



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

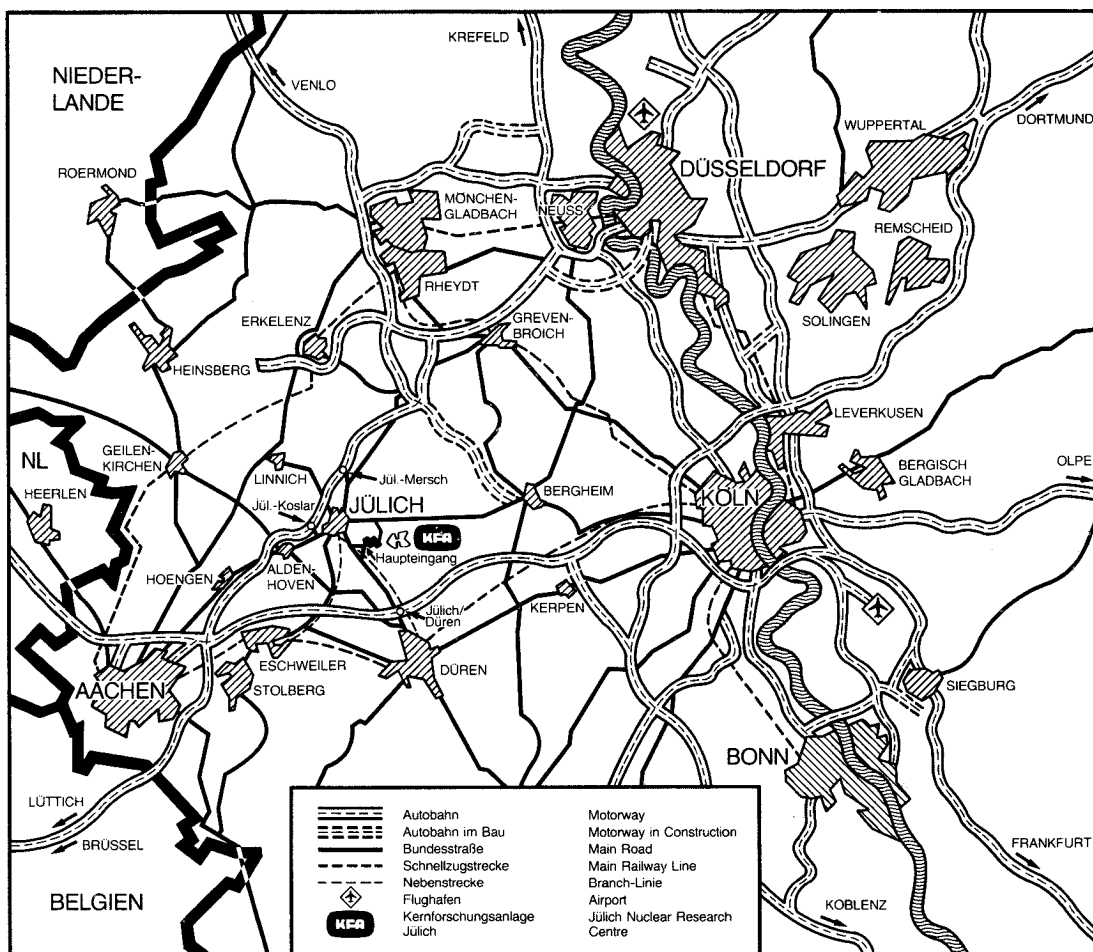
Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur Xanthanbildung
bei *Xanthomonas campestris***

von

Petra Pielken

Jül-2135
Juni 1987
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2135
 Institut für Biotechnologie Jüli-2135

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 19 13 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

Untersuchungen zur Xanthanbildung bei *Xanthomonas campestris*

von

Petra Pielken

D 10 (Diss. Uni. Düsseldorf)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine Diskussionsbereitschaft und zahlreichen Anregungen sowie für die großzügige Unterstützung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme, Aufgeschlossenheit und stets gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Herrn Engelmann danke ich für die vielen Ratschläge zur Lösung technischer Probleme, Herrn Mohl für die Durchführung der gelchromatographischen Analysen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Eggeling und Herrn Dr. Schimz bedanken, die durch ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, durch konstruktive Kritik und zahlreiche Ratschläge zur Lösung methodischer Probleme sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
d	Tag
dpm	desintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
DH	Dehydrogenase
ΔE	Extinktionsänderung
GDP	Guanosindiphosphat
h	Stunde(n)
min	Minute(n)
$NAD(P)^+$	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (phosphat) oxidiert
$NAD(P)H+H^+$	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (phosphat) reduziert
NMG	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
sec	Sekunde(n)
Tr.Gew.	Trockengewicht
U	Enzymeinheit
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung.....	1
II	Material und Methoden.....	10
1.	Organismus.....	10
2.	Chemikalien.....	10
3.	Nährmedien und Kulturbedingungen.....	12
4.	Bestimmung des Bakterienwachstums.....	14
5.	Nachweis von Methionin und Cycloleucin.....	14
6.	Mutagenese und Isolierung von Mutanten.....	15
6.1	Mutagenese.....	15
6.2	Isolation von Antibiotika-resistenten Mutanten..	15
6.3	Isolation von Methionin-auxotrophen Mutanten....	16
7.	Plasmidnachweis.....	16
8.	Bestimmung von Kohlenhydraten.....	16
8.1	Glucosenachweis.....	16
8.2	Xanthan-Bestimmungen.....	17
8.2.1	Gravimetrische Bestimmungsmethode.....	17
8.2.2	Nachweis mit Anthron.....	18
8.2.3	Viskositätsbestimmung.....	19
8.3	Nachweis von Glykogen.....	19
8.4	Bestimmung von Glucose-6-P und Glucose-1-P.....	20
8.5	Analysen zur Charakterisierung der nieder- molekularen Zuckerbestandteile.....	21
8.5.1	Gelpermeationschromatographie mit Fractogel....	22
8.5.2	Dünnschichtchromatographie.....	23
8.5.3	Borat-Komplex-Chromatographie mit Anionenaus- tauscher.....	25
8.5.4	Hydrolyse-Bedingungen.....	27
9.	Erstellung der Kohlenstoffbilanz.....	28
10.	Bestimmung des Adenosin-Nucleotid-Gehaltes in Zellen.....	30
11.	Herstellung von Rohextrakten.....	33
12.	Proteinbestimmung.....	33
13.	Bestimmung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt...	34

III Ergebnisse.....	41
1. Mutanten mit veränderter Xanthanbildung.....	41
1.1 Untersuchung von Antibiotika-resistenten Mutanten.....	42
2. Einfluß von Kulturbedingungen auf die Xanthanbildung.....	45
2.1 Einfluß von Aminosäuren auf die Xanthan- bildung.....	45
2.2 Einfluß von Methionin auf die Xanthanbildung....	47
2.3 Einfluß von Metaboliten des Methioninstoff- wechsels auf die Xanthanbildung.....	49
2.4 Einfluß von Methionin-Analoga auf die Xanthanbildung.....	50
2.5 Xanthanbildung nach Zugabe des Methionins zu verschiedenen Zeiten sowie mit nicht wachsenden Zellen.....	53
3. Versuche zur Verbesserung der Xanthanbildung....	55
4. Untersuchungen zum Glucose-Metabolismus.....	58
4.1 Untersuchung von niedermolekularen Zuckerbe- standteilen im Kulturfiltrat.....	58
4.2 Untersuchungen zur Akkumulation von intra- zellulären Metaboliten.....	64
4.3 C-Bilanz.....	67
4.4 Der Adenosin-Nucleotid-Gehalt der Zellen.....	70
4.5 Enzyme des Glucose-Stoffwechsels.....	72
4.5.1 Enzyme des Katabolismus.....	72
4.5.2 Enzyme des Anabolismus.....	76
IV Diskussion.....	81
V Zusammenfassung.....	92
VI Literatur.....	94

I EINLEITUNG

Die mikrobiellen Polysaccharide werden entsprechend ihrer Lokalisation in drei Hauptgruppen eingeteilt (Wilkinson 1958):

1. Intrazelluläre Polysaccharide, die in der Regel als Speicherstoffe dienen (z.B. Stärke und Glykogen).
2. Zellwand-Polysaccharide, die als Strukturelemente für den Schutz und für die Stabilität der Zellen verantwortlich sind.
3. Extrazelluläre Polysaccharide, die als Kapseln oder Schleime außerhalb der Zellwand lokalisiert sind.

Die extrazellulären Polysaccharide können gemäß ihrer Zusammensetzung in zwei Gruppen unterteilt werden: Die Homopolysaccharide sind nur aus einer Art monomerer Einheiten zusammengesetzt, während die Heteropolysaccharide aus mehreren verschiedenen Zuckern bestehen (Lehninger 1977). Zu den Homopolysacchariden zählen beispielsweise Dextran, Laevan und Pullulan, zu den Heteropolysacchariden das Alginat und Xanthan (Voelskow 1983).

Es werden verschiedene biologische Funktionen der extrazellulären Polysaccharide diskutiert: Sie sollen die Zellen gegen Phagen und Phagocytose schützen, die Anheftung an Oberflächen ermöglichen und an der Pathogenität vieler Mikroorganismen beteiligt sein (Wilkinson 1958).

Unter den zahlreichen mikrobiellen Exopolysacchariden erlangten in den letzten Jahrzehnten vor allem Dextran, Pullulan und Xanthan großes industrielles Interesse. Xanthan wird z.B. in der Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie sowie in der Waschmittel- und Farben-Industrie verwendet; daneben gewinnt es steigende Bedeutung bei der tertiären Erdölförderung (Sutherland und Ellwood 1979).

Das Xanthan wird von Bakterien der Gattung Xanthomonas, wie z.B. von X. phaseoli (Lesley und Hochster 1959), X. campestris (Rogovin et al. 1961), X. oryzae (Lin und Tseng 1979), als extrazelluläres Polymer gebildet. Das von X. campestris ausgeschiedene Xanthan enthält als Hauptbestandteile D-Glucose, D-Mannose sowie D-Glucuronsäure (Sloneker und Jeanes 1962). Die Struktur ist in Abb. 1 dargestellt: Die Hauptkette besteht aus D-Glucose-Einheiten, die β -1,4-glykosidisch verbunden sind; sie entspricht damit der chemischen Struktur von Cellulose. Etwa jedes zweite Glucose-Molekül ist mit einer Seitenkette verknüpft, die aus D-Mannose, D-Glucuronsäure und einem weiteren Molekül D-Mannose zusammengesetzt ist. Jede nicht endständige D-Mannose-Einheit der Seitenkette trägt in der 6-Position eine Acetylgruppe, und ungefähr die Hälfte der endständigen D-Mannose-Moleküle weist eine Pyruvatgruppe auf, die ketalartig mit der 4- und 6-Position verbunden ist (Jansson et al. 1975, Melton et al. 1976).

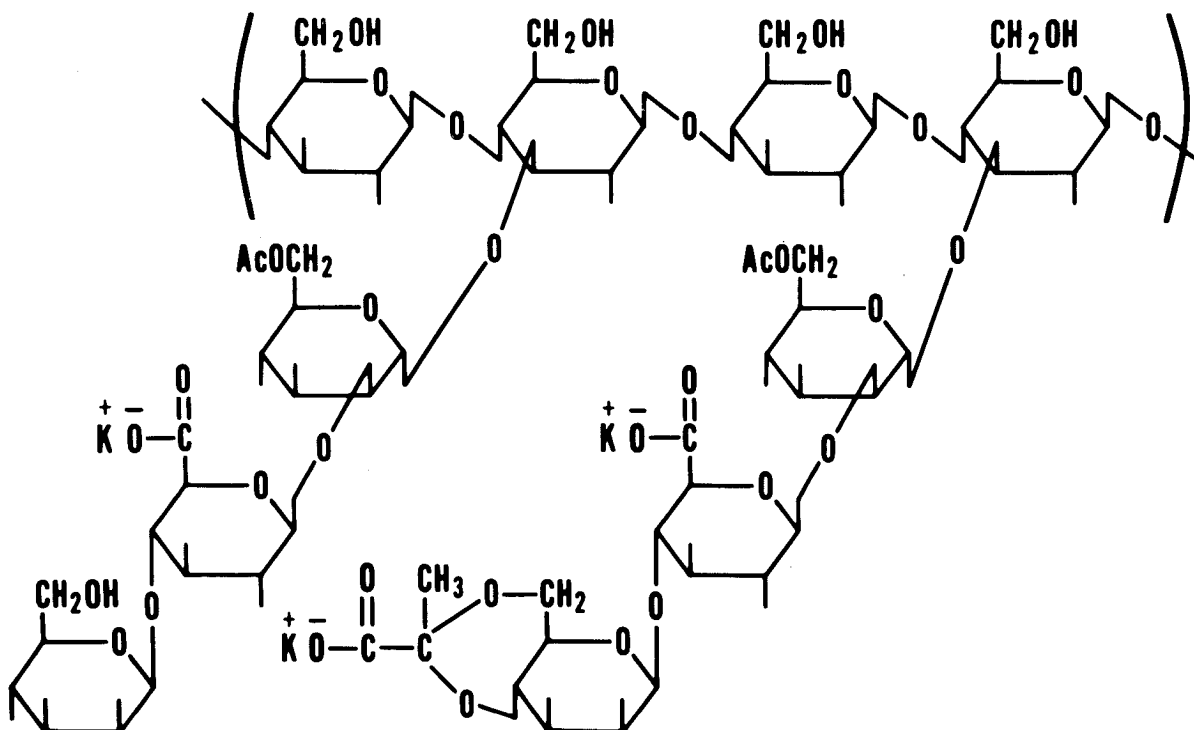


Abb. 1: Aufbau des Xanthans

Die für die Biosynthese des Xanthans notwendigen Bausteine werden in der Regel aus dem Glucosestoffwechsel zur Verfügung gestellt. Untersuchungen zum Glucose-Metabolismus bei X. campestris ergaben, daß der Kohlenstoff-Katabolismus mit dem von Pseudomonas aeruginosa vergleichbar ist (Whitfield et al. 1982), so daß sich zur Zeit das in Abb. 2 dargestellte Glucose-Abbauschema ergibt (Ng und Dawes 1973): Neben einer Gluconat-DH, die die Umsetzung von Gluconat zu 2-Oxogluconat katalysiert, besitzt X. campestris auch die zur weiteren Umsetzung von Gluconat und 2-Oxogluconat zu 6-P-Gluconat notwendigen Enzyme Gluconat-Kinase, 2-Oxogluconat-Kinase und 2-Oxogluconat-Reductase. Überraschenderweise war jedoch eine Glucose-DH, die bei P. aeruginosa die Glucose im Periplasma zu Gluconat umsetzt, lediglich bei einigen X. campestris-Mutanten, jedoch nicht im Wildtyp nachweisbar (Whitfield et al. 1982). Es ist bekannt, daß in Xanthomonas sp. der Abbau von Glucose in erster Linie über den Entner-Doudoroff-Weg erfolgt (Katznelson 1955, 1957); dagegen nimmt der in einigen Xanthomonas-Arten nachgewiesene Pentose-Phosphat-Weg eine untergeordnete Rolle ein (Zagallo und Wang 1967). Whitfield et al. (1982) zeigten, daß auch bei X. campestris der Glucose-Abbau über den Entner-Doudoroff-Weg erfolgt (Abb. 2), doch konnte bisher die Beteiligung des Pentose-Phosphat-Weges am Substrat-Abbau in X. campestris nicht nachgewiesen werden (Whitfield 1979).

In Analogie zur Zellwandsynthese setzt die Synthese des Xanthans zunächst die intrazelluläre Bereitstellung entsprechender Zuckernucleotide voraus. Für die Bildung der an der Xanthansynthese beteiligten aktivierten Zucker UDP-Glucose, UDP-Glucuronsäure und GDP-Mannose kann der in Abb. 3 dargestellte Weg angenommen werden (Whitfield 1979): Glucose-6-P wird entweder mittels Phosphoglucoseisomerase zu Fructose-6-P oder über Phosphoglucomutase zu Glucose-1-P umgesetzt. Während Fructose-6-P über mehrere enzymatische Umsetzungen den für die Xanthanbiosynthese notwendigen aktivierten Zucker GDP-Mannose liefert, wird UDP-Glucose direkt aus Glucose-1-P gebildet; das dazu notwendige Enzym ist UDP-Glucose-Pyrophosphorylase. Die für die weitere Umsetzung von UDP-Glucose zu

UDP-Glucuronsäure notwendige UDP-Glucose-DH konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, obwohl die UDP-Glucuronsäure im Zuckernucleotid-"pool" von X. campestris enthalten war (Whitfield 1979).

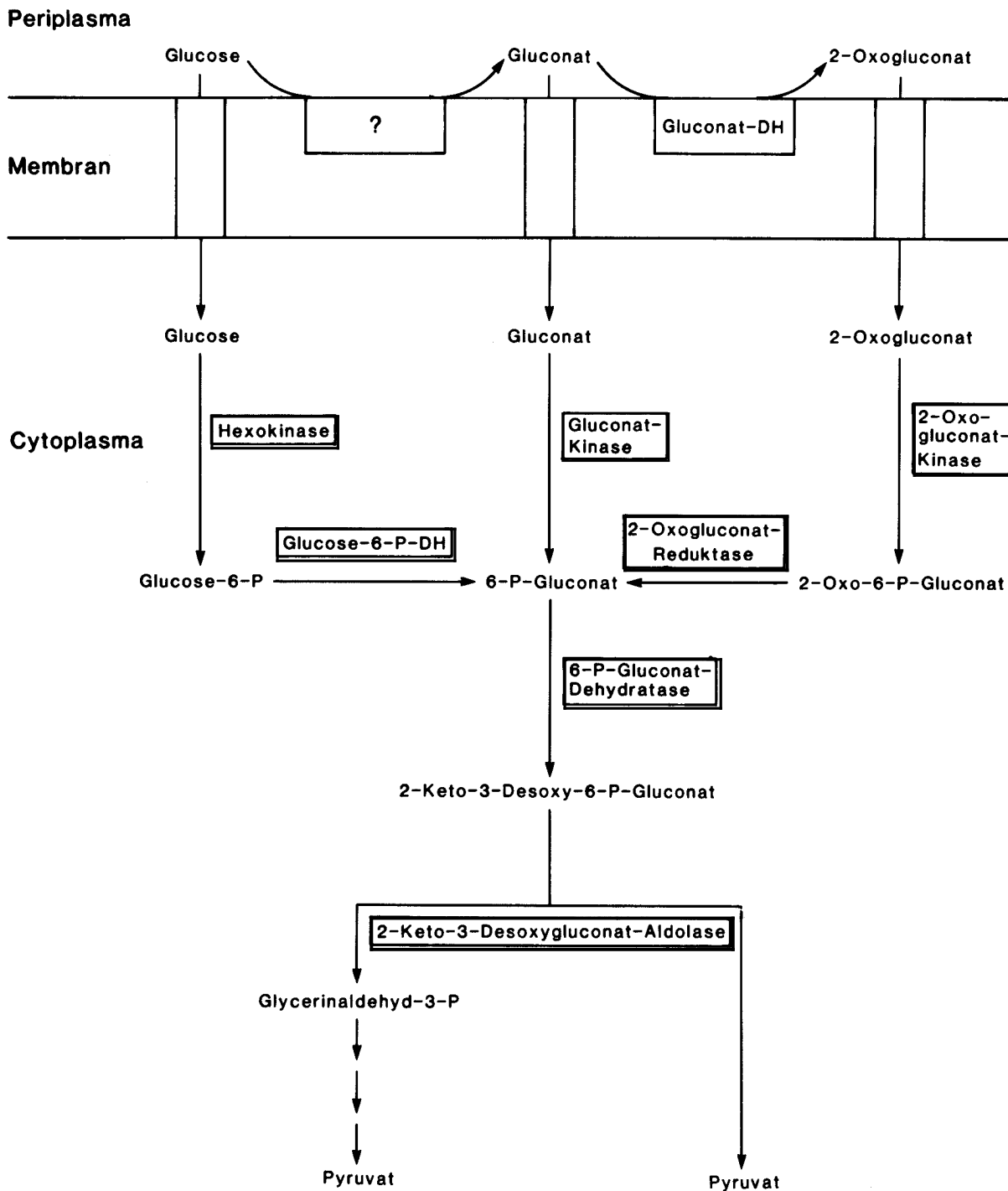


Abb. 2: Glucose-Katabolismus bei X. campestris

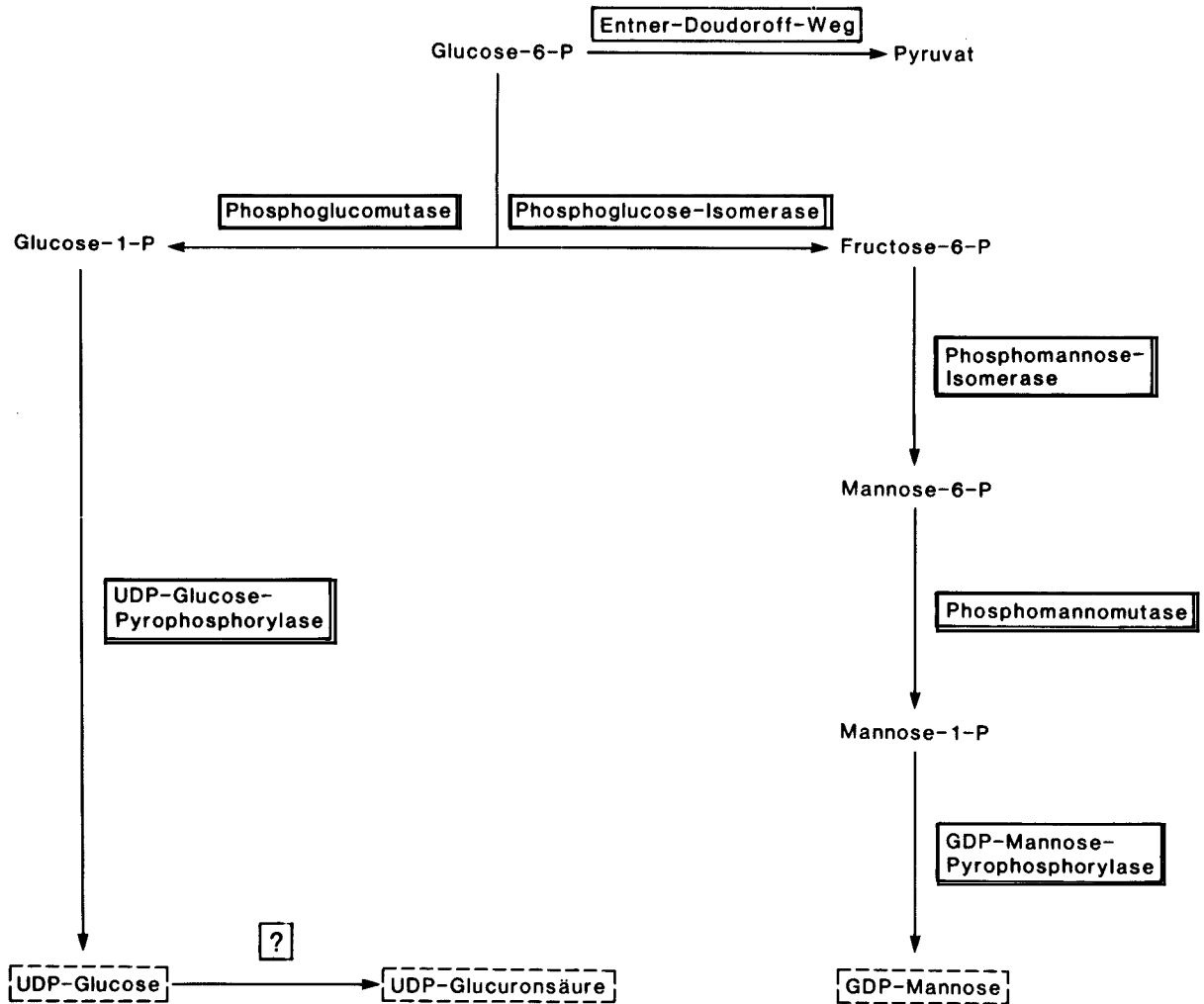


Abb. 3: Bildung der für die Xanthansynthese notwendigen Zuckernucleotide

Die nächsten Schritte im Xanthanbiosyntheseweg finden an der Cytoplasmamembran statt und sind in Abb. 4 dargestellt (Sutherland 1985): Die aktivierten Zucker (UDP-Glucose, GDP-Mannose und UDP-Glucuronsäure) übertragen ihren Zuckeranteil auf einen Lipid-Akzeptor, so daß ein Pentasaccharid-Pyrophosphat-Lipid gebildet wird (Ielpi et al. 1981a). Der Donor für den im Xanthan enthaltenen Pyruvatrest ist Phosphoenolpyruvat (Ielpi et al. 1981b); die Acetylierung erfolgt über Acetyl-CoA, wobei noch nicht geklärt ist, ob das Tri-, Tetra- oder Pentasaccharid-PP-Lipid der "physiologische Akzeptor" ist (Ielpi et al. 1983). Die gebildeten Pentasaccharid-Einheiten

Zur Regulation der Xanthanbiosynthese wurde - aufgrund der vor allem bei den Enterobakterien gewonnenen Erkenntnisse zur Polysaccharidsynthese - das in Abb. 5 dargestellte Modell entwickelt (Sutherland 1977).

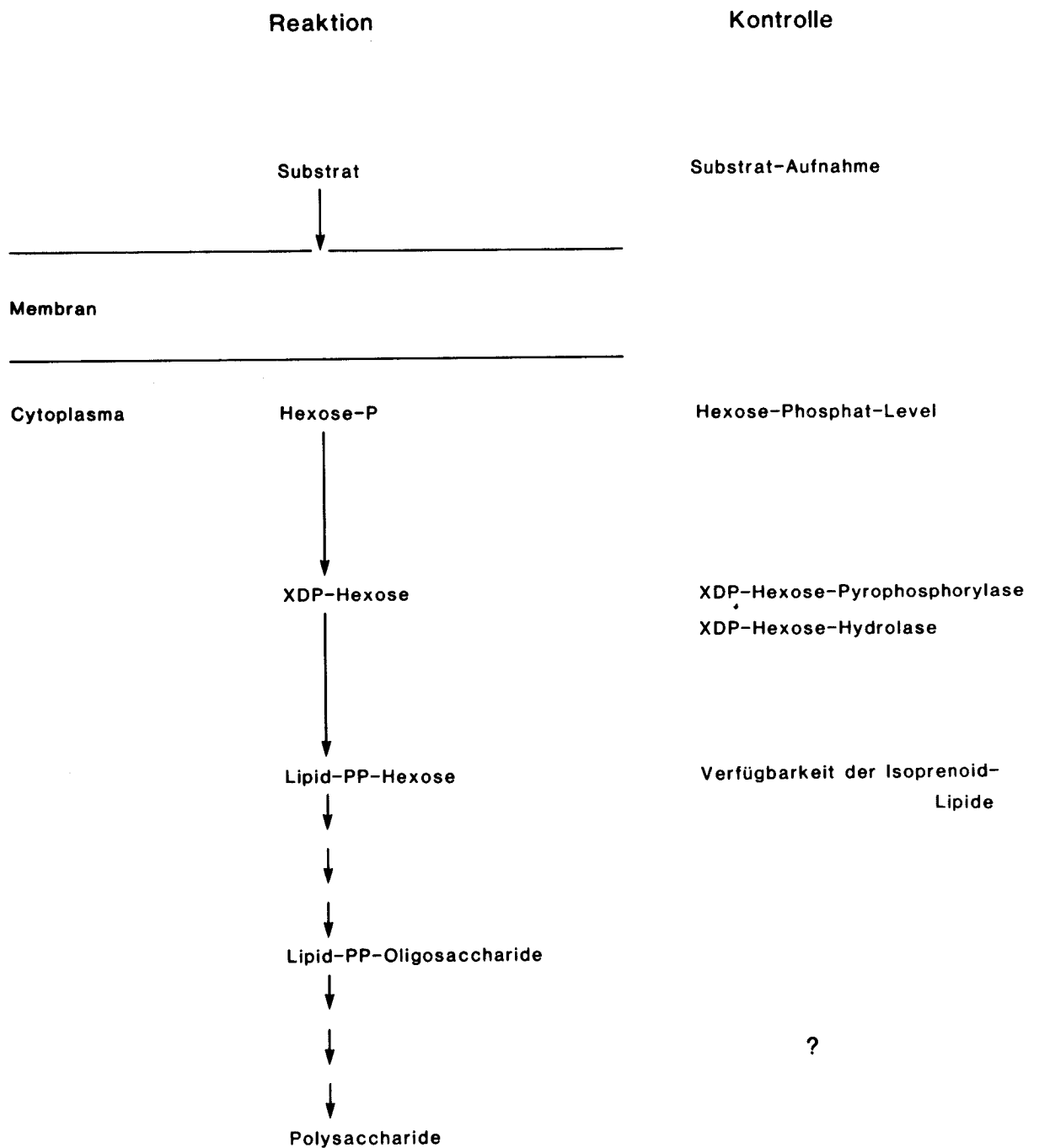
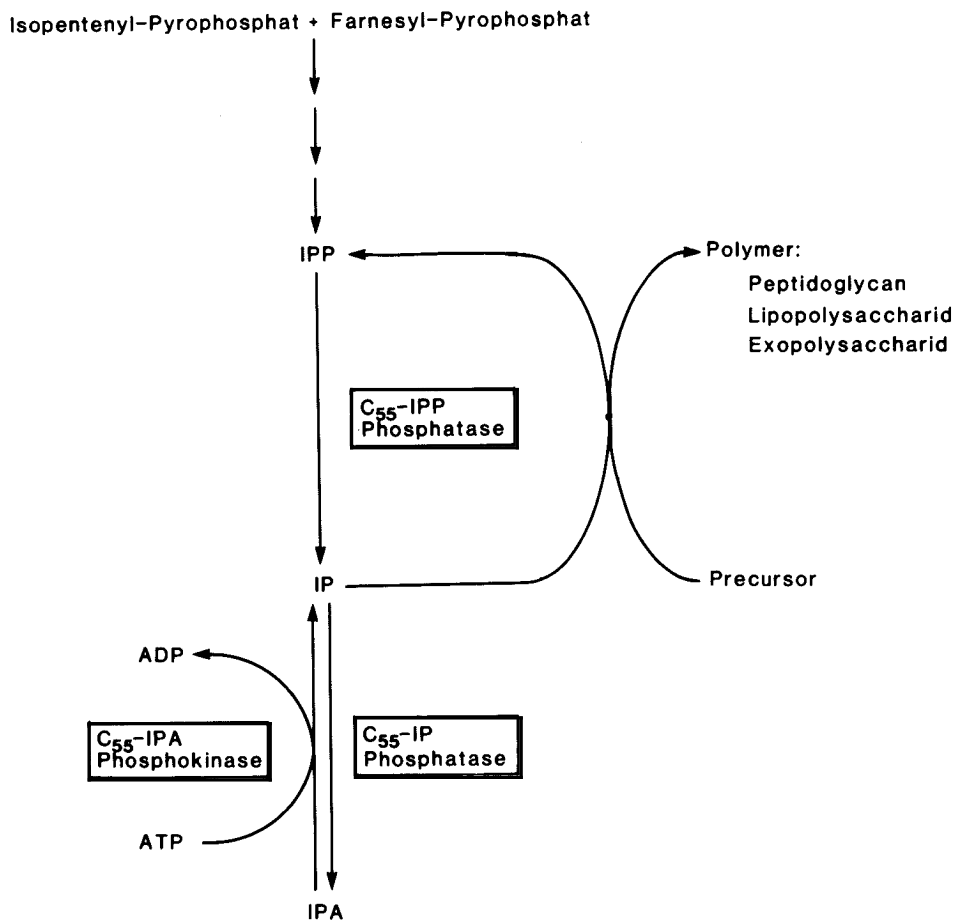


Abb. 5: Theoretische Möglichkeiten zur Kontrolle der Polysaccharidsynthesen bei X. campestris

Für die Xanthansynthese gibt es nur bezüglich der Regulation des Zuckernucleotid-pools über spezifische Hydrolasen einige Hinweise: Es wird vermutet, daß bei X. oryzae nachgewiesene alkalische Phosphatasen an der Regulation des Zuckernucleotid-pools beteiligt sind und erhöhte Phosphatase-Aktivitäten in Mutanten zu einer verminderten Exopolysaccharidbildung geführt haben (Chu und Tseng 1981, 1984; Tseng et al. 1983).



IPP: C ₅₅ -Isoprenyl-Pyrophosphat	{	metabolisch aktiv
IP: C ₅₅ -Isoprenyl-Phosphat		
IPA: C ₅₅ -Isoprenoid-Alkohol		metabolisch inaktiv

Abb. 6: Modell zur Regulation der Carrier-Lipide

Unter den weiteren Kontrollmöglichkeiten wird der Regulation und Verfügbarkeit der Isoprenoid-Lipide eine besondere Bedeutung beigemessen, da Lipid-Akzeptoren sowohl für die Zellwand- und Lipopolysaccharidsynthese als auch für die Exopolysaccharidsynthese benötigt werden. Zur Regulation der Isoprenoid-Lipide selbst (Abb. 6) wird angenommen, daß nach der Polymerisation der Vorstufen zum Makromolekül die frei gewordenen Carrier-Lipide (Isoprenyl-Pyrophosphat, IPP) mit Hilfe einer spezifischen Phosphatase für einen neuen Synthesecyclus bereitgestellt (Isoprenyl-Phosphat, IP) oder weiter in eine metabolisch inaktive Form (Isoprenoid-Alkohol, IPA) überführt werden; eine Umsetzung in die metabolisch wieder aktive Form erfolgt vermutlich über eine spezifische Phosphokinase (Sutherland 1979).

Es werden weiterhin Prioritäten in der Verfügbarkeit der Carrier-Lipide vermutet: in wachsenden Zellen hätte die Peptidoglycansynthese Vorrang vor der Lipopolysaccharidsynthese und diese wiederum Vorrang vor der Exopolysaccharidsynthese, während in der stationären Phase die Carrier-Lipide vorwiegend für die Exopolysaccharidbildung zur Verfügung stünden (Norval und Sutherland 1969, Sutherland 1977).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst, Mutanten mit veränderter Xanthanbildung zu bekommen. Darüber hinaus war es das Ziel, Kulturbedingungen zu finden, unter denen die Xanthanbildung verändert ist, um Untersuchungen zum Glucose-Metabolismus durchführen zu können.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Organismus

Für diese Arbeit wurde Xanthomonas campestris NRRL B-1459 verwendet. Es handelt sich um ein gelbpigmentiertes, gram-negatives, polar begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium, das zur Familie der Pseudomonadaceae gehört und aerob wächst (Bradbury 1984).

2. Chemikalien

Außer den aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Amersham Buchler, Braunschweig:

D-(U-¹⁴C)Glucose

Boehringer, Mannheim:

Adenosin-5'-Diphosphat, Dinatriumsalz

Adenosin-5'-Monophosphat, Dinatriumsalz

Adenosin-5'-Triphosphat, Dinatriumsalz

Ampicillin, Natriumsalz

Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3)

Fructose-6-Phosphat, Dinatriumsalz

Gluconat-Kinase (EC 2.7.1.12)

Gluconat-6-Phosphat, Trinatriumsalz

Glucose-1,6-Diphosphat, Tetracyclohexylammoniumsalz

Glucose-1-Phosphat, Dikaliumsalz

Glucose-6-Phosphat, Dinatriumsalz

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)

Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase/Triose-Phosphat-Isomerase (EC 1.1.1.8/EC 5.3.1.1)

Glycogen aus Kaninchenleber

Guanosin-5'-Diphospho-Mannose, Dikaliumsalz

Hexokinase (EC 2.7.1.1)

Maltoheptaose

Maltohexaose
 Maltopentaose
 Maltotetraose
 Maltotriose
 Myokinase (EC 2.7.4.3)
 β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
 β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, Dinatriumsalz
 β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert),
 Tetranatriumsalz
 Phosphoenolpyruvat, Kaliumsalz
 Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1)
 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.44)
 Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40)
 Restriktionsendonuclease Eco RI (EC 3.1.23.13)
 Ribonuclease (EC 3.1.27.5)
 Ribose-5-Phosphat, Dinatriumsalz
 Uridin-5'-Diphospho-Glucose, Dinatriumsalz

Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA:

Bacto-Agar
 Bacto-Peptone
 Hefe-Extrakt
 Malz-Extrakt

Hoechst, Frankfurt:

Flavomycin(=Moenomycin)

Serva Feinbiochemica, Heidelberg:

DL-Äthionin
 Brenztraubensäure, Natriumsalz
 p-Fluorphenylalanin
 Glycogen aus Mollusken
 Glycylglycin
 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidin

Sigma Chemie, München:

L-Alanyl-L-Methionin
 Bacitracin
 Carbenicillin, Dinatriumsalz
 Cycloleucin
 (+)-Cystathionin
 D-Erythrose-4-Phosphat, Natriumsalz
 N-Formyl-DL-Methionin
 DL-Homocystein
 DL-Homoserin
 α -Keto- δ -Methiolbuttersäure, Natriumsalz
 Luciferin/Luciferase, lyophilisierter Rohextrakt FLE 50
 D-Methionin
 L-Methioninamid, Hydrochlorid
 DL-Methionin-Hydroxyanalog, Calciumsalz
 DL-Methionin-S-Methyl-Sulfoniumchlorid
 DL-Methionin-Sulfoxid
 L-Methionyl-L-Alanin
 α -Methyl-DL-Methionin
 Phosphomycin, Dinatriumsalz
 Pyrophosphat, Tetranatriumsalz
 Seleno-DL-Methionin

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

Komplexmedium (YM-Medium) zur Anzucht und Stammhaltung
(Jeanes et al. 1976).

Anzucht:	Hefe-Extrakt	3 g
	Malz-Extrakt	3 g
	Bacto-Pepton	5 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
Stammhaltung und YM-Platten zusätzlich:		
	Glucose x H ₂ O	10 g
	Bacto-Agar	20 g

Der pH wurde vor dem Autoklavieren mit 1N NaOH auf 7.0 eingestellt; Glucose wurde getrennt autoklaviert.

Mineralsalzmedium (modifiziert nach Davidson 1978).

Glucose x H ₂ O	25	g
KH ₂ PO ₄	5	g
NH ₄ Cl	1	g
Na ₂ SO ₄	0.66	g
Mg ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	0.20	g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0.03	g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.01	g
H ₃ BO ₃	6	mg
FeCl ₃ x 6H ₂ O	2.4	mg
Aqua dest.	ad 1000	ml

Für Mineralsalzmedium-Platten zusätzlich:

Bacto-Agar	20	g
------------	----	---

Der pH wurde vor dem Autoklavieren mit 3N NaOH auf 7.0 eingestellt; Glucose wurde getrennt autoklaviert.

Die Nährmedien und Glucose wurden 20 min bei 121°C im gespannten Dampf autoklaviert. Alle weiteren Substanzen wurden in der jeweils angegebenen Konzentration, das Methionin, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 2.7 mM (0.04 %) dem Medium nach dem Autoklavieren steril filtriert (Millipore-Sterilfilter, Porengröße 0.2 µm) zugegeben.

Stammhaltung

Stammkulturen wurden alle 2 Wochen auf frischem Schrägagar überimpft, 24 h bei 30°C inkubiert und anschließend bei +4°C aufbewahrt. Zusätzlich wurden in Abständen von 8 Wochen von Plattenausstrichen auf YM-Agarplatten, die 2 Tage bei 30°C inkubiert wurden, von den größten und schleimigsten Kolonien neue Schrägagarkulturen oder Lyophilisate angelegt (Kidby et al. 1977).

Kultivierung

Vorkulturen wurden mit Zellmaterial vom Schrägagarröhrchen oder mit lyophilisierten Zellen angeimpft. Alle Submers-Kulturen wurden in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 2 seitlichen

Schikanen und 100 ml Nährmedium auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 100 UpM und einer Temperatur von 30°C inkubiert. Als Impfmateriäl für das Mineralsalzmedium dienten 5 ml einer 2 x mit Saline (0.9 % NaCl) gewaschenen, 15 h in Komplexmedium angezogenen Vorkultur. Im Verlauf der Kultivierung in Mineralsalzmedium wurde der pH der Kulturen 2 x täglich bestimmt und gegebenenfalls mit steriler 1 N NaOH auf 6.5-7.0 nachgestellt. Dies gewährleistete einen vollständigen Verbrauch der zugesetzten Glucose.

4. Bestimmung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde entweder durch Trübungsmessung oder durch Bestimmung des Trockengewichts der Zellen verfolgt.

Die Trübungsmessung erfolgte mit einem Zeiss Spektralphotometer PM6 bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen Aqua dest. Lag die Extinktion der zu bestimmenden Proben höher als 0.5, wurde entsprechend mit Aqua dest. verdünnt.

Für die Trockengewichtsbestimmungen wurden die Kulturen je nach Viskosität 1:5 oder 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und anschließend 15-30 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Zellen wurden 2 x in Aqua dest. gewaschen, in wenig Aqua dest. resuspendiert, in Reagenzgläser übertragen, lyophilisiert und gewogen.

5. Nachweis von Methionin und Cycloleucin

Der Methionin- und Cycloleucin-Gehalt von Kulturfiltraten wurde mit einem Aminosäure-Analysator (LC 2000 der Firma Biotronik, Wissenschaftliche Geräte GmbH) bestimmt.

6. Mutagenese und Isolierung von Mutanten

6.1 Mutagenese

Zur Anzucht der Zellen für die Mutagenese wurden 5 ml einer 15 h gewachsenen Vorkultur in 100 ml frisches Komplexmedium übertragen und 5 h inkubiert; die Lebendkeimzahl betrug dann etwa 5×10^8 Zellen/ml Kultur. Zu diesen exponentiell wachsenden Zellen wurde pro ml Kultur 0.1 mg NMG - in 10 µl Dimethylformamid gelöst - gegeben. Nach 6 min Inkubation bei Raumtemperatur waren etwa 80-90 % der Zellen abgetötet. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, 2 x mit Saline gewaschen und in dem gleichen Volumen Saline aufgenommen wie an Kulturvolumen für die Mutagenese eingesetzt worden war. Die so hergestellten mutagenisierten Zellsuspensionen wurden vor dem Ausplattieren zunächst 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} sowie 5×10^{-4} , 5×10^{-5} und 5×10^{-6} verdünnt.

6.2 Isolation von Antibiotika-resistenten Mutanten

Die zur Mutantenselektion eingesetzten Antibiotika waren: Bacitracin, Moenomycin, Carbenicillin, Ampicillin und Phosphomycin. Die Bacitracin- und Moenomycinkonzentration in den Vollmediumplatten betrug jeweils 150 µg/ml Medium, die Carbenicillin-, Ampicillin- und Phosphomycinkonzentration jeweils 5 µg/ml Medium. Von den verdünnten mutagenisierten Zellsuspensionen wurden 0.1 ml auf YM-Agarplatten, die ein Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Als Kontrolle dienten 0.1 ml 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} verdünnte unbehandelte Zellsuspensionen, die auf YM-Agarplatten sowohl mit als auch ohne Antibiotikum ausplattiert wurden. Alle Platten wurden anschließend bei 30°C inkubiert. Auf den Kontrollplatten ohne Antibiotikum sowie auf den Bacitracin- und Moenomycin-Selektionsplatten waren bereits nach 2 Tagen, auf den restlichen Antibiotika-Mutanten-Platten erst nach 6-8 Tagen Kolonien gewachsen. Mutantenkolonien, die im Vergleich zu den gewachsenen Wildstammkolonien offensichtlich einen größeren Schleimhof gebildet hatten, wurden auf Schrägagarröhrchen abgeimpft.

6.3 Isolation von Methionin-auxotrophen Mutanten

Mutagenisierte Zellsuspensionen wurden in den angegebenen Verdünnungen zunächst auf Vollmediumplatten ausplattiert. Die nach 2 Tagen bei 30°C gewachsenen Kolonien wurden anschließend auf Mineralsalzmedium-Platten jeweils mit und ohne 2.7 mM Methionin überstempelt und weitere 6 Tage inkubiert. Die als Methionin-auxotroph identifizierten Mutanten wurden anschließend auf YM-Agarplatten isoliert, nochmals 2 Tage bei 30°C inkubiert und ein zweites Mal überstempelt. Die bestätigten auxotrophen Mutanten wurden schließlich auf Schräg-agarröhrchen übertragen.

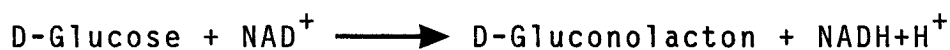
7. Plasmidnachweis

Der Plasmidnachweis erfolgte nach der in Maniatis et al. (1982) angegebenen Vorschrift (modifiziert nach Birnboim und Doly 1979). Als Kontrolle dienten E. coli-Stämme mit und ohne Plasmid sowie das bereits isolierte Plasmid pBR 322 (Boehringer, Mannheim). Ein Teil der von X. campestris hergestellten Präparate wurden zusätzlich 5-fach konzentriert. Die Verdauung wurde mit Restriktionsenzym Eco R I durchgeführt. Die Agarose-Gel-Elektrophorese (mit 0.7 % Agarose) erfolgte bei 80 V über 3 h; die Gele wurden anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt.

8. Bestimmung von Kohlenhydraten

8.1 Glucosenachweis

Glucosebestimmungen wurden mit Glucose-DH ("System Glucose", Firma Merck) durchgeführt. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Glucose nach der Gleichung:



Zusatz von Mutarotase beschleunigt den Reaktionsverlauf.

Reaktionslösung:

1 Fl. Enzymgemisch (Glucose-DH/Mutarotase)

+ 170 mg NAD

+ 170 ml 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.6.

Durchführung:

0.1 ml Probe (1-10 µg Glucose) wurde mit 1 ml Reaktionslösung vermischt und 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion gegen einen Leerwert ohne Glucose bei 340 nm bestimmt. Die zur Berechnung der Konzentration verwendete Eichgerade - mit einer Glucose-Lösung (10-100 µg Glucose/ml Aqua dest.) erstellt - verlief für $0.03 < \Delta E_{340} < 0.3$ linear.

Für die Bestimmung der Glucose im Kulturfiltrat wurden die entnommenen Kulturproben je nach Viskosität 1:2, 1:5 oder 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, 20 min bei 32.000 g zentrifugiert und die Überstände bis zum Tag der Messung eingefroren.

8.2 Xanthan-Bestimmungen

Der Xanthangehalt von Kulturen wurde mit 2 unterschiedlichen Methoden bestimmt, wobei die gravimetrische Methode als Endwertbestimmung (nach Verbrauch der Glucose) benutzt wurde, und mit dem Anthrontest die Xanthanbildung im Verlauf der Fermentation verfolgt wurde.

8.2.1 Gravimetrische Bestimmungsmethode

(modifiziert nach Moraine und Rogovin 1966)

Zur gravimetrischen Bestimmung wurden 10 g Kultur mit 40 g einer 1.25 %-igen KCl-Lösung verdünnt, 15 min verrührt und anschließend 20 min bei 17.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Rühren auf 60°C erhitzt und das Xanthan mit 100 ml 2-Propanol (reinst), das dem Überstand innerhalb von 5 min portionsweise zugegeben wurde, ausgefällt, auf einem getrockneten, gewogenen Papierfilter (Ø 55 mm, Schleicher & Schüll) über Vakuum abfiltriert und mit 2 x 40 ml 2-Propanol

nachgewaschen. Die Proben wurden 24 h im Trockenschrank bei 110°C getrocknet, im Exsikkator über Kieselgel abgekühlt und dann gewogen.

8.2.2 Nachweis mit Anthron

Die Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeiten geerntet, je nach Viskosität 1:5 oder 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und 15-30 min bei 10.000 g zentrifugiert. Je 10 ml der so erhaltenen Kulturfiltrate wurden - um freie Rest-Glucose zu entfernen - gegen Aqua dest. ca. 12 h dialysiert. Zur Bestätigung, daß unter diesen Bedingungen jegliche freie Glucose entfernt wurde, diente das Xanthan "Rhonopol 23" (Rhone-Poulenc, Frankreich) mit internem Glucose-Standard.

Der Xanthangehalt der Proben wurde anschließend mit Anthron nach einer Vorschrift von Herbert et al. (1971) bestimmt. Nach dieser Methode werden Polysaccharide durch Kochen in Säure hydrolysiert und die Monomere in Furfurale überführt, die durch Kondensation mit Anthron gefärbt werden.

Reaktionslösung:

200 mg Anthron
+ 5 ml Ethanol (absolut)
+ 95 ml 75 %-ige H_2SO_4 .

Durchführung:

0.5 ml eiskalte Probe (10-100 µg Xanthan) wurden mit 2.5 ml eiskalter Anthronlösung in eisgekühlten Gläsern gut vermischt, 10 min gekocht und im Eisbad abgekühlt. Bei Raumtemperatur wurden die Proben noch einmal gemischt und die Extinktion bei 625 nm bestimmt. Die Eichgerade - mit Rhonopol 23 (20-200 µg/ml Aqua dest.) erstellt - verlief für $0.08 < \Delta E_{625} < 0.8$ linear.

8.2.3 Viskositätsbestimmung

Für die Viskositätsbestimmung wurde 150 mg NaCl in 15 ml Kultur gelöst und die Viskosität mit dem Haake-Viskosimeter RV 3 bestimmt: Die Testsubstanz befindet sich in einem Rotor-Stator-System; der Rotor läuft mit definierter Drehfrequenz, wobei das dazu erforderliche Drehmoment ein Maß für die Viskosität der Testsubstanz ist.

Das zeitlineare Drehfrequenz-Programm war auf $50 \times \text{min}^{-2}$ eingestellt.

Berechnung der Viskosität:

$$\eta = \frac{G \times S}{n} \quad (\text{mPa} \cdot \text{s})$$

G = Gerätekonstante ($\text{mPa} \cdot \text{s} \cdot \text{Skt}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

für Meßkopf 50: $28.85 \text{ mPa} \cdot \text{s} \cdot \text{Skt}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

für Meßkopf 500: $297.30 \text{ mPa} \cdot \text{s} \cdot \text{Skt}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

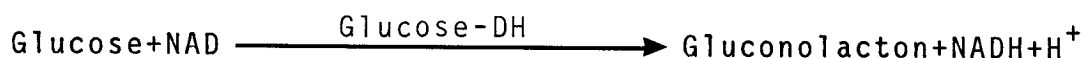
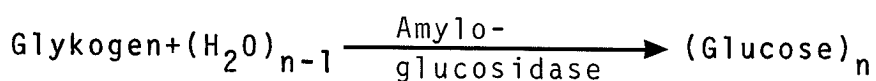
S = Skalenteile (Skt)

n = Umdrehungszahl (min^{-1})

Die Skalenteile wurden den Fließkurven, die mit einem x-y-Schreiber aufgenommen wurden, bei $n = 64 \text{ UpM}$ entnommen.

8.3 Nachweis von Glykogen

Das Glykogen wurde nach Schimz und Overhoff (1986) extrahiert und mit Amyloglucosidase nach der Methode von Keppler und Decker (1974) nach dem folgenden Prinzip nachgewiesen:



Dazu wurden 2 mg getrocknete Bakterienzellen und als Kontrollproben je 1 mg Kaninchenleber- und Mollusken-Glykogen pro ml 0.6 N HClO_4 mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier B15 der Firma Branson Sonic Power Co. Danbarg, Con.

USA) 10 min bei maximaler Leistung unter Eiskühlung kontinuierlich beschallt und anschließend mit 2 M NaHCO₃ neutralisiert. Je 0.5 ml Neutralisat wurde mit 2 ml 0.5 M Na-Acetat-Puffer pH 4.8 versetzt; davon wurde je 1 ml als Leerwert-Probe entnommen und je 1 ml mit 0.5 ml Amyloglucosidase-Lösung (27 mg Enzym(160 U)/ml 0.5 M Na-Acetat-Puffer pH 4.8) vermischt. Die Amyloglucosidase-Ansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert. Alle Proben wurden anschließend mit 2 M NaKPO₄ pH 6.8 vermischt (0.5 ml/ml Probe), 20 min gekocht, im Eisbad abgekühlt und 10 min in einer Eppendorf-Zentrifuge bei ca. 12.000 g zentrifugiert. Der Glucose-Gehalt im Überstand wurde nach der unter 8.1 beschriebenen Methode bestimmt und der Glykogen-Gehalt der Zellen nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\frac{\Delta E_{340}}{\epsilon} \times \frac{MG}{\text{mg TZ/ml BA}} = \frac{\mu\text{g Glykogen}}{\text{mg TZ}}$$

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm
 = 6.22 (cm² x μmol^{-1})

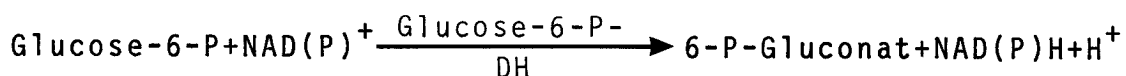
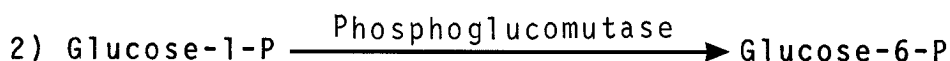
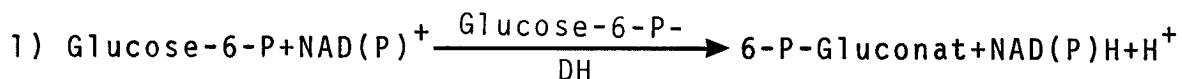
MG = Molekulargewicht der Anhydroglucose
 = 162 (g x mol⁻¹)

BA = Bestimmungsansatz

TZ = Trockenzellen

8.4 Bestimmung von Glucose-6-P und Glucose-1-P

Der Glucose-6-P- und Glucose-1-P-Gehalt der Zellen wurde in Perchlorsäure-Extrakten (siehe 10.) nach den folgenden Reaktionsabläufen bestimmt (modifiziert nach Ng und Dawes 1973 sowie Bergmeyer et al. 1974):



Die Zunahme der Extinktion wurde bei 340 nm gemessen.

Durchführung:

Der Bestimmungsansatz setzte sich zusammen aus:

			Konz. im Test
0.695 ml	50 mM	Gomori's Tris-Maleat-Puffer (GTM) pH 6.8	35 mM
0.600 ml		HClO ₄ -Extrakt	
0.100 ml	30 mM	NAD in GTM	3 mM
0.050 ml	100 mM	MgCl ₂ in GTM	5 mM
0.050 ml	1 mM	Glucose-1,6-diP in GTM	0.05 mM

Die Reaktion (1) wurde durch Zugabe von 2.5 µl Glucose-6-P-DH (1100 U/ml) gestartet; nach Ablauf der Reaktion wurde nach Zugabe von 5 µl Phosphoglucomutase (400 U/ml) zum gleichen Bestimmungsansatz der Glucose-1-P-Gehalt bestimmt (Reaktion 2).

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach der Gleichung:

$$c = \frac{\Delta E_{340}}{\epsilon} \times \frac{V}{v} \times F \text{ (}\mu\text{mol/ml Kultur)}$$

V = Testvolumen (ml)

v = Probevolumen (ml)

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm
= 6.22 (cm² x µmol⁻¹)

F = Verdünnungsfaktor

8.5 Analysen zur Charakterisierung der niedermolekularen Zuckerbestandteile

Probenvorbereitung:

Nach Verbrauch der Glucose wurden die hoch-viskosen Kulturen 1:10 verdünnt und anschließend 20 min bei 17.000 g zentrifugiert. Die Überstände (Kulturfiltrate) wurden zum Teil ultrafiltriert (PM10-Membran, Amicon), um das Xanthan abzutrennen und die Ultrafiltrate zum Teil mit einem Rotationsverdampfer bei 30°C über Wasserstrahlvakuum um das ca. 7-fache konzentriert.

8.5.1 Gelpermeationschromatographie mit Fractogel

Die Trennung von Kohlenhydrat-Bestandteilen in Kulturfiltraten erfolgte über eine Fractogel TSK HW-55(S)-Säule, die Trennung in Ultrafiltraten über eine Fractogel TSK HW-40(S)-Säule (Hamacher und Sahn 1985).

Trennbedingungen:

Fractogel	<u>TSK HW</u>	
	<u>55(S)</u>	<u>40(S)</u>
Proben:	Kulturfiltrat	Ultrafiltrat
Verdünnung	1:10	1:10
aufgetragenes Vol. (ml)	5	5
Säule:		
Durchmesser (cm)	3	2.5
Länge (cm)	228	196
Trennbereich (g/mol)	1000 - 500000	100 - 10000
Puffer:	je 50 mM Na-Sulfat/Na-Acetat + 0.02 % Na-Acid, pH 7.3	
Temperatur (°C)	40	60
Durchflußrate (ml/h)	75	60
Druck (bar)	1.0	0.8
Detektion:		
Reagenz:	Orcin/H ₂ SO ₄	
Durchflußrate (ml/h)	60	60
Mischungsverhältnis		
Säuleneluent/Reagenz	15/60	15/60
Reaktionstemperatur (°C)	ca. 100	ca. 100
Reaktionscoil (Teflon):		
Durchmesser (mm)	2.45	2.45
Länge (m)	2	2
Photometer:	Beckmann TV 40	Zeiss PM 2 K
Durchflußküvette:		
Schichtdicke (cm)	1	1
Volumen (µl)	ca. 70	ca. 70
Wellenlänge (nm)	420	420
Schreiber:	Servogor 220	Phillips PM8202
Empfindlichkeit (V)	0.5	0.5

Vorschub (cm/h)	3	3
Fraktionierung:		
Vol./Röhrchen (ml)		3
min/Röhrchen		4
Fraktionszahl		180

Retentionszeiten der Vergleichssubstanzen (h)

(vgl. auch Abb. 7):

Glucose (M_1)	11.9
Cellobiose (M_2)	11.1
Maltotriose (M_3)	10.6
Maltotetraose (M_4)	10.1
Maltopentaose (M_5)	9.7
Maltohexaose (M_6)	9.4
Maltoheptaose (M_7)	9.2

Reagenzzusammensetzung:

- 0.93 l Aqua dest.
- + 2.50 l 96 %-ige H_2SO_4 in der Kälte gemischt
- + 4.00 g Orcin.

Quantifizierung:

Der aus Abb. 7 ermittelte Durchschnittswert der 7 peak-Flächen betrug 8.25 cm^2 , so daß 500 μg Zucker einer Fläche von 8.25 cm^2 entsprechen.

8.5.2 Dünnschichtchromatographie

Die Zuckerbestandteile im 7-fach konzentrierten Ultrafiltrat wurden zusätzlich durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Dazu wurden je 40 μl Probe (20-50 μg Zucker) und je 10 μl der Referenzzucker (je 10 μg) auf eine Kieselgel-60-Fertigplatte (0.25 mm) mit Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel dienten 100 ml eines Gemisches von Chloroform/Methanol/Aqua dest. im Verhältnis 55:45:10 mit 0.02 % $CaCl_2 \times 2H_2O$ (nach der von Serolab GmbH, Aidenbach, herausgegebenen Laboranleitung "Ganglioside").

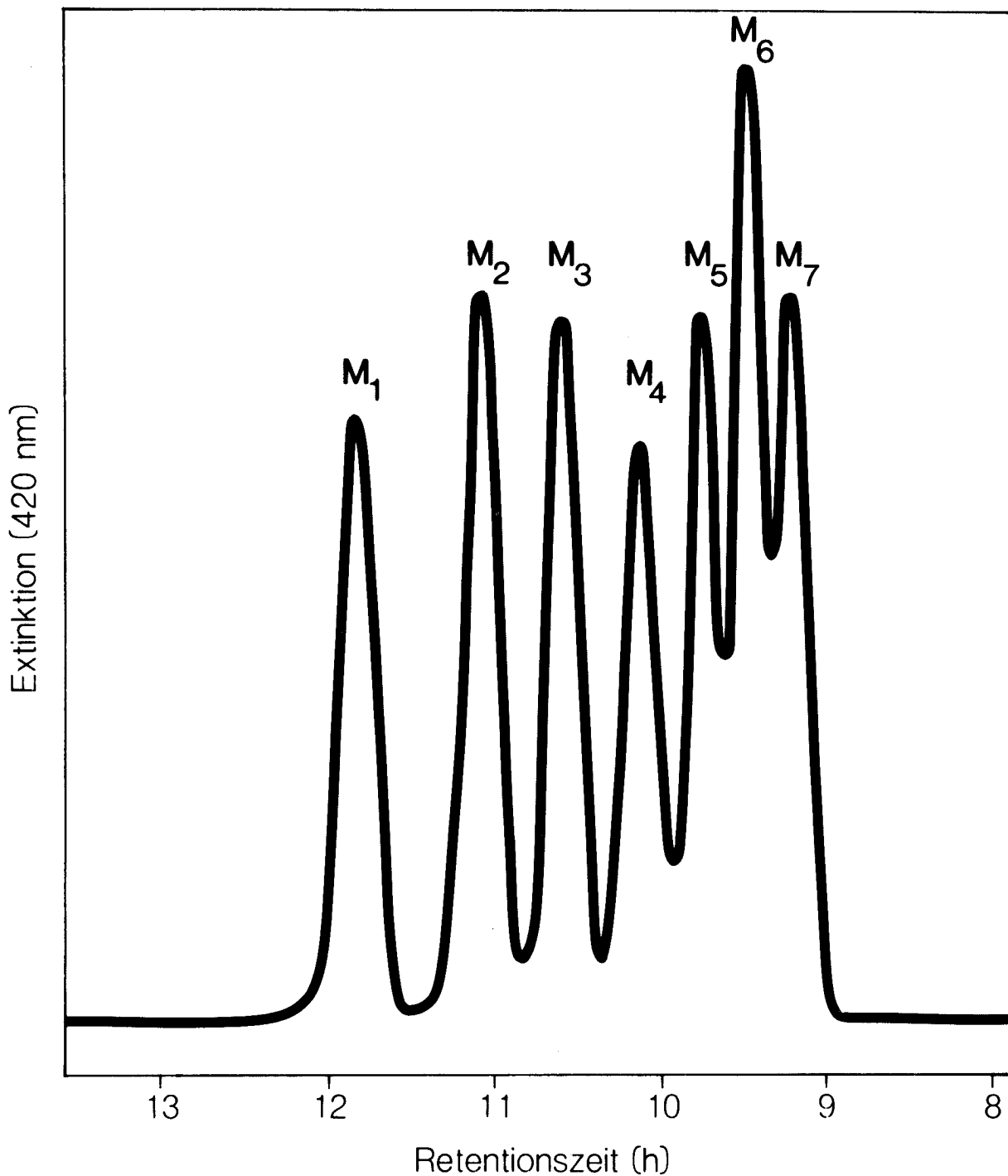


Abb. 7: Gelchromatographische Trennung von Maltooligomeren
(je 500 µg) mit Fractogel TSK HW-40(S)

Nach 2 x 2 h Laufzeit wurden die Platten getrocknet, mit H_2SO_4 besprüht (Lehle und Tanner 1974) und in einem Trockenschrank 15 min bei 110°C entwickelt.

8.5.3 Borat-Komplex-Chromatographie mit Anionenaustauscher

Die Auftrennungen von Zuckern in Boratform erfolgten nach Khym und Zill (1951) mit den Biotronik-Geräten LC 2000 und ZA 5100. Für die Auftrennung der Zuckerbestandteile in den nach Gelfiltration mit TSK HW-40(S) gesammelten Fraktionen (8.5.1) mußten diese zunächst entsalzt und konzentriert werden: Dazu wurde das in den Fraktionen enthaltene Sulfat (50 mM) mit 500 mM Ba-Acetat (Verhältnis: 10 Teile Fraktion + 1 Teil Ba-Acetat) bei 40-50°C ausgefällt und über Polycarbonat-Membran-Filter (Bio-Rad, München) über Vakuum abfiltriert. Die Na- und Ba-Ionen wurden durch Kationenaustausch mit Dowex 50 WX-8 (Serva, Heidelberg) und Aqua dest. als Eluent aus den Proben entfernt, die Essigsäure anschließend durch Lyophilisieren entzogen. Die Lyophilisate wurden in 3 ml Aqua dest. wieder aufgenommen und der pH zum Teil mit 0.2 N NaOH auf 7.0 eingestellt.

Der Nachweis der Zucker erfolgte durch das Reagenz

1. Kupfer-Bicinchoninat, mit dem reduzierende Zucker nachgewiesen und Zuckeroligomere nicht gespalten werden. Bei der Reaktion wird das Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert, das mit Bicinchoninat einen Farbkomplex bildet, der bei 570 nm gemessen wird.

Reagenzzusammensetzung:

- a) 414 g K_2CO_3
+ ca. 1500 ml Aqua dest.

- b) 5 g K_2CO_3
+ 3.7 g Asparaginsäure
+ 100 ml Aqua dest.

+ 1 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Diese Lösung wird der K_2CO_3 -Lösung ad 1800 ml mit Aqua dest. zugemischt.

- c) 2 g Na-Bicinchoninat
+ 200 ml Aqua dest.

Diese Lösung wird ebenfalls dem K_2CO_3 -Puffer zugegeben.

2. Orcin/ H_2SO_4 , mit dem Furanbildner nachgewiesen und Zucker-oligomere hydrolysiert werden. Die dabei gebildeten Farbkomplexe werden bei 420 nm gemessen.

Reagenzzusammensetzung: 3.75 g Orcin
+ 2.5 l 96 %-ige H_2SO_4

Trennbedingungen:

Reagenz:	<u>Orcin/H_2SO_4</u>	<u>Cu^{2+}/Bicinchoninat</u>
----------	---	--

aufgetragenes

Probenvolumen (μl)	300	500
---------------------------------	-----	-----

Säule:

Durchmesser (cm)	0.6	0.6
------------------	-----	-----

Länge (cm)	30	30
------------	----	----

Trennharz

Durrum

DA-X-8-11

DA-X-4-20

Puffer:

Elution	1 h:	0.2 M K-Borat pH 8.15
---------	------	-----------------------

	+ 2 h:	0.4 M K-Borat pH 9.45
--	--------	-----------------------

	+ 2 h:	1.0 M K-Borat pH 10.0
--	--------	-----------------------

Äquilibrierung	0.75 h:	0.1 M K-Borat pH 8.0
----------------	---------	----------------------

Regenerierung	0.75 h:	10 % K-Tetraborat x $4\text{H}_2\text{O}$
---------------	---------	---

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	60	60
-----------------------------------	----	----

Durchflußrate (ml/h)	60	60
----------------------	----	----

Detektion:

Durchflußrate (ml/h)	70	70
----------------------	----	----

Mischungsverhältnis

Eluent/Reagenz	1/1.1	1/1
----------------	-------	-----

Reaktionstemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	100	100
--	-----	-----

Reaktionscoil:

Durchmesser (mm)	0.7	0.7
------------------	-----	-----

Länge (m)	20	20
-----------	----	----

Wellenlänge (nm)	420	570
------------------	-----	-----

Retentionszeiten der Vergleichssubstanzen (diese gelten sowohl für Orcin/H₂SO₄ als auch für Cu²⁺/Bicinchoninat als Nachweisreagenz):

Substanz:	Retentionszeit (h)	
	ohne NaCl (vor Hydrolyse)	mit 2 M NaCl (nach Hydrolyse)
Cellobiose	0.8	0.8
Ribose	1.4	1.3
Mannose	1.6	1.5
Arabinose	1.8	1.6
Galactose	1.9	1.7
Xylose	2.1	1.8
Glucose	2.6	2.0
Galacturonsäure	4.6	3.6
Glucuronsäure	5.6	5.5

8.5.4 Hydrolyse-Bedingungen

8.5.4.1 Chemische Hydrolyse

Die Totalhydrolyse von Zuckerbestandteilen erfolgte durch Kochen in 2 N HCl. Dazu wurde 1 Teil Probe mit 1 Teil 4 N HCl in der Kälte gemischt, 1 h gekocht, in Eis gekühlt und anschließend mit 190 mg NaHCO₃/ml Hydrolysat neutralisiert.

8.5.4.2 Enzymatische Hydrolysen

Weitere Versuche zur Charakterisierung niedermolekularer Zuckerbestandteile erfolgten durch Einwirkung verschiedener Enzyme auf ultrafiltrierte Proben nach den von Schimz ausgearbeiteten Vorschriften (unveröffentlicht).

a) Hydrolyse durch Amyloglucosidase

Die Proben wurden zunächst mit 6 M Essigsäure auf pH 4.8 eingestellt und 10 mg Enzym (60 U) in 1 ml 0.2 M Na-Acetat-Puffer pH 4.8 gelöst. Probe und Enzymlösung wurden so vermischt, daß die Enzymkonzentration im Hydrolyseansatz

1 mg/ml betrug. Nach 1 h und 2 h Inkubation bei 37°C wurde den Hydrolysaten je 0.4 ml 2 M Tris-HCl-Puffer pH 7.0 pro ml zugesetzt, die Ansätze 15 min gekocht, anschließend 15 min in einer Laborzentrifuge zentrifugiert und die Zuckeranteile im Überstand mittels Zuckeranalysatoren identifiziert.

Die Durchführung der Hydrolysen mit Cellulase und Xanthanase erfolgten wie beschrieben; jeweilige Abweichungen sind unter b) und c) angegeben.

b) Hydrolyse durch Cellulase mittels 'Rohenzym' von Trichoderma viride

(erhalten von der GBF, Braunschweig)

Es wurden 1 mg Rohenzym/ml Na-Acetat-Puffer pH 4.8 gelöst; der Hydrolyseansatz mit 0.1 mg Rohenzym/ml wurde bei 50°C inkubiert.

c) Hydrolyse mit Xanthanase-haltigem Kulturfiltrat

Die Proben wurden mit 6 M Essigsäure, das Xanthanase-haltige Kulturfiltrat mit 0.2 M Na-Acetat-Puffer pH 4.8 auf pH 5.4 eingestellt. Der Hydrolyseansatz mit 0.1 ml Kulturfiltrat/ml wurde bei 42°C inkubiert.

9. Erstellung der Kohlenstoffbilanz

Die C-Bilanz wurde mit Hilfe ^{14}C -markierter Glucose in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 2 seitlichen Schikanen und einer zusätzlich angebrachten Seitenöffnung durchgeführt. Die Seitenöffnung wurde mit einem Schraubverschluß, der ein Septum zur Probeentnahme enthielt, verschlossen.

Je 25 μl einer ^{14}C -Glucose-Lösung (7.4 MBq/ml in Ethanol) wurden vor Zugabe des Mediums und der gewaschenen Zellen in den Kolben im Vakuum getrocknet, um das Ethanol zu entfernen.

$^{14}\text{CO}_2$ wurde in 2 ml 6 N NaOH, das 2 x täglich erneuert wurde, abgefangen. Die NaOH lag in einem Gefäß vor, das am Verschlußstopfen des Schüttelkolbens befestigt war. Die Kulturen wurden

2 x täglich mit Luft begast und das dabei zusätzlich frei werdende $^{14}\text{CO}_2$ in 2 ml 3 N NaOH geleitet. Alle NaOH-Proben wurden 1:6 bzw. 1:3 mit Aqua dest. verdünnt, so daß die Endkonzentration 1 N NaOH betrug.

Nach Verbrauch der Glucose wurden die Proben wie folgt aufbereitet:

Die hoch-viskosen Kulturen wurden 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, 25 min bei 17.000 g zentrifugiert und die Zellen wie beschrieben (siehe 4.) weiterbehandelt, jedoch zusätzlich 1 x mit 0.1 M kalter Glucose gewaschen, um unspezifisch gebundene ^{14}C -Glucose zu verdrängen. Die Überstände wurden jeweils zur Hälfte ultrafiltriert (PM 10-Membran, Amicon), das Xanthan 1 x mit 0.1 M kalter Glucose und 2 x mit Aqua dest. gewaschen und im gleichen Volumen wieder in Aqua dest. aufgenommen.

Zur Bestimmung von ^{14}C in Zellen wurden diese nach Beendigung des Wachstums geerntet und mit 1 N NaOH aufgeschlossen (Herbert et al. 1971), indem 20 mg Trockenzellen in 10 ml 1 N NaOH bzw. 10 mg Trockenzellen in 5 ml 1 N NaOH aufgenommen und 15 min gekocht wurden.

Die Radioaktivität aller Proben wurde mit einem Scintillations-Zähler (Tri-Carb Liquid Scintillation System, Model 4530, Packard Instruments, Frankfurt) bestimmt. Unterschiedliche Mengen (≤ 1 ml) der in NaOH bzw. Aqua dest. gelösten Proben wurden entsprechend - d.h. mit 1 N NaOH oder mit Aqua dest. - auf 1 ml aufgefüllt und 1:2 mit Aqua dest. (NaOH-Proben) bzw. 1:2 mit 1 N NaOH (Aqua dest.-Proben) verdünnt sowie mit jeweils 10 ml Insta-Gel (Packard) vermischt.

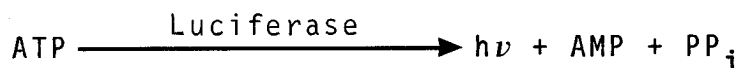
Mit entsprechenden nicht-radioaktiv markierten Proben, die ^{14}C -Glucose als internen Standard enthielten, wurde der "quench" bzw. die "efficiency" (Ausbeute an counts/min) bestimmt. Die durchschnittlichen dpm-(desintegrations per minute)-Werte der einzelnen Proben wurden jeweils auf 1 ml Kultur bezogen und der prozentuale Anteil an eingesetzter ^{14}C -Glucose ermittelt.

10. Bestimmung des Adenosin-Nucleotid-Gehaltes in Zellen

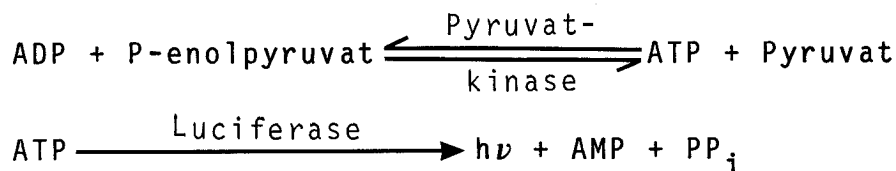
(nach Spielmann et al. 1981 und Schimz et al. 1981)

Der Adenosin-Nucleotid-(AXP)-Gehalt der Zellen wurde mit Luciferin/Luciferase über Licht-Emissions-Bestimmung nach den folgenden Reaktionsabläufen ermittelt:

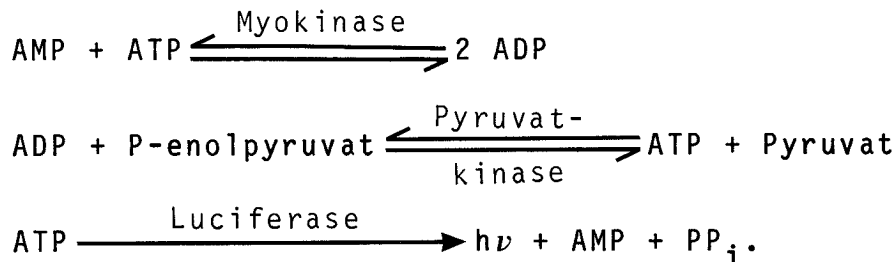
1. ATP-Bestimmung:



2. ADP-Bestimmung:



3. AMP-Bestimmung:



Probenvorbereitung:

5 ml frische Kultur wurden mit 5 ml eiskalter 35 %-iger (v/v) HClO_4 gut vermischt, für 15 min ins Eisbad gestellt, danach bei Raumtemperatur mit 15 ml 2 M KHCO_3 neutralisiert und anschließend 20 min bei 11.000 g abzentrifugiert. Bei hoher Viskosität der Kulturen wurde nach dem Neutralisieren zusätzlich 1:2 mit Aqua dest. verdünnt. Die Überstände (HClO_4 -Extrakte) wurden bis zum Tag der Bestimmung bei -18°C aufbewahrt.

Reaktionslösungen:

Puffer: 50 mM Tris- H_2SO_4 -Puffer pH 7.4

+ 3.5 mM MgSO_4

 $+ 2.5 \text{ mM } \text{K}_2\text{SO}_4$

+ 0.6 mM EDTA

PEP (P-enolpyruvat)-Reagenz:

0.5 M MgSO_4

+ 1.8 M KCl in Puffer gelöst

kurz vor Gebrauch wurden 10 mg PEP/1.5 ml Reagenz gelöst und im Eisbad aufbewahrt.

AXP-Lösungen:

je 1 mM in Aqua dest. gelöst

aufbewahrt bei -18°C

kurz vor Gebrauch 1:10 und 1:20 verdünnt.

Luciferin/Luciferase-Lösung:

10 mg lyophilisierter Rohextrakt FLE 50/ml Aqua dest.

Myokinase: 720 U/ml

Pyruvatkinase: 400 U/ml

Durchführung:

Die Reaktionsansätze wurden nach dem folgenden Pipettier-Schema hergestellt:

Bestimmung von:	ATP			ADP+ATP			AMP+ADP+ATP		
Probenbezeichnung:	T0	T1	T2	D0	D1	D2	M0	M1	M2
PEP-Reagenz:				je 100 µl					
HClO ₄ -Extrakt:				je 500 µl					

Interne Standards

(μ1):

ATP _{1:10}	-	10	-	-	-	-	-	-
ATP _{1:20}	-	-	10	-	-	-	-	-
ADP _{1:10}	-	-	-	-	10	-	-	-
ADP _{1:20}	-	-	-	-	-	10	-	-
AMP _{1:10}	-	-	-	-	-	-	10	-
AMP _{1:20}	-	-	-	-	-	-	-	10

Puffer (µl)	500	490	490	490	480	480	480	470	470
Myokinase (µl) +	-	-	-	-	-	-	10	10	10
Pyruvatkinase (µl)	-	-	-	-	-	-	10	10	10
Pyruvatkinase (µl)	-	-	-	10	10	10	-	-	-
Inkubation bei									
Raumtemperatur	0 min			20 min			45 min		

Die Licht-Emission wurde in den ersten 4 sec nach Injektion an einem Biolumineszenz-Analysator (XP 2000, Skan AG Basel, Schweiz) als "counts" bestimmt. Der Bestimmungsansatz setzte sich zusammen aus:

0.25 ml Luciferin/Luciferase
 2.15 ml Puffer
 0.50 ml Reaktionsansatz
 Σ 2.90 ml Bestimmungsansatz

Berechnungen:

Zur internen Standardisierung wurde von den 4 sec-counts der Proben mit internem Standard die Werte der entsprechenden Proben ohne Standard abgezogen (T1-T0, T2-T0, D1-D0 usw.) = Δ 4 sec-counts. Der für 1 nmol AXP/ml Bestimmungsansatz erhaltene 4 sec-count-Wert

$$\epsilon_x = \frac{4 \text{ sec-counts}}{\text{nmol AXP}}$$

wurde zur Berechnung der AXP-Konzentrationen verwendet.

Zur Bestimmung des AXP-Gehaltes der Proben wurden zunächst die 4 sec-counts des Leerwertes (HClO₄-Extrakt ohne Kultur) von denen der entsprechenden übrigen Proben abgezogen (= Δ T0, Δ D0, Δ M0) und der Nucleotid-Gehalt wie folgt berechnet:

ATP-Gehalt:

$$\frac{\Delta T0(4 \text{ sec-counts})}{\epsilon_T} = \text{nmol ATP/ml Bestimmungsansatz}$$

ADP-Gehalt:

$$\frac{\Delta D0 - \Delta T0(4 \text{ sec-counts})}{\epsilon_D} = \text{nmol ADP/ml Bestimmungsansatz}$$

AMP-Gehalt:

$$\frac{\Delta M0 - \Delta D0(4 \text{ sec-counts})}{\epsilon_M} = \text{nmol AMP/ml Bestimmungsansatz.}$$

Zur Bestimmung des AXP-Gehaltes pro ml Kultur bzw. pro mg Trockengewicht wurde mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren multipliziert.

11. Herstellung von Rohextrakten

Bakterienkulturen, die in Mineralsalzmedium gewachsen waren, wurden zu unterschiedlichen Zeiten durch Zentrifugation (30 min bei 17.000 g und 5°C) geernet. Bei hoher Viskosität der Kulturen wurde zuvor 1:5 oder 1:10 mit 0.1 M K-Phosphat-Puffer pH 7.1 verdünnt. Nach zweimaligem Waschen in 0.1 M K-Phosphat-Puffer pH 7.1 wurden die Zellen in jeweils 8 ml 60 mM Glycylglycin-Puffer pH 7.1 resuspendiert und mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier B 15, Branson Sonic Power Co. Danburg, Con. USA) 10 min bei maximaler Leistung (konisches Microhorn, output $7 \hat{=} 105$ W) diskontinuierlich unter Eiskühlung beschallt. Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (20 min bei 18.000 g und 5°C) abgetrennt und die Überstände (Rohextrakte) für die Bestimmung von Enzymaktivitäten (siehe 13.) verwendet.

12. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in Rohextrakten wurde nach der Methode von Bensadoun und Weinstein (1976) bestimmt.

Reaktionslösung (Kupfer-Tartrat-Reagenz):

1 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ in 0.1 N NaOH und

2 % Na-K-Tartrat in 0.1 N NaOH

wurden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:2 vermischt. Von diesem Gemisch wurde 1 ml zu 50 ml

2 % Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH gegeben.

Durchführung:

1 ml Proteinlösung (5-50 μg Protein) wurde mit 10 μl 1.5 % Na-Desoxycholat 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden mit 0.2 ml 36 % Trichloressigsäure gefällt und 10 min in einer Eppendorf-Zentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml Kupfer-Tartrat-Reagenz aufgenommen und mit 0.1 ml Folin-Reagenz (1:2 mit Aqua dest. verdünnt) vermischt. Nach 45 min Inkubation im Dunkeln wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin (5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 60 mM Glycylglycin-Puffer (pH 7.1) erstellt und verlief für $0.09 < \Delta E_{660} < 0.6$ linear.

13. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt

Die Messungen erfolgten bei 30°C in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Reaktionen wurden - wenn nicht anders angegeben - durch Zugabe von Substrat gestartet und die Zunahme bzw. Abnahme der Extinktion bei 340 nm gemessen. Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe eines Kompensationsschreibers (Servogor 210).

Die spezifischen Aktivitäten wurden als U/mg Protein berechnet, wobei eine Enzymeinheit (U) 1 μmol umgesetztes Substrat/min entspricht. Zur Berechnung wurde für NAD(P)H ein Extinktionskoeffizient ϵ von $6.22 \text{ (cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1})$ verwendet.

13.1 Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.47) (modifiziert nach Ng und Dawes 1973)

13.1.1 NADP-abhängige Reaktion

			Konz.im Test
0.5	ml	80 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.2	40 mM
0.1	ml	700 mM D-Glucose	70 mM
0.05	ml	200 mM MgCl ₂	10 mM
0.05	ml	20 mM NADP	1 mM
x	ml	Rohextrakt	
0.3-x	ml	Aqua dest.	

13.1.2 NAD-abhängige Reaktion

			Konz.im Test
0.5	ml	80 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.2	40 mM
0.15	ml	1000 mM D-Glucose	150 mM
0.05	ml	200 mM MgCl ₂	10 mM
0.20	ml	60 mM NAD	12 mM
x	ml	Rohextrakt	
0.1-x	ml	Aqua dest.	

13.1.3 Diskontinuierlicher Test zum Nachweis der Glucose-DH (Gluconat-Nachweis) (modifiziert nach Möllering und Bergmeyer 1974)

Testansatz:			Konz.im Test
0.5	ml	80 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.2	40 mM
0.1	ml	700 mM D-Glucose	70 mM
0.05	ml	200 mM MgCl ₂	10 mM
0.05	ml	20 mM NADP	1 mM
0.05	ml	Rohextrakt	
0.25	ml	Aqua dest.	

Nach 20 min Inkubation bei 30°C wurde der Reaktionsansatz 10 min gekocht und 5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge bei ca. 12.000 g zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Gluconat wurde wie folgt bestimmt:

Bestimmungssatz:			Konz.im Test
0.5 ml	80 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.2		40 mM
0.05 ml	200 mM MgCl ₂		10 mM
0.05 ml	40 mM ATP pH 7.0		2 mM
0.05 ml	20 mM NADP		1 mM
5 µl	6-P-Gluconat-DH		1.2 U
x ml	Überstand		
0.335-x ml	Aqua dest.		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.01 ml Gluconat-Kinase (1 U/ml Bestimmungsansatz) gestartet.

13.2 Hexokinase (EC 2.7.1.1)

(modifiziert nach Ng und Dawes 1973)

Die Bestimmung der Hexokinase erfolgte mit Hilfe eines diskontinuierlichen Tests, da während eines kontinuierlichen Tests sowohl die Hexokinase- als auch die Glucose-DH-Reaktion erfaßt wurde.

Testansatz:		Konz.im Test
x ml	Rohextrakt	
0.55-x ml	80 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.2	bis 44 mM
0.10 ml	700 mM D-Glucose	70 mM
0.05 ml	200 mM MgCl ₂	10 mM
0.05 ml	200 mM ATP pH 7.0	10 mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Rohextrakt gestartet, der Testansatz 20 min bei 30°C inkubiert, 10 min gekocht und 10 min in einer Eppendorf-Zentrifuge bei ca. 12.000 g zentrifugiert. Der Glucose-6-P-Gehalt im Überstand wurde mittels Glucose-6-P-DH bestimmt.

Bestimmungssatz:		Konz.im Test
x ml	Überstand	
0.75-x ml	80 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.2	bis 60 mM
0.05 ml	20 mM NADP	1 mM
0.20 ml	Aqua dest.	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.5 µl Glucose-6-P-DH (1.75 U/ml Bestimmungsansatz) gestartet.

13.3 6-P-Gluconat-DH (EC 1.1.1.44)

(Bergmeyer et al. 1974)

		Konz.im Test
0.25 ml	200 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.6	50 mM
0.20 ml	100 mM Gluconat-6-P	20 mM
0.10 ml	200 mM MgCl ₂	20 mM
0.05 ml	30 mM NAD	1.5 mM
x ml	Rohextrakt	
0.4-x ml	Aqua dest.	

13.4 Glucose-6-P-DH (EC 1.1.1.49)

(Ng und Dawes 1973)

		Konz.im Test
0.5 ml	100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8.6	50 mM
0.1 ml	50 mM Glucose-6-P	5 mM
0.05 ml	300 mM MgCl ₂	15 mM
0.05 ml	30 mM NADP/NAD	1.5 mM
x ml	Rohextrakt	
0.3-x ml	Aqua dest.	

13.5 Isocitrat-DH

13.5.1 NADP-abhängige Isocitrat-DH (EC 1.1.1.42)

(Ng und Dawes 1973)

		Konz.im Test
0.5 ml	80 mM Glycylglycin-Puffer pH 8.8	40 mM
0.05 ml	40 mM DL-Isocitrat	2 mM
0.1 ml	200 mM MgCl ₂	20 mM
0.05 ml	30 mM NADP	1.5 mM
x ml	Rohextrakt	
0.3-x ml	Aqua dest.	

13.5.2 NAD-abhängige Isocitrat-DH (EC 1.1.1.41)
(modifiziert nach Plaut 1969)

		Konz.im Test
0.50 ml	80 mM Glycylglycin-Puffer pH 8.8	40 mM
0.05 ml	40 mM DL-Isocitrat	2 mM
0.10 ml	200 mM MgCl ₂	20 mM
0.05 ml	30 mM NAD	1.5 mM
0.05 ml	100 mM ADP pH 7.0	5 mM
x ml	Rohextrakt	
0.25-x ml	Aqua dest.	

13.6 Transaldolase (EC 2.2.1.2)
(Brand 1974)

		Konz.im Test
0.500 ml	200 mM Triäthanolamin-Puffer pH 7.6	100 mM
mit	20 mM EDTA	10 mM
0.075 ml	100 mM Fructose-6-P	7.5 mM
0.025 ml	10 mM Erythrose-4-P	0.25 mM
0.020 ml	10 mM NADH	0.20 mM
1.250 µl	GDH/TIM*	0.4/12.5 U
x ml	Rohextrakt	
0.38-x ml	Aqua dest.	

13.7 Transketolase (EC 2.2.1.1)
(modifiziert nach Brin 1974)

		Konz.im Test
0.500 ml	200 mM Triäthanolamin-Puffer pH 7.6	100 mM
mit	20 mM EDTA	10 mM
0.050 ml	100 mM Ribose-5-P	5 mM
0.050 ml	10 mM Xylulose-5-P	0.5 mM
0.075 ml	200 mM MgCl ₂	15 mM
0.025 ml	10 mM Thiaminpyrophosphat	0.25 mM
0.020 ml	10 mM NADH	0.2 mM
1.25 µl	GDH/TIM*	0.4/12.5 U
x ml	Rohextrakt	
0.28-x ml	Aqua dest.	

* Gemisch aus Glycerin-P-DH (GDH) und Triose-P-Isomerase (TIM)

13.8 Phosphoglucose-Isomerase (EC 5.3.1.9)

(Bergmeyer et al. 1974)

			Konz.im Test
0.5	ml	200 mM Triäthanolamin-Puffer pH 7.6	100 mM
0.1	ml	100 mM Fructose-6-P	14 mM
0.05	ml	200 mM MgCl ₂	10 mM
0.05	ml	30 mM NADP	1.5 mM
5	µl	Glucose-6-P-DH	3.5 U
x	ml	Rohextrakt	
0.295-x	ml	Aqua dest.	

13.9 Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1)

(modifiziert nach Bergmeyer et al. 1974 und Najjar 1955)

			Konz.im Test
0.5	ml	200 mM Triäthanolamin-Puffer pH 7.6	100 mM
0.015	ml	70 mM Glucose-1-P	1 mM
0.025	ml	200 mM MgCl ₂	5 mM
0.025	ml	30 mM NADP	0.75 mM
0.035	ml	1 mM Glucose-1,6-diP	0.035 mM
0.145	ml	140 mM Cystein pH 7.5	20.3 mM
5	µl	Glucose-6-P-DH	3.5 U
x	ml	Rohextrakt	
0.25-x	ml	Aqua dest.	

13.10 Bestimmung der Zucker-aktivierenden Enzyme

Zur Bestimmung der Zucker-aktivierenden Enzyme wurde der Rohextrakt zunächst über eine Sephadex G-25M-Säule (PD 10-Fertigsäule von Pharmacia, Freiburg) entsalzt.

13.10.1 GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.13)

(Munch-Petersen 1962)

			Konz.im Test
0.5	ml	100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.5	50 mM
0.05	ml	5 mM GDP-Mannose	0.25 mM
0.025	ml	200 mM $MgCl_2$	5 mM
0.025	ml	100 mM $Na_4P_2O_7$	2.5 mM
0.020	ml	3 mM ADP pH 7.0	0.06 mM
0.030	ml	70 mM D-Glucose	2 mM
0.1	ml	50 mM Na-Fluorid	5 mM
0.05	ml	30 mM NADP	1.5 mM
2.5	μ l	Hexokinase	3.5 U
2.5	μ l	Glucose-6-P-DH	1.75 U
x	ml	Rohextrakt (entsalzt)	
0.195-x	ml	Aqua dest.	

13.10.2 UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9)

(Bergmeyer et al. 1974)

			Konz.im Test
0.50	ml	200 mM Tris-HCl-Puffer pH 7.8	100 mM
0.15	ml	100 mM UDP-Glucose	15 mM
0.025	ml	200 mM $MgCl_2$	5 mM
0.025	ml	100 mM $Na_4P_2O_7$	2.5 mM
0.025	ml	30 mM NADP	0.75 mM
0.020	ml	3 mM Glucose-1,6-diP	0.06 mM
5	μ l	Phosphoglucomutase	2 U
5	μ l	Glucose-6-P-DH	3.5 U
x	ml	Rohextrakt (entsalzt)	
0.245-x	ml	Aqua dest.	

13.10.3 UDP-Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.22)

(Zalitis et al. 1972)

			Konz.im Test
0.1	ml	1000 mM Glycylglycin-Puffer pH 8.7	100 mM
0.05	ml	100 mM UDP-Glucose	5 mM
0.05	ml	30 mM NAD	1.5 mM
x	ml	Rohextrakt (entsalzt)	
0.8-x	ml	Aqua dest.	

III ERGEBNISSE

1. Mutanten mit veränderter Xanthanbildung

Das Ziel war, zunächst Mutanten mit erhöhter Xanthanbildung bzw. Mutanten, die Xanthan von höherer Viskosität bilden, zu erhalten.

Da die Xanthanbiosynthese einige auffallende Analogien zur Zellwandsynthese aufweist (z.B. bezüglich der Beteiligung eines Isoprenoid-Lipid-Carriers), wurden zur Isolation von Mutanten Antibiotika ausgewählt, von denen bekannt ist, daß sie die Zellwandsynthese beeinflussen. Zu diesen Antibiotika gehören:

- Bacitracin, das die Umsetzung von C_{55} -Isoprenyl-Pyrophosphat zu C_{55} -Isoprenyl-Phosphat hemmt (Storm 1974). So war bei Bacitracin-resistenten Klebsiella aerogenes-Mutanten die Exopolysaccharidbildung erhöht, was auf einen erhöhten Transfer von Glucose auf den Lipid-Carrier zurückgeführt wurde (Sutherland 1977).
- Moenomycin, das die C_{55} -Isoprenoid-Alkohol-Kinase hemmt (Sandermann 1976).
- Carbenicillin und Ampicillin, die als semisynthetische Penicilline während der Zellwandsynthese die Quervernetzung durch Transpeptidierung beeinträchtigen. Nach Einwirkung von Carbenicillin und anderen Penicillinen auf unterschiedliche Pseudomonas-Arten traten schleimbildende, resistente Varianten auf (Govan und Fyfe 1978, Govan et al. 1981).

Mit diesen Antibiotika sollten resistente X. campestris-Mutanten mit erhöhter Xanthanbildung selektioniert werden.

- Phosphomycin, das als Phosphoenolpyruvat-analoge Substanz die Pyruvyl-Transferase hemmt; dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von UDP-N-Acetylglucosamin und Phosphoenolpyruvat zu UDP-N-Acetylglucosamin-3-enolpyruvylether, das während der Synthese von UDP-N-Acetylmuraminsäure als Zwischenprodukt auftritt (Kahan et al. 1974).

Da Phosphoenolpyruvat die Vorstufe für das im Xanthan enthaltene Pyruvat ist und angenommen wird, daß Pyruvat die Viskosität beeinflusst (Sandford et al. 1977, 1978; Seeger 1981; Smith et al. 1981, 1984), könnten Phosphomycin-resistente Mutanten, die Xanthan mit erhöhtem Pyruvatanteil und damit von höherer Viskosität bilden, erwartet werden.

Um die Eignung dieser Antibiotika zur Selektion von X. campestris-Mutanten zu prüfen, wurde zunächst auf YM-Agarplatten die Konzentration ermittelt, bei der gerade kein Wachstum mehr erfolgt, indem unterschiedliche Antibiotikakonzentrationen (bis zu 500 µg/ml Medium) zugegeben wurden. Ampicillin, Carbenicillin und Phosphomycin hemmten das Wachstum in Konzentrationen von ≥ 5 µg/ml Medium (die Inkubationszeit betrug 14 Tage), wogegen Bacitracin (50-500 µg/ml) und Moenomycin (100-500 µg/ml) nur eine Wachstumsverzögerung um 2-3 Tage bewirkten: während auf den Kontrollplatten ohne Antibiotikum bereits nach 2 Tagen Kolonien gewachsen waren, traten auf den Bacitracin- und Moenomycin-Platten erst nach 4-5 Tagen Kolonien auf. Da berichtet worden ist, daß Bacitracin in Flüssigkultur die Xanthanausbeute beeinflusst (Holt 1978, Whitfield 1979) und eigene Experimente dies bestätigten (0.15 mg Bacitracin/ml Kultur führten bei vergleichbarem Wachstum anstelle von 8 g/l zu 3.5 g/l Xanthan), wurde auch Bacitracin zur Mutantenselektion eingesetzt.

1.1 Untersuchung von Antibiotika-resistenten Mutanten

Mutagenisierte Zellen wurden auf Antibiotika-haltigen YM-Agarplatten ausplattiert, die Moenomycin und Bacitracin in einer Konzentration von 150 µg/ml, Ampicillin, Carbenicillin und Phosphomycin in einer Konzentration von 5 µg/ml enthielten. Nach 2 Tagen waren nicht-mutagenisierte Zellen auf den Kontrollplatten (ohne Antibiotikum) normal gewachsen und zeigten die übliche hellgelbe Pigmentierung. Dagegen traten mit mutagenisierten Zellen nach 2 (auf Bacitracin- und Moenomycinplatten) bzw. 6-8 Tagen (auf den restlichen Antibiotika-Platten) Kolonien unterschiedlichster Größe auf (Abb. 8).

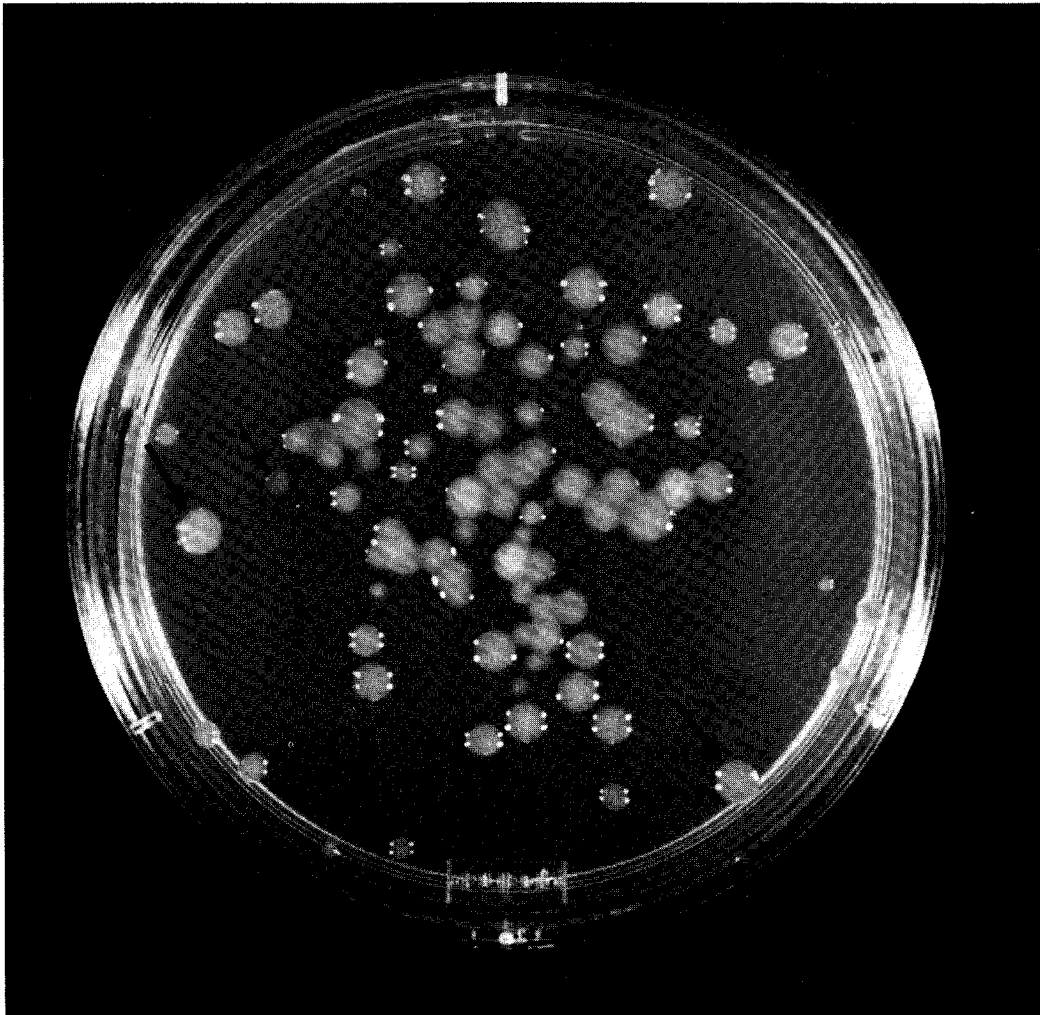


Abb. 8: Koloniemorphologie von X. campestris-Mutanten auf Bacitracin-haltigen Platten (150 µg/ml Medium) nach Einwirkung von NMG (→ Kolonieform vergleichbar mit der des Wildstammes; → orange gefärbte, kaum noch schleimbildende Mutante).

Neben Mutanten, deren Kolonieform mit der des Wildtyps vergleichbar war, zeigten sich auch solche, die dunkelgelb bis orange gefärbt waren und kaum noch Schleim bildeten.

Von allen 5 Plattentypen wurden insgesamt 56 Kolonien isoliert, die offensichtlich einen größeren Schleimhof gebildet hatten. Da während der Kultivierung in Mineralsalzmedium mit 0.3 % Pyruvat ein Nachstellen des pHs nicht erforderlich war, wurde dieses Medium zum Durchtesten der Mutanten verwendet, die hinsichtlich Wachstum, Xanthanausbeute und Viskosi-

tät geprüft wurden. Dabei zeigte sich, daß 6 Mutanten entweder bereits in der Vorkultur oder in der Hauptkultur nicht mehr wachstumsfähig waren. 49 Mutanten zeigten bezüglich der durchgetesteten Eigenschaften im Vergleich zum Wildtyp entweder keine Unterschiede, oder die Xanthanausbeuten und Viskositätswerte waren geringer als die beim Wildstamm bestimmten Werte; in diesen Fällen wurde die zugesetzte Glucose nicht verbraucht. Von einer Bacitracinplatte wurde eine als "B 21" bezeichnete Mutante isoliert, deren Wachstum um 2 Tage verzögert war und die eine geringere End-OD als der Wildstamm erreichte; doch war nach Verbrauch der Glucose die Xanthanausbeute mit der des Wildstammes vergleichbar und die Viskosität sogar um ca. 40 % erhöht (Tab. 1).

Diese veränderte Eigenschaft war in 2 folgenden Tests reproduzierbar, danach jedoch nicht mehr; auch mit (bereits nach dem ersten Test hergestellten) lyophilisierten Zellen waren keine erhöhten Viskositätswerte mehr erreichbar. Diese Instabilität ist auch für andere X. campestris-Stämme beschrieben: So isolierten Schwartz und Bodie (1985) einen X. campestris-Stamm, der mit 4 % Molke ein hoch viskoses Exopolysaccharid produzierte, diese Fähigkeit aber nach einiger Zeit verlor.

Tab. 1: Wachstum und Xanthanproduktion der Mutante B 21 in Mineralsalzmedium mit 0.3 % Pyruvat
Zu den angegebenen Inkubationszeiten war die zugesetzte Glucose (25 g/l) verbraucht.

Stamm	Wachstums- dauer (d)	End- OD ₆₀₀	Wachstums- rate (h ⁻¹)	Inkuba- tions- zeit (d)	Xanthan (g/l)	Viskosität (mPa x s)
Wildstamm						
(NRRL B-1459)	2	4.0	0.11	5	10.1	62.7
Mutante						
(B 21)	4	3.0	0.07	7	11.7	90.6

Einige Autoren beschreiben, daß bei der Kultivierung des Wildstammes auf YM-Agar häufig wenig schleimbildende Varianten auftraten, die dunkelgelb erschienen, wogegen die stärker schleimenden Kolonien des Wildstammes normalerweise hellgelb sind (Silman und Rogovin 1972, Cadmus et al. 1976). Diese Varianz scheint auch bei anderen Exopolysaccharid-bildenden Organismen verbreitet zu sein (Amemura et al. 1977, Hisamatsu et al. 1977). Da nachgewiesen wurde, daß bei Rhizobium meliloti die Exopolysaccharid-Gene Plasmid-gebunden sind (Finan et al. 1986), ebenso bei Streptococcus cremoris (Vedamuthu und Neville 1986) und in einigen Xanthomonas-Stämmen bereits Plasmide nachgewiesen werden konnten (Lin et al. 1979, Kado und Liu 1981, Civerolo 1985, Haas und Fett 1985), wurde X. campestris auf das Vorhandensein von Plasmiden untersucht. Dazu wurde eine Plasmid-Minipräparation (alkalische Lyse) von X. campestris durchgeführt. Nach Agarose-Gel-Elektrophorese der isolierten, mit Restriktionsenzym Eco R I verdauten DNA von X. campestris traten jedoch keine definierten Fragmente auf, so daß unter den verwendeten Versuchsbedingungen ein Plasmid nicht nachweisbar war.

2. Einfluß von Kulturbedingungen auf die Xanthanbildung

Da keine stabilen Mutanten mit veränderter Xanthanbildung erhalten werden konnten, wurde nach Kulturbedingungen gesucht, unter denen eine veränderte Xanthanbildung stattfindet.

2.1 Einfluß von Aminosäuren auf die Xanthanbildung

Viele Xanthomonas-Stämme benötigen zum Wachstum Methionin (0.02 %) und/oder Glutamat (0.1 %), zum Teil auch Nicotinsäure (100 µg/l) (Starr 1946, Guirard und Snell 1981, Chun und Alvarez 1983). Bei X. campestris erhöhte Glutamat in Konzentrationen bis zu 15 mM die Xanthanausbeuten, ohne das Wachstum nennenswert zu beeinflussen; erst Glutamat-Konzentrationen über 15 mM erhöhten die Zelldichte, während die Xanthanausbeuten abnahmen (Souw und Demain 1979).

Es sollte zunächst geklärt werden, inwieweit neben Glutamat auch andere L-Aminosäuren das Wachstum und die Xanthanbildung bei X. campestris beeinflussen. Die Aminosäuren wurden den Mineralsalzmedien steril filtriert vor dem Animpfen zugegeben, das Wachstum über die Zeit verfolgt und die Xanthanausbeuten nach Verbrauch der Glucose bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2: Wachstum und Xanthanausbeuten nach Zugabe verschiedener L-Aminosäuren

Die Aminosäuren wurden in einer Konzentration von jeweils 5 mM den Medien vor dem Animpfen zugegeben. Zu den angegebenen Inkubationszeiten war die zugesetzte Glucose (25 g/l) verbraucht; das Xanthan wurde nach Verbrauch der Glucose gravimetrisch bestimmt.

L-Aminosäure	Wachstums- dauer (d)	End- OD ₆₀₀	Inkubations- zeit (d)	Xanthan (g/l)
Kontrolle	2	4.3	6	9.9
Histidin	6	4.5	8	10.2
Tryptophan	6	4.0	7	11.8
Tyrosin	6	4.3	7	11.4
Phenylalanin	6	4.3	7	11.1
Serin	7*	6.3	12	10.6
Glycin	3	5.6	6	10.4
Cystein	8**	6.1	13	9.0
Alanin	3	4.7	7	10.4
Leucin	3	3.8	7	11.5
Valin	7	4.5	7	10.6
Lysin	7	3.6	11	12.5
Aspartat	3	3.9	7	10.6
Asparagin	3	5.3	6	10.4
Threonin	3	4.3	8	10.3
Isoleucin	3	3.3	7	10.0
Methionin	2	4.3	7	6.4
Glutamat	2	6.3	5	9.8
Glutamin	3	6.1	6	10.7
Prolin	2	6.3	5	10.1
Arginin	2	4.5	5	10.2

* 4 d lag-Phase + 3 d exponentielle Phase

**6 d lag-Phase + 2 d exponentielle Phase

Es zeigte sich, daß die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie die Aminosäuren Leucin und Lysin eine geringfügige Steigerung der Xanthanausbeute bewirkten. Serin, Glycin und Cystein sowie auch Asparagin, Glutamat, Glutamin und Prolin erhöhten zwar die Zelldichte, doch hatte dies kaum Einfluß auf die Xanthanausbeuten. Besonders auffallend war die drastisch reduzierte Xanthanbildung in Gegenwart von Methionin: diese Aminosäure bewirkte im Vergleich zur Kontrolle bei gleicher End-OD eine um ca. 40 % verringerte Xanthanausbeute. Der Effekt des Methionins auf die Xanthanbildung wurde deshalb näher untersucht.

2.2 Einfluß von Methionin auf die Xanthanbildung

X. campestris-Zellen wurden jeweils mit und ohne Methionin kultiviert, wobei das Wachstum, der Glucoseverbrauch und die Xanthanbildung über die Zeit verfolgt wurde (Abb. 9). Während die Wachstumsrate unter Einfluß des Methionins um 0.02 h^{-1} erhöht war, lag in beiden Fällen nach Beendigung des Wachstums die gleiche Zelldichte vor. Ferner ergaben die Bestimmungen des Xanthangehaltes in den Kulturfiltraten, daß über die gesamte Kultivierungszeit die Xanthankonzentration in Gegenwart von Methionin verringert war. Bezüglich des Glucoseverbrauchs über die Zeit ergaben sich keine auffälligen Unterschiede. Nach Verbrauch der Glucose waren von den mit Methionin gewachsenen Zellen 8 g/l Xanthan gebildet worden, wohingegen die Konzentration in den Kontrollansätzen bei 12.5 g/l lag.

Tab. 3 zeigt den Einfluß von unterschiedlichen Methioninkonzentrationen (0.3-4.0 mM) auf die Xanthanausbeuten. Mit steigender Methioninkonzentration bis zu 1.3 mM konnte zunächst eine Abnahme der Xanthanausbeuten von 9.4 g/l (Kontrolle ohne Methionin) auf 5.7 g/l Xanthan beobachtet werden. Methioninzugaben über 1.3 mM führten zu Xanthankonzentrationen, die um einen Mittelwert von 5.7 g/l schwankten; deshalb wurde davon ausgegangen, daß Methionin in Konzentrationen über 1.3 mM keine weitere Hemmung der Xanthanbildung bewirkt. Ferner ergaben Aminosäureanalysen der Kulturfiltrate, daß das zugesetzte

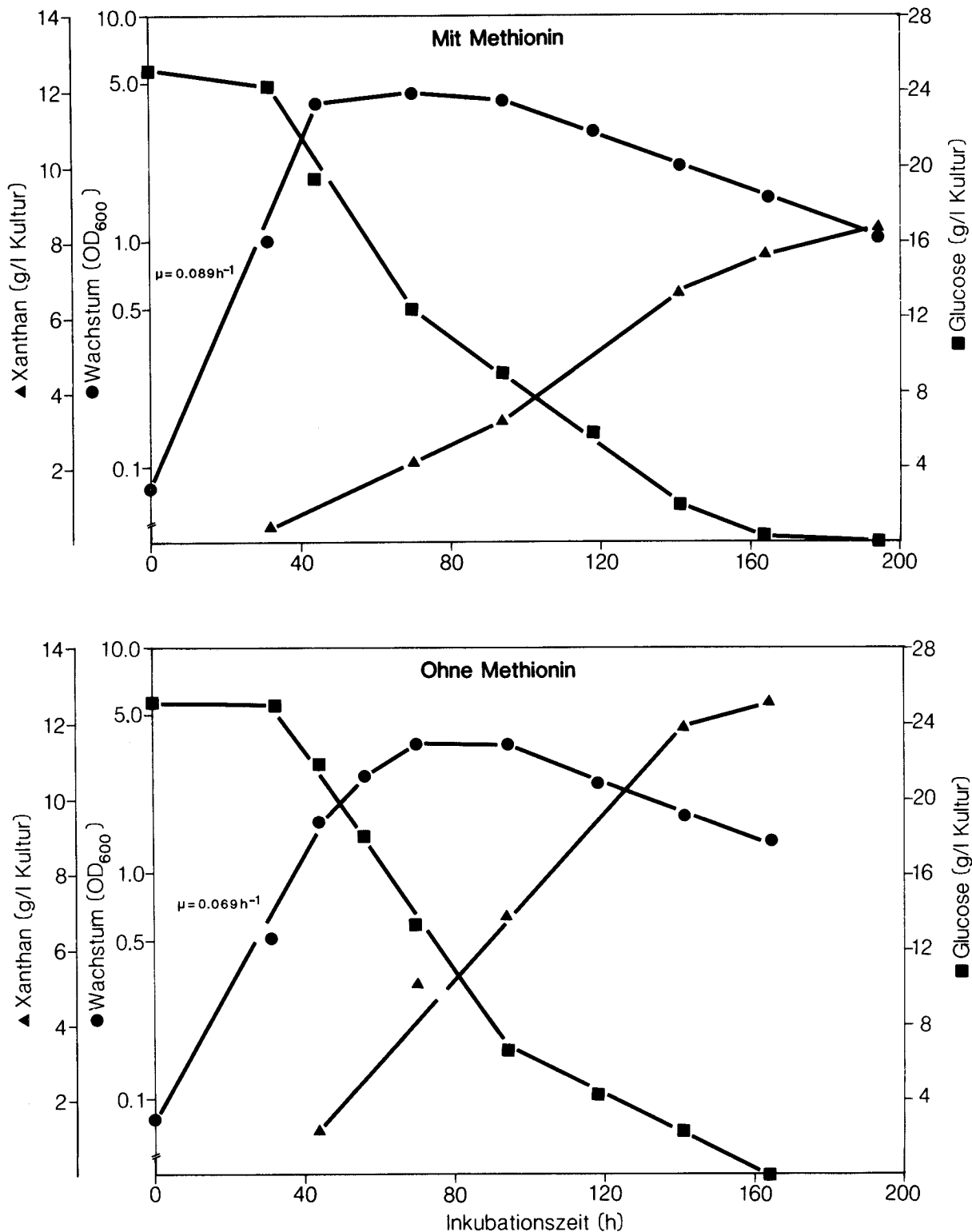


Abb. 9: Vergleich des Wachstums, der Xanthanbildung und des Glucoseverbrauchs mit und ohne Methionin.

Methionin wurde in einer Konzentration von 2.7 mM vor dem Animpfen zugegeben. Die Bestimmung des Xanthangehaltes in den Kulturfiltraten erfolgte mit dem Anthrontest nach Dialyse.

Tab. 3: Wachstum und Xanthanproduktion in Abhängigkeit von der Methioninkonzentration

Das Methionin wurde den Medien vor dem Animpfen zugegeben; das Xanthan wurde nach Verbrauch der Glucose (25 g/l) gravimetrisch bestimmt. In allen Fällen war das Wachstum nach 2 d beendet und die Glucose nach insgesamt 8 d verbraucht.

Methionin-konzentration (mM)	End-OD ₆₀₀	Methionin-Verbrauch (nach h)	Xanthan (g/l)
0	3.8	-	9.4
0.33	3.4	25	8.0
0.67	3.6	44	7.0
1.34	3.9	44	5.7
2.68	4.4	51	5.3
4.02	4.8	51	6.2

Methionin von den Zellen bereits während des Wachstums aufgenommen wurde: so war in allen Fällen das Methionin in der späten exponentiellen Phase in den Kulturfiltraten nicht mehr nachweisbar.

2.3 Einfluß von Metaboliten des Methioninstoffwechsels auf die Xanthanbildung

Um zu prüfen, ob das Methionin selbst oder aber andere Substanzen, die im Methionin-Metabolismus auftreten, die verminderte Xanthanbildung bewirken, wurde den Kulturen α -Ketobutyrat, Cystathionin, Homocystein und Homoserin zugesetzt. Wie aus Tab. 4 zu ersehen ist, hatten α -Ketobutyrat und Cystathionin keinen Einfluß auf die Xanthanbildung; dagegen war im Vergleich zur Kontrolle die Ausbeute bei Zusatz von Homocystein um ca. 30 %, bei Zusatz von Methionin um etwa 55 % verringert.

Tab. 4: Wachstum und Xanthanbildung nach Zugabe von Zwischenprodukten des Methioninstoffwechsels

Alle Substanzen wurden dem Medium in einer Konzentration von je 2.7 mM zugesetzt; das Xanthan wurde nach Verbrauch der Glucose (bzw. nach den jeweils angegebenen Inkubationszeiten) gravimetrisch bestimmt.

Zugegebene Substanz	Wachstumsdauer (d)	End-OD ₆₀₀	Inkubationszeit (d)	Xanthan (g/l)
Kontrolle	2	5.3	7	9.4
α -Ketobutyrat	9*	3.4	14	10.6
Cystathionin	3	6.5	7	9.1
Homocystein	6**	5.0	12	6.4
Homoserin	kein Wachstum		14	
Methionin	2	5.6	7	4.1

* 6 d lag-Phase + 3 d exponentielle Phase

** 4 d lag-Phase + 2 d exponentielle Phase

Da α -Ketobutyrat und Cystathionin keinen Einfluß auf die Xanthanbildung zeigten, ist anzunehmen, daß Methionin selbst die Xanthanbildung beeinflusst. Der durch Homocystein hervorgerufene Hemmeffekt ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß es als Vorstufe des Methionins direkt zu Methionin umgesetzt wird, wogegen Cystathionin eher abgebaut wird (Abb. 10).

2.4 Einfluß von Methionin-Analoga auf die Xanthanbildung

Um einen weiteren Hinweis zu bekommen, ob Methionin selbst die Xanthanbildung beeinflusst, wurden Methionin-Analoga auf ihren Einfluß auf die Xanthanbildung getestet. Es zeigten mindestens 6 der geprüften Substanzen einen ähnlichen Hemmeffekt wie Methionin (Tab. 5); DL-Methionin-S-Methyl-Sulfoniumchlorid hatte dagegen keinen Einfluß auf die Xanthanbildung. Weiterhin wurde geprüft, ob das Cycloleucin im Verlauf der Kultivierung von den Zellen umgesetzt wird. Die Aminosäureanalysen ergaben, daß die Cycloleucinkonzentrationen in den

Tab. 5: Einfluß von Methionin-Analoga auf die Xanthanbildung

Die Antimetabolite wurden den Medien in äquimolaren Konzentrationen (je 2.7 mM) zugegeben; das Xanthan wurde nach Verbrauch der Glucose (d.h. nach den jeweils angegebenen Inkubationszeiten) in den Kulturfiltraten gravimetrisch bestimmt.

Analoga	Wachstums- dauer (d)	End- OD ₆₀₀	Inkubations- zeit (d)	Xanthan (g/l)
L-Methionyl-L-Alanin	2	5.2	7	6.8
D-Methionin	2	4.4	7	6.9
N-Formyl-DL-Methionin	2	5.2	7	6.9
L-Alanyl-L-Methionin	2	5.5	7	7.1
Cycloleucin	2	5.0	7	7.2
α -Keto- δ -Methiolbutyrat	1	4.2	12	7.3
DL-Methionin-Amid- Hydrochlorid	3	5.0	7	8.0
DL-Methionin-Hydroxy- Analog	1	5.6	7	8.4
α -Methyl-DL-Methionin	5	3.6	11	9.7
DL-Methionin-Sulfoxid	2	4.5	7	9.7
DL-Äthionin	8*	3.8	13	9.9
DL-Methionin-S-Methyl- Sulfoniumchlorid	2	4.4	7	12.4
Selen-DL-Methionin				
p-Fluorphenylalanin	kein Wachstum		14	
Kontrollen:				
L-Methionin	2	4.6	7	7.4
ohne Zusatz	2	4.3	7	12.4

* 6 d lag-Phase + 2 d exponentielle Phase

2.5 Xanthanbildung nach Zugabe des Methionins zu verschiedenen Zeiten sowie mit nicht wachsenden Zellen

Die beiden folgenden Versuche sollten Hinweise darauf geben, ob Methionin die katalytische Aktivität oder die Konzentration von Enzymen beeinflusst. Dazu wurde zunächst das Methionin den Kulturen zu verschiedenen Inkubationszeiten zugegeben und - nachdem die Glucose verbraucht worden war - der Xanthangehalt der Kulturfiltrate bestimmt. Es zeigte sich (Abb. 11), daß Methionin nur dann die Xanthanausbeuten verringerte, wenn es vor dem Animpfen oder im Laufe der frühen exponentiellen Phase zugegeben wurde. Je später die Methioninzugabe erfolgte, d.h. je weiter das Wachstum fortgeschritten war, umso geringer war der Einfluß auf die Xanthanbildung. In der frühen stationären Phase zugegebenes Methionin hatte keinen Einfluß mehr.

Aminosäureanalysen der Kulturfiltrate ergaben, daß in der exponentiellen Phase zugegebenes Methionin spätestens bis zur frühen stationären Phase verbraucht war. In der späten exponentiellen und frühen stationären Phase zugefüttertes Methionin war nach etwa 24 weiteren Stunden in den Kulturfiltraten ebenfalls nicht mehr nachweisbar.

Wenn Methionin die katalytische Aktivität von Enzymen beeinflussen würde, wäre zu erwarten, daß sich der Hemmeffekt auch mit stationären Zellen zeigt. Da die Hemmung der Xanthanbildung aber nur erfolgt, wenn Methionin wachsenden Zellen zugegeben wird, weist das eher auf veränderte Enzymkonzentrationen hin.

Zur Bestätigung wurde ein Experiment mit nicht wachsenden X. campestris-Zellen durchgeführt: Diese wurden zunächst 3 Tage in Mineralsalzmedien jeweils mit und ohne 2.7 mM Methionin kultiviert, anschließend 2 x mit Saline gewaschen und dann in Mineralsalzmedium ohne N-Quelle so resuspendiert, daß die optische Dichte beider Zellsuspensionen ca. 10 Extinktionseinheiten betrug. Jeweils 50 ml dieser Zellsuspensionen wurden zu weiteren 50 ml Mineralsalzmedium ohne N-Quelle zugegeben und die Zellen weitere 7 Tage inkubiert. Nachdem die Glucose ver-

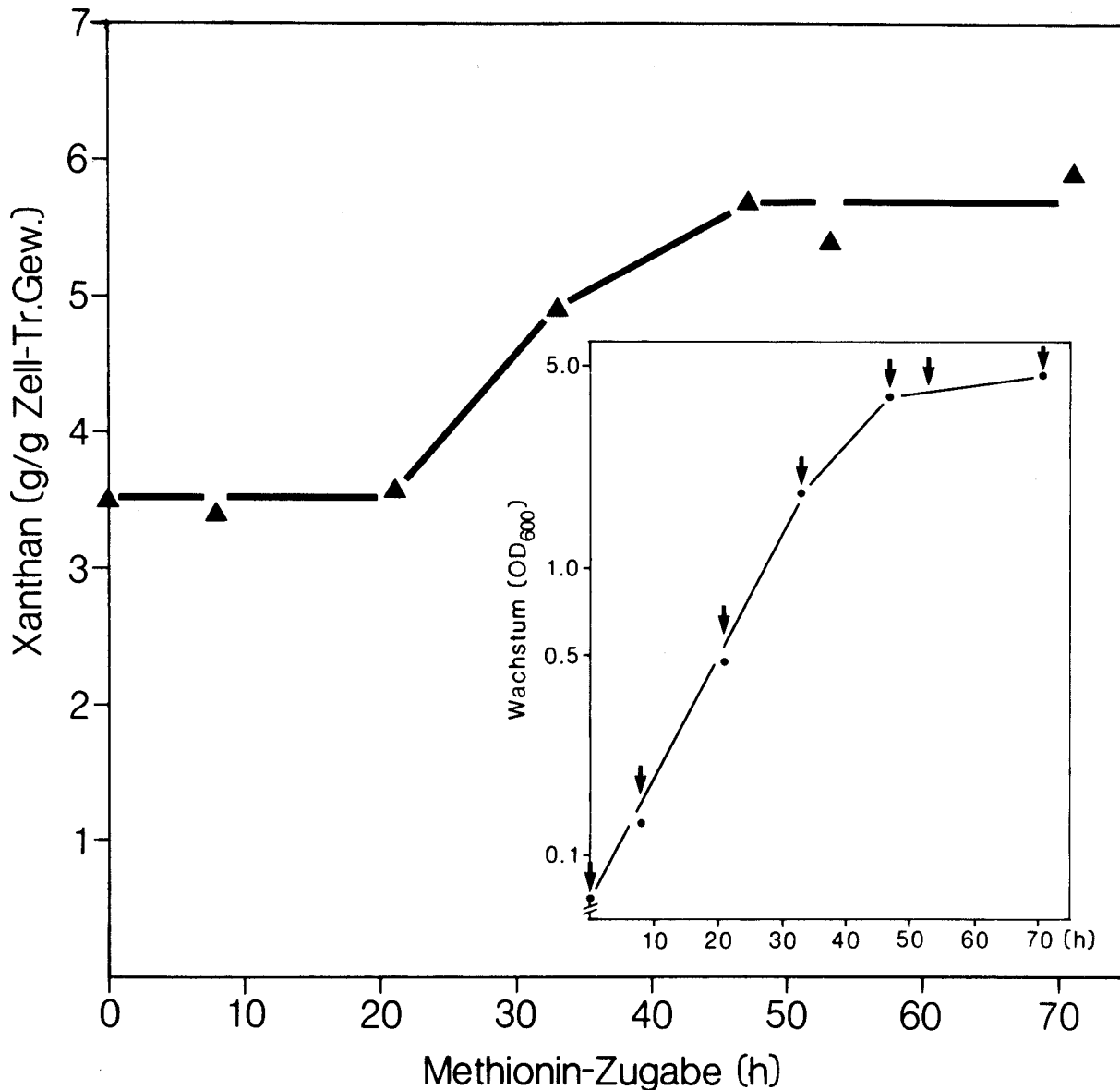


Abb. 11: Einfluß von Methionin auf die Xanthanbildung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Methionin-Zugabe

Zu einzelnen Kulturen wurde Methionin in einer Konzentration von 2.7 mM zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten zugegeben (Inset) und die jeweils resultierende Xanthankonzentration gegen den Zeitpunkt der Methionin-Zugabe aufgetragen.

braucht war, ergaben die Xanthanbestimmungen der Kulturfiltrate, daß die mit Methionin gewachsenen Zellen 8.5 g/l Xanthan, die ohne Methionin kultivierten Zellen 12.6 g/l Xanthan produziert hatten. Die in Gegenwart von Methionin

gewachsenen Zellen hatten damit im Vergleich zur Kontrolle auch unter nicht wachsenden Bedingungen ca. 30 % weniger Xanthan gebildet.

Es ist daher anzunehmen, daß Methionin nicht als die Aktivität beeinflussender Effektor wirkt, sondern eher die Menge an gebildeten Enzymen beeinflußt.

3. Versuche zur Verbesserung der Xanthanbildung

Es bot sich an, mit dem gefundenen Methionin-Effekt zu versuchen, die Xanthanbildung zu steigern. Da zum Nährmedium zugegebenes Methionin die Xanthansynthese teilweise hemmt, könnten bereits unter Kulturbedingungen ohne Methionin die intrazellulären Methioninkonzentrationen ausreichen, um ungünstig auf die Xanthanbildung zu wirken. Daher wurden Versuche, einen intrazellulären Methionin-Mangel zu schaffen, durchgeführt. Dies sollte durch Zugabe von Aminosäuren mit regulatorischem Einfluß sowie mit Hilfe von Methionin-auxotrophen Mutanten erreicht werden.

Es ist bekannt, daß in E. coli die Aminosäuren Isoleucin, Threonin und Lysin sowie Leucin und Valin die Methioninsynthese drosseln (Datta 1969). Daher wurde versucht, diesen Effekt auch in X. campestris herbeizuführen, indem die genannten Aminosäuren in einer Konzentration von je 1 mM dem Medium als Gemisch zugegeben wurde. Es zeigte sich, daß bei Zugabe der Aminosäuren nach 3 Tagen Inkubation die Medien bereits so viskos waren, wie in den Kontrollansätzen nach 5 Tagen; auch war die zugesetzte Glucose (25 g/l) um 1-2 Tage schneller verbraucht. Bezüglich der Xanthanausbeuten ergaben sich keine Unterschiede: in beiden Fällen wurden 10 g/l Xanthan produziert. Weiterhin waren auch die End-OD-Werte bei Zusatz der Aminosäuren erhöht: nach Beendigung des Wachstums (nach 2 Tagen Inkubation) war eine OD von 6.8, dagegen in den Kontrollansätzen eine OD von 4.3 erreicht. Es ist deshalb möglich, daß das verbesserte Wachstum zu einer schnelleren Xanthanbildung beigetragen hat, zumal auch nach Zugabe von Glutamat und Prolin (siehe 2.1, Tab. 2) die OD-Werte um 2 Einheiten erhöht waren und die Glucose um 1 Tag schneller

verbraucht wurde. Um entscheiden zu können, ob die schnellere Xanthanbildung auf die erhöhte Zelldichte und/oder auf einen regulatorischen Einfluß der Aminosäuren zurückzuführen ist, müßten die Zellen mit und ohne Aminosäuren kultiviert werden und anschließend die Xanthanbildung unter nicht wachsenden Bedingungen (bei gleicher Zelldichte) verglichen werden. Weiterhin müßte auch geklärt werden, ob die Zugabe dieser Aminosäuren bei X. campestris tatsächlich einen intrazellulären Methionin-Mangel hervorrufen.

Ein weiterer Versuch zur Verbesserung der Xanthansyntheseleistung bestand darin, die intrazelluläre Methioninkonzentration bei Methionin-auxotrophen Mutanten gering zu halten. Es wurden zunächst 6 Methionin-auxotrophe Mutanten isoliert, die in Mineralsalzmedium mit und ohne 2.7 mM Methionin getestet wurden. Von diesen 6 Mutanten verblieb eine Mutante, die ohne Methionin auch in Submers-Kultur nicht mehr wachstumsfähig war. Es wurde das Wachstum und die Xanthanproduktion dieser auxotrophen Mutante in Abhängigkeit von verschiedenen Methioninkonzentrationen bestimmt (Tab. 6). Es ist ersichtlich, daß in allen Fällen weniger Xanthan als in der Kontrolle ohne Methionin gebildet wurde. Bei Methioninkonzentrationen unter 0.7 mM wurde jedoch auch die erzielte End-OD verringert, so daß zusätzlich das gebildete Xanthan auf die Zellmasse bezogen wurde. Aus diesen Werten geht hervor, daß mit abnehmender Methioninkonzentration die Xanthanbildungsfähigkeit der Zelle zunahm. Dies könnte bedeuten, daß tatsächlich durch einen Methioninmangel die Menge an Xanthansynthese-Enzymen beeinflusst ist, oder aber, daß die Methioninlimitation zu einer Verschiebung des Glucosestoffwechsels führt. Wird das gebildete Xanthan auf die verbrauchte Glucose bezogen, führt Methionin bei der geringsten Konzentration (0.2 mM) nicht zu der bekannten Reduktion.

Tab. 6: Wachstum und Xanthanproduktion einer Methionin-auxotrophen Mutante in Abhängigkeit von unterschiedlichen Methioninkonzentrationen
Die zugesetzte Glucosekonzentration betrug 25 g/l.

Methionin- konzentration (mM)	Wachstums- dauer (d)	End- OD ₆₀₀	Inkubations- zeit (d)	Rest- Glucose (g/l)	Xanthan (g/l)	Xanthan/ Zellmasse (g/lxOD)	Xanthan/ver- brauchte Glucose (g/g)
5.4	4	5.0	6	0	3.0	0.6	0.12
2.7	4	5.4	7	0	5.1	0.9	0.20
1.3	4	5.6	7	0	5.4	1.0	0.22
0.7	3	4.6	12	0	5.7	1.2	0.23
0.5	4	2.6	25	5.0	5.2	2.0	0.26
0.3	3	2.3	25	9.0	4.9	2.1	0.31
0.2	4	1.1	25	13.0	4.7	4.3	0.39
0	kein Wachstum						
Wildstamm:							
ohne Methionin mit 2.7 mM	3	5.0	7	0	10.0	2.0	0.40
Methionin	2	5.3	7	0	6.5	1.2	0.26

4. Untersuchungen zum Glucose-Metabolismus

Wie gezeigt werden konnte, ist unter Einfluß des Methionins bei gleichem Glucoseverbrauch und annähernd gleicher End-OD die Xanthanausbeute reduziert. Da auch bei Zellen, die mit Methionin kultiviert worden waren, unter nicht wachsenden Bedingungen die Xanthanbildung reduziert war (siehe 2.5) ist anzunehmen, daß Methionin den Stoffwechsel nachhaltig verändert. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war festzustellen, worauf die durch Methionin verursachte verringerte Xanthanbildung zurückzuführen ist.

4.1 Untersuchung von niedermolekularen Zuckerbestandteilen im Kulturfiltrat

Es wurde zunächst angenommen, daß die Zellen unter Einfluß des Methionins niedermolekulare Xanthanvorstufen ausscheiden, die mit der gravimetrischen Xanthanbestimmung nicht erfaßt werden. Es wurden deshalb Kulturfiltrate mit Fractogel TSK HW-55(S) (Trennbereich $10^3 - 5 \times 10^5$ g/mol) gelchromatographisch getrennt. Wie aus Abb. 12 zu ersehen ist, traten neben Xanthan niedermolekulare Zuckerbestandteile auf, die von den mit Methionin kultivierten Zellen in höheren Konzentrationen ausgeschieden wurden.

Zur besseren Auftrennung dieser Bestandteile wurden die Kulturfiltrate zunächst ultrafiltriert, um das enthaltene Xanthan abzutrennen und anschließend auf eine Säule mit Fractogel TSK HW-40(S) (Trennbereich $10^2 - 10^4$ g/mol) gegeben. Die nach der Trennung aufgetretenen Hauptpeaks sind in Abb. 13 dargestellt. Die Säule war mit Maltooligomeren ($M_1 - M_7$ mit Retentionszeiten zwischen 9 und 12.5 h) kalibriert worden (Abb. 7), so daß eine Abschätzung des Molekulargewichtes durch Vergleich der Retentionszeiten vorgenommen wurde: Es lag für die Substanz mit der Retentionszeit von 10.6 h bei etwa 600 g/mol; dies entspräche Zuckeroligomeren von $X_3 - X_4$. Für die höhermolekularen Bestandteile, deren Retentionszeiten unter 9 h lagen, wurde ein Polymerisationsgrad von $X_{10} - X_{12}$ bzw. ein Molekulargewicht von ca. 2000 g/mol abgeschätzt.

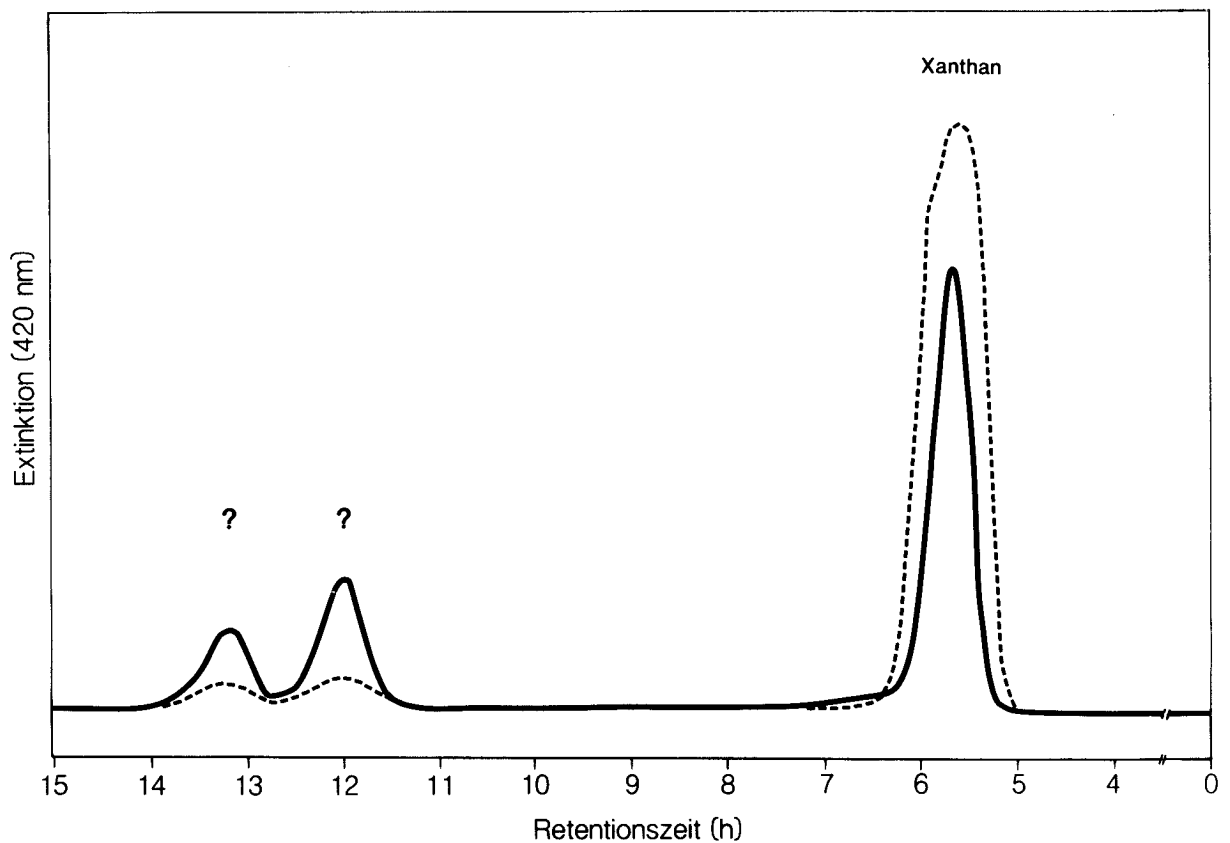


Abb. 12: Gelchromatographische Trennung von Kulturfiltrat mit Fractogel TSK HW-55(S) (Trennbereich: 10^3 - 5×10^5 g/mol) Es wurden jeweils 5 ml 1:10 verdünntes Kulturfiltrat von Zellen, die mit (—) und ohne (----) 2.7 mM Methionin gewachsen waren, aufgetragen.

Diese Abschätzungen der Molekulargewichte durch Vergleich der Retentionszeiten setzen aber voraus, daß es sich bei den gefundenen Zuckerbestandteilen wie bei den zur Eichung verwendeten Maltooligomeren um unsubstituierte Moleküle handelt; denn die Retentionszeiten substituerter und unsubstituierter Zucker stimmen oft nicht überein: beispielsweise trat methylierte Glucose nach Trennung mit Bio-Gel P-4 im Bereich der Maltotriose auf (Grellert und Ballou 1972).

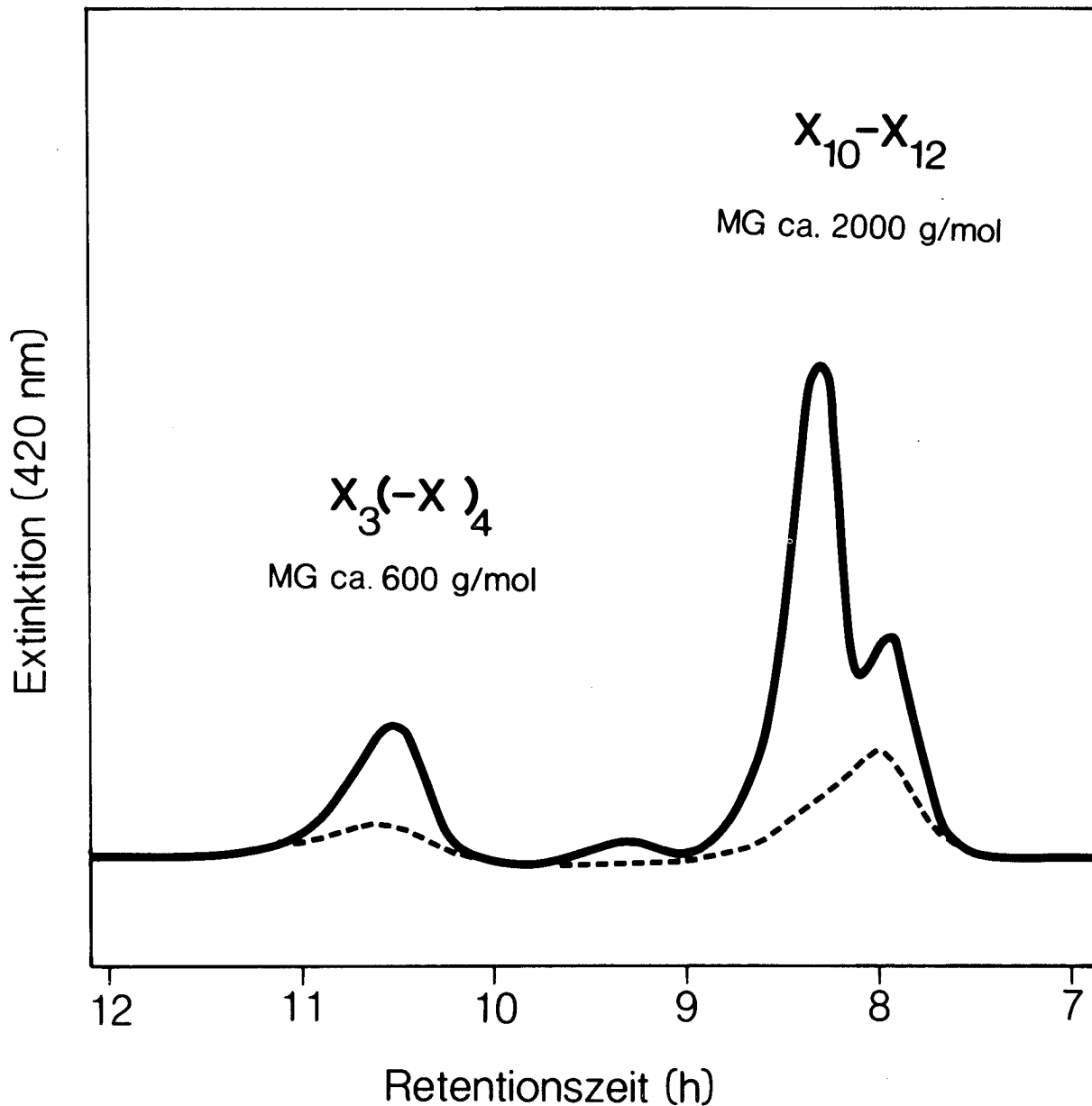


Abb. 13 Gelchromatographische Trennung von Ultrafiltrat mit Fractogel TSK HW-40(S) (Trennbereich: 10^2-10^4 g/mol)
Es wurden jeweils 5 ml 1:10 verdünntes Ultrafiltrat von Zellen, die mit (—) und ohne (----) 2.7 mM Methionin gewachsen waren, aufgetragen.

Um eine genauere Zuordnung der X_3-X_4 -Bestandteile vornehmen zu können, wurden ultrafiltrierte und auf das 7-fache konzentrierte Proben dünnschichtchromatographisch getrennt.

Wie Tab. 7 zeigt, konnte auch nach dieser Trennung eine Zuordnung zu Triose oder Tetraose nicht vorgenommen werden.

Um festzustellen, ob die unter Einfluß des Methionins produzierten niedermolekularen Zuckeranteile ausreichen, um den Verbleib des Glucoseanteils zu erklären, der nicht zu Xanthan metabolisiert wird, wurde zunächst die Konzentration an gebildeten Zuckeranteilen abgeschätzt. Dies erfolgte durch Berechnung der in Abb. 13 dargestellten peak-Flächen. Als Bezugswert diente der aus dem Eichlauf mit Maltooligomeren (Abb. 7) ermittelte Durchschnittswert der 7 peak-Flächen; dieser betrug 8.25 cm² und entsprach damit 500 µg Zucker. Wie aus Tab. 8 zu ersehen ist, ergaben die Berechnungen, daß der Anteil an niedermolekularen Zuckerbestandteilen unter Einfluß des Methionins 1.86 g/l und für die Kontrolle 0.66 g/l Kultur betrug. Mit Methionin wurden 6.1 g/l und ohne Methionin 12.3 g/l Xanthan gebildet. Angenommen, die niedermolekularen Zuckeranteile würden zu Xanthan umgesetzt, wären mit Methionin etwa 8 g/l Xanthan und ohne Methionin ca. 13 g/l Xanthan gebildet worden. Damit wird ein Teil der Glucose (etwa 4-5 g/l) zu noch unbekannten Produkten metabolisiert.

Tab. 7: Identifizierung der Zuckerbestandteile mittels Dünnschichtchromatographie

Zucker	R _f -Werte		
	Einzelreferenzen	konzentrierte Ultrafiltrate mit Methionin	ohne Methionin
Cellobiose	0.43		
Maltotriose	0.36		
		0.29 (X ₃ -)X ₄	0.28
Maltotetraose	0.25		
Maltopentaose	0.17		

Tab. 8: Quantitative Bestimmung der niedermolekularen Zuckeranteile aus den in Abb. 15 dargestellten peak-Flächen
 Als Bezugswert diente der aus Abb. 7 ermittelte Durchschnittswert der 7 peak-Flächen der Maltooligomeren: damit entsprechen 500 µg Zucker einer Fläche von 8.25 cm².

Probe	peak	Fläche (cm ²)	Zucker-Konzentration (mg/ml Kultur)
mit Methionin	X ₃ -X ₄	3.0	0.36
	X ₁₀ -X ₁₂	12.3	1.50
			Σ1.86
ohne Methionin	X ₃ -X ₄	1.2	0.15
	X ₁₀ -X ₁₂	4.2	0.51
			Σ0.66

Es wurde weiterhin der Versuch unternommen, die niedermolekularen Zuckerbestandteile näher zu charakterisieren und zu prüfen, ob es sich um Xanthanvorstufen handelt. Dazu wurden die Ultrafiltrate mittels Borat-Komplex-Anionenaustausch-Chromatographie analysiert. Die Proben wurden jeweils vor und nach HCl-Hydrolyse aufgetragen und jeweils mit 2 unterschiedlichen Detektionssystemen (Orcin/H₂SO₄ und Cu²⁺/Bicinchoninat) erfaßt. Für die Zuordnung der vor Hydrolyse aufgetretenen Substanzen dienten die nach Gelchromatographie gesammelten, konzentrierten X₃-X₄- und X₁₀-X₁₂-Fraktionen. Abb. 14 (A1) zeigt, daß mit Orcin/H₂SO₄ als Nachweisreagenz vor Hydrolyse sowohl die X₁₀-X₁₂- als auch die X₃-X₄-Bestandteile auftraten. Die Retentionszeit betrug für X₁₀-X₁₂ ca. 2.8 h und für X₃-X₄ etwa 3.3 h. Nach HCl-Hydrolyse dieser Substanzen war mit dem gleichen Detektionssystem nur Glucose nachweisbar (Abb. 14, A2). Im Gegensatz dazu waren mit Cu²⁺/Bicinchoninat-Reagenz, mit dem nur reduzierende Zucker nachgewiesen werden, vor Hydrolyse nur die X₃-X₄-Bestandteile nachweisbar (Abb. 14, B1). Die X₁₀-X₁₂-Zucker traten dagegen nicht auf, was darauf hinweist, daß es sich hierbei um Zucker ohne freie, reduzierende Gruppe handeln muß. Die Retentionszeit der X₃-X₄-Komponente betrug 3.8 h. Zu diesem Zeitpunkt trat auch ein Abbauprodukt des Xanthans auf, das

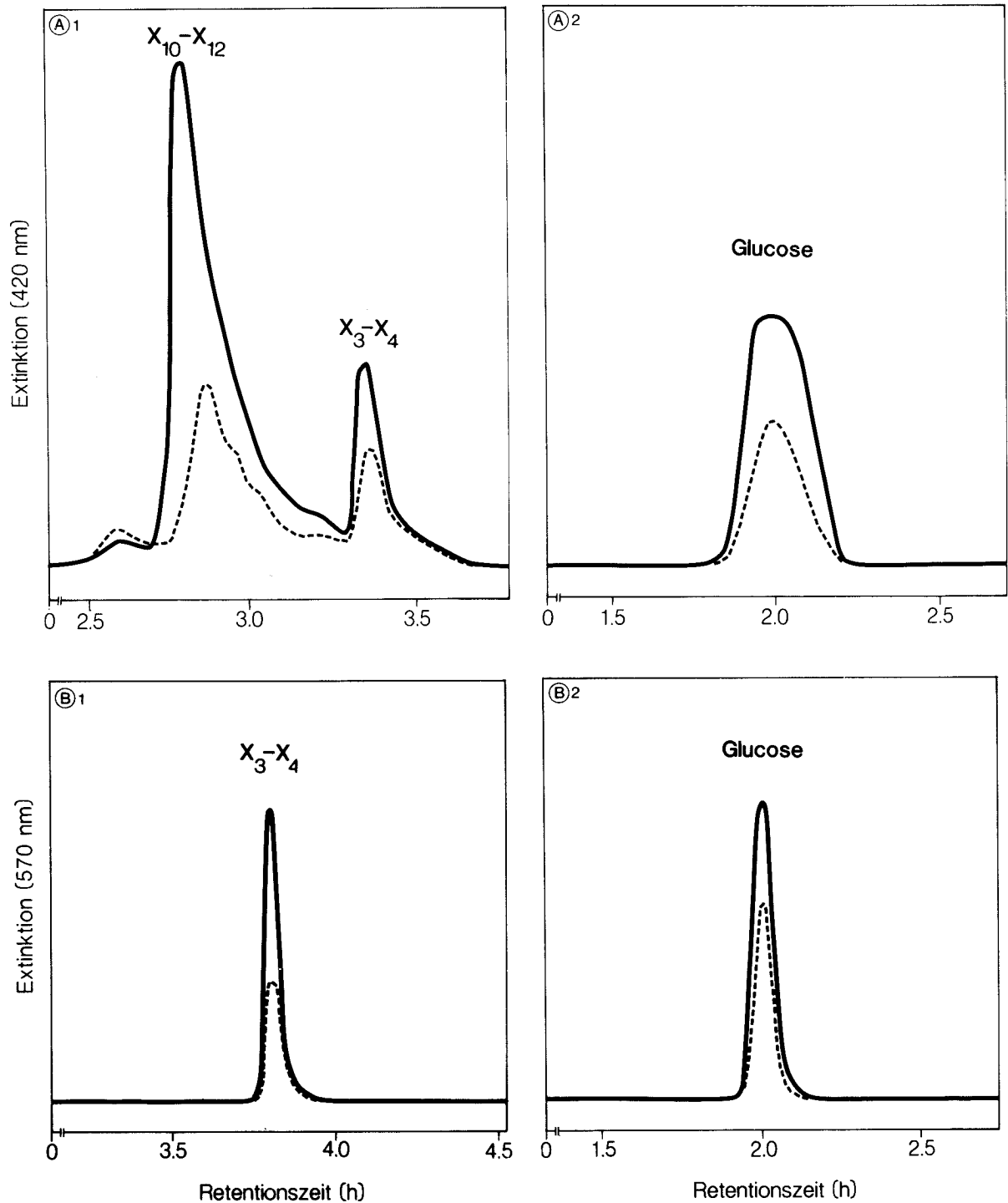


Abb. 14: Trennung der Zuckerbestandteile über Borat-Komplex-Anionenaustausch-Chromatographie

Nachweisreagenz (A) Orcin/ H_2SO_4 , (B) Cu^{2+} /Bicinchoninat; (1) vor Hydrolyse, (2) nach Hydrolyse; — mit 2.7 mM Methionin, ---- ohne Methionin; Probevol.: (A) 300 μ l 7-fach konzentriertes Ultrafiltrat, (B) 500 μ l Ultrafiltrat.

enzymatisch mit Roh-Xanthanase gewonnen wurde (Schimz, pers. Mitteilung). Die Entstehung der X_3 - X_4 -Komponente durch X. campestris-eigene Xanthanase ist aber unwahrscheinlich, da ein solches Enzym weder im Kulturfiltrat noch mit intakten Zellen nachgewiesen werden konnte. Nach chemischer Hydrolyse des durch Xanthanase erhaltbaren Abbauproduktes wird sowohl Glucose als auch Mannose frei. Dagegen war nach HCl-Hydrolyse der X_3 - X_4 -Komponente nur Glucose als Bestandteil nachweisbar (Abb. 14, B2).

Die Analysenergebnisse deuten darauf hin, daß es sich bei den ins Kulturfiltrat ausgeschiedenen niedermolekularen Zuckerbestandteilen vermutlich nicht um Xanthanvorstufen handelt, da weder Mannose noch Glucuronsäure als Bausteine nachweisbar waren.

Zuletzt wurde noch versucht, die niedermolekularen Zuckerbestandteile im Ultrafiltrat enzymatisch mit Amyloglucosidase sowie mit Cellulase- und Xanthanase-haltigem Kulturfiltrat abzubauen. Da kein Abbau der Zucker erfolgte, bedeutet dies, daß weder Glykogen- noch Cellulose- noch (besonders im Falle der X_{10} - X_{12} -Komponente) Xanthan-ähnliche Bruchstücke vorliegen.

4.2 Untersuchungen zur Akkumulation von intrazellulären Metaboliten

Die Konzentration der niedermolekularen Zuckerbestandteile war zu gering, um den Verbleib des Glucoseanteils zu erklären, der bei Zugabe von Methionin nicht zu Xanthan metabolisiert wird. Deshalb wurde geprüft, ob X. campestris einen Speicherstoff synthetisiert und ob eine verstärkte Akkumulation bei Zugabe von Methionin erfolgt. Es ist bereits bekannt, daß Polyhydroxybuttersäure als Speicherstoff von Xanthomonas-Zellen nicht gebildet wird (Palleroni 1985). Dagegen ist noch unbekannt, ob der Organismus zur Glykogensynthese befähigt ist. Für den Versuch eines Glykogennachweises sprach vor allem, daß die zur Glykogensynthese notwendigen Voraussetzungen durch das für X. campestris verwendete Mineralsalzmedium gegeben waren; denn wie die Glykogensynthese erfolgt auch eine optimale Xanthansynthese bei hoher Kohlenstoff-Konzentration unter Stickstoff-

bzw. Wachstums-limitierten Bedingungen (Souw und Demain 1979, Holme 1957, Dawes und Senior 1973).

Wie Abb. 15 zeigt, war bei X. campestris Glykogen nachweisbar. Während die meisten Bakterien das Glykogen erst im Laufe der stationären Phase synthetisieren (Preiss 1984), wurde sowohl in den mit als auch ohne Methionin gewachsenen X. campestris-Zellen das Glykogen während der exponentiellen und frühen stationären Phase gebildet; dies konnte auch bei Streptococcus mitis (Gibbons und Kapsimalis 1963) sowie Rhodopseudomonas capsulata (Eidels und Preiss 1970) beobachtet werden. Es wurden mit Methionin 17 % und ohne Methionin 15 % des Bakterientrockengewichts an Glykogen gebildet. Nach 120 h (mit Methionin) bzw. 100 h (ohne Methionin) wurde ein Teil des gebildeten Glykogens wieder abgebaut, so daß in den mit Methionin gewachsenen Zellen nach 140 h noch ein Glykogengehalt von 9 % und in den ohne Methionin gewachsenen Zellen nach 120 h noch ein Glykogengehalt von 11 % des Trockengewichtes vorlag. In beiden Fällen blieb dieser Glykogengehalt bis zum Ende der Inkubationszeit konstant. Die Ergebnisse zeigen, daß der Glykogengehalt der Zellen durch Methionin kaum beeinflußt wird.

Bei Zoogloea ramigera wird mit einsetzender Exopolysaccharidsynthese die von diesem Organismus gebildete Polyhydroxybuttersäure abgebaut, so daß vermutet wird, daß dieser Speicherstoff für die extrazelluläre Polysaccharidbildung verwertet wird (Parsons und Dugan 1971). Ob auch das von X. campestris gebildete Glykogen nach Abbau für die Xanthansynthese eingesetzt wird, ist ungeklärt. Dazu könnte eine über den bisher erfaßten Zeitraum hinausgehende Bestimmung der Xanthanbildung und des Glykogengehaltes der Zellen auch nach Verbrauch der Glucose sowie der Einsatz von radioaktiv markiertem Glykogen weiteren Aufschluß geben. Da maximal 20 mg Glykogen/100 mg Trockenzellen gebildet werden und in einer 100 ml-Kultur etwa 200 mg Trockenzellen enthalten sind, werden also maximal 0.4 g/l Glykogen synthetisiert. Angenommen, das Glykogen würde vollständig abgebaut und die freigesetzte Glucose zu Xanthan umgesetzt, würde dies nur eine um maximal 0.4 g/l höhere Xanthanausbeute bedeuten.

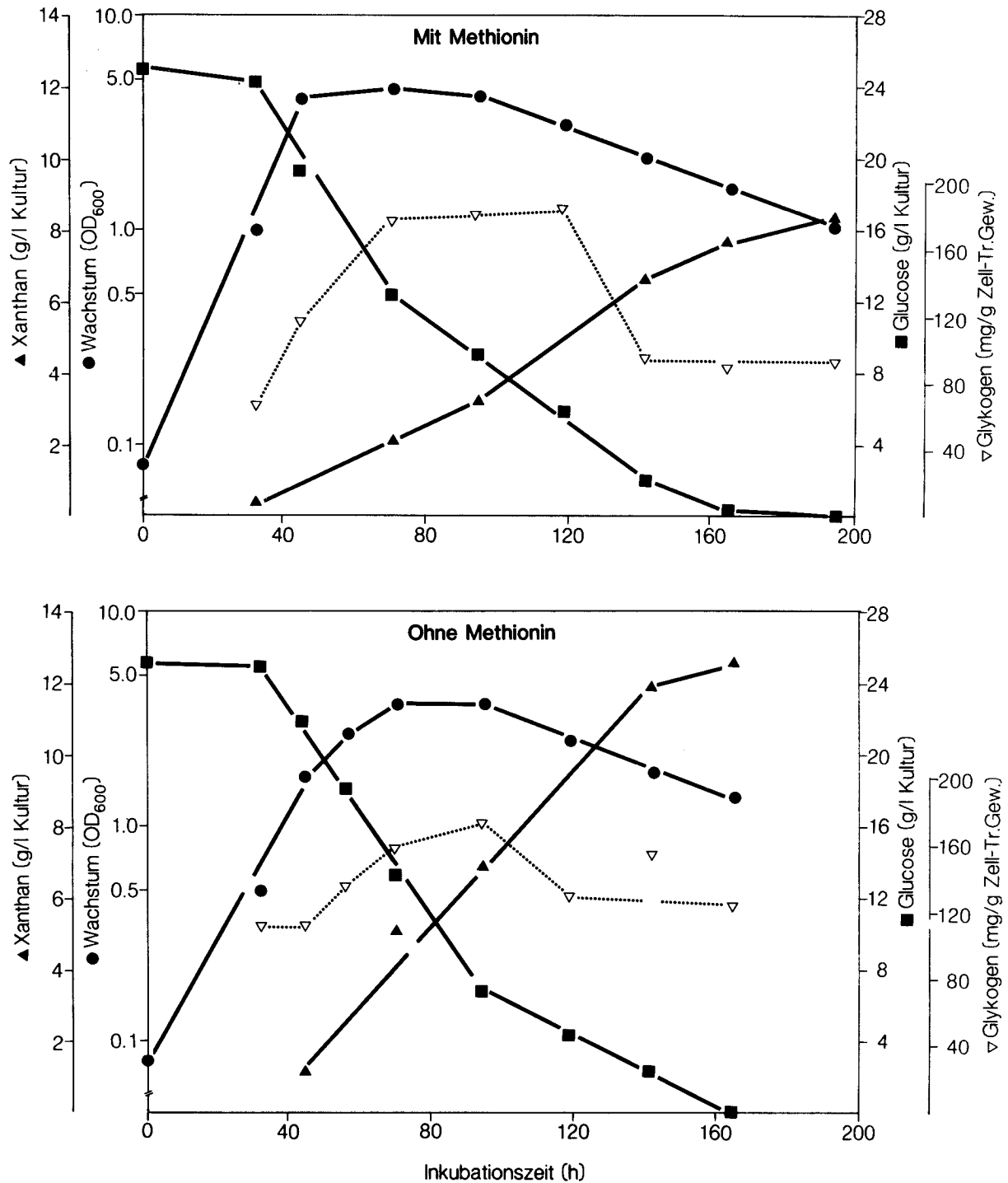


Abb. 15: Xanthanbildung, Glucoseverbrauch und Glykogengehalt der Zellen

Die Zellen wurden mit und ohne 2.7 mM Methionin kultiviert. Der Nachweis von Glykogen und Glucose erfolgte enzymatisch; der Xanthangehalt der Kulturfiltrate wurde nach Dialyse mit Anthron bestimmt.

Unter der Annahme, daß durch Methionin ein oder mehrere Schritte im Xanthanbiosyntheseweg reduziert ablaufen und dies eine Akkumulation von Glucose-1-P und/oder Glucose-6-P zur Folge haben könnte, wurde der Gehalt an Glucose-1-P und Glucose-6-P in den Zellen nach Perchlorsäureaufschluß bestimmt. Es zeigte sich aber, daß der Glucose-6-P-Gehalt in der stationären Phase in den mit 2.7 mM Methionin gewachsenen Zellen geringer war. Er betrug 0.03-0.06 $\mu\text{mol/mg}$ Zelltrockengewicht, dagegen in den ohne Methionin gewachsenen Zellen 0.1 $\mu\text{mol/mg}$ Zelltrockengewicht. Glucose-1-P war in allen Extrakten nicht nachweisbar, was für einen unmittelbaren Verbrauch dieses Phosphatzuckers in den Folgereaktionen sprechen könnte.

4.3 C-Bilanz

Die in Gegenwart von Methionin gewachsenen Zellen mußten, da sie bei gleichem Glucose-Verbrauch etwa 40 % weniger Xanthan bildeten, die zugesetzte Glucose zu noch unbekannten Produkten metabolisieren. Da der Glykogengehalt dieser Zellen nicht signifikant erhöht war und die Konzentration der im Kulturfiltrat aufgetretenen niedermolekularen Zuckerbestandteile zu gering war, um den Verbleib des Glucoseanteils, der nicht zu Xanthan metabolisiert wird, zu erklären, wurde eine C-Bilanz durchgeführt. Dies erfolgte mit ^{14}C -Glucose unter Standardbedingungen. Wie die ermittelten, in Tab. 9 aufgeführten Werte zeigen, fand sich etwa 7 % der eingesetzten ^{14}C -Glucose in den Zellen wieder, wobei kaum ein Unterschied zwischen den mit und ohne Methionin kultivierten Zellen bestand. Dies stimmt damit überein, daß in beiden Fällen auch etwa gleiche End-OD-Werte erreicht wurden. Dagegen waren im Kulturfiltrat unter Einfluß des Methionins 10 % der eingesetzten ^{14}C -Glucose weniger nachweisbar als in den Kontrollproben ohne Methionin. Nach Abtrennen des Xanthans aus den Kulturfiltraten zeigte sich, daß mit Methionin 10 % weniger ^{14}C -Glucose im gebildeten Xanthan nachweisbar war. Weiterhin bestätigten die im Xanthan bestimmten absoluten prozentualen Anteile, daß in Gegenwart von Methionin ca. 40 % weniger Xanthan gebildet wurde. Im Ultrafiltrat war - absolut gesehen - nur ein um etwa 30 % höherer Anteil an einge-

Tab. 9: Verteilung der Radioaktivität mit und ohne 2.7 mM Methionin

Den Kulturen wurden 25 μ l ^{14}C -Glucose (0.185 MBq) sowie 25 g/l kalte Glucose zugesetzt. Die eingesetzte ^{14}C -Glucose wurde als 100 % gesetzt.

	mit Methionin (% der eingesetzten ^{14}C -Glucose)	ohne Methionin
Zellen	7.2	6.7
Kulturfiltrat	32.1	42.4
Xanthan	17.3	28.4
Ultrafiltrat	13.7	10.6
CO_2 -----	51.0	41.5
Gesamt	90.3	90.6

gesetzter ^{14}C -Glucose unter Einfluß des Methionins nachweisbar, obwohl mit Methionin eine 3-fach höhere Konzentration an niedermolekularen Zuckerbestandteilen gefunden wurde (Tab. 8). Möglicherweise lagen im Kulturfiltrat der ohne Methionin gewachsenen Zellen noch andere, nicht identifizierbare C-Verbindungen vor. Die in Gegenwart von Methionin fehlenden 10 % an eingesetzter ^{14}C -Glucose im Kulturfiltrat bzw. im Xanthan fanden sich in einem entsprechend erhöhten Anteil an gebildetem CO_2 wieder.

In Abb. 16 ist das während der Kultivierung gebildete $^{14}\text{CO}_2$ gegen die Zeit aufgetragen. In den Methioninkulturen war die Geschwindigkeit der CO_2 -Bildung während des Wachstums deutlich erhöht, was mit der erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen unter Einfluß des Methionins erklärt werden kann. Der CO_2 -Level blieb aber auch nach Beendigung des Wachstums bei gleicher Zelldichte höher als in den Kontrollen ohne Methionin.

Die C-Bilanz zeigte, daß unter Einfluß des Methionins der nicht zu Xanthan metabolisierte Glucoseanteil zu CO_2 umgesetzt wird.

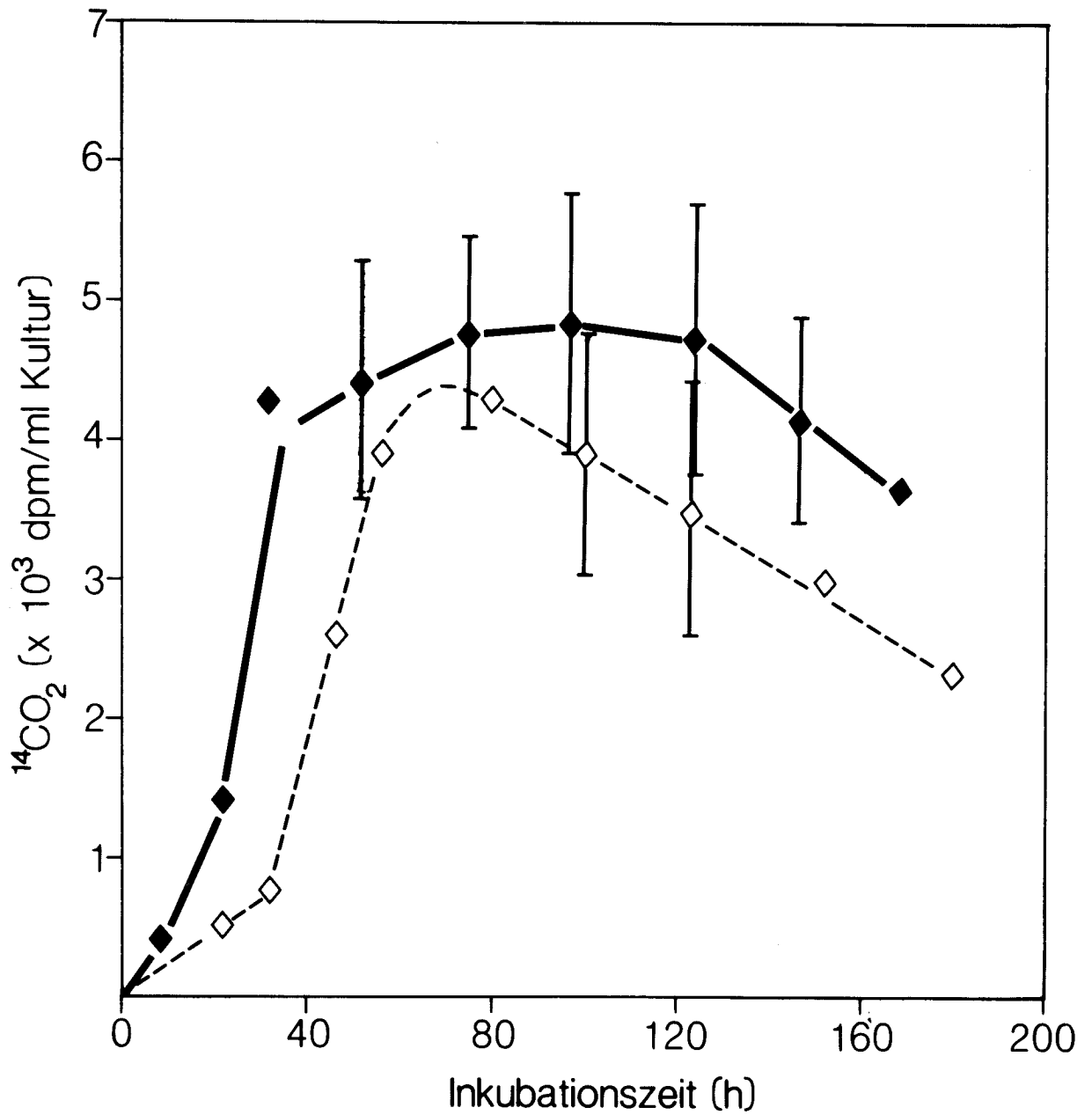


Abb. 16: $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung der mit und ohne Methionin (2.7 mM) gewachsenen Zellen
 (—) mit Methionin; (-----) ohne Methionin

4.4 Der Adenosin-Nucleotid-Gehalt der Zellen

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob eine erhöhte CO_2 -Bildung unter Einfluß des Methionins einen gesteigerten ATP-Gehalt bzw. erhöhten Energy Charge der Zellen zur Folge hatte.

Aus den Bestimmungen des Nucleotid-(AXP)-Gehaltes der Zellen geht hervor (Abb. 17), daß sich der AXP-Gehalt der mit und ohne Methionin kultivierten Zellen kaum unterschied. In beiden Fällen war eine vergleichbare Abnahme des ATP-Gehaltes ab der späten exponentiellen Phase (nach 30-40 h) von ca. 6-7 auf etwa 2 nmol/mg Zell-Trockengewicht feststellbar. Auch war der ADP-Gehalt unter beiden Kulturbedingungen über die Zeit vergleichbar: er blieb bis zum Ende des Wachstums (bis zu ca. 60 h) relativ konstant auf etwa 2-2.5 nmol/mg Zell-Trockengewicht und nahm bis zur mittleren stationären Phase (bis zur 120./140. h) um 1-1.5 nmol/mg Zell-Trockengewicht ab. AMP war erst in der späten Wachstums- bzw. frühen stationären Phase nachweisbar und erreichte einen Wert von maximal 1.5 nmol/mg Zell-Trockengewicht; nach etwa 120 h waren in beiden Extrakten nur noch ca. 0.2 nmol AMP/mg Zell-Trockengewicht enthalten.

Aus den ermittelten AXP-Werten wurde der Energy Charge der Zellen berechnet. Die Werte ergaben (Tab. 10), daß zu allen Zeitpunkten der Energy Charge relativ hoch war: er lag mit Werten zwischen 0.7-0.9 an der obersten Grenze des für den Erhalt des Lebens als notwendig angesehenen Bereiches von 0.5-0.8 (Knowles 1979).

Die Ergebnisse zeigen, daß ein erhöhter ATP-Gehalt bzw. Energy Charge von Zellen, die mit Methionin kultiviert worden waren, nicht nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise wird die durch erhöhte CO_2 -Bildung zusätzlich gewonnene Energie als Wärme an die Umgebung abgegeben, was kalorimetrisch erfaßt werden könnte. Eine andere Möglichkeit ist, daß unter Einfluß des Methionins bei vergleichbarem ATP-Gehalt der Energieumsatz ("turn-over") erhöht ist, der mit einer von Karl und Bossard (1985) entwickelten Methode (mit $^{32}\text{PO}_4$) bestimmt werden könnte.

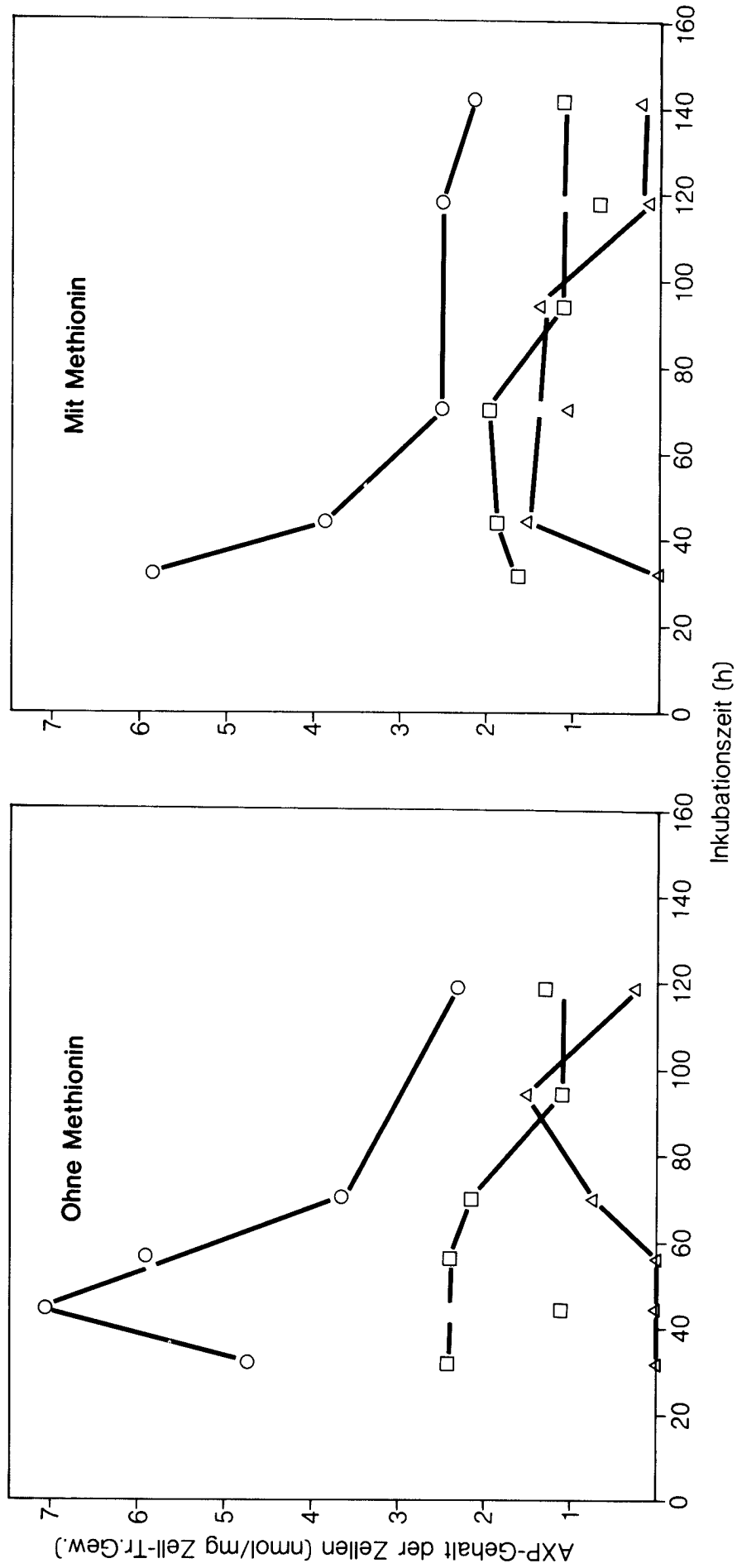


Abb. 17: AXP-Gehalt der mit und ohne Methionin (2.7 mM) kultivierten Zellen
(○—○) ATP; (□—□) ADP; (△—△) AMP.

Tab. 10: Energy Charge der mit und ohne Methionin (2.7 mM) kultivierten Zellen

Die Berechnung erfolgte mit den in Abb. 17 eingezeichneten AXP-Werten nach der Gleichung

$$E.C. = \frac{[ATP] + 0.5 [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Zeit (h)	Energy Charge	
	mit Methionin	ohne Methionin
32	0.89	0.83
44	0.66	0.82
56	0.72	0.85
70	0.63	0.72
118	0.86	0.76
140	0.77	

4.5 Enzyme des Glucose-Stoffwechsels

Wie gezeigt werden konnte, wirkt Methionin vermutlich nicht als Effektor auf Enzyme, sondern beeinflusst eher die Menge an gebildeten Enzymen. Damit müssen sich Zellen, mit und ohne Methionin kultiviert, durch unterschiedliche Enzymspiegel des Kohlenstoffmetabolismus auszeichnen. Es wurden deshalb einige katabole und anabole Enzyme bestimmt.

4.5.1 Enzyme des Katabolismus

Für X. campestris wird das in Abb. 2 dargestellte Glucose-Abbauschema angenommen: Neben einer Gluconat-DH, die die Umsetzung von Gluconat zu 2-Oxogluconat katalysiert, besitzt der Organismus auch die zur weiteren Umsetzung von Gluconat und 2-Oxogluconat notwendigen Enzyme Gluconat-Kinase, 2-Oxogluconat-Kinase und 2-Oxogluconat-Reduktase; dagegen konnte eine Glucose-DH, die die Glucose zu Gluconat umsetzt, bisher nicht nachgewiesen werden (Whitfield et al. 1982). Ferner ist bekannt, daß bei X. campestris der Glucose-Abbau über den Entner-Doudoroff-Weg erfolgt, wogegen der zur Bereitstellung

von Pentosen notwendige Pentose-Phosphat-Weg noch nicht nachgewiesen werden konnte (Whitfield 1979).

Zum Vergleich der spezifischen Aktivitäten einiger kataboler Enzyme in Rohextrakten von Zellen, die mit und ohne Methionin kultiviert worden waren, sollten zunächst die bei X. campestris bereits von Whitfield (1979) nachgewiesenen Enzyme Hexokinase und Glucose-6-P-DH bestimmt werden. Bei Versuchen, die Hexokinase nach dem von Ng und Dawes (1973) angegebenen Test mit Glucose-6-P-DH als Indikatorenzym zu messen fiel auf, daß bereits eine Reaktion allein mit Glucose als Substrat und NAD(P) als Coenzym nachweisbar war. Es wurde deshalb ein Gluconat-Nachweis durchgeführt, der bestätigte, daß während dieser Reaktion Gluconat gebildet wurde. Damit ist bewiesen, daß X. campestris eine Glucose-DH besitzt, die die Umsetzung von Glucose zu Gluconat mit NAD oder NADP als Coenzym katalysiert. Da während eines kontinuierlichen Hexokinase-Tests auch die Glucose-DH-Reaktion ablief, erfolgten die Aktivitätsbestimmungen der Hexokinase durch diskontinuierliche Bestimmungen des gebildeten Glucose-6-P.

Wie Tab. 11 zeigt, wurden in den Rohextrakten der mit und ohne Methionin kultivierten Zellen (Met^+ , Met^-) vergleichbare Hexokinase- und Glucose-6-P-DH-Aktivitäten bestimmt. Dagegen waren die Glucose-DH-Aktivitäten in den Met^+ -Rohextrakten sowohl mit NAD als auch mit NADP als Coenzym um das 2-3-fache geringer. Dieses Ergebnis zeigt, daß in den Methionin-kultivierten Zellen der verringerte Fluß von Glucose zu Gluconat offensichtlich nicht zu einer vermehrten Verfügbarkeit von Glucose-6-P für die Xanthansynthese führt. Die NAD-abhängige Glucose-DH-Aktivität nahm in den mit und ohne Methionin kultivierten Zellen mit zunehmendem Alter der Zellen sehr stark ab. Da sich die NADP-abhängige Glucose-DH-Aktivität dabei nicht proportional zur NAD-abhängigen verhielt, ist anzunehmen, daß 2 unterschiedliche Enzyme in X. campestris vorhanden sind; diese waren aber nicht durch Gelchromatographie mit G 200 zu trennen.

Tab. 11: Spezifische Aktivitäten einiger kataboler Enzyme (U/mg Protein)

Die mit und ohne Methionin kultivierten Zellen (Met^+ , Met^-) wurden in der exponentiellen Phase (Met^- : nach 50 und 66 h; Met^+ : nach 42 und 50 h) sowie in der stationären Phase (jeweils nach 116 und 140 h) geerntet und die spezifischen Aktivitäten nach Ultraschallaufschluß in den Rohextrakten bestimmt.

Zeitpunkt der Zellernte (h)	Glucose-DH		Hexo- kinase	Glucose-6-P-		Isocitrat-		6-P-Gluconat-		Trans- ketolase	Trans- aldolase
	NADP	NAD		NADP	DH	NAD	NADP	DH	NAD		
Met^- :	50	0.037	0.127	0.041	0.20	0.16	0.58	0.046	0.028	0.083	0.140
	66	0.045	0.144	0.047	0.22	0.17	0.67	0.049	0.045	0.110	0.130
	116	0.042	0.032	0.069	0.23	0.22	0.74	0.061	0.075	0.140	0.100
	140	0.028	0.011	0.082	0.28	0.27	0.66	0.039	0.073	0.110	0.055
Met^+ :	42	0.014	0.039	0.058	0.16	0.15	0.81	0.088	0.020	0.100	0.100
	50	0.027	0.084	0.052	0.13	0.12	0.37	0.045	0.035	0.105	0.053
	116	0.021	0.012	0.064	0.20	0.21	0.66	0.105	0.065	0.100	0.076
	140	0.017	0.005	0.071	0.21	0.22	0.55	0.069	0.058	0.076	0.069

Da die Zellen unter Einfluß des Methionins einen höheren CO_2 -Anteil bildeten, wurde das CO_2 -freisetzende Enzym Isocitrat-DH bestimmt. Es zeigte sich (Tab. 11), daß - mit Ausnahme des 50 h Wertes - die NAD-abhängige Isocitrat-DH-Aktivität in den Met^+ -Rohextrakten tatsächlich um etwa das Doppelte erhöht war. Ein weiteres CO_2 -freisetzendes Enzym ist die am Pentose-Phosphat-Weg beteiligte 6-P-Gluconat-DH. Dieses Enzym sowie die ebenfalls am Pentose-Phosphat-Weg beteiligten Enzyme Transketolase und Transaldolase konnten nachgewiesen werden; damit steht fest, daß auch der Pentose-Phosphat-Weg am Glucose-Metabolismus von X. campestris beteiligt ist. Die Zugabe von Methionin beeinflusste aber kaum die spezifischen Aktivitäten dieser Enzyme (Tab. 11). Nur bei der Transaldolase war - wie auch bei der Isocitrat-DH - nach 50 h ein ca. 50 %-iger Aktivitätsrückgang in den Met^+ -Rohextrakten zu verzeichnen; die Aktivitätswerte dieser beiden Enzyme waren in Zellen zunehmenden Alters wieder erhöht.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Glucose-DH, Hexokinase, Glucose-6-P-DH und 6-P-Gluconat-DH ergibt, daß einerseits die Glucose-DH-Aktivität um etwa das 15-fache abnahm, andererseits aber die Hexokinase- und 6-P-Gluconat-DH-Aktivität um etwa das 2-3-fache und die Glucose-6-P-DH-Aktivität um etwa das 1.5-fache zunahmen. Dies bedeutet möglicherweise, daß während der stationären Phase die Umsetzung von Glucose zu Gluconat über eine verminderte Enzymmenge "abgeschaltet" und die Glucose eher direkt aufgenommen wird; die zunehmenden Hexokinase-, 6-P-Gluconat-DH- und Glucose-6-P-DH-Aktivitäten weisen darauf hin, daß möglicherweise gleichzeitig ein beschleunigter Glucose-Abbau erfolgt.

Um zu prüfen, ob Methionin nicht als Effektor auf die in Tab. 11 angegebenen Enzyme wirkt, wurde es dem jeweiligen Testansatz in Konzentrationen von 7.5, 15.0 und 30.0 mM zugegeben. Die Zugabe bewirkte keine Aktivitätsveränderung dieser Enzyme.

4.5.2 Enzyme des Anabolismus

An der Synthese der für die Xanthanbildung notwendigen Zuckernucleotide GDP-Mannose, UDP-Glucose und UDP-Glucuronsäure sind die Enzyme GDP-Mannose-Pyrophosphorylase, UDP-Glucose-Pyrophosphorylase und UDP-Glucose-DH beteiligt (Abb. 3); bisher konnte jedoch bei X. campestris eine UDP-Glucose-DH, die die Bildung der UDP-Glucuronsäure aus UDP-Glucose katalysiert, nicht nachgewiesen werden (Whitfield 1979). Erste Versuche, dieses Enzym im Rohextrakt nachzuweisen, hatten keinen Erfolg; auffällig waren vor allem die vor Substratzugabe ablaufenden Blindreaktionen, die erst nach Entsalzen des Rohextraktes behoben werden konnten. Im entsalzten Rohextrakt war eine NAD-abhängige UDP-Glucose-DH nachweisbar. Für die Bestimmung der Zucker-aktivierenden Enzyme wurde deshalb generell entsalzter Rohextrakt verwendet. Es wurden weiterhin die Enzyme Phosphoglucoseisomerase und Phosphoglucomutase bestimmt.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten ergab, daß in den Rohextrakten der mit und ohne Methionin kultivierten Zellen ein auffallender Unterschied nur bezüglich der Phosphoglucomutase-Aktivitäten bestand. Dieses Enzym war unter Einfluß des Methionins während der exponentiellen Phase um das 2-3-fache geringer vorhanden (Tab. 12). Dies könnte darauf hinweisen, daß ein geringerer Glucose-6-P-Anteil zu Glucose-1-P umgesetzt werden kann, so daß Glucose-6-P eher in den katabolen Stoffwechsel eingeschleust würde. In der stationären Phase nimmt zwar die spezifische Aktivität der Phosphoglucomutase wieder zu, doch könnte die in diesem Zeitraum erhöhte Isocitrat-DH-Aktivität (Tab. 11) darauf hinweisen, daß Glucose-6-P auch weiterhin bevorzugt abgebaut wird. Dies würde andererseits eine verminderte Synthese der für die Xanthanbiosynthese notwendigen aktivierten Zucker bedeuten und damit die geringeren Xanthan-ausbeuten bzw. die erhöhte CO₂-Bildung erklären. Weiterhin fiel auf, daß im Vergleich zur UDP-Glucose-Pyrophosphorylase die spezifischen Aktivitäten der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase um das 3-6-fache erhöht waren (Tab. 12); auch die spezifische

Tab. 12: Spezifische Aktivitäten einiger anaboler Enzyme

Die mit und ohne Methionin kultivierten Zellen (Met^+ , Met^-) wurden in der exponentiellen Phase (Met^- : nach 50 und 66 h; Met^+ : nach 42 und 50 h) sowie in der stationären Phase (jeweils nach 116 und 140 h) geerntet und die spezifischen Aktivitäten nach Ultraschallaufschluß in den Rohextrakten bestimmt.

Zeitpunkt der Zellernte (h)	(U/mg Protein)				(mU/mg Protein)	
	Phospho- glucose- isomerase	GDP-Mannose Pyrophos- phorylase	Phospho- gluco- mutase	UDP-Glucose- Pyrophosphory- lase	UDP-Glucose- DH	UDP-Glucose- NAD
Met^- :	50	0.50	0.058	0.32	0.017	0.70
	66	0.49	0.102	0.45	0.024	1.00
	116	0.86	0.097	0.56	0.013	< 0.20
	140	1.12	0.047	0.37	0.008	< 0.20
Met^+ :	42	0.41	0.065	0.20	0.014	0.29
	50	0.48	0.040	0.14	0.014	< 0.20
	116	0.87	0.095	0.44	0.014	< 0.20
	140	1.05	0.049	0.35	0.006	< 0.20

Aktivität der an der Synthese von GDP-Mannose beteiligten Phosphoglucoseisomerase war gegenüber den Phosphoglucomutase-Aktivitäten um das 2-3-fache erhöht. Dies könnte für die Xanthanbiosynthese bedeuten, daß weniger die Synthese von GDP-Mannose, sondern eher die der aktivierten Zucker UDP-Glucose und UDP-Glucuronsäure limitiert ist.

Um zu testen, ob Methionin auch bei den gemessenen anabolen Enzymen nicht als Effektor wirkt, wurde es den jeweiligen Testansätzen in unterschiedlichen Konzentrationen (7.5, 15.0 und 30.0 mM) zugegeben. Eine Aktivitätsänderung konnte auch hier nicht beobachtet werden.

Die für UDP-Glucose-DH bestimmten Aktivitätswerte waren auffallend gering (Tab. 12). Um einen Hinweis zu bekommen, ob mit den gemessenen Enzymaktivitäten die ermittelten Xanthankonzentrationen gebildet werden können, wurden die spezifischen Aktivitäten der Zucker-aktivierenden Enzyme mit der Xanthansyntheserate verglichen. In Tab. 13 ist für den Zeitraum der ersten drei Bestimmungen die jeweilige Konzentrationszunahme des Xanthans angegeben; die Werte wurden der Abb. 9 entnommen. Die gebildete Xanthankonzentration wurde dann in die Konzentration an Gesamtmonomeren umgerechnet, wobei ein mittleres Molekulargewicht von 170 g/mol zugrunde gelegt wurde. Da die einzelnen Monomeren Mannose, Glucose und Glucuronsäure im Xanthan in einem Verhältnis von 2:2:1 enthalten sind, wurden die berechneten Konzentrationen an Gesamtmonomeren entsprechend aufgeteilt. An einem Beispiel soll erläutert werden, wie die spezifischen Aktivitäten ($\mu\text{mol gebildete Produkte/min/mg Protein}$) in die entsprechenden Syntheseraten ($\mu\text{mol synthetisierbare Produkte}/\Delta\text{h/ml Kultur}$) umgerechnet wurden: Die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase-Aktivität nahm in den Met⁻-Rohextrakten zwischen der 50. und 66. h der Kultivierung von 0.058 auf 0.102 U/mg Protein zu. Für diesen Zeitraum von 16 h kann damit eine durchschnittliche spezifische Aktivität von 0.08 U/mg Protein zugrunde gelegt werden. Die Proteinkonzentrationen lagen nach 50 h bei 6.2 mg/ml Rohextrakt, nach 66 h bei 7.9 mg/ml Rohextrakt.

Tab. 13: Vergleich der Xanthansyntheserate mit der spezifischen Aktivität der Zucker-aktivierenden Enzyme
(Die einzelnen Rechenschritte sind im Text näher erläutert).

Zeit- raum	Xanthan- zunahme	Σ Mono- mere	Mannose Glucose	Glucu- ronsäure	GDP-Mannose Pyrophosph.	UDP-Glucose Pyrophosph.	UDP-Glu- cose-DH
(Δh)	($\mu\text{g/ml}$ Kultur)	(μmol nachweisbare Produkte/ Δh / ml Kultur)	2	:	2	:	1
			(μmol nachweisbare Produkte/ Δh / ml Kultur)		(μmol synthetisierbare Produkte/ Δh / ml Kultur)		(F)*
Met ⁻ :	16	2 000	12.0	4.8	4.8	2.4	54 (11)
	50	4 500	26.5	10.6	10.6	5.3	186 (17)
Met ⁺ :	8	500	3.0	1.2	1.2	0.6	29 (24)
	66	3 250	19.0	7.6	7.6	3.8	222 (29)
							48 (6.0)
							0.14 (0.25)
							0.80 (0.20)

* F = $\frac{\mu\text{mol synthetisierbares Produkt}/\Delta h/\text{ml Kultur}}{\mu\text{mol synthetisierbares Produkt}/\Delta h/\text{ml Kultur}}$

Für den 16 h-Zeitraum kann damit eine durchschnittliche Proteinkonzentration von 7 mg/ml Rohextrakt angenommen werden. Da die Zellen aus etwa 100 ml Gesamtkultur nach dem Waschen in ca. 10 ml Puffer aufgenommen wurden (= 10-fache Konzentrierung), lag der Proteingehalt der Kultur innerhalb der 16 h bei durchschnittlich 0.7 mg/ml. Damit betrug die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase-Aktivität 0.056 U/0.7 mg Protein bzw. 0.056 U/ml Kultur; dies bedeutet, daß rechnerisch 0.056 μ mol GDP-Mannose/min/ml Kultur oder 54 μ mol GDP-Mannose/16 h/ml Kultur gebildet werden können. Die weiteren in Tab. 13 angegebenen Werte wurden entsprechend berechnet.

Ein Vergleich der rechnerisch ermittelten synthetisierbaren und nachweisbaren Produktkonzentrationen zeigt, daß die Pyrophosphorylasen unter optimalen Bedingungen einen größeren Anteil an Glucose und Mannose zur Verfügung stellen könnten als sich im Xanthan wiederfindet. Rein rechnerisch könnte unter Met^- -Bedingungen die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase einen um den Faktor 10-20, die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase einen um den Faktor 3-3.5 höheren Produktanteil bilden; unter Met^+ -Bedingungen beträgt der Faktor für GDP-Mannose-Pyrophosphorylase sogar 20-30, der für UDP-Glucose-Pyrophosphorylase 6-7. Jedoch ergibt sich rechnerisch ein Mangel an durch UDP-Glucose-DH synthetisierbarer Glucuronsäure: So wird im Xanthan ein 4-fach höherer Anteil gefunden, als theoretisch gebildet werden könnte. Dies kann bedeuten, daß für das Enzym in vivo günstigere Bedingungen vorliegen als in dem benutzten Test.

Die Aussagekraft dieser Berechnungen ist aber sehr begrenzt, da bei Übertragung auf in vivo-Verhältnisse vorausgesetzt werden muß, daß die Enzyme auch in vivo mit Substrat gesättigt sind und keiner Regulation unterliegen.

IV DISKUSSION

Eine optimale Xanthanbildung bei X. campestris erfolgt unter Stickstoff- bzw. Wachstums-limitierten Bedingungen (Souw und Demain 1979). Diese Voraussetzung ist durch das für X. campestris verwendete Mineralsalzmedium gegeben (Davidson 1978). Nach Zugabe von verschiedenen L-Aminosäuren zum Medium zeigte sich, daß Methionin bereits in sehr geringen Konzentrationen (ab 1.3 mM) die Xanthanausbeuten um ca. 40 % verringert. Dieser Effekt ist aber nicht bedingt durch eine vermehrte Verfügbarkeit von Stickstoff bzw. durch ein verbessertes Wachstum, da Glutamat, Glutamin oder Prolin die Xanthanausbeuten nicht reduzieren, wohl aber eine höhere Zelldichte ermöglichen. Auch zeigt das Experiment mit ^{14}C -markierter Glucose, daß kein höherer Anteil an Kohlenstoff in den mit Methionin kultivierten Zellen festgelegt wird. Methionin fördert aber den Kohlenstoff-Fluß in Richtung Katabolismus, da während der gesamten Kultivierungszeit im Vergleich zur Kontrolle ohne Methionin die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung verstärkt ist.

Da Zellen auch nach Entfernen des Methionins eine reduzierte Xanthanbildung zeigten, ist anzunehmen, daß Methionin die Synthese von Enzymen des Kohlenstoffmetabolismus beeinflusst. Die veränderten spezifischen Aktivitäten einiger Enzyme in Rohextrakten der in Anwesenheit von Methionin gewachsenen Zellen bestätigen dies: im Vergleich zur Kontrolle ist z.B. die Glucose-DH-Aktivität um das 2-3-fache verringert, die Aktivität der NAD-abhängigen Isocitrat-DH dagegen um das Doppelte erhöht. Da die Isocitrat-DH ein CO_2 -freisetzendes Enzym ist, stimmen die erhöhten Aktivitätswerte mit der erhöhten $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung überein. Untersuchungen bei Streptomyces albogriseolus bestätigen, daß die Enzymsynthese prinzipiell durch Aminosäuren beeinflussbar ist: dieser Organismus produziert die zur Umsetzung von D-Glucose zu D-Fructose notwendige Glucose-Isomerase, deren Bildung durch Zugabe von Aspartat erhöht, dagegen durch Glutamat verringert wird (Gavristov et al. 1985).

Es ist anzunehmen, daß kein Abbau- oder Syntheseprodukt, sondern Methionin selbst die Xanthansynthese beeinflusst, da einige nicht metabolisierbare Analoga einen ähnlichen Effekt ausüben. Es ist bekannt, daß Methionin auch bei anderen biologischen Systemen hemmend wirken kann: so wird die Glykolyse bei verschiedenen Tumor-Zelllinien (aus Rattenleber) zu 70 % durch Methionin gehemmt; auch hier wird vermutet, daß Methionin selbst die Glykolyse beeinflusst, da auch Cycloleucin und andere Analoga den gleichen Hemmeffekt zeigen (Boerner und Racker 1985, Resnick et al. 1986).

Bisher ist über die Xanthanbiosynthese nur wenig bekannt; so gibt es keine Kenntnisse zu den am Biosyntheseweg beteiligten Enzymen (Transferasen, Polymerasen) und deren Regulation, zu Transportmechanismen und Terminationsschritten sowie zum Vorgang der Polymerisation. Ferner ist auch die Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus unbekannt, obwohl dieser eine besondere Bedeutung zukommt; denn aus der Kohlenstoff-Quelle werden nicht nur die für die Biosynthese des Xanthans notwendigen Vorstufen zur Verfügung gestellt, sondern der Kohlenstoff dient auch der Energiegewinnung und Synthese von Zellbestandteilen. Da die Xanthanbildung durch Methionin beeinflusst werden kann, ist die Möglichkeit gegeben, vergleichende enzymatische Untersuchungen durchzuführen, um damit Hinweise zur Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus zu erhalten. Es sind zunächst einige, bisher noch nicht nachgewiesene Enzyme im Glucose-Stoffwechsel von X. campestris gefunden worden (Abb. 18): so besitzt der Organismus eine NAD(P)-abhängige Glucose-DH, von der angenommen werden kann, daß sie wie bei Pseudomonas aeruginosa am Periplasma lokalisiert ist (Midgley und Dawes 1973). Auch die UDP-Glucose-DH, die die Bildung der für die Xanthanbiosynthese erforderliche UDP-Glucuronsäure aus UDP-Glucose katalysiert, konnte nachgewiesen werden. Weiterhin ist auch die 6-P-Gluconat-DH sowie Transketolase und Transaldolase nachweisbar, so daß nicht nur der KDPG-Weg, sondern auch der Pentose-Phosphat-Weg am Substratabbau in X. campestris beteiligt ist. Da bei X. juglandis, X. pruni, X. phaseoli und einigen anderen Xanthomonas-Arten der

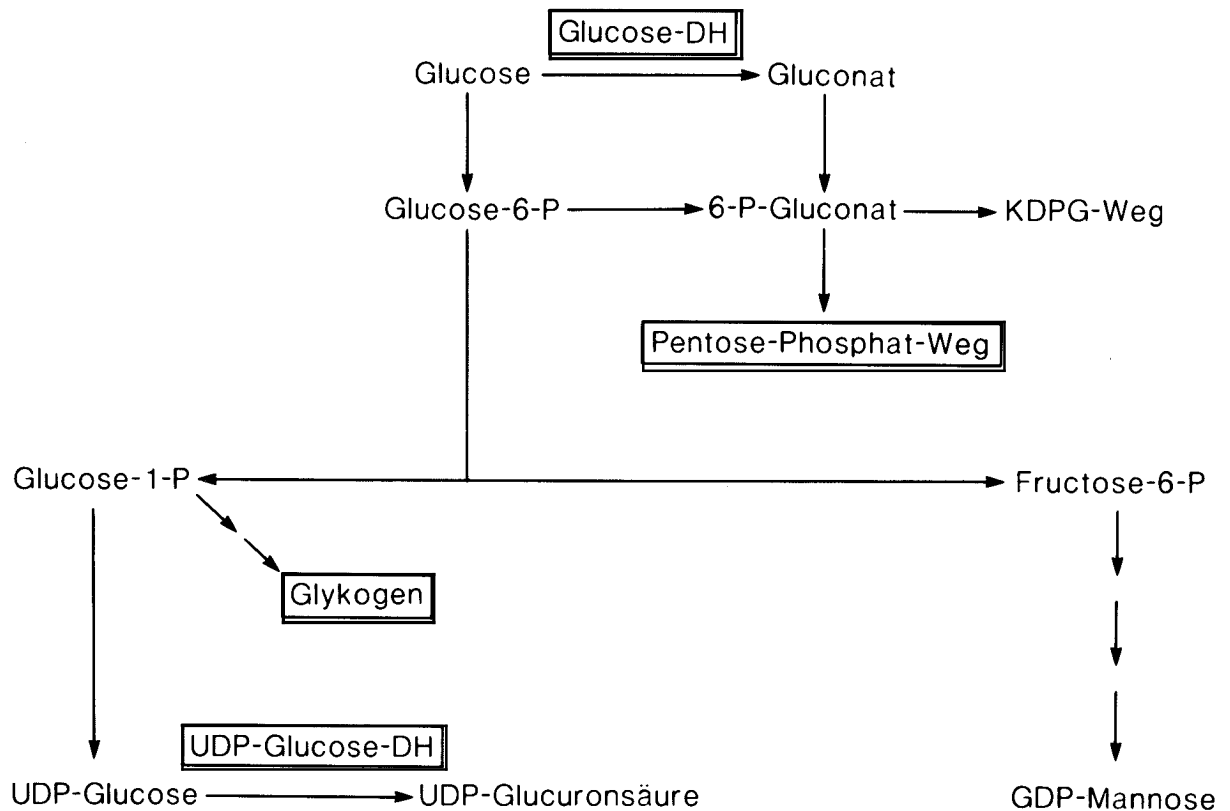


Abb. 18: Ergänzungen zum Glucose-Stoffwechsel bei *X. campestris*

überwiegende Teil der Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut und nur ein Glucose-Anteil von 8-16 % über den Pentose-Phosphat-Weg umgesetzt wird (Zagallo und Wang 1967), trifft dies möglicherweise auch für *X. campestris* zu.

Zur Regulation der Xanthanbildung bzw. des Glucose-Metabolismus ist für *X. campestris* das in der Einleitung vorgestellte Modell (Abb. 5) entwickelt worden (Sutherland 1977). Unter den dort genannten Regulationsmöglichkeiten sollen die folgenden Punkte anhand der erzielten Ergebnisse näher diskutiert werden:

- die Kontrolle der Substrat-Aufnahme
- die Regulation auf der Hexose-Phosphat-Ebene
- die Verfügbarkeit der Zuckernucleotide.

Da X. campestris eine Glucose-DH besitzt, hat der Organismus 2 Möglichkeiten die Glucose aufzunehmen und in den Kohlenstoffmetabolismus einzuschleusen. Damit könnte bereits auf dieser Stufe die erste Möglichkeit einer Kontrolle bestehen. Auffällig ist, daß nach Beendigung des Wachstums und mit steigender Xanthanproduktion die Glucose-DH-Aktivität abnimmt, dagegen die Hexokinase-, Glucose-6-P-DH- und vor allem die 6-P-Gluconat-DH-Aktivität zunehmen. Inwieweit diese Aktivitätsveränderungen die Xanthansynthese beeinflussen bzw. dafür sogar erforderlich sind, läßt sich nicht entscheiden. Eine Regulation der Substrataufnahme bei X. campestris könnte wie bei Pseudomonas aeruginosa erfolgen (Abb. 2): Dieser Organismus metabolisiert in Gegenwart hoher Glucose-Konzentrationen (über 20 mM) ein Teil der Glucose extrazellulär zu Gluconat (Midgley und Dawes 1973, Roberts et al. 1973). Gleichzeitig wird der Gluconat-Transport, die Gluconat-Kinase und die Gluconat-DH induziert (Hunt und Phibbs 1983). Die Produktionsrate der extrazellulären Metabolite Gluconat und 2-Oxogluconat übersteigt die Aufnahmerate in die Zelle (Dawes et al. 1975), so daß Gluconat und 2-Oxogluconat akkumulieren; dies hat zur Folge, daß der Glucose-Transport reduziert abläuft (Whiting et al. 1976a). Geringer werdende Glucose-Konzentrationen und eine abnehmende Sauerstoffversorgung der Zellen führen dazu, daß die extrazelluläre Metabolisierung von Glucose "abgeschaltet" wird, d.h. der Transport von Gluconat und 2-Oxogluconat sowie die Aktivität der Glucose-DH, Gluconat-DH, Gluconat- und 2-Oxogluconat-Kinase und der 2-Oxogluconat-Reduktase nehmen ab; dagegen nimmt der Glucose-Transport wieder zu, wobei gleichzeitig erhöhte spezifische Aktivitäten der katabolen Enzyme Hexokinase und Glucose-6-P-DH feststellbar sind (Whiting et al. 1976b, Mitchell und Dawes 1982, Dawes 1985). Möglicherweise liegt auch bei X. campestris ein ähnlicher oder sogar gleicher Umschaltmechanismus vor. Die abnehmenden Glucose-DH-Aktivitäten sprechen dafür, daß wie bei P. aeruginosa die Umsetzung von Glucose zu Gluconat über eine verminderte Enzymmenge "abgeschaltet" und Glucose eher direkt aufgenommen wird; die wie bei P. aeruginosa beobachteten zunehmenden Aktivitäten

einiger kataboler Enzyme (Hexokinase, 6-P-Gluconat-DH und Glucose-6-P-DH) deuten darauf hin, daß möglicherweise gleichzeitig ein beschleunigter Glucose-Abbau erfolgt. Ferner sind auch bei X. campestris die für diesen Umschaltmechanismus notwendigen Voraussetzungen (geringer werdende Glucose-Konzentrationen und abnehmende Sauerstoffversorgung der Zellen) gegeben; denn mit zunehmender Xanthanproduktion nimmt auch die Glucose-Konzentration ab und die Viskosität des Mediums zu, was vermutlich auch zu einer limitierten Sauerstoffversorgung der Zellen führt (Behrens et al. 1977, Banks und Browing 1984, Schindler et al. 1984).

Es ist weiterhin fraglich, inwieweit ein erhöhter oder verminderter Glucose-Transport die Xanthanbildung beeinflusst. In den mit Methionin gewachsenen Zellen wurde eine erhöhte Glucose-DH-Aktivität erwartet. Die Vorstellung war, daß durch eine verstärkte Umsetzung von Glucose zu Gluconat weniger Glucose-6-P für die Xanthansynthese zur Verfügung steht. Dafür spricht auch der in stationären Zellen geringere Glucose-6-P-Gehalt. Überraschenderweise zeigt jedoch ein Vergleich der Glucose-DH-Aktivitäten, daß mit Methionin die Enzymkonzentration über die gesamte Kultivierungszeit um das 2-3-fache vermindert ist. Offensichtlich sind also gerade erhöhte Glucose-DH-Aktivitäten für die Xanthanbildung günstig. Inwieweit dies tatsächlich zutrifft, könnten Studien mit gezielt veränderten Organismen zeigen, z.B. Mutanten ohne Glucose-DH oder solche mit einem deutlich erhöhten Enzymspiegel.

Auf der Hexose-Phosphat-Ebene müssen in X. campestris komplex ablaufende Regulationsmechanismen angenommen werden (Sutherland 1977): Das aus der Glucose durch die Hexokinase gebildete Glucose-6-P wird entweder in katabole oder anabole Stoffwechselprozesse eingeschleust. Für den Anabolismus wird Glucose-6-P entweder über Phosphoglucomutase zu Glucose-1-P oder über Phosphoglucoseisomerase zu Fructose-6-P umgesetzt. Auch auf der Ebene dieser Phosphatzucker verzweigt sich der Stoffwechsel weiter; denn aus beiden Phosphatzuckern müssen die für die Zellwand-, Lipopolysaccharid- und Xanthansynthese notwendigen aktivierten Zucker bereitgestellt werden.

Da nachgewiesen werden konnte, daß X. campestris noch ein weiteres, intrazellulär vorkommendes Polysaccharid, den Speicherstoff Glykogen, synthetisiert, muß auf der Ebene von Glucose-1-P eine weitere Reaktionssequenz zugefügt werden; denn der für die Synthese des Glykogens notwendige aktivierte Zucker ADP-Glucose wird aus Glucose-1-P durch ADP-Glucose-Pyrophosphorylase gebildet. Aus ADP-Glucose wird dann durch die Glykogen-Synthase das Glykogen synthetisiert (Schlegel 1981).

Während zur Regulation der Xanthansynthese auf der Hexose-Phosphat-Ebene keine Untersuchungen vorliegen, ist bezüglich der Glykogensynthese folgendes bekannt: Bei Bakterien, die wie X. campestris Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg abbauen, wird die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase durch Glucose-6-P und Fructose-6-P aktiviert. Fructose-6-P wird dabei im Laufe des in Abb. 19 dargestellten Cyclus aus Glycerinaldehyd-P und Dihydroxyaceton-P gebildet (Preiss 1969, Lessie und Phibbs 1984).

Untersuchungen bei X. phaseoli lassen annehmen, daß dieser Cyclus auch in Xanthomonas-Zellen abläuft (Hochster und Katznelson 1958). Die Bildung von Glucose-6-P und Fructose-6-P wird durch einen hohen Energy Charge bzw. hohen ATP-Gehalt der Zellen begünstigt, indem die Glucose-6-P-DH durch ATP gehemmt wird und die Phosphoglucoseisomerase-Aktivität ansteigt (Lessie und Neidhardt 1967, Preiss 1969, 1978).

Diese Voraussetzungen sollten analog auch bei X. campestris gegeben sein: Für eine begünstigte Bildung von Fructose-6-P und Glucose-6-P sprechen sowohl die hohen Energy Charge-Werte (0.7-0.9) als auch die hohen Phosphoglucoseisomerase- und Phosphoglucomutase-Aktivitäten (0.5-1 U/mg Protein und 0.3-0.6 U/mg Protein). Diese für die Glykogensynthese notwendigen Voraussetzungen sind auch dann noch gegeben, wenn kein Glykogen mehr synthetisiert, aber weiter Xanthan gebildet wird. Dies kann bedeuten, daß für die Xanthansynthese die gleichen Voraussetzungen erforderlich sind, zumal Fructose-6-P zur Bildung der GDP-Mannose und Glucose-6-P bzw. Glucose-1-P zur Bildung der UDP-Glucose und UDP-Glucuronsäure verfügbar sein müssen.

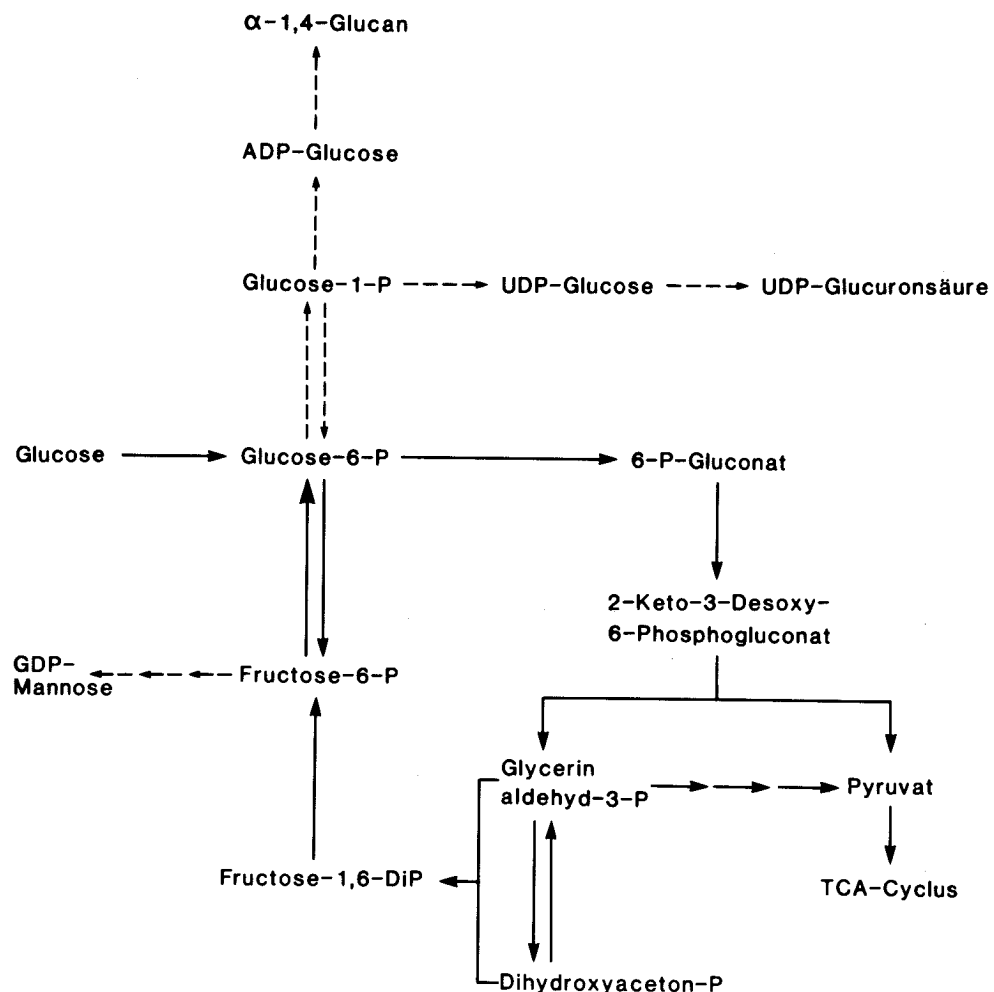


Abb. 19: Recycling von Glycerinaldehyd-3-P über den Entner-Doudoroff-Weg

In Anwesenheit von Methionin ist die Phosphoglucomutase-Aktivität zum Teil um das 2-3-fache verringert. Möglicherweise wird damit weniger Glucose-6-P zu Glucose-1-P umgesetzt und Glucose-6-P verstärkt in den katabolen Stoffwechsel eingeschleust. Dafür sprechen auch die erhöhten NAD-abhängigen Isocitrat-DH-Aktivitäten bzw. die erhöhte CO_2 -Bildung der mit Methionin gewachsenen Zellen. In der stationären Phase nimmt zwar die Phosphoglucomutase-Aktivität wieder zu, doch ist auch die Isocitrat-DH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle in diesem Zeitraum um das Doppelte erhöht. Dies könnte darauf hinweisen, daß Glucose-6-P auch weiterhin bevorzugt abgebaut

wird, wofür auch der in stationären Zellen geringere Glucose-6-P-Gehalt spricht. Dies würde andererseits eine verminderte Synthese der für die Xanthanbildung notwendigen aktivierten Zucker bedeuten und damit die geringeren Xanthanausbeuten bzw. die erhöhte CO_2 -Bildung erklären.

Die geringeren Phosphoglucomutase-Aktivitäten in den Rohextrakten der mit Methionin gewachsenen Zellen könnten weiterhin darauf hinweisen, daß diese Enzymreaktion eventuell der oder ein limitierender Schritt in der Xanthanbiosynthese ist. Diese Annahme wird durch den Befund unterstützt, daß sowohl in den mit als auch ohne Methionin gewachsenen Zellen Glucose-1-P nicht nachweisbar ist, was für einen unmittelbaren Verbrauch des Phosphatzuckers in den Folgereaktionen spricht. Dies kann bedeuten, daß die vorhandenen Phosphoglucomutase-Konzentrationen nicht ausreichen, um genügend Glucose-1-P aus Glucose-6-P nachzuliefern.

Wenn dieses Modell stimmt, könnte mit Hilfe genetischer Methoden versucht werden, die Phosphoglucomutase-Aktivitäten in X. campestris zu erhöhen, was eventuell zu höheren Xanthanausbeuten führt. Obwohl im Vergleich zum gebildeten Xanthan (6 bzw. 10-12 g/l) nur sehr geringe Glykogenmengen synthetisiert werden (0.4 g/l), könnte eine zusätzliche Verstärkung des Kohlenstoff-Flusses in Richtung UDP-Glucose in Glykogen-minus-Mutanten erreicht werden.

Die Bestimmung der Zucker-aktivierenden Enzyme ergab, daß die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase-Aktivität während der Kultivierung deutlich zunimmt; bis zur stationären Phase steigt die Konzentration von 0.06 auf 0.1 U/mg Protein an. Im Vergleich dazu wurden relativ geringe UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivitäten gemessen; diese erreichen am Ende des Wachstums einen maximalen Wert von 0.024 U/mg Protein und nehmen nach Beendigung des Wachstums sofort wieder ab. Sowohl die vergleichsweise höheren GDP-Mannose-Pyrophosphorylase-Aktivitäten als auch die - im Vergleich zur Phosphoglucomutase - höheren Phosphoglucoseisomerase-Aktivitäten könnten darauf hinweisen bzw. bestätigen, daß für die Xanthanbiosynthese weniger die Reaktionsschritte in Richtung GDP-Mannose limi-

tiert sind, sondern daß eher der Reaktionsablauf in Richtung UDP-Glucose/UDP-Glucuronsäure verstärkt werden muß, wenn höhere Xanthanausbeuten erreicht werden sollen. Um dazu weiterführende Informationen zu erhalten, ist es notwendig, sowohl die intrazellulären Substratkonzentrationen für Flußberechnungen als auch die K_M -Werte der zu den aktivierten Zuckern führenden Enzyme zu bestimmen.

Bei X. campestris nehmen die spezifischen Aktivitäten der an der Vorstufenbildung beteiligten Enzyme mit der Xanthanbildung zu. Dies wurde auch bei Azotobacter vinelandii bezüglich der Alginatproduktion beobachtet, so daß angenommen wird, daß die Alginatsynthese durch Repression und Derepression der Vorstufen-bildenden Enzyme kontrolliert wird (Horan et al. 1981); denn bei anderen Organismen, wie z.B. Klebsiella aerogenes (Norval und Sutherland 1973) und Pseudomonas NCIB 11264 (Williams und Wimpenny 1980), sind die an der Vorstufenbildung beteiligten Enzyme konstitutiv, unabhängig davon, ob Exopolysaccharide gebildet werden oder nicht.

Ein Vergleich der Xanthansyntheserate mit der spezifischen Aktivität der Zucker-aktivierenden Enzyme ergab, daß UDP-Glucose-Pyrophosphorylase unter optimalen Bedingungen einen 3-3.5-fach, GDP-Mannose-Pyrophosphorylase einen 10-20-fach höheren Produktanteil bilden könnten, als für die ermittelte Xanthansyntheserate erforderlich ist. Eine Übertragung auf in vivo-Verhältnisse setzt aber voraus, daß die Enzyme auch in vivo mit Substrat gesättigt sind und keiner Regulation unterliegen. Es kann jedoch eine Regulation dieser Enzyme nicht ausgeschlossen werden. Bei einigen Organismen sind zur Regulation derjenigen Enzyme, die an der Bildung der für die Lipopolysaccharidsynthese benötigten aktivierten Zucker beteiligt sind, bereits Untersuchungen durchgeführt worden: Beispielsweise wird in E. coli TDP-Glucose-Pyrophosphorylase, die Glucose-1-P zu TDP-Glucose umsetzt, durch UDP-Glucose und UDP-Glucose-Pyrophosphorylase durch TDP-Glucose gehemmt (Bernstein und Robbins 1965). Ähnliche Regulationsmechanismen sind auch bei Aerobacter aerogenes und bei einigen Salmonella-Arten gefunden worden (Kornfeld und Ginsburg 1966).

Ferner muß auch berücksichtigt werden, daß neben der Xanthansynthese zusätzlich die Zellwand- und Lipopolysaccharidsynthese von der Bereitstellung entsprechender Zuckernucleotide abhängig ist (Abb. 20). So sind in den Lipopolysacchariden von X. campestris die Zuckerbestandteile Glucose, Mannose, Galactose, Galacturonsäure, daneben auch Rhamnose, 2-Keto-3-Desoxyoctonat (dessen Synthese von Ribulose-5-P ausgeht) sowie 3-Acetamido-3,6-Didesoxygalactose enthalten (Volk 1966, 1968a und b, Hickmann und Ashwell 1966). Es ist daher anzunehmen, daß die gesamten, für die Xanthansynthese notwendigen aktivierten Vorstufen während des Wachstums auch für die Lipopolysaccharidbildung verfügbar sein müssen. Die UDP-Glucuronsäure geht zwar nicht direkt in die Lipopolysaccharidsynthese ein, muß aber für die Bildung der UDP-Galacturonsäure bereitgestellt werden. Dagegen werden GDP-Mannose und UDP-Glucose direkt benötigt, wobei aus UDP-Glucose noch zusätzlich die aktivierte Vorstufe UDP-Galactose gebildet wird (Ginsburg 1964).

Bisher konnten auch die direkt an der Xanthansynthese beteiligten Enzyme (wie Transferasen und Polymerasen) sowie die für den Export des Xanthans zuständigen Enzyme nicht bestimmt werden. Auch diese letzten Schritte der Xanthanbiosynthese könnten limitierend sein.

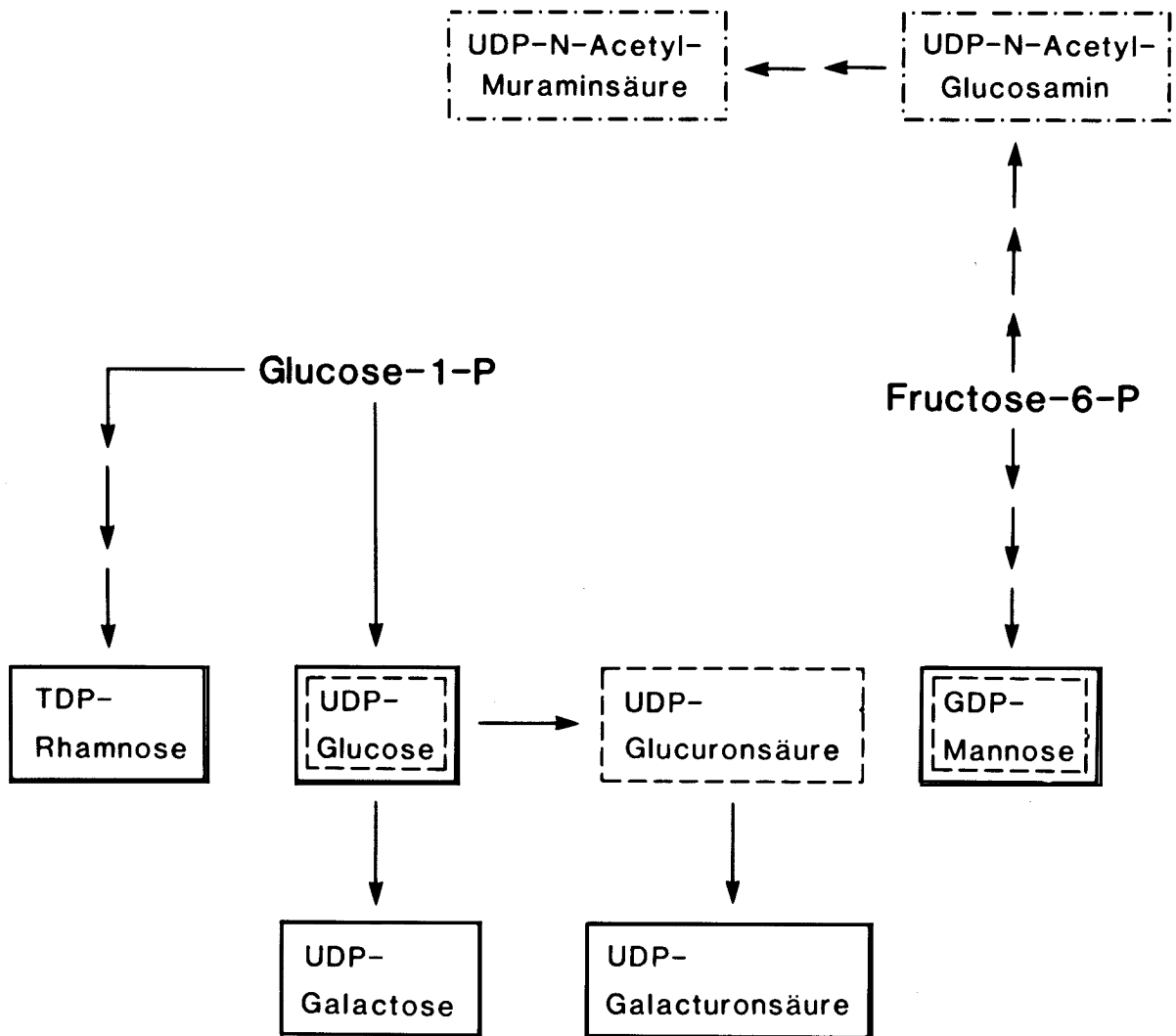


Abb. 20: Aktivierter Vorstufen, die für die Zellwand- (·-·-·-·), Lipopolysaccharid- (—) und Xanthansynthese (----) bei X. campestris benötigt werden.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst nach Möglichkeiten zur Beeinflussung der Xanthanbildung gesucht, um durch weitere Untersuchungen das Verständnis zum Glucose-Metabolismus in X. campestris zu vertiefen.

1. Es wurde gefunden, daß X. campestris nach Zugabe geringer Methioninkonzentrationen (ab 1.3 mM) etwa 40 % weniger Xanthan bildet als in Kontrollen. Dies ist auch nach Zugabe von Methionin-Analoga der Fall.
2. Unter Einfluß des Methionins treten vermehrt niedermolekulare extrazelluläre Zucker auf, die wahrscheinlich nur aus Glucose bestehen und aus 3-4 bzw. 10-12 monomeren Zuckereinheiten zusammengesetzt sind. Zusätzlich konnte als intrazelluläres Polysaccharid Glykogen nachgewiesen werden. Der Glykogengehalt der Zellen wird durch Methionin nicht beeinflußt.
3. Eine mit ^{14}C -Glucose durchgeführte C-Bilanz ergab, daß Methionin die Oxidation von Glucose zu CO_2 fördert, aber kein höherer Anteil an Kohlenstoff in den mit Methionin kultivierten Zellen festgelegt wird.
4. Enzymatische Untersuchungen zeigten, daß in X. campestris neben dem KDPG-Weg auch der Pentose-Phosphat-Weg am Glucose-Abbau beteiligt ist. Ferner konnte erstmalig eine Gluconat-DH und UDP-Glucose-DH nachgewiesen werden.
5. Unter Einfluß des Methionins ist die spezifische Aktivität der CO_2 -freisetzenden NAD-abhängigen Isocitrat-DH um das Doppelte erhöht, dagegen die Phosphoglucomutase-Aktivität während des Wachstums um das 2-3-fache verringert. Dies kann bedeuten, daß weniger Glucose-6-P zu Glucose-1-P umgesetzt und Glucose-6-P verstärkt in den katabolen Stoffwechsel eingeschleust wird. In der stationären Phase

nimmt zwar die Phosphoglucomutase-Aktivität wieder zu, doch bleibt die Isocitrat-DH-Aktivität erhöht. Möglicherweise wird damit Glucose-6-P auch weiterhin bevorzugt abgebaut, wofür auch ein in stationären Zellen nachweisbar geringerer Glucose-6-P-Gehalt spricht. Dies würde eine verminderte Synthese der für die Xanthanbildung notwendigen aktivierten Zucker bedeuten und damit die geringeren Xanthanausbeuten bzw. die erhöhte CO_2 -Bildung unter Einfluß des Methionins erklären.

6. Aus den Ergebnissen lassen sich Vorschläge zur Erhöhung des Kohlenstoff-Flusses in Richtung Xanthanbiosynthese ableiten.

VI LITERATUR

- Amemura, A. Hisamatsu, M., Harada, T. (1977): Spontaneous mutation of polysaccharide production in Alcaligenes faecalis var. myxogenes 10C3.
Appl. Environm. Microbiol. **34**: 617-620
- Banks, G., Browning, P.D. (1984): Fermentation process for the production of polysaccharides.
Europäisches Patent 0 112 661
- Behrens, U. Makarskij, A., Ambrosius, J., Franke, R. (1977): Stickstoffverwertung und Xanthanbildung bei Xanthomonas campestris.
Zeitsch. Allg. Mikrobiol. **17**: 339-345
- Bensadoun, A., Weinstein, D. (1976): Assay of proteins in the presence of interfering materials.
Anal. Biochem. **70**: 241-250
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Graßl, M. (1974): Enzyme als biochemische Reagentien.
In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse I. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße: 454-558
- Bernstein, R.L., Robbins, P.W. (1965): Control aspects of uridine 5'-diphosphate glucose and thymidine 5'-diphosphate glucose synthesis by microbial enzymes.
J. Biol. Chem. **240**: 391-397
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acid. Res. **7**: 1513-1523
- Boerner, P., Racker, E. (1985): Methionine-sensitive glycolysis in transformed cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 6750-6754

- Bradbury, J.F. (1984): Genus II. Xanthomonas.
In: Holt, J.G., Krieg, N.R. (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1. Williams & Wilkins, Baltimore, London: 199-210
- Brand, K. (1974): Transaldolase.
In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse I. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße: 752-756
- Brin, M. (1974): Transketolase.
In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse I. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße: 744-751
- Cadmus, M.C., Rogovin, S.P., Burton, K.A., Pittsley, J.E., Knutson, C.A., Jeanes, A. (1976): Colonial variation in Xanthomonas campestris NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain.
Can. J. Microbiol. **22**: 942-948
- Chu, S.-T., Tseng, Y.-H. (1981): Release of alkaline phosphatase from cells of Xanthomonas oryzae by manipulation of surface permeability.
Chinese J. Microbiol. Immunol. **14**: 156-166
- Chu, S.-T., Tseng, Y.-H. (1984): Characterization of phosphatases in Xanthomonas campestris pv. oryzae.
J. Chinese Biochem. Soc. **13**: 60-69
- Chun, W.W.C., Alvarez, A.M. (1983): A starch-methionine medium for isolation of Xanthomonas campestris pv. campestris from plant debris in soil.
Plant Disease **76**: 632-635
- Civerolo, E.L. (1985): Indigenous plasmids in Xanthomonas campestris pv. citri.
Phytopathol. **75**: 524-528

- Datta, P. (1969): Regulation of branched biosynthetic pathways in bacteria.
Proc. Nat. Acad. Sci. **52**: 1004-1012
- Davidson, I.W. (1978): Production of polysaccharide by Xanthomonas campestris in continuous culture.
FEMS Microbiol. Lett. **3**: 347-349
- Dawes, E.A., Senior, P.J. (1973): The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms.
In: Rose, A.H., Tempest, D.W. (Hrsg.): Advances in Microbial Physiology **10**: 135-262
- Dawes, E.A., Midgley, M., Whiting, P.H. (1975): Control of transport systems for glucose, gluconate and 2-oxo-gluconate, and of glucose metabolism in Pseudomonas aeruginosa.
In: Dean, A.C.R., Ellwood, D.C., Evans, C.G.T., Melling, J. (Hrsg.): Continuous Culture 6: Applications and New Fields. Ellis Horwood Ltd., Chichester: 195-207
- Dawes, E.A. (1985): The effect of environmental oxygen concentration on the carbon metabolism of some aerobic bacteria.
In: Kulaev, I.S., Dawes, E.A., Tempest, D.W. (Hrsg.): Environmental regulation of microbial metabolism.
Academic Press, London: 121-125
- Eidels, L., Preiss, J. (1970): Carbohydrate metabolism in Rhodopseudomonas capsulata: enzyme titers, glucose metabolism, and polyglucose polymer synthesis.
Arch. Biochem. Biophys. **140**: 75-89
- Finan, T.M., Kunkel, B., DeVos, G.F., Signer, E.R. (1986): Second symbiotic megaplasmid in Rhizobium meliloti carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes.
J. Bacteriol. **167**: 66-72

- Gavristov, A.V., Afanas'eva, V.P., Zhitskaya, E.A., Golovina, N.S., Nakhapetyan, L.A. (1985): Influence of vitamins and certain amino acids on the biosynthesis of glucose isomerase by a culture of Streptomyces albogriseolus. Microbiol. **54**: 43-49
- Gibbons, R.J., Kapsimalis, B. (1963): Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by Streptococcus mitis. Arch. Oral Biol. **8**: 319-329
- Ginsburg, V. (1964): Sugar nucleotides and the synthesis of carbohydrates. Adv. Enzymol. Rel. Sub. Biochem. **26**: 35-88
- Govan, J.R.W., Fyfe, J.A.M. (1978): Muroid Pseudomonas aeruginosa and cystic fibrosis: resistance of the muroid form to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of muroid variants in vitro. J. Antimicrob. Chemother. **4**: 233-240
- Govan, J.R.W., Fyfe, J.A.M., Jarmann, T.R. (1981): Isolation of alginate-producing mutants of Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida and Pseudomonas mendocina. J. Gen. Microbiol. **125**: 217-220
- Grellert, E., Ballou, C.E. (1972): Biosynthesis of a mycobacterial lipopolysaccharide. J. Biol. Chem. **247**: 3236-3241
- Guirard, B.M., Snell, E.E. (1981): Biochemical factors in growth. In: Gerhardt, P. (Hrsg.): Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington DC: 79-111

- Haas, M.J., Fett, W.F. (1985): Preliminary investigations of the molecular basis of plant pathogenesis by Xanthomonas campestris pv. glycines.
190th ACS National Meeting, Chicago, Illinois, September 8-13, Abstract of Papers No. 49
- Hamacher, K., Sahm, H. (1985): Characterization of enzymatic degradation products of carboxymethyl cellulose by gel chromatography.
Carbohydr. Polymers **5**: 319-327
- Herbert, D., Phipps, P.J., Strange, R.E. (1971): Chemical analysis of microbial cells.
In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Hrsg.): Methods in Microbiology 5B, Academic Press, London, New York: 209-344
- Hickmann, J., Ashwell, G. (1966): Isolation of a bacterial lipopolysaccharide from Xanthomonas campestris containing 3-acetamido-3,6-dideoxy-D-galactose and D-rhamnose.
J. Biol. Chem. **241**: 1424-1428
- Hisamatsu, M., Ott, I., Amemura, A., Harada, T. (1977): Change in ability of Agrobacterium to produce water-soluble and water-insoluble β -glucans.
J. Gen. Microbiol. **103**: 375-379
- Hochster, R.M., Katznelson, H. (1958): On the mechanism of glucose-6-phosphate oxidation in cell-free extracts of Xanthomonas phaseoli (XP8).
Can. J. Biochem. Physiol. **36**: 669-689
- Holme, T. (1957): Continuous culture studies on glycogen synthesis in Escherichia coli B.
Acta Chem. Scand. **11**: 763-775

- Holt, M.S. (1978): Production of exopolysaccharide by washed cell suspensions of Xanthomonas campestris.
Ph. M. Thesis, Microbiology Division, Shell Research Ltd., Sittingbourne, Kent
- Horan, N.J., Jarman, T.R., Dawes, E.A. (1981): Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of Azotobacter vinelandii and on the enzymes involved in its biosynthesis.
J. Gen. Microbiol. 127: 185-191
- Hunt, J.C., Phibbs, P.V. (1983): Regulation of alternate peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol. 154: 793-802
- Ielpi, L., Couso, R.O., Dankert, M.A. (1981a): Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum.
FEBS Lett. 130: 253-256
- Ielpi, L., Couso, R.O., Dankert, M.A. (1981b): Xanthan gum biosynthesis. Pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 1400-1408
- Ielpi, L., Couso, R.O., Dankert, M.A. (1983): Xanthan gum biosynthesis. Acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar-stage.
Biochem. Intern. 6: 323-333
- Jansson, P.-E., Kenne, L., Lindberg, B. (1975): Structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris.
Carbohydr. Res. 45: 275-282

- Jeanes, A., Rogovin, P., Cadmus, M.C., Silman, R.W., Knutson, C.A. (1976): Polysaccharide (xanthan) of Xanthomonas campestris NRRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification, and analysis.
U.S. Agricultural Research Service ARS-NC-51: 1-14
- Kado, C.I., Liu, S.-T. (1981): Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.
J. Bacteriol. **145**: 1365-1373
- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J., Kropp, H. (1974):
The mechanism of action of fosfomycin (phosphomycin).
In: Salton, M.R.J., Tomasz, A. (Hrsg.): Mode of Action of antibiotics on Microbial Walls and Membranes. Annals of the New York Academy of Sciences **235**: 364-386
- Karl, D.M., Bossard, P. (1985): Measurement and significance of ATP and adenine nucleotide pool turnover in microbial cells and environmental samples.
J. Microbiol. Methods **3**: 125-139
- Katznelson, H. (1955): The metabolism of phytopathogenic bacteria. I. Comparative studies on the metabolism of representative species.
J. Bacteriol. **70**: 469-475
- Katznelson, H. (1957): Metabolism of phytopathogenic bacteria. II. Metabolism of carbohydrates by cell-free extracts.
J. Bacteriol. **75**: 540-543
- Keppler, D., Decker, K. (1974): Glykogen. Bestimmung mit Amyloglucosidase.
In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse II. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße: 1171-1176

- Khym, J.X., Zill, L.P. (1951): The separation of monosaccharides by ion exchange.
J. Amer. Chem. Soc. **73**: 2399-2400
- Kidby, D., Sandford, P., Herman, A., Cadmus, M. (1977): Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: Xanthomonas campestris NRRL B-1459.
Appl. Environm. Microbiol. **33**: 840-845
- Knowles, C.J. (1979): Adenine nucleotide pool maintenance during bacterial growth and starvation.
In: Atkinson, D.E., Fox, C.F. (Hrsg.): Modulation of Protein Function. Symposia on Molecular and Cellular Biology **13**: 13-26
- Kornfeld, R.H., Ginsburg, V. (1966): Control of synthesis of guanosine 5'-diphosphate D-mannose and guanosine 5'-diphosphate L-fucose in bacteria.
Biochim. Biophys. Acta **117**: 79-87
- Lehle, L., Tanner, W. (1974): Membrane-bound mannosyl transferase in yeast glycoprotein biosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta **350**: 225-235
- Lehninger, A.L. (1977): Biochemie.
2. Auflage, Verlag Chemie
- Lesley, S.M., Hochster, R.M. (1959): The extracellular polysaccharide of Xanthomonas phaseoli.
Can. J. Biochem. Physiol. **37**: 513-529
- Lessie, T.G., Neidhardt, F.C. (1967): Adenosine triphosphate-linked control of Pseudomonas aeruginosa glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Bacteriol. **93**: 1337-1345

- Lessie, T.G., Phibbs, P.V. (1984): Alternative pathways of carbohydrates utilization in Pseudomonas.
Ann. Rev. Microbiol. **38**: 359-387
- Lin, B.-C., Day, H.-J., Chen, S.-J., Chien, M.-C. (1979): Isolation and characterization of plasmids in Xanthomonas manihotis.
Bot. Bull. Academia Sinica **20**: 157-171
- Lin, H.-M., Tseng, Y.-H. (1979): Exopolysaccharide synthesis in Xanthomonas oryzae.
Proc. Natl. Sci. Counc. ROC **3**: 279-284
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): Molecular Cloning. A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbour (CSH) Laboratory, New York
- Melton, L.D., Mindt, L., Rees, D.A., Sanderson, G.R. (1976): Covalent structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris: evidence from partial hydrolysis studies.
Carbohydr. Res. **46**: 245-257
- Midgley, M., Dawes, E.A. (1973): The regulation of transport of glucose and methyl α -glucoside.
Biochem. J. **132**: 141-154
- Mitchell, C.G., Dawes, E.A. (1982): The role of oxygen in the regulation of glucose metabolism, transport and the tricarboxylic acid cycle in Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol. **128**: 49-59
- Möllering, H., Bergmeyer, H.U. (1974): D-Gluconat.
In: Bergmeyer, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse II. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße: 1288-1292

- Moraine, R.A., Rogovin, P. (1966): Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation.
Biotechnol. Bioeng. **8**: 511-524
- Munch-Petersen, A. (1962): GDPM pyrophosphorylase.
In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Hrsg.): Methods in Enzymology V. Academic Press, New York, London: 171-174
- Najjar, V.A. (1955): Phosphoglucomutase from muscle.
In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Hrsg.): Methods in Enzymology I. Academic Press, New York, London: 294-299
- Ng, M.-W., Dawes, E.A. (1973): Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in Pseudomonas aeruginosa by citrate.
Biochem. J. **132**: 129-140
- Norval, M., Sutherland, I.W. (1969): A group of Klebsiella mutants showing temperature-dependent polysaccharide-synthesis.
J. Gen. Microbiol. **57**: 369-377
- Norval, M., Sutherland, I.W. (1973): The production of enzymes involved in exopolysaccharide synthesis in Klebsiella aerogenes types 1 and 8.
Eur. J. Biochem. **35**: 209-215
- Palleroni, N.J. (1985): Biology of Pseudomonas and Xanthomonas.
In: Demain, A.L., Solomon, N.A. (Hrsg.): Biology of Industrial Microorganisms. Biotechnol. Ser. **6**: 27-56
- Parsons, A.B., Dugan, P.R. (1971): Production of extra-cellular polysaccharide matrix by Zoogloea ramigera.
Appl. Microbiol. **21**: 657-661

- Plaut, G.W.E. (1969): Isocitrate dehydrogenase (DPN-specific) from bovine heart.
In: Lowenstein, J.M. (Hrsg.): Methods in Enzymology XIII. Citric Acid Cycle. Academic Press, New York, London: 34-42
- Preiss, J. (1969): The regulation of the biosynthesis of α -1,4 glucans in bacteria and plants.
Curr. Topics Cell. Regul. 1: 125-160
- Preiss, J. (1978): Regulation of adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase.
Adv. Enzymol. Rel. Areas Molec. Biol. 46: 317-381
- Preiss, J. (1984): Bacterial glycogen synthesis and its regulation.
Ann. Rev. Microbiol. 38: 419-458
- Resnick, R.J., Feldmann, R., Willard, J., Racker, E. (1986): Effect of growth factors and methionine on glycolysis and methionine transport in rat fibroblasts and fibroblasts transfected with myc and ras genes.
Cancer Res. 46: 1800-1804
- Roberts, B.K., Midgley, M., Dawes, E.A. (1973): The metabolism of 2-oxogluconate by Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol. 78: 319-329
- Rogovin, S.P., Anderson, R.F., Cadmus, M.C. (1961): Production of polysaccharide with Xanthomonas campestris.
J. Biochem. Microbiol. Technol. Engin. 3: 51-63
- Sandermann, H. (1976): Moenomycin: an inhibitor of C₅₅-isoprenoid-alcohol kinase from Staphylococcus aureus.
Biochim. Biophys. Acta 444: 783-788

- Sandford, P.A., Pittsley, J.E., Knutson, C.A., Watson, P.R., Cadmus, M.C., Jeanes, A. (1977): Variation in Xanthomonas campestris NRRL B-1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: Sandford, P.A., Laskin, A. (Hrsg.): Extracellular Microbial Polysaccharides. ACS Symp. Ser. **45**: 192-210
- Sandford, P.A., Watson, P.R., Knutson, C.A. (1978): Separation of xanthan gums of differing pyruvate content by fractional precipitation with alcohol. Carbohydr. Res. **63**: 253-256
- Schimz, K.-L., Rütten, B., Tretter, M. (1981): Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyzer. Adv. Biotechnol. **1**: 457-462
- Schimz, K.-L., Overhoff, B. (1986): angenommen FEMS Microbiol. Lett.
- Schindler, J., Weiss, A., Bahn, M. (1984): Verbessertes Verfahren zur Herstellung von exozellulären Biopolymeren. Deutsches Patent DE 32 24 547
- Schlegel, H.G. (1981): Allgemeine Mikrobiologie. 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Schwartz, R.D., Bodie, E.A. (1985): Production of high-viscosity whey broths by a lactose-utilizing Xanthomonas campestris strain. Appl. Environm. Microbiol. **50**: 1483-1485
- Seeger, B. (1981): Zwei unterschiedliche Sekundärstrukturen bei Xanthomonas-Polysaccharid. Die Nahrung **25**: 655-666

- Silman, R.W., Rogovin, P. (1972): Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate. *Biotechnol. Bioeng.* **14**: 23-31
- Sloneker, J.H., Jeanes, A. (1962): Exocellular bacterial polysaccharide from Xanthomonas campestris NRRL B-1459. Part I. Constitution. *Can. J. Chem.* **40**: 2066-2071
- Smith, I.H., Symes, K.C., Lawson, C.J., Morris, E.R. (1981): Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *Int. J. Biol. Macromol.* **3**: 129-134
- Smith, I.H., Symes, K.C., Lawson, C.J., Morris, E.R. (1984): The effect of pyruvate on xanthan solution properties. *Carbohydr. Polymers* **4**: 153-157
- Souw, P., Demain, A.L. (1979): Nutritional studies on xanthan production by Xanthomonas campestris NRRL B-1459. *Appl. Environm. Microbiol.* **37**: 1186-1192
- Spielmann, H., Jacob-Müller, U., Schulz, P. (1981): Simple assay of 0.1-1.0 pmol of ATP, ADP and AMP in single somatic cells using purified luciferin luciferase. *Anal. Biochem.* **113**: 172-178
- Starr, M.P. (1946): The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutrition requirements of genus Xanthomonas. *J. Bacteriol.* **51**: 131-143
- Storm, D.R. (1974): Mechanism of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. In: Salton, M.R.J., Tomasz, A.(Hrsg.): Mode of Action of Antibiotics on Microbial Walls and Membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **235**: 387-398

Sutherland, I.W. (1977): Microbial exopolysaccharide synthesis.

In: Sandford, P.A., Laskin, A. (Hrsg.): Extracellular Microbial Polysaccharides. ACS Symp. Ser. **45**: 40-57

Sutherland, I.W. (1979): Microbial exopolysaccharides: control of synthesis and acylation.

In: Berkely, R.C.W., Gooday, G.W., Ellwood, D.C. (Hrsg.): Microbial Polysaccharides and Polysaccharases. Academic Press, London, New York, San Francisco: 1-34

Sutherland, I.W. (1985): Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides.

Ann. Rev. Microbiol. **39**: 243-270

Sutherland, I.W., Ellwood, D.C. (1979): Microbial exopolysaccharides - industrial polymers of current and future potential.

Symp. Soc. Gen. Microbiol. **29**: 107-150

Tseng, Y.-H., Weng, S.-F., Lin, H.-M., Lai, Y.-F. (1983): Pleiotropic effects in non-mucoid mutants of Xanthomonas campestris pv. oryzae.

Proc. Natl. Sci. Counc. B. ROC **7**: 44-50

Vedamuthu, E.R., Neville, J.M. (1986): Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by Streptococcus cremoris MS.

Appl. Environm. Microbiol. **51**: 677-682

Voelskow, H. (1983): Extrazelluläre mikrobielle Polysaccharide: Biopolymere mit interessanten Anwendungsmöglichkeiten.

Forum Mikrobiol. **6**: 273-282

- Volk, W.A. (1966): Cell wall lipopolysaccharides from Xanthomonas species.
J. Bacteriol. **91**: 39-42
- Volk, W.A. (1968a): Quantitative assay of polysaccharide components obtained from cell wall lipopolysaccharides of Xanthomonas species.
J. Bacteriol. **95**: 980-982
- Volk, W.A. (1968b): Isolation of D-galacturonic acid 1-phosphate from hydrolysates of cell wall lipopolysaccharide extracted from Xanthomonas campestris.
J. Bacteriol. **95**: 782-786
- Whitfield, C. (1979): Exopolysaccharide biosynthesis in Xanthomonas sp.
Ph.D. Thesis, Department of Microbiology, University of Edinburgh
- Whitfield, C., Sutherland, I.W., Cripps, R.E. (1982): Glucose metabolism in Xanthomonas campestris.
J. Gen. Microbiol. **128**: 981-985
- Whiting, P.H., Midgley, M., Dawes, E.A. (1976a): Control of transport and glucose catabolism in Pseudomonas.
Biochem. J. **154**: 659-668
- Whiting, P.H., Midgley, M., Dawes, E.A. (1976b): The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose metabolism in Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol. **92**: 304-310
- Wilkinson, J.F. (1958): The extracellular polysaccharides of bacteria.
Bacteriol. Rev. **22**: 46-73

- Williams, A.G., Wimpenny, J.W.T. (1980): Extracellular polysaccharide biosynthesis by Pseudomonas NCIB 11264. Studies on precursor-forming enzymes and factors affecting exopolysaccharide production by washed suspensions.
J. Gen. Microbiol. **116**: 133-141
- Zagallo, A.C., Wang, C.H. (1967): Comparative glucose catabolism of Xanthomonas species.
J. Bacteriol. **93**: 970-975
- Zalitis, J., Uram, M., Bowser, A.M., Feingold, D.S. (1972): UDP-glucose-dehydrogenase from beef liver.
In: Ginsburg, V. (Hrsg.): Methods in Enzymology XXVIII. Complex Carbohydrates, Part B. Academic Press, New York, London: 430-435

