellt. Die Anwesenheit geringer MSX-Konzentrationen hatte einen drastischen Effekt auf die spezifische GS-Aktivität im *C. glutamicum* Rohextrakt (K_i Wert: 90 μ M). Die GOGAT wurde erst bei deutlich höheren MSX-Konzentrationen gehemmt (K_i Wert: 4,5 mM). Dagegen hatten MSX-Konzentrationen bis 100 mM keinen Effekt auf die spezifische GDH-Aktivität. Somit wurde gezeigt, daß MSX beide Enzyme des GS/GOGAT-Weges hemmte.

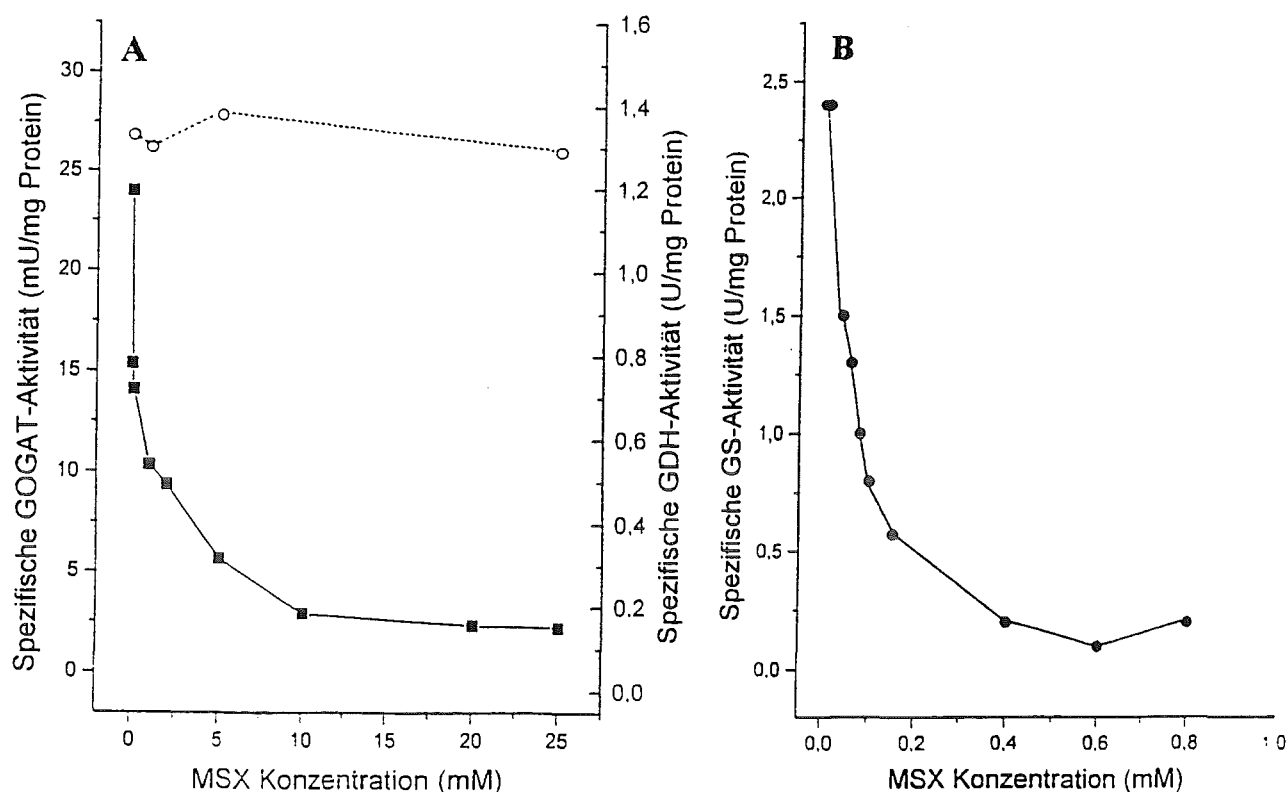


Abbildung 6 A & B: Einfluß des Glutaminanalogons MSX auf die Aktivitäten von GS (●) und GOGAT (■) aus *C. glutamicum*. Die GDH (O) aus *C. glutamicum* wurde durch MSX nicht gehemmt.

Zur weiteren Untersuchung der Ammoniumassimilationswege in *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB 1 wurden Wachstumsexperimente in Minimalmedium mit 90 mM NH_4^+ als alleinige Stickstoffquelle und verschiedenen MSX-Konzentrationen unternommen. MSX wurde dem Medium in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 mM. *C. glutamicum* ATCC 13032 wuchs in Gegenwart von 100 mM MSX. Dahingegen war bei *C. glutamicum* EB1 bei 100-200 μ M MSX kein Wachstum mehr festzustellen.

Die Wachstumskurven beider Stämme in Minimalmedium mit 90 mM NH_4^+ als alleinige N-Quelle in An- und Abwesenheit von 10 mM MSX sind in Abbildung 7 dargestellt. Das Wachstum von *C. glutamicum* EB 1 wurde durch 10 mM MSX im Minimalmedium gehemmt. Es wurde geschlossen, daß MSX spezifisch auf die ammoniumassimilierenden Enzyme GS und GOGAT wirkte, da sich das Wachstum beider Stämme mit dieser Substanz differenzieren ließ. Da MSX stark wachstumshemmend auf *C. glutamicum* EB1 wirkte, wurde gefolgert, daß es in diesem Stamm außer dem GS/GOGAT-Weg keinen weiteren NH_4^+ -Assimilationsweg gab.

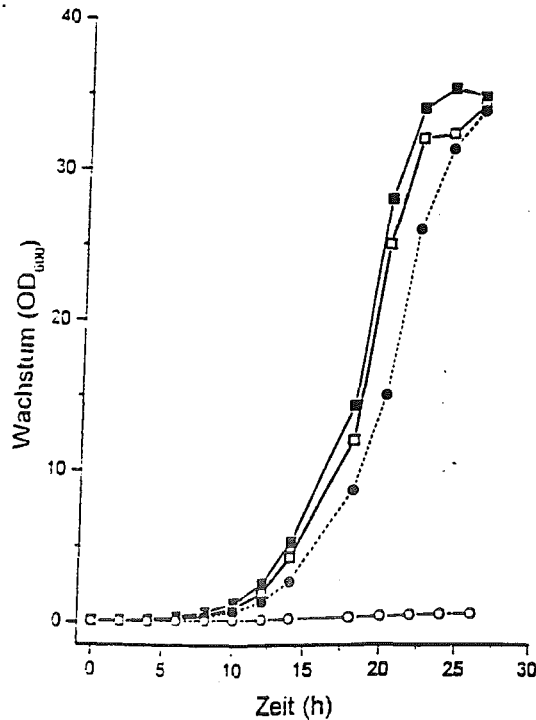


Abbildung 7: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB1 in An- (□○) und Abwesenheit (■●) von 10 mM MSX.

3.1.3. Regulation der Ammoniumassimilation in *C. glutamicum*

Zur weiteren Aufklärung der verschiedenen spezifischen Enzymaktivitäten von GDH, GS und GOGAT in *C. glutamicum* ATCC 13032 und der GDH-Mutante wurden Versuche zur Regulation dieser Enzyme in Abhängigkeit der NH_4^+ -Konzentration durchgeführt. Dazu wurden die beiden Stämme mit verschiedenen NH_4^+ -Konzentrationen in batch-Kultur kultiviert. Weiterhin wurden kontinuierliche Fermentationen mit *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. glutamicum* EB1 sowie dem Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B durchgeführt, bei denen die NH_4^+ -Verfügbarkeit variiert wurde. Die spezifischen Aktivitäten der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme wurde im Rohextrakt gemessen.

Unterhalb einer in den batch-Fermentationen eingesetzten NH_4^+ -Konzentration von 10 mM betrug im *C. glutamicum* Wildtyp die spezifische GDH-Aktivität $1 \pm 0,2$ U/mg Protein. Oberhalb dieser eingesetzten NH_4^+ -Konzentration wurde die spezifische GDH-Aktivität mit konstanten Werten von $1,7 \pm 0,2$ U/mg Protein gemessen. Die GDH wurde also im untersuchten NH_4^+ -Konzentrationsbereich von 1 – 90 mM nicht in Abhängigkeit der NH_4^+ -Verfügbarkeit reguliert. Im Gegensatz zur GDH wurden die Enzyme des GS/GOGAT-Weges stark in Abhängigkeit des NH_4^+ -Angebotes reguliert. Die spezifische GS-Aktivität betrug in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei einer NH_4^+ -Konzentration von unter 10 mM bis zu 1,5 U/mg Protein. Bei Erhöhung der eingesetzten NH_4^+ -Konzentration auf über 10 mM sank diese spezifische Aktivität auf einen Wert von 100 mU/mg Protein ab. Die spezifische GS-Aktivität in *C. glutamicum* ATCC 13032 war somit stark von der Ammoniumkonzentration abhängig. Das gleiche Regulationsverhalten wurde auch in *C. glutamicum* EB 1 beobachtet. Die spezifische GS-Aktivität lag mit ca. 2 U/mg Protein bei einer NH_4^+ -Konzentration unter 10 mM 25 % höher als im Wildtyp. Bei Ammoniumkonzentrationen über 10 mM war die GS-Aktivität mit 300 mU/mg Protein um den Faktor 3 höher als beim Wildtyp unter gleichen Bedingungen.

Bei NH_4^+ -Konzentrationen unter 7,5 mM war eine spezifische GOGAT-Aktivität von ca. 35 mU/mg Protein beim Wildtyp meßbar. Wurde die NH_4^+ -Konzentration über diesen Wert erhöht, war keine GOGAT-Aktivität mehr im Zellextrakt von *C. glutamicum* ATCC 13032 nachweisbar. Im Gegensatz hierzu war die GOGAT in *C. glutamicum* EB 1 unabhängig von der angebotenen NH_4^+ -Konzentration aktiv. Dies ließ auf eine geänderte Signalsituation im Regulationssystem dieses Enzyms in *C. glutamicum* EB1 schließen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 8 A und 8 B dargestellt.

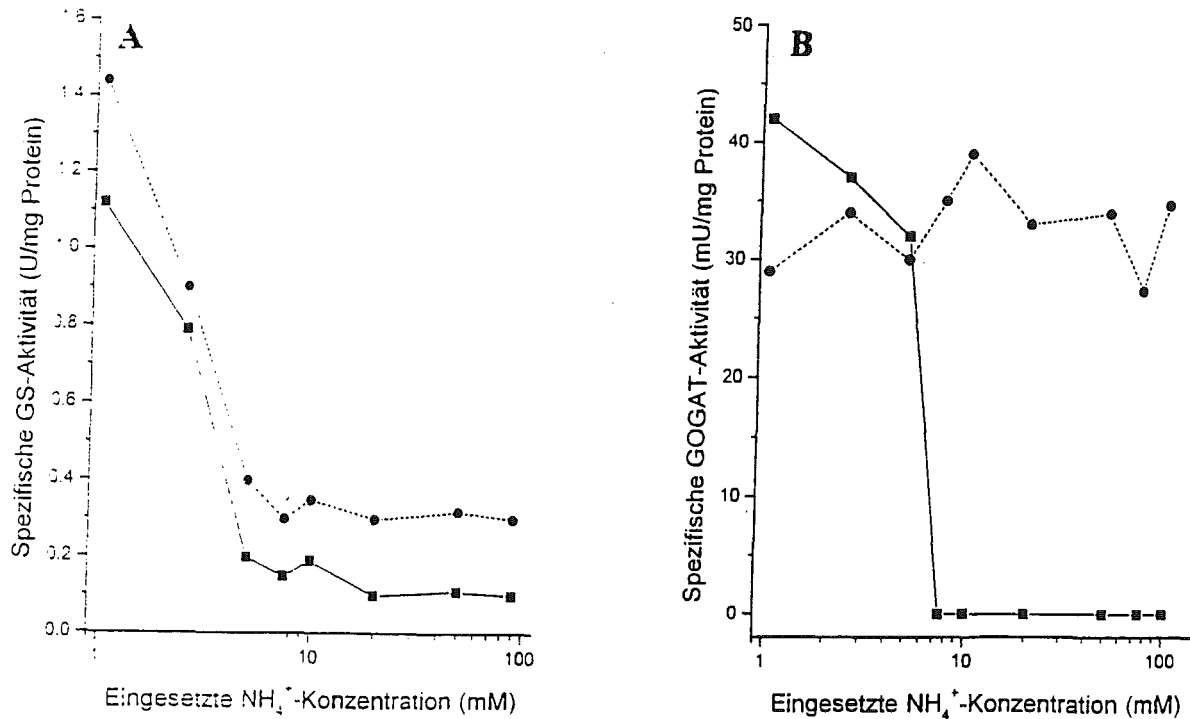


Abbildung 8 A & B: Regulation von GS und GOGAT aus *C. glutamicum* ATCC 13032 (■) und *C. glutamicum* EB 1 (●) in Minimalmedium mit verschiedenen NH_4^+ -Konzentrationen.

Weiterführend wurden mit den *C. glutamicum*-Stämmen ATCC 13032 und –EB 1 sowie dem Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B kontinuierliche Fermentationen durchgeführt. Dieses Fermentationsverfahren wurde angewendet, um die ammoniumassimilierenden Enzyme in *C. glutamicum* bei Wachstum, bei C-Limitierung und definierten NH_4^+ -Überschüssen sowie bei NH_4^+ -limitiertem Wachstum zu charakterisieren. Diese Bedingungen waren in den batch-Kulturen nicht realisierbar.

C. glutamicum ATCC 13032 wurde in kontinuierlicher Kultur im *in vivo*-NMR-Bioreaktor vermehrt. Als Medium wurde das synthetische Hochzelllichtfermentationsmedium (siehe Material und Methoden) eingesetzt. Dabei wurden die Bedingungen so gewählt, daß zuerst die NH_4^+ -Verfügbarkeit (150 mM NH_4^+ im Zulauf) das Wachstum der Kultur begrenzte und sich ein konstanter Glucoseüberschuß aufbaute. Die Glucosekonzentration im Medienzulauf lag konstant bei 550 mM. Nach 50 h dieses Fließgleichgewichtes wurde die NH_4^+ -Verfügbarkeit auf 225 mM im Zulauf erhöht. Dadurch wurde die N-Limitierung aufgehoben, die Bakterienkultur verbrauchte die überschüssige Glucose restlos. Nun stellte sich ein neues Fließgleichgewicht mit C-Limitierung und einem konstanten NH_4^+ -Überschuß ein. Der Übergang zwischen diesen beiden Fermentationszuständen konnte beobachtet werden. Der Verlauf dieser Fermentationsführung mit *C. glutamicum* ATCC 13032 ist in Abb. 9 dargestellt.

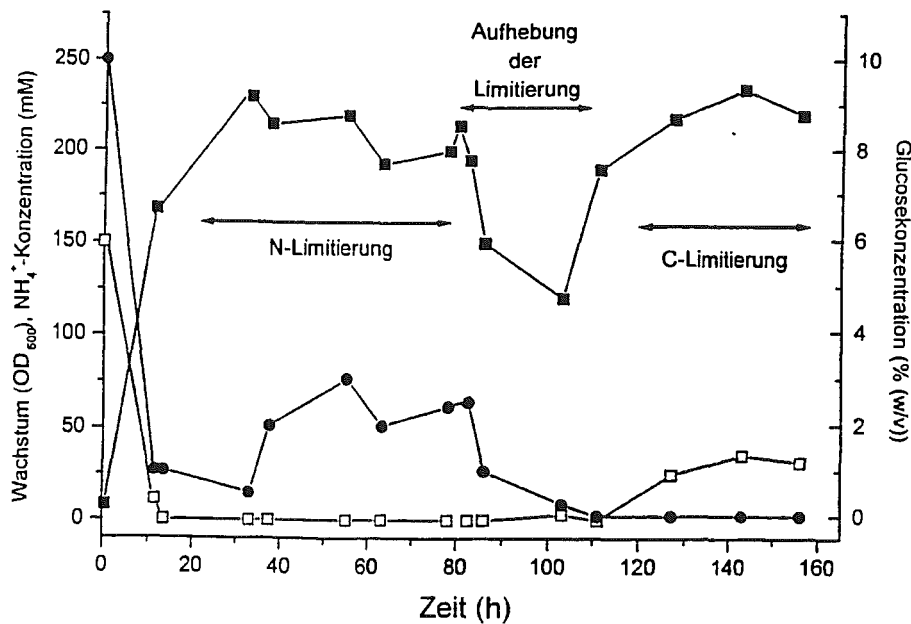


Abbildung 9: Kontinuierliche Fermentation von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei C- und N-Limitierung: Verlauf der optischen Dichte (■), der Glucose- (□) und der NH_4^+ -Konzentration (●) im Kulturüberstand. Alle Parameter wurden off-line bestimmt.

Alle Fermentationsparameter lagen bei den eingestellten Werten (siehe Material und Methoden). Die Biotrockenmassekonzentration lag bei 40-50 g/l. Die Ergebnisse der *ex vivo*-Aktivitätsbestimmungen von GDH, GS und GOGAT in *C. glutamicum* bei Wachstum unter N- bzw. C-Limitierung sind in Abb. 10 zusammengefaßt.

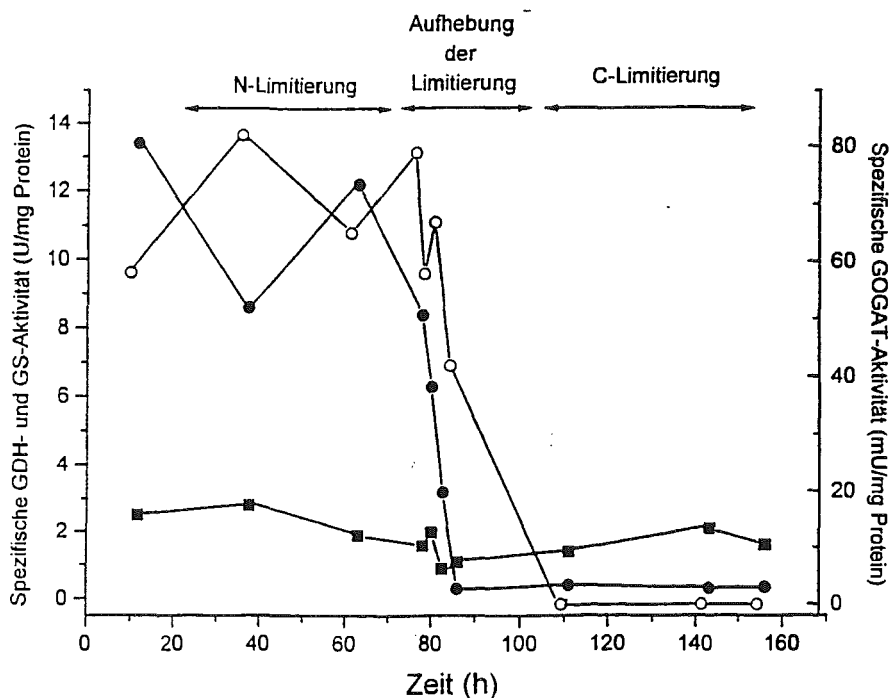


Abbildung 10: Werte der spezifischen GOGAT- (O), der spezifischen GS- (●) und der spezifischen GDH- (■) Aktivitäten in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei kontinuierlicher Kultivierung unter C- und N-Limitierung

Bei NH_4^+ -Limitierung oder NH_4^+ -Überschuß stellten sich zwei verschiedene Zustände bezüglich der spezifischen Aktivitäten der ammoniumassimilierenden Enzyme in *C. glutamicum* ATCC 13032 ein.

Bei NH_4^+ -Limitierung wurden spezifische GOGAT-Aktivitäten von ca. 50 mU/mg Protein und spezifische GS-Aktivitäten von ca. 12 U/mg Protein gemessen. Die spezifische GOGAT-Aktivität lag damit im aus den batch-Fermentationen bekannten Bereich. Die spezifische GS-Aktivität war dagegen zehnfach höher als in den batch-Fermentationen festgestellt wurde. Daraus wurde geschlossen, daß unter den Bedingungen der batch-Fermentationen die GS noch nicht voll induziert sein konnte. Wurde die NH_4^+ -Limitierung aufgehoben, so sank die spezifische GS-Aktivität innerhalb von 8 h auf einen Wert von 300 mU/mg Protein. Bei diesem Wert blieb die GS bei N-Überschuß konstant. 24 h nachdem die N-Limitierung aufgehoben wurde, konnte keine spezifische GOGAT-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Die GDH war bei kontinuierlichem Wachstum unabhängig von der NH_4^+ -Verfügbarkeit aktiv. Die spezifische GDH-Aktivität blieb während des gesamten Versuches bei 1-2 U/mg Protein. Die definierte GDH-Mutante *C. glutamicum* EB 1 wurde ebenfalls unter N- und C-Limitierung kontinuierlich im *in vivo*-NMR-Bioreaktor kultiviert. Dieser Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie der oben beschriebene Versuch mit *C. glutamicum* ATCC 13032. Der Verlauf dieser Fermentation ist in Abb. 11 dargestellt.

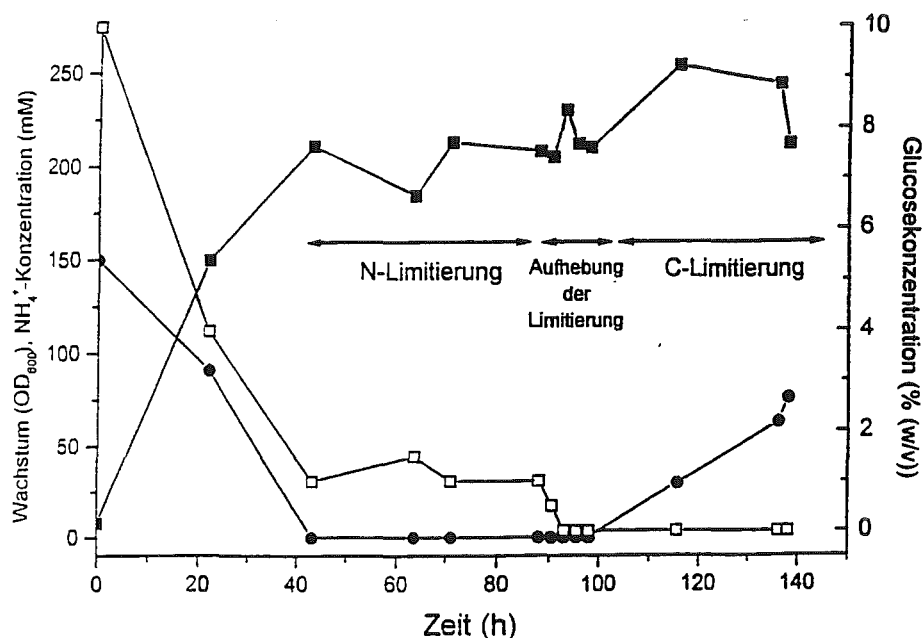


Abbildung 11: Kontinuierliche Fermentation von *C. glutamicum* EB1 bei C- und N-Limitierung: Verlauf der optischen Dichte (■), der Glucose (□) und der NH_4^+ -Konzentration (●) im Kulturüberstand. Alle Parameter wurden off-line bestimmt.

Alle Fermentationsparameter lagen bei den eingestellten Werten (siehe Material und Methoden). Die Biotrockenmassekonzentration lag konstant bei 50 ± 4 g/l. Die Ergebnisse der *ex vivo*-Aktivitätsbestimmungen von GDH, GS und GOGAT in *C. glutamicum* EB1 bei Wachstum unter N- bzw. C-Limitierung sind in Abb. 12 zusammengefaßt.

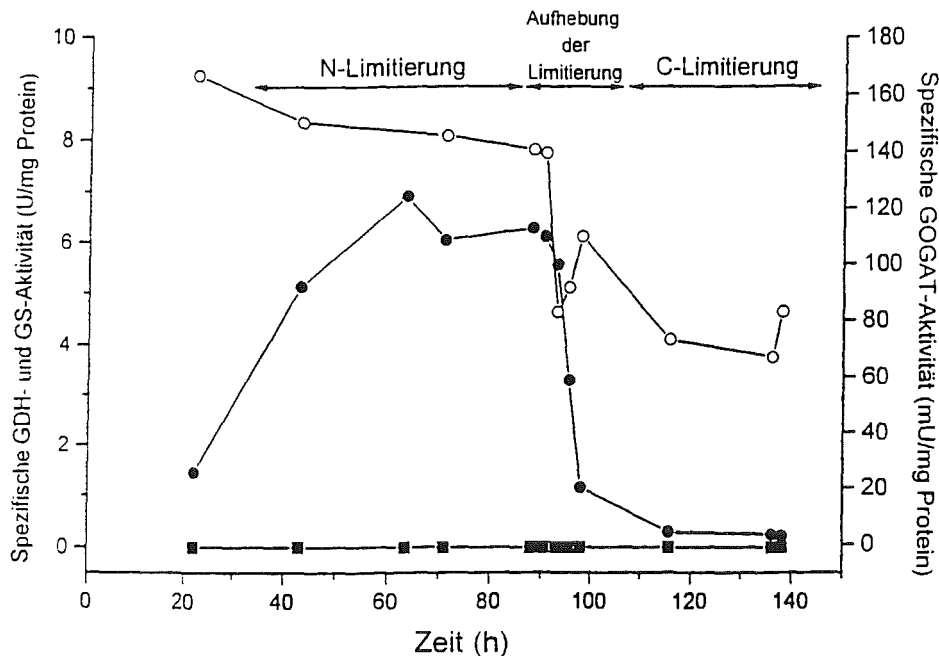


Abbildung 12: Verlauf der spezifischen GOGAT- (○), der spezifischen GS- (●) und der spezifischen GDH- (■) Aktivitäten in *C. glutamicum* EB 1 bei kontinuierlicher Kultivierung unter C- und N-Limitierung

Es wurden zwei verschiedene physiologische Zustände der ammoniumassimilierenden Enzyme GS und GOGAT bei NH_4^+ -Limitierung bzw. NH_4^+ -Überschuß festgestellt.

Bei NH_4^+ -Limitierung wurden spezifische GOGAT-Aktivitäten von ca. 150 mU/mg Protein gemessen. Dieser Wert entspricht dem dreifachen jener Aktivität, die in *C. glutamicum* ATCC 13032 unter identischen Bedingungen gemessen wurde. Die spezifische GS-Aktivität betrug bei NH_4^+ -Limitierung ca. 6.5 U/mg Protein, was im Bereich der Wildtypaktivität lag. Bei Aufhebung der NH_4^+ -Limitierung sank die spezifische GS-Aktivität innerhalb von 8 h auf einen Wert von 300 mU/mg Protein. Bei diesem Wert blieb die GS bei N-Überschuß konstant. Dieser Wert war genauso hoch wie der von *C. glutamicum* ATCC 13032 unter gleichen Bedingungen. Die spezifische GOGAT-Aktivität sank bei Überführung der kontinuierlichen Kultur von der N- in die C-Limitierung auf ca. 70 mU/mg Protein. In *C. glutamicum* ATCC 13032 war unter diesen Fermentationsbedingungen keine GOGAT-Aktivität mehr nachweisbar.

Analog zu den kontinuierlichen Fermentationen mit wechselnder NH_4^+ -Verfügbarkeit, die mit *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB 1 durchgeführt wurden, wurde ein solcher Versuch mit dem Lysinproduktionsstamm MH 20-22B durchgeführt. Die Fragestellung bei dieser kontinuierlichen Fermentation war: wie stellt sich die Ammoniumassimilation in *C. glutamicum* MH20-22B qualitativ unter Lysinproduktionsbedingungen dar und ist das Regulationsverhalten der ammoniumassimilierenden Enzyme in diesem Produktionsstamm verschieden von dem des Wildtypes?

Die Fermentationsführung war prinzipiell mit den oben beschriebenen Versuchen identisch. Das optimierte Lysinproduktionsmedium (Kelle *et al.* 1996) wurde verwendet. Es wurde bei höheren NH_4^+ -Konzentrationen gearbeitet. Die NH_4^+ -Limitierung wurde noch bei 225 mM NH_4^+ im Medium erreicht. Die NH_4^+ -Konzentration im Medium betrug bei NH_4^+ -Überschußbedingungen 700 mM, was der ermittelten optimalen NH_4^+ -Konzentration bei der Lysinproduktion entspricht (Kelle *et al.* 1996).

Eine Übersicht über den Verlauf von Glucose- und NH_4^+ -Konzentration sowie des Wachstums über den Fermentationszeitraum gibt Abbildung 13.

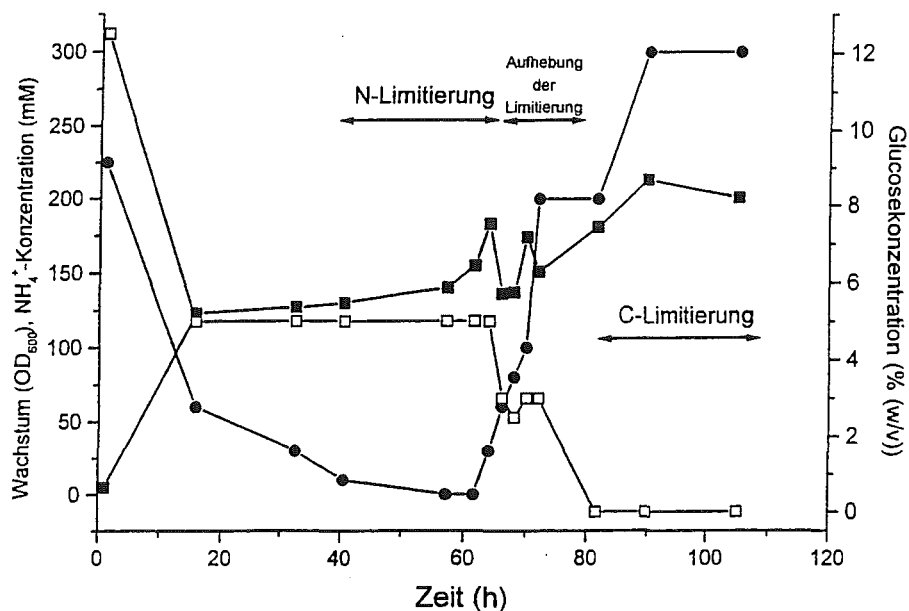


Abbildung 13: Kontinuierliche Fermentation des Lysinproduktionsstammes *C. glutamicum* MH20-22B bei C- und N-Limitierung: Verlauf der optischen Dichte (■), der Glucose (□) und der NH_4^+ -Konzentration (●) im Kulturüberstand. Alle Parameter wurden off-line bestimmt.

Alle Fermentationsparameter entsprachen über die gesamte Fermentationszeit den eingestellten Werten (siehe Material und Methoden). In Abbildung 14 ist die Lysinkonzentration im Kulturüberstand der kontinuierlichen Fermentation dargestellt. Als Nebenprodukte der Lysinproduktion wurden Glutamat (2 mM) und Alanin (1,5 mM) nachgewiesen.

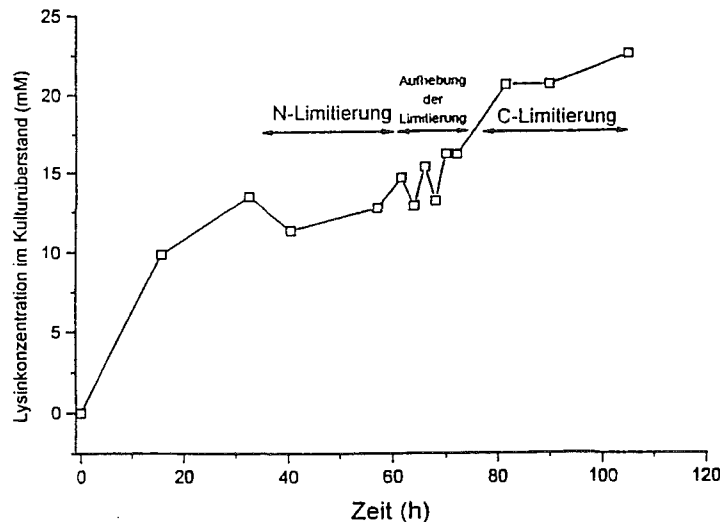


Abbildung 14: Konzentration von produziertem Lysin (mM) (□) im Kulturüberstand von *C. glutamicum* MH20-22B in kontinuierlicher Kultur bei C- und N-Limitierung.

C. glutamicum MH20-22B schied sowohl bei N- als auch bei C-limitiertem, kontinuierlichem Wachstum L-Lysin in das Kulturmedium aus. Die *ex vivo* gewonnenen Daten zu den spezifischen Aktivitäten der NH_4^- -assimilierenden Enzyme bei Wachstum und Lysinproduktion dieses Stammes unter den gegebenen Bedingungen sind in Abbildung 15 dargestellt.

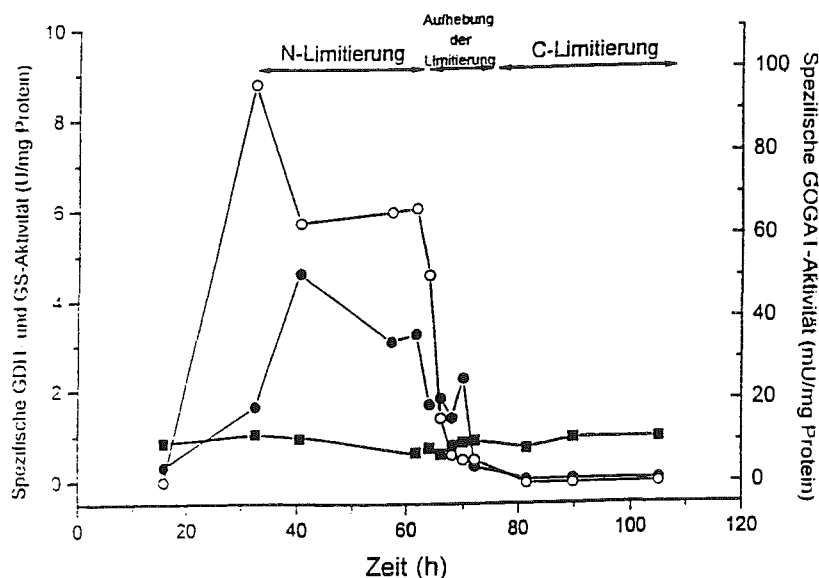


Abbildung 15: Verlauf der spezifischen GOGAT- (O), der spezifischen GS- (●) und der spezifischen GDH- (■) Aktivitäten in *C. glutamicum* MH20-22B bei kontinuierlichem Wachstum und Lysinproduktion unter C- und N-Limitierung

Das Regulationsverhalten von GS, GOGAT und GDH in *C. glutamicum* MH 20-22B glich funktionell dem von *C. glutamicum* ATCC 13032. Die spezifischen Enzymaktivitäten des Ammoniumassimilationsapparates unter NH_4^+ -Mangel lagen im gleichen Bereich wie die des Wildtypes. Die spezifische GOGAT-Aktivität betrug ca. 60 mU/mg Protein. Diese Aktivität sank bei steigender NH_4^+ -Verfügbarkeit unter die Nachweisgrenze. Die spezifische GDH-Aktivität von ca. 1 U/mg Protein war mit der des *C. glutamicum* Wildtypes identisch und wurde ebenfalls von der angebotenen NH_4^+ -Konzentration nicht beeinflusst. Die spezifische GS-Aktivität lag mit 3-4 U/mg Protein bei NH_4^+ -Limitierung niedriger als im Wildtyp.

Ein gravierender Unterschied zwischen *C. glutamicum* MH20-22B und *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde bei Wachstum mit NH_4^+ -Überschuß gefunden: die spezifische GS-Aktivität (30 mU/mg Protein) betrug nur etwa 10 % der Wildtypaktivität.

Die Ergebnisse zur Regulation der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme in den drei untersuchten *C. glutamicum*-Stämmen ließen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Das regulative Verhalten von *C. glutamicum* EB1, -MH20-22B und -ATCC 13032 bezüglich GS und GOGAT wurde beim Übergang der kontinuierlichen Kulturen von NH_4^+ -Mangel zu NH_4^+ -Überschuß als phänotypisch gleich erkannt. Beide spezifischen Enzymaktivitäten sanken mit steigendem NH_4^+ -Angebot in beiden untersuchten Stämmen. Lediglich die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme bei C-Limitierung unterschieden sich stark. *C. glutamicum* EB1 benutzte die Enzyme des GS-GOGAT-Weges weiterhin zur Glutamatsynthese, während er im Wildtyp durch Herabsetzung der GOGAT-Aktivität nicht mehr verwendet werden konnte. Die spezifische GS-Aktivität in *C. glutamicum* MH20-22B lag bei C-Limitierung und NH_4^+ -Überschuß lediglich bei 10 % der Wildtypaktivität.

3.2. Quantitative Untersuchung der Ammoniumassimilation in *C. glutamicum* mittels *in vivo*- ^{15}N -NMR

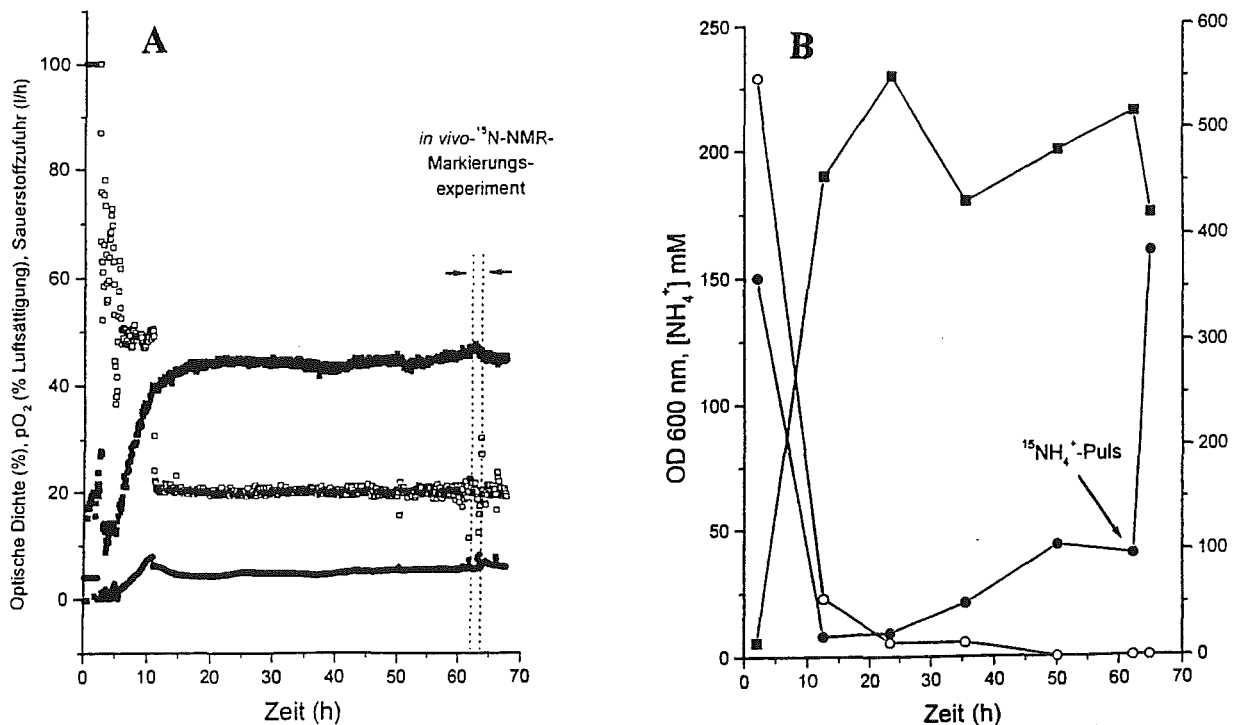
Die im Zuge dieser Arbeit entwickelte *in vivo*- ^{15}N -NMR Methode hatte als Zielsetzung die qualitative und quantitative Erfassung des Ammoniumstoffwechsels in intakten *C. glutamicum* Zellen unter definierten Bedingungen. Die *in vivo* $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken in die ersten Ammoniumassimilationsprodukte von verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen wurden NMR-spektroskopisch gemessen. Die spezifischen *in vivo*-Reaktionsgeschwindigkeiten (*in vivo*-Stickstoffflüsse) der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme wurden dann durch ein computergestütztes, mathematisches Modell der NH_4^+ -Assimilation in *C. glutamicum* berechnet.

3.2.1. Untersuchung der Ammoniumassimilation von *C. glutamicum* ATCC 13032 mittels *in vivo*- ^{15}N -NMR

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde im *in vivo*-NMR Bioreaktor kontinuierlich kultiviert. Durch die Fermentationsbedingungen wurde lediglich Wachstum und keine Produktbildung ermöglicht.

Die Fermentationsbedingungen wurden im einzelnen im Material- und Methodenteil dieser Arbeit beschrieben. Während der Fermentation wurden in regelmäßigen Abständen Biomasseproben zur *in vitro* Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der ammoniumassimilierenden Enzyme und zur Charakterisierung der Kulturüberstände genommen. Die so durchgeführte kontinuierliche Fermentation stellte eine aerob wachsende ($\text{pO}_2 > 20\%$ Luftsättigung), hochzelldichte (50 g Biotrockenmasse/l) und kohlenstofflimitierte *C. glutamicum*-Kultur mit einem definiertem NH_4^+ -Überschuß (50 mM) bereit. Nach 50 h in diesem Fließgleichgewicht wurde das *in vivo*- ^{15}N -Markierungsexperiment begonnen. Hierzu wurde ein $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puls (ca. 100 mM) auf das System gegeben und die Anreicherung dieses Tracers in den betreffenden stickstoffhaltigen Metabolitpools *in vivo* gemessen. Die Signale akkumulierten 15 min für ein Spektrum. Das Experiment dauerte 3 h. Während des Experimentes wurden Biomasseproben zur späteren Analyse der löslichen Metabolitpools aus dem Fermenter entnommen, die sofort in kochendem Ethanol aufgeschlossen wurden.

Die on-line und off-line gemessenen Fermentationsparameter dieses ^{15}N -NMR-Experimentes sind in den Abbildungen 16 A und 16 B dargestellt.



Abbildungen 16: A: On-line gemessene Werte von pO₂ (% Luftsättigung) (□), Sauerstoffzufuhr (l/h) (●) und relativer optischer Dichte (%) (■) der kontinuierlichen *C. glutamicum* ATCC 13032-Kultur im *in vivo*-¹⁵N-NMR-Experiment. B: Off-line gemessene Werte von NH₄⁺-Konzentration (mM) (●), Glucosekonzentration (mM) (○) und optischer Dichte bei 600 nm (■) der kontinuierlichen *C. glutamicum* ATCC 13032-Kultur im *in vivo*-¹⁵N-NMR-Experiment.

Bei diesen Fermentationsbedingungen betrug die Ammoniumaufnahme von *C. glutamicum* 6,42 nmol / min mg TW. Diese im Fließgleichgewicht der Fermentation konstante Aufnahme rate änderte sich nach der Gabe des ¹⁵NH₄⁺-Pulses nicht signifikant (Ammoniumaufnahme rate nach ¹⁵NH₄⁺-Puls: 6,5 nmol / min mg TW). Im Fließgleichgewicht wurden aus einem Gramm zugeführten NH₄⁺ 10 g Biotrockenmasse gebildet. Pro g verbrauchter Glucose wurden im Fließgleichgewicht 0,25 g Biotrockenmasse gebildet. Außer Biomasse konnte in der Kulturbrühe kein Nebenprodukt in nennenswerten Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die spezifischen Aktivitäten der NH₄⁺-assimilierenden Enzyme (GS: ca. 300 mU/mg Protein, GDH: ca. 900 mU/mg Protein, GOGAT: unter der Nachweisgrenze) entsprachen den aus den vorhergehenden Versuchen zur Regulation dieser Enzyme (s.o.) erwarteten Werten.

Alle Aktivitäten waren über den Fermentationszeitraum und das ^{15}N -Markierungsexperiment konstant. Die *ex vivo* gemessenen spezifischen Aktivitäten der ammoniumassimilierenden Enzyme über die Fermentationszeit sind in Abbildung 17 dargestellt.

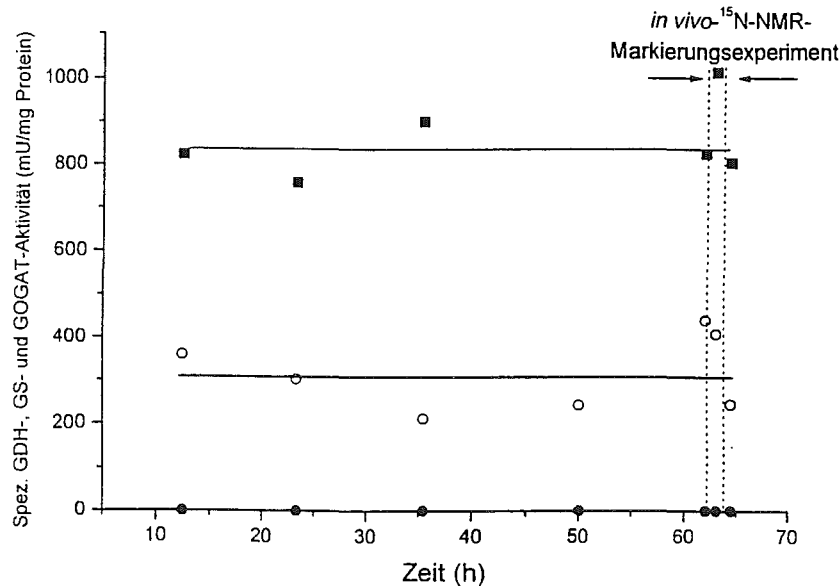


Abbildung 17: *Ex vivo* gemessene spezifische Aktivitäten von GDH (■), GS (○) und GOGAT (●) (alle in U/mg Protein) während des *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experimentes mit *C. glutamicum* ATCC 13032

Die im Zuge des ^{15}N -Markierungsexperimentes nach ethanolischem Aufschluß der Zellen bestimmten Metabolitpoolgrößen in *C. glutamicum* ATCC 13032 sind in Abbildung 23 dargestellt. Der Zeitpunkt -5 min charakterisierte den Zustand der Kultur vor Gabe des $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pulses, alle weiteren Bestimmungen erfolgten nach Gabe des Pulses. Kein meßbarer Metabolitpool reagierte signifikant auf den $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Puls, das Fließgleichgewicht der Kultur wurde durch den Tracer nicht gestört.

Der gemessene hohe Glutamatpool (180 mM) in *C. glutamicum* war in guter Übereinstimmung zu Literaturdaten (Lambert *et al.* 1995). Dies gilt auch für die nicht Poolgrößen von Lysin, Alanin und Aspartat, die alle im Bereich von 10 mM lagen. Der mit einem unerwartet hohen Wert bestimmte Glutaminpool (53 mM) konnte in bisherigen Studien mit den verwendeten sauren Aufschlußmethoden (vornehmlich mit Perchlorsäure) nicht erfaßt werden. Bei niedrigen pH-Werten wird Glutamin quantitativ zu Glutamat oxidiert. Hier begründete sich die Notwendigkeit zur Entwicklung der neutralen, glutaminschonenden, ethanolischen Zellaufschlußmethode in dieser Arbeit. Die Verläufe der intrazellulären Konzentrationen von Glutamat und Glutamin sind in Abb. 18 dargestellt.

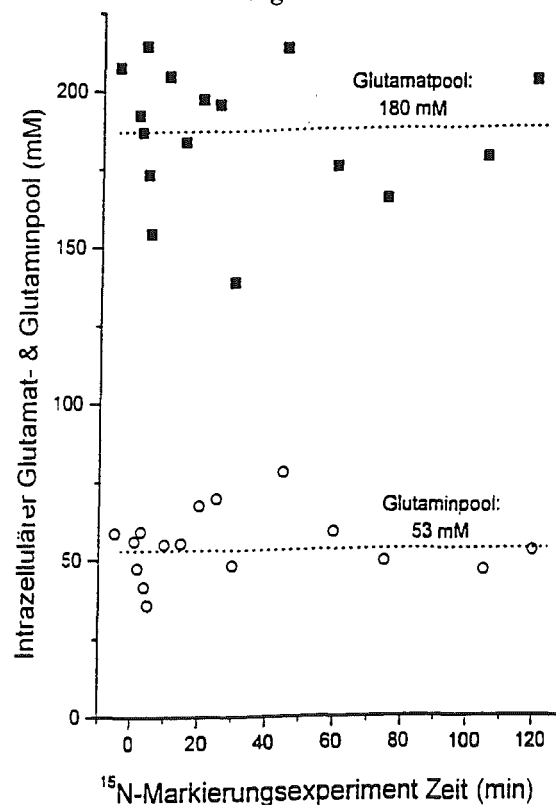


Abbildung 18: Intrazellulären Aminosäurepools von Glutamat (■) und Glutamin (○) vor und während des ^{15}N -Markierungsexperimentes mit *C. glutamicum* ATCC 13032.

Die drei dominanten ^{15}N -NMR-Signale in der *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektrenreihe von *C. glutamicum* ATCC 13032 waren die von $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin (-264 ppm), das Summensignal von $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin und $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat sowie das von freiem $^{15}\text{NH}_4^+$ (-355 ppm). Nach einer Inkubationszeit von etwa 1 h konnten die schwächeren ^{15}N -NMR-Signale aus $^{15}\text{N}_\alpha$ -Prolin (-320 ppm) und von $^{15}\text{N}_\epsilon$ -Lysin (-343 ppm) gemessen werden.

Die Spektrenreihe zeigte eine starke $^{15}\text{NH}_4^+$ -Inkorporation in die α -Aminogruppe von Glutamat. Die Stärke dieses Signals stand in guter Übereinstimmung mit der hohen gemessenen Poolgröße (180 mM) dieser Aminosäure in *C. glutamicum*. Die Integration dieser Spektren ergab, daß die Hälfte des Glutamatpools nach 20 min nach dem $^{15}\text{NH}_4^+$ -Puls mit $^{15}\text{NH}_4^+$ markiert war. Die Höhe des ^{15}N -NMR-Signals aus der γ -Aminogruppe von Glutamin steht ebenfalls im Einklang mit dem *ex vivo* gemessenen hohen Glutaminpool (50 mM). Überraschenderweise ließ sich aus der kurzen Durchmarkierungszeit (50 % der N_γ -Glutamin waren in ca. 15 min ^{15}N -markiert) auch auf einen hohen Umsatz dieses Pools schließen.

Das ^{15}N -NMR-Signal aus $^{15}\text{NH}_4^+$ zeigte ein auffälliges Verhalten: es nahm im Versuchszeitraum kontinuierlich ab und durchtrat nach 1 h die Basislinie. Dies ließ auf einen stetig abnehmenden Nuclear Overhauser Effect (NOE) für $^{15}\text{NH}_4^+$ im Versuchszeitraum schließen. Da der NOE für ^{15}N bei Protonenentkopplung negativ ist, entspricht der Durchtritt des ^{15}N -NMR-Signals durch die Nulllinie einem mittleren NOE für NH_4^+ von -1 . Die Serie von *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren, die mit einer zeitlichen Auflösung von 15 min nach Gabe des $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pulses von *C. glutamicum* ATCC 13032 aufgenommen wurde, ist in Abbildung 19 gezeigt.

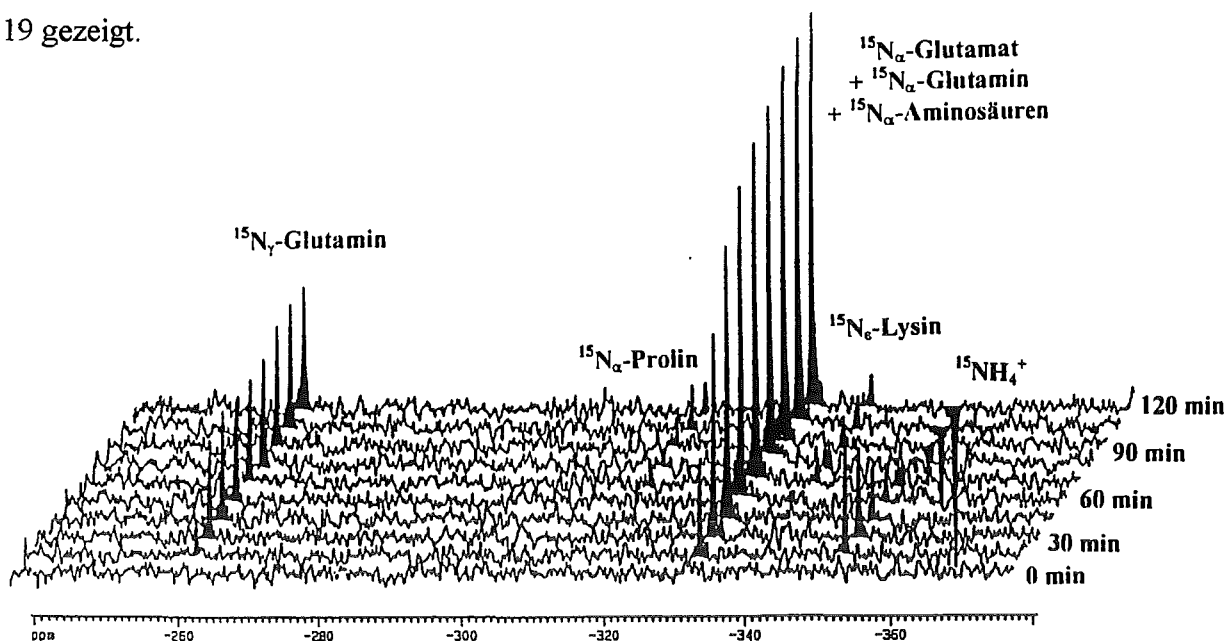


Abbildung 19: *In vivo*- ^{15}N -NMR-Spektrenreihe der kontinuierlichen *C. glutamicum* ATCC 13032-Kultur bei C-Limitierung (Auflösung 15 min / Spektrum).

Der ^{15}N -Markierungsgrad von NH_4^+ im Markierungsexperiment betrug 75 %. Dieser Wert wurde mit ^1H - $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ - ^{14}N -NMR-Kopplungsexperimenten mit Kulturüberständen und Zellextrakten aus dem ^{15}N -Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* ATCC 31032 ermittelt. Ein Beispiel für ein ^1H -NMR-Spektrum eines $^{15}\text{NH}_4^+$ -haltigen Zellextraktes zur Bestimmung des ^{15}N -Durchmarkierungsgrades ist in Abbildung 20 gezeigt. Die Fläche der kleinen ^{14}N -gekoppelten ^1H -Signale entsprach dem ^{14}N -Anteil des NH_4^+ -Pools, die Fläche der großen ^{15}N -gekoppelten ^1H -Signale entsprach dem ^{15}N -Markierungsgrad. Die ^{15}N -Equilibrierung des NH_4^+ -Pools im Cytoplasma mit dem $^{15}\text{NH}_4^+$ des Kulturmediums ist nach 2 min erreicht. Für den verwendeten Hydrozyklonfermenter wurde eine Mischzeit von 1 min ermittelt (Hartbrich *et al.* 1996). Somit stellte sich das $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Gleichgewicht im Markierungsexperiment sehr schnell ein.

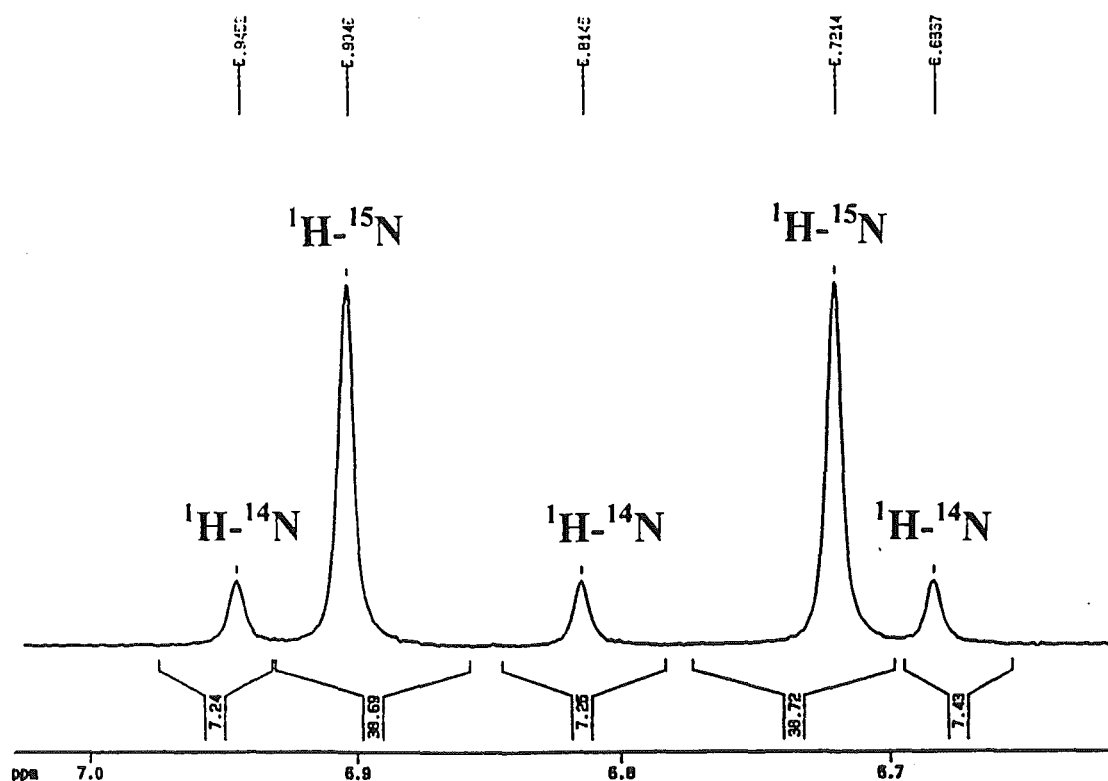


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrum von angesäuertem, ethanolischem Zellextrakt (Zeitpunkt der Probenahme nach dem $^{15}\text{NH}_4^+$ -Puls: 120 min) aus dem ^{15}N -Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032 zur Bestimmung des $^{15/14}\text{N}$ -Markierungsgrades des NH_4^+ -Pools.

Die starken *in vivo*- ^{15}N -NMR-Signale aus N_γ -Glutamin und der N_α -Gruppen aus Glutamin und Glutamat, sowie die entsprechenden ^{15}N -Durchmarkierungszeiten wurden durch die ^{15}N -NMR Messungen von ethanolischen Zellextrakten aus dem ^{15}N -Markierungsexperiment bestätigt. Beide Signale waren die ersten Substanzen, die innerhalb der ersten 5 Minuten des Experimentes markiert wurden. Durch die längere ^{15}N -NMR-Bemessung der Zellextrakte verbesserte sich das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis stark. So konnten folgende weitere Signale zu früheren Zeitpunkten des Experimentes aufgelöst werden: N_α -Prolin (-320,7 ppm), N_ϵ -Lysin (-343,5 ppm), N_α -Alanin (-333,0 ppm) und N_α -Valin (-339 ppm). Das N_γ -Glutaminsignal bei -264,5 ppm wurde von einem nicht identifizierten Signal bei -264,3 ppm überlappt (dieses Signal stellte wahrscheinlich die Amidogruppe von Asparagin dar).

Daher wurden die relativen, überlappenden Peakflächen in den Extrakten durch Integration bestimmt und die zeitlich entsprechenden *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren wurden um diese Faktoren korrigiert. Abbildung 21 zeigt ein ^{15}N -NMR-Spektrum eines ethanolischen Extraktes aus dem *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032.

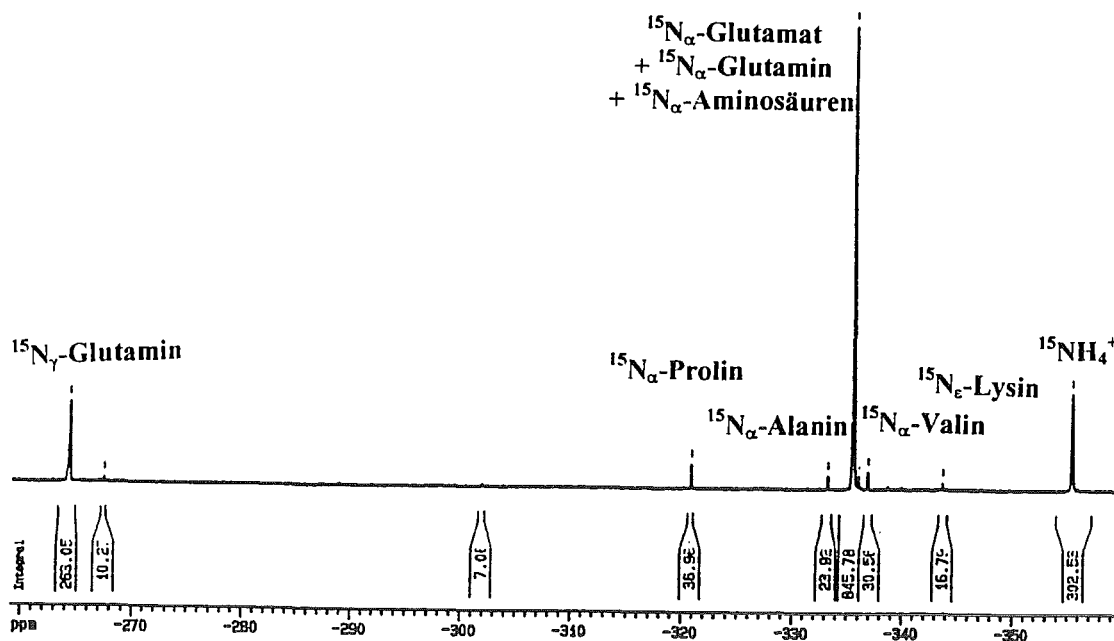


Abbildung 21: ^{15}N -NMR-Spektrum des ethanolischen Zellextraktes aus *C. glutamicum* ATCC 13032, der bei $t=60$ min nach dem $^{15}\text{NH}_4^+$ -Puls im ^{15}N -Markierungsexperiment gewonnen wurde. Die ^{15}N -Signale der cytoplasmatischen Aminosäuren sind in der Abbildung beschriftet.

Auch in den ethanolischen Zellextrakten waren die N_α -Signale (-335,5 ppm) aus Glutamat und Glutamin nicht auflösbar. Weiterhin wurde das N_α -Summensignal aus beiden Substanzen durch nicht identifizierte Signale bei -335,4 ppm und -335,9 ppm überlappt. Um die relative Anreicherung in N_α -Glutamat und N_α -Glutamin zu verschiedenen Zeitpunkten des ^{15}N -Markierungsexperimentes bestimmen zu können, wurden beide Aminosäuren mittels FPLC aus den betreffenden Extrakten präparativ aufgereinigt. Dazu wurden Extrakte von benachbarten Zeitpunkten der Probenahme im ^{15}N -Markierungsexperimentes gepoolt. Der ^{15}N -Markierungsgrad wurde über ^1H -Spin-Echo-Differenz-NMR-Experimente (SPEED) bestimmt. Die drei ^1H -Spektren eines $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -SPEED Experimentes mit aufgereinigtem Glutamin sind in Abbildung 22 A-C gezeigt. Der prozentuale Wert der ^{15}N -Markierung in der N_γ -Position wurde aus dem Differenzspektrum (22 C) des Spektrums aller $^{14/15}\text{N}$ -gekoppelten ^1H (22 A) mit dem Spektrum der ^{14}N -gekoppelten- ^{15}N invertierten ^1H (22 B) ermittelt.

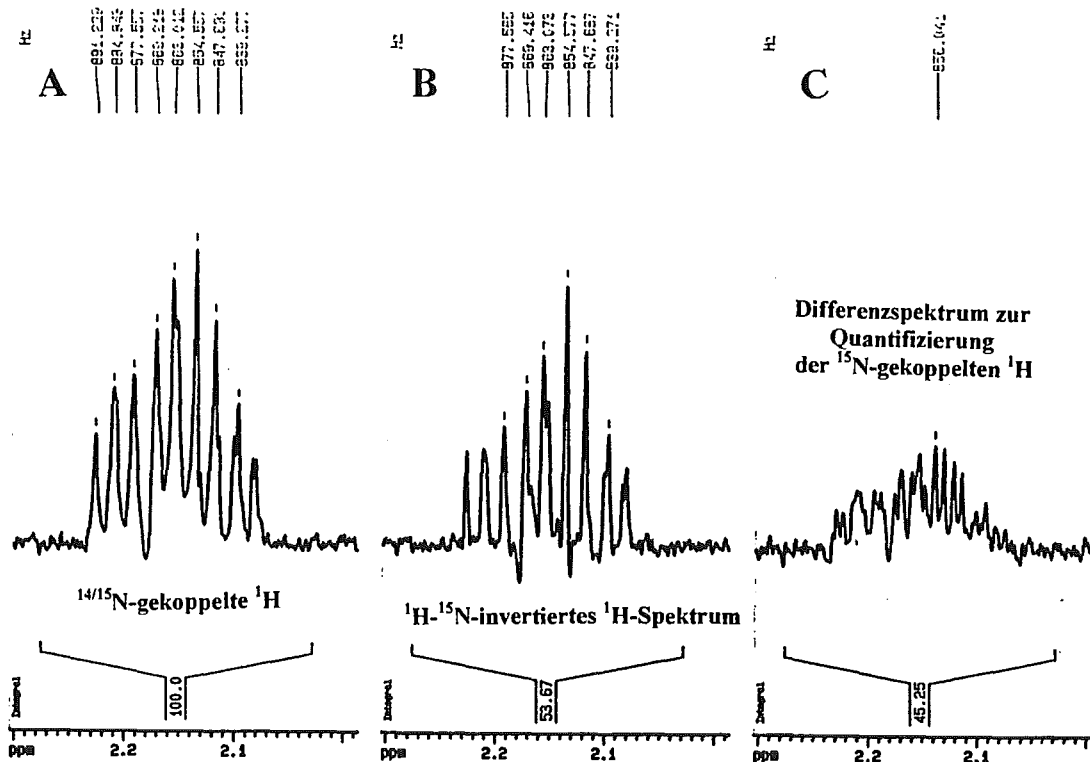


Abbildung 22: Bestimmung des ^{15}N -Markierungsgrades in der γ -N-Position von gereinigtem Glutamin aus dem ethanolischen Zellextrakt (25+30 min) aus *C. glutamicum* ATCC 13032: ^1H -Spektren der $^{14/15}\text{N}$ gekoppelten Protonen (A), ^1H -Spektrum mit invertierten ^{15}N -gekoppelten ^1H (B) und Differenzspektrum zur Quantifizierung der ^{15}N -gekoppelten ^1H (C)

Aus den ermittelten ^{15}N -Markierungen gereinigten Aminosäuren zu verschiedenen Zeitpunkten des ^{15}N -Markierungsexperimentes mit *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde deutlich, daß die γ -Position von Glutamin bei der Ammoniumassimilation wesentlich schneller als die α -Position von Glutamin und Glutamat ^{15}N -markiert wurde. Die Ergebnisse dieser SPEED-NMR-Untersuchungen im Einzelnen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Prozentuale ^{15}N -Anreicherung in den Stickstoffatomen von gereinigtem Glutamat und Glutamin aus ethanolischen Extrakten von *C. glutamicum* ATCC 13032

^{15}N -Markierungsgrad (%)	Frühe Probe (3+4+5 min)	Mittlere Probe (25+30 min)	Endwert (165 min)
$^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat	6,9±0,7	37,5±1,8	73,6
$^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin	n.b.	15,5±1,5	n.b.
$^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin	6,1±0,6	48±3	76,8

Zur weiteren Kalibrierung der *in vivo* ermittelten ^{15}N -NMR-Peakflächen wurde durch Zugabe von 99%ig ^{15}N -markierten Standardsubstanzen (^{15}N -Glutamat und $^{15}\text{N}_2$ -Glutamin) zu den ^{15}N -markierten ethanolischem Zellextrakten die Proportionalität der Peakfläche im NMR-Spektrum zu der jeweiligen Konzentration im Zellextrakt geklärt. Es wurde ermittelt, daß die 1 mM der γ -Aminogruppe aus Glutamin bei der Integration der ^{15}N -NMR-Spektren einen Peakflächenbeitrag von 58,4 Flächeneinheiten erbrachte. Dieser Wert lag um 54 % höher als die einander ähnlichen Werte für die α -Aminogruppen aus Glutamat und Glutamin (N_α -Glutamat: 36,4 Peakflächeneinheiten pro mM, N_α -Glutamin: 39,3 Peakflächeneinheiten pro mM). Dies erklärte die in den *in vivo*- ^{15}N -Spektren stark hervorgehobenen γ - ^{15}N -Peaks von Glutamin. Mit diesen Daten ließen sich die Flächen der *in vivo*- ^{15}N -NMR-Signale der α - und γ -Aminogruppen kalibrieren.

Zur Berechnung der *in vivo*-Stickstoffflüsse bei der Ammoniumassimilation von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden die im erstellten mathematischen Modell formulierten Gleichung iterativ an die kalibrierten *in vivo*- ^{15}N -Markierungsdaten angepaßt. Die gelösten Funktionen des mathematischen Modells und die Werte der ^{15}N -NMR-Peakflächen, an die diese Funktionen iterativ angepaßt wurden, sind in Abbildung 23 dargestellt.

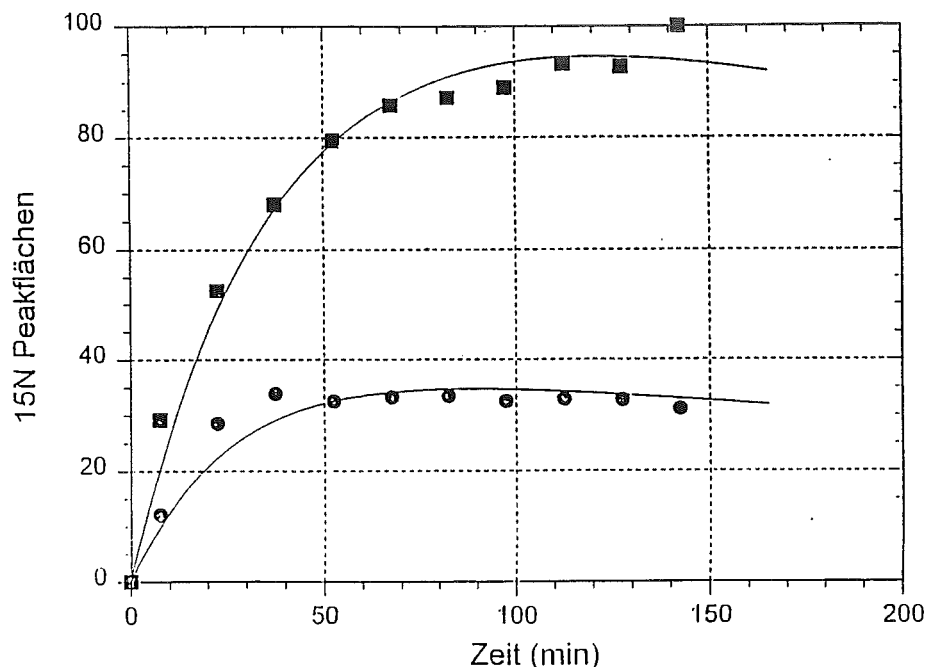


Abbildung 23: Lösungsfunktionen (—) der durch das mathematische Modell der Ammoniumassimilation berechneten *in vivo*-Stickstoffflüsse und *in vivo*- ^{15}N -Markierungen aus dem Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032 ($^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat + $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin (■) / $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin (●)).

Die sich aus der iterativen Anpassung der Lösungsfunktionen im einzelnen ergebenden *in vivo*-Stickstoffflüsse sind in Abbildung 24 dargestellt.

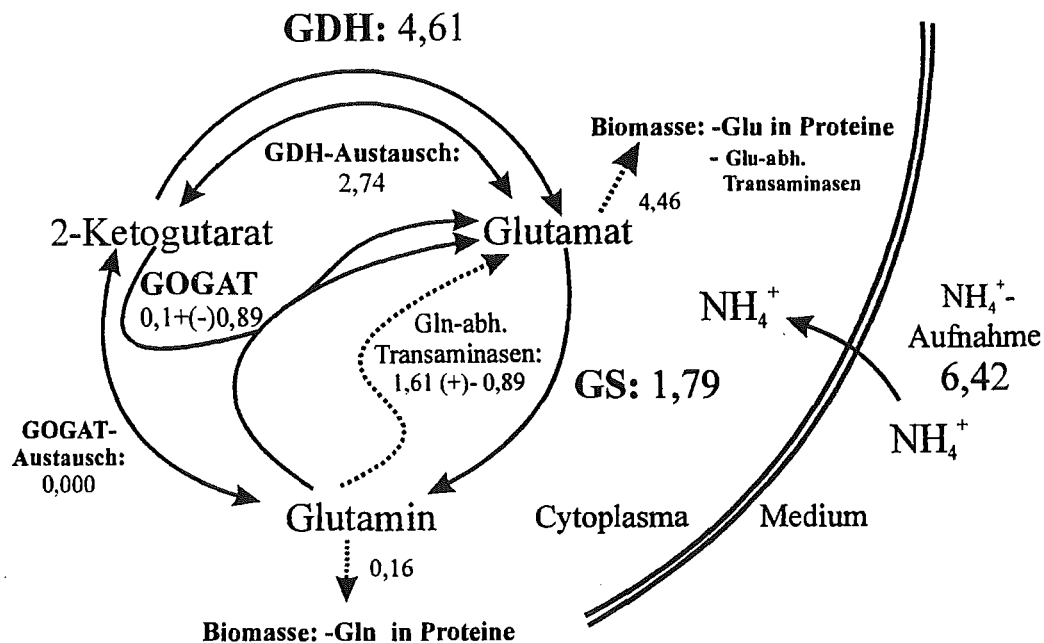


Abbildung 24: Übersicht über die *in vivo*-Stickstoffflüsse der Ammoniumassimilation bei C-limitiertem Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032. Stickstoffflüsse in $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

Als Ergebnis der *in vivo*-Stickstoffflußbestimmung wurde festgestellt, daß ca. 70 % (4,61 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht min) des fixierten NH_4^+ in *C. glutamicum* ATCC 13023 über die GDH in Glutamat eingebaut wurden. Etwa 30 % (1,79 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht min) des Ammoniums gelangten über die GS und Glutamin in den Primärstoffwechsel. Damit wurde mit den vorliegenden *in vivo* ^{15}N -NMR Untersuchungen eine bisher nicht erkannte Schlüsselrolle von Glutamin in der Ammoniumassimilation von *C. glutamicum* entdeckt.

Unter den untersuchten Wachstumsbedingungen (C-Limitierung, N-Überschuß) schien die GOGAT keine Rolle bei der Ammoniumassimilation zu spielen. Aus den durchgeführten ^{15}N Markierungsexperimenten ließ sich dies aber nicht eindeutig ableiten. Der für die GOGAT-Reaktion bzw. für die glutaminabhängigen Transaminasen formulierte, relativ große statistische Fehler von 55 % des Nettoflusses ($1,61 \pm 0,89 \mu\text{mol/g Trockengewicht min}$) zeigt an, daß die Meßdaten es nicht erlauben, eindeutig zu entscheiden, über welchen Weg das Glutamin weiterverstoffwechselt wurde. Dieser nicht eindeutig zugeordnete Stickstoffabfluß aus dem Glutaminpool ($0,89 \mu\text{mol/g Trockengewicht min}$) könnte sowohl über die GOGAT-Reaktion als auch über glutaminabhängige Biosynthesen verlaufen.

Der hohe Austauschfluß der GDH (ca. 60 % des Nettostickstoffflusses) zeigte an, daß die GDH *in vivo* bei der NH_4^+ -Assimilation nahe am entsprechenden Reaktionsgleichgewicht arbeitete. So wurden über die Hin- und Rückreaktion dieses Enzyms mehr $^{15}\text{NH}_4^+$ in den Glutamatpool eingetragen als tatsächlich Glutamat zur Biomasse- und Glutaminsynthese gebildet und verbraucht wurde.

3.2.2. Untersuchung der Ammoniumassimilation in dem Glutamatdehydrogenase-negativen *C. glutamicum* EB 1 mittels *in vivo*- ^{15}N -NMR

Es stellte sich die Frage nach den qualitativen und quantitativen Veränderungen der *in vivo*-Stickstoffflüsse in dem GDH-negativen *C. glutamicum* EB1. Analog zu dem *in vivo*- ^{15}N -NMR-Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde ein entsprechendes Experiment mit der definierten GDH-Defektmutante *C. glutamicum* EB 1 durchgeführt. Die Versuchs- und Fermentationsbedingungen beider Experimente waren gleich, lediglich die Meßzeit für ein *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektrum konnte aufgrund der guten Ergebnisse auf 7,5 min/Spektrum halbiert werden.

Die ermittelten Fermentationsparameter des *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experimentes mit *C. glutamicum* EB1 sind in den Abbildungen 25 A und 25 B dargestellt.

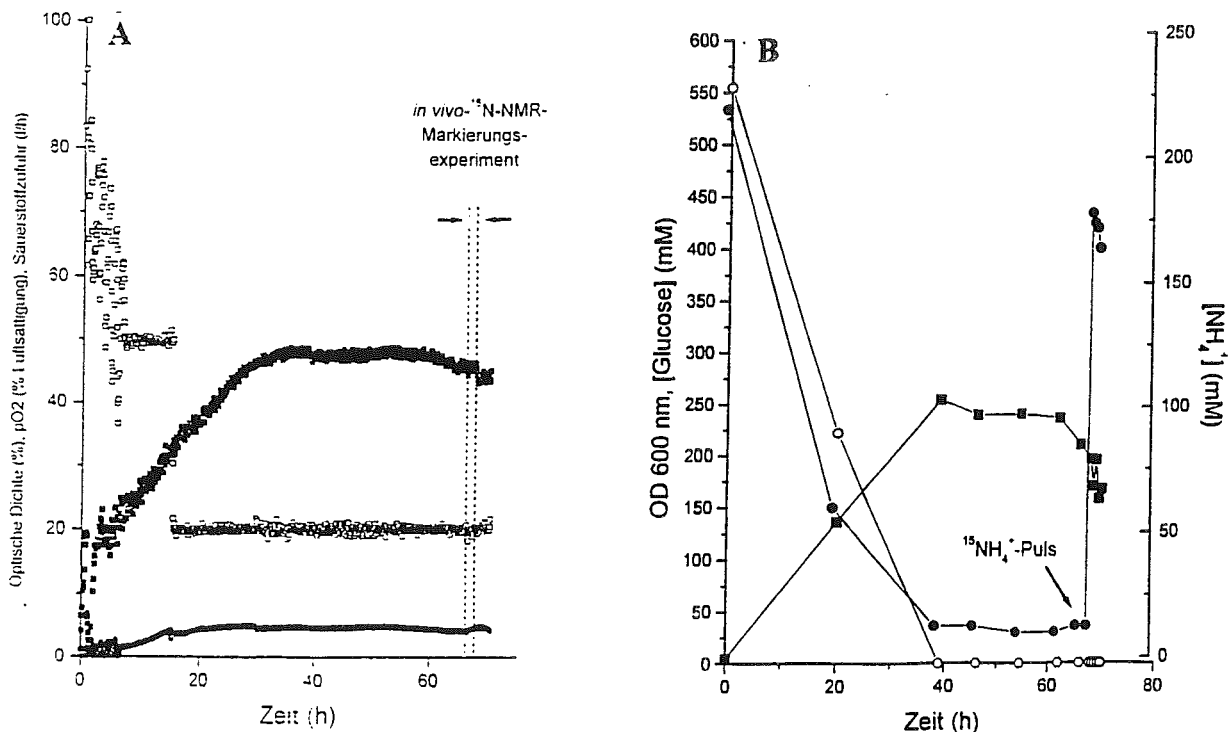


Abbildung 25: A: On-line gemessene Werte von pO₂ (% Luftsättigung) (□), Sauerstoffzufuhr (l/h) (●) und relativer optischer Dichte (%) (■) der kontinuierlichen *C. glutamicum* ATCC 13032-Kultur im *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experiment. B: Off-line gemessene Werte von NH_4^+ -Konzentration (mM) (●), Glucosekonzentration (mM) (○) und optischer Dichte bei 600 nm (■) der kontinuierlichen *C. glutamicum* ATCC 13032-Kultur im *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experiment.

Bei dem Vergleich der on-line gemessenen optischen Dichten aus den beiden *in vivo*-NMR-Experimenten (Abb. 26) zeigte sich der Wachstumsnachteil von *C. glutamicum* EB 1 gegenüber dem Wildtyp bei definierten NH_4^+ -Überschüssen deutlich. Dieser Effekt wurde bereits in den batch-Fermentationen mit beiden Stämmen bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen beobachtet.

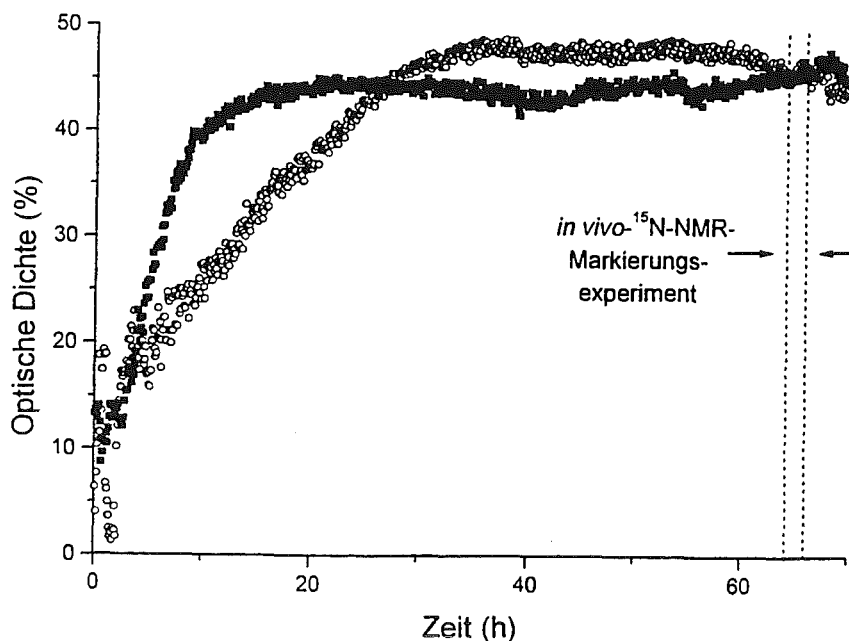


Abbildung 26: Vergleich der on-line gemessenen optischen Dichten der kontinuierlichen Kulturen von *C. glutamicum* ATCC 13032 (O) und *C. glutamicum* EB1 (■) in den *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experimenten.

Die Ammoniumaufnahme von *C. glutamicum* EB1 betrug $6,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg TW}^{-1}$ und war somit fast identisch mit der NH_4^+ -Aufnahmerate des Wildtyps. Diese im Fließgleichgewicht der Fermentation konstante Aufnahmerate änderte sich nach der Gabe des $^{15}\text{NH}_4^+$ -Pulses nicht signifikant (Ammoniumaufnahme nach $^{15}\text{NH}_4^+$ -Puls: $6,45 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg TW}^{-1}$). Im Fließgleichgewicht wurden aus einem Gramm zugeführten NH_4^+ ca. 10 g Biotrockenmasse gebildet. Pro g verbrauchter Glucose wurden im Fließgleichgewicht 0,26 g Biotrockenmasse gebildet. Außer Biomasse konnten in der Kulturbrühe keine Nebenprodukte in nennenswerten Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die spezifischen Aktivitäten der ammoniumassimilierenden Enzyme über den Fermentationszeitraum sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Aktivitätswerte (GS: ca. 300 mU/mg Protein, GOGAT ca. 40 mU/mg Protein, GDH unter der Nachweisgrenze) glichen den bereits aus dem Experiment zur deren Regulation bekannten Werten. Alle Aktivitäten waren auch im ^{15}N -Markierungsexperiment konstant.

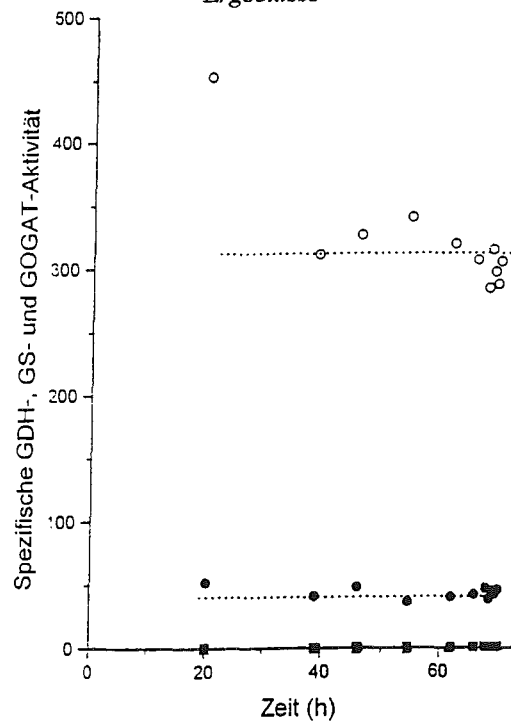


Abbildung 27: *Ex vivo* gemessene spezifische Aktivitäten von GDH (■), GS (○) und GOGAT (●) (alle in U/mg Protein) während des *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experimentes mit *C. glutamicum* EB1.

Der Glutaminpool war in *C. glutamicum* mit ca. 66 mM in etwa gleich hoch wie im Wildtyp. Der Glutamatpool war mit ca. 100 mM um fast 40% kleiner als in *C. glutamicum* ATTC 13023. Alle meßbaren Aminosäurepools blieben während des ^{15}N -Markierungsexperimentes konstant (Abbildung 28).

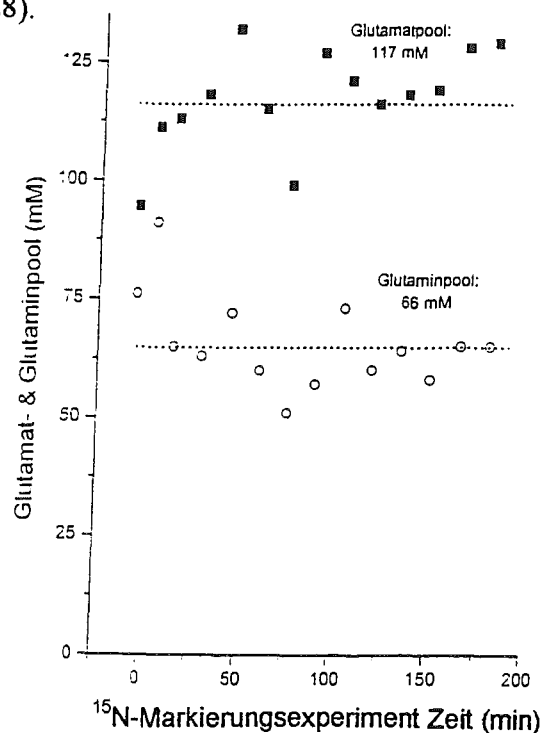


Abbildung 28: Konzentrationen der intrazellulären Aminosäuren Glutamat (■) und Glutamin (○) in *C. glutamicum* EB1 vor und während des ^{15}N -Markierungsexperimentes.

Die *in vivo*-gemessenen ^{15}N -NMR-Spektren aus dem ^{15}N -Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* EB 1 sind in Abbildung 29 gezeigt. Zum Zeitpunkt $t=0$ wurde der $^{14}\text{NH}_4^+$ -Überschuß der kontinuierlichen Kultur mit $^{15}\text{NH}_4^+$ auf 180 mM aufgestockt.

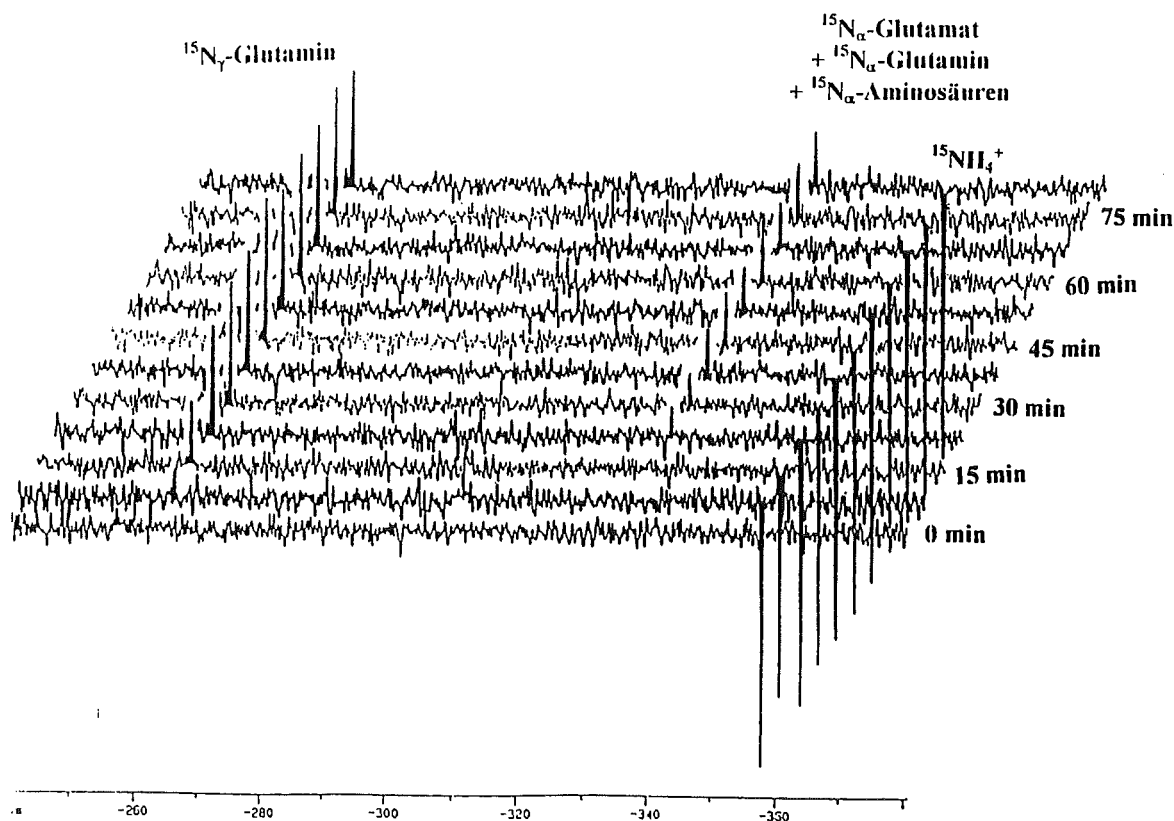


Abbildung 29: *In vivo*- ^{15}N -NMR-Spektrenreihe der kontinuierlichen *C. glutamicum* EB1-Kultur bei C-Limitierung (Auflösung 7,5 min / Spektrum)

Die *in vivo*- NH_4^+ -Einbaukinetiken in die primären NH_4^+ -Assimilationsprodukte von *C. glutamicum* EB1 waren von denen des Wildtyps verschieden. Das dominierende ^{15}N -NMR-Signal war das der Amidogruppe im Glutamin (-264 ppm). Aufgrund der verbesserten zeitlichen Auflösung war dieses Signal als das erste Assimilationsprodukt von $^{15}\text{NH}_4^+$ zu identifizieren. ^{15}N -Glutamat (-335 ppm) trat erst im zweiten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektrum ($t=7,5\text{min}$) nach Gabe des $^{15}\text{NH}_4^+$ -Pulses auf. Das ^{15}N -Glutamatsignal war weitaus schwächer ausgeprägt als im Wildtyp.

Das $^{15}\text{NH}_4^+$ -Signal (-355 ppm) war negativ und zeigte im Verlauf des ^{15}N -Markierungsexperimentes einen leichten Anstieg. Dies deutete auf einen NOE von ca. -1,1 hin. Die NOEs im Experiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032 und -EB1 waren somit leicht verschieden, was durch geringe Unterschiede in der Konzentration paramagnetischer Ionen erklärt werden konnte.

Die ^{15}N -Markierung des NH_4^+ -Pools (73 %) wurde wiederum mit ^1H -NMR in ethanolischen Extrakten bestimmt. Die ^{15}N -NMR-Untersuchungen der ethanolischen Extrakte bestätigten die *in vivo*-NMR-Ergebnisse und lieferten kinetische Informationen über das ^{15}N -Markierungsverhalten von: N_α -Glutamat und N_α -Glutamin (- 335,5 ppm), N_α -Alanin (- 333 ppm), N_α -Prolin (- 320,4 ppm) und N_γ -Glutamin (- 264,1 ppm).

Darüberhinaus wurden aus diesen Spektren die Peaküberlappungsanteile zur Korrektur der *in vivo*- $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken im Bereich von N_γ -Glutamin und den N_α -Aminosäuren abgeschätzt. Der ^{15}N -Markierungsgrad in präparativ gereinigtem Glutamat (N_α) und Glutamin (N_α , N_γ) wurde bei $t=30$ min über ^1H -SPEED-Experimente gemessen und ist in Tabelle 7 aufgeführt. Auf die Bestimmung dieser Markierungen in weiteren Extrakten wurde verzichtet, da der Markierungsgrad zu einem frühen Zeitpunkt des Markierungsexperimentes wenig zusätzliche Information lieferte und die relative Markierung zu einem späten Zeitpunkt im Markierungsexperiment dem Durchmarkierungsgrad des NH_4^+ -Pools entsprach.

Tabelle 7: Prozentuale ^{15}N -Anreicherung in den Stickstoffatomen von gereinigtem Glutamat und Glutamin aus ethanolischen Extrakten von *C. glutamicum* ATCC 13032

^{15}N -Markierungsgrad (%)	Mittlere Probe (30 min)
$^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat	$25,8 \pm 3$
$^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin	$14,1 \pm 1,5$
$^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin	$25,8 \pm 3$

Analog zum ^{15}N -Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden die *in vivo*- ^{15}N -Markierungskinetiken mit den gemessenen Peaküberlappungsfaktoren und den relativen ^{15}N -Markierungen aus dem aufgereinigten Glutamat und Glutamin kalibriert.

Zur Berechnung der *in vivo*-Stickstoffflüsse in *C. glutamicum* EB1 wurden die Gleichungen des mathematischen Modells der Ammoniumassimilation iterativ an die *in vivo*- $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken angepaßt. Die durch Anpassung gelösten Funktionen des mathematischen Modells und die kalibrierten *in vivo*- ^{15}N -Markierungskinetiken in der GDH-Mutante sind in Abbildung 30 dargestellt.

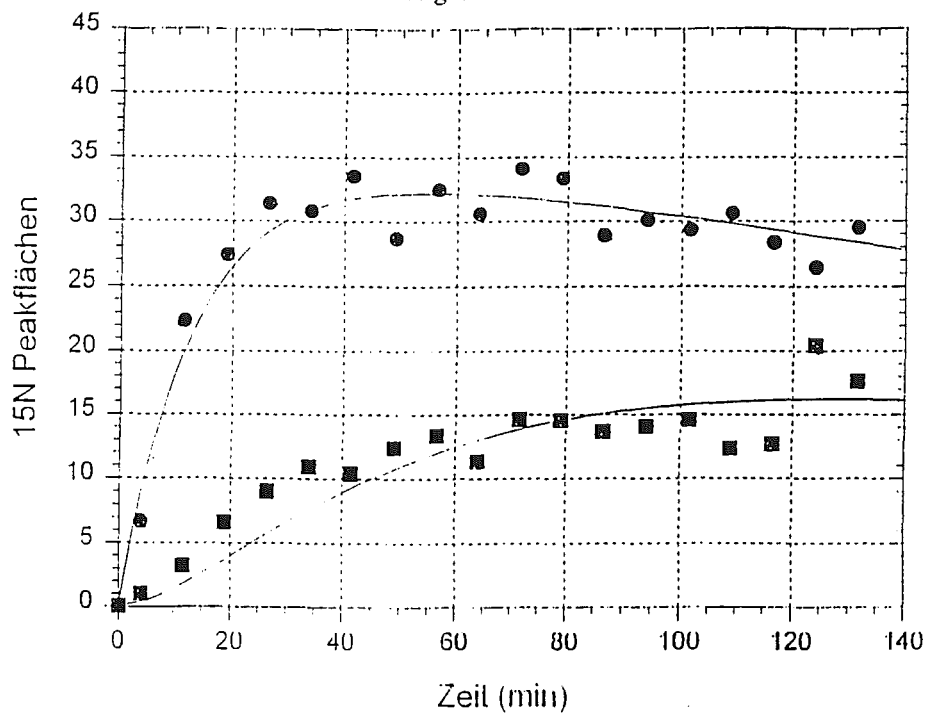


Abbildung 30: Lösungsfunktionen (—) der durch das mathematische Modell der Ammoniumassimilation berechneten *in vivo*-Stickstoffflüsse und *in vivo*- ^{15}N -Markierungen aus dem Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* EB1 ($^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat + $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin (■) / $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin (●)).

Die sich aus diesen Lösungsfunktionen im einzelnen ergebenden *in vivo*-Stickstoffflüsse ($\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht min) sind in der Übersicht in Abbildung 31 aufgeführt.

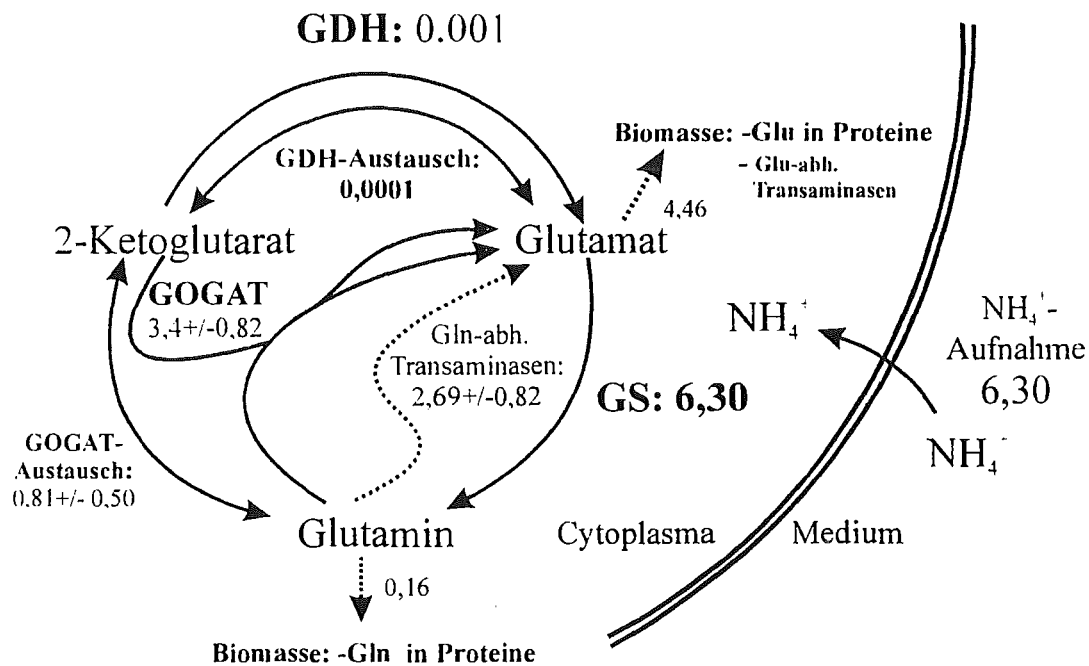


Abbildung 31: Übersicht über die *in vivo*-Stickstoffflüsse der Ammoniumassimilation bei C-limitiertem Wachstum von *C. glutamicum* EB1. Stickstoffflüsse in $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht $^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

In *C. glutamicum* EB1 wurde $^{15}\text{NH}_4^+$ ausschließlich über die GS-Reaktion (6,3 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht min) assimiliert. Im mathematischen Modell zur Berechnung der *in vivo*-Stickstoffflüsse wurde der NH_4^+ -Umsatz über die GDH zur Variation freigelassen; dennoch wurde von dem Modell bei der statistisch besten Lösung kein GDH-Netto- und GDH-Austauschfluß gefunden.

Der ^{15}N -Glutamatpool in *C. glutamicum* EB1 wurde durch die GOGAT-Reaktion und durch glutaminabhängige Transaminasen gefüllt. Die *in vivo*-GOGAT-Aktivität ließ sich zweifelsfrei nachweisen und betrug mindestens 2,8 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht min. Wie im ^{15}N -Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* ATCC 13032 ergab sich auf der Abflußseite des Glutaminpools ein mathematisches Quantifizierungsproblem. Die glutaminabhängigen Transaminasen trugen wesentlich zur ^{15}N -Markierung des Glutamats bei (mindestens 1,9 $\mu\text{mol g}$ Trockengewicht $^{-1}$ min $^{-1}$). Bei diesen beiden ^{15}N -Glutamatsynthesereaktionen existierte ein relativ großer Anteil des Stickstoffflusses (0,82 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht min), der vom mathematischen Modell der NH_4^+ -Assimilation nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Von diesem Betrag abgesehen, konnte man aber mindestens 60 % des ^{15}N -Markierungseintrages in den Glutamatpool der GOGAT-Reaktion zuordnen, während höchstens 40 % der ^{15}N -Markierung des Glutamats über glutaminabhängige Transaminasereaktionen zugeführt wurden.

Die Analyse der Stickstoffflüsse mit *in vivo*- ^{15}N -NMR zeigte im *C. glutamicum* Wildtyp eine bisher nicht erkannte Schlüsselrolle von Glutamin bei der Ammoniumassimilation. Mit 30 % des assimilierten NH_4^+ war der Umsatz über die GS im *C. glutamicum* Wildtyp unerwartet hoch. In der GDH-Mutante wurde das gesamte NH_4^+ über die GS assimiliert.

Die intrazellulären Poolgrößen von Glutamin waren in *C. glutamicum* ATCC 13032 (53 ± 10 mM) und *C. glutamicum* EB1 (64 ± 10 mM) nahezu identisch. Die *in vivo*- ^{15}N -Durchmarkierungszeit für N_γ -Glutamin betrug beim Wildtyp weniger als 30 min und bei der GDH-Defektmutante 22,5-30 min. Die intrazelluläre Glutamatkonzentration von *C. glutamicum* EB1 (100 ± 10 mM) war niedriger als in *C. glutamicum* ATCC 13032 (160 ± 10 mM). Die *in vivo*- ^{15}N -Durchmarkierungszeit betrug im *C. glutamicum* Wildtyp 75-90 min und in der GDH-Mutante 45 min.

In *C. glutamicum* EB1 war es trotz gleich hoher Glutaminkonzentration in der Zelle nicht möglich, den Glutamatpool auf das Niveau des Wildtyps zu heben. Da dies nur durch die GOGAT-Reaktion bewerkstelligt werden kann, konnte dieses Enzym als das wachstumslimitierende „bottle neck“ in der GDH-Mutante von *C. glutamicum* identifiziert werden.

3.2.3. Untersuchung der Ammoniumassimilation in dem lysinproduzierenden Stamm MH20-22B von *C. glutamicum* mit *in vivo*- ^{15}N -NMR

Nachdem die *in vivo*-Stickstoffflüsse bei der NH_4^+ -Assimilation bei Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB 1 aufgeklärt wurden, stellte sich die Frage nach der quantitativen Funktion der NH_4^+ -Assimilation in einem *C. glutamicum*-Stamm, der außer der Biomassesyntese noch eine Aminosäure als Produkt in das Kulturmedium ausscheidet. Zur Klärung dieser Frage wurde der lysinproduzierende *C. glutamicum*-Stamm MH20-22B (Schrumpf *et al.* 1992) ausgewählt. Prinzipiell waren die Fermentationsbedingungen bei dem *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experiment mit *C. glutamicum* MH20-22B mit den vorhergehenden ^{15}N -Markierungsversuchen identisch, es wurde lediglich das Lysinproduktionsmedium (Kelle *et al.* 1996) mit höheren NH_4^+ -Konzentrationen (700 mM) verwendet.

Um bei dieser hohen NH_4^+ -Konzentration des Mediums eine für das *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experiment erforderliche hohe $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Durchmarkierungsrate des NH_4^+ -Pools zu erhalten, wurde ein höherer $^{15}\text{NH}_4^+$ -Puls (300 mM) auf das System gegeben.

Durch die hohe NH_4^+ -Konzentration (200-300 mM) bei Lysinproduktion durch *C. glutamicum* MH20-22B im Fließgleichgewicht war der ^{15}N -Durchmarkierungsgrad des NH_4^+ -Pools nicht so hoch wie in den vorhergehenden Experimenten. Dies führte zu einem schlechteren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis der gemessenen *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren im Vergleich zu den vorangegangenen *in vivo*- ^{15}N -Markierungsversuchen.

Die kontinuierliche Fermentation mit *C. glutamicum* MH20-22B wurde mit denselben Fermentationsparametern ausgeführt wie die vorhergehenden *in vivo*- ^{15}N -Markierungsexperimente (pH=7, pO_2 =20%, $T=30^\circ\text{C}$). Die kontinuierliche Kultur befand sich vor dem ^{15}N -Markierungsexperiment über 80 h (4 Biomasseverweilzeiten) im vorgesehenen Fließgleichgewicht. Alle Fermentationsparameter waren konstant und lagen bei den gewünschten Werten. Die Biomassekonzentration lag bei 50 ± 4 g/l. Die off-line gemessenen Fermentationsparameter sind in Abbildung 32 dargestellt.

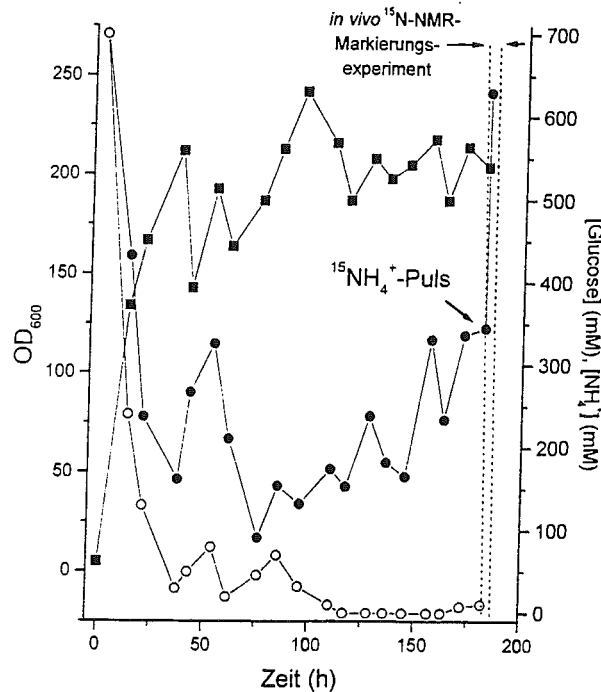


Abbildung 32: Off-line bestimmte Fermentationsparameter: Glucosekonzentration (mM) (○), NH_4^+ -Konzentration (mM) (●), optische Dichte bei 600 nm (■)

Die Konzentration des von *C. glutamicum* MH20-22B ins Kulturmedium ausgeschiedenen Lysins betrug ca. 20 mM (Abb. 38). Als Nebenprodukte wurden Alanin und Glutamat in Konzentrationen von ca. 2 mM aus gebildet. Die Lysinausbeute pro Mol Glucose bei kontinuierlichen Wachstum von *C. glutamicum* MH 20-22B betrug 20 %. Die spezifische Produktivität lag, bedingt durch die hohe Biomassekonzentration, bei 40 $\mu\text{mol/g}$ Biotrockenmasse h.

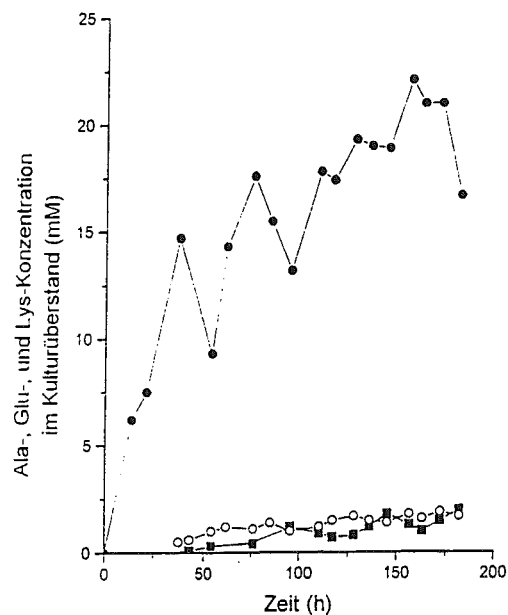


Abbildung 33: Konzentrationen von ausgeschiedenem Lysin (●), Glutamat (○) und Alanin (■) in der kontinuierlichen Fermentation zu dem ^{15}N -Markierungsexperiment mit *C. glutamicum* MH20-22B.

Die spezifischen Aktivitäten der primären NH_4^+ -assimilierenden Enzyme GDH und GS waren im Fließgleichgewicht der kontinuierlichen Kultur konstant (Abb. 39). Die spezifische GDH-Aktivität betrug ca. 1,2 U/mg Protein und lag damit im Bereich der Aktivität von *C. glutamicum* ATCC 13032. Die spezifische GS-Aktivität wurde mit 45 mU/mg Protein bestimmt, was einem Sechstel der Wildtypaktivität entsprach. Diese niedrige spezifische GS-Aktivität in *C. glutamicum* MH20-22B bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen wurde bereits bei dem Experiment zur Regulation der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme in diesem Stamm beobachtet. Die Aktivität der GOGAT war in Zellextrakten von *C. glutamicum* MH20-22B bei Wachstum unter C-Limitierung und N-Überschuß nicht nachweisbar.

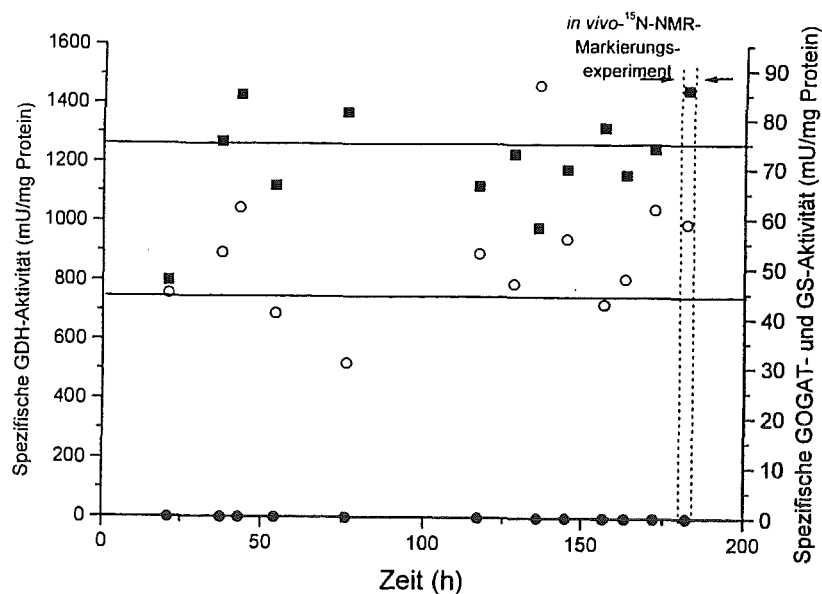


Abbildung 34: Spezifischen Aktivitäten der ammoniumassimilierenden Enzyme GDH (■), GS (○) und GOGAT (●) in *C. glutamicum* MH20-22B in kontinuierlicher Kultur bei C-Limitierung und N-Überschuß.

Die Konzentrationen der im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B gelösten Aminosäuren waren während des *in vivo*- ^{15}N -Markierungsexperimentes konstant (Abb. 40). Bei der Bestimmung der zellinternen Aminosäurekonzentrationen wurden signifikante Unterschiede zu den bisher untersuchten *C. glutamicum*-Stämmen festgestellt. Der Glutamatpool in *C. glutamicum* MH20-22B betrug ca. 100 mM und ist damit um 45 % niedriger als der des Wildtyps. Der Glutaminpool im Lysinproduktionsstamm war mit 20 mM sogar um 60 % geringer als der entsprechende Pool in *C. glutamicum* ATCC 13032. Der Lysinpool war in *C. glutamicum* MH20-22B mit 50 mM fünffach gegenüber dem des Wildtyps erhöht. Am stärksten war jedoch der Alaninpool (240 mM) im Lysinproduzenten gesteigert; die Alaninkonzentration in *C. glutamicum* ATCC 13032 betrug lediglich ca. 10 mM.

Weiterhin war in *C. glutamicum* MH20-22B eine außerordentlich hohe intrazelluläre Valinkonzentration (127 mM) feststellbar und es konnte eine Isoleucinkonzentration von ca. 7 mM gemessen werden. Diese Aminosäurepools lagen in *C. glutamicum* ATCC 13032 unter der Nachweisgrenze. All diese veränderten internen Aminosäurekonzentrationen lassen auf tiefgreifende Unterschiede im Aminosäure- und Stickstoffstoffwechsel vom *C. glutamicum* Wildtyp und dem Lysinproduzenten schließen.

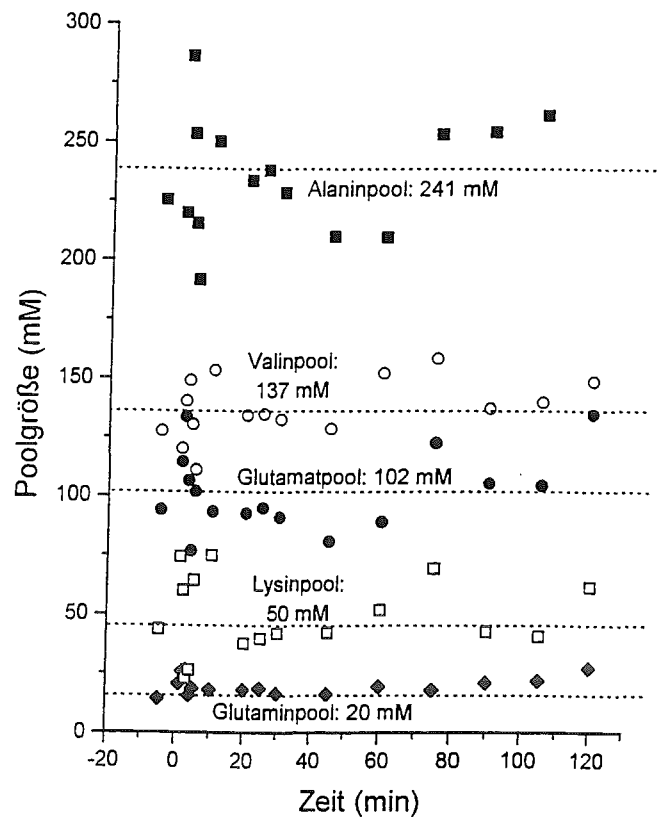


Abbildung 35: Verläufe der zellinternen Aminosäurepools von Alanin (■), Valin (○), Glutamat (●), Lysin (□) und Glutamin (◆) während des ^{15}N -Markierungsexperimentes mit *C. glutamicum* MH20-22B.

Die quantitativen Verhältnisse dieser Aminosäurepools wurden durch die *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren von *C. glutamicum* MH20-22B größenordnungsmäßig bestätigt. Das heißt, daß sich hohe interne Aminosäurekonzentrationen mit den entsprechenden intensiven *in vivo*- ^{15}N -NMR-Signalen korrelieren ließen. Abbildung 36 zeigt das bei 135 min des ^{15}N -Markierungsexperimentes aufgenommene, vollständig durchmarkierte *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektrum von *C. glutamicum* MH20-22B.

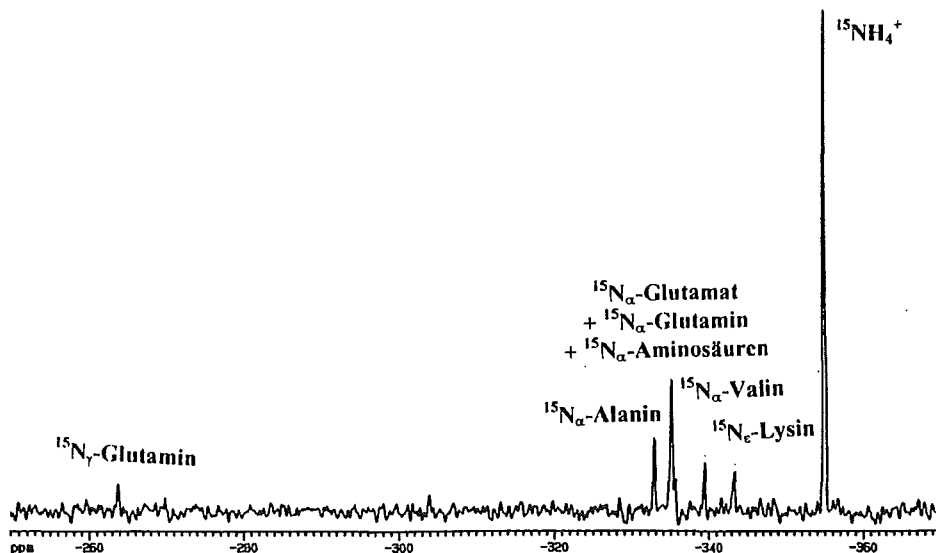


Abbildung 36: *In vivo*- ^{15}N -NMR Spektrum von *C. glutamicum* MH20-22B bei 135 min des ^{15}N -Markierungsexperimentes.

Das Signal-zu-Rauschen Verhältnis dieser *in vivo*- ^{15}N -NMR-Messungen war, bedingt durch die niedrige Durchmarkierung des NH_4^+ -Pools (ca. 40 %), schlechter als in den ^{15}N -Markierungsexperimenten mit *C. glutamicum* ATCC 13032 und -EB 1. Neben dem $^{15}\text{NH}_4^+$ -Signal (-355 ppm) wurden die ^{15}N -NMR-Signale folgender intrazellulärer Aminosäuren differenziert: Summenpeak von $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamat, $^{15}\text{N}_\alpha$ -Glutamin und anderer $^{15}\text{N}_\alpha$ -Aminosäuren (-355 ppm), $^{15}\text{N}_\epsilon$ -Lysin (-343,4 ppm), $^{15}\text{N}_\alpha$ -Valin (-339,5 ppm), $^{15}\text{N}_\alpha$ -Alanin (-332,6 ppm) und $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamin (-263 ppm). In Abbildung 37 sind die *in vivo*- ^{15}N -Markierungskinetiken des $^{15}\text{N}_\alpha$ -Aminosäuresummenpeaks und des $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutaminsignals in *C. glutamicum* MH20-22B dargestellt. Durch das niedrige Signal-zu-Rauschen-Verhältnis in diesem ^{15}N -Markierungsexperiment waren diese *in vivo*- ^{15}N -NMR-Signale nicht als Rohdaten quantifizierbar.

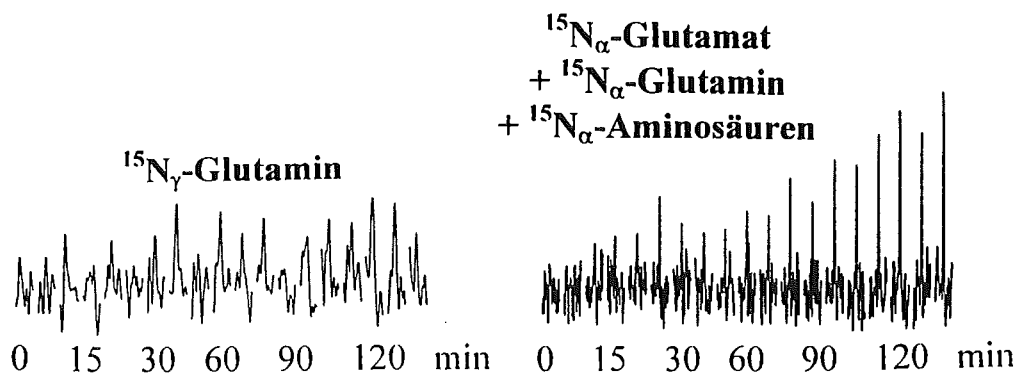


Abbildung 37: *In vivo*- ^{15}N -Markierungskinetiken von N_γ -Glutamin und die N_α -Aminogruppen von Glutamat, Glutamin und anderen Aminosäuren in *C. glutamicum* MH20-22B bei kontinuierlichem Wachstum unter C-Limitierung und NH_4^+ -Überschuß.

All diese *in vivo*- ^{15}N -NMR-Signale intrazellulärer Aminosäuren wurden in den ^{15}N -NMR-Spektren von ethanolischen Zellextrakten, die während des ^{15}N -Markierungsexperimentes gewonnen wurden, bestätigt (Abb. 38 A). Sowohl das $^{15}\text{N}_\alpha$ -Aminosäurensommensignal als auch das Signal $^{15}\text{N}_\gamma$ -Glutamins wurde durch vielfältige schwache ^{15}N -NMR-Signale überlagert. In den ethanolischen Extrakten konnten ^{15}N -NMR-Signale von nicht identifizierten biogenen ^{15}N -markierten Verbindungen bei -327,5 ppm, -327,6 ppm, -343,7 ppm und ca. -337 ppm nachgewiesen werden.

Sehr prominent waren die ^{15}N -NMR-Signale von präparationsbedingten ^{15}N -markierten Artefakten (-325, 8 ppm, -327,5 ppm, -328,2 ppm, -330,4 ppm, -331,6 ppm) (Abb. 38 A & B). In den *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren waren diese auffälligen Signale nicht enthalten. Die chemischen Verschiebungen dieser ^{15}N -markierten Substanzen ließen sich nicht mit denen von bekannten stickstoffhaltigen Primärmetaboliten korrelieren. Die betreffenden Signale waren bereits im ersten ethanolischen Zellextrakt (1 min nach dem $^{15}\text{NH}_4^+$ -Puls) (Abb. 38 B) voll durchmarkiert und änderten ihre integrativen Beträge während des ^{15}N -Markierungsexperimentes nicht signifikant. Daraus konnte geschlossen werden, daß diese ^{15}N -Verbindungen nicht biogenen Ursprungs waren. Wahrscheinlich wurden diese Stoffe unter den Reaktionsbedingungen des Zellaufschlußverfahrens durch chemische Reaktionen aus reaktiven biogenen Vorstufen gebildet.

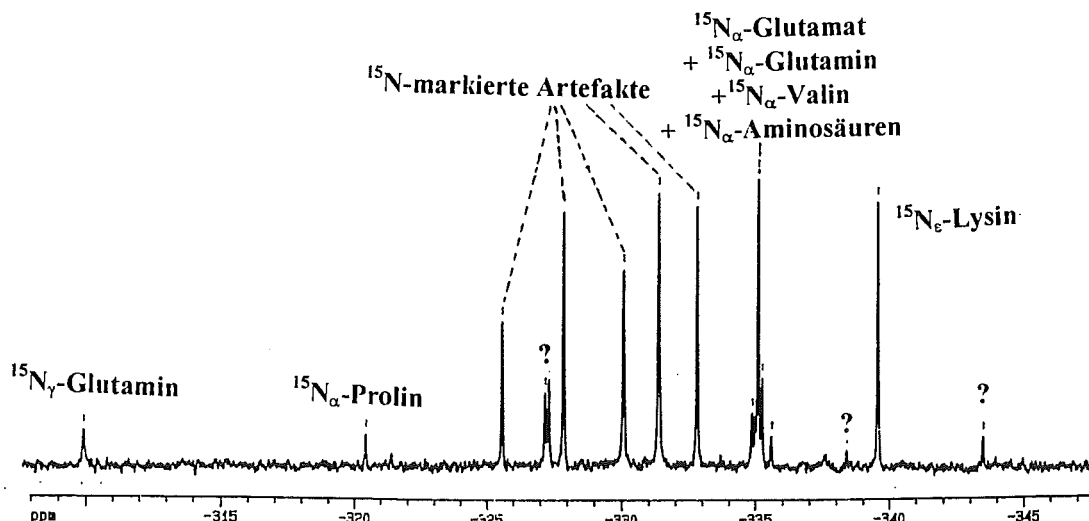
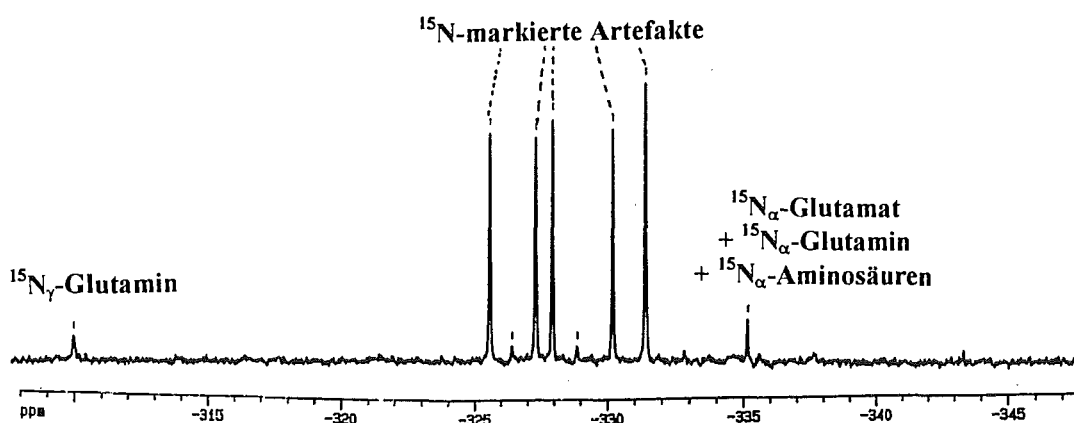


Abbildung 38: A: ^{15}N -NMR-Spektrum des ethanolischen Zellextraktes aus *C. glutamicum* MH 20-22B nach 135 min des ^{15}N -Markierungsexperimentes.



38 B: ^{15}N -NMR-Spektrum des ethanolischen Zellextraktes aus *C. glutamicum* MH 20-22B nach 1 min des ^{15}N -Markierungsexperimentes.

Diese, im Vergleich zu den bisher bearbeiteten *C. glutamicum*-Stämmen, außerordentlich komplexe Zusammensetzung der ^{15}N -markierten Verbindungen in ethanolischen Zellextrakten aus *C. glutamicum* MH20-22B machte die Ermittlung von Peaküberlappungsfaktoren in den entsprechenden *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren unmöglich. Damit war eine korrekte Quantifizierung der *in vivo*- ^{15}N -NMR Signale, wie dies bei den ^{15}N -Markierungsexperimenten mit *C. glutamicum* ATCC 13032 und -EB 1 unternommen wurde, ausgeschlossen. Dadurch konnte eine Auflösung der Stickstoffflüsse in *C. glutamicum* MH20-22B mittels eines mathematischen Modelles des kinetischen ^{15}N -Eintrags nicht erfolgen.

Über die Stickstoffflüsse bei Wachstum und Lysinproduktion von *C. glutamicum* MH20-22B bei C-Limitierung und NH_4^+ -Überschuß lassen sich aufgrund des durchgeführten Experimentes folgende Aussagen treffen:

Die NH_4^+ -Aufnahmerate von *C. glutamicum* MH20-22B lag mit $12,3 \mu\text{mol g Biotrockenmasse}^{-1} \text{ min}^{-1}$ fast doppelt so hoch wie in den bisher untersuchten *C. glutamicum*-Stämmen. Über Metabolitbilanzierung in dieser kontinuierlichen Kultur wurde ein Kohlenstofffluß in Lysin von $0,63 \mu\text{mol g Biotrockenmasse}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Nach den Ergebnissen von K. Sonntag 1994 wurden bei der eingesetzten NH_4^+ -Konzentration 51 % der ϵ -Aminogruppen in Lysin direkt über den DDH-Weg aus NH_4^+ gebildet. Demnach wurden in dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch die α -Aminogruppen des Lysins und 49% der ϵ -Aminogruppen des Lysin über Transaminierung mit dem primären NH_4^+ -Assimilationsprodukt Glutamat gebildet, woraus sich der Glutamatabfluß zur Lysinsynthese von $0,94 \mu\text{mol g Biotrockenmasse}^{-1} \text{ min}^{-1}$ errechnete.

Der Gesamtstickstofffluß in Lysin betrug $1,26 \mu\text{mol g Biotrockenmasse}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was bedeutet, daß nur 10% des von *C. glutamicum* MH 20-22B unter den untersuchten Bedingungen assimilierten Ammoniums zur Lysinbiosynthese genutzt wurde. Bilanziert man die im Fließgleichgewicht aus dem Fermenter abfließenden gelösten zellinternen Aminosäuren Alanin, Glutamat, Valin, Isoleucin und Glutamin, so wurde ein Gesamtstickstofffluß in diese Metabolite von $1,22 \mu\text{mol g Biotrockenmasse}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Dieser Stofffluß in zellinterne Nebenprodukte war also fast so hoch wie der in das ausgeschiedene Lysin; die Stoffflüsse im einzelnen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Stickstoffflüsse in *C. glutamicum* MH20-22B bei Wachstum und Lysinproduktion in kontinuierlicher Kultur bei C-Limitierung und N-Überschuß.

Stickstofffluß	$\mu\text{mol/g Trockengewicht min}$	Stickstofffluß	$\mu\text{mol/g Trockengewicht min}$
NH_4^+ -Aufnahme	12,6	Glutamatabfluß aus dem Fließgleichgewicht	0,23
Stickstofffluß in Lysin	1,26	Glutaminabfluß aus dem Fließgleichgewicht	0,04
NH_4^+ -Einbau in Lysin über den DDH-Weg*	0,32	Alaninabfluß aus dem Fließgleichgewicht	0,54
N_ϵ -Lysin-Synthese über glutamatabhängige Transaminase	0,31	Valinabfluß aus dem Fließgleichgewicht	0,31
N_α -Lysin-Synthese über glutamatabhängige Transaminase	0,63	Isoleucinabfluß aus dem Fließgleichgewicht	0,01
Gesamt-Stickstofffluß in Biomasse**	6,4	Nicht zuzuordnender Stickstoffabfluß	3,81

* nach Sonntag *et al.* 1995

** Wert aus *C. glutamicum* ATCC 13032

Vorausgesetzt, daß sich der Stickstoffbedarf zur Biomassessynthese von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* MH20-22B nicht wesentlich unterscheiden (Biomasseanalyse: Kelle *et al.* 1996), wurde die Ammoniumaufnahme des Wildtyps unter ganz ähnlichen Fermentationsbedingungen als Stickstofffluß in die Biomasse von *C. glutamicum* MH20-22B angenommen. Bilanzierte man nun die identifizierten und angenommenen Stickstoffflüsse in *C. glutamicum* MH20-22B, so ergab sich ein nicht zugeordneter Anteil von 30% des assimilierten Ammoniums. Über den Verbleib dieser NH_4^+ -Menge konnte mit den angewendeten analytischen Methoden keine Aussage getroffen werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals quantitative Daten zur Ammoniumassimilation eines Mikroorganismus unter definierten Kulturbedingungen gewonnen. Voraussetzung hierfür war die Entwicklung der *in vivo*- ^{15}N -NMR-Methode. Zusammen mit Ergebnissen, die mit biochemischen Methoden gewonnen wurden, ergab sich ein detailliertes Bild der Stoffflüsse bei der Ammoniumassimilation in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Untersuchungen zur Ammoniumassimilation von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde festgestellt, daß bei kontinuierlichem Wachstum bei C-Limitierung und NH_4^+ -Überschuß 30 % des NH_4^+ über die GS-Reaktion in Glutamin fixiert wurden. Der Glutaminpool im *C. glutamicum* Wildtyp war nach dem Glutamatpool der größte cytoplasmatische Aminosäurepool. So wurde in dieser Arbeit eine bisher nicht erkannte, bedeutende Rolle von Glutamin im NH_4^+ -Stoffwechsel von *C. glutamicum* entdeckt. Der *in vivo*-Stickstofffluß von Glutamin in die Biomassesynthese entsprach bei *C. glutamicum* ATCC 13032 etwa 30 % des assimilierten NH_4^+ . Dieser Wert lag mehr als doppelt so hoch wie der bei *Escherichia coli* festgestellte Glutaminbedarf zur Biomassebildung (13% des assimilierten Stickstoffs) (Reitzer und Magasanik 1987). Dieser unterschiedliche Glutaminbedarf zur Biomassesynthese des Gram-positiven *C. glutamicum* und des Gram-negativen *E. coli* läßt sich wahrscheinlich durch deren unterschiedlichen Zellwandaufbau erklären. Der Peptidoglycananteil an der Biotrockenmasse von Gram-positiven Bakterien liegt beim drei- bis siebenfachen des Zellwandanteils von Gram-negativen Bakterien (Schlegel 1992). Die Aminogruppe der Peptidoglycanbausteine UDP-N-Acetyl-Muramat und UDP-N-Acetyl-Glucosamin werden direkt über glutaminabhängige Transaminasen gebildet (Gottschalk 1985). Somit kann es sich bei dem entdeckten hohen Stickstofffluß über die GS um einen grundlegenden Unterschied von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien handeln.

Der experimentelle Zugang zur *in vivo*-Stickstoffflußanalyse war die *in vivo*- ^{15}N -NMR-Methode, die in dieser Arbeit entwickelt wurde. Die Kohlenstoff-Stoffflußanalyse des Zentralstoffwechsels über Metabolitbilanzierung und Isotopenanalyse von ^{13}C -markierten Metaboliten und der Berechnung der Stoffflüsse durch computergestützte Auswertung der ^{13}C -Verteilungsmuster in den Kohlenstoffgerüsten sind bewährte Methoden (Vallino 1990,

Stephanopoulos und Vallino 1991, Marx *et al.* 1996). Wesentliche Vorteile dieser stationären Stoffflußbestimmung über Isotopenanalyse sind die Unterscheidungsmöglichkeiten von parallel verlaufenden Stoffwechselwegen (Sonntag *et al.* 1994, Marx 1997) und die Identifizierung von bidirektionalen Reaktionen (Szyperski 1995, Marx *et al.* 1996) im Zentralstoffwechsel. Das Vorgehen der Isotopenanalyse bei der Stoffflußbestimmung erbrachte *in vivo*-Quantifizierungen der Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel, die bei klassischen biochemischen Untersuchungen nicht zugänglich waren (Rollin *et al.* 1995, Zupke und Stephanopoulos 1995, Sonntag *et al.* 1994, Sonntag 1995, Marx *et al.* 1995, Marx 1997). Ein Nachteil der Stoffflußanalyse über die ^{13}C -Isotopenanalyse ist die notwendige Komplexität der mathematischen Modelle, die den Zentralstoffwechsel beschreiben (Vallino und Stephanopoulos 1990, Vallino 1991, Wiechert und de Graaf 1996). Zur mathematischen Auswertung der ^{13}C -Verteilungsmuster muß die Datenbasis der gemessenen ^{13}C -Markierungen sehr umfangreich sein, was die Methode durch die erforderliche Isolierung vieler ^{13}C -markierter Zellbestandteile aufwendig macht (Marx 1997).

Stickstoffflüsse konnten über diese bewährte Methode der Stoffflußanalyse nicht bestimmt werden, da es bei Stickstoffatomen in Metaboliten keine analysierbaren Positionseffekte des Stickstoffs gibt. *In vivo*-Stickstoffflüsse können jedoch über die Messung von *in vivo*- ^{15}N -Einbaukinetiken erfaßt werden. Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren war zur Messung solcher *in vivo*- ^{15}N -Markierungskinetiken sehr gut geeignet. Die mathematischen Modelle zur Berechnung der spezifischen *in vivo*-Reaktionsgeschwindigkeiten aus den ^{15}N -Markierungskinetiken in dieser Arbeit gestalteten sich relativ einfach. Zur eindeutigen Quantifizierung der *in vivo*-Stickstoffflüsse war im Zuge dieser Arbeit die exakte Kalibrierung der *in vivo*- ^{15}N -NMR-Signale mit den auf klassischen biochemischem Wege ermittelten, intrazellulären Metabolitkonzentrationen von großer Bedeutung. Die Information über Konzentrationen der cytoplasmatischen Metabolite war nur auf dem Wege der Extraktion zugänglich, wodurch sich methodische Aufarbeitungsfehler auswirken könnten. Weiterhin wurden ^{15}N -markierte Metabolite, deren ähnliche chemische Verschiebung im *in vivo*- ^{15}N -Spektrum keine exakte Trennung der Signale zuließ (N_α -Aminosäuren), durch Aufreinigung aus Extrakten getrennt. Die etablierte *in vivo*- ^{15}N -NMR-Methode erbrachte also wesentliche Fortschritte bei der Stickstoffflußanalyse, eine vollständige Quantifizierung der NH_4^+ -Assimilation ausschließlich aus den *in vivo* gemessenen ^{15}N -Markierungskinetiken war jedoch aus den genannten Gründen nicht möglich.

Kürzlich wurde ein sehr ausführliches mathematisches Modell des Glutamatstoffwechsels in der Nebennierenrinde publiziert (Martin *et al.* 1997). Dieses sehr umfangreiche Modell formulierte fünf cyclische Synthesewege im Zentralstoffwechsel zum Kohlenstoffgerüst des Glutamats. Drei dieser fünf Stoffwechselwege lagen über ^{13}C - und ^{14}C -Markierungsversuche im experimentellen Zugang der Arbeitsgruppe und die jeweiligen Stoffflüsse wurden quantifiziert (Chauvin *et al.* 1997). Unter anderem wurde von dieser Arbeitsgruppe gezeigt, daß Glutamat in der Nebennierenrinde durch die GDH abgebaut wurde, während gleichzeitig Glutamat gluconeogenetisch aus Glutamin, Alanin und CO_2 synthetisiert wurde (Chauvin *et al.* 1997). Die Umsätze auf dem Glutamat/Glutaminzyklus des GS/GOGAT-Weges konnten nicht quantifiziert werden. Hier könnte mit ^{15}N -Markierungsexperimenten ein Fortschritt erreicht werden.

Das in dieser Untersuchung verwendete *in vivo* ^{15}N -NMR-Meßverfahren stellte eine Fortentwicklung der von Haran *et al.* 1986 durchgeführten Versuche mit dem glutamatproduzierendem *B. lactofermentum* dar (Haran *et al.* 1986). Bei den von Haran *et al.* 1986 publizierten *in vivo*- ^{15}N -Spektren von *B. lactofermentum* war der physiologische Zustand der aus dem Bioreaktor in ein Standard-NMR-Röhrchen überführten Zellen während der Aufarbeitung und der langen ^{15}N -NMR-Meßzeit (130-200 min/*in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektrum) nicht charakterisiert und nicht konstant. Dementsprechend gab es Unterschiede zwischen *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren aus „packed cell“-Versuchen und aus den definierten Fermentationen mit dem *in vivo*-NMR-Bioreaktor. Die publizierten „packed cell“- ^{15}N -Spektren ließen sich mit dem zu *B. lactofermentum* nahe verwandten *C. glutamicum* Wildtyp in dieser Arbeit mit „packed cell“- ^{15}N -NMR-Versuchen gut reproduzieren (Daten wurden nicht gezeigt). Haran *et al.* konnten mit ihren ^{15}N -NMR-Untersuchungen 1986 zeigen, daß die stärksten ^{15}N -NMR-Signale bei Wachstum von *B. lactofermentum* die von ^{15}N -Glutamat, ^{15}N -Glutamin, ^{15}N -Alanin und ^{15}N -Lysin waren (Haran *et al.* 1986). Dieses Ergebnis wurde auch durch die definierten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Untersuchungen im *in vivo*-NMR-Bioreaktor in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Das von Haran *et al.* 1986 beschriebene, im „packed cell“- ^{15}N -NMR-Spektrum enthaltene, starke Signal aus ^{15}N -Acetyl-Glutamin wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten „packed cell“- ^{15}N -NMR-Versuchen ebenfalls beobachtet (Daten wurden nicht gezeigt), war aber in den definierten mit dem *in vivo*-NMR-Fermenter gemessenen *in vivo*- ^{15}N -NMR-Spektren nicht enthalten. Man konnte nun spekulieren, ob es sich bei dieser Substanz um einen Metaboliten der Anaerobiose oder der Cytolyse von glutamatproduzierenden Bakterien handelte.

Bei der Untersuchung von Haran *et al.* 1986 wurden alle ^{15}N -Aminosäure-Signale, mit Ausnahme des ^{15}N -Glutamatpeaks, von *B. lactofermentum* unter Glutamatproduktionsbedingungen schwächer (Haran *et al.* 1986). Dies wurde von Haran *et al.* 1986 als meßbare Permabilität der Cytoplasmamembran für niedermolekulare Metabolite interpretiert. Weiterhin wurde von Haran *et al.* 1986 gezeigt, daß bei sauerstofflimitierter Glutamatproduktion von *B. lactofermentum* ein wesentlicher Anteil der ^{15}N -Markierung wahrscheinlich über die Glutamat-Alanin-Transaminase in ^{15}N -Alanin gelangte. In der Untersuchung von Haran *et al.* 1986 war nur ein „packed cell“ ^{15}N -NMR-Spektrum von *B. lactofermentum* pro Fermentation publiziert. Die $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken des glutamatproduzierenden Bakteriums wurde nicht erfaßt. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnten daher auch keine *in vivo*-Stickstoffflüsse quantifiziert werden.

Die spezifischen Aktivitäten der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme bei NH_4^+ -Überschuß (GDH: 1,2 U/mg Protein, GS: 300 mU/mg Protein, GOGAT: nicht nachweisbar), die in dieser Arbeit bestimmt wurden, liegen in der gleichen Größenordnung wie die Literaturdaten (Shiio und Ozaki 1970, Tachiki *et al.* 1981, Sung *et al.* 1984, Börmann 1994). Dies gilt ebenfalls für die spezifischen Aktivitäten von GDH (ca. 1 U/mg Protein) und GOGAT (ca. 50 mU/mg Protein) bei niedrigen NH_4^+ -Konzentrationen (Ertan 1992, Tochikura *et al.* 1984). Die bei NH_4^+ -Limitierung gemessene spezifische GS-Aktivität (ca. 12 U/mg Protein) lag um den Faktor fünf bis zehn höher als die Werte in ähnlichen Studien (Tachiki *et al.* 1981, Sung *et al.* 1985). Dies kann durch die in dieser Arbeit realisierten Kulturbedingungen erklärt werden; in keiner der bisher publizierten Arbeiten (Tachiki *et al.* 1981, Sung *et al.* 1985) wuchs *C. glutamicum* in kontinuierlicher Kultur streng NH_4^+ -limitiert bei einem C-Überschuß.

Bei vielen Mikroorganismen, die sowohl über den GDH- als auch über den GS/GOGAT-Weg zur Ammoniumassimilation verfügen, werden die Enzyme des GS/GOGAT-Weges durch die Art und Konzentration der N-Quelle im Medium reguliert (Review: Merrick & Edwards 1995). Bei dem am besten in *E. coli* untersuchten Regulationsmechanismus wird die GS-Aktivität bei hoher NH_4^+ -Verfügbarkeit durch Adenylierung vermindert. Weiterhin wird die Expression des für die GS codierenden Gens *glnA* bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen reprimiert. Die funktionelle Kaskade der regulatorischen Proteine der GS-Regulation ist in *E. coli* gut charakterisiert (Reitzer und Magasanik 1987).

Die spezifische GS-Aktivität war in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei NH_4^+ -Limitierung hoch und sank mit steigender NH_4^+ -Konzentration. Im Wildtyp sank die spezifische GOGAT-Aktivität ebenfalls von hohen Werten bei NH_4^+ -Mangel auf Werte unterhalb der

Nachweisgrenze bei NH_4^+ -Überschuß. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Regulationsverhalten der Enzyme des GS/GOGAT-Weges in *C. glutamicum* stimmt mit den Ergebnissen von Kim *et al.* 1986 und Sung *et al.* 1985 überein.

Diese Arbeitsgruppen publizierten Regulationstendenzen der GS und der GOGAT in *C. glutamicum* ATCC 13058 und *B. flavum*, deren spezifische Aktivitäten bei steigender Stickstoffversorgung abnahmen (Sung *et al.* 1985, Kim *et al.* 1986). Die Ergebnisse dieser Arbeit machen die Regulation der GS-Aktivität in *C. glutamicum* direkt durch die N-Verfügbarkeit im Medium sehr wahrscheinlich. In der Literatur sind Hinweise auf eine den bekannten Regulationsmechanismen ähnlichen Regulation der GS durch Adenylierung in *C. glutamicum* zu finden (Park *et al.* 1989).

In der vorliegenden Arbeit konnte der von Kim *et al.* 1986 beschriebene Befund, daß die spezifische GDH-Aktivität in *C. glutamicum* ATCC 13058 mit sinkender NH_4^+ -Verfügbarkeit abnahm (Kim *et al.* 1986), nicht bestätigt werden. Die GDH in *C. glutamicum* ATCC 13032 verhielt sich unabhängig von der NH_4^+ -Konzentration. Sung *et al.* beschrieben die spez. GDH-Aktivität in *B. flavum* ebenfalls als unabhängig von der NH_4^+ -Konzentration (Sung *et al.* 1985).

Die *in vivo*- ^{15}N -NMR-Stickstoffflußanalyse der GDH-Mutante von *C. glutamicum* bei kontinuierlichem Wachstum unter C-Limitierung und NH_4^+ -Überschuß in dieser Arbeit ergab, daß 100 % des NH_4^+ über den GS/GOGAT-Weg assimiliert wurden. Auch in *C. glutamicum* EB 1 wurden mindestens 30 % des gebildeten Glutamins für die Biomassesynthese verbraucht, was das entsprechende Ergebnis bei der Stickstoffflußanalyse des *C. glutamicum* Wildtyps bestätigt. Die mit dem ^{15}N -NMR-Markierungsversuch festgestellte NH_4^+ -Assimilation von *C. glutamicum* EB1 über den GS/GOGAT-Weg steht mit der Beobachtung der wachstumshemmenden Wirkung von MSX auf *C. glutamicum* EB1 bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen und den bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen gemessenen spezifischen Aktivitäten der Enzyme des GS/GOGAT-Weges in dieser Arbeit im Einklang.

Im Zuge der Charakterisierung der NH_4^+ -Assimilation von *C. glutamicum* ATCC 13032 und – EB1 in der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß sich beide Stämme durch ihr Wachstumsverhalten bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen in Gegenwart des Glutaminanalogons MSX unterschieden. *C. glutamicum* EB1 wurde im Gegensatz zum Wildtyp durch MSX unter diesen Bedingungen stark im Wachstum gehemmt. Die hier gezeigte Inhibition der GS aus verschiedenen Organismen durch MSX ist mehrfach in der Literatur beschrieben

(Manning *et al.* 1969, Weisbrod und Meister 1973). Auch die in dieser Arbeit festgestellte Inhibition der GOGAT durch MSX wurde beobachtet (Mora *et al.* 1987). MSX wird über die Cytoplasmamembran transportiert (Kleiner *et al.* 1983). Aus der inhibitorischen Wirkung von MSX auf die definierte GDH-Mutante *C. glutamicum* EB1 wurde in dieser Arbeit geschlossen, daß der GDH- und der GS/GOGAT-Weg die einzigen NH_4^+ -Assimilationswege in *C. glutamicum* waren.

Die spezifische GOGAT-Aktivität in *C. glutamicum* EB1 war unabhängig von der NH_4^+ -Verfügbarkeit. Dieses Ergebnis der vorliegenden Arbeit steht in Einklang mit den Befunden von E. Börmann 1994, die bei hoher N-Verfügbarkeit die verschiedenen Aktivitätszustände der GOGAT in *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB1 feststellte. Die Möglichkeit von Sekundärmutationen in *C. glutamicum* EB1 wurde von E. Börmann durch Transformation von *C. glutamicum* EB 1 mit einem *gdh*-tragenden Plasmid, wodurch die GOGAT in diesem Stamm wieder wie im Wildtyp reguliert wurde, ausgeschlossen (Börmann–El Kholy 1994). Das gegenüber dem Wildtyp veränderte Regulationsverhalten der Enzyme des GS/GOGAT-Weges in der definierten GDH-Mutante wurde auch schon bei anderen GDH-negativen aminosäureproduzierenden Bakterienstämmen beschrieben. Sung *et al.* beschrieben 1985 bei einer durch ungerichtete Mutagenese erhaltenen GDH-defekten Mutante von *B. flavum* ebenfalls eine hohe spezifische GOGAT-Aktivität bei hoher Stickstoffverfügbarkeit (Sung *et al.* 1985).

Die von der NH_4^+ -Konzentration unabhängige GOGAT-Aktivität in *C. glutamicum* EB1 deutet auf einen zur GS verschiedenen Regulationsmechanismus der GOGAT in *C. glutamicum* hin. Hier ist durch den gemessenen niedrigeren Glutamatpool in *C. glutamicum* EB1 die Regulation durch diese Poolgröße wahrscheinlich. Nach dieser Hypothese würde die GOGAT bei kleinerem Glutamatpool in *C. glutamicum* zur Glutamatsynthese aktiv. In *Salmonella typhimurium* und *Klebsiella aerogenes* wurde beobachtet, daß Glutamat oder glutamatgenerierende N-Quellen (Arginin, Prolin, Histidin) die GOGAT-Expression bei N-limitierten Wachstum reprimieren (Brenchley *et al.* 1973, Brenchley *et al.* 1975). Es wurde ein Gen *gltF* im GOGAT-Operon (*gltBDF*) von *E. coli* beschrieben, dessen Produkt zur glutamatabhängigen Repression der GOGAT beitrug (Costano *et al.* 1992).

Die Untersuchungen an *Brevibacterium flavum* (Tochikura *et al.* 1984) und an *Corynebacterium callunae* (Ertan 1992), bei denen erhöhte GOGAT-Aktivitäten in diesen aminosäureproduzierenden Bakterien bei Wachstum auf Glutamat festgestellt wurden, widersprechen dieser Hypothese der glutamatabhängigen GOGAT-Repression nicht zwangsläufig. Glutamat wird von *C. glutamicum* nur relativ schlecht aufgenommen

(Krämer *et al.* 1990, Krämer & Lambert 1990) und die physiologische Situation der von Ertan 1992 und Tochikura *et al.* 1984 untersuchten Kulturen entsprach unter Umständen dem der N-Limitierung, wodurch die GOGAT aktiviert würde.

In dieser Arbeit wurde die GOGAT als das wachstumsratenlimitierende "bottle neck" in *C. glutamicum* EB1 identifiziert. Der Wachstumsnachteil der GDH-Mutante bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen im Vergleich zu *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde von E. Börmann nicht beschrieben (Börmann 1994). Von E. Börmann wurde zur Stammcharakterisierung ein Minimalmedium mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Harnstoff als N-Quelle verwendet. Da auf diesem Medium beide Stämme gleich schnell wuchsen, ist anzunehmen, daß der Regulationszustand der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme bei gleichzeitigem NH_4^+ - und Harnstoffangebot nicht dem bei reiner NH_4^+ -Verwertung entsprach. Vermutlich wurde der Wachstumsunterschied zwischen beiden Stämmen durch zusätzliche Regulationsmöglichkeiten (z.B. Harnstoffaufnahme (Siewe 1996)) ausgeglichen. Nur bei NH_4^+ als einzige N-Quelle wurden nach dieser Hypothese die in beiden Stämmen verschiedenen NH_4^+ -Assimilationswege in ihrem jeweiligen NH_4^+ -abhängigen Regulationszustand wachstumsratenbestimmend. Nicht ausschließen konnte man zusätzliche osmotische Effekte aufgrund der hohen Pufferkonzentration im Minimalmedium mit NH_4^+ als einzige N-Quelle.

Die definierte Mutation in der GDH von *C. glutamicum* EB1 führte zu drastischen Verschiebungen der Stickstoffflüsse und der Glutamatpoolgröße im Vergleich zum Wildtyp. Der genetische „Hintergrund“ beider Stämme war identisch und so wurden keine weiteren Differenzen im Stickstoff- und Aminosäurestoffwechsel beider Stämme festgestellt. Die Auswirkungen dieses definierten genetischen Eingriffes auf den NH_4^+ -Stoffwechsel von *C. glutamicum* ließen sich im Zuge dieser Arbeit gut charakterisieren.

Ganz anders als die *in vivo*-Stickstoffflußanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* EB1 verlief die Charakterisierung des NH_4^+ -Stoffwechsels in dem durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Lysinproduktionsstammes *C. glutamicum* MH20-22B (Schrumpf *et al.* 1992).

Die exakte Quantifizierung der Stickstoffflüsse in *C. glutamicum* MH20-22B war mit der entwickelten ^{15}N -NMR-Methodik nicht möglich. Es wurde eine Vielzahl von physiologischen Unterschieden im Stickstoffstoffwechsel des Lysinproduktionsstammes und des Wildtyps festgestellt (spezifische GS-Aktivität, niedrige Poolgrößen der primären NH_4^+ -

Assimilationsprodukte, hohe Poolgrößen anderer Aminosäuren). Die kulturbedingten Voraussetzungen für das *in vivo*- ^{15}N -NMR-Markierungsexperiment waren nicht so günstig wie in den vorhergehenden Experimenten. Das niedrige $^{15}\text{NH}_4^+ / ^{14}\text{NH}_4^+$ -Verhältnis (47%) im ^{15}N -Markierungsexperiment ließ eine Quantifizierung der *in vivo*- ^{15}N -NMR-Signale nicht zu. Schließlich konnten etwa 30 % des assimilierten NH_4^+ keinem meßbarem Stickstofffluß eindeutig zugeordnet werden.

Mit *in vivo*- ^{15}N -NMR und biochemischen Methoden wurden in dieser Arbeit sehr hohe Konzentration der Pyruvatabkömmlinge Alanin und Valin im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B gemessen. Dies könnte als Hinweis auf einen sehr hohen Pyruvatpool bei der Lysinproduktion von *C. glutamicum* MH20-22B gewertet werden. Gegen diese Hypothese sprechen die *in vivo*- ^{13}C -NMR-Untersuchen an diesem Stamm von A. Hartbrich (Hartbrich 1996). Bei der Messung von *in vivo*- ^{13}C -Einbaukinetiken bei C-limitierter Lysinproduktion von *C. glutamicum* MH20-22B wurde kein starkes Signal der C-Atome von Pyruvat gemessen. Lediglich das Signal des Pyruvatabkömmlings Lactat war im *in vivo*- ^{13}C -NMR-Spektrum vertreten. Weiterhin wurden von A. Hartbrich 1996 die Signale der C-Atome aus Lysin und der Tricarbonsäurezyklusintermediate und -abkömmlinge Succinat und Glutamat bestimmt (Hartbrich 1996). Die Versuchsbedingungen des *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experimentes in dieser Arbeit und die des *in vivo*- ^{13}C -NMR-Experimentes (Hartbrich *et al.* 1996) mit *C. glutamicum* MH20-22B waren praktisch identisch. Das massive Auftreten der Aminosäuren der Pyruvatfamilie in *C. glutamicum* MH20-22B kann wahrscheinlich nicht mit einem hohen Pyruvatpool erklärt werden. Sehr hohe Pyruvatkonzentrationen im Cytoplasma von *C. glutamicum* ATCC 13032 in Abhängigkeit der Sauerstoffversorgung wurden von K. Sonntag 1994 mit *in vivo*- ^{13}C -NMR gemessen (Sonntag 1994). Bei einem pO_2 von 80-100 % Luftsättigung betrug der Pyruvatpool 25 mM, bei einem pO_2 von unter 30% steigerte sich der Pyruvatpool von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf bis zu 300 mM (Sonntag 1994). In den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Experimenten und den von A. Hartbrich 1996 durchgeführten *in vivo*- ^{13}C -NMR-Versuchen mit *C. glutamicum* MH20-22B wurde der pO_2 der Kultur bei 20 % Luftsättigung geregelt. Eine Sauerstofflimitierung der Kultur wurde von Hartbrich 1996 aufgrund der niedrigen ^{13}C -Lactatsignale und der nicht meßbaren ^{13}C -Pyruvatsignale ausgeschlossen (Hartbrich 1996). So kann die hohe Variabilität des Pyruvatpools im *C. glutamicum* Wildtyp in Abhängigkeit der Sauerstoffversorgung nicht direkt mit dem Auftreten der Aminosäuren der Pyruvatfamilie bei der Lysinproduktion von *C. glutamicum* MH20-22B in Verbindung gebracht werden.

Das Regulationsverhalten der NH_4^+ -assimilierenden Enzyme in Abhängigkeit der NH_4^+ -Konzentration in *C. glutamicum* MH20-22B wurde in dieser Arbeit als mit dem Wildtyp phänotypisch gleich erkannt. Dagegen betrug die spezifische GS-Aktivität bei hohen NH_4^+ -Konzentrationen nur 10% der Wildtypaktivität. Eine Erklärung hierfür war mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten nicht zu erkennen.

Für die weitere Anwendung der im Zuge dieser Arbeit etablierten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Methodik auf den Stickstoff- und Aminosäurestoffwechsel von *C. glutamicum* werden sich aus den oben genannten Gründen genetisch gut charakterisierte, definierte *C. glutamicum*-Mutanten besser eignen als vielfältig mutagenisierte Stämme.

In Bakterien sind zwei Wege für die Assimilation von Ammonium bekannt: NH_4^+ kann über die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) zu Glutamat oder über die Glutamin-Synthetase (GS) zu Glutamin umgesetzt werden. Aus Glutamin kann dann über die Glutamin-2-Ketoglutarat-Aminotransferase (GOGAT) Glutamat synthetisiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von *in vivo*- ^{15}N -NMR-Markierungsexperimenten die NH_4^+ -Assimilation in verschiedenen *Corynebacterium glutamicum* Stämmen qualitativ und quantitativ zu charakterisieren.

Bei der in dieser Arbeit etablierten *in vivo*- ^{15}N -NMR-Methode wurden $^{15}\text{NH}_4^+$ -Einbaukinetiken bei kontinuierlichen *C. glutamicum*-Kulturen mittels eines Spezialfermenters gemessen. Aus diesen *in vivo*- ^{15}N -Markierungskinetiken wurden die *in vivo* Stickstoffflüsse in *C. glutamicum* quantifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit *in vivo*- ^{15}N -NMR gezeigt, daß bei kontinuierlichem Wachstum von *C. glutamicum* unter NH_4^+ -Überschuß 30 % des assimilierten Stickstoffs über die GS in Glutamin eingebaut wurden. 70 % des NH_4^+ wurden über die GDH assimiliert. Das gebildete Glutamin wurde für biosynthetische Reaktionen verbraucht. In kontinuierlichen Fermentationen mit *C. glutamicum*, bei denen die NH_4^+ -Verfügbarkeit variiert wurde, waren die spez. Aktivitäten der Enzyme des GS/GOGAT-Weges bei NH_4^+ -Überschußbedingungen (GS: 300 mU/mg Protein, GOGAT: nicht nachweisbar) um ein vielfaches geringer als unter NH_4^+ -Mangelbedingungen (GS: 12 U/mg Protein, GOGAT: 50 mU/mg). Die GDH (1,5 U/mg Protein) verhielt sich unabhängig von der NH_4^+ -Konzentration. Mit *in vivo*- ^{15}N -NMR wurden also ein unerwartet hoher *in vivo*-Stickstofffluß über die GS bei einer niedrigen spezifischen Aktivität dieses Enzyms unter NH_4^+ -Überschußbedingungen in *C. glutamicum* nachgewiesen. Damit wurde eine bisher nicht erkannte, zentrale Rolle des überraschend hohen Glutaminpools (60 mM) bei der NH_4^+ -Assimilation von *C. glutamicum* entdeckt.

Die definierte GDH-Mutante von *C. glutamicum* (Verdopplungszeit: 3,2 h) hatte bei NH_4^+ -Überschußbedingungen einen signifikanten Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp (Verdopplungszeit: 2 h). Das Glutaminanalogon MSX wirkte im Gegensatz zum Wildtyp stark wachstumshemmend auf die definierte GDH-Defektmutante von *C. glutamicum*. Als Targets von MSX wurden GS und GOGAT, aber nicht die GDH identifiziert. Daraus wurde geschlossen, daß es in *C. glutamicum* außer dem GDH- und dem GS/GOGAT-Weg keine weiteren zentralen NH_4^+ -Assimilationswege gab. Während sich die NH_4^+ -abhängige Regulation der GS in der GDH-Mutante wie im Wildtyp verhielt, war die spezifische GOGAT-Aktivität in der GDH-Mutante unabhängig von der NH_4^+ -Konzentration. In der *in vivo*- ^{15}N -NMR-Untersuchung der GDH-Mutante wurde wie erwartet nachgewiesen, daß das gesamte assimilierte NH_4^+ unter NH_4^+ -Überschußbedingungen über den GS/GOGAT-Weg assimiliert wurde. Wie im Wildtyp wurden etwa 30 % des assimilierten NH_4^+ über Glutamin zur Biomassessynthese genutzt.

Die Untersuchung des NH_4^+ -Stoffwechsels des Lysinproduktionsstammes *C. glutamicum* MH20-22B ergab, daß die intrazellulären Pools der primären NH_4^+ -Assimilationsprodukte (Glutamat: 100 mM, Glutamin: 20 mM) deutlich geringer waren als im Wildtyp. Die spez. GS-Aktivität (30 mU/mg Protein) bei NH_4^+ -Überschußbedingungen betrug nur 10 % der Wildtypaktivität. Ferner wurden sehr hohe cytoplasmatische Konzentrationen der Aminosäuren der Pyruvatfamilie (Alanin: 240 mM, Valin: 140 mM) festgestellt.

5. Verwendete Literatur

- Abe, S., Takayama, K.I. and Kinoshita, S.** 1967 Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 13, pp. 279-301
- Altenburger, R., Arbarzua, S., Callies, R., Grimme, L. H., Mayer, A. and Leibfritz, D.** 1991 Ammonia rythm in *Microcystis firma* studied by *in vivo* ^{15}N and ^{31}P NMR spectroscopy. *Arch. Microbiol.* Vol 156, pp. 471-476
- Berry, A.M., Thrayer, J.R., Carol, S.E. and Jones, A.D.** 1990 Patters of $[^{13}\text{N}]$ ammonium uptake and assimilation by *Frankia* HFPAr13. *Arch. Microbiol.* Vol. 154, pp 510-513
- Blomberg, F. and Rüterjans, H.** 1983 Nitrogen-15 NMR in Biological Systems. *Biol. Magn. Reson.* Vol. 5, pp. 21-43
- Börmann, E. R., Eikmanns, B.J., Gutmann, M. and Sahm, H.** 1992 Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* Vol. 6, pp. 317-326
- Börmann-El Kholy, E. R., Eikmanns, B.J., Gutmann, M. and Sahm, H.** 1993 Glutamate Dehydrogenase is not essential for Glutamate Formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 59, No. 7, pp. 2329-2331
- Börmann-El Kholy, E.R.** 1994 Die Glutamat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum*: genetische und physiologische Untersuchungen. Dissertation der Universität Düsseldorf. Berichte des Forschungszentrum Jülich 2929 (ISSN 0944-2952)
- Brenchley, J. E., Prival, M. J. and Magasanik, B.** 1973 Regulation of the enymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. *J. Biol. Chem.* Vol. 248, pp 6122-6128
- Brenchley, Baker, C.A. and Patil, L.G.** 1975 Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* Vol. 124, pp 182-189
- Castano, I., Flores, N., Valle, N., Covarrubias, A. and Bolivar, F.** 1992 *gltF*, a member of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*, is involved in nitrogen regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* Vol. 6, pp. 2733-2741
- Chauvin, M.-F., Megnin-Chanet, F., Martin, G., Mispelters, J. and Baverel, G.** 1997 The Rabbit Kidney Tubule Simultaneously Degrades and Synthesizes Glutamate. *J. Biol. Chem.* Vol. 272, No. 8, pp. 4705-4716
- Ertan, H.** 1992 Some Properties of Glutamate Dehydrogenase, Glutamine Synthetase and Glutamate Synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* Vol. 158, pp. 35-41

- Eikmanns, B. J.** 1992 Identification, Sequence Analysis and Expression of a *Corynebacterium glutamicum* Gene Cluster Encoding the three Glycolytic Enzymes Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerate Kinase, and Triosephosphate Isomerase, *J. Bacteriol.* Vol. 174, No. 19, pp. 6076-6086
- Gottschalk, G.** 1986 Bacterial Metabolism, Second Edition, Springer-Verlag New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo Inc., ISBN 0-387-96153-4
- Günther, H.** 1992 NMR-Spektroskopie; Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen- und Kohlenstoff-13-Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. ISBN 3-313-487503-9
- Hartbrich, A., G. Schmitz, Weuster-Botz, D., de Graaf, A. A. and Wandrey, C.** 1996 Development and Application of a Membrane Cyclone Reactor for *In Vivo* NMR Spectroscopy with High Microbial Cell Densities. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 51, pp. 624-635
- Hartbrich, A.** 1997 Charakterisierung und Maßstabsübertragung von Zyklonreaktoren in der Biotechnologie. Dissertation der Fakultät für Maschinenwesen der Rheinisch-Westphälischen Technischen Hochschule Aachen
- Haran, N., Kahana, Z.E., Lapidot, A.** 1983 *In Vivo* ^{15}N NMR Studies of Regulation of Nitrogen Assimilation an Amino Acid Productio by *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Biol. Chem.* Vol. 258, No. 21, pp. 12929-12933
- Hirose, Y. und Okada, A.** 1979 Microbial production of amino acids. In: Pepplev, H.J. und Perlman, P. (eds.) Microbial Technology, 2nd Edition, Vol. 1, pp. 211-240
- Ishino, S., Kuga, T. Yamaguchi, K., Shirahata, K. and Araki, K.** 1984 Involvement of meso- α,ϵ -diaminopimelate-D-dehydrogenase in lysine biosynthesis in *Corynbacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* Vol. 48, No. 10, pp. 2557-2560
- Jones, G. J. and Bellion, E.** 1991 *In vivo* ^{13}C - and ^{15}N NMR Studies of Methylamine Metabolism in *Pseudomonas* Species MA. *J. Biol. Chem.* Vol. Vol. 266, No. 18, pp. 11705-11713
- Kanamori, K. and Roberts, J.D.** 1983 ^{15}N NMR Studies of Biological Systems. *Acc. Chem. Res.* Vol. 16, pp. 35-41
- Kanamori, K., Legerton, T. L., Weiss, R. L. and Roberts J. D.** 1982 Effect of the Nitrogen Source on Glutamine and Alanine Biosynthesis in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* Vol. 257, No. 23, pp. 14168-14172
- Kanamori, K., Weiss, R.L., Roberts, J.D.** 1987 I Glutamate Biosynthesis in *Bacillus azotofixans*. *J. Bacteriol.* Vol. 171, No. 4, pp. 2148-2154

- Kanamori, K., Weiss, R.L., Roberts, J.D.** 1987 II Ammonia Assimilation by *Bacillus polymyxa*. *J. Biol. Chem.* Vol. 262, No. 23, pp. 11038-11045
- Kanamori, K., Weiss, R.L., Roberts, J.D.** 1987 III Role of Glutamate Dehydrogenase in Ammonia Assimilation Pathways in Nitrogen-Fixing *Bacillus macerans*. *J. Bacteriol.* Vol. 169, pp. 4692-4695
- Kanamori, K., Weiss, R.L., Roberts, J.D.** 1989 Ammonia Assimilation Pathways in Nitrogen-Fixing *Clostridium kluyverii* and *Clostridium butyricum*. *J. Bacteriol.* Vol. 171, No. 4, pp. 2148-2154.
- Kelle, R., Laufer, B., Brunzema, C., Krämer, R. and Wandrey, C.** 1996 Reaction engineering analysis of L-lysine transport by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 51, pp. 40-50
- Kenealy, W.R., Thompson, T.E., Schubert, K.R. and Zeikus J.G.** 1982 Ammonia Assimilation and Synthesis of Alanine, Aspartate and Glutamate in *Methanosarkina barkeri* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* Vol. 150, No. 3, pp. 1357-1365
- Kim, I.-J., Kyung, H.-M., Lee, B.-L.** 1986 Genetic regulation for the biosynthesis of glutamate family in *C. glutamicum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* Vol. 14, No. 5, pp. 427-432
- Kim C.H. and Hollocher T.C.** 1982 ¹³N-Isotope Studies on the Pathway of Ammonia Assimilation in *Bacillus megaterium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* Vol. 151, No. 1, pp. 358-366
- Kimura, K.** 1962 The significance of glutamic dehydrogenase in glutamic acid fermentation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 8, 253-260
- Kleiner, D., Alef, K. and Hartmann, A.** 1983 Uptake of methionine sulfoximine by some N₂ fixing bacteria, and its effect on ammonium transport. *FEBS Letters* Vol. 164, No. 1, pp. 121-123
- Klingenberg, M. & Pfaff, E.** 1967 Means of terminating reactions, pp. 680-684. In R.W. Estabrook and M. R. Pullmann (ed.) *Methods of enzymology*, Vol. X, Academic Press, Inc., New York
- Krämer R. & Lambert C.** 1990 Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*: Evidence for a primary active transport system. *Eur. J. Biochem.* Vol. 194, pp. 937-944
- Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C. and Ebinghausen, H.** 1990 Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*: Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur. J. Biochem.* Vol. 194, pp. 929-935

- Kuesel, A.C., Kuhn, W., Sianoudis, J., Grimme, L.H., Leibfritz, D. and Mayer, A. 1989 N-15 in vivo NMR spectroscopic investigation of nitrogen deprived cell suspensions of green alga *Chlorella fusca*. *Arch. Microbiol.* Vol. 151, pp. 434-438
- Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M., and Krämer R. 1995 Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. *Appl. Env. Microbiol.* Vol. 61, pp. 4334-4342
- Llinas, M., Würtherich, K., Schwotzer, W. und von Philipsborn, W. 1975 ¹⁵N-nuclear magnetic resonance of living cells. *Nature*, Volume 257, pp. 817-818
- Lundberg, P., Weich, R.G., Jensen, P. and Vogel, H.J. 1989 Phosphorous-31 and Nitrogen-14 NMR Studies of the Uptake of Phosphorous and Nitrogen Compounds in the Marine Macroalgae *Ulva lactuca*. *Plant Physiol.* Vol. 89, pp. 1380-1387
- Oshima, K., Tanaka, K. and Kinoshita, S. 1964 Studies on L-glutamic acid fermentation. XI Purification and properties of L-glutamic acid dehydrogenase from *Micrococcus glutamicus*. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 28, pp. 714-722
- Manning, J. M., Moore, S., Rowe, W. B. and Meister, A. 1969 Identification of L-Methionine-S-Sulfoximine that Inhibits Glutamine Synthetase. *Biochemistry* Vol. 8, No. 6, pp. 2681-2685
- Martin, G., Chauvin, M.-F. and Baverel, G. 1997 Model Applicable to NMR Studies for Calculating Flux Rates in Five Cycles Involved in Glutamate Metabolism. *J. Biol. Chem.* Vol. 272, No. 8, pp. 4717-4728
- Martin, F. 1985 Monitoring plant metabolism by ¹³C, ¹⁵N and ¹⁴N nuclear magnetic resonance spectroscopy. A review to algae, fungi and higher plants. *Physiol. Veg.* Vol. 24, No. 4, pp. 463-490
- Marx, A., de Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L. and 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.* Vol. 49, pp. 111-129
- Marx, A. 1997 Bestimmung des Kohlenstoffflusses im Zentrastoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum* mittels ¹³C-Isotopenanalyse. Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Meers, J.L., Tempest, D.W., and Brown, C.M. 1970 Glutamine (amide)-2-Oxoglutarate-Amidotransferase oxidoreduktase (NADP) an enzyme involved in the synthesis of glutamate in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* Vol 64, pp. 187-194

- Merrick, M. J. and Edwards, R. A.** 1995 Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiological reviews* Vol. 59, No. 4, pp 604-622
- Misono, H., Togawa, H., Yamamoto, T. and Soda, K.** 1979 Meso- α,β -diaminopimelat-D-dehydrogenase; distribution and the reaction produkt. *J. Bacteriol.* Vol. 137, No. 1, pp. 22-37
- Misono, H., Ogasawara, M. and Nagasaki, S.** 1986 Characterisation of Meso- α,β -diaminopimelat-D-dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 50, pp. 2729-2734
- Mora, Y., Hernandez, G. and Mora J.** 1987 Regulation of Carbon and Nitrogen Flow by Glutamate Synthase in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* Vol. 133, 1667-1674
- Ogden, G. & Földen P.** (1986) Amino acid analysis: an overview of current methods. *LC-GC* 5: pp. 28-40
- Pahel, G., Zelenetz, A.D. and Tyler, B.M.** 1978 *glbB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* Vol 133, pp. 139-148
- Park, M.-S., Choi, S.-Y., Kim, S.-J. and Min, K.-H.** 1989 Properties of Glutamine Synthetase from *Corynebacterium glutamicum*. *Korean Biochem. J.* Vol. 22, No. 2, pp. 128-132
- Von Philipsborn, W. and Müller, R.** 1986 ^{15}N -NMR Spectroscopy-New Methods and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* Vol. 25, pp. 383-413
- Preece, N.E. & Creedan, S.** 1993 Determining ^{15}N to ^{14}N ratios in biofluids by single pulse ^1H nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry* 215, pp. 180-183
- Reitzer, L. J. and Magasanik, B.** 1987 Ammonium assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. pp 302-320 In Neidhardt, F.C., Ingraham, J. L., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H. E. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Rollin, C., Morgant, V., Guyonvarch, A. and Guerquin-Kern, J.-L.** 1995 ^{13}C -NMR studies of *Corynebacteriu melassecola* metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.* Vol. 227, pp. 488-493
- Rottenberg, H.** 1979 The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles and vesicles. pp. 547-569. In S. Fleischer and L. Parker (ed.) *Methods in enzymology*, Vol. IV. Academic Press, Inc, New York
- Schlegel, H. G.** 1992 Allgemeine Mikrobiologie 7. Überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart pp. 51-61

- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Pühler, H., Eggeling, L. and Sahm, H.** 1991 A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* Vol. 173, pp. 4510-4516
- Schrumpf, B., Eggeling, L. and Sahm H.** 1992 Isolation and prominent characteristics of a L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 37, pp. 4510-4516
- Shapiro, B.M. and Stadtman, E.R.** (1970) Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods in Enzymology* 17A: 910-922
- Siewe, R.** 1996 Funktion und Regulation von Aufnahmesystemen für stickstoffhaltige Substrate bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität Düsseldorf. Berichte des Forschungszentrums Jülich ISSN 0944-2952
- Sonntag, K., Eggeling, L., de Graaf, A.A. and Sahm, H.** 1993. Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* Vol. 213, pp. 1325-1331
- Sonntag, K.** 1994 Charakterisierung von Kohlenstoff-Flüssen bei der Produktion von L-Glutamat und L-Lysin mit *Corynebacterium glutamicum* mittels Kernresonanz-Spektroskopie. Dissertation Universität Dortmund
- Sonntag, K., Schwinde, J., de Graaf, A. A., Marx, A., Eikmanns, B.J., Wiechert, W. and Sahm, H.** 1995 ¹³C NMR Studies of the fluxes in central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 44, pp. 489-495
- Shiio, I and Ozaki, H.** 1970 Regulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-specific Glutamate Dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a Glutamate-producing Bacterium. *J. Biochem.* Vol. 68, pp. 633-647
- Shiio, I and Ujigawa, K.** 1978 Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in glutamate-producing *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* Vol. 84, pp. 647-657
- Stephanopoulos, G. and Vallino, G.** 1991 Network rigidity and metabolic engineering in metabolic overproduction. *Science* Vol. 252, pp. 1675-1680
- Sung, H.A., Tachiki, T., Kumagai, H., Tochikura, T.** 1984 Production and Preparation of Glutamate Synthase from *Brevibacterium flavum*. *J. Ferment. Technol.* Vol. 62, No. 6, pp. 569-575
- Sung, H.A., Tamaki, H., Tachiki, T., Kumagai, H., Tochikura, T.** 1985 Ammonia Assimilation by Glutamine Synthase/Glutamate Synthase System in *Brevibacterium flavum*. *J. Ferment. Technol.* Vol. 63, pp. 5-10

- Szyperski, T.** 1995 Biosynthetically directed fractional ^{13}C -labeling of proteinogenic amino-acids-An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.* Vol. 232, pp.433-448
- Tachiki, T., Wakisaka, S. Kumagai, H., Kumagai, H. and Tochikura, T.** 1981 Crystallisation of glutamine synthetase from *Micrococcus glutamicus*. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 45, pp. 549-550
- Tochikura, T., Sung, T.T., Tachiki, T., Hidehiko, K.** 1984 Occurance of Glutamate Synthase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 48, No. 8, pp. 2149-2150
- Vallino, J.J.** 1990 Flux determination in cellular bioreaction networks: application to lysine fermentation. In: *Frontiers in bioprocessing*. Eds.: Sikdar, S.K., Bier, M., Todd, P. pp. 205-219, CRC, Boca Raton, FL
- Vandecasteele, J.P., Lemal, J. and Coudert, M.** 1975 Pathways and Regulation of Glutamate Synthesis in a *Corynebacterium sp.* Overproducing Glutamate. *J. Gen. Microbiol.* Vol. 90, pp. 178-180
- Walker, T.E. and London, R.E.** 1987 Bisynthetic Preparation of L- ^{13}C - and ^{15}N Glutamate by *Brevibacterium flavum*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 53, No. 1, pp. 92-98
- Warren, J. G., Strong, A. A. D., Schneider, B. L., Lee, W.-N. P. and Reitzer, L. J.** 1994 Utilization of Aspartate as a Nitrogen Source in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* Vol. 270, No 2, pp. 638-643
- Wendisch, F. W., de Graaf, A.A. and Sahm, H.** 1997, Accurate determination of ^{13}C -enrichments in nonprotonated carbon atoms of isotopically enriched amino acids by ^1H nuclear magnetic resonance, *Analytical Biochemistry* 245, 196-202
- Weisbrod, R. E. and Meister, A.** 1973 Studies on Glutamine Synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* Vol. 248, No. 11, pp. 3997-4002
- Wiechert, W. and de Graaf, A.A.** 1996 *In vivo* stationary flux analysis by ^{13}C -labelling experiments. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Ed.: Scheper, T., Springer, Berlin
- Zupke, C. and Stephanopoulos, G.** 1994 Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnol. Prog.* Vol. 10, pp. 489-498

Danksagung

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

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

Herrn Prof. Dr. R. Krämer danke ich für die Übernahme des Koreferates und die Betreuung im Rahmen des Graduiertenkolleges.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für das Stipendium im Rahmen des Graduiertenkolleges „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung“ der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf. Allen Mitgliedern dieses Graduiertenkolleges danke ich für die weiterführende Ausbildung und das angenehme Arbeitsumfeld.

Herrn Dr. A. A. de Graaf danke ich herzlich für die Einführung in die NMR-Methoden und die mathematische Modellierung des Stickstoffstoffwechsels. Ohne seine Erfahrung, seine Hilfe und Ausdauer wäre die Entwicklung der *in vivo*-¹⁵N-Methode nicht möglich gewesen.

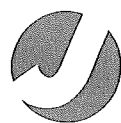
Herrn Prof. Dr. B. Eikmanns danke ich für die Betreuung der mikrobiologischen Arbeiten und die stets gute Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern der „NMR-Arbeitsgruppe“ Dr. A. Marx, K. Striegel, Dr. S. Schoberth, M. Heck, G. Schmitz und S. Petersen danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre. Auch danke ich für das gute Arbeitsumfeld den Mitgliedern der „Arbeitsgruppe Eikmanns“ Dr. P. Peters-Wendisch, V. Wendisch, D. Rittmann und S. Schnicke. M. Jakoby und T. Hermann aus der „Arbeitsgruppe Krämer“ danke ich für die Bestimmung der Cytoplasmavolumina im Zuge der Aminosäurepoolbestimmungen.

Ganz herzlichen Dank auch an die Mitarbeiter der elektrischen und mechanischen Werkstätten des IBT. Ohne ihre praktische Hilfe hätte der *in vivo*-NMR-Bioreaktor nicht realisiert werden können. Weiterhin danke ich den vielen ungenannten Mitarbeitern des IBT 1 und IBT 2 für ihre Hilfe und die gute Arbeitsatmosphäre.

Am meisten danke ich meiner Frau Kerstin, die mich mit ihrer Liebe und ihrer Unterstützung durch die Zeit dieser Arbeit begleitet hat.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3496
Januar 1998
ISSN 0944-2952

Forschungszentrum Jülich



Jül-3496
Januar 1998
ISSN 0944-2952