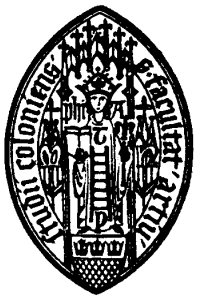


Universität zu Köln
Institut für Biochemie

„Untersuchungen zum Einfluß der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*“

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von Dipl.-Biotechnol., MSc. Hendrik Rönsch

aus Sondershausen

Hundt Druck GmbH, Köln

Köln, November 2000

Amico pectus – hosti frontem!

Betreuung und 1. Referent: Prof. Dr. R. Krämer, Lehrstuhl für Biochemie der Universität zu Köln

2. Referent: Prof. Dr. H. Bothe, Lehrstuhl für Botanik II der Universität zu Köln

Tag der letzten mündlichen Prüfung (Disputation): 7. November 2000

KURZZUSAMMENFASSUNG

Der Lysin-Produzent *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B besitzt außerordentlich wirkungsvolle Mechanismen zur Anpassung an hyperosmotischem Streß. In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der Biomassebildung, des Substratverbrauchs, der Lysinbildung und des Zellvolumens bei Osmostreß untersucht. Es wurde erstmals für einen Gram-positiven Mikroorganismus *in vivo* gezeigt, daß das Zellvolumen in der Wachstumsphase umgekehrt proportional zum Osmostreß reguliert wird. Die osmoprotektive Substanz Betain vergrößerte das Zellvolumen um 20%, hatte aber keinen Einfluß auf stationäre Zellen, deren Zellvolumina unreguliert waren. *C. glutamicum* MH20-22B synthetisierte während der Wachstumsphase Prolin und in der stationären Phase Trehalose. Betainaufnahme wurde gegenüber Prolinsynthese bevorzugt. Aktive Kompensation von Osmostreß erfolgte nur in der Wachstumsphase. Die chromosomale Deletion der Betain-Transporter EctP und BetP beeinflußte die Physiologie der Anpassung an Osmostreß nur unwesentlich, aber der Transporter ProP wurde dadurch aktiviert. Hinweise auf einen bisher unbekannten Betain-Transporter wurden gefunden. Die Lysinausbeute sank durch Erhöhung des Osmostresses in einem typischen *batch* Prozeß. Betain hatte keinen Einfluß auf die Lysinausbeute, bewirkte aber einen schnelleren Beginn der Produktionsphase und reduzierte die Trehalosekonzentration deutlich. Die spezifische Erhaltungsenergie stieg proportional zum Osmostreß. Die maximale Lysinbildungsrate war nahezu unabhängig vom Osmostreß und wurde bei einer Wachstumsrate von 0,1 h^{-1} beobachtet. Durch Simulation konnte auf kritische Wachstumsraten geschlossen werden, ab welchen keine Lysinbildung mehr stattfindet.

ABSTRACT

The lysine producer *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B possesses very effective mechanisms for hyperosmotic adaptation. In this work the changes of biomass formation, substrate consumption, lysine production and cell volume due to osmotic stress were investigated. For the first time it was shown for a Gram-positive microorganism *in vivo* that the cell volume was actively regulated during the growth phase. The osmoprotective substance betaine led to an increase in cell volumes of up to 20% however, did not influence stationary cell volumes, which were unregulated. *C. glutamicum* MH20-22B synthesised proline in the exponential phase and trehalose in the stationary phase. The uptake of betaine was preferred to the synthesis of proline. Active compensation of osmotic stress was observed only during exponential growth. The chromosomal deletion of the betaine transporters EctP and BetP did not influence the physiology of the adaptation to osmotic stress, but the transporter ProP was activated due to these deletions. Evidence for an unknown betaine transporter was found. Lysine yield decreased due to increasing osmolality in a typical batch fermentation. Betaine had no influence on the lysine yield, however caused an earlier start of the production phase and reduced trehalose concentration significantly. The specific maintenance energy increased with increasing osmolality. The maximum lysine production rate was almost independent of osmotic stress and was observed at a specific growth rate of 0,1 h^{-1}. After simulating lysine production it was concluded that critical growth rates exist where no lysine production would occur.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 DIE GATTUNG *CORYNEBACTERIUM* 2
1.1.1 Herkunft und Stammentwicklung von C. glutamicum *MH20-22B* *3*
1.1.2 Industrielle L-Lysinfermentation *3*
1.2 OSMOREGULATION IN MIKROORGANISMEN 4
1.2.1 Anpassung an Osmostreß *4*
1.2.2 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung des Einflusses von hyperosmotischem Osmostreß auf das Wachstum von Mikroorganismen *9*
1.2.3 Volumenregulation *10*
1.3 VERSUCHSZIELE 10

2 THEORIE 11

2.1 KONTINUIERLICHE FERMENTATION UND BIOREAKTORTECHNIK 11
2.1.1 Chemostattheorie *11*
2.1.2 Ausbeute- und Erhaltungs-Koeffizienten *12*
2.2 MATHEMATISCHE MODELLE 13

3 MATERIAL UND METHODEN 14

3.1 BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE, MEDIEN UND CHEMIKALIEN 14
3.1.1 Bakterienstämme *14*
3.1.2 Verwendete Vektoren und Plasmide *15*
3.1.3 Komplexmedien *16*
3.1.4 Minimalmedien *16*
3.1.5 Medienzusätze *16*
3.1.5.1 Modifiziertes C.g. XII für kontinuierliche Fermentationen 17
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN 18
3.2.1 Allgemeine DNA-Techniken *18*
3.2.1.1 Gewinnung und Reinigung von Desoxy-Ribonukleinsäure 18
3.2.1.2 Rekombination von DNA 18
3.2.1.3 Gelelektrophorese 18
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion *19*
3.2.2.1 Starter-Oligonukleotide 20
3.2.3 Herstellung kompetenter E. coli *Zellen und Transformation von* E. coli *21*
3.2.4 Transformation von C. glutamicum *21*
3.2.5 Konjugationen mit E. coli *S17-1 als Donor und* C. glutamicum *als Empfänger* *22*
3.2.6 Bestimmung des spezifischen bakteriellen Cytoplasmavolumens *23*
3.2.7 Bestimmung der spezifischen Transportraten von EctP, BetP, ProP und PutP für die kompatiblen Solute Betain, Ectoin und Prolin *24*
3.3 KULTIVIERUNGS- UND FERMENTATIONSBEDINGUNGEN 25
3.3.1 Stammhaltung und Vorkulturen *25*
3.3.2 Kultivierungen im Schüttelkolben *25*
3.3.3 Kultivierungen im Bioreaktor *26*
3.3.3.1 Bioreaktorausstattung 26
3.3.3.2 batch Fermentationen im Bioreaktor 27
3.3.3.3 Kontinuierliche Kulturführung im Bioreaktor 28
3.3.3.4 Kontinuierliche Kulturführung mit langsam steigendem Osmostreß 28

3.4 ANALYTIK 29
3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse *29*
3.4.2 Bestimmung der Bakterienzahl *29*
3.4.3 Zellaufschlüsse mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) *30*
3.4.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie zur Konzentrationsbestimmung von Aminosäuren *30*
3.4.4.1 Standard-HPLC mit o-Phthaldialdehyd-Mercaptoethanol (OPA & MEtOH)-Vorsäulen-Derivatiserung zur Konzentrationsbestimmung primärer Aminosäuren 30
3.4.4.2 HPLC mit kombinierter o-Phthaldialdehyd-Mercaptopropionsäure (OPA-MPS) und 9-Fluorenylmethyl-chlorformiat (FMOC-Cl)-Vorsäulen-Derivatiserung zur Konzentrationsbestimmung primärer und sekundärer Aminosäuren 32
3.4.4.3 Bestimmung der Konzentration von Glycinbetain mittels isokratischer HPLC 33
3.4.5 Bestimmung der Kaliumkonzentration *34*
3.4.6 Bestimmung der Konzentration von Kohlenhydraten *34*
3.4.6.1 Glukose, Saccharose und Trehalose im Medium 34
3.4.6.2 Konzentrationsbestimmung von Trehalose im bakteriellen Cytoplasma mittels GC 35

4 ERGEBNISSE 36

4.1 PHYSIOLOGIE UND STAMMENTWICKLUNG 36
4.1.1 Korrelation von Zellzahl und Biotrockenmasse zu Optischer Dichte *36*
4.1.2 Chromosomale Deletion von betP, ectP *und* proP *39*
4.2 VERGLEICH DER AUFNAHMERATEN FÜR BETAIN, ECTOIN UND PROLIN – DIE BESONDERE ROLLE DES TRANSPORTERS PROP 41
4.3 WACHSTUM UND ZELLVOLUMEN VON *C. GLUTAMICUM* MH20-22B IN ABHÄNGIGKEIT VOM OSMOTISCHEN STREß 43
4.3.1 Die Veränderungen der Biotrockenmasse und des Substratverbrauchs von C. glutamicum *MH20-22B in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und vom osmotischen Streß im Medium* *43*
4.3.2 Korrelation von Zellvolumen und der Wachstumsrate *46*
4.4 DYNAMIK DER AKKUMULATION OSMOPROTEKTIVER SUBSTANZEN IM CYTOPLASMA ALS REAKTION AUF HYPEROSMOTISCHEN STREß UND DIE WIRKUNG AUF DIE BILDUNG VON L-LYSIN 51
4.4.1 Der Eltern-Produktionsstamm C. glutamicum *MH20-22B* *53*
4.4.2 Die Mutante C. glutamicum *MH20-22B D2 (*ectP$^-$ betP$^-$*)* *60*
4.4.3 Die Mutante C. glutamicum *MH20-22B D3 (*ectP$^-$ betP$^-$ proP$^-$*)* *64*
4.4.4 Die L-Lysinbildung bei unterschiedlichem hyperosmotischem Streß *69*
4.5 ERGEBNISSE AUS VERSUCHEN MIT KONTINUIERLICHER KULTURFÜHRUNG 77
4.5.1 Bestimmung der Erhaltungsenergie und der Substrat-Verbrauchsraten bei unterschiedlichem osmotischem Streß *77*
4.5.1.1 Einstellung von Fließgleichgewichten 77
4.5.1.2 Spezifischer Substratverbrauch bei konstanter Wachstumsrate in Abhängigkeit vom osmotischen Streß 80
4.5.2 Lysinbildung in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei unterschiedlichem hyperosmotischem Streß *84*
4.5.3 Langsame Anpassung an steigenden osmotischen Streß bei konstanter Verdünnungsrate *87*

5 DISKUSSION 89

5.1 AKTIVIERUNG DES TRANSPORTERS PROP NACH DELETION VON *ECTP* UND *BETP* UND DIE BEOBACHTETE RESTAUFNAHMERATE FÜR BETAIN 89

5.2 VERÄNDERUNG DES CYTOPLASMAVOLUMENS VON *C. GLUTAMICUM* MH20-22B IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WACHSTUMSPHASE UND UNTERSCHIEDLICHEM OSMOSTREß 91

5.3 ANPASSUNG DES METABOLISMUS VON *C. GLUTAMICUM* MH20-22B UND MUTANTEN MIT DEFEKTEN IN DEN AUFNAHMEPROTEINEN FÜR KOMPATIBLE SOLUTE UNTER EINWIRKUNG VON HYPEROSMOTISCHEM OSMOSTREß 94

5.4 L-LYSINBILDUNG UND SUBSTRATVERBRAUCH VON *C. GLUTAMICUM* MH20-22B IN ABHÄNGIGKEIT VON DER OSMOLALITÄT 98

6 ZUSAMMENFASSUNG 100

7 ANHANG UND ZUSATZINFORMATIONEN 102

7.1 ZWEI MÖGLICHE L-LYSINBIOSYNTHESE-WEGE IN *C. GLUTAMICUM* 102

7.2 DER DEGUSSA-HÜLS PROZEß DER L-LYSINHERSTELLUNG 103

7.3 KINETIK DER HYPEROSMOTISCHEN OSMOREGULATION IN *C. GLUTAMICUM* 104

7.3.1 Osmotisch aktivierte Syntheseproteine 104

7.3.2 Osmotisch aktivierte Transportproteine 105

7.4 KALIUMKONZENTRATIONEN IM CYTOPLASMA 107

8 LITERATURLISTE 108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I) FORMELZEICHEN

Π	Osmotischer Druck	Pa
ΔE	Extinktionsdifferenz	-
ε	Extinktionskoeffizient	
λ	Wellenlänge	nm
γ	Aktivitätskoeffizient	
Δt, dt	Zeitraum, Intervall	h
μ	spezifische Wachstumsrate	h^{-1}
A	Aktivität (radioaktiv)	dpm, Ci
a_w	Wasseraktivität	
d	Küvettendicke	m
dX/dt	Wachstumsrate	g/(l*h)
D	Durchflußrate, Verdünnungsrate (*dilution rate*)	h^{-1}
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	g/l
m_S	Erhaltungsenergie (Substrat)	g/(g*h)
pH	pH-Wert	-
R	Allgemeine Gaskonstante	
r_{Lys}	spezifische Lysinbildungsrate	g/(g*h)
r_S	spezifische Substratverbrauchsrate	g/(g*h)
r_{up}	Aufnahmerate	nmol/min*mg BTM
s, S	Substratkonzentration	g/l
T	Temperatur	°C
t, t_i	Prozeßzeit	h
t_c	*centre time*; Maximum oder ein Wendepunkt	h
$t_{V_{i,max}}$	Zeit des Erreichens des max. Cytoplasmavolumens	h
V_C	Spezifisches bakterielles Cytoplasmavolumen	µl/mg BTM
V_F	Volumenstrom, Pumprate	l/h
V_R	Arbeitsvolumen des Bioreaktors	l
V_W	partielles molares Volumen des Wassers	l/mol
V_Z	Zellvolumen	μm^3
x	Stoffmengenanteil	mol/mol
X, [X]	Konzentration der Biotrockenmasse	g/l
$Y_{Y/Z}$	Ausbeutekoeffizient von Y bezogen auf Z (*yield*)	g/g
Y_{Y/Z_TG}	„wahrer“ Ausbeutekoeffizient	g/g

II) TIEFGESTELLTE INDIZES

0	Anfangs-, Einlauf-
1,2	End-, Zeitpunkt 1, Zeitpunkt 2, et c.
i	Element i, Zeitpunkt i
lag	*lag* Phase, in der *lag* Phase
krit.	kritisch
max.	maximal
opt.	optimal
R	Reaktor, Reaktions-
S	Substrat
stat.	stationär
t	Zeitpunkt
theor.	theoretisch
TG	*true growth*

III) ABKÜRZUNGEN

Δ	Delta-, Änderung	
^{3}H	Tritium	
^{14}C	^{14}C-Kohlenstoff	
A	Amplitude	
BTM	Biotrockenmasse	g/l
C, c	allgem. Konzentration	g/l oder mol/l
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
F	Faktor, Verdünnungsfaktor	
HPLC	*High Pressure Liquid Chromatography*	
K	Konstante	
MG	Molekulargewicht	g/mol
O_2	Sauerstoff	
CO_2	Sauerstoff	
OD	Optische Dichte	
pO_2	Sauerstoffpartialdruck	%
TCZ	Tricarbonsäurezyklus	
ss	*steady state* (Fließgleichgewicht)	
w	*width* (Weite, Länge)	
[i]	allgemein: Konzentration von i	

1 Einleitung

Was haben die industrielle Produktion von L-Lysin mit *Corynebacterium glutamicum* und der Vorgang der Osmoregulation miteinander zu tun?

Nun, auf den ersten Blick nichts für den reduktionistisch veranlagten Wissenschaftler – auch recht wenig für den traditionellen Bioverfahrenstechniker...

Und doch: die physiologische Antwort auf osmotischen Streß in der Umgebung eines Bakteriums und die damit verbundene Regulation des bakteriellen Metabolismus wirken sich direkt auf die Produktivität im klassischen Fermentationsprozeß aus. Die optimale Versorgung mit Nährstoffen für das bakterielle Wachstum einerseits und die bestmöglich erzielbare Ausbeute an L-Lysin andererseits erweisen sich auf den zweiten Blick als Gratwanderung zwischen Unterversorgung mit möglicherweise limitierenden Substraten und zu großem osmotischen Streß durch eine zu hohe Konzentration an Nährstoffen. Eine sehr hohe Ausgangskonzentration an Nährstoffen im *fed batch* Prozeß (über 150 g/l) erweist sich in der Praxis häufig als extremer osmotischer Streß für Mikroorganismen – ein Streß, der durch geeignete Mechanismen kompensiert werden muß. Für den Bioverfahrenstechniker ein „alter Hut“, da Fermentationen in einem optimalen Konzentrationsbereich betrieben werden müssen. Dieser optimale Bereich wird jedoch oft anhand von Erfahrungswerten ermittelt und selten wird eine Prozeßstrategie durch wirklich fundiertes Wissen untermauert. Durch extreme osmotische Bedingungen aktivierte Kompensationsprozesse benötigen in jedem Falle die Aufwendung von Energie, welche für das primäre Ziel – die effektive Produktion von L-Lysin – verlorengeht.

Die genaue Kenntnis der Stoffwechsel-Vorgänge im Bakterium nach der Einwirkung von osmotischem Streß sollten zunächst eine fundierte Analyse der L-Lysinproduktion in Wechselwirkung mit osmotischem Streß und daran anschließend eine Prozeßoptimierung erlauben. Die Erforschung der physiologischen Veränderungen in *C. glutamicum* als Anwort auf extreme osmotische Bedingungen soll in dieser Arbeit jedoch an erster Stelle stehen – dennoch aber beides vereinbaren: Grundlagenforschung und angewandte Technologie.

1.1 Die Gattung *Corynebacterium*

Die Gattung *Corynebacterium* gehört zu der Gruppe der Actinomyceten. Corynebakterien sind Gram-positive, nicht-sporenbildende, stäbchen- bis keulenförmige Bodenbakterien mit hohem GC-Gehalt. Chemotaxonomische Studien in Bezug auf Zellwandbeschaffenheit und Lipidzusammensetzung zeigten enge evolutive Verknüpfungen mit Mycobakterien, Nocardien und Rhodokokken [Liebl *et al.* 1991]. Das besondere morphologische Merkmal der Corynebakterien ist die „schnappende" Zellteilung, wobei Zellen kurz vor der eigentlichen Teilung noch seitlich miteinander verbunden bleiben. Neben der vielseitigen Nutzbarmachung als Produzent von verschiedenen Aminosäuren existieren jedoch auch human- und pflanzenpathogene Arten der Familie Corynebacteriaceae. Als bekannteste Vertreter seien hier die Erreger der Diphtherie (*Corynebacterium diphtheriea*) und als Planzenpathogene *Corynebacterium michiganense* und *Corynebacterium fascians* [Schlegel 1992] genannt.

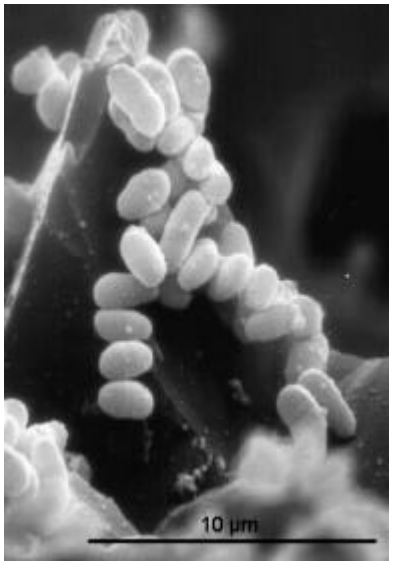


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Quelle: Forschungszentrum Jülich, IBT)

Corynebacterium glutamicum wurde 1957 zunächst als *Micrococcus glutamicus* beschrieben [Kinoshita *et al.* 1957]. Ein breit angelegtes Screening verschiedener Isolate von Mikroorganismen aus Boden, Klärschlamm, Fäkalien, Früchten und Gemüsen zielte auf die Selektion von Glutaminsäure-Produzenten, welches mit der Entdeckung von *C. glutamicum* resultierte. Heute stellt *C. glutamicum* nach intensiver Stamm- und Verfahrensentwicklung [Kiss *et al.* 1992, Park *et al.* 1997, Weuster-Botz *et al.* 1998] neben dem sehr eng verwandten *Brevibacterium sp.* [Kawahara *et al.* 1990] wohl den bedeutendsten Aminosäureproduzenten im biotechnischen Großmaßstab dar. Neben der Herstellung von Glutaminsäure und Lysin wurden aber auch Versuche unternommen, *C. glutamicum* für die Synthese anderer Stoffe wie Riboflavin [Koizumi *et al.* 2000] oder Tryptophan [Ikeda und Katsumata 1999] zu nutzen, jedoch haben sich dafür noch keine Produktionsverfahren durchgesetzt.

1.1.1 Herkunft und Stammentwicklung von *C. glutamicum* MH20-22B

Der L-Lysin-Produktionsstamm *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B wurde 1992 aus dem Wildtypstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 [Abe *et al.* 1976] durch chemische Mutagenese gezielt entwickelt [Schrumpf *et al.* 1992]. Der Stamm besitzt eine für die meisten L-Lysinproduzenten typische Aufhebung oder Minimierung der *feedback*-Inhibierung der Aspartatkinase (E.C. 2.7.2.4) durch L-Lysin sowie eine stark erhöhte L-Lysinauscheidung (0,57 mmol/g BTM*h) in das Medium. Ausbeuten bis zu 0,44 g L-Lysin/g Glukose wurden bei Wachstum auf Glukose beobachtet [Schrumpf *et al.* 1992]. Die Details der Stoffwechselwege von Vorstufen zum L-Lysin sind in Abschnitt 7.1 dargestellt.

1.1.2 Industrielle L-Lysinfermentation

Neben der Verwendung von fermentativ hergestellter L-Glutaminsäure (Natriumglutamat) als Geschmacksverstärker in Nahrungsmitteln wie Kartoffelchips, Würzsaucen und Fertiggerichten findet fermentativ hergestelltes L-Lysin vor allem Anwendung als Zusatzstoff in der Futtermittelindustrie – im Besonderen als Zusatzstoff in der Schweinemast [Susenbeth 1995] sowie als Grundstoff in der Kosmetikindustrie [Leuchtenberger 1996]. L-Lysin wird bereits seit 1956 [Chatterjee und Chatterjee 1997] biotechnisch hergestellt und seit circa 40 Jahren mit *C. glutamicum* fermentativ gewonnen [Leuchtenberger 1996]. Weltweit überwiegen wenige Hersteller den L-Lysin-Markt: Ajinomoto (Japan) mit Heartland Lysine (USA), Kyowa Hakko (Japan), Cheil Jedang (Korea), Degussa-Hüls AG und Cargill mit Midland Lysine (Deutschland, USA) sowie die BASF (Deutschland) als jüngster Wettbewerber [Hodgson 1994].

Tabelle 1 zeigt die Entwicklung des weltweiten Marktes der Aminosäureherstellung seit 1982 am Beispiel der Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin. L-Lysin ist kommerziell hauptsächlich als L-Lysinhydrochlorid (nach Anionenchromatographie), sowie als sprühgetrocknetes Mischgranulat aus L-Lysin, Biomasse und anderen Nebenprodukten (Biolys 60®) erhältlich.

Tabelle 1: Die Entwicklung der weltweiten Aminosäureproduktion am Beispiel der bedeutenden Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin

Jahr	L-Glutamat [Tonnen/Jahr]	L-Lysin [Tonnen/Jahr]	Quellenangabe
1982	270.000	34.000	Eggeling und Sahm 1999
1991	420.000	152.000	Eggeling und Sahm 1999
1999	600.000	350.000	Möckel Degussa-Hüls AG, DECHEMA 1999
2000	> 1.000.000	400.000	Krämer [persönliche Mitteilung]

1.2 Osmoregulation in Mikroorganismen

Die Fähigkeit der Anpassung an beständig wechselnde hohe und niedrige Konzentrationen von Salzen, Stoffwechselprodukten und anderen osmotisch wirksamen Substanzen stellt einen höchst interessanten Aspekt der Evolution von Mikroorganismen dar. Für die Bilanz der Wasseraktivität a_w gilt folgender Zusammenhang:

$$a_W = \Sigma (\gamma_i \cdot \chi_i)$$ **Gleichung 1:** Wasseraktivität

Der osmotische Druck Π einer Lösung wird im allgemeinen folgendermaßen beschrieben:

$$\Pi = (RT/V_W) \cdot \ln a_w$$ **Gleichung 2:** Osmotischer Druck

Ebenso läßt sich der Druck im Bakterieninneren beschreiben, der als Turgordruck P bezeichnet wird:

$$P = (RT/V_W) \cdot \ln (a_{w_Medium}/ a_{w_Zelle})$$ **Gleichung 3:** Turgordruck

Aus Gleichung 2 wird deutlich, daß der osmotische Druck primär von der Aktivität des Wassers und damit von der Konzentration an gelösten Substanzen abhängig ist. Weiterhin ist erkennbar, daß der osmotische Druck nicht von Volumenregulation und Regulation der Konzentration gelöster Substanzen zu trennen sind – ja vielmehr direkt miteinander wechselwirken, da gilt: $\Pi \sim (1/V_W \cdot \ln a_w)$.

1.2.1 Anpassung an Osmostreß

Hypoosmotischer Streß (Regenschauer, Waschschritte mit Wasser in der Laborroutine), entsteht für einen Mikroorganismus, wenn die Gleichgewichtsdifferenz zwischen der Konzentration gelöster Stoffe in der Umgebung einer Zelle und der Konzentration gelöster Stoffe im Cytoplasma durch eine Verdünnung der Substanzen in der Umgebung der Zelle größer wird. Im Gegensatz dazu entsteht hyperosmotischer Streß für eine Zelle dann, wenn dieses Gleichgewicht durch eine Zunahme der Konzentration gelöster Substanzen in der Umgebung eines Mikroorganismus gestört wird (Dürreperioden, salzige Habitate, Fermentationen mit hohen Substratkonzentrationen). Durch hyperosmotischen Streß wird einer Zelle Wasser aus den Hydrathüllen im Cytoplasma entzogen [Wiggins 1990, Qu *et al.* 1998, Wood 1999]. Bei der Anpassung der cytoplasmatischen Gesamtkonzentration von gelösten Stoffen an die Konzentration des umgebenden Mediums durch Synthese und/oder Aufnahme oder Ausschleusung sogenannter osmoprotektiver Substanzen (da diese

Schutz gegen Dehydratisierung bei hyperosmotischem Streß vermitteln) wird zwischen verschiedenen Anpassungsstrategien von Mikroorganismen unterschieden. So akkumulieren Halobakterien und halophile Prokaryoten bis zu 6 mol/l Kaliumchlorid bei hyperosmotischem Streß im Cytoplasma, wogegen die meisten anderen Prokaryoten keine oder nur eine vorübergehenden Akkumulation von Kalium betreiben und Ionen vorzugsweise gegen organische Moleküle austauschen. Aus diesem Grunde entstand die Zuordnung zu Ionen- und kompatiblen Solut-Typen [Galinski und Trüper 1994].

Organische Gelöststoffe, welche dem Osmoschutz der Zelle dienen, werden allgemein als kompatible Solute bezeichnet [Yancey 1982, Wood 1999, Bremer und Krämer 2000]. Stoffe dieser Substanzklasse sind „kompatibel“, da sie auch in hoher Konzentration die Enzymaktivitäten nicht beeinflussen [Yancey 1982]. Als kompatible Solute werden von Mikroorganismen [Frings *et al.* 1993, Farwick *et al.* 1995, Record *et al.* 1998], aber auch von höheren Organismen [Lang *et al.* 1998, Strand *et al.* 1999] verschiedene Substanzen genutzt, welche jedoch in aller Regel niedermolekular sind. Genutzt werden ungeladene *Zucker* wie Saccharose oder Trehalose, ungeladene und geladene *Aminosäuren* wie Prolin, Glutaminsäure oder Glutamin, *Polyole* wie Glycerol oder Arabitol, weiterhin polare *Aminosäurederivate* wie Glycinbetain (kurz: Betain), Carnitin oder Ectoin [Yancey 1982]. Die Molekülstrukturen von kompatiblen Solute, welche *C. glutamicum* aus der Umgebung aufnehmen kann, sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

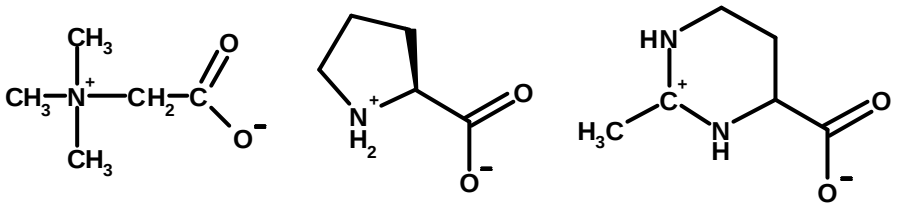


Abbildung 2: Von *C. glutamicum* genutzte kompatible Solute, die aufgenommen werden können

Entsteht für eine Zelle hypoosmotischer Streß, ist diese physikochemisch gezwungen, den Konzentrationsunterschied auszugleichen. Wasser diffundiert zwangsläufig in die Zelle ein, um das Cytoplasma zu verdünnen. Da Wasser nur bedingt membranpermeabel ist [Schoberth *et al.* 2000], wird der beschleunigte Wasseraustausch von Mikroorganismen möglicherweise durch Aquaporine katalysiert [Calamita *et al.* 1995, Hohmann *et al.* 2000, Schoberth *et al.* 2000]. Der osmotisch bedingte Wassereinstrom bei hypoosmotischem Streß kann unter bestimmten Umständen zum Bersten der Mikroorganismen [Whatmore und Reed 1990] führen und muß aus diesem Grunde durch geeignete Mechanismen ausgeglichen werden. Die aktive Regulation durch den Mikroorganismus wird durch gleichzeitige, selektive Entfernung gelöster Stoffe mittels spezifischer Kanäle erreicht. Diese Kanäle in der bakteriellen Plasmamembran wurden detailliert untersucht und wegen ihrer Aktivität aufgrund

von Druckunterschieden als mechanosensitive Kanäle bezeichnet [Zoratti und Petronilli 1988, Martinac 1983, Ruffert *et al.* 1999]. Im Gegensatz zu hypoosmotischen Streß wird die Zelle bei hyperosmotischem Streß durch Wasserverlust bedroht und muß die Konzentration gelöster Stoffe im Cytoplasma entweder durch Akkumulation von verfügbaren gelösten Substanzen aus der Umgebung oder durch eigene Synthese vergrößern. Bei osmotisch bedingtem, unkontrolliertem Wasserverlust ohne Gegenregulation käme es zur sogenannten Plasmolyse; durch die akute Verringerung der Wasseraktivität (siehe Gleichung 1) würde die Zelle ihre Lebensfähigkeit verlieren. Osmoregulation ist bei hyperosmotischen Bedingungen also notwendig, um das Zellvolumen und den für das Wachstum notwendigen Turgordruck wiederherzustellen [Whatmore und Reed 1990].

Die zelluläre Antwort auf hyperosmotischem Streß in Gram-negativen Prokaryoten wurde mit *Escherichia coli* als Modellorganismus ausführlich untersucht [Csonka und Epstein 1998]. Nach einem plötzlichen Ansteigen der Osmolalität im Medium (*upshift*) akkumuliert *E. coli* sehr schnell Kaliumionen aus dem Medium welche jedoch in kurzer Zeit durch Aminosäuren und deren Derivate ersetzt werden. Im späteren Stadium der Streßantwort wird Trehalose synthetisiert und akkumuliert, welche wiederum die Aminosäuren ersetzt [Larsen *et al.* 1987, Dinnbier *et al.* 1988, Strøm und Klaasen 1993]. Die Anpassung an hyperosmotischen Streß wurde ebenfalls ausführlich in anderen Gram-negativen Prokaryoten untersucht: Beispiele sind *Salmonella typhimurium* [Koo *et al.* 1991], *Synechocystis sp.* [Marin *et al.* 1998], *Rhizobium meliloti* [Milner und Wood 1996], *Sinorhizobium meliloti* [Gouffi *et al.* 1998] und *Halomonas elongata* [Galinski und Trüper 1994]. Auch Purpurbakterien wie *Rhodobacter sphaeroides* [Abee *et al.* 1990] und andere Vertreter [Welsh *et al.* 1998] sowie Archaebakterien wie *Methanosarcina thermophila* [Proctor *et al.* 1997] wurden hinsichtlich ihrer osmoregulatorischen Eigenschaften zum Teil detailliert untersucht.

Für Studien der Osmoregulation in Pilzen wurde vorrangig die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [Ölz *et al.* 1993] herangezogen, aber auch filamentöse Pilzen wie *Ashbya gossypii* [Förster *et al.* 1998] wurden untersucht. In höheren Organismen wurde das Phänomen Osmoregulation beschrieben, jedoch unter anderen Gesichtspunkten. So wurde in der Alge *Euglena gracilis* im Besonderen die Volumenregulation untersucht [Shehata und Kempner 1977]. Osmostreß- und Kälteanpassung in Pflanzen wurde zum Beispiel für *Arabidopsis thaliana* [Strand *et al.* 1999] und für die Bohne *Vicia vaba* L. [Shabala *et al.* 2000] untersucht. In der Forschung mit Säugerzellkulturen (zum Beispiel Nieren- und Hirnzellen) wird Osmoregulation fast ausschließlich als „Volumenregulation“ diskutiert [Burg 1995, Burg *et al.* 1997, O´Neill 1999]. Ebenso wie bei Prokaryoten werden zur schnellen Regulation nach osmotischen *uphifts* von den Säugerzellen Ionen aufgenommen. Bevorzugte organische kompatible Solute („osmotische Agenzien“) für Säugerzellen sind Saccharose, Mannitol, Taurin, Choline, Betain, Trimethylamin-*N*-oxid sowie Glucose [Lang *et al.* 1998].

Erkenntnisse der osmoregulatorischen Eigenschaften in Gram-positiven Prokaryoten wurden hauptsächlich durch Kurzzeitfermentationen und *upshift* Experimente gewonnen. Beispiele hierfür sind Untersuchungen an *Bacillus subtilis* [Kempf und Bremer 1999], *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* [Poolman und Glaasker 1998, Guillot *et al.* 2000], *Listeria monocytogenes* [Smith *et al.* 1998], *Staphylococcus aureus* [Pourkomailian und Booth 1994] und natürlich *C. glutamicum* [Skjerdal *et al.* 1995, Peter *et al.* 1998; Rübenhagen *et al.* 2000].

Wie reguliert *C. glutamicum* als Gram-positiver Mikroorganismus die Konzentration gelöster Substanzen als Anwort auf hypo- oder hyperosmotischen Streß? *Shift*-Experimente mit *C. glutamicum* zeigten, daß nach hypoosmotischem Streß sehr schnell Betain und Prolin durch mechanosensitive Kanäle aus dem Cytoplasma ausgeschleust werden, wogegen andere Substanzen wie ATP zurückgehalten werden. Weitere physiologische und genetische Untersuchungen ergaben, daß auch *C. glutamicum* große und kleine mechanosensitive Kanäle (MscL und MscS) besitzt [Ruffert *et al.* 1999, Nottebrock 2000], welche diese spezifischen Transportaktivitäten katalysieren. Erleichterte Wasseraufnahme durch Aquaporine konnte bisher in Gram-positiven Organismen außer in *Enterococcus faecalis* nicht beobachtet werden [Hohmann *et al.* 2000].

Wird *C. glutamicum* hyperosmotischem Streß ausgesetzt, so werden Prolin und Trehalose synthetisiert, falls keine anderen kompatiblen Solute in der Umgebung der Zellen zur Verfügung stehen [Frings *et al.* 1993]. Neben der Synthese als osmoprotektive Substanz kann Prolin auch für anabolische Zwecke durch den Transporter PutP aufgenommen werden. Falls vorhanden, werden von *C. glutamicum* bei hyperosmotischem Streß die kompatiblen Solute Ectoin und Betain aus der Umgebung aufgenommen, da sie nicht selbst synthetisiert werden können [Farwick *et al.* 1995, Peter *et al.* 1998]. *C. glutamicum* besitzt zur Aufnahme dieser Substanzen die drei osmotisch regulierten, sekundären Soluttransporter BetP, EctP und ProP, welche osmoprotektive Substanzen im Symport mit Ionen in die Zelle transportieren (siehe Abbildung 3).

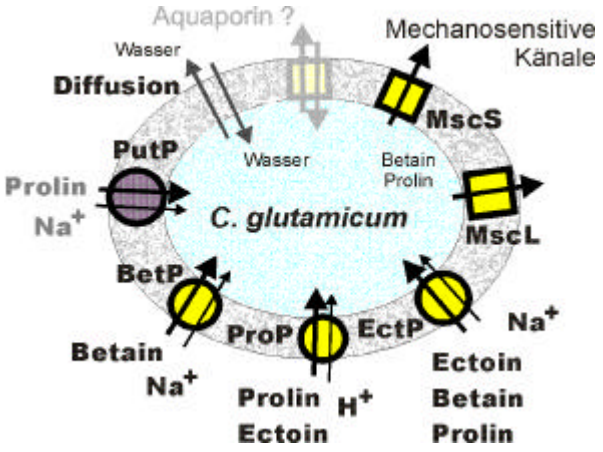


Abbildung 3: Die Transportproteine für osmoprotektive Substanzen und kompatible Solute in *C. glutamicum*. Gelbe Unterlegungen symbolisieren osmotisch aktivierte Regulation

In Experimenten mit kontinuierlicher Kulturführung [Guillouet und Engasser 1995] wurde festgestellt, daß *C. glutamicum* ohne kompatible Solute im Medium hauptsächlich Prolin bei hohen Wachstumsraten und Trehalose vorrangig bei niedrigen Wachstumsraten synthetisiert. Neben Untersuchungen, in welcher Art und Weise kompatible Solute in *C. glutamicum* die Anpassung an hyperosmotischen Streß beeinflussen, war für *C. glutamicum* stets die Veränderung der Aminosäure-Produktionsleistung bei Einwirkung hyperosmotischen Stresses als bioverfahrenstechnisch relevantes Problem ein begleitendes Thema der Experimente. In der folgenden Abbildung sind Daten einer früheren Untersuchung dargestellt, welche die Veränderung des spezifischen Substratverbrauchs als Funktion der Osmolalität des Fermentationsmediums beschreiben.

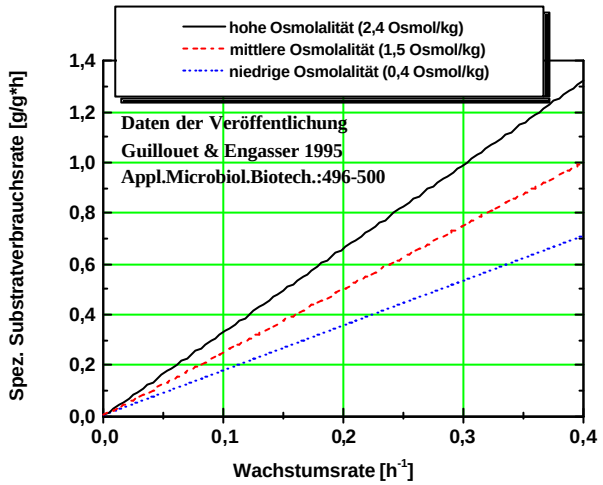


Abbildung 4: Der spezifische Substratverbrauch von *C. melassolicola* in Abhängigkeit von der Wachstumsrate und osmotischem Streß (nach Guillouet und Engasser 1995).

Wie auch bei anderen Fragestellungen, bei denen die Veränderung des Substratverbrauchs als Funktion eines Streßfaktors in kontinuierlicher Kulturführung untersucht wurde – wie etwa das Bereitstellen eines toxischen Xenobiotikums als alleinige Kohlenstoffquelle [Hempel *et al.* 1998] – konnte für *C. melassolicola* gezeigt werden, daß der spezifische Substratverbrauch (wie erwartet) mit steigender Wachstumsrate und steigenden Osmostreß zunahm. An den Kernaussagen sind jedoch Zweifel angebracht, da nichtwachsende Zellen anhand der Daten kein Substrat verbrauchen würden – was jeder Erfahrung entgegensteht [Hempel *et al.* 1998]. Weiterhin wird ein unterschiedlicher spezifischer Substratverbrauch bei unterschiedlichem Osmostreß suggeriert – was sonst gewöhnlich nur bei Wachstum auf unterschiedlichen Substraten beobachtet wird. *Summa summarum* existieren nur wenige Studien, welche Osmoregulation und Bioverfahrenstechnik in *C. glutamicum* fundiert miteinander vereinbaren, weshalb in dieser Arbeit mit geeigneten Strategien beide Bereiche intensiv in Hinblick bisher vernachlässigter Aspekte untersucht werden sollen.

1.2.2 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung des Einflusses von hyperosmotischem Osmostreß auf das Wachstum von Mikroorganismen

Zur Untersuchung der Anpassung an hyperosmotischen Streß sind aus der Literatur sehr verschiedene experimentelle Strategien bekannt. Grundsätzlich lassen sich die beschriebenen Strategien in zwei Kategorien unterteilen: zeitabhängige und zeitunabhängige Versuche.

Nahezu sämtliche Daten der Anpassung von Bakterien an hyperosmotischen Streß wurden aus Experimenten mit plötzlichen Veränderungen der Osmolalität (sogenannten *shifts*) im Medium gewonnen [Dinnbier *et al.* 1988, Guillouet und Engasser 1995, Farwick *et al.* 1995, Glaasker *et al.* 1996, Csonka und Epstein 1998, Cayley *et al.* 2000]. Dazu wird meist eine in Mineralsalzmedium mit geringer Osmolalität wachsende Bakterienkultur zu einem bestimmten Zeitpunkt mit einer hohen Konzentration an NaCl oder einer vergleichbaren osmotisch wirksamen Substanz versetzt. Durch diesen Versuchsaufbau kann die Anpassung der Zelle an plötzliche osmotische Veränderungen untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, zeitabhängige Untersuchungen an einem aus dem Gleichgewicht gebrachtem biologischen System durchzuführen, wie etwa Veränderungen der Syntheseleistung von konstitutiv synthetisierten Enzymen, Veränderungen der Wachstumsrate oder aber Expressionsstudien. Aus anderer Sichtweise sind jedoch genau diese Vorteile unerwünscht, denn die *shifts* reißen das biologische System stets abrupt aus einem bestehenden Gleichgewicht. Diese plötzliche, sehr große Veränderung der Osmolalität (im Bereich von Millisekunden) spiegelt für hyperosmotische *shifts* mit Sicherheit keine natürlichen Bedingungen wider und Untersuchungen, welche den natürlichen Anpassungsprozeß an hyperosmotischen Streß simulieren, sollten keine *shifts* als experimentelle Grundlage nutzen.

Im Gegensatz zu Ansätzen im Schüttelkolben besteht mit der kontinuierlichen Kultur die Möglichkeit, die Anpassung an hyperosmotischen Streß zeitlich unabhängig bei konstanter Wachstumsrate zu beobachten [Guillouet und Engasser 1995, Skjerdal *et al.* 1995]. Da diese Art des Ansatzes experimentell weitaus aufwendiger im Vergleich zu Schüttelkolben ist, existieren hierzu relativ wenig veröffentliche Daten [Hirao *et al.* 1989, Lee *et al.* 1995]. Für diese Untersuchungen müssen Bakterien in ein Fließgleichgewicht mit konstanter Wachstumsrate überführt werden, um dann anhand dieses Gleichgewichtszustandes Schlüsse zur Akkumulation osmoprotektiver Substanzen und zum Substratverbrauch unter den jeweiligen Bedingungen ziehen zu können. Der Vorteil dieser Methodik ist die zeitunabhängige Betrachtung der ablaufenden Prozesse während der Anpassung an hyperosmotischen Streß als Funktion der Wachstumsrate – die Bakterien bleiben praktisch in einer Wachstumsphase „arretiert“. Nachteile dieser Versuchsführung sind die teilweise extrem langen Zeiträume, welche bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichts vergehen, sowie die notwendige experimentelle Laborausstattung.

1.2.3 Volumenregulation

Wenig Informationen sind in der Literatur zu Regulation des Cytoplasmavolumens einer bakteriellen Zelle zu finden. Häufig wurden Versuche beschrieben, welche hauptsächlich die Veränderung des Cytoplasmavolumens nach osmotischen *shifts* zum Thema hatten [Skjerdal *et al.* 1995, Guillouet und Engasser 1996, Cayley *et al.* 2000]. Den umfangreichsten Teil nehmen in der Literatur Studien zur Volumenregulation in Eukaryoten ein, wobei regulatorische Zu- und Abnahme des Zellvolumens (*regulatory volume increase or decrease* als RVI oder RVD) im Zusammenhang mit Osmoregulation häufig beschrieben wurden [Lang *et al.* 1998, O'Neill 1999]. Erstmals wurden Volumenbestimmungen von Bakterien für *S. typhimurium* und *E. coli* [Stock *et al.* 1977] beschrieben. Nahezu alle späteren Experimentatoren übernahmen die Methodik Stocks, welche als Grundidee die Vermessung der unterschiedlichen Verteilung membrandurchläßiger und membranundurchläßiger Radioisotope in Medium und Bakterien hat. Weiterentwicklungen variierten meist die Art der Radioisotope [Rottenberg 1979, Skjerdal *et al.* 1995]. Andere Entwicklungen versuchten, alternative Methoden wie die Zählung und Größenbestimmung von Zellen im *Coulter counter* [Whatmore *et al.* 1990], *Image* Cytometrie [Woldringh *et al.* 1993], NMR-Spektroskopie [Pfeuffer 1998] oder aber *Scanning*-Ionenleitfähigleits-Mikroskopie [Korchev *et al.* 2000] für die Volumenbestimmung von Mikroorganismen zu nutzen.

1.3 Versuchsziele

Für den L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B soll in der vorliegenden Arbeit bei möglichst realitätsnahen Bedingungen untersucht werden, wie sich Zellbildung (Biotrockenmasse), Substratverbrauch, und vor allem das Cytoplasmavolumen als Reaktion auf hyperosmotischen Streß im Laufe einer typischen Fermentation verändern. Da in bisherigen Experimenten stets plötzliche Veränderungen der Osmolalität im Medium (*upshifts*) angewandt wurden, soll in dieser Arbeit die Anpassung an jeweils konstant eingestellten Osmostreß (im Bereich von 1,0 bis 2,5 Osmol/kg) untersucht werden. Im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B und Mutanten mit Defekten in den Aufnahmeproteinen für kompatible Solute soll die Zusammensetzung von selbstsynthetisierten und aufgenommenen osmoprotektiven Substanzen (hier Betain) im Cytoplasma als Reaktion auf konstanten Osmostreß (von 1,0 bis 2,5 Osmol/kg) und in Abhängigkeit von der Wachstumsphase bestimmt werden. Das Ziel der kontinuierlichen Versuchsführung mit *C. glutamicum* MH20-22B soll einerseits die Ermittlung der notwendigen Erhaltungsenergie von nichtwachsenden Zellen sein. Die L-Lysinproduktion soll weiterhin als Funktion von Wachstumsrate und Osmolalität im Medium charakterisiert werden. Zusätzlich sollen die metabolischen Veränderungen bei konstanter Wachstumsrate und langsam steigendem Osmostreß über einen längeren Versuchszeitraum beobachtet werden.

2 Theorie

2.1 Kontinuierliche Fermentation und Bioreaktortechnik

2.1.1 Chemostattheorie

Wird eine Mikroorganismenkultur im Chemostat kultiviert, so handelt es sich um einen dynamischen Prozeß, bei dem jedoch alle Eingangs- und Ausgangsparameter konstant bleiben. So ändern sich vorgegebene Verdünnungsrate und Substrateinlaufkonzentration nicht. Der pH-Wert und die Temperatur, sowie Rührerdrehzahl und Begasungsrate werden konstant gehalten. Daraus resultieren im Idealzustand konstante Abgaswerte, eine unveränderlich konstante Biomassekonzentration, sowie keine Fluktuationen in der stationären Substratkonzentration, die unter substratlimitierten Wachstumsbedinungen in der Regel sehr klein ist. Betrachtet man den gesamten Prozeß, so gilt für eine beliebige Prozeßvariable ($[CO_2]$, [X], [S], et c.) [Zeng 1999]:

$$\text{S}\,\mathbf{Akkumulation} = \text{S}\,\mathbf{Eingangstrom} - \text{S}\,\mathbf{Ausgangstrom} + \text{S}\,\mathbf{Produktion} - \text{S}\,\mathbf{Verbrauch} = \mathbf{0}$$

Für diese Arbeit gilt speziell bezogen auf das Substrat, daß im stationären Zustand ein dynamisches Fließgleichgewicht herrscht. Da kein Substrat im Bioreaktor *de novo* entsteht, brauchen lediglich Eingangs- und Ausgangsstrom, sowie Verbrauch des Substrates durch die Biomasse betrachtet zu werden:

$$\frac{d[S]}{dt} = D \cdot [S]_0 - D \cdot [S] - r_s \cdot [X]$$

Gleichung 4: Substratbilanz im Chemostat

Im ideal durchmischten, kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor wächst die Kultur mit einer durch die Verdünnungsrate vorgegebene Wachstumsrate. Da die absolute Konzentrationsänderung der BTM (dX) unter diesen Bedingungen gleich Null ist, kann aus der Biomassebilanz folgender Zusammenhang hergeleitet werden:

$$D = \frac{V_F}{V_R} \overset{ss}{=} \mu$$

Gleichung 5: Fließgleichgewicht im Chemostat

Die Wachstumsrate entspricht unter idealen Bedingungen des Fließgleichgewichts (*steady state* = ss) der Verdünnungsrate [Zeng 1999].

2.1.2 Ausbeute- und Erhaltungsenergie-Koeffizienten

Der Ausbeutekoeffizient $Y_{x/s}$ stellt das Verhältnis von gebildeter Biomasse zu verbrauchtem Substrat dar. Unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels der Mikroorganismen kann für das Wachstum in kontinuierlicher Kultur folgende Formel benutzt werden:

$$Y_{x/s} = \frac{m}{r_s} = \frac{X}{[s]_0 - [s]}$$

Gleichung 6: Ausbeutekoeffizeint $Y_{X/S}$

Nichtwachsende Zellen benötigen zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels Energie. Dieser Substratbedarf wird in Form des *maintenance*-Terms (oder Erhaltungsenergie) berücksichtigt und unterscheidet sich vom experimentell ermittelten Ausbeutekoeffizient $Y_{x/s}$. Der korrigierte, „wahre“ Ausbeutekoeffizient berücksichtigt den Substratbedarf zur Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen und läßt sich mit folgendem Zusammenhang beschreiben:

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_{x/s_TG}} + \frac{m_s}{m}$$

Gleichung 7: *maintenance*-Term m_s

und folglich

$$Y_{x/s_TG} = \frac{m}{r_s - m_s}$$

Gleichung 8: Wahre Ausbeute Y_{X/S_TG}

m_s ist ein *maintenance*-Faktor, der die Substratverbrauchsrate [g/g h] für nichtwachsende Zellen angibt. Aus den Gleichung 7 und Gleichung 8 ergibt sich die Möglichkeit der Bestimmung von m_s und Y_{x/s_TG} durch graphische Auftragung von r_s gegen μ (=D) im stationären Zustand (Fließgleichgewicht) einer kontinuierlichen Kultur:

$$r_s = \frac{1}{Y_{x/s_TG}} \cdot m + m_s = \frac{1}{Y_{x/s_TG}} \cdot D + m_s$$

Gleichung 9: Ermittlung von m_s und Y_{X/S_TG} durch Auftragung von $r_S = f(D)$

2.2 Mathematische Modelle

Für die Anpassung der ermittelten Daten wurde unterschiedliche mathematische Modelle herangezogen, welche zum besseren Verständnis der Anpassungsmodi näher erläutert werden.

Der Verlauf der BTM wurde für alle ermittelten Daten durch Anpassung mit folgendem Modell des sigmoiden Wachstums durchgeführt. Dieses mathematische Modell wurde aufgrund seiner fast universellen Anwendbarkeit für die Anpassung des zeitlichen Verlaufs bakteriellen Wachstums benutzt. Auch andere sigmoide Verläufe wurden mit dieser Formel modelliert.

$$X(t) = \frac{X_0 - X_i}{1 + e^{\frac{t_i - t_C}{dx}}} + X_i$$

Gleichung 10: Sigmoide Anpassung (Boltzmann Origin™)

Anpassungen des beobachteten Cytoplasmavolumens wurden mit dem sogenannten Lognormal-Modell aus Origin™ durchgeführt. Diese Funktion verfügt über eine Variable, welche formal-mathematisch die Größe des Abszissenabschnittes festlegt, sowie weitere Größen zur Beschreibung eines Maximas. Diese Funktion bietet alle notwendigen mathematischen Variablen zur Beschreibung der beobachteten typischen Verläufe der Cytoplasma- und Zellvolumina unter allen getesteten Bedingungen.

$$V_Z = V_{Z,\,stat.} + A \cdot e^{\frac{-\ln^2\left(\frac{t_i}{t_{Vz,\,max}}\right)}{2 \cdot w^2}}$$

Gleichung 11: Peak-Anpassung (log-normal Origin™)

Für die Modellierung von Daten zur Lysinbildung in Abhängigkeit der Wachstumsrate wurde das Modell von Luong [Luong 1987] modifiziert. Diese Formel bietet die Möglichkeit, kritische Wachstumsraten, ab denen kein Umsatz mehr beobachtet wird, mit in die Modellierung einfließen zu lassen.

$$r_{Lys} = r_{Lys,max} \cdot \frac{\mu}{K + \mu} \cdot \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{krit.}}\right)$$

Gleichung 12: Luong-Modell [Luong 1987]

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme, Plasmide, Medien und Chemikalien

3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *E. coli* und *C. glutamicum* sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Stämme von *E. coli* und *C. glutamicum* und deren phäno- und genotypischen Eigenschaften

Stamm	relevanter Geno-/Phänotyp	Referenz
E. coli		
DH5αmcr	*endA1 supE44 thi-1 l⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR D(lacZYA-argF) U169* Φ80*dlacZ DM15mcrA D(mrr hsdRMS mcrBC)*	Grant *et al.* 1990
S17-1	*thi-1* F⁻ *endA1 hsdR17 supE44* λ⁻ *pro*	Simon *et al.* 1983
C. glutamicum		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe *et al.* 1967
ATCC 13032 Δ3‘	*ectP⁻,betP⁻, putP⁻*	Morbach (unveröffentl.)
MH20-22B	*lysC(Fbr) leuCD*	Schrumpf *et al.*1992
MH20-22B Δ1	*lysC(Fbr) leuCD, ectP⁻*	diese Arbeit
MH20-22B Δ2	*lysC(Fbr) leuCD, ectP⁻,betP⁻*	diese Arbeit
MH20-22B Δ3	*lysC(Fbr) leuCD, ectP⁻,betP⁻,proP⁻*	diese Arbeit
MH20-22B Δ3$^+$	*lysC(Fbr) leuCD, ectP⁻,betP⁻, proP⁻*,pHP5 (*proP*)	diese Arbeit
MH20-22B Δ3‘	*lysC(Fbr) leuCD, ectP⁻,betP⁻, putP⁻*	diese Arbeit

3.1.2 Verwendete Vektoren und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide mit ihren Markern und Eigenschaften

Plasmide	Marker/Eigenschaft	Referenz
Standardklonierungsvektoren und deren Derivate		
pUC18/19	Expressionsvektor, Amp^R, ColE1, $oriV_{E.c.}$, 2,7 kb	Vieira und Messing 1982
pEKEX2	Kan^R, *laqI*^{q}, *ptac*	Eikmanns *et al.* 1994
pAB1	*putP* (3,3 kb) in pUC18	Peter 1997
pHP2	*betP* (2,3 kb) in pUC18	Peter 1997
pHP4	*proP* (3,6 kb) in pUC18	Peter 1997
pHP5	*proP* (3,6 kb) in pEKEX2	Peter 1997
pBA2	*ectP* (2,7 kb) in pUC18	Peter 1997
pAB1 *putP*$^-$	pAB1 mit interner *Nco*I-*Nco*I-Deletion	Peter 1997
pHP2 *betP*$^-$	pHP2 mit interner *Hinc*II-*Nru*I-Deletion	Peter 1997
pHP4 *proP*$^-$	pHP4 mit interner *Stu*I-*Eco*RV-Deletion	Peter 1997
pBA2 *ectP*$^-$	pBA2 mit interner *Cla*I-*Cla*I-Deletion	Peter *et al.* 1998
Integrationsvektoren und deren Derivate		
pK19*mobsacB*	Integrationsvektor, Kan^R, $oriV_{E.c.}$, *mob*, *sacB*, 5,7 kb	Schäfer *et al.* 1994
pK19*mobsacB putP*$^-$	pK19*mobsacB* mit dem 2,7kb *Sph*I-Fragment aus pAB1 *putP*$^-$	diese Arbeit
pK19*mobsacB betP*$^-$	pK19*mobsacB* mit dem 1,3kb *Eco*RI-Fragment aus pHP2 *betP*$^-$	diese Arbeit
pK19*mobsacB proP*$^-$	pK19*mobsacB* mit dem 1,4kb *Sca*I-*Nae*I-Fragment aus pHP4 *proP*$^-$	Peter 1997
pK19*mobsacB ectP*$^-$	pK19*mobsacB* mit dem 2,0kb *Bam*HI-*Eco*RI-Fragment aus pBA2 *ectP*$^-$	Peter *et al.* 1998

3.1.3 Komplexmedien

Für die Kultivierung von *C. glutamicum* wurde (falls nicht anders beschrieben) das Vollmedium Brain Heart Infusion (**BHI**) von der Fa. Difco (Augsburg, Deutschland) bezogen und entsprechend der Herstellervorschrift angesetzt. Zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurde das Vollmedium Luria Broth (**LB**) nach Sambrook *et al.* [1989] verwendet. Zur Stammhaltung, DNA-Isolierung und Kultivierung von *C. glutamicum* wurde ebenfalls das Vollmedium LB verwendet. Zur Regeneration nach der Elektroporation wurden die Zellen auf **LBHIS**-Agar nach Liebl *et al.* [1989] kultiviert.

3.1.4 Minimalmedien

Die in dieser Arbeit benutzen Chemikalien wurden – soweit nicht anders erwähnt – routinemäßig *pro analysi* bezogen. Für die Bestimmungen der cytoplasmatischen Solutzusammensetzung sowie der Bestimmung des Cytoplasmavolumens in Schüttelkolben wurde *C. glutamicum* im Mineralsalzmedium C.g.XII mit 6% (w/v) Saccharose angezogen [Keilhauer *et al.* 1993]. Die Konzentration von $(NH_4)_2SO_4$ wurde auf 20 g/l erhöht. Osmostreß wurde in variablen Konzentrationen mit NaCl eingestellt. L-Leucin und D(+)Biotin wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben. Prokatechusäure wurde für eine verbesserte Eisenionenaufnahme ebenfalls sterilfiltriert zugegeben.

3.1.5 Medienzusätze

Bei Stämmen, die sich von dem Leucin-auxotrophen L-Lysinbildner *C. glutamicum* MH20-22B ableiten, wurden alle Minimalmedien für kontinuierliche Kulturen in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,4 g/l mit L-Leucin supplementiert. Zur Selektion von Antibiotikaresistenzen in rekombinanten Stämmen oder zur Inhibierung des Wachstums wurden den Medien nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Lösungen je nach Versuchsziel in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Tabelle 4: Zusätze zu den Medien

Organismus	Medienzusatz	Konzentration [µg/ml]
E. coli	Carbenicillin	50
	Kanamycinsulfat	25
C. glutamicum	Kanamycinsulfat	25
	Prokatechusäure	30
	Betain	10 mmol/l

3.1.5.1 Modifiziertes C.g. XII für kontinuierliche Fermentationen

Für kontinuierliche Fermentationen wurde das Mineralsalzmedium C.g.XII modifiziert [Keilhauer *et al.* 1993]. Da im Bioreaktor eine Pufferung durch MOPS nicht mehr notwendig war, wurde auf diesen Bestandteil verzichtet. Weiterhin wurde die Konzentration von $(NH_4)_2SO_4$ wie auch bei den Experimenten mit Schüttelkolben auf 20 g/l erhöht. Als Kohlenstoffquelle wurde hier Glukose benutzt. Die NaCl-Konzentration wurde in Abhängigkeit des Versuchsansatzes im Bereich von 10 g/l bis 50 g/l variiert, um eine variable Osmolalität je nach Versuch einstellen zu können. Die Spurensalze wurden als 1000fach konzentrierte Stammlösung sterilfiltriert nach dem Autoklavieren zugegeben. Der Komplexbildner EDTA (Ethylendiamintetraacetat) wurde dem Medium für eine verbesserte Eisenionenaufnahme zugegeben.

Tabelle 5: Modifiziertes Minimalmedium C.g.XII für kontinuierliche Fermentationen

Bestandteil	**Molare Masse [g/mol]**	**Konzentration [mol/l]**	**Konzentration [g/l]**
Glukose	180,16	0,555	100,0
NaCl	58,44	0,17 bis 0,86	10,0 bis 50,0
$(NH_4)_2SO_4$	132,14	0,15	20,0
K_2HPO_4	174,23	$1,1 \cdot 10^{-2}$	2,0
KH_2PO_4	136,09	$1,5 \cdot 10^{-2}$	2,0
$MgSO_4$	120,50	$0,8 \cdot 10^{-3}$	1,0
Na_2EDTA	336,24	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-1}$
$CaCl_2$	110,99	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
$MnSO_4$	169,01	$6,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
$FeSO_4$	277,85	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
$ZnSO_4$	287,54	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
$CuSO_4$	249,70	$6,0 \cdot 10^{-7}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
$NiCl_2$	237,60	$8,5 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$
L-Biotin	244,30	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
L-Leucin	131,20	$3,8 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-2}$

3.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

3.2.1 Allgemeine DNA-Techniken

3.2.1.1 Gewinnung und Reinigung von Desoxy-Ribonukleinsäure (DNA)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) verwendet. Hierzu wurden je 4 ml einer LB-Flüssikultur übernacht bei 37°C inkubiert und dann mit Hilfe des GFX™ Micro Plasmid Prep Kit von Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Braunschweig, Deutschland) die Plasmid-DNA isoliert. Falls nicht anders angegeben, wurde die DNA mit 20 µl sterilem, destilliertem Wasser von den Säulen eluiert.

3.2.1.2 Rekombination von DNA

Die verschiedenen Techniken zur DNA-Rekombination wie Spaltung mit Restriktionsenzymen, Klenow-Reaktion, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, Ligation, Phenol-extraktion und Ethanolpräzipitation wurden nach Sambrook *et al*. [1989] durchgeführt.

3.2.1.3 Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA oder ihren Restriktionsfragmenten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in 0,8% (w/v in TAE) Agarosegelen nach Sambrook *et al*. [1989]. War die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen zur weiteren Klonierung notwendig, wurde die DNA mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) gereinigt und anschließend ebenfalls in sterilem, destilliertem Wasser aufgenommen.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet [Mullis *et al.* 1986]. Dazu wurden zwei genspezifische Starter-Oligonukleotide (*forward- und reverse primer*) verwendet, welche den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Ein wiederholter Zyklus aus DNA-Denaturierung, *primer*-Anlagerung und Kettenverlängerung der Primer mit *Taq* DNA-Polymerase® (DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) führte zur exponentiellen Vermehrung der DNA-Stränge. Komplementäre Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) in gereinigter Form bezogen. Für die Amplifizierung der DNA wurden Thermocycler der Firma Eppendorf (Hamburg Eppendorf, Deutschland) verwendet. Ein typischer 50 µl Ansatz hatte folgende Zusammensetzung: 0,1 pmol/l Plasmid-DNA (*template*), je 100-250 pmol/l *forward*-und *reverse* Primer, je 10 mmol/l dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 10 mmol/l Tris , 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 50 mmol/l KCl, bei pH 8,3 (Reaktionspuffer der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und 2,5 U *Taq*-Polymerase (ebenfalls Fa. Roche Diagnostics). Der Ablauf des Amplifizierungszyklus wurde den jeweiligen Bedingungen angepaßt. Zur Durchführung der PCR wurde der Thermocycler nach folgendem Profil programmiert:

Tabelle 6: Standard-PCR-Temperaturprofil

PCR-Profil	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94 °C	2 min
Denaturierung	30	94 °C	45 Sek.
Annealing	30	siehe Tabelle 7	30 Sek.
primer Extension	30	72°C	siehe Tabelle 7
Kühlen	1	4 °C	∞ (bis Abbruch)

Die Dauer der DNA-Polymerisation wurde so gewählt, daß bei einer Synthesegeschwindigkeit der *Taq*-Polymerase von circa 1000 Basen/min die *template*-Länge mit dem Faktor 1,5 multipliziert wurde, um eine vollständige Synthese des komplementären Fragmentes zu garantieren.

In Tabelle 7 sind die tatsächlich benutzten *annealing*-Temperaturen sowie die Zeiten für die *primer* Extension der jeweiligen Gene aufgeführt.

Tabelle 7: *Annealing*-Temperaturen und Polymerisationszeiten für die *primer* Extension

Gen	Reale *annealing* -Temp.	*primer* Extension
putP	60 °C	2,5 min
betP	60 °C	2,0 min
proP	60 °C	2,5 min
ectP	60 °C	2,0 min

3.2.2.1 Starter-Oligonukleotide (*primer*)

In Tabelle 8 sind in dieser Arbeit benutzten *primer* aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Starter-Oligonukleotide (*primer*)

primer	(5‘-3‘)-DNA-Sequenz	Gen	Referenz
PSTC4	ACT-CAT-AAG-ATA-TGA-CGA	*proP*	Peter 1997
PSTB2rek	GAG-GAT-TTC-ATG-GTC-CGT-G	*proP*	Peter 1997
ABF2	CAA-GAC-AGA-AAA-ATA-CGA-CG	*putP*	Peter 1997
ABR3	GAT-TTC-ATA-CAA-CGT-TAT-CG	*putP*	Peter 1997
PCR1	CTG-AGT-TTT-TAT-GAC-TAC-ATC-TGA-C	*betP*	Peter 1997
PCR2	CTA-TCG-ACG-CTT-CCC-CGC-G	*betP*	Peter 1997
ECTP3	TTA-AAT-ATC-GTA-TTC-GTC-CCT	*ectP*	Peter *et al.* 1998
ECTP5	ATG-AGC-TCA-AAT-ATA-GCT-ATC	*ectP*	Peter *et al.* 1998

Nach Beendigung der PCR wurden jeweils Aliquots aus jedem Ansatz entnommen und durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Sollten die nach der PCR erhaltenen DNA-Fragmente in einen beliebigen Vektor kloniert werden, so wurden sie mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland) gereinigt und dann zunächst in pUC18 kloniert.

3.2.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation von *E. coli*

Für die Transformation und Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente *E. coli* DH5α*mcr*-Zellen benötigt. Hierfür wurde die Methode nach Inoue *et al.* [1990] benutzt. Für die Transformation wurde je 200 µl Aliquots der kompetenten Zellen bei 4°C mit 20 µl Plasmid-DNA (durchschnittlich 10 ng) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzschock bei 42°C für 30 Sekunden. Danach wurden die Zellen nochmals für 10 Minuten bei 4°C gelagert. Dann wurden 800 µl LB-Vollmedium (mit 1% (w/v) Glucose) zu dem 200 µl-Ansatz gegeben und es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 Stunde. Danach wurden die Zellen vom Medium getrennt, in 200 µl LB-Vollmedium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem zur Selektion notwendigen Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C bis zum Sichtbarwerden von Einzelkolonien übernacht inkubiert.

Kompetente *E. coli* S17-1 wurden stets frisch vor der eigentlichen Transformation nach der Methode von Chung *et al.* [1989] hergestellt. Dazu wurden die Zellen zunächst in LB-Vollmedium bei 37°C bis zu einer $OD_{600\,nm}$ von circa 0,4 angezogen. 1 ml dieser Kultur wurde auf 4°C gekühlt und dann bei 4°C in einer Zentrifuge Z 200 M41 von Hermle Labortechnik (Wehingen, Deutschland) für 10 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in $^1/_{10}$ des Ausgangsvolumen TSS aufgenommen (2x LB-Vollmedium, 10% w/vPEG 6000, 5% v/v DMSO und 50 mmol/l $MgCl_2$). Dann wurden circa 10 ng zu transformierende DNA zugegeben, und der Ansatz für 30 Minuten bei 4°C gelagert. Danach wurden $^9/_{10}$ des Ausgangsvolumen LB-Vollmedium (mit 1% w/v Glucose) zugegeben und der Ansatz für 1,5 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Weiter wurde wie oben verfahren.

3.2.4 Transformation von *C. glutamicum*

Zur effizienten Transformation von *C. glutamicum* wurde die Elektroporation angewendet [Liebl *et al.*, 1989]. Die Zellen wurden dazu zunächst in Anwesenheit von Wachstumsinhibitoren (LB-Vollmedium mit zusätzlich 4 mg/ml Isonicotinsäureanhydrid, 2,5%(w/v) Glycin und 0,1%(v/v) Tween 80) bis zu einer Zellkonzentration von 0,16 g BTM /l ($OD_{600\,nm}$ von 0,5) bei Raumtemperatur angezogen und anschließend geerntet. Das Zellpellet wurde viermal mit sterilem 10% (v/v) Glyzerin bei 4°C gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in Aliquots zu 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Zur Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit DNA gemischt und in vorgekühlte Küvetten der Firma Biorad (München, Deutschland) übertragen. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser der Firma Biorad (München, Deutschland) bei einem Parallelwiderstand von 200 Ω, einer Kapazität von 25 µF und einer Spannung von 2,5 kV durchgeführt.

3.2.5 Konjugationen mit *E. coli* S17-1 als Donor und *C. glutamicum* als Empfänger

Die Übertragung von mobilisierbaren Plasmiden des Donors *E. coli* S17-1 in *C. glutamicum* erfolgte nach der Methode von Schäfer *et al.* [1994]. Dazu wurde ein 100 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen mit 20 ml LB-Vollmedium und dem zur Selektion benötigten Antibiotikum befüllt. Das LB-Vollmedium wurde mit 400 µl einer frisch transformierten Kultur des plasmidtragenden Stammes S17-1 beimpft und bis zu einer Biomassekonzentration von circa 0,3 g/l BTM ($OD_{600\ nm}$ von 0,7-1,0) angezogen und anschließend auf Eis gelagert. Pro Ansatz (insgesamt 14 pro Konjugation) wurden 3 ml des Rezipienten (*C. glutamicum*) in LB-Vollmedium (1,55 g/l BTM oder $OD_{600\ nm}$ von 5,0) in einem Falcon-Röhrchen einem Hitzeschock (9 min, 48,5°C) unterzogen und anschießend mit 1 ml der Donorkultur vermischt. Die Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes in 100 µl LB-Vollmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend auf sterile Zellulosenitratfilter (Typ HAWP, Porengröße 0,45 µm) von Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich) als dickflüssiger Tropfen aufgetragen, der Filter auf LB-Agarplatten aufgelegt und für die erste Rekombination circa 20 Stunden bei 30°C inkubiert. Zellen wurden mit je 600 µl LB-Vollmedium von den Filtern abgeschwemmt und für die erste Selektion auf BHI-Agarplatten (eine pro Ansatz) mit Nalidixinsäure und Kanamycin in der benötigten Konzentration aufgetragen und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Aus den Einzelkolonien wurden Kolonien von *C. glutamicum* durch mikroskopische Analyse identifiziert (durchschnittlich 10 Klone aus den 14 Ansätzen) und zur Kontrolle des gewünschten Phänotyps (Kan^R und Suc^S) auf BHI-Agarplatten mit Kanamycin und Nalidixinsäure (Positivkontrolle) und parallel auf BHI-Agarplatten mit Nalidixin und 10% (w/v) Saccharose (Negativkontrolle) ausgestrichen und für 15 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Nur Klone der Positivkontrolle, die gleichzeitig kein Wachstum auf der Negativkontrolle zeigten, wurden für den zweiten Rekombinationsschritt in LB-Vollmedium mit 2% (w/v) Glukose für 24 Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend auf BHI-Agarplatten mit 10 % (w/v) Saccharose bei 30°C bis zum Sichtbarwerden von Einzelkolonien inkubiert. Einzelkolonien wurden zwecks Unterscheidung der erfolgreichen zweiten Rekombination in einem zweiten Selektionsschritt wieder auf BHI-Agarplatten mit Kanamycin und Nalidixin (in diesem Schritt die Negativkontrolle) und parallel auf BHI-Agarplatten mit Nalidixin und 10% (w/v) Saccharose (in diesem Schritt die Positivkontrolle) ausgestrichen und 15 Stunden bei 30 °C inkubiert. Es wurden nur jene Klone verwendet, die kanamycinsensitiv waren und auf saccharosehaltigen BHI-Agarplatten wuchsen (Kan^S und Suc^R). In circa 20 willkürlich gewählten positiven Klonen wurde nach diesem Selektionsschritt mittels PCR eine Überprüfung des Genotyps durchgeführt, wobei durchschnittlich nur 20% der getesteten Klone den gewünschten Genotyp zeigten.

3.2.6 Bestimmung des spezifischen bakteriellen Cytoplasmavolumens

Die Bestimmung des Cytoplasma- oder Zellvolumens wurde nach einer modifizierten Methode der Verteilung eines permeablen radioaktiven Isotops (^3H_2O) und eines nichtpermeablen radioaktiven Isotops ([^{14}C]Taurin) in der Zelle und im Vergleich dazu im Fermentationsmedium durchgeführt [Stock *et al.* 1977, Rottenberg 1979]. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen durch Zentrifugation vom Medium getrennt – nicht durch Silikonölzentrifugation, wie früher beschrieben [Ruffert *et al.*1997]. Diese Veränderung wurde notwendig, da durch eine erhöhte Salzkonzentration im Medium dessen Dichte einen größeren Wert als kommerziell erhältliches Silikonöl annahm, wodurch eine Trennung von Zellen und Medium unmöglich war.

1ml Testansatz enthielten: 20 mmol/l Taurin, 0,12 µCi/ml [^{14}C]Taurin, 0,45 µCi/ml ^3H_2O von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) und ungefähr 1,0 g/l Zellen in Minimalmedium der untersuchten Wachstumsphase. Um diese Biomassekonzentration im Testansatz für alle gewählten Versuchszeiten unabhängig von der tatsächlich vorhandenen Biomassekonzentration im Fermentationsmedium zu gewährleisten, wurden – sofern notwendig – die Zellen einem Zentrifugationsschritt unterworfen und dann wieder in Medium derselben Probe auf die notwendige Konzentration verdünnt oder angereichert. Die Ansätze wurden nach Zugabe der radioaktiven Substrate (als konzentrierte Stammlösung) 1 Minute inkubiert und dann einer Zentrifugation mittels einer Zentrifuge Z 200 M/H von Hermle Labortechnik (Wehingen, Deutschland) bei 13.000 rpm unterworfen. Überstand und Pellet wurden getrennt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 13.000 rpm bewirkte eine restlose Sedimentierung kleiner, an der Innenseite des Eppendorf-Reaktionsgefässes anhaftenden Tröpfchen, welche abgenommen und verworfen wurden. Das vom Medium getrennte Pellet wurde in 500 µl 0,1% (w/v) CTAB-Lösung resuspendiert, um die Zellen zu permeabilisieren und damit das Cytoplasma freizusetzen. Aus diesen beiden Fraktionen (Überstand und Pellet) wurden je 500 µl des Überstandes und 400 µl des resuspendierten Pellets für die Isotopenzählung in jeweils 15 ml Szintillationsflüssigkeit UltimaGold® der Fa. Canberra-Packard (Frankfurt, Deutschland) oder Rotiscint® von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert und die Zerfälle pro Minute von ^3H_2O und [^{14}C]Taurin mit dem Scintillationszähler LS 6500 von Beckman Coulter (Fullerton, USA) 5 Minuten lang ausgezählt und mit den ermittelten Werten das Cytoplasmavolumen nach Gleichung 13 berechnet [Rottenberg 1979].

$$V_C = \frac{V_{Probe} \cdot \left(\frac{A_{[^3H]\,Pellet}}{A_{[^3H]\,Überstand}} - \frac{A_{[^{14}C]\,Pellet}}{A_{[^{14}C]\,Überstand}} \right)}{BTM}$$

Gleichung 13: Berechnung des spezifischen Cytoplasmavolumens V_C

3.2.7 Bestimmung der spezifischen Transportraten von EctP, BetP, ProP und PutP für die kompatiblen Solute Betain, Ectoin und Prolin

Um die von den *C. glutamicum*-Zellen akkumulierte Menge an radioaktiv markiertem Substrat in Abhängigkeit von der Zeit zu bestimmen, wurde die schnelle Filtration angewandt. 20 ml Zellen einer Übernachtkultur in BHI-Vollmedium wurden zentrifugiert und in Phosphatpuffer (50mM Kaliumphosphat, 10mM Natriumchlorid, pH 7,5) gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen in zweifach konzentriertem Phosphatpuffer auf eine Konzentration von circa 2,5 g BTM /l ($OD_{600\ nm}$ von 8,0) eingestellt. Durch Mischung von zweifach konzentrierter (1,2 mol/l) Natriumchlorid-Phosphatpuffer-Lösung und der zweifach konzentrierten Zellsuspension in Phosphatpuffer wurde der eigentliche Versuchsansatz hergestellt (1,25 g/l BTM Zellen, 600 mmol/l NaCl). Durch Zugabe von 100fach konzentrierter Glukoselösung auf eine Endkonzentration von 10 mmol/l im Versuchsansatz wurden die Zellen energetisiert. Vor Versuchsstart wurden die Zellen für 3 Minuten bei 30°C inkubiert. Nichtradioaktive Substrate wurden entsprechend dem Versuchsansatz zwecks Maskierung des unspezifischen Transports in folgenden Konzentrationen zugegeben: Betain: 2 mmol/l, Ectoin: 0,75 mmol/l, Prolin: 0,25 mmol/l. Der Ansatz wurde durch Zugabe jeweils eines 1000fach konzentriert radioaktiven Substrats (Volumenaktivität im Ansatz: Betain und Ectoin 35 nCi/ml und Prolin 15 nCi/ml) gestartet. Über einen Zeitraum von 150 Sekunden wurden bei 30°C zunächst alle 15 Sekunden, nach 60 Sekunden jedoch alle 30 Sekunden je 200µl Probe aus dem gerührten Ansatz entnommen. Die Zellen wurde von umgebendem Medium durch schnelle Filtration über Glasfaserfilter vom Typ F der Fa. Millipore (Eschborn, Deutschland) mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage der Fa. Hölzl (Dörfen, Deutschland) abgetrennt. Noch an den Zellen haftendes Medium wurde durch zweimaliges Waschen mit jeweils 2,5 ml 0,1 mol/l LiCl entfernt. Anschließend wurden die Filter abgenommen und mit 5ml Szintillationscocktail UltimaGold® der Fa. Canberra-Packard (Frankfurt, Deutschland) resuspendiert und nach 60 Minuten mit dem Scintillationszähler LS 6500 von Beckman Coulter (Fullerton, USA) 5 Minuten lang ausgezählt und danach die Transportraten nach folgender Gleichung berechnet:

$$r_{up} = \frac{A_{Probe} \cdot [s_{Probe}]}{A_{\Sigma} \cdot V_{Probe} \cdot F_{BTM} \cdot OD_{600\ nm}}$$

Gleichung 14: Berechnung der spezifischen Transportrate

Die Prolinaufnahme durch PutP allein wurde unter veränderten Bedingungen vermessen. Die Aufnahmerate wurde mit einer geringeren Prolin-Volumenaktivität ($^1/_{10}$) bestimmt, da die Affinität von PutP zu Prolin im Vergleich zu den anderen Transportern wesentlich geringer ist (siehe Abschnitt 7.3.2).

3.3 Kultivierungs- und Fermentationsbedingungen

3.3.1 Stammhaltung und Vorkulturen

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 50%(v/v) einer auf Komplexmedium angezogenen Übernachtkultur und 50%(v/v) sterilem Glyzerin bestanden. Aliquots dieser Zellsuspensionen wurden bei -20°C bzw. -70°C aufbewahrt und zum Animpfen von Festmedium verwendet. Diese Stammhaltungsplatten wurden zwischen 15 und 48 h inkubiert, dann bei 4°C gelagert und in Abständen von ungefähr 30 Tagen erneuert.

Vorkulturen von *C. glutamicum* MH20-22B wurden in 100 ml flüssigem BHI-Vollmedium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C angezogen, indem stets 2 ml Dauerkultur als Inoculum benutzt wurde. Für die Experimente mit konstantem Osmostreß wurden die Vorkulturen zusätzlich mit 15 g/l NaCl versetzt.

Vorkulturen von *E. coli* wurden in flüssigem LB-Vollmedium in 10ml Reagenzgläsern bei 37°C angezogen.

3.3.2 Kultivierungen im Schüttelkolben

Zur Bestimmung der Aminosäureproduktion, des Cytoplasmavolumens und der Zusammensetzung des Cytoplasmas wurden Zellen einer Vorkultur aus Vollmedium entnommen, geerntet, einmal in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und anschließend wieder in 10 ml 0,9% (w/v) NaCl-Lösung aufgenommen. Mit dieser Zellsuspension wurde C.g.XII-Medium mit einer Biomassekonzentration von 0,31 g BTM /l ($OD_{600\ nm}$ von 1,0) angeimpft. Die Kultivierung von *C. glutamicum* und *E. coli* erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichen Schikanen. Die Kolben waren mit 90 ml konzentriertem Komplexmedium oder Mineralsalzmedium befüllt. Die Vorkulturen wurden von frisch angelegten Stammplatten oder im Falle von *C. glutamicum* MH20-22B aus Dauerkulturen angeimpft und für 15 h unter Schütteln (140 rpm) kultiviert. Dabei betrug die Temperatur bei *C. glutamicum* 30°C und bei *E. coli* 37°C.

3.3.3 Kultivierungen im Bioreaktor

3.3.3.1 Bioreaktorausstattung

Als Bioreaktoren wurden 2-Liter Rührkessel mit einem Arbeitsvolumen V_R = 1,8*l* der Firma Braun Biotech (Melsungen, Deutschland) benutzt. Zur Agitation wurden zwei Rushton-Turbinen unterhalb der 1,0*l*-Graduierung im gleichmäßigen Verhältnis an der Rührerwelle angebracht. Die Temperaturregulation wurde durch einen Glasdoppelmantel realisiert. Verschiedene Anschlußstutzen (DN 19 & DN 25) wurden für die Installation aller gängigen Online-Analyse-Sonden für pO_2, pH, und Temperatur genutzt. Die Zuluft wurde dem Bioreaktor durch einen 0,2µm Sterilfilter (SpiralCap™) der Fa. Pall Gelman Sciences (Roßdorf, Deutschland) zugeführt. Die Abluft wurde durch einen Kühler geleitet und mittels eines 1,0 µm Bacterial Airvent Filter der Fa. Pall Gelman Sciences (Roßdorf, Deutschland) sterilfiltriert. Um eine Analyse des Reaktorinhaltes in Bezug auf Biomassekonzentration und Substratgehalt zu definierten Zeitpunkten zu ermöglichen, wurden Proben durch Überduck aus dem Bioreaktor mittels eines in 70%(w/v) Ethanol tauchenden Schlauchstücks entnommen, was eine Probennahme unter sterilen Bedingungen ermöglichte. Der Bioreaktoraufbau ist in Abbildung 5 dargestellt.

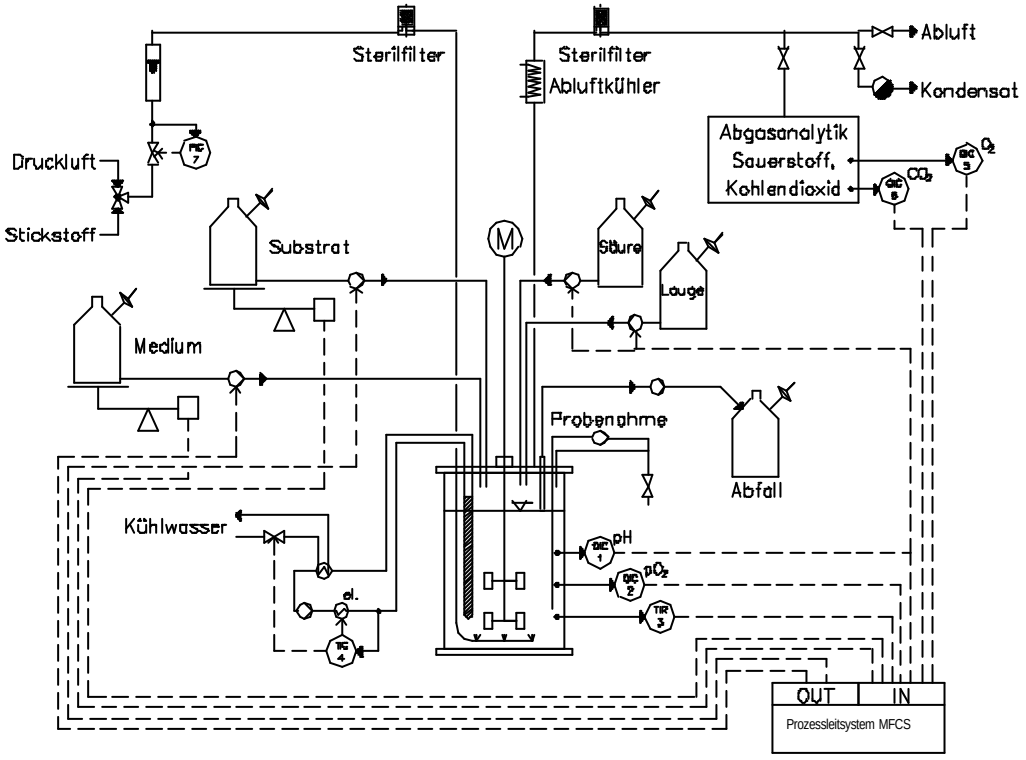


Abbildung 5: Bioreaktoraufbau und Peripherie

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über sämtliche in dieser Arbeit benutzten biotechnischen Geräte und Sonden.

Tabelle 9: Geräte und Elektroden für den Bioreaktorbetrieb

Gerät	Herstellerfirma
Biostat B und MSR-Einheit	Fa. Braun (Melsungen, Deutschland)
Prozeßleitsystem MFCS®	Fa. Braun (Melsungen, Deutschland)
Medien- u. Abfalltanks 20*l* & 50*l*	Fa. Nalge Nunc International (Rochester, USA)
Abgasanalytik: URAS 10E (in EGAS-1)	Fa. Hartmann & Braun GmbH (Ratingen, Deutschland)
pO_2-Elektrode	Fa. Mettler-Toledo (Steinbach, Deutschland)
pH-Elektrode	Fa. Mettler-Toledo (Steinbach, Deutschland)
Pumpen 313U (Abfall)	Fa. Watson-Marlow (Falmouth, Großbritannien)
Pumpen 313U (Medium)	Fa. Watson-Marlow (Falmouth, Großbritannien)
Sterilfilter SpiralCap™ 0,2 µm (Zuluft)	Fa. Pall Gelman Sciences (Roßdorf, Deutschland)
Sterilfilter Bacterial Airvent 1,0µm (Abluft)	Fa. Pall Gelman Sciences (Roßdorf, Deutschland)
Sterilfilter 13mm 0,2µm (Vorlagenflaschen)	Fa. Pall Gelman Sciences (Roßdorf, Deutschland)
Silikon-Schläuche	Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mapren-Schläuche	Fa. Watson-Marlow (Falmouth, Großbritannien)
Viton-Schläuche	Fa. Watson-Marlow (Falmouth, Großbritannien)

3.3.3.2 *batch* Fermentationen im Bioreaktor

Für *batch* Fermentationen wurde zunächst 2 ml einer Dauerkultur in 100 ml BHI-Vollmedium in 500 ml Erlenmeyerkolben kultiviert. Insgesamt 100 ml dieser Vorkultur wurden nach einem Waschschritt in 0,9% (w/v) NaCl als Inoculum für einen 2*l* Rührkessel von Braun Biotech (Melsungen, Deutschland) verwendet, der mit 1,4*l* konzentriertem Vorlagemedium für kontinuierliche Fermentationen (modifiziertes C.g.XII) befüllt war.

Bei der Kultivierung wurden die Temperatur, die Rührgeschwindigkeit, die Luftzufuhr, der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck kontrolliert. Die Temperatur wurde auf 30°C geregelt. Der pO_2 wurde bei 30 % Sättigung gehalten. Durch die Zugabe von 25 % NH_4OH-Lösung wurde außerdem der pH-Wert auf 6,9 eingeregelt. Für die *on line*-Analyse des O_2- und CO_2-Gehalts in der Gasphase wurde das Gerät URAS 10E der Fa. Hartmann& Braun (Ratingen, Deutschland) verwendet. Die Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe des Softwarepaketes MFCS der Firma Braun Biotech GmbH (Melsungen, Deutschland), das ebenfalls für die Datenerfassung und Kontrolle aller Regelkreise genutzt wurde.

3.3.3.3 Kontinuierliche Kulturführung im Bioreaktor

Ebenso wie in der *batch* Kultivierung wurden während der kontinuierlichen Kulturführung die Temperatur, die Rührgeschwindigkeit, die Luftzufuhr, der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck kontrolliert. Die Datenregistrierung erfolgte ebenfalls mit dem MFCS der Fa. Braun Biotech GmbH (Melsungen, Deutschland). Über eine Pumpe wurde mittels eines im Reaktorkopf fixierten Absaugrohres überschüssige Bakteriensuspension kontinuierlich aus dem Bioreaktor in einen Abfallbehälter (50*l*-Tank) abgeführt und somit das Volumen im Bioreaktor konstant gehalten. An den mechanischen Berührungsstellen Pumpe ⇔ Schlauch wurden stets stark beanspruchbare Mapren-Schläuche (Innendurchmesser 1,6 mm) benutzt. Für die Säurezufuhr wurde ein Silikonschlauch (Innendurchmesser 1,6 mm) gewählt. Ammoniak wurde durch Viton-Schläuche (Innendurchmesser 1,2 mm) gepumpt. Im Schlauch der Medienzufuhr befand sich eine Probennahmeeinheit, um steril die tatsächliche Zulaufkonzentration bestimmen zu können. Die Zuluft wurde durch hauseigene Druckluft bezogen. Die Anteile von CO_2 und O_2 in der Zuluft wurden mit χ_{CO2} = 0,03 und χ_{O2} = 0,2094 als konstant angenommen. Diese Zuluft wurde dem Reaktor steril (SpiralCap™ 0,2 µm) konstant mit 84 Nl/h zugeführt, was einer Begasung des Bioreaktors von 1,0 vvm entsprach.

3.3.3.4 Kontinuierliche Kulturführung mit langsam steigendem Osmostreß

Im Unterschied zur Methodik „Kontinuierliche Kulturführung“ (siehe 3.3.3.3) wurde dem Bioreaktor hier fünffach konzentriertes Medium für kontinuierliche Kulturführung zugeführt, sowie aus einem weiteren Vorlagegefäß gesättigte NaCl-Lösung (250 g/l) über eine Pumpe 313U von Watson-Marlow (Falmouth, Großbritannien) zugeführt. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, steriles, destilliertes Wasser wiederum mittels einer Watson-Marlow-Pumpe 313U kontrolliert mit den beiden Substratströmen zu mischen.

Die zwei Substratzuläufe (siehe Abbildung 5), also gesättigte NaCl-Lösung und fünffach konzentriertes Medium wurden derart mit Wasser vor Eintritt in den Bioreaktor gemischt, daß ein normal konzentriertes Medium für kontinuierliche Versuchsführung vorlag und in der Zusammensetzung konstant gehalten werden konnte. Jedoch resultierte durch Variation der Förderrate der NaCl-Lösung einerseits und der Förderrate des destillierten Wassers andererseits die Möglichkeit einen variable NaCl-Konzentration im Zulauf einzustellen.

3.4 Analytik

3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Jeweils 5 ml Fermentationsbrühe wurden in 10ml-Reagenzgläschen gefüllt und für 15 min bei 14.000 rpm in der 5810R der Fa. Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Deutschland) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Das Zellpellet wurde zweimal mit 0,9% (w/v) NaCl gewaschen und dann für 48 Stunden bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach 30 min Abkühlung im Exikator wurde die Gewichtsdifferenz zwischen leeren und mit Zellpellet gefüllten Röhrchen bestimmt und auf ein Volumen von 1 *l* umgerechnet. Diese ermittelte Biotrockenmasse wurde mit der optischen Dichte $OD_{600\ nm}$ zum Probenahmezeitpunkt korreliert. Aus dieser Korrelation ergab sich eine lineare Beziehung:

$$BTM = 0{,}31 \cdot OD_{600\,nm}\ [g/l]$$

Gleichung 15: Korrelation von BTM zu OD

Für eine detailliertere Darstellung dieser Korrelation siehe Abschnitt 4.1.1. Mittels Gleichung 15 wurde in der vorliegenden Arbeit die Biotrockenmasse zuverlässig ermittelt.

3.4.2 Bestimmung der Bakterienzahl

Die Zahl der Bakterien pro ml Medium in Abhängigkeit von der Fermentationszeit wurde mittels einer Thoma-Zählkammer der Fa. Superior Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) mit einer Kammertiefe von 0,1 mm ermittelt. Hierzu wurde die Kultur vom *C. glutamicum* unbekannter Zellkonzentration nach folgender Formel verdünnt:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = 5 \cdot (OD_{600\,nm})^2$$

Gleichung 16: Zellzahl-Verdünnungsfaktor

Somit konnte eine relativ konstante Zellzahl von durchschnittlich 25 Zellen pro auszuzählendem Quadrat sichergestellt werden Ansonsten wurde entsprechend den Instruktionen des Herstellers vorgegangen.

3.4.3 Zellaufschlüsse mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Der Zellinhalt wurde durch Permeabilsierung der Bakterienmembran mittels des Detergenz Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) gewonnen. Hierzu wurden *C. glutamicum*-Zellen mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage der Fa. Hölzl (Dörfen, Deutschland) und Nitrocellulose-Filtern (AAWP 02500 0,8 µm) der Fa. Millipore (Eschborn, Deutschland) vom Medium getrennt. Durch zwei anschließende Spülschritte mit einer im Vergleich zum Fermentationsmedium höherosmolaren NaCl-Lösung (5 Osmol/kg) wurde sichergestellt, daß einerseits Reste anhaftenden Mediums vollständig von den Zellen getrennt wurden und andererseits, daß jegliche Zellinhaltsstoffe im Zellinneren verblieben. Die Zellen wurden mit 0,1% (w/v) CTAB vom Filter in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gespült, vollständig resuspendiert und nach 2 Minuten sedimentiert. Der Überstand mit den Zellinhaltstoffen wurde weiteren Analysen unterzogen.

3.4.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie zur Konzentrationsbestimmung von Aminosäuren

3.4.4.1 Standard-HPLC mit o-Phthaldialdehyd-Mercaptoethanol (OPA & MEtOH)-Vorsäulen-Derivatiserung zur Konzentrationsbestimmung primärer Aminosäuren

Zur Bestimmung der Konzentration primärer Aminosäuren im Medium wurden als erstes die Zellen durch Zentrifugation mit einer Zentrifuge Z 200 M/H von Hermle Labortechnik (Wehingen, Deutschland) für 5 min bei 13000 rpm vom Medium getrennt. Aus dem Überstand wurde durch entsprechende Verdünnung eine Probe mit einer Aminosäure-Konzentration bis maximal 0,5 mmol/l hergestellt. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte nach Auftrennung über *reversed phase*-HPLC [Lindenroth und Mopper 1979] durch Korrelation der Fluoreszenzintensität mit der Konzentration nach Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA).

Dazu wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP 1090 der Fa. Hewlett-Packard (Waldbronn, Deutschland) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (HP 1046 A) verwendet. Die Systemsteuerung erfolgte über die Hewlett-Packard Software ChemStation. 1 µl der zu analysierenden Probe wurden in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10 µl Fertigreagens (o-Phthaldialdehyd und 2-Mercaptoethanol) der Fa. Pierce (St. Augustin, Deutschland) gemischt.

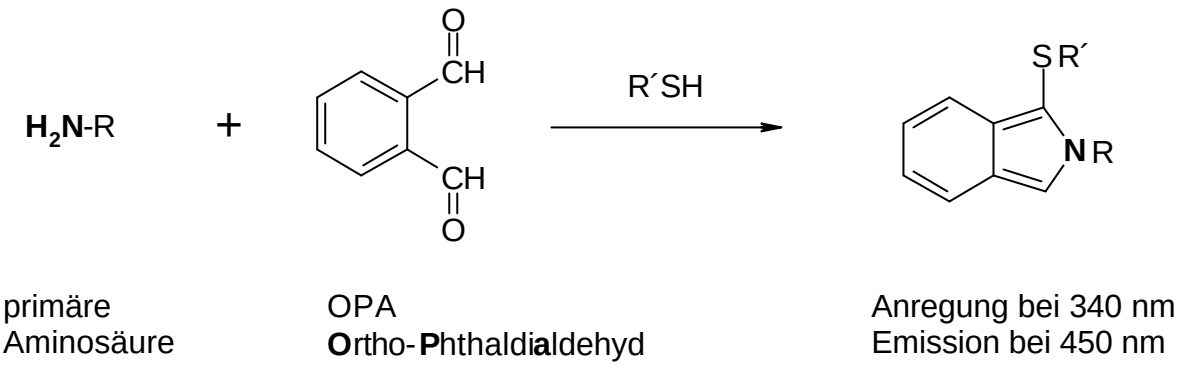
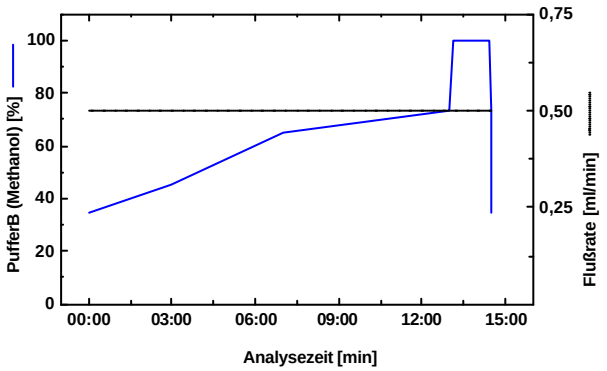


Abbildung 6: Derivatisierung mit OPA und einem Mercaptoderivat (SH-R)

Die dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole [Schuster 1988] wurden mit einer *reversed phase*-Säule (125x4mm Hypersil ODS 5 µ) der Fa. CS Chromatographieservice (Langerwehe, Deutschland) nach folgendem Gradienten (Abbildung 7) getrennt, wobei als Laufpuffer A 0,1 mol/l Natriumacetat (mit 0,3% w/v Natriumacid pH 7,2) und als Laufpuffer B Methanol *gradient grade* der Fa. Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Deutschland) verwendet wurden.



	Zeit [min]	B [%]	Fluß
1	00:00	35	0,5
2	03:00	45	0,5
3	07:00	65	0,5
4	13:00	73	0,5
5	13:06	100	0,5
6	14:24	100	0,5
7	14:29	73	0,5
8	14:30	35	0,5

Abbildung 7: Gradient zur Trennung von primären Aminosäuren mit einer *reversed phase*-Säule (125x4mm Hypersil ODS 5 µ)

Die Fluoreszenzdetektion der Aminosäurederivate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die Aminosäurekonzentrationen wurden durch eine Korrelation mit den Signalflächen [%·s] berechnet.

3.4.4.2 HPLC mit kombinierter o-Phthaldialdehyd-Mercaptopropionsäure (OPA-MPS) und 9-Fluorenylmethyl-chlorformiat (FMOC-Cl)-Vorsäulen-Derivatiserung zur Konzentrationsbestimmung primärer und sekundärer Aminosäuren

War es notwendig, die Konzentration sekundärer Aminosäuren (wie Prolin) zu bestimmen, so wurden die Proben sowohl mit OPA, als auch mit FMOC-Cl derivatisiert [Schuster 1988]. Anders als unter 3.4.4.1 beschrieben, wurde hier Mercaptopropionsäure (MPS) benutzt, um die Polarität der Derivate zu erhöhen. Andernfalls führte dies zu einer Überlagerung der Signale von Lysin-Isoindols und Prolin-FMOC. Die Reaktion mit FMOC-Cl bildete ebenfalls fluoreszenzaktive Derivate (Anregung bei 266 nm, Detektion bei 310 nm).

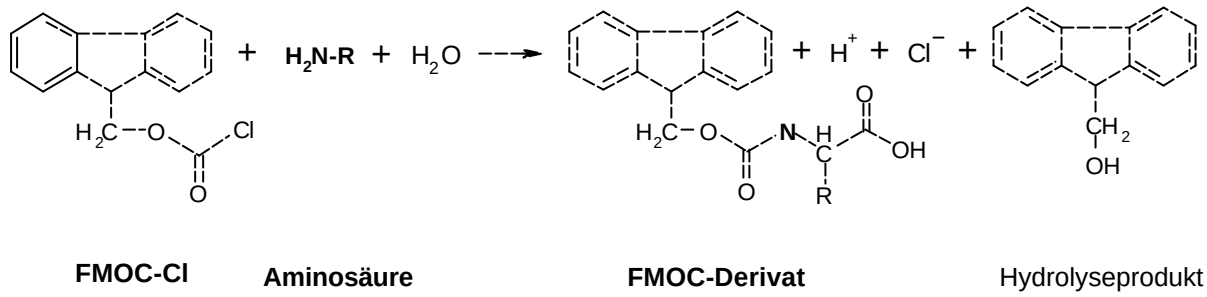
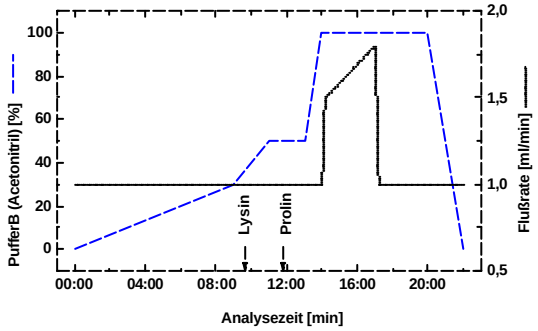


Abbildung 8: Derivatisierung mit FMOC

Die FMOC-Derivate konnten durch eine Änderung der Anregungs- und Detektionswellenlängen nach erfolgter Detektion der OPA-MPS-Derivate detektiert werden. Die fluoreszierenden OPA-MPS- und FMOC-Derivate wurden analog zu 3.4.4.1 nach folgendem Gradienten (Abbildung 9) getrennt. Laufpuffer A 0,03 M NaAcetat (mit 0,5 % v/v Tetrahydrofuran *gradient grade*) und Laufpuffer B Acetonitril *gradient grade* mit 0,1 M Natriumacetat wurden im Verhältnis 4:1 verwendet.



	Zeit [min]	B [%]	Fluß [ml/min]
1	00:00	0,5	1,0
2	09:00	30	1,0
3	11:00	50	1,0
4	13:00	50	1,0
5	14:00	100	1,0
6	14:06	100	1,4
7	14:12	100	1,5
8	17:00	100	1,8
9	17:12	100	1,0
10	20:00	100	1,0
11	22:00	0,5	1,0

Abbildung 9: Gradient zur Trennung von primärer und sekundären Aminosäuren mit einer *reversed phase*-Säule (125x4mm Hypersil ODS 5 µ) nach Schuster [1988] * Elution von Lysin & Prolin

3.4.4.2.1 Herstellung des FMOC-Reagenz

FMOC-Cl (zur Synthese) der Fa. Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Deutschland) wurde als 0,25%ige Lösung (w/v) in Acetonitril HPLC *gradient grade* der Fa. Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Deutschland) hergestellt und zur Derivatisierung benutzt. Die Lösung wurde vor den Analysen stets frisch angesetzt.

3.4.4.2.2 Herstellung des o-Phtaldialdehyd-Mercaptoptopionsäure -Reagenz

Das Reagenz wurde nach Angabe der Fa. Pierce (Instructions: Fluoraldehyd No. 26015) hergestellt. Abweichend von der Vorschrift wurde anstatt Mercaptoethanol für diese Arbeit Mercaptopropionsäure benutzt und die daraus resultierende Änderung des pH-Wertes mit 25ml KOH (1 mol/l) ausgeglichen. Die fertige Lösung wurde in HPLC-Glasröhrchen (á 1 ml) mit Stickstoff überlagert und bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Tabelle 10: Benutzte Chemikalien zur Herstellung des OPA-MPS-Reagenz

Materialien	**Hersteller**
Borsäure *purum*	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Mercapto-Propionsäure, zur Aminosäureanalyse	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
KOH (45%-ig)	Baker (Deventer, Holland)
Brij 35 (30%-ig)	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
OPA, für die Fluoreszenz	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Methanol, p.a.	Baker (Deventer, Holland)

3.4.4.3 Bestimmung der Konzentration von Glycinbetain mittels isokratischer HPLC

Betain wurde mittels der 126NM HPLC der Fa. Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) nachgewiesen.. Als Trennsäule diente eine Polyamine2-Säule (150 x 4 mm) der Fa. YMC (Schermbeck, Deutschland). Beladung und Eluation der Säule wurde mit einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser (im Verhältnis 75:25) isokratisch mit 1,0 ml/min als *recycle* betrieben. Detektiert wurde Betain nach durchschnittlich 3,8 Minuten Trennzeit mit dem Brechungsindexdetektor ERC-7515A von ERC (Alteglofsheim, Deutschland) bei 30°C.

3.4.5 Bestimmung der Kaliumkonzentration

Der Gehalt an Kaliumionen im Cytoplasma von *C. glutamicum* wurde mittels Atomemissionsspektroskopie in einem Flammenphotometers Elex 6361 der Fa. Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden zunächst Zellen nach der CTAB-Methode aufgearbeitet (Abschnitt 3.4.3), dann 20fach verdünnt und der Gehalt der Kaliumionen aus mindestens 1 ml verdünnter Probelösung bestimmt.

3.4.6 Bestimmung der Konzentration von Kohlenhydraten

3.4.6.1 Glukose, Saccharose und Trehalose im Medium

Die Konzentrationen von Trehalose, Saccharose und Glukose im Medium wurden mit enzymatischen Tests der Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) bestimmt. Anders als in der Vorschrift angegeben, wurden jeweils $^1/_3$ der Volumina benutzt. Der Glukosebestimmung lagen folgende Reaktionen zugrunde:

$$\textbf{Hexose} \xrightarrow{\text{Hexosekinase}} \textbf{Hexose-6-phosphat} + \textbf{NADP} \xrightarrow{\text{Hexosephosphat-Dehydrogenase}} \textbf{Hexose-6-phosphat} + \textbf{NADPH}$$

Abbildung 10: Enzymreaktionen der Glukosebestimmung

Die Extinktion des entstehenden NADPH wurde in 1ml Halbmikroküvetten bei 340 nm mit dem Ultrospec 3000 der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) gemessen und über folgende Gleichungen die Glukosekonzentration berechnet.

$$C = V \cdot MG / \varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000$$ **Gleichung 17**: Glukosebestimmung (allg.[1])

$$C_{Glucose} = \Delta E \times 0{,}87 \times F^2 \ [g/l]$$ **Gleichung 18**: Glukosebestimmung

Trehalose wurde mittels Trehalase (10U pro 200µl Testansatz) der Fa. Sigma (Deisenhofen, Deutschland) in Citratpuffer bei pH 5,7 in zwei Moleküle Glucose gespalten [Guillouet 1995], deren Konzentration im Anschluß daran mit dem Roche Diagnostics Glukose Test bestimmt wurde [Test **716 251**]. Saccharose wurde mittels Invertase in Fructose und Glukose gespalten

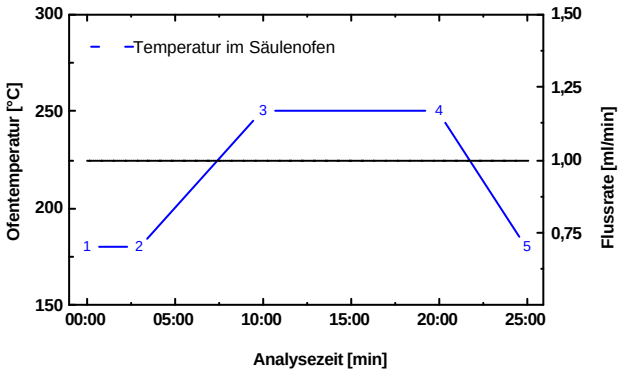
[1] $\varepsilon_{340\,nm}$ = 6,3 l·mmol^{-1}·cm^{-1}; **V**=1,007 ml; **v**=0,033 ml; **MG**$_{Glucose}$=180,16 g/mol **d**= 1 cm

[2] D**E**=Extinktion nach Enzymzugabe – Extinktion vor Enzymzugabe; **F**=Verdünnungsfaktor (1:10 → F=10)

und danach der Gehalt an Glukose ermittelt [Test **139 041**]. Glukose wurde direkt mit dem UV-Glukose-Test **716 251** der Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) bestimmt.

3.4.6.2 Konzentrationsbestimmung von Trehalose im bakteriellen Cytoplasma mittels Gaschromatographie

Für die Bestimmung der Konzentration von Trehalose im Cytoplasma wurde die Trehalose einer Derivatisierung mit N-Methyltrimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) unterzogen, um leichter flüchtige Zuckerderivate zu erhalten. Für die Bestimmung wurden die CTAB-Fraktionen aus 3.4.3 benutzt. Je 100 µl einer CTAB-Fraktion wurde in 1ml-GC-Glaschraubverschluss-Röhrchen der Fa. CS-Chromatographieservice (Langerwehe, Deutschland) überführt. In einem Speedvac-Vacuumverdampfer der Fa. Eppendorf (Hamburg Eppendorf, Deutschland) wurde bei 30°C für 4 Stunden das Wasser vollständig abgezogen. Die verbleibende feste Phase wurde mit 100 µl MSTFA versetzt, gasdicht mit teflonbeschichteten Dichtungen verschlossenen und die Sililylierungsreaktion für 60 min bei 105 °C durchgeführt. Aus dieser Lösung wurde je 1µl mit einer 5µl Hamilton-Spritze in die CS-Fused-Silica-Kapillarsäule (FS-SE-54-CB-0.25) der Fa. CS-Chromatographieservice (Langerwehe, Deutschland) des Gaschromatographen GC 9000 der Fa. Fison Instruments (Rodano, Italien) direkt eingespritzt. Der Temperaturgradient (siehe auch Abbildung 11) und der Signalintegrator D-2000 der Fa. Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland) wurden simultan ohne Zeitverzögerung manuell gestartet. Die Temperaturen des Detektors EL 980 der Fa. Fison Instruments und des Injektors betrugen 290°C und 270°C.



	Zeit [min]	T [°C]	Fluß [ml/min]
1	0	180	1,0
2	3	180	1,0
3	10	250	1,0
4	20	250	1,0
5	25	180	1,0

Abbildung 11: Temperaturgradient zur Trennung von Disacchariden mit Gaschromatographie

Mit dieser Versuchsanordnung konnten Disaccharidgemische problemlos getrennt werden. Das Trehalosederivat wurde reproduzierbar nach circa 19 Minuten detektiert.

4 Ergebnisse

4.1 Physiologie und Stammentwicklung

Bevor auf die Ergebnisse der Stammentwicklung und auf die Beobachtungen der Anpassung an hyperosmotischen Streß im Schüttelkolben eingegangen wird, werden im folgenden Abschnitt grundlegende Beobachtungen für den Stamm *C. glutamicum* MH20-22B näher erläutert. Diese sind für das Verständnis und den logischen Zusammenhang der nachfolgenden Darstellungen von Bedeutung. Die folgenden Daten sind stets Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen, falls nicht anders erwähnt.

4.1.1 Korrelation von Zellzahl und Biotrockenmasse zu Optischer Dichte

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) einer Zellsuspension war für eine korrekte Bilanzierung der auftretenden Stoffwechselprozesse (Substratverbrauch, Produktbildung, et c.) essentiell. In der Regel besteht zwischen BTM und Trübung der Fermentationsbrühe ein direkter Zusammenhang. Da die Bestimmung der Trübung (also der optischen Dichte oder Extinktion einer Lösung bei 600nm) experimentell und zeitlich weit weniger aufwendig ist, als die Bestimmung der BTM, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen beiden Größen für den Stamm *C. glutamicum* MH20-22B aufgestellt. Abbildung 12 zeigt die experimentellen Ergebnisse nach Anzucht der Zellen in verschiedenen Medien:

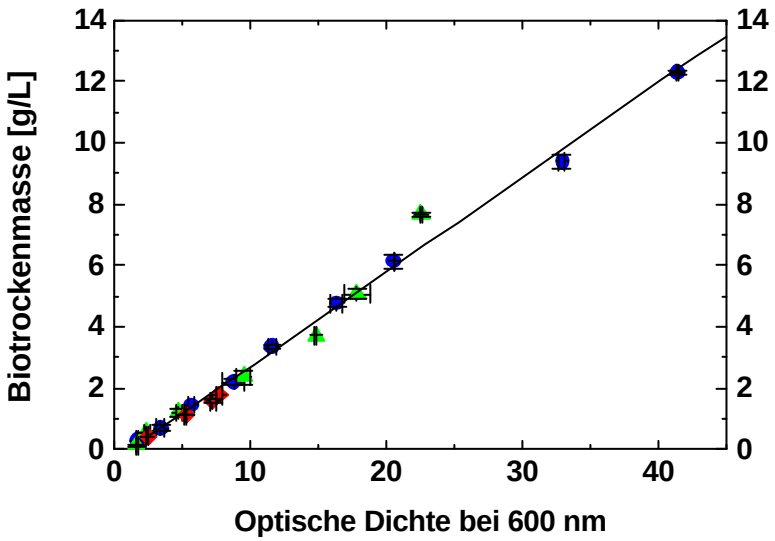


Abbildung 12: Korrelation zwischen BTM und OD für *C. glutamicum* MH20-22B in verschiedenen Medien. Dargestellt sind: ● Minimalmedium mit 1,0 Osmol/kg, ● BHI-Medium mit 0,8 Osmol/kg und ◆ BHI-Medium mit 3,0 Osmol/kg

Lineare Zusammenhänge wurden routinemäßig durch lineare Regression mit Hilfe des NLSF-Pakets (*non-linear least square fitter*) der Software Origin™ statistisch ausgewertet. Aus den Daten der Korrelation zwischen $OD_{600\ nm}$ und der BTM wurde folgende einfache Formel zur Berechnung der BTM aus OD-Messungen von Kulturen abgeleitet:

$$BTM = 0{,}31 \cdot OD_{600\,nm}\ [g/l]$$

Gleichung 19: Korrelation von BTM zu $OD_{600\,nm}$

Diese Korrelation ist als Durchschnittswert aller getesteten Medien und Wachstumsbedingungen zu betrachten. Allerdings wuchsen die Zellen aufgrund der hohen Osmolalität *a priori* nicht zu hohen Zelldichten an, was die Menge der sinnvoll nutzbaren Datenpunkte für diese Versuchsbedingungen begrenzte. Wurde zwischen einzelnen Versuchsbedingungen unterschieden, so ergaben sich geringe Abweichungen von diesem Mittelwert (0,31 ± 0,02). Im Verlauf dieser Arbeit aufgrund der sehr geringen Fehlerbehaftung mit dieser Mittelwert gearbeitet und es konnte die BTM mit Hilfe der $OD_{600\,nm}$ zuverlässig bestimmt werden.

Weiterhin war es notwendig, neben der Ermittlung der Korrelation zwischen BTM und $OD_{600\ nm}$, die exakte Zellzahl im Verhältnis zur BTM zu bestimmen, da gerade unter den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen mit osmotischem Streß nicht *ad hoc* von vergleichbaren Eigenschaften der Zellen ausgegangen werden konnte. Es wäre durchaus vorstellbar, daß wenige große Zellen eine vergleichbare Konzentration der Biomasse zeigen, wie zum Beispiel viele kleine Zellen [Meury 1988]. Für die im nächsten Abschnitt erläuterten Bestimmungen des Cytoplasmavolumens war es von außerordentlicher Bedeutung festzustellen, ob für sich die absolute Anzahl von *C. glutamicum*-Zellen pro Volumeneinheit zu irgendeinem Zeitpunkt des Wachstum trotz des linearen Zusammenhangs zwischen $OD_{600\,nm}$ und BTM möglicherweise nicht-proportional verhalten würden.

Analog zu den bereits beschriebenen Untersuchungen wurden im folgenden Experiment die Anzahl der Zellen in Abhängigkeit von der BTM und der OD_{600} zu verschiedenen Zeiten einer typischen Wachstumskurve (*lag*-Phase, exponentielle Phase und stationäre Phase) bestimmt.

Abbildung 13 zeigt die ermittelten Beziehungen zwischen den drei experimentell zugänglichen Größen BTM, $OD_{600\,nm}$, und Zellzahl.

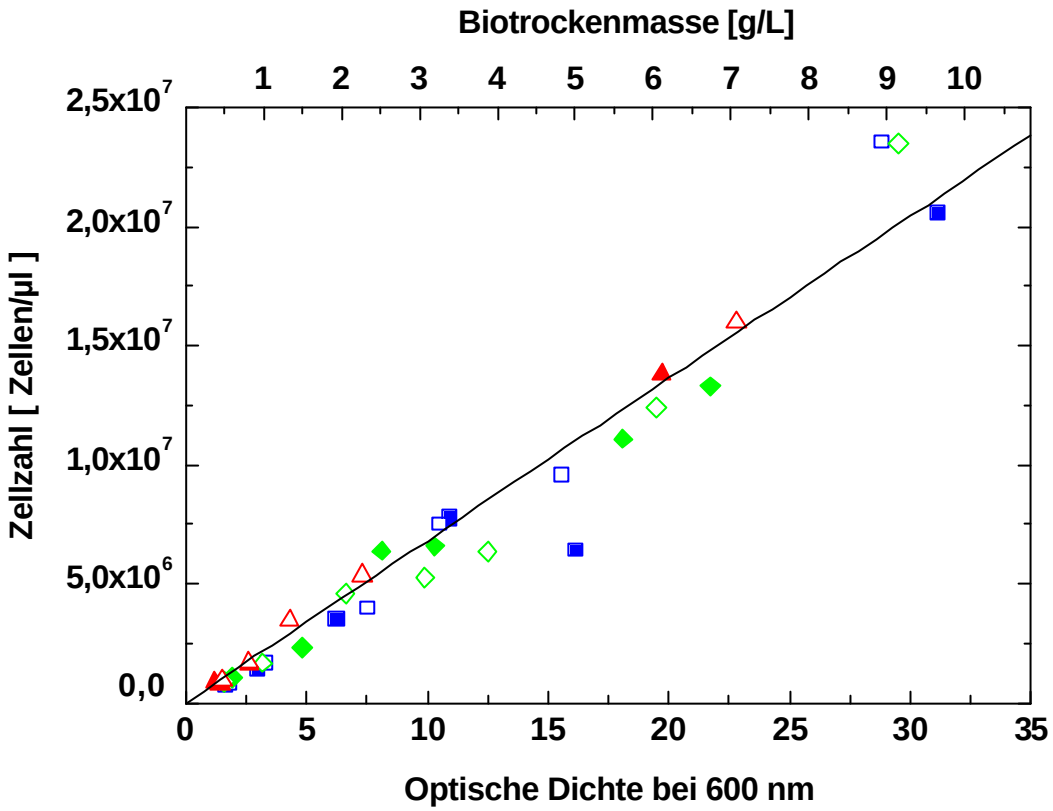


Abbildung 13: Zellzahl in Abhängigkeit von der Osmolalität und der Wachstumsphase im Schüttelkolben. Dargestellt sind: Mineralsalzmedium (MM) mit 1,0 Osmol/kg plus 10 mmol/l Betain, ■ MM mit 1,0 Osmol/kg, ? MM mit 1,5 Osmol/kg plus 10 mmol/l Betain, ◆ MM mit 1,5 Osmol/kg, ? MM mit 2,5 Osmol/kg plus 10 mmol/l Betain und ● MM mit 2,5 Osmol/kg

Die linearen Abhängigkeiten der OD, der BTM und der Zellzahl untereinander erlauben die Aufstellung einfacher mathematischer Korrelationen. Aus Abbildung 13 lassen sich folgende Gleichungen durch lineare Regression mit Hilfe der Software Origin ™ der Daten ableiten:

$$BTM\ [g/l] = 4{,}6 \cdot 10^{-7} \times \text{Zellzahl}\ [\text{Zellen}/\mu l]$$

Gleichung 20: Korrelation von BTM zu Zellzahl

$$\text{Zellzahl}\ [\mu l^{-1}] = 6{,}8 \cdot 10^{5} \times OD_{600\,nm}$$

Gleichung 21: Korrelation von Zellzahl zu OD

4.1.2 Chromosomale Deletion von *betP*, *ectP* und *proP*

Ausgehend vom L-Lysin-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Mutanten hergestellt. Ziel der Stammentwicklung war es, zunächst einen Stamm zu konstruieren, welcher kein Betain mehr aufnehmen kann (also Deletionen in *ectP* und *betP* aufweisen sollte) und darauf aufbauend einen Stamm mit vollständig defekten osmotisch regulierten Aufnahmesystemen (also mit Deletionen in *ectP*, *betP* und *proP*) zu entwickeln. Als Konsequenz sollte ein Verlust der Transportaktivität für Betain in den Stämmen *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 (kurz: Δ2) als auch *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 (kurz: Δ3) und *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ (kurz: Δ3‘) eine Verschlechterung der Anpassung an hyperosmotischen Streß im Vergleich zum Wildtyp bedeuten.

Für die Stammentwicklung wurde die Methodik der doppelten Rekombination [Schäfer *et al.* 1994] eingesetzt. Mit dieser Methode war es möglich, das Wildtypgen im Chromosom gegen ein Allel auszutauschen, welches durch die Einführung einer Deletion im kodierenden Bereich kein funktionelles Protein mehr kodierte. Der Vorteil dieser Methode war die saubere Deletion des gewünschten Gens im Chromosom, ohne daß etwa Resistenzgene oder andere Marker permanent im Chromosom von *C. glutamicum* MH20-22B verblieben. Folgende Stämme wurden in dieser Arbeit entwickelt:

Tabelle 11: Ausgehend vom Wildtyp-Produktionsstamm entwickelte Mutanten mit Deletionen in den Gene, welche für die Aufnahme von kompatiblen Soluten kodieren.

Stammbezeichnung	**Deletierte Gene**	**Genausstattung**
C. glutamicum MH20-22B [Wildtyp]	*keine*	*ectP, proP, betP, putP*
C. glutamicum MH20-22B [Δ2]	*ectP, betP*	*proP, putP*
C. glutamicum MH20-22B [Δ3]	*ectP, betP, proP*	*putP*
C. glutamicum MH20-22B [Δ3‘]	*ectP, betP, putP*	*proP*
C. glutamicum MH20-22B [$\Delta 3^{+}$]	*ectP, betP, proP*	*putP* + *proP* (auf pHP5)

Zur Überprüfung der chromosomalen Deletion dieser Gene wurden die entsprechenden Stämme mit Hilfe von PCR überprüft und die resultierenden DNA-Fragmente mit Hilfe eines Agarosegels entsprechend ihrer Größe getrennt. Abbildung 14 zeigt das erhaltene Agarosegel mit einer Ethidiumbromidfärbung.

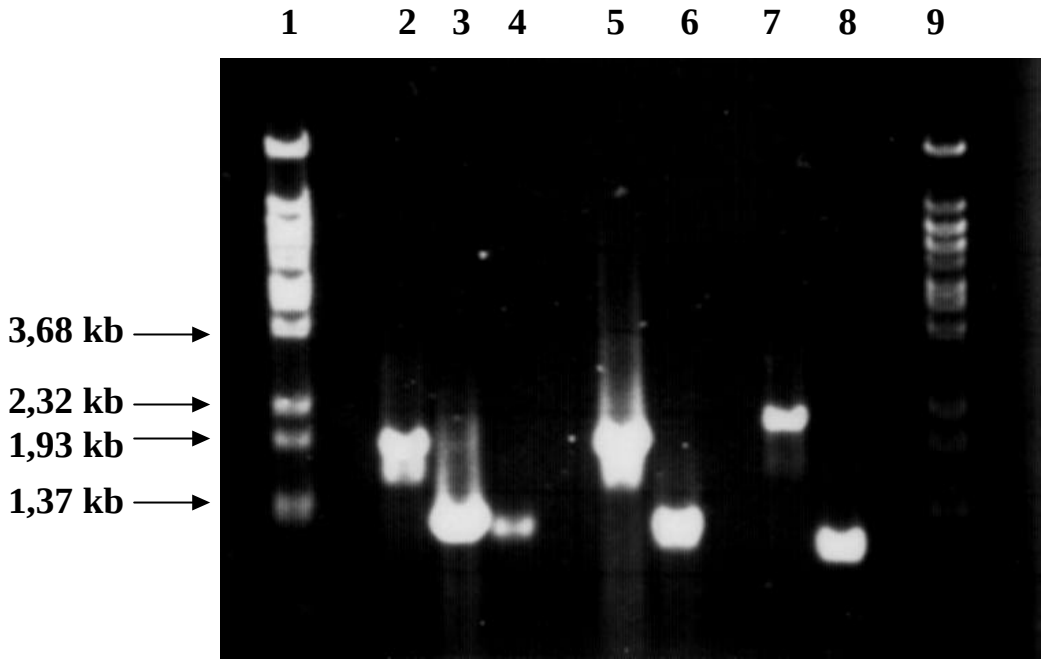


Abbildung 14: Agarosegel mit den PCR-Produkten von *ectP*, *betP* und *proP* und den verkürzten Deletionen als Nachweis der erfolgten chromosomalen Deletionen in *C. glutamicum* MH20-22B. Dargestellt sind in Bahnen 1&9: DNA-Größenstandard (*Bst*EII-Verdau des λ-Phagen), Bahn 2: *C. glutamicum* MH20-22B, Bahn 3&4: *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 (*ectP*-Primer), Bahn 5: *C. glutamicum* MH20-22B, Bahn 6: *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 (*betP*-Primer), Bahn 7: *C. glutamicum* MH20-22B, Bahn 8: *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 (*proP*-Primer),

Die erfolgreiche chromosomale Deletion der Gene *ectP*, *betP* und *proP* ist in Abbildung 14 gezeigt.

Der Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 zeigte Deletionen in allen Genen, welche für osmotisch regulierte Aufnahmeproteine kodieren. In Abbildung 14 werden diese erfolgten Deletionen durch Verkürzung der PCR-Fragmente um durchschnittlich 1kb sichtbar, welche durch Amplifikation mit genspezifischen Primern erhalten worden sind. Somit standen nunmehr zwei Stämme zur Verfügung: die Dreifachdeletion *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 und folglich die Zweifachdeletion *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 (hier nicht dargestellt).

4.2 Vergleich der Aufnahmeraten für Betain, Ectoin und Prolin – die besondere Rolle des Transporters ProP

Neben der genetischen Charakterisierung durch PCR war es notwendig, den erwarteten Verlust der Transportaktivität der entwickelten Stämmen für Betain durch detaillierte biochemische Untersuchungen zu bestätigen. Aus diesem Grund wurden die Aufnahmeraten für die kompatiblen Solute Ectoin, Betain und Prolin durch die jeweils stammspezifisch synthetisierten Transporter bestimmt. Die ermittelten Transportraten sind in Abbildung 15 dargestellt. Im Vergleich zu den aus *C. glutamicum* MH20-22B entwickelten Mutanten ist der Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ3‘ mit Deletionen in *ectP betP* und *putP* ebenfalls aufgeführt [Morbach, unveröffentlicht].

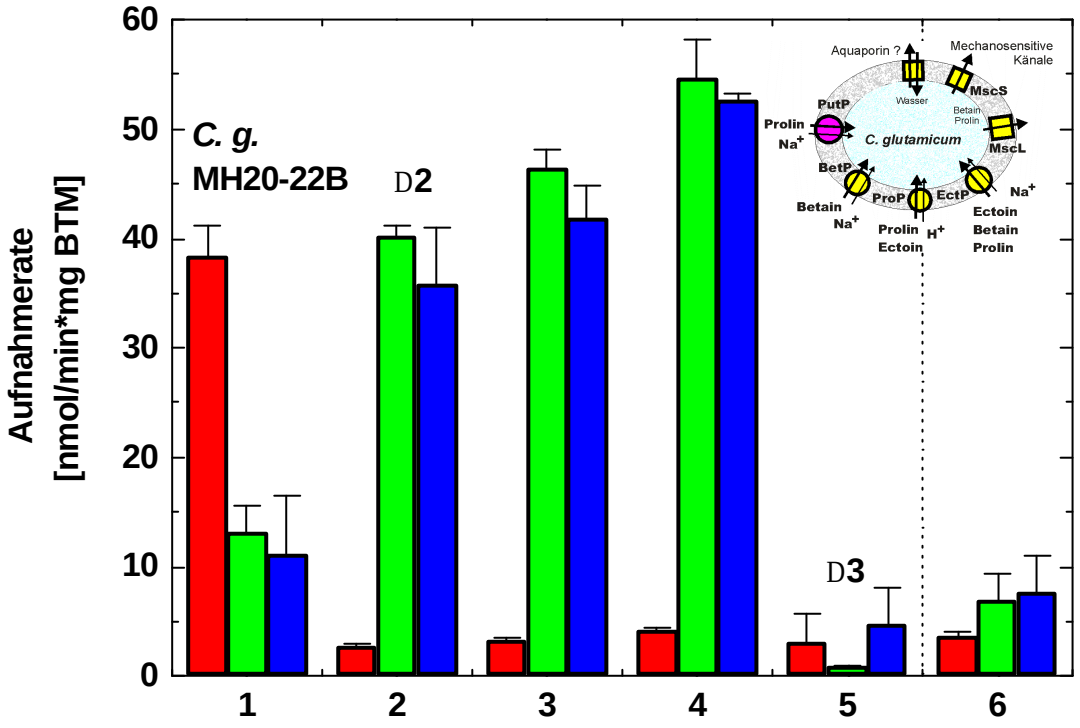


Abbildung 15: Die Aufnahmeraten für ■ Betain, ■ Ectoin und ■ Prolin [nmol/min*mg BTM] in den verschiedenen Stämmen von *C. glutamicum*. Dargestellt sind 1: *C. glutamicum* MH20-22B (alle Transporter), 2: *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 (*ectP*⁻, *betP*⁻), 3: *C. glutamicum* MH20-22B Δ3⁺ (*ectP*⁻, *betP*⁻, *proP*⁻ mit *proP* auf pHP5), 4: *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ (*ectP*⁻, *betP*⁻, *putP*⁻), 5: *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 (*ectP*⁻, *betP*⁻, *proP*⁻) und zum Vergleich 6: *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ3‘ (*ectP*⁻, *betP*⁻, *putP*⁻)

Durch Deletion der Betain-Transporter (EctP und BetP) im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 sank die spezifische Betainaufnahmerate zwar signifikant, doch blieb ein konstanter Hintergrundwert der spezifischen Betainaufnahme von 2-3 nmol/min*mg BTM meßbar. Dieser Hintergrundwert blieb sowohl bei zusätzlicher Deletion von *putP* im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ (4 in Abbildung 15) als auch in *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 (5 in Abbildung 15) mit Deletionen in *ectP, betP* und *proP* erhalten und sank nicht. Auch Experimente mit Mutanten des Typstammes *C. glutamicum* ATCC 13032 ergaben diese Restaktivität für Betain [Peter *et al.* 1998]. In Kurzzeitexperimenten (bis zu 8 Stunden) konnte gezeigt werden, daß diese Hintergrundrate auch bei Zugabe von Betain das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 ohne osmotisch regulierte Transporter (DHPE) [Peter *et al.* 1998] bei extremem Osmostreß nicht signifikant verbesserte. Daraus wurde geschlossen, daß es sich um eine unspezifische Aufnahme von Betain durch andere Transporter handeln müßte.

Die Transportrate für Ectoin stieg nach Deletionen von *ectP* und *betP* (2 in Abbildung 15) im Vergleich zum Stamm *C. glutamicum* MH20-22B signifikant auf das Dreifache der ursprünglichen Transportrate an (40,3 ± 0,9 nmol/min*mg BTM). Auch in den Stämmen *C. glutamicum* MH20-22B $\Delta3^+$ (3 in Abbildung 15) und *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ (4 in Abbildung 15) war diese stark erhöhte Aufnahmerate für Ectoin meßbar. Für den Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ war die bestimmte Rate mit 54,6 ± 3,5 nmol/min*mg BTM noch um circa 30 % höher. Im Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ3‘ mit gleicher Transporterausstattung wie *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ war eine Aktivierung des Ectoin-Transportes zwar auch zu beobachten, jedoch nicht in gleicher Größenordnung. Der Prolintransport stieg analog zum Ectointransport nach Deletion von *ectP* und *betP* im Vergleich zum Stamm *C. glutamicum* MH20-22B signifikant auf das Dreifache der ursprünglichen Transportrate (35,8 ± 5,2 nmol/min*mg BTM) an. Wie auch für Ectoin war im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ (4 in Abbildung 15) eine nochmals erhöhte Transportrate meßbar (52,7 ± 0,6 nmol/min*mg BTM).

Erst mit der Deletion von *proP* (*C. glutamicum* MH20-22B Δ3) kam der Ectointransport vollständig zum Erliegen und die gemessene Hintergrundrate von 0,9 ± 0,1 nmol/min*mg BTM war um circa 30% geringer als die bestimmte Hintergrundrate für Betain. Anders als für den Ectointransport kam die Aufnahme von Prolin im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 mit Deletion von *proP* nicht zum Erliegen, da dort das konstitutiv exprimierte System *putP* noch aktiv war. Die spezifische Prolin-Aufnahmerate betrug (3,2 ± 2,1 nmol/min*mg BTM) und wurde in gleicher Größenordnung im Wildtypstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 bestimmt [Peter *et al.* 1997].

Durch die Charakterisierung der spezifischen Transportraten der bereits genetisch definierten Stämme konnte nachgewiesen werden, daß die Mutanten auch biochemisch auf die Deletionen einzelner Transportproteine wie erwartet reagierten. Die erhöhten Aufnahmeraten

in den Stämmen Δ2, Δ3 und $\Delta 3^+$ ließen sich auf eine Aktivierung des Transporters ProP in diesen Mutanten zurückführen. Hervorzuheben ist, daß mit dieser Stammkonstruktion Bedingungen gefunden wurden, unter denen das Transportsystem ProP aktiv kompatible Solute transportierte, da auch in Derivaten von *C. glutamicum* ATCC 13032 [Peter *et al.* 1998] bisher keine Bedingungen gefunden werden konnten, unter welchen Transportaktivität von ProP gemessen werden konnte.

4.3 Wachstum und Zellvolumen von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit vom osmotischen Streß

Das Wachstum, der Substratverbrauch und die Veränderung des Cytoplasmavolumens in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und von osmotischem Streß wurden für den leucinauxotrophen L-Lysin-Produzenten *C. glutamicum* MH20-22B untersucht. Zusätzlich sollte dabei die Wirkung der osmoprotektiven Substanz Betain untersucht werden. Im Gegensatz zu bisherigen experimentellen Ansätzen wurde nicht die Anpassung der Zellen an eine plötzlichen Änderung der Osmolalität (*shift*) untersucht, sondern vielmehr Experimente bei konstantem osmotischem Streß durchgeführt. Die Versuche wurden im Schüttelkolben für 48 Stunden durchgeführt.

4.3.1 Die Veränderungen der Biotrockenmasse und des Substratverbrauchs von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und vom osmotischen Streß im Medium

Das Wachstum und der Substratverbrauch von *C. glutamicum* MH20-22B wurde in Fermentationen mit realitätsnaher Medienzusammensetzung und Fermentationsdauer (48 Stunden) bei unterschiedlichem, aber über die Versuchszeit jeweils konstant eingestelltem Osmostreß untersucht. Für die Versuche wurden die drei repräsentativen Osmolalitäten 1,0 Osmol/kg (ein für *C. glutamicum* – im Gegensatz zu *E. coli* – nur geringer hyperosmotischer Streß [Guillouet 1995, Record *et al.* 1998, Cayley *et al.* 2000]), 1,5 Osmol/kg (moderater Osmostreß) und 2,5 Osmol/kg (hoher Osmostreß) gewählt. Die beobachtete Zunahme der Biotrockenmasse sowie der Saccharoseverbrauch sind in Abhängigkeit der Fermentationszeit in Abbildung 16 dargestellt. Der Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase korrelierte experimentell mit dem Verbrauch des limitierenden Substrates L-Leucin (da es sich bei *C. glutamicum* MH20-22B um einen leucinauxotrophen Stamm handelt). Nach Verbrauch des L-Leucins kam es jedoch in keinem Fall zu gleichzeitiger Limitierung der Kohlenstoffquelle. Die im Medium mit NaCl eingestellte Osmolalität veränderte sich über den Versuchszeitraum nur unwesentlich (± 6%), woraus ersichtlich wird, daß der Verbrauch an osmotisch wirksamen Substraten (hier Saccharose) durch das Entstehen osmotisch wirksamer Metabolite (wie Aminosäuren und Carbonsäuren) kompensiert wurde.

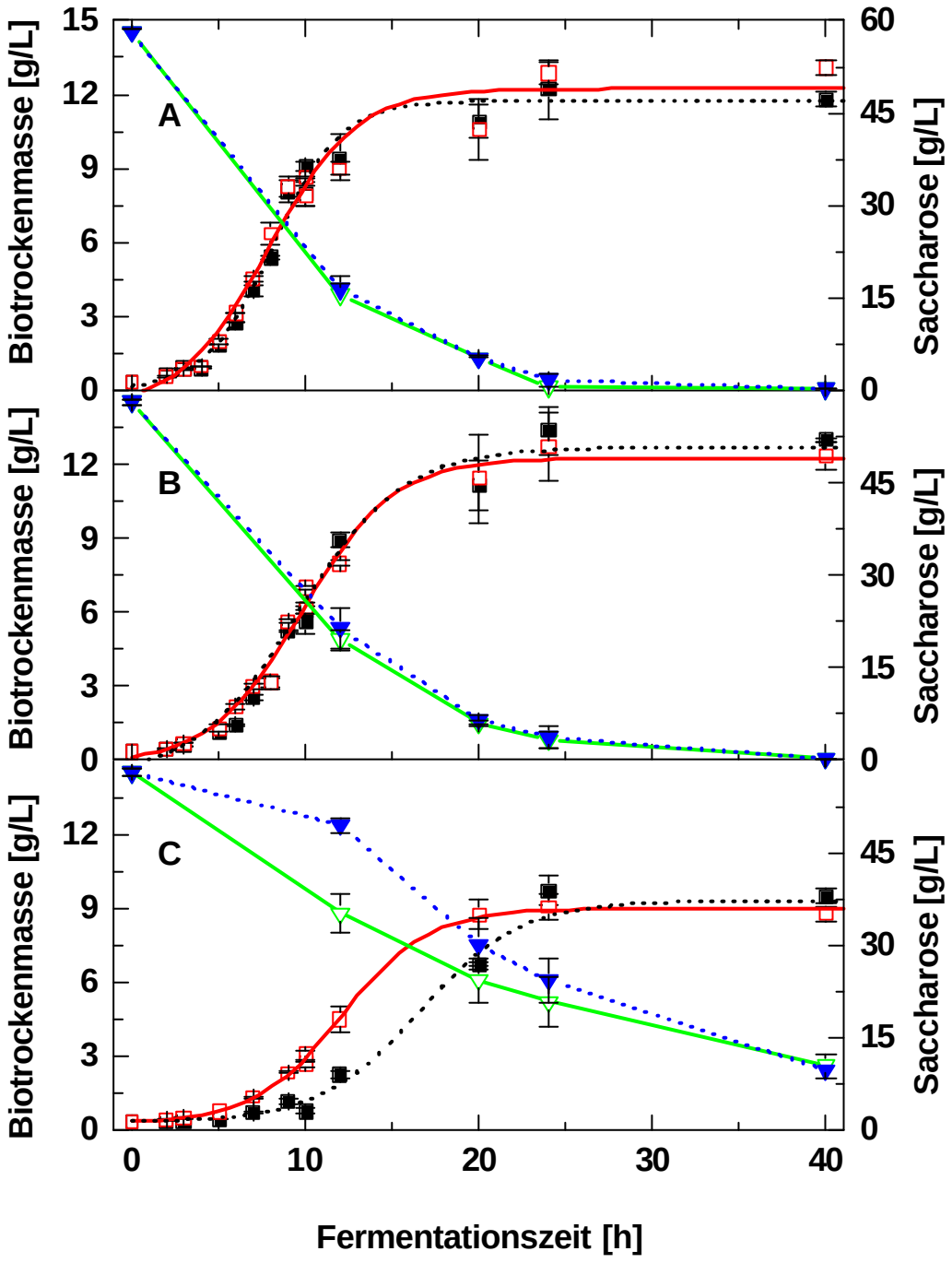


Abbildung 16: Die Konzentration der Biotrockenmasse und die Saccharosekonzentration im Medium in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und der Osmolalität. A: 1,0 Osmol/kg, B: 1,5 Osmol/kg und C: 2,5 Osmol/kg. Dargestellt sind: BTM mit 10 mmol/l Betain, ■ BTM ohne Zusatz von Betain, ▽ Saccharose im Medium mit 10 mmol/l Betain und • Saccharose im Medium ohne Zusatz von Betain

Die mittlere erreichte BTM in der stationären Phase für Experimente mit oder ohne Zusatz von Betain betrug in den Ansätzen mit 1,0 und 1,5 Osmol/kg nach 40 Stunden Fermentationszeit 12,7 ± 0,7 g/l, während die mittlere BTM nach 40 Stunden bei 2,5 Osmol/kg (mit oder ohne Betain im Medium) nur 9,4 ± 0,5 g/l betrug und somit ungefähr 25% niedriger war. In einem von dieser Versuchsreihe unabhängigen Experiment wurde das Wachstum in Abhängigkeit vom osmotischen Streß mit kleineren Erhöhungen des Osmostresses in Schritten von 0,2 Osmol/kg gemessen. Tatsächlich konnte eine Schwellwert-Osmolalität bestimmt werden , die im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 Osmol/kg lag, ab welcher eine geringere BTM in der stationären Phase von circa 10 g/l beobachtet wurde.

Der Zusatz der osmoprotektiven Substanz Betain wirkte nur bei hohem osmotischen Streß (2,5 Osmol/kg) wachstumsfördernd. Dies wurde durch einen früheren Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase und damit auch in die stationäre Phase deutlich, welche mit Zusatz von Betain unter diesen Bedingungen nach 12 Stunden erreicht wurde, ohne Betain jedoch erst nach circa 20 Stunden Fermentationszeit.

Der Verbrauch der Kohlenstoffquelle Saccharose war ebenfalls mit der Osmolalität des Mediums korreliert, da mit zunehmendem Streß weniger Saccharose verbraucht wurde. Wiederum waren die Unterschiede zwischen den Ansätzen mit 1,0 und 1,5 Osmol/kg nicht signifikant, jedoch zeigte die Abnahme der Saccharosekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit erhebliche Unterschiede bei hohem Osmostreß (2,5 Osmol/kg). Die Bakterien konnten Saccharose schneller metabolisieren, falls dem Medium Betain zugesetzt wurde. Nach 40 Stunden Fermentationszeit war Saccharose bei den Ansätzen mit 1,0 und 1,5 Osmol/kg bereits vollständig verbraucht, während beim Ansatz mit der hohen Osmolalität von 2,5 Osmol/kg noch circa 13% der Ausgangskonzentration im Medium (bei vergleichbarer Konzentration der BTM) meßbar waren.

Die Untersuchungen zur Anpassung an unterschiedlichen Osmostreß zeigten, daß die Zellbildung und der Saccharoseverbrauch von *C. glutamicum* MH20-22B lediglich bei einer sehr hohen Osmolalität von 2,5 Osmol/kg signifikant beeinflußt wurde. Erst unter diesen extremen Bedingungen wurde ein verlangsamtes Wachstum und verlangsamter Kohlenstoffverbrauch beobachtet. Durch Zugabe von Betain konnte jedoch bei hohem Osmostreß ein wachstumsfördernder Effekt beobachtet werden.

4.3.2 Korrelation von Zellvolumen und der Wachstumsrate

Neben der Beobachtung der Zellbildung und des Substratverbrauchs während der Anpassung an unterschiedlichen hyperosmotischen Streß (wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben) wurde die Veränderung der spezifischen Cytoplasmavolumina und die Veränderung der Wachstumsraten unter den gleichen Versuchsbedingungen bestimmt.

Die Gesamtheit des Hydrathüllenwassers und des ungebundenen Wassers im Cytoplasma und im Periplasma wird allgemein als Zellwasser bezeichnet [Wiggins 1990, Qu *et al.* 1998, Record *et al.* 1998a, Record *et al.* 1998b, Wood 2000, Cayley *et al.* 2000]. In dieser Arbeit wurde das ungebundene cytoplasmatische Wasser von *C. glutamicum* MH20-22B durch Zugänglichkeitsstudien mit Taurin und Wasser bestimmt [Stock *et al.* 1977]. Dabei wurde angenommen, daß Taurin als nicht-membranpermeables Molekül dieses cytoplasmatische Wasser nicht penetrieren konnte, Wasser aber wohl. Wurde das bestimmte Wasservolumen auf die Biotrockenmasse bezogen, so wird dies in den folgenden Abschnitten als „Spezifisches Cytoplasmavolumen“ V_C bezeichnet. Wurde dieser Wert jedoch auf eine einzelne Zelle bezogen, so wird dies als das ungebundene Wasservolumen einer einzelnen Zelle V_Z bezeichnet (wobei in das tatsächliche Zellvolumen noch Protein-, DNA- und sonstige Volumina einfließen würden).

Das spezifische Cytoplasmavolumen wurde während aller Wachstumsphasen in Abhängigkeit von der Osmolalität im Medium gemessen – unter gleichen Bedingungen, wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben. Anders als bei experimentellen Ansätzen in früheren Publikation [Guillouet und Engasser 1995, Skjerdal *et al.* 1995, Cayley *et al.* 2000] wurden in dieser Arbeit keine plötzlichen Änderungen des osmotischen Streß (*upshifts*) benutzt, sondern wie unter 4.3.1 beschrieben, ein jeweils konstanter Osmostreß während des gesamten Wachstums eingestellt. Von besonderem Interesse war, ob die Zugabe von Betain Auswirkungen auf die Wachstumsrate oder aber das cytoplasmatische Wasservolumen unter den gewählten Versuchsbedingungen hatte.

Für die drei bereits erläuterten Bedingungen 1,0 Osmol/kg, 1,5 Osmol/kg und 2,5 Osmol/kg wurden in Abhängigkeit von der Wachstumsphase die spezifischen Cytoplasmavolumina von *C. glutamicum* MH20-22B bestimmt und sind in Abbildung 17 dargestellt. Der interpolierte Verlauf nicht gemessener Zeitpunkte wurde mit einem Modell angepaßt (Gleichung 11). Zusätzlich wurden aus Abbildung 16 die Wachstumsraten dX/dt numerisch durch Differenzierung mit Origin™ abgeleitet. Die Wachstumsraten sind zeitgleich mit den spezifischen Cytoplasmavolumina in Abbildung 16 dargestellt.

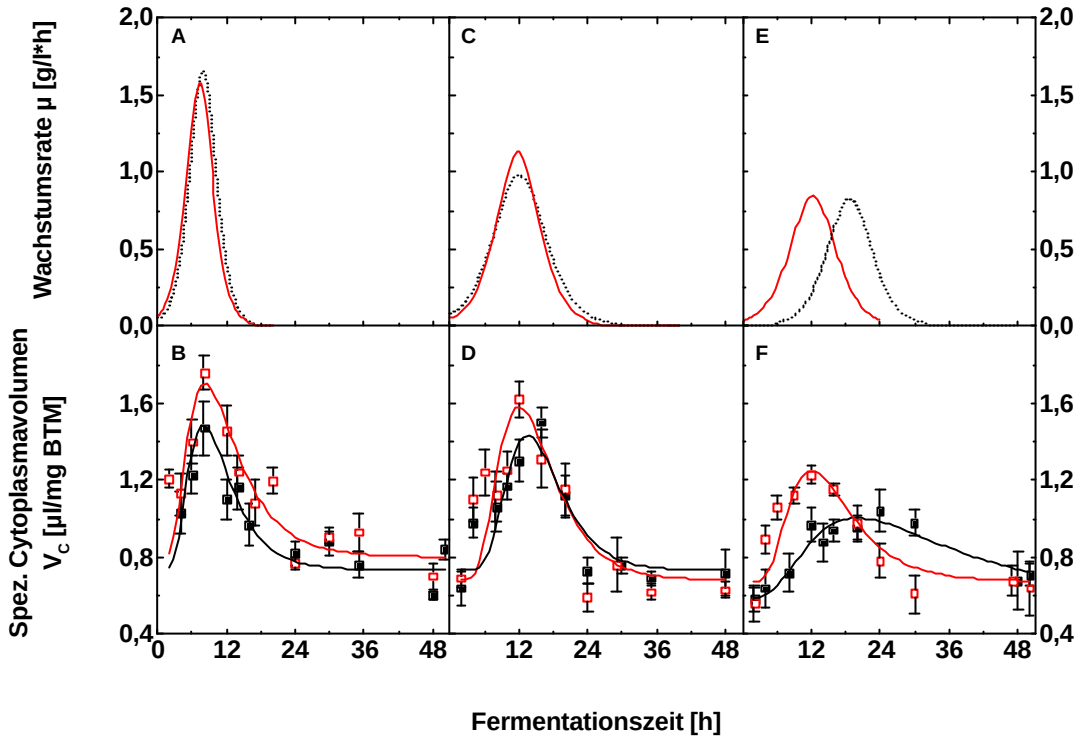


Abbildung 17: Die Wachstumsrate und das spezifische Cytoplasmavolumen von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und vom osmotischen Streß. Dargestellt sind **1,0 Osmol/kg** (A, B), **1,5 Osmol/kg** (C; D) und **2,5 Osmol/kg** (E, F) wobei im Detail bedeutet: A, C, E: dX/dt [g/l*h] mit 10 mmol/l Betain (rote Linien) und dX/dt ohne Betain (schwarze Punktlinien) sowie B,D,F: V_C [µl/mg BTM] mit 10 mmol Betain im Medium ( ) und V_C ohne Betain im Medium (■). Für die Modellierung der V_C - Daten wurde Gleichung 11 benutzt.

Das spezifische Cytoplasmavolumen (also das gesamte Zellwasser) V_C veränderte sich in Abhängigkeit von der Wachstumsphase derart, daß nach einer Phase schnellen Ansteigens zu Beginn der Fermentation stets ein Maximum durchschritten wurde. Nach Erreichen dieses Maximums verringerte sich das spezifische Cytoplasmavolumen wieder signifikant. Weiterhin sank das spezifische Cytoplasmavolumen während einer vergleichbaren Wachstumsphase mit steigender Osmolalität. Die Wachstumsrate dX/dt wurde ebenfalls von der Osmolalität beeinflußt, indem sich $(dX/dt)_{max.}$ mit steigendem Osmostreß verringerte. Weiterhin korrelierten $(dX/dt)_{max.}$ in den jeweiligen Experimenten zeitlich exakt mit $V_{C,\ max.}$. Betain beeinflußte den Zeitpunkt von $(dX/dt)_{max.}$ und $V_{C,\ max.}$. bei 2,5 Osmol/kg signifikant, jedoch nicht bei geringerem Osmostreß. Obwohl Betain den absoluten Wert von $(dX/dt)_{max.}$ im Vergleich zum Ansatz ohne Betain nicht beeinflußte, konnte unter allen Bedingungen eine Vergrößerung des spezifischen Cytoplasmavolumens und damit eine Vergrößerung des Zellvolumens beobachtet werden, falls Betain im Medium verfügbar war.

Bei 1,0 und 1,5 Osmol/kg konnten signifikante Unterschiede der Wachstumsraten beobachtet werden, die jedoch nicht von Betain beeinflußt wurden. Zellen bei 1,0 Osmol/kg erreichten $(dX/dt)_{max.}$ früher (nach 8,2 ± 0,1 Stunden +/- Betain) als Zellen, die bei 1,5 Osmol/kg angezogen wurden. Diese erreichten $(dX/dt)_{max.}$ nach 12,8 ± 0,7 Stunden (+/- Betain). Obwohl $(dX/dt)_{max.}$ bei 1,0 und 1,5 Osmol/kg durch die Zugabe von Betain nicht beeinflußt wurde, war bereits bei moderatem Osmostreß (1,5 Osmol/kg) eine geringe Verschiebung von $V_{C, max.}$. zu einem früherem Zeitpunkt feststellbar (siehe Abbildung 17), falls dem Medium Betain zugesetzt wurde. Bei 2,5 Osmol/kg änderte Betain $(dX/dt)_{max.}$ ebenfalls nicht, verschob jedoch den Zeitpunkt maximaler Wachstumsrate $(dX/dt)_{max.}$ von 20,0 Stunden (ohne Betain) auf 12,2 Stunden (mit Betain).

Die ermittelten spezifischen Cytoplasmavolumina konnten mit Gleichung 20 auf absolute Zellvolumina umgerechnet werden. Um den Einfluß der Zellvolumina auf die Wachstumsrate zu ermitteln, wurde diese Korrelation aus Abbildung 16 extrahiert und in der sekundären Abbildung 18 dargestellt.

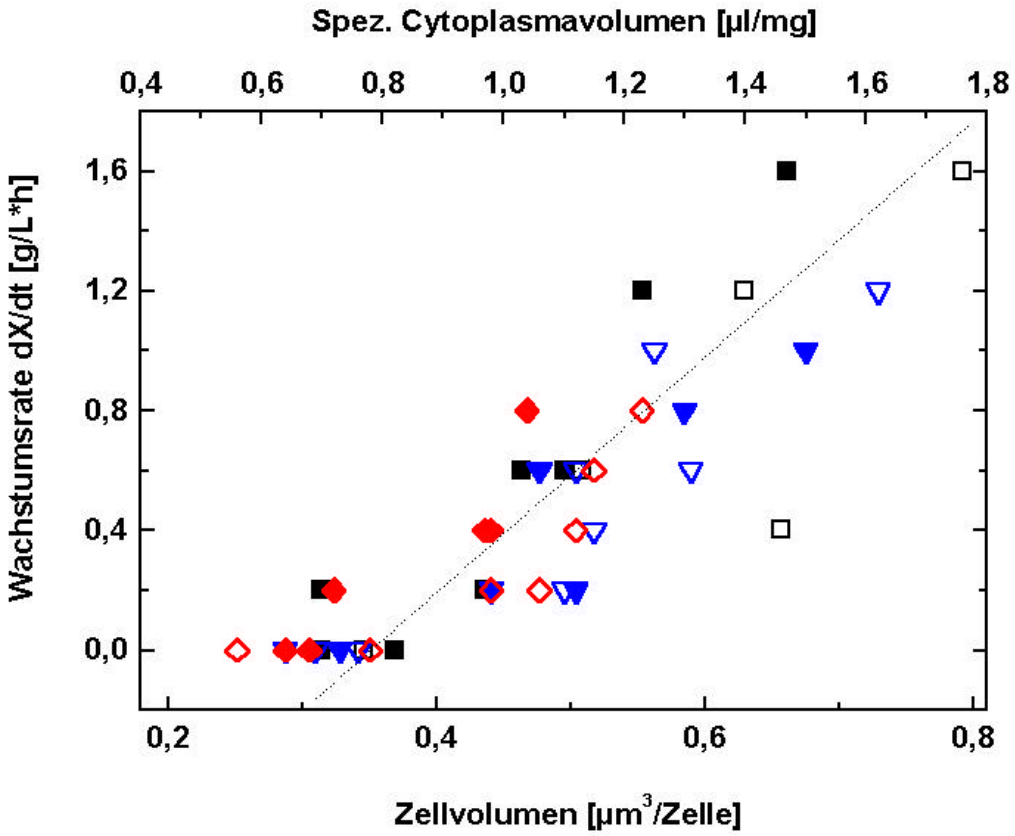


Abbildung 18: Die Wachstumsrate von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von dem Zellvolumen und unterschiedlichem hyperosmotischen Streß. Dargestellt sind: 1,0 Osmol/kg, ■ 1,0 Osmol/kg, ∇ 1,5 Osmol/kg, • 1,5 Osmol/kg, ? 2,5 Osmol/kg und ◆ 2,5 Osmol/kg. Offene Symbole: (mit Betain) und geschlossene Symbole (kein Betain)

Die Wachstumsraten waren unabhängig von Osmostreß und Fermentationszeit direkt mit den Zellvolumina korreliert. Größere Zellvolumina bedeuteten auch eine größere Wachstumsrate. Der Zusatz der osmoprotektiven Substanz Betain zum Medium resultierte nicht in signifikanten Erhöhungen der beobachteten Wachstumsraten. Die aus Abbildung 17 abgeleiteten Parameter sowie die aus der Modellierung erhaltenen Parameter zur Beschreibung des Wachstums sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Modellierte und gemessene Wachstumsparameter (* Mittelwerte aus der stationären Phase) von *C. glutamicum* MH20-22B bei unterschiedlichem Osmostreß

Parameter	**1,0 Osmol/kg**		**1,5 Osmol/kg**		**2,5 Osmol/kg**	
	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain
$t_{V\,Z,max.}$ [h]	8,0	8,2	13,5	12,1	20,0	12,2
$(dX/dt)_{max.}$ [g/l*h]	1,66	1,57	0,98	1,13	0,83	0,84
$V^{*}_{Z,stat.}$ [µm³]	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,30 ± 0,05
$V_{Z,stat.}$ [µm³]	0,33	0,36	0,33	0,31	0,27	0,30
$V_{Z,exp.}$ [µm³]	0,67	0,78	0,65	0,72	0,45	0,57

Die Größe $t_{V\,Z,max.}$ ist jene Zeit, zu welcher die Zellvolumina ihre größte Werte erreichten. Diese Zeiten stimmten exakt mit den Zeitpunkten von $(dX/dt)_{max.}$ überein. Das stationäre Zellvolumen $V_{Z,stat.}$ der gemessenen Datenpunkte verringerte sich geringfügig mit steigender Osmolalität des Mediums, sank jedoch unabhängig von der Osmolalität durchschnittlich nicht unter 0,3 µm³. Die größten Zellvolumina wurden bei 1,0 Osmol/kg beobachtet: bis zu 0,80 ± 0,04 µm³ (mit Betain) und bis zu 0,67 ± 0,06 µm³ (ohne Betain). Bei 2,5 Osmol/kg wurde im Vergleich zu den geringeren Osmolalitäten ein längerer Zeitraum maximaler Zellvolumina und keine ausgeprägten Maxima beobachtet. Unter diesen extremen Streßbedingungen konnten signifikant kleinere Zellvolumina in der exponentiellen Phase gemessen werden (< 0,60 ± 0,06 µm³). Analog zu $(dX/dt)_{max.}$ wurde die Zeit hoher Zellvolumina $t_{V\,Z,max.}$ deutlich verschoben, wenn Betain verfügbar war. Die Werte von $V^{*}_{Z,stat.}$ sind den Volumina der *lag*-Phase $V_{Z,lag}$ sehr ähnlich – zumindest für die Ansätze mit 1,5 und 2,5 Osmol/kg, für welche die *lag*-Phase tatsächlich vermessen wurde. Die Durchschnittswerte von $V^{*}_{Z,stat.}$ korrelierten ausgezeichnet mit modellierten Werten von $V_{Z,stat.}$, welche mit Hilfe des beschriebenen Modells (Gleichung 11) ermittelt wurden. Die Abhängigkeit des Zellvolumens von der Osmolalität ist in Abbildung 19 dargestellt. Zusätzlich wurden Meßdaten von ruhenden Zellen [Ruffert *et al.* 1997] mit in die Abbildung aufgenommen.

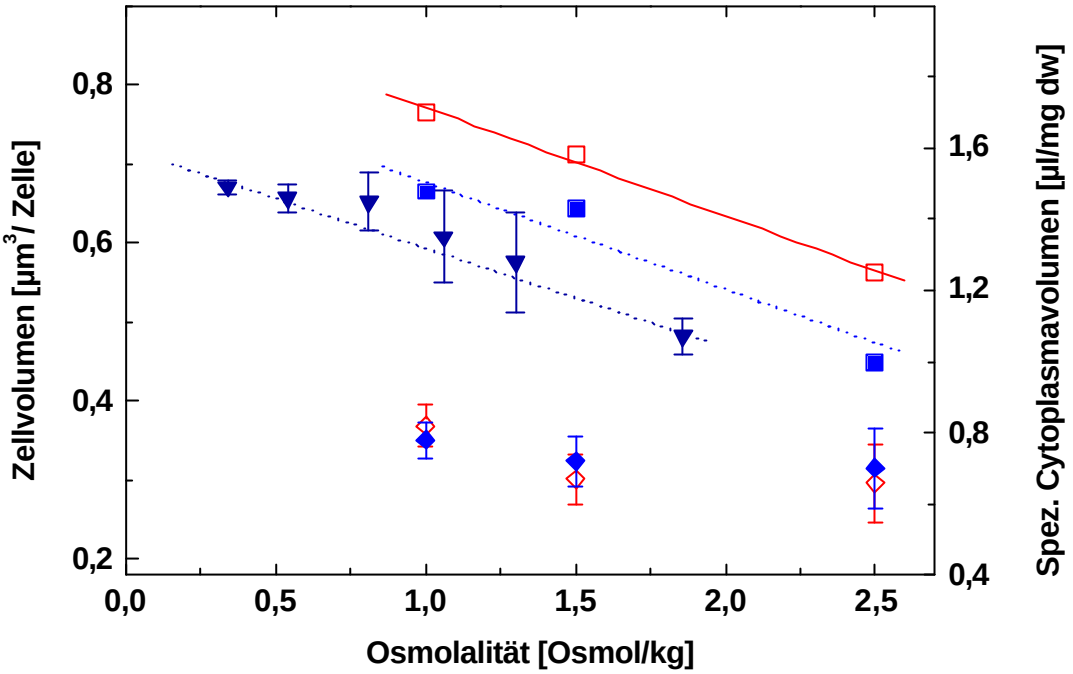


Abbildung 19: Das Zellvolumen in Abhängigkeit von der Osmolalität in Mineralsalzmedium. Dargestellt sind: exponentiell wachsende Zellen mit Betain, ■ exponentiell wachsende Zellen ohne Betain, ● ruhende Zellen [Ruffert *et al.* 1998], ? stationäre Zellen mit Betain und ◆ stationäre Zellen ohne Betain

Lineare Regressionen der Daten wachsender Zellen aus Tabelle 12 sowie der Daten von ruhenden Zellen resultierten in Geradensteigungen mit jeweils nahezu identischen negativen Steigungen von -0,13 µm^3/(Osmol/kg) für *C. glutamicum*.

Die maximal beobachtete Wachstumsrate $(dX/dt)_{max.}$ von *C. glutamicum* MH20-22B wurde direkt durch den osmotischen Streß im Medium beeinflußt. Mit einer Vergrößerung des osmotischen Stresses im Medium verringerte sich $(dX/dt)_{max.}$, ohne jedoch von Betain signifikant beeinflußte zu werden. Lediglich bei hohem osmotischen Streß von 2,5 Osmol/kg wurde der Zeitpunkt von $(dX/dt)_{max.}$ durch Zugabe von Betain zu einem früheren Stadium verschoben. Betain vergrößerte das Zellwasser (das Cytoplasmavolumen) der Bakterien während der Phase exponentiellen Wachstums um durchschnittlich 20 %. In der stationären Phase hielten alle Zellen unabhängig von der Verfügbarkeit von Betain und der Osmolalität im Medium ein minimales Zellvolumen von durchschnittlich 0,3 µm³ aufrecht. Diese Beobachtungen erhärteten die Feststellung, daß *C. glutamicum* MH20-22B außerordentlich wirkungsvolle Mechanismen besitzt, sich gegen hyperosmotischen Streß zu schützen.

4.4 Dynamik der Akkumulation osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma als Reaktion auf hyperosmotischen Streß und die Wirkung auf die Bildung von L-Lysin

Nachdem der makro- und mikroskopische Einfluß von Osmostreß auf das Wachstum von *C. glutamicum* MH20-22B untersucht wurde, werden im nächsten Abschnitt die Untersuchungen zur Auswirkung von Osmostreß auf die Konzentration osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma sowie im Fermentationsmedium erläutert.

Für die drei untersuchten Stämme (*C. glutamicum* MH20-22B, Δ2, Δ3) wurden die gleichen Fermentationsbedingungen wie im vorigen Abschnitt gewählt: 1,0 Osmol/kg (geringer hyperosmotischer Streß), 1,5 Osmol/kg (moderater hyperosmotischer Streß) und 2,5 Osmol/kg (hoher hyperosmotischer Streß). Weiterhin sollte der Einfluß des osmoprotektiven kompatiblen Solutes Betain auf die Akkumulation anderer osmoprotektiver Substanzen und die L-Lysinbildung untersucht werden. Die Stämme wurden über Nacht in BHI-Flüssigmedium bei 1,5 Osmol/kg angezogen, um an Osmostreß adaptatie rte Vorkulturen zur Verfügung zu haben. Aliquots dieser Vorkulturen wurden gewaschen und in Schüttelkolben mit Mineralsalzmedium und definierter Osmolalität entsprechend dem Versuchsansatz angeimpft. In der folgenden Abbildung ist die gebildete BTM nach 48 Stunden Fermentationszeit in Abhängigkeit von der Osmolalität dargestellt.

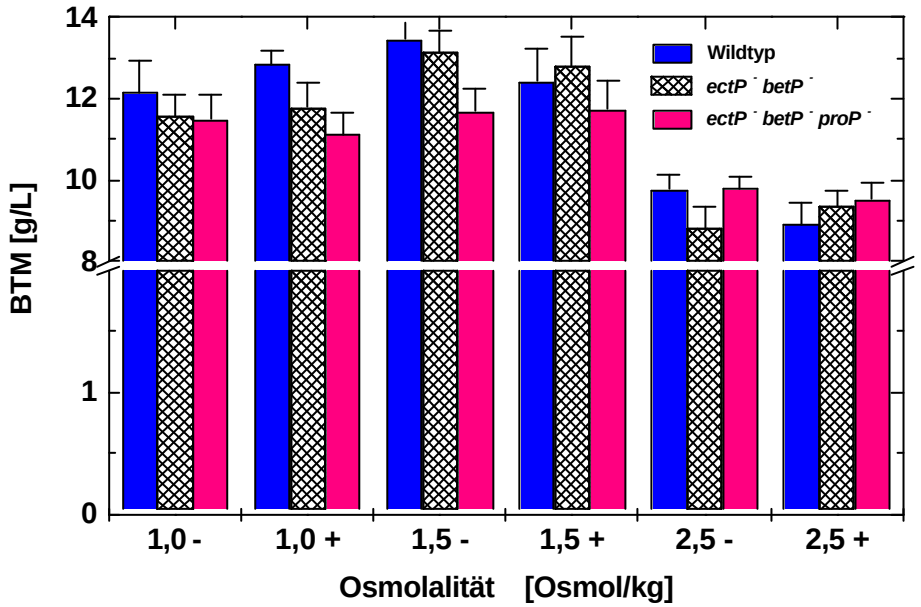


Abbildung 20: Die gebildete BTM der Stämme *C. glutamicum* MH20-22B, Δ2 und Δ3 nach 48 Stunden Fermentationszeit in Abgängigkeit von der Osmolalität im Medium. (+/-) bedeutet 10 mmol/l zugesetztes Betain oder kein Betain im Medium

Die gebildete BTM nach 48 Stunden Fermentationszeit unterschied sich zwischen den einzelnen Stämmen nicht signifikant, sondern betrug bei geringem und moderatem hyperosmotischen Streß durchschnittlich 12 g/l bis 13 g/l unter diesen Bedingungen. Wurden die Zellen bei extrem hohen hyperosmotischem Streß (2,5 Osmol/kg) angezogen, so verringerte sich die gebildete BTM nach 48 Stunden auf durchschnittlich 9 g/l für alle Stämme. Unterschiede konnten nach der Ermittlung der maximalen spezifischen Wachstumsraten festgestellt werden, welche als Steigung der exponentiellen Wachstumsphase durch halblogarithmische Auftragung der BTM in Abhängigkeit von der Fermentationszeit bestimmt wurden.

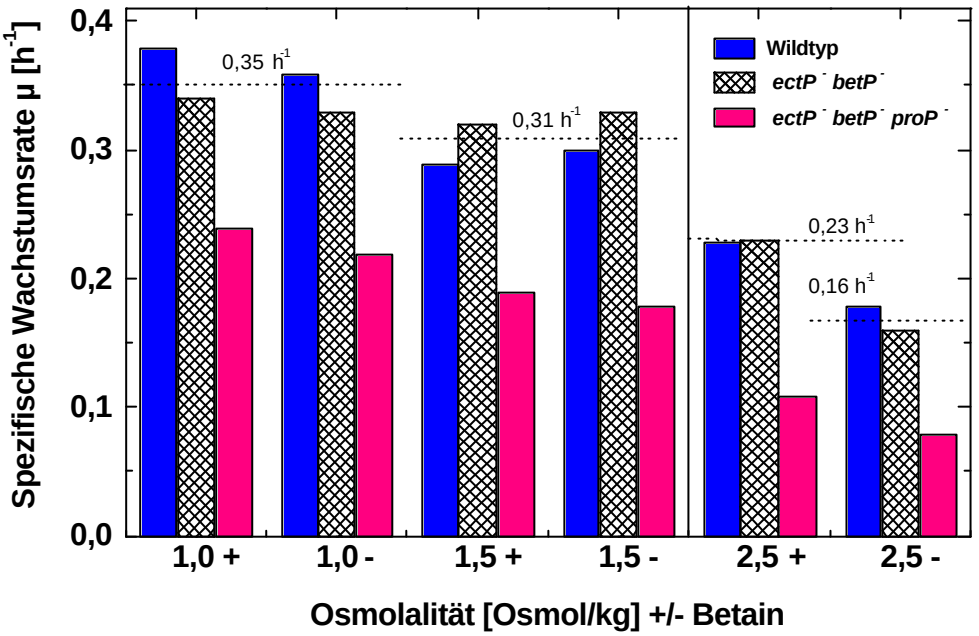


Abbildung 21: Die maximalen spezifischen Wachstumsraten der Stämme *C. glutamicum* MH20-22B, Δ2 und Δ3 nach 48 Stunden Fermentationszeit in Abhängigkeit von der Osmolalität im Medium. Die Raten wurden graphisch durch halblogarithmische Auftragung bestimmt. (+/-) bedeutet 10 mmol/l zugesetztes Betain oder kein Betain im Medium

Mit steigendem hyperosmotischem Streß sank für alle untersuchten Stämme die maximale spezifische Wachstumsrate. Dabei zeigten *C. glutamicum* MH20-22B und die Doppeldeletion *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 ähnliche Raten, welche gut mit bereits bestimmten spezifischen Wachstumsraten für *C. glutamicum* übereinstimmen [Peter *et al.* 1997]. *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 wuchs unter allen Versuchsbedingungen mit stark verminderten spezifischen Wachstumsraten. Betain erhöhte die spezifische Wachstumsrate signifikant nur bei Bedingungen mit hohem Osmostreß (2,5 Osmol/kg).

4.4.1 Der Eltern-Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits deutlich, daß *C. glutamicum* mit außerordentlich gut funktionierenden Kompensationsmechanismen gegen hyperosmotischen Streß ausgestattet ist, denn Osmolalitäten von 1,0 Osmol/kg und 1,5 Osmol/kg zeigten nur einen geringen hemmenden physiologischen Effekt. Für *C. glutamicum* stellt 1,0 Osmol/kg im Medium – im Gegensatz zu *E. coli* – nur einen geringen hyperosmotischen Streß dar [Guillouet 1995, Record *et al.* 1998, Cayley *et al.* 2000]. In dieser Arbeit wurde die Anpassung von *C. glutamicum* MH20-22B an hyperosmotischen Streß im Bereich von 1,0 Osmol/kg bis 2,5 Osmol/kg untersucht. Neben der Untersuchung, wie BTM, Zellvolumina und Wachstumsraten im Verlauf einer typischen Aminosäurefermentation von hyperosmotischem Streß beeinflußt werden, steht in diesem Abschnitt die physiologische Streßantwort im Mittelpunkt des Interesses. Wie kompensiert *C. glutamicum* im Cytoplasma extremen osmotischen Streß und welchen Einfluß hat die osmoprotektive Substanz Betain?

Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, daß *C. glutamicum* als Antwort auf hyperosmotischen Streß sowohl Prolin als auch Trehalose selbst synthetisieren kann [Frings *et al.* 1993]. Sofern im Medium die kompatiblen Solute Betain oder Ectoin vorhanden sind, werden diese gegenüber der *de novo* Synthese jedoch bevorzugt aufgenommen. Dazu besitzt *C. glutamicum* die osmotisch regulierten Transportproteine EctP, ProP und BetP [Peter 1997] (siehe auch Abbildung 3 auf Seite 7), die mit steigendem Osmostreß ihre spezifische Aufnahmerate erhöhen [Farwick *et al.* 1995, Peter *et al.* 1998].

Im diesem Abschnitt wird die Anpassung des L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B an geringen hyperosmotischen Streß beschrieben. Untersucht wurde die Veränderung der Konzentrationen von BTM und Trehalose im Medium sowie der Akkumulation osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma bei konstantem hyperosmotischem Streß. Im Gegensatz zu früheren Experimenten wurden in dieser Arbeit keine *shifts* benutzt, das heißt, die Osmolalität wurde zu Beginn des Wachstums eingestellt und blieb dann im Verlauf der Fermentation unveränderlich. Mit der in Abschnitt 4.3 gefundenen Volumenkorrelation in Abhängigkeit von Osmolalität und Wachstumsrate konnten die zunächst gemessenen spezifischen Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen [mol/g BTM] in tatsächliche Cytoplasmakonzentrationen [mmol/l] umgerechnet werden. In Abbildung 22 ist die Dynamik osmoprotektiver Substanzen (Prolin, Betain und Trehalose) im Cytoplasma sowie der BTM und Trehalose im Medium bei 1,0 Osmol/kg (mit und ohne Betain im Medium) als Funktion der Zeit für den Stamm *C. glutamicum* MH20-22B dargestellt.

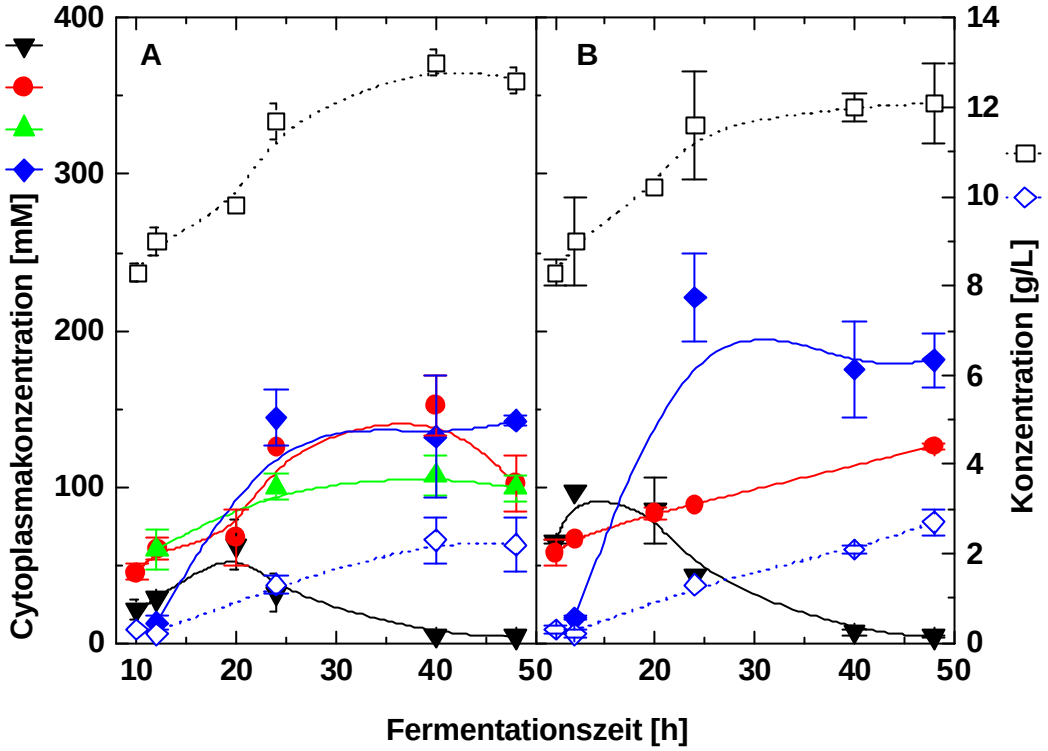


Abbildung 22: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **1,0 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Zugesetztes Betain zeigte bei geringem hyperosmotischen Osmostreß (1,0 Osmol/kg) keinen fördernden Einfluß auf die Zellbildung (BTM); wie auch bereits in Abschnitt 4.3 beobachtet. Wurde den Zellen 10 mmol/l Betain angeboten, wurde dies jedoch aufgenommen und bis zu 107 mmol/l im Cytoplasma (nach 40 Stunden, Abbildung 22-A) akkumuliert.

Auf die cytoplasmatische Konzentration von Glutaminsäure hatte Betain keinen regulatorischen Einfluß. Die Glutaminsäurekonzentration schwankte im Rahmen der Meßgenauigkeit in beiden Ansätzen (+/- Betain) um einen Wert von 100 mmol/l, jedoch stieg die Konzentration im Laufe der Fermentation leicht an. Parallel zur Glutaminsäure wurde die Konzentration des Gegenions Kalium bestimmt; jedoch bewegte sich die Kaliumkonzentration im Cytoplasma in dieser und allen folgenden Versuchsreihen in der gleichen Größenordnung wie die Glutaminsäure. Auf eine graphische Darstellung wurde aus diesem Grund stets verzichtet. Die entsprechenden Konzentrationen können jedoch dem Anhang entnommen werden.

Die Verfügbarkeit von Betain veränderte jedoch die cytoplasmatischen Konzentrationen von Prolin und Trehalose. Ohne Betain im Medium konnte im Vergleich zum Ansatz mit Betain

eine Erhöhung der Konzentrationen dieser von den Zellen selbst synthetisierten osmoprotektiven Substanzen auf durchschnittlich 180 mmol/l Trehalose und maximal 100 mmol/l Prolin gemessen werden.

Sowohl mit als auch ohne Betain im Medium wurde Prolin verstärkt während der Wachstumsphase als vorübergehend genutzte osmoprotektive Substanz gebildet, während Trehalose die bevorzugte osmoprotektive Substanz in der stationären Phase war und permanent im Cytoplasma akkumuliert wurde. In das Medium wurde Trehalose bis zu 2,7 ± 0,3 g/l (ohne Betain) und bis zu 2,2 ± 0,6 g/l (mit Betain) ausgeschieden (Zum Vergleich: 2 g/l Trehalose entsprechen einer Konzentration von circa 6 mmol/l).

In der folgenden Abbildung sind die Veränderungen der Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen und der BTM sowie von Trehalose (wie in Abbildung 22), jedoch bei moderatem hyperosmotischem Streß (1,5 Osmol/kg) dargestellt.

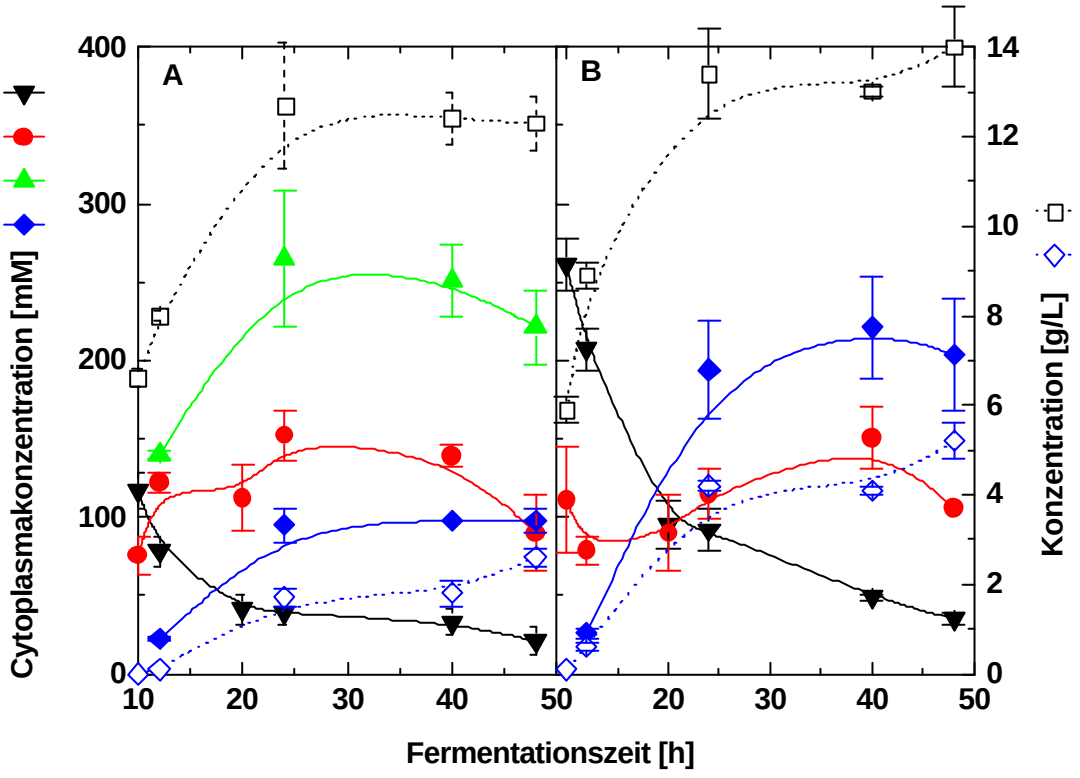


Abbildung 23: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **1,5 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Wie bei dem Ansatz mit 1,0 Osmol/kg zeigte zugesetztes Betain bei 1,5 Osmol/kg keinen fördernden Einfluß auf die Zellbildung (BTM). Wurde den Zellen 10 mmol/l Betain

angeboten, wurde dies aufgenommen. Im Gegensatz zur Versuchsreihe bei 1,0 Osmol/kg akkumulierten die Zellen unter diesen Bedingungen (1,5 Osmol/kg) durchschnittlich bis zu 250 mmol/l im Cytoplasma (Abbildung 23-A).

Bei den Glutaminsäure- und Kaliumkonzentrationen konnten keine Veränderungen zum vorigen Ansatz festgestellt werden. Die Verfügbarkeit von Betain beeinflußte die cytoplasmatischen Konzentrationen von Prolin und Trehalose in diesem experimentellen Ansatz bereits signifikant, da sich die cytoplasmatische Konzentration dieser Solute ohne Betain im Medium zu vergleichbaren Zeitpunkten ungefähr verdoppelte. Wieder wurde sowohl mit als auch ohne Betain im Medium Prolin verstärkt während der Wachstumsphase als vorübergehend genutzte osmoprotektive Substanz gebildet. Ohne Betain wurden in der Wachstumsphase 261 ± 17 mmol/l beobachtet, während im Parallelansatz mit Betain nur 117 ± 12 mmol/l während dieser Phase beobachtet wurden. Die cytoplasmatische Konzentration sank im Laufe der Fermentation sehr stark, so daß in Zellen der späten stationären Phase in beiden Ansätzen (+/- Betain) Konzentrationen um 20 mmol/l beobachtet wurden.

Trehalose stellte wieder die bevorzugte osmoprotektive Substanz in der stationären Phase dar und wurde permanent im Cytoplasma akkumuliert. Mit Betain wurden in der stationären Phase durchschnittlich 100 mmol/l Trehalose gemessen. Ohne Betain stieg die Cytoplasmakonzentration auf durchschnittlich 210 mmol/l an. Im Medium wurde unter diesen Bedingungen signifikant mehr Trehalose als bei geringem hyperosmotischen Streß gemessen. Ohne Betain wurde bis zu 5,2 ± 0,4 g/l Trehalose ausgeschieden, wogegen Betain im Medium die ausgeschiedene Trehalose auf maximal 2,6 ± 0,2 g/l reduzierte und damit die absolute Trehalose-Konzentration im Medium nahezu halbierte.

Analog zu den beiden vorangegangenen Versuchsreihen wird im folgenden Abschnitt die physiologische Anpassung des L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B an sehr hohen hyperosmotischen Streß (2,5 Osmol/kg) beschrieben. Wie wirkte sich die hier angewandte Strategie eines konstant wirkenden hyperosmotischen Stresses im Gegensatz zu den bisher durchgeführten *shift* Experimenten aus? In Abbildung 24 sind die Veränderungen der Konzentrationen von osmoprotektiven Substanzen im Cytoplasma sowie der Verlauf der BTM und Trehalose im Medium während einer typischen Fermentation dargestellt.

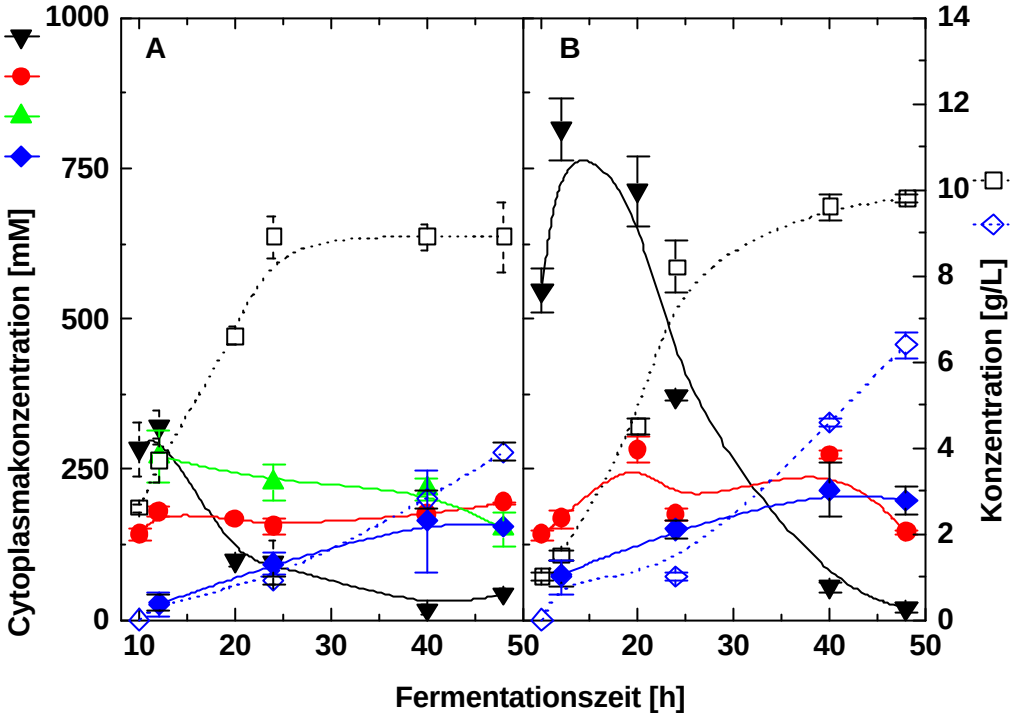


Abbildung 24: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **2,5 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Die deutlichste Veränderung in der Zusammensetzung des Cytoplasmas im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B während des Wachstums bei hohem hyperosmotischen Streß (2,5 Osmol/kg) im Gegensatz zu den weiter oben beschriebenen experimentellen Ansätzen mit geringerer Osmolalität war die überproportional gestiegene Konzentration von Prolin im Cytoplasma in der Wachstumsphase, falls kein Betain im Medium enthalten war.

Weiterhin zeigte zugesetztes Betain unter diesen Versuchsbedingungen einen deutlich wachstumsfördernden Einfluß auf die Zellbildung (BTM), da sich die *lag*-Phase ohne Zusatz von Betain verlängerte (siehe auch Abschnitt 4.3.1, Seite 43). Betain aus dem Medium wurde aufgenommen, jedoch überstiegen die maximal beobachteten cytoplasmatischen Konzentrationen nicht die Cytoplasmakonzentrationen bei 1,5 Osmol/kg zu vergleichbaren Zeitpunkten. Die Zellen akkumulierten bei hohem hyperosmotischen Streß wie auch bei 1,5 Osmol/kg durchschnittlich bis zu 250 mmol/l Betain im Cytoplasma (Abbildung 24-A). Mit Übergang in die stationäre Phase sank die cytoplasmatische Betainkonzentration geringfügig.

Bei den Glutaminsäure- und Kaliumkonzentrationen konnten keine signifikanten Veränderungen zum Ansatz bei 1,0 Osmol/kg festgestellt werden. Die Verfügbarkeit von Betain beeinflußte lediglich die cytoplasmatischen Konzentrationen von Prolin in diesem experimentellen Ansatz signifikant, da die sich die cytoplasmatische Konzentration ohne Betain im Medium zu vergleichbaren Zeitpunkten mehr als verdoppelte. Wieder wurde sowohl mit als auch ohne Betain im Medium Prolin verstärkt während der Wachstumsphase als vorübergehend genutzte osmoprotektive Substanz gebildet. Ohne Betain wurden in der Wachstumsphase maximal 815 ± 51 mmol/l beobachtet, während im Parallelansatz mit Betain nur 320 ± 29 mmol/l während dieser Phase gemessen wurden. Die cytoplasmatische Konzentration sank im Laufe der Fermentation wieder sehr stark, so daß in Zellen der späten stationären Phase in beiden Ansätzen (+/- Betain) Konzentrationen wie auch bei den vorherigen Ansätzen um 20 mmol/l beobachtet wurden.

Trehalose stellte wieder die bevorzugte osmoprotektive Substanz in der stationären Phase dar und wurde permanent im Cytoplasma akkumuliert, jedoch zeigte Betain unter diesen Bedingungen keinen signifikanten Effekt auf die Akkumulation im Cytoplasma Mit Betain wurden in der stationären Phase durchschnittlich 160 mmol/l Trehalose gemessen. Ohne Betain stieg die Cytoplasmakonzentration auf durchschnittlich 200 mmol/l an. Im Medium wurde unter diesen Bedingungen jedoch wieder signifikant mehr Trehalose als bei geringem und moderatem hyperosmotischen Streß gemessen. Ohne Betain wurde bis zu 6,4 ± 0,3 g/l Trehalose ausgeschieden, wogegen Betain im Medium die ausgeschiedene Trehalose auf maximal 3,9 ± 0,2 g/l verringerte und damit die absolute Trehalosekonzentration im Medium wieder wesentlich reduzierte.

Neben der detaillierten Untersuchung der zeitabhängigen Akkumulation osmoprotektiver Substanz war eine Bilanzierung des Gesamtgehalts analysierter Solute in Abhängigkeit von der Osmolalität im Verlaufe einer Fermentation von Interesse. Diese Bilanzierung als Vergleich der Solute im Cytoplasma (+/- Betain) sollte Aufschluß über die mehrfach publizierte „positive Wirkung“ von Betain [Kawahara *et al.* 1995, Cayley *et al.* 2000] auf die Zellbildung und die L-Lysinproduktion geben. Deshalb wurde im folgenden Abschnitt die Gesamtheit aller analysierten Solute inklusive Kalium als Summe der osmoprotektiven Substanzen zu einem diskreten Zeitpunkt während einer Fermentation zusammengefaßt. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis dieser Summierung.

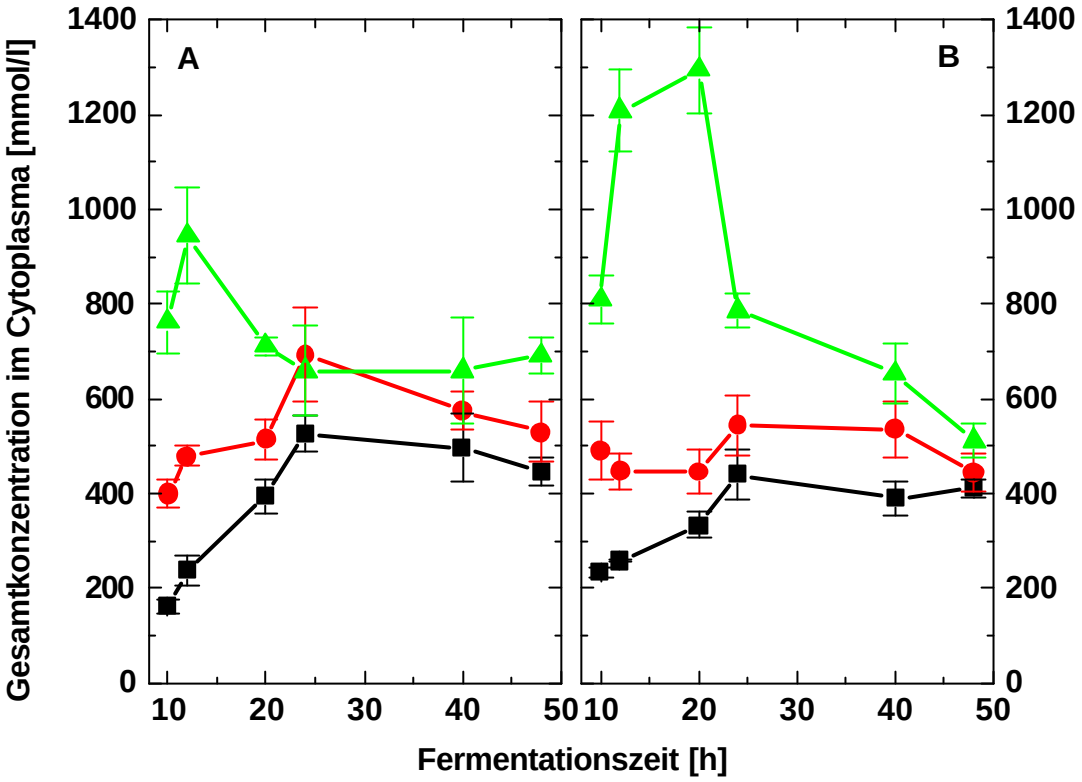


Abbildung 25: Summe der Konzentrationen aller gemessenen osmoprotektiven Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und der Zugabe von Betain (A) und ohne Betain (B) bei ■ 1,0 Osmol/kg, ● 1,5 Osmol/kg und ● 2,5 Osmol/kg

Mit steigender Osmolalität im Medium stieg auch die Gesamtkonzentration osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma. Die Daten der beiden experimentellen Ansätze mit 1,0 Osmol/kg und mit 1,5 Osmol/kg zeigten einen ähnlichen zeitlichen Konzentrationsverlauf osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma. Die Summe osmoprotektiver Substanzen stieg sowohl mit als auch ohne Betain bis ungefähr 24 Stunden nach Beginn der Fermentation leicht an und erreichte danach relativ konstant bleibende Werte um 400 mmol/l (1,0 Osmol/kg) und 550 mmol/l (1,5 Osmol/kg). Bei 2,5 Osmol/kg stieg die Konzentration osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma während der Wachstumsphase überproportional stark an. Ohne Betain im Medium (Abbildung 29, B) war die Gesamtkonzentration osmoprotektiver Substanzen (bis zu 1300 mmol/l nach 24 Stunden) im Vergleich zum Ansatz mit Betain (A) (bis zu 950 mmol/l nach 12 Stunden) signifikant größer. In der späten stationären Phase verringerte sich die Summe osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma in beiden Ansätzen wieder auf circa 600 mmol/l. Betain kompensierte extrem hohen osmotischen Streß während des Wachstums wesentlich effektiver als Prolin.

4.4.2 Die Mutante *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 (*ectP*⁻ *betP*⁻)

Im Vergleich zum Stamm MH20-22B zeigte der Stamm *C. glutamicum* MH20-22 Δ2 keine signifikanten Veränderungen der BTM und der Trehalosekonzentration im Medium sowie der cytoplasmatischen Konzentrationen von Betain, Glutamat und Prolin während der Anpassung an hyperosmotischen Streß im Verlaufe der Fermentationen im Schüttelkolben.

Wie auch für den Elternstamm wird in diesem Kapitel die Anpassung von *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 an geringen hyperosmotischen Streß (1,0 Osmol/kg) beschrieben. Untersucht wurden die Konzentrationen von BTM und Trehalose im Medium sowie die Dynamik osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma bei konstantem hyperosmotischen Streß. In Abbildung 26 ist die Anpassung bei 1,0 Osmol/kg für den Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 dargestellt.

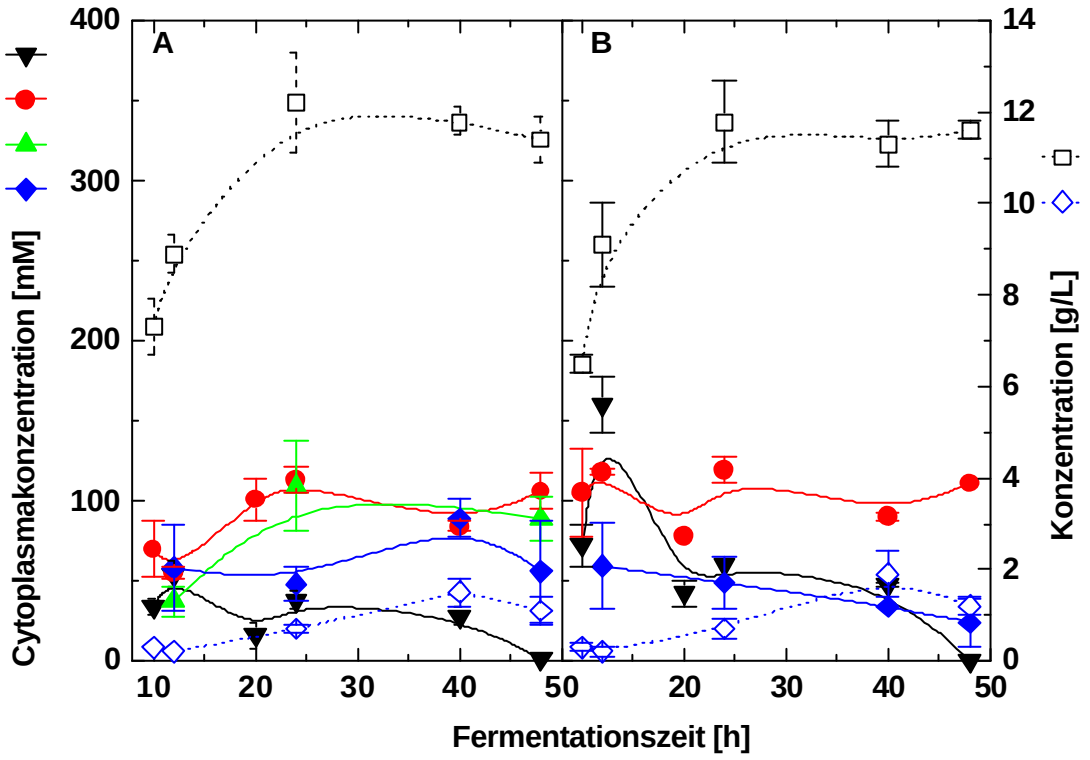


Abbildung 26: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **1,0 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Die Bildung von BTM und die Ausscheidung von Trehalose im Medium verliefen analog wie im Elternstamm *C. glutamicum* MH20-22. Betain zeigte auf die Zellbildung – wie unter diesen Bedingungen zu erwarten – wieder keinen fördernden Einfluß. Obwohl gezeigt wurde, daß diese Mutante Betain mit wesentlich geringerer Rate aufnehmen konnte (2-3 nmol/min*mg BTM), wurde Betain dennoch in vergleichbarer Konzentration zum Elternstamm akkumuliert. Die cytoplasmatischen Konzentrationen von Glutamat, Kalium und Prolin verliefen mehr oder weniger analog zu der bereits beobachteten Situation im Stamm *C. glutamicum* MH20-22. Die Bildung von Trehalose im Cytoplasma zeigte Unterschiede. Die durchschnittliche Cytoplasmakonzentration betrug 50 mmol/l und war damit zu allen beobachteten Zeitpunkten wesentlich geringer als im Elternstamm. Weiterhin wurde kein deutliches Ansteigen der Konzentration in der stationären Phase zu beobachtet.

Die Konzentrationen osmoprotektiver Solute im Cytoplasma sowie der BTM und Trehalose im Medium bei moderatem hyperosmotischen Streß (1,5 Osmol/kg) sind analog zum Elternstamm in Abbildung 27 dargestellt.

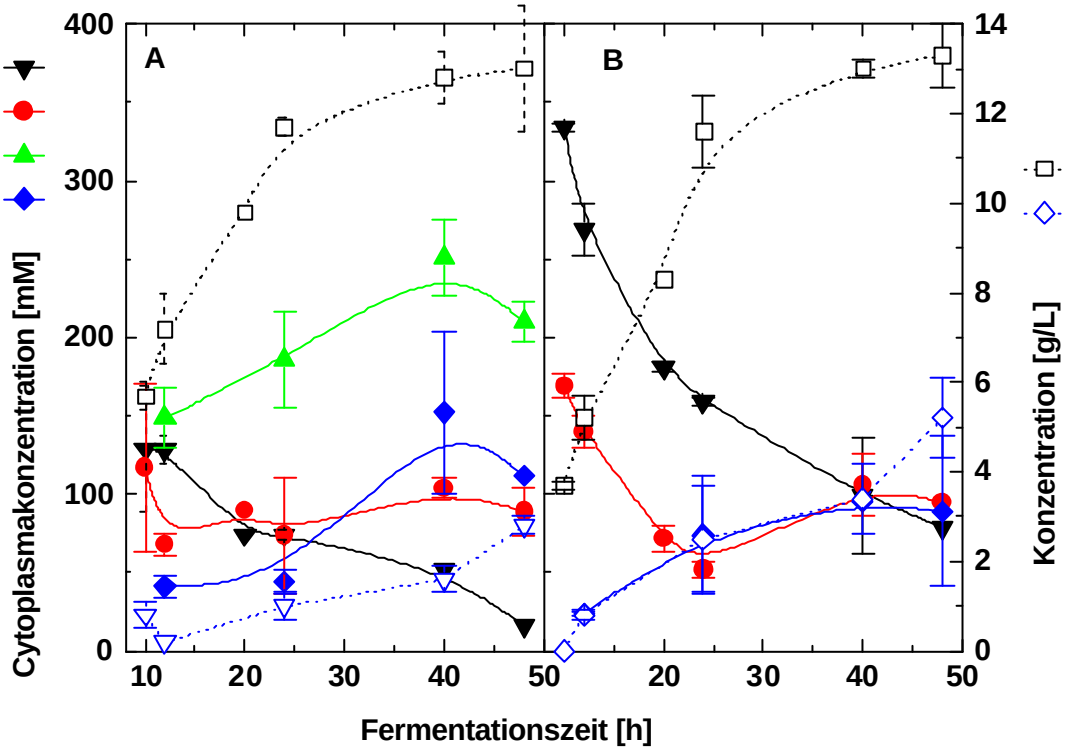


Abbildung 27: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **1,5 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Im Gegensatz zum Ansatz bei 1,0 Osmol/kg vermittelte Betain bei 1,5 Osmol/kg bereits einen leicht förderlichen Einfluß auf die Zellbildung (BTM). Betain wurde wieder in hoher Konzentration akkumuliert bis 200 mmol/l im Cytoplasma (Abbildung 27-A), obwohl diese Mutante Betain mit stark verringerter Rate aufnehmen konnte. Die Glutaminsäure- und Kaliumkonzentrationen im Cytoplasma wurden von Betain nicht signifikant beeinflußt und verliefen wie bereits für die anderen Ansätze beobachtet. Die Akkumulation von Prolin und Trehalose verlief wie im Elternstamm, jedoch betrug die Konzentration von Trehalose im Cytoplasma sowohl mit als auch ohne Betain nur durchschnittlich 100 mmol/l. Die Konzentration von Trehalose im Medium war mehr oder weniger unverändert zum Elternstamm.

Im folgenden Abschnitt wird die Anpassung der Stammes *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 an hohen hyperosmotischen Streß (2,5 Osmol/kg) beschrieben. Die Zunahme der Konzentrationen von BTM und Trehalose im Medium sowie die Konzentrationsveränderungen osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma bei konstant hoher Osmolalität (2,5 Osmol/kg) sind in Abbildung 28 für den Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 dargestellt.

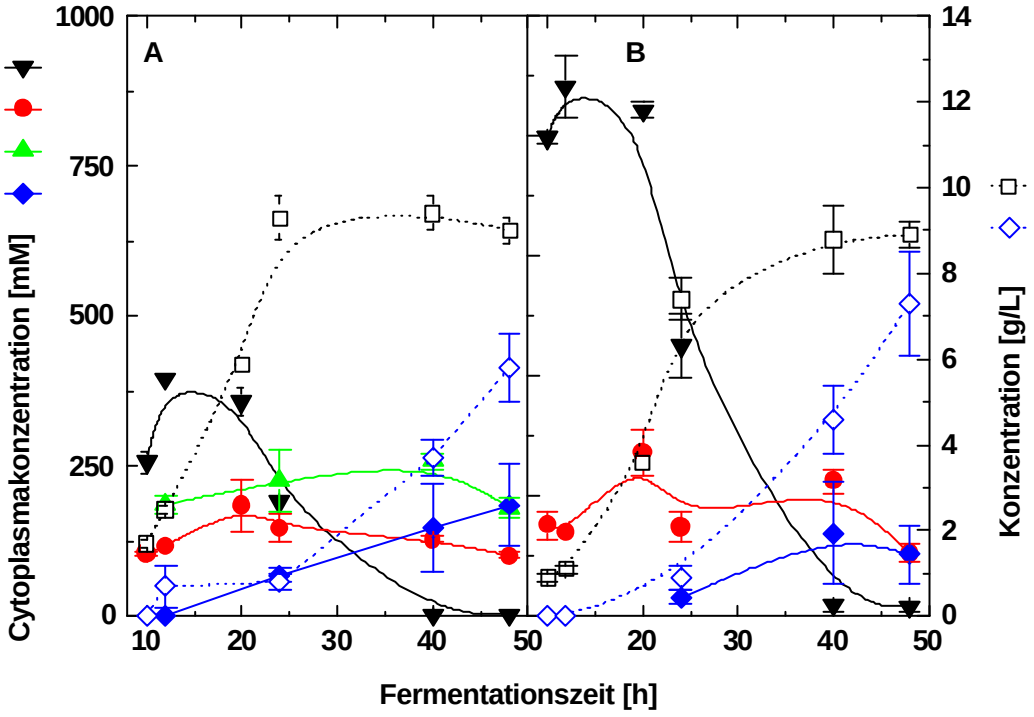


Abbildung 28: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **2,5 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Die cytoplasmatischen Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen veränderten sich während der Fermentation bei hoher Osmolalität analog zum bereits beschriebenen Verlauf des Elternstammes *C. glutamicum* MH20-22B mit der Ausnahme, daß von *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 im Medium mehr Trehalose akkumuliert wurde. Ohne Betain wurde bis zu 7,3 ± 1,2 g/l Trehalose ausgeschieden, wogegen Betain im Medium die ausgeschiedene Trehalose auf maximal 5,8 ± 0,8 g/l reduziert.

Nachfolgend wird wieder die Summe aller analysierten Solute inklusive Kalium während der Fermentation zusammengefaßt. Abbildung 29 zeigt das Ergebnis dieser Summierung.

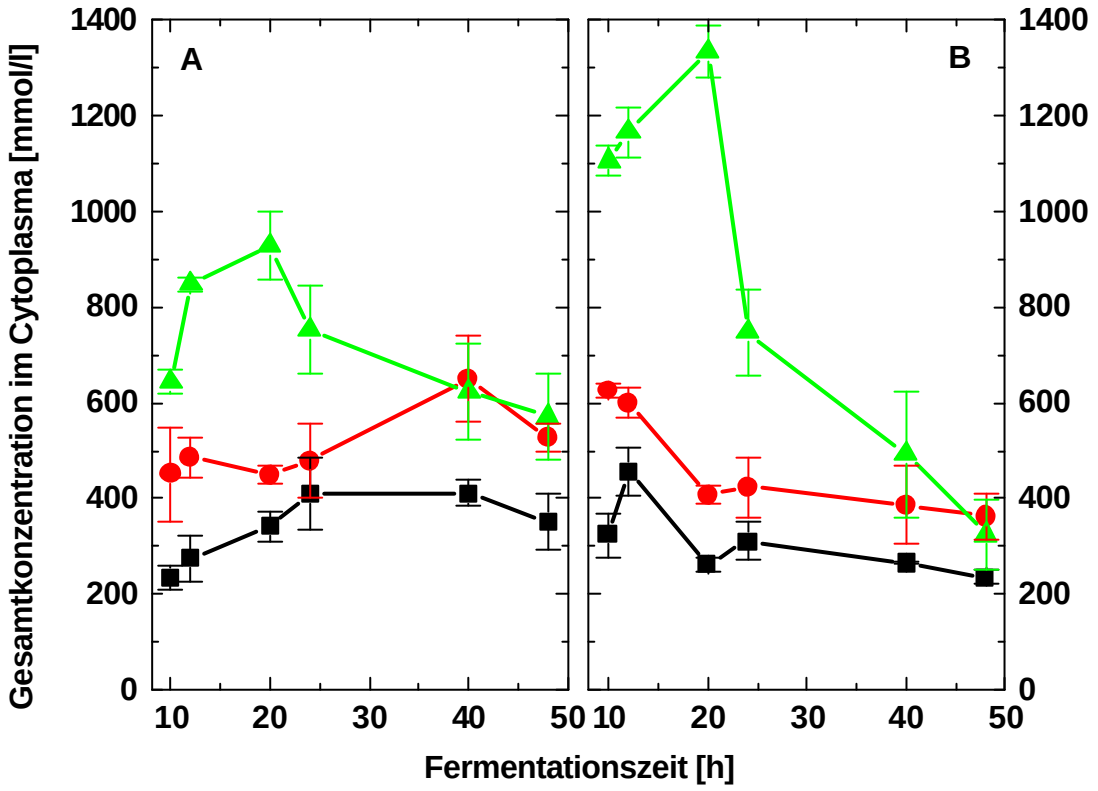


Abbildung 29: Summe der Konzentrationen aller gemessenen osmoprotektiven Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und der Zugabe von Betain (A) und ohne Betain (B) bei ■ 1,0 Osmol/kg, ● 1,5 Osmol/kg und ● 2,5 Osmol/kg

Sowohl phänomenologisch als auch quantitativ gleicht die Anpassung an hohen hyperosmotischen Streß von *C. glutamicum* Δ2 dem Elternstamm. Bemerkenswert bleibt, daß entgegen den Erwartungen trotz der verringerten Betainaufnahmerate keine nachteiligen Auswirkungen auf Wachstum, Betainakkumulation sowie auf die Synthese anderer Solute beobachtet werden konnte.

4.4.3 Die Mutante *C. glutamicum* MH20-22B D3 (*ectP*⁻ *betP*⁻ *proP*⁻)

Wie schon in den vorigen Abschnitten beschrieben, wurde auch für die Mutante *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 die Anpassung an geringen hyperosmotischen Streß (1,0 Osmol/kg) untersucht. Für diesen Stamm konnte gezeigt werden, daß die Deletion sämtlicher osmotisch regulierten Aufnahmesysteme für osmoprotektive Substanzen wie auch beim Stamm Δ2 mit einer erheblich verringerten Aufnahmerate für Betain resultierte. Untersucht wurde der zeitliche Verlauf der Zunahme von BTM und Trehalose im Medium sowie der Akkumulation osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma unter dem Einfluß von Betain. In Abbildung 30 sind die zeitlichen Veränderungen bei 1,0 Osmol/kg für *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 dargestellt.

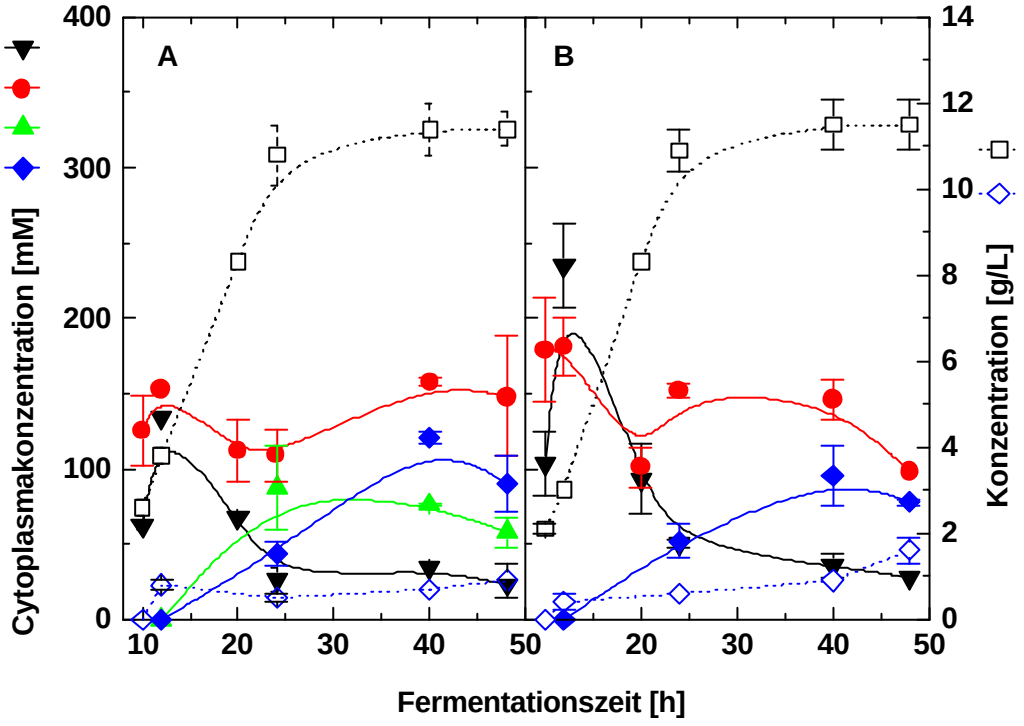


Abbildung 30: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **1,0 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Auch *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 zeigt im generellen cytoplasmatischen Konzentrationsverlauf der osmoprotektiven Substanzen bei 1,0 Osmol/kg keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Elternstamm *C. glutamicum* MH20-22B. Jedoch wuchs die

Mutante im Vergleich zu Wildtyp und Doppeldeletion Δ2 wesentlich langsamer (siehe auch Abbildung 21). Trotz der stark verringerten Aufnahmerate für Betain (2-3 nmol/min*mg BTM) durch Deletion der Gene aller osmotisch regulierten Systeme (*ectP*, *betP* und *proP*) wurde wie auch wie im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 das Betain im Cytoplasma durch Aufnahme aus dem Medium bis zu 100 mmol/l akkumuliert. Die Konzentrationen von Glutaminsäure und Kalium verliefen analog zu den bereits beschriebenen Beobachtungen in den anderen Stämmen unter diesen Bedingungen. Prolin wurde unter diesen Bedingungen während der Wachstumsphase jedoch in höherer Konzentration akkumuliert. So betrug die beobachtete Cytoplasmakonzentration ohne Betain maximal 235 ± 30 mmol/l, während im Parallelansatz mit Betain 134 ± 2 mmol/l während dieser Phase beobachtet wurden. Diese Konzentrationen waren circa doppelt so hoch wie im Elternstamm. Nach Übergang in die stationäre Phase sank die Konzentration wieder auf Werte um 20 mmol/l. Trehalose wurde bevorzugt während der stationären Phase akkumuliert. Die Trehalosekonzentration im Cytoplasma stieg jedoch in beiden Ansätzen (+/- Betain) nicht über 100 mmol/l und war damit circa 50% geringer als im Elternstamm. Betain beeinflußte die cytoplasmatische Konzentration von Trehalose nur geringfügig.

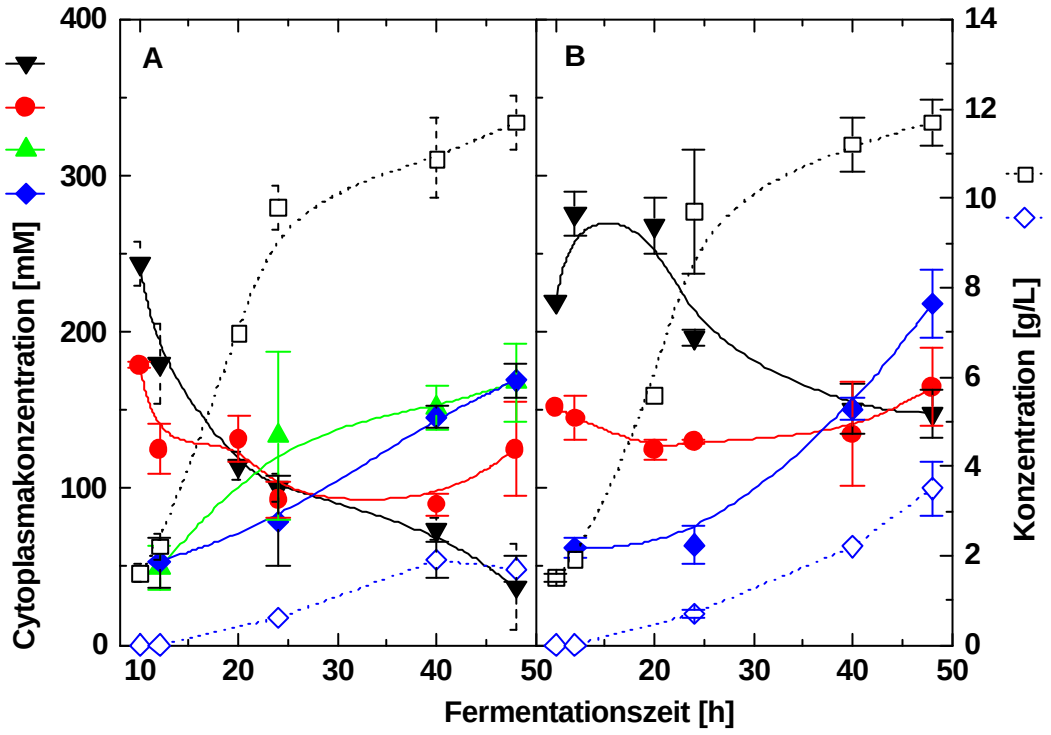


Abbildung 31: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **1,5 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ▼ Prolin ● Glutaminsäure ▲ Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Im Gegensatz zum Ansatz bei 1,0 Osmol/kg vermittelte zugesetztes Betain bei 1,5 Osmol/kg einen leicht förderlichen Einfluß auf die Zellbildung (BTM), wie auch schon für die Doppeldeletion Δ2 beobachtet. Wurde Betain angeboten, konnte dies im Verlaufe der Fermentation wie auch im Ansatz mit 1,0 Osmol/kg aufgenommen werden. Im Gegensatz zum Elternstamm akkumulierten die Zellen bei 1,5 Osmol/kg jedoch durchschnittlich nur 150 mmol/l Betain im Cytoplasma (Abbildung 31-A) und damit ungefähr 40% weniger im Vergleich zum Elternstamm. Die Glutaminsäure- und Kaliumkonzentrationen im Cytoplasma wurden von Betain nicht signifikant beeinflußt und verliefen ähnlich wie bereits für die anderen Ansätze beobachtet.

Wie im Elternstamm reduzierte die Verfügbarkeit von Betain die cytoplasmatische Konzentration von Prolin im Verlauf der Fermentation. Prolin wurde bevorzugt während der Wachstumsphase im Cytoplasma akkumuliert. So betrug die beobachtete Cytoplasmakonzentration ohne Betain im Medium maximal 280 ± 15 mmol/l, während im Parallelansatz mit Betain während dieser Phase 240 ± 15 mmol/l Prolin gemessen wurden. Mit Betain im Medium sank die Prolinkonzentration nach Übergang in die stationäre Phase auf Werte um 50 mmol/l, während beim Ansatz ohne Betain eine höhere Konzentration von durchschnittlich 150 mmol/l beobachtet wurde.

Trehalose wurde wie auch beim Elternstamm bevorzugt in der stationären Phase gebildet. Ohne Betain wurden bis zu 220 ± 20 mmol/l Trehalose im Cytoplasma akkumuliert. Wurde den Zellen Betain als osmoprotektive Substanz angeboten, so reduzierte sich die Trehalosekonzentration im Cytoplasma auf 170 ± 25 mmol/l. Im Medium wurde unter diesen Bedingungen ebenfalls signifikant mehr Trehalose als bei geringem hyperosmotischen Streß gemessen. Ohne Betain wurde bis zu 3,5 ± 0,6 g/l Trehalose ausgeschieden, wogegen Betain im Medium die ausgeschiedene Trehalose auf maximal 1,7 ± 0,3 g/l reduzierte und damit die absolute Trehalosekonzentration im Medium ähnlich wie beim Elternstamm nahezu halbierte.

Durch das stark verlangsamte Wachstum des Stammes *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 bei hohem hyperosmotischen Streß (siehe auch Abschnitt 4.4.4 auf S. 69) waren auch Veränderungen in der Zusammensetzung des Cytoplasmas zu erwarten. Im folgenden Abschnitt werden die Untersuchungen der Anpassung an 2,5 Osmol/kg dieses Stammes beschrieben. In Abbildung 32 ist der Konzentrationsverlauf osmoprotektiver Substanzen analog zu den vorigen Abbildungen in Abhängigkeit von der Fermentationszeit dargestellt.

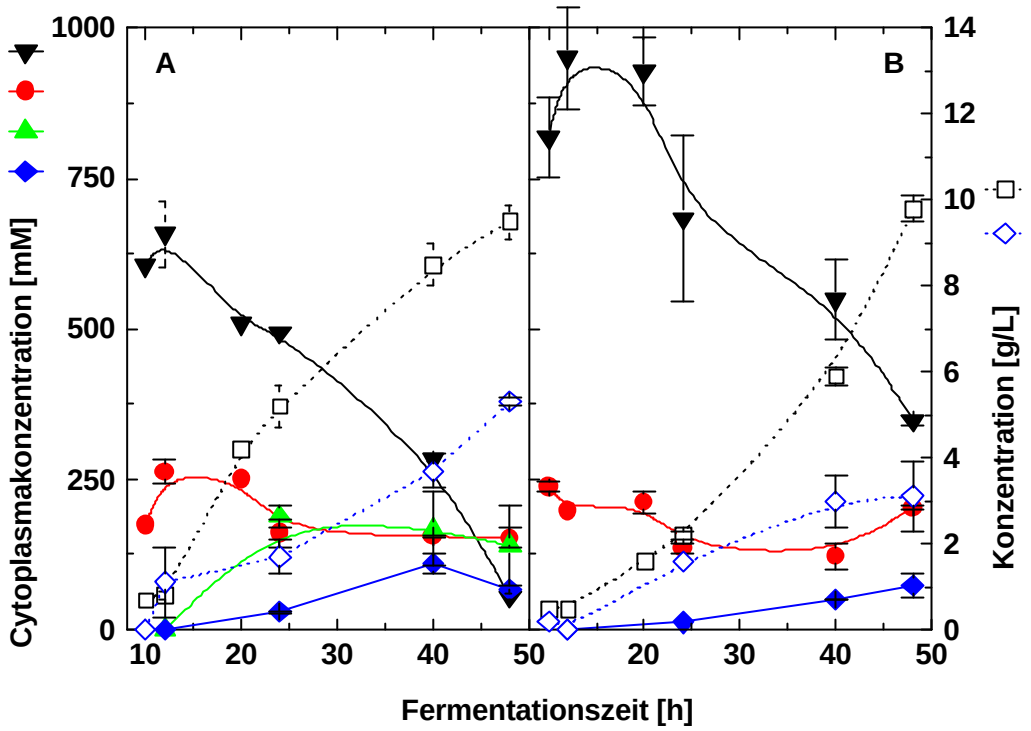


Abbildung 32: Osmoprotektive Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und bei **2,5 Osmol/kg** mit Betain (A) und ohne Betain (B). Dargestellt sind: ● Prolin ● Glutaminsäure ● Betain und ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie □ BTM und ◇ Trehalose im Medium

Im Vergleich zum Wildtyp verlief die Zellbildung (BTM) unter diesen Bedingungen wesentlich langsamer (siehe auch Abbildung 21). Die cytoplasmatischen Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen veränderten sich während der Fermentation bei hoher Osmolalität analog zum bereits beschriebenen Verlauf des Elternstammes mit der Ausnahme, daß im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 Prolin für einen längeren Zeitraum in hohen Konzentrationen akkumuliert wurde. Wie in *C. glutamicum* MH20-22 reduzierte die Verfügbarkeit von Betain die cytoplasmatische Konzentration von Prolin während der Wachstumsphase im Cytoplasma. So betrug die beobachtete Prolinkonzentration im Cytoplasma ohne Betain im Medium maximal 950 ± 85 mmol/l, während im Parallelansatz mit Betain 650 ± 50 mmol/l während dieser Phase beobachtet wurden. Die Konzentration sank im Vergleich zum Wildtyp nur langsam. Mit Betain im Medium sank die Prolinkonzentration nach Übergang in die stationäre Phase auf Werte um 50 mmol/l, während beim Ansatz ohne Betain eine höhere Konzentration von durchschnittlich 350 mmol/l beobachtet wurde. Betain selbst wurde von diesem Stamm unter diesen Bedingungen sehr viel langsamer im Cytoplasma akkumuliert. Nach 12 Stunden Fermentationszeit war die Betainkonzentration noch unter der cytoplasmatischen Nachweisgrenze von circa 20 mmol/l.

Ohne Betain wurden lediglich 3,1 ± 0,8 g/l Trehalose ausgeschieden, wogegen mit Betain im Medium maximal 5,3 ± 0,1 g/l Trehalose gemessen wurde. Dieser Unterschied im Vergleich zu den Stämmen *C. glutamicum* MH20-22B und *C. glutamicum* MH20-22B Δ2, wo durch Betainzusatz die Konzentration von Trehalose im Cytoplasma stets stark reduziert werden konnte, muß im Zusammenhang mit dem verlangsamten Wachstum gesehen werden. Durch den sehr viel späteren Eintritt in die stationäre Phase war es folgerichtig, daß im Ansatz ohne Betain in diesem speziellen Fall weniger Trehalose beobachtet werden konnte. Abbildung 33 zeigt wieder die Summe der analysierten Solute (inklusive Kalium) während des Verlaufs einer Fermentation.

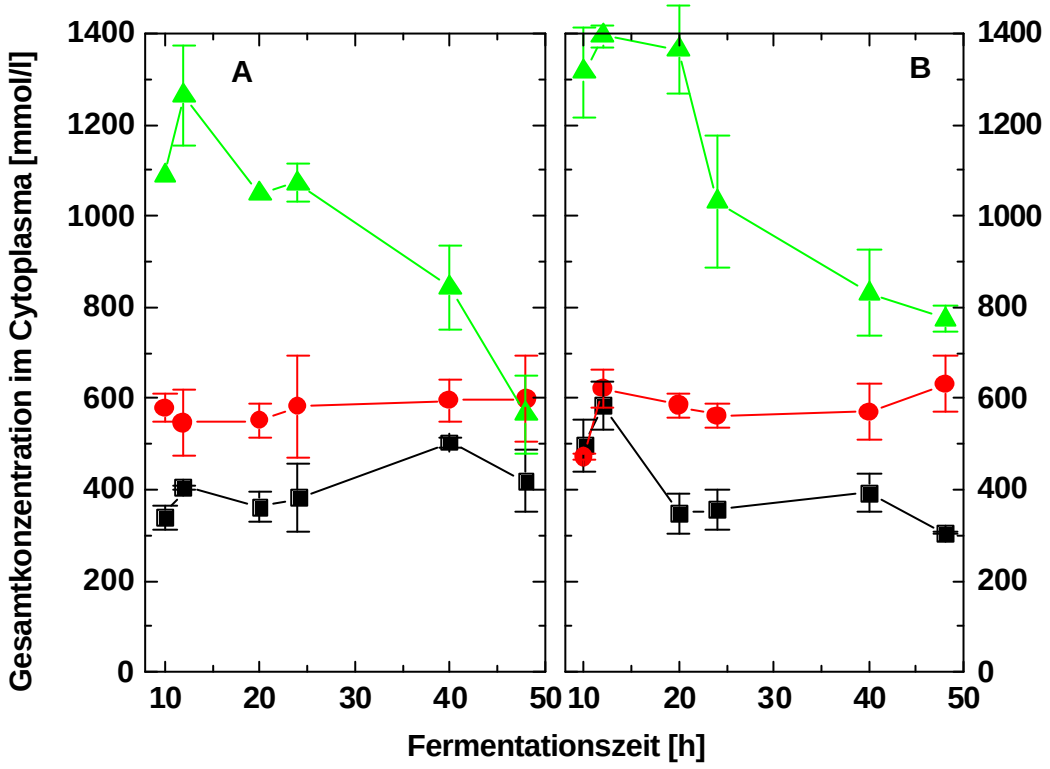


Abbildung 33: Summe der Konzentrationen aller gemessenen osmoprotektiven Substanzen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und der Zugabe von Betain (A) und ohne Betain (B) bei ■ 1,0 Osmol/kg, ● 1,5 Osmol/kg und ● 2,5 Osmol/kg

Mit steigender Osmolalität im Medium stieg auch beim Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 die Summe der Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma an. Die Summe an osmoprotektiven Substanzen in den unterschiedlichen Phasen der Fermentation war für die untersuchten Bedingungen wie auch beim Elternstamm beobachtet. Bei 2,5 Osmol/kg stieg die Konzentration osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma während der Wachstumsphase ebenfalls überproportional stark bis auf circa 1,4 mol/l an. In der stationären Phase verringerte sich die Summe osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma in beiden Ansätzen wieder auf

durchschnittlich 600 mmol/l. Obwohl der Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 wesentlich langsamer im Vergleich zum Elternstamm wuchs, bestätigte sich, daß trotz der erheblich verringerten Betainaufnahmerate keine signifikanten, nachteiligen Auswirkungen für die Zellbildung und Betainakkumulation während der Fermentation gefunden werden konnten.

C. glutamicum MH20-22B und die konstruierten Mutanten Δ2 und Δ3 konnten hyperosmotischen Streß erstaunlich gut kompensieren, da die Bakterien wider Erwarten auch bei 2,5 Osmol/kg zu hohen Zelldichten – wenn auch mit verminderter Wachstumsrate – anwuchsen. Osmolalitäten von 1,0 und 1,5 Osmol/kg hatten nur geringfügige physiologische Konsequenzen. Eine Deletion der spezifischen Betain-Aufnahmesysteme BetP und EctP verursachte keine Nachteile bei der Anpassung an hyperosmotischen Streß. Nach zusätzlicher Deletion des Transporters ProP im Stamm Δ2 konnte für den Stamm Δ3 ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu *C. glutamicum* MH20-22B und *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 gezeigt werden. Es wurde weiterhin gezeigt, daß *C. glutamicum* hyperosmotischen Streß prinzipiell durch Synthese von Prolin in der Phase exponentiellen Wachstums und durch Trehalosesynthese in der stationären Phase kompensierte. Bei hohem hyperosmotischen Osmostreß wurden Prolinkonzentrationen bis zu 1000 mmol/l beobachtet. Trotz dieser hohen Konzentration im Cytoplasma konnte im Medium nahezu kein Prolin (< 3 mmol/l) nachgewiesen werden. Trehalose wurde im Cytoplasma bis zu 250 mmol/l akkumuliert und in hoher Konzentration (bis zu 7 g/l bei hohem Osmostreß ohne Betain) ins Medien ausgeschieden. Betain verringerte die Konzentration dieses Nebenproduktes der Fermentation erheblich. Wenn Betain aus der Umgebung aufgenommen werden konnte, wurde dies bis zu 250mmol/l im Cytoplasma akkumuliert und vermittelte während der Wachstumsphase einen verbesserten Schutz gegen Wasserverlust als Prolin, da sich in diesem Fall die Prolinkonzentration im Cytoplasma um durchschnittlich halbierte. Aktiv kompensierte *C. glutamicum* MH20-22B Osmostreß lediglich in der Phase exponentiellen Wachstums, da nach dieser Phase die Summe der Cytoplasmakonzentrationen der analysierten Substanzen fast unabhängig vom Osmostreß auf Konzentrationen um 600 mmol/l sanken.

4.4.4 Die L-Lysinbildung bei unterschiedlichem hyperosmotischem Streß

Neben der detaillierten Kenntnis der Dynamik der Akkumulation osmoprotektiver Substanzen im Cytoplasma als Antwort auf hyperosmotischen Streß ist das Verständnis der funktionellen Abhängigkeit der L-Lysinbildung von der Osmolalität von ökonomischer Bedeutung. Im folgenden Abschnitt wird der Verlauf von L-Lysin als Funktion der Fermentationszeit und der Osmolalität im Medium beschrieben. Die zeitliche Verlauf der L-Lysinkonzentrationen war in allen untersuchten Stämmen prinzipiell ähnlich. Der Stamm *C. glutamicum* MH20-22B wurde als einzelnes Beispiel gewählt, um den Konzentrationsverlauf zu zeigen.

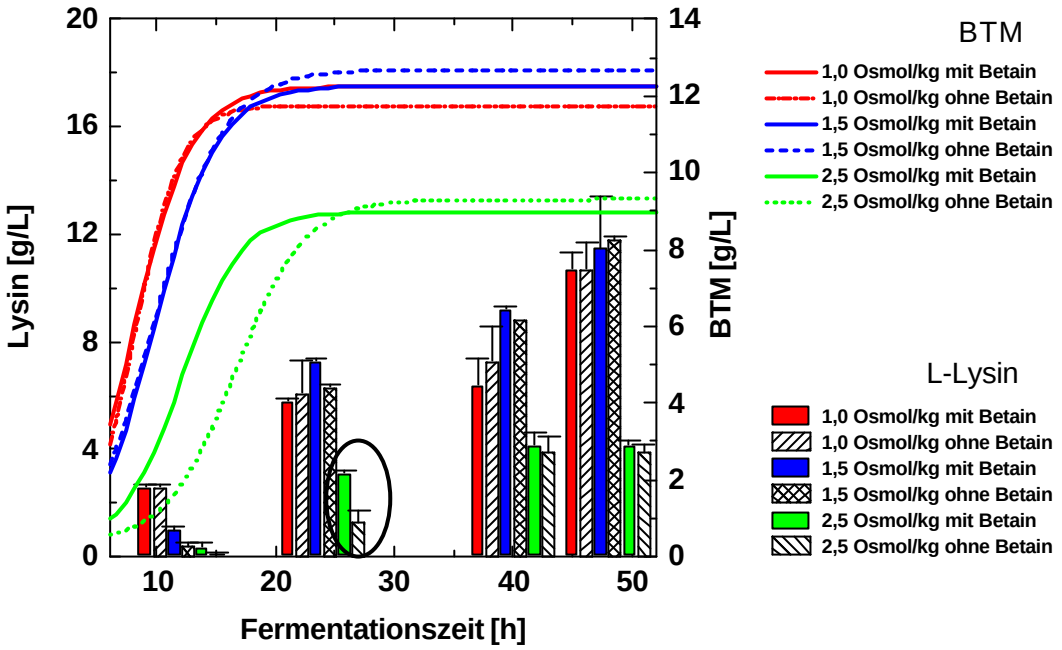


Abbildung 34: L-Lysinkonzentrationen und BTM im Medium im Verlauf von *batch* Fermentationen im Schüttelkolben mit dem *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit vom hyperosmotischen Streß nach 12, 24 ,40 und 48 Stunden. Die dargestellten BTM sind die angepaßten Kurven aus Abbildung 16. Hervorgehoben ist der Effekt von Betain auf die L-Lysinbildung bei hohem osmotischen Streß von 2,5 Osmol/kg nach Eintritt in die stationäre Phase

Beim Übergang von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase, begann *C. glutamicum* MH20-22B verstärkt L-Lysin zu synthetisieren. Nach 48 Stunden Fermentationszeit wurden für die Ansätze mit geringem und moderatem Osmostreß die höchsten Konzentrationen von durchschnittlich 11,2 ± 0,6 g/l beobachtet. Eine Förderung der L-Lysinbildung durch Zugabe von Betain konnte unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden. Bei hohem osmotischen Streß wurde unter diesen Bedingungen wesentlich weniger L-Lysin von den Zellen in das Medium ausgeschieden (4,1 ± 0,5 g/l). Wieder war durch Zugabe von Betain auch unter diesen Bedingungen kein Erhöhung der L-Lysinkonzentration bei Abbruch der Fermentation nach 48 Stunden zu beobachten, sondern lediglich nach Eintritt in die stationäre Phase. Nach 24 Stunden Fermentationszeit wurde unter diesen Bedingungen zwischenzeitlich eine höhere Konzentration von L-Lysin durch Zugabe von Betain beobachtet.

In der folgenden Abbildung sind die erzielten L-Lysinkonzentrationen aller in dieser Arbeit untersuchten Stämme aufgeführt. Die Konzentrationen wurden nach Abbruch der Fermentationen nach 48 Stunden bestimmt.

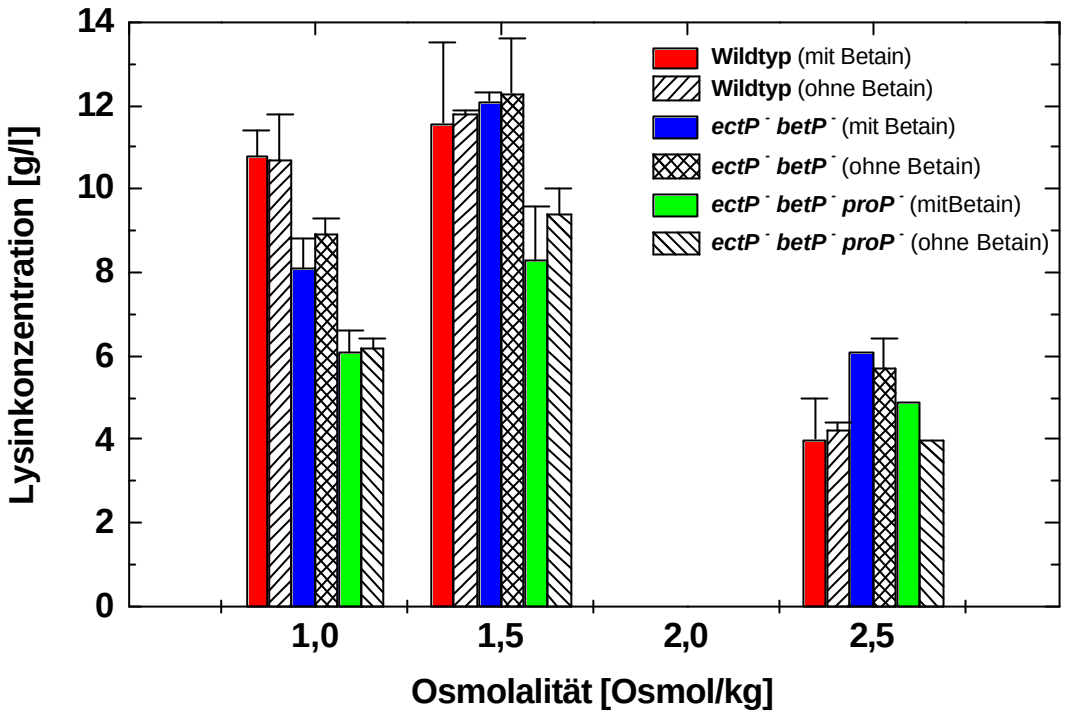


Abbildung 35: Lysinkonzentrationen im Medium nach 48 Stunden Fermentationszeit der in dieser Arbeit untersuchten Stämme von *C. glutamicum* MH20-22B

Abbildung 35 vergleicht speziell die erreichten L-Lysinkonzentrationen nach Abbruch der Fermentationen und nicht den Verlauf der L-Lysinproduktion. Aus den Untersuchungen ging klar hervor, daß Betain die Konzentration von L-Lysin am Ende einer Fermentation bei den gewählten realen Versuchsbedingungen nicht signifikant beeinflußt, aber bei hohem Osmostreß zwischenzeitlich einen indirekten positiven Effekt auf die L-Lysinkonzentration zeigte.

Bei geringem Osmostreß synthetisierte der Elternstamm die höchste Konzentration an L-Lysin (circa 10 g/l). Unter diesen Bedingungen hatten beide Mutanten (Δ2 und Δ3) signifikant weniger L-Lysin am Ende der Fermentation ins Medium ausgeschieden. Bei moderatem Osmostreß von 1,5 Osmol/kg konnte bei allen Stämmen die höchste L-Lysinkonzentration beobachtet werden – bis zu 12 g/l. Auch bei moderatem Osmostreß wurde vom Stamm C. glutamicum MH20-22B Δ3 deutlich weniger L-Lysin als von den anderen Stämmen (Elternstamm undΔ2) produziert. Für alle Stämme konnte beobachtet werden, daß bei hohem Osmostreß von 2,5 Osmol/kg die Konzentration von L-Lysin im Medium im Vergleich zu den anderen Bedingungen auf durchschnittlich die Hälfte abnahm.

In den folgenden Tabellen sind die BTM, die Menge an verbrauchtem Substrat, die entstandene Trehalose und die daraus berechneten wichtigsten biotechnologischen Kenngrößen zur Beschreibung der L-Lysinproduktion mit *C. glutamicum* MH20-22B (in den Tabellen als Wildtyp bezeichnet) und den konstruierten Mutanten (Δ2 und Δ3) aufgelistet. (+) und (-) bedeuten in den Tabellen mit und ohne Betain.

Tabelle 13: Biotrockenmasse der verschiedenen konstruierten Stämme in Abhängigkeit von der Osmolalität nach 48 Stunden Fermentationszeit. Mineralsalzmedium mit 6% (w/v) Saccharose und L-Leucinlimitierung. Angaben in [g/l]

[Osmol/kg]	Wildtyp (+)	Wildtyp (-)	D2 (+)	D2 (-)	D3 (+)	D3 (-)
1,0	12,9 ± 0,4	12,2 ± 0,8	11,8± 0,6	11,6 ± 0,5	11,1 ± 0,5	11,5 ± 0,6
1,5	12,4 ± 0,8	13,5 ± 0,7	12,8 ± 0,7	13,1 ± 0,6	11,7 ± 0,7	11,7 ± 0,6
2,5	8,9 ± 0,5	9,8 ± 0,4	9,4 ± 0,4	8,8 ± 0,5	9,5 ± 0,4	9,8 ± 0,3

Tabelle 14: Saccharoseverbrauch der verschiedenen konstruierten Stämme in Abhängigkeit von der Osmolalität nach 48 Stunden Fermentationszeit. Mineralsalzmedium mit 6% (w/v) Saccharose und L-Leucinlimitierung. Die Saccharosekonzentration war zu Beginn 58 g/l. Angaben in [g/l]

[Osmol/kg]	Wildtyp (+)	Wildtyp (-)	D2 (+)	D2 (-)	D3 (+)	D3 (-)
1,0	58,0 ± 0,1	58,0 ± 0,1	58,0 ± 0,1	58,0 ± 0,1	58,0 ± 0,1	57,9 ± 0,1
1,5	57,9 ± 0,1	58,0 ± 0,1	58,0 ± 0,1	57,9 ± 0,1	57,9 ± 0,1	57,9 ± 0,1
2,5	54,1 ± 0,2	55,0 ± 0,2	57,9 ± 0,1	53,2 ± 1,9	45,7 ± 2,1	42,4 ± 0,9

Tabelle 15: Trehalosekonzentration im Medium der verschiedenen konstruierten Stämme in Abhängigkeit von der Osmolalität nach 48 Stunden Fermentationszeit. Mineralsalzmedium mit 6% (w/v) Saccharose und L-Leucinlimitierung. Angaben in [g/l]

[Osmol/kg]	Wildtyp (+)	Wildtyp (-)	D2 (+)	D2 (-)	D3 (+)	D3 (-)
1,0	2,2 ± 0,6	2,7 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,4	1,6 ± 0,3
1,5	2,6 ± 0,3	5,2 ± 0,4	2,8 ± 0,4	5,2 ± 0,9	1,7 ± 0,8	3,5 ± 0,0
2,5	3,9 ± 0,2	6,4 ± 0,3	5,8 ± 0,8	7,3 ± 1,2	5,3 ± 0,1	3,1 ± 0,8

Die Ausbeuten geben den biologischen Wirkungsgrad für ein bestimmtes Produkt bezogen auf ein Substrat oder eine andere Bezugsgröße an. Berechnet wurden die Ausbeuten wie in Gleichung 6 beschrieben. Da es sich in Tabelle 16 und Tabelle 17 um biomassebezogene Ausbeuten handelt, wurde für die Berechnung anstatt der Kohlenstoffkonzentration die Biomasse als Bezugsgröße gewählt. Diese Ausbeuten können ein genaueres Bild des physiologischen Zustandes der Zellen als substratbezogene Ausbeuten vermitteln.

Tabelle 16: L-Lysinausbeute $Y_{Lys/X}$ (Lysin pro BTM) der verschiedenen konstruierten Stämme in Abhängigkeit von der Osmolalität nach 48 Stunden Fermentationszeit. Angaben in [g/g]

[Osmol/kg]	Wildtyp (+)	Wildtyp (-)	D2 (+)	D2 (-)	D3 (+)	D3 (-)
1,0	0,84 ± 0,05	0,88 ± 0,09	0,69 ± 0,06	0,77 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,54 ± 0,01
1,5	0,93 ± 0,15	0,87 ± 0,01	0,94 ± 0,02	0,94 ± 0,10	0,71 ± 0,11	0,80 ± 0,05
2,5	0,44 ± 0,11	0,43 ± 0,02	0,66 ± 0,00	0,65 ± 0,08	0,51 ± 0,00	0,40 ± 0,00

Tabelle 17: Trehaloseausbeute $Y_{Tre/X}$ (Trehalose pro BTM) der verschiedenen konstruierten Stämme in Abhängigkeit von der Osmolalität nach 48 Stunden Fermentationszeit. Angaben in [g/g]

[Osmol/kg]	Wildtyp (+)	Wildtyp (-)	D2 (+)	D2 (-)	D3 (+)	D3 (-)
1,0	0,17 ± 0,05	0,22 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,15 ± 0,03
1,5	0,21 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,39 ± 0,07	0,14 ± 0,07	0,29 ± 0,00
2,5	0,43 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,63 ± 0,09	0,82 ± 0,14	0,54 ± 0,01	0,30 ± 0,08

Bezogen auf die Biomasse war für *C. glutamicum* MH20-22B und die beschriebenen Mutanten die Syntheseleistung von L-Lysin mit Werten um 1 g L-Lysin/g BTM bei der moderaten Osmolalität am größten, jedoch waren die Ausbeuten bei 1,0 Osmol/kg ähnlich. Bei hohem Osmostreß sanken die Ausbeuten signifikant auf Werte um 0,5 L-Lysin/g BTM. Betain zeigte allgemein keine förderliche Wirkung auf die Synthese von L-Lysin.

Trehalose wurde in direkter Abhängigkeit von der Osmolalität in das Medium ausgeschieden. Der Zusatz von Betain verringerte die Trehaloseausbeute erheblich. So stieg die Ausbeute ohne Zusatz von Betain von durchschnittlich 0,15 g/g bei geringem Osmostreß auf durchschnittlich 0,73 g/g bei hohem Osmostreß (Mittelwert von Wildtyp und Δ2). Betain im Medium reduzierte diese Ausbeuten um durchschnittlich 27%, so daß durchschnittlich nur noch 0,53 g Trehalose/g BTM ausgeschieden wurden..

Das Verhältnis von ausgeschiedener Trehalose zu L-Lysin veränderte sich von 1:6 bei geringem Osmostreß zu 1:2 (mit Betain) oder 1:1,3 (ohne Betain) bei hohem Osmostreß.

Neben den biomassebezogenen Ausbeuten sind die substratbezogenen Ausbeuten von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung, da diese den Wirkungsgrad, also den effektiven Umsatz des Substrates in Produkt quantitativ erfassen. In den folgenden Abbildungen sind sämtliche zugänglichen Ausbeuten als prozentuale Anteile am Gesamtumsatz aufgeführt. Da im Schüttelkolben die Kohlendioxidentwicklung nicht verfolgt wurde, wurde der Kohlendioxidanteil zusammen mit den Anteilen nicht analysierter Nebenprodukte (Äpfelsäure, Lactat, Acetat et c.) als fehlender Anteil von eins angenommen. Da sich die berechneten Ausbeuten von Elternstamm und Δ2 gleichen, werden hier lediglich die Ausbeuten für *C. glutamicum* MH20-22B und der Mutante *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 aufgeführt. Zunächst die berechneten Werte für den Elternstamm:

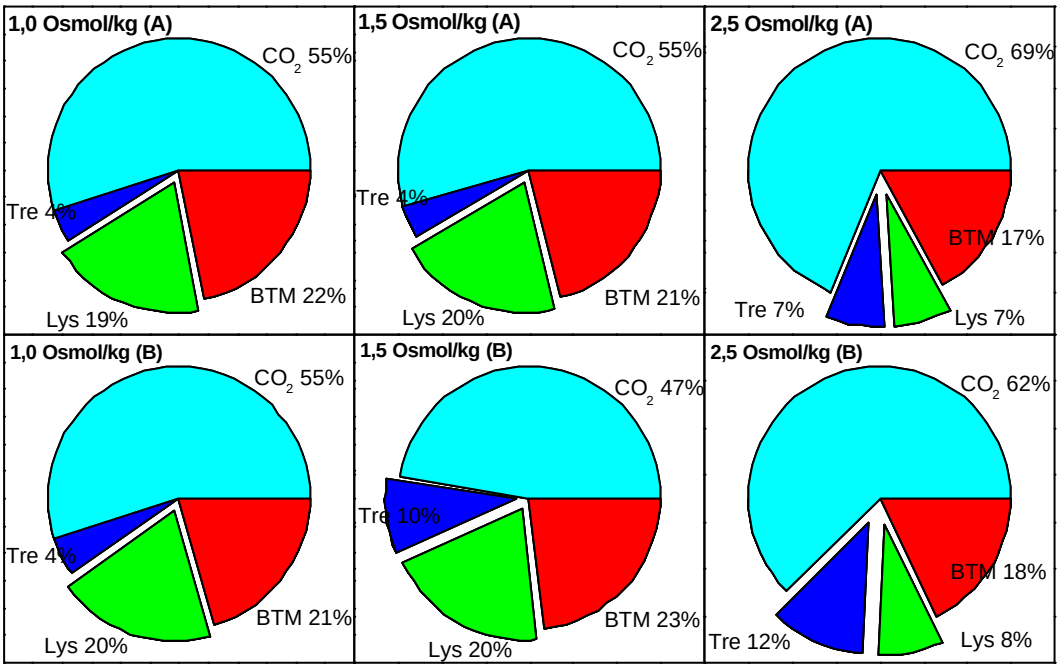


Abbildung 36: Substratbezogene Ausbeuten nach 48 Stunden Fermentationszeit mit *C. glutamicum* MH20-22B bei leucinlimitiertem Wachstum auf 6% (w/v) Saccharose. Dargestellt sind: ■ (BTM) $Y_{X/S}$ ■ (Lys) $Y_{Lys/S}$ ■ (Tre) $Y_{Tre/S}$ ■ sonstige ($Y_{CO2/S}$ und andere). Ansätze A (mit Betain) und Ansätze B (ohne Betain)

Die Anteile an BTM und L-Lysin am Gesamtumsatz veränderten sich durch die Erhöhung des Osmostreß von 1,0 Osmol/kg auf 1,5 Osmol/kg nicht. Auch die Zugabe von Betain bewirkte keine Veränderungen in dieser Hinsicht. Erst mit steigendem Osmostreß (2,5 Osmol/kg) verringerten sich die Ausbeuten der BTM und des L-Lysin. Während die BTM-Ausbeute jedoch nur geringfügig sank (von durchschnittlich 21% auf durchschnittlich 18%), verringerte sich die L-Lysinausbeute um mehr als die Hälfte (von circa 20% auf 8%) unter diesen Bedingungen. Die Ausbeute an Trehalose vom Gesamtkohlenstoff stieg mit steigender

Osmolalität im Medium beständig an. Betain verringerte den Anteil von Trehalose am Gesamtumsatz bei moderatem und hohem Osmostreß um durchschnittlich 50%. Bei geringem Osmostreß wurden ungefähr 4% des gesamten Kohlenstoffs in Trehalose umgesetzt (+/- Betain), wogegen ohne Betain bei hohen Osmostreß maximal 12% des Kohlenstoffs in Trehalose umgesetzt wurden. Der Anteil an Kohlendioxid und nicht analysierten Substanzen erhöhte sich von durchschnittlich 55% (bei 1,0 Osmol/kg und 1,5 Osmol/kg) auf ungefähr 65% vom Gesamtumsatz bei hohem Osmostreß.

Im folgenden Abschnitt wird auf die Veränderungen der substratbezogenen Ausbeuten des Stammes *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 im Gegensatz zum Elternstamm eingegangen.

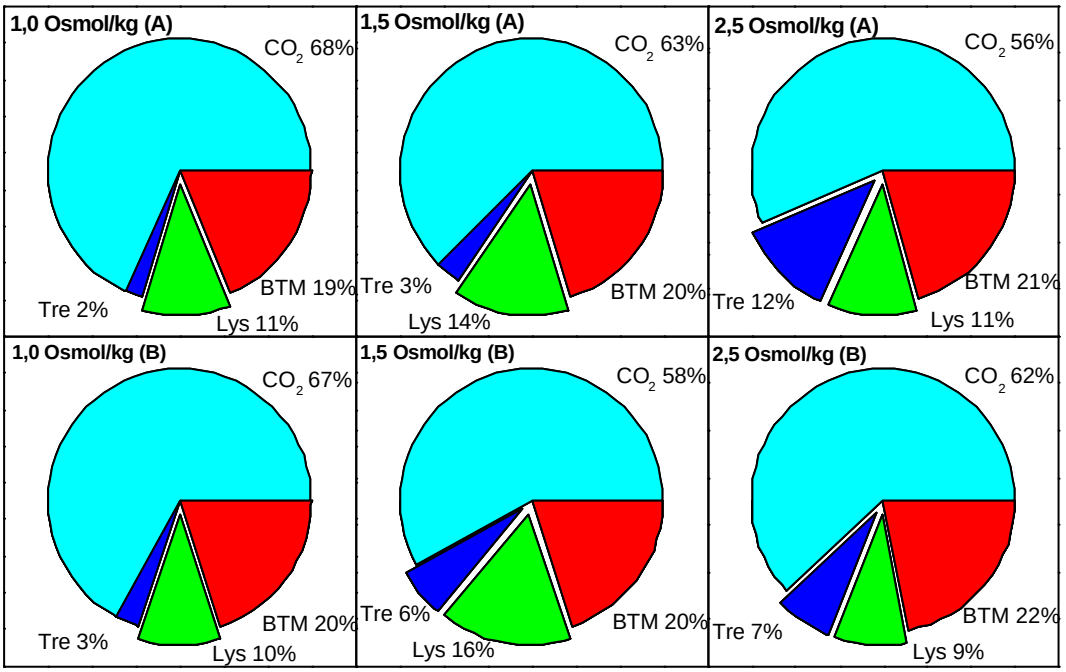


Abbildung 37: Substratbezogene Ausbeuten nach 48 Stunden Fermentationszeit mit *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 bei leucinlimitiertem Wachstum auf 6% (w/v) Saccharose. Dargestellt sind: ■ (BTM) $Y_{X/S}$ ■ (Lys) $Y_{Lys/S}$ ■ (Tre) $Y_{Tre/S}$ ■ sonstige ($Y_{CO2/S}$ und andere). Ansätze A (mit Betain) und Ansätze B (ohne Betain)

Im Gegensatz zum Elternstamm fällt auf, daß *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 wesentlich weniger L-Lysin und Trehalose aus dem vorhandenen Substrat Saccharose synthetisiert. Die Anteile der BTM am Gesamtumsatz blieben jedoch unter allen Versuchsbedingungen vergleichbar hoch (durchschnittlich 20%) – wie auch für den Elternstamm beobachtet. Die L-Lysinausbeuten sanken bei geringer und moderater Osmolalität signifikant um durchschnittlich 30%, blieben jedoch bei hohem Osmostreß in vergleichbarer Größenordnung von durchschnittlich 10% vom Gesamtumsatz. Betain zeigte auch bei *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 keine förderliche Wirkung für die L-Lysinausbeute. Bei 1,0 Osmol/kg und

1,5 Osmol/kg wurde signifikant weniger Trehalose aus der vorhandenen Kohlenstoffquelle synthetisiert. Betain im Medium verminderte auch bei *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 den Anteil von Trehalose am Gesamtumsatz um durchschnittlich 50%. Bei hohem Osmostreß wurde jedoch im Ansatz mit Betain eine signifikant höhere Trehaloseausbeute beobachtet. Dieser Anstieg muß allerdings zusammen mit dem generell verlangsamten Wachstum dieses Stammes, dem früheren Übergang in die stationäre Phase unter diesen Bedingungen und der damit verbundenen Trehalosesynthese gesehen werden (siehe Abbildung 32).

Es konnte gezeigt werden, daß *C. glutamicum* MH20-22B bei geringem und moderatem Osmostreß bei leucinlimitiertem Wachstum auf Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle auf den Gesamtkohlenstoff bezogen durchschnittlich 20% Biotrockenmasse und 20% L-Lysin bildete. Bei hohem Osmostreß von 2,5 Osmol/kg (welcher reale Prozeßbedingungen mit sehr hoher Ausgangskonzentration von Nährstoffen simulieren sollte), sank die Ausbeute an Biotrockenmasse nur geringfügig. Die Lysinausbeute (bezogen auf die Kohlenstoffquelle) sank jedoch signifikant um circa 50%. Die substratbezogenen Ausbeuten von Biomasse L-Lysin waren unabhängig vom Zusatz der osmoprotektiven Substanz Betain.

Der Anteil des in Aminosäure-Fermentationen unerwünschten Nebenproduktes Trehalose wurde durch den Zusatz von Betain unter diesen Bedingungen stets erheblich reduziert. Allerdings stieg mit steigendem Osmostreß auch der Anteil von Trehalose am Gesamtkohlenstoffumsatz beständig an. Bei geringer Osmolalität (1,0 Osmol/kg) wurden ohne Betain als Fermentationszusatz lediglich circa 4% des Kohlenstoffes in Trehalose umgesetzt, wobei dieser Anteil bei hohem Streß auf 7% (mit Betain) und 12% (ohne Betain) anstieg.

Durch Deletion der Transporter BetP, EctP und ProP veränderte sich die substratbezogene Ausbeute an Biotrockenmasse nicht, jedoch konnten für diese Mutante verringerte Anteile von L-Lysin und Trehalose am Gesamtkohlenstoffumsatz aufgrund des langsameren Wachstums beobachtet werden.

4.5 Ergebnisse aus Versuchen mit kontinuierlicher Kulturführung

Mit Hilfe der kontinuierlichen Versuchsführung sollten in dieser Arbeit die spezifischen Substratverbrauchsraten von *C. glutamicum* MH20-22B sowie die Erhaltungsenergien in Abhängigkeit von der Osmolalität bestimmt werden.

4.5.1 Bestimmung der Erhaltungsenergie und der Substrat-Verbrauchsraten bei unterschiedlichem osmotischem Streß

4.5.1.1 Einstellung von Fließgleichgewichten

Die Einstellung eines Fließgleichgewichts (siehe 2.1.1, S.11) war für die exakte Bestimmung der kinetischen Parameter von außerordentlicher Bedeutung. Folgende Abbildung zeigt zunächst einen typischen Übergang von einer *batch* Fermentation mit *C. glutamicum* MH20-22B zur kontinuierlichen Versuchsführung. Nach dem Start der kontinuierlichen Versuchsführung begann auch der mit dem typischen Einschwingen verbundene Übergang in einen Fließgleichgewichtszustand.

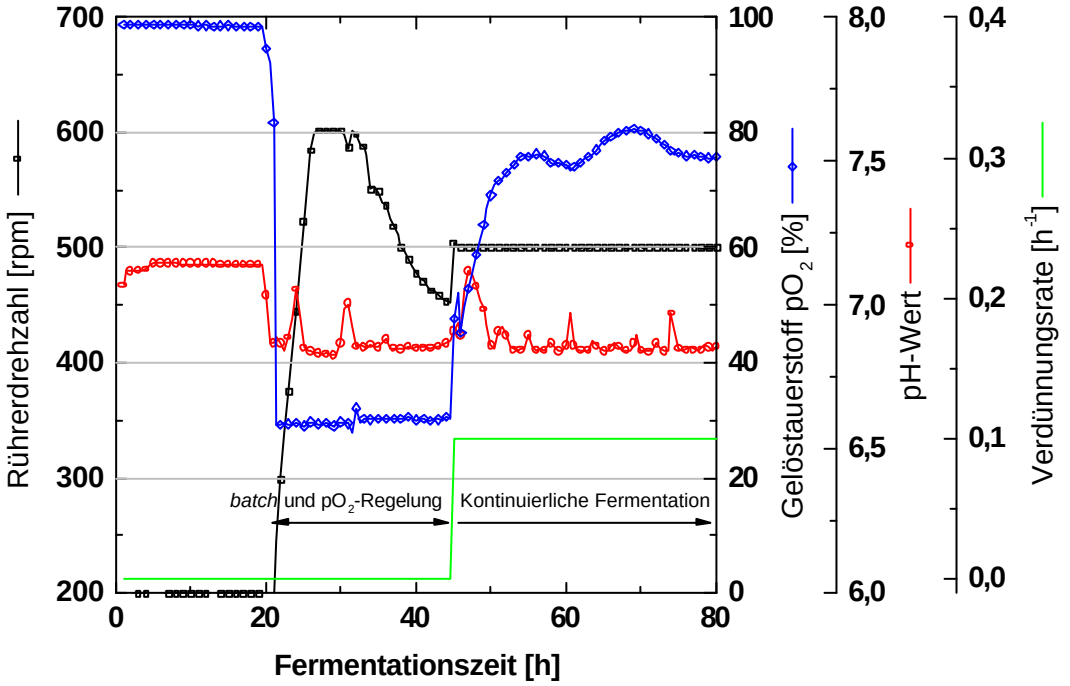


Abbildung 38: Übergang von *batch* zu kontinuierlicher Kultur mit *C. glutamicum* MH20-22B. Dargestellt sind: Rührerdrehzahl [rpm], ? pO_2 [%], ○ pH-Wert und – Verdünnungsrate [h^{-1}]. V_R = 4,0*l* mit Mineralsalzmedium in einem 10*l*-Bireaktor mit einem Arbeitsvolumen von 8*l*.

Vor dem eigentlichen Start der Fermentation (dem Animpfen) wurde für 20 Stunden ein Steriltest durchgeführt (Abbildung 38), indem der Bioprozeß unter Kultivierungsbedingungen gefahren wurde – lediglich ohne Bakterien. Sollten Kontaminationen im Medium vorhanden sein, sollte dies anhand von steigendem Sauerstoffverbrauch sichtbar werden. Da keine auffälligen Veränderungen meßbar waren, konnte im Anschluß an den Steriltest angeimpft werden. Sofort nach dem Animpfen (20h) war eine schnelle Abnahme des Gelöstsauerstoffes durch den einsetzenden Metabolismus meßbar. Der Prozeß wurde für 24 Stunden einer pO_2-Regelung unterworfen, wobei der Gelöstsauerstoffgehalt mittels der Rührerdrehzahl konstant gehalten wurde. Diese Regelung wurde angewandt, um eine Sauerstofflimitierung zu verhindern.

Nach 44 Stunden wurde der kontinuierliche Zulauf gestartet und gleichzeitig der pO_2-Regelkreis aufgehoben; statt dessen eine konstante Rührerdrehzahl (in diesem Beispiel 500 rpm) eingestellt, um ein konstantes Reaktionsvolumen während der gesamten kontinuierlichen Fermentation zu gewährleisten. Durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl vergrößerte sich mit kleiner werdendem Blasendurchmesser die spezifische Gasaustauschfläche, was in verbessertem Sauerstofftransfer resultierte. Damit stieg auch der pO_2-Wert an. Mit den konstant gehaltenen Prozeßparametern begann der Metabolismus der Zellen einem Gleichgewichtszustand zuzustreben (44h bis 80 h in Abbildung 38). Alle weiteren kontinuierlichen Fermentationen in dieser Arbeit wurden durch diese Strategie angefahren und eingestellt.

In dieser Arbeit wurden Fließgleichgewichte anhand der absoluten Veränderungen des Gelöstsauerstoffes (pO_2) im Zusammenhang mit den absoluten Veränderungen der BTM beurteilt. Nur wenn beide Parameter über mindestens eine Verweilzeit nach Verstreichen von mindestens fünf hydrodynamischen Verweilzeiten konstante Werte zeigten, wurde das entstandene Fließgleichgewicht als stabil angesehen und Messungen von BTM, Substraten, Abgaskonzentrationen, Lysingehalt, und anderen Produkten vorgenommen. Die folgende Abbildung zeigt einen typischen Fermentationsverlauf mit *C. glutamicum* MH20-22B nach dem Übergang aus einer *batch* Fermentation bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichtes. In diesem Beispiel wurde im Gegensatz zum vorigen Beispiel ein Standard-Bioreaktor (mit 1,8*l* Reaktionsvolumen) benutzt.

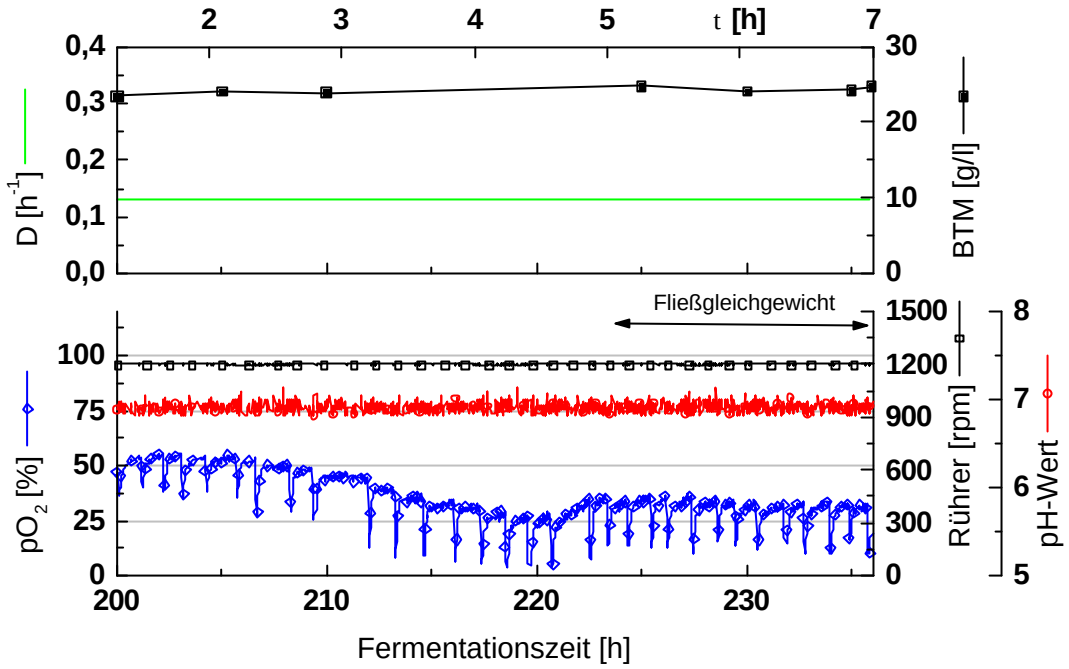


Abbildung 39: Übergang in ein Fließgleichgewicht in kontinuierlicher Kultur mit *C. glutamicum* MH20-22B. Dargestellt sind: ■ BTM [g/l] Rührerdrehzahl [rpm], ? pO_2 [%], ○ pH-Wert und – Verdünnungsrate [h^{-1}]. V_R= 1,0*l* mit Mineralsalzmedium in einem 2*l*-Bireaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,8*l* Medium: 10% Glucose – 2,4 Osmol/kg (NaCl) mit 0,05 g/l L-Leucin.

Bereits nach 2 hydrodynamischen Verweilzeiten änderte sich die Konzentration der BTM nicht mehr. Jedoch sank über einen Zeitraum der pO_2-Wert, was auf einen dynamischen Metabolismus hinwies. Erst nach dem Verstreichen von ungefähr fünf hydrodynamischen Verweilzeiten zeigten sich auch beim pO_2-Wert keine Veränderungen mehr. Das System hatte nach circa 225h einen Zustand des Fließgleichgewichts erreicht, in welchem sich nach außen hin keine Parameter (außer der Summe an zugeführtem pH-Korrekturmittel) mehr veränderten. Die beobachteten Spitzen nach unten waren typisch für die Prozeßkontrolle und korrelierten stets mit der Zudosierung von Antischaummittel sobald eine erhöhte Schaumdecke im Bioreaktor detektiert wurde.

Sollte ein neuer Fließgleichgewichtszustand erreicht werden, so wurden geringfügige Veränderungen der Verdünnungsrate ($\Delta D \leq 0{,}05\ h^{-1}$) vorgenommen, wodurch sich das System schnell an die neu vorgegebenen äußeren Parameter anpassen konnte.

4.5.1.2 Spezifischer Substratverbrauch bei konstanter Wachstumsrate in Abhängigkeit vom osmotischen Streß

Der Substratverbrauch des L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Osmolalität wurde in dieser Arbeit mit Hilfe kontinuierlicher Versuchsführung bestimmt. In dieser Versuchsreihe wurde aus zwei Gründen Glukose (hier 10% w/v) als Kohlenstoffquelle im Zulauf verwendet. Einerseits, um in Anlehnung an publizierte Daten [Lee *et al.* 1995, Guillouet und Engasser 1995] eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu haben und andererseits aus versuchstechnischen Gründen. Für eine optimale Durchführung mußte der pH-Wert des Vorlagemediums im sauren Bereich liegen, jedoch ist Saccharose in Lösung im Bereich von pH < 7 nicht mehr stabil, sondern zerfällt in Glukose und Fruktose [Angabe des Herstellers]. Das Wachstums wurde durch eine Konzentration von 0,05 g/l L-Leucin limitiert und konstanter osmotischer Streß durch Vorlage von NaCl eingestellt. Für die verschiedenen Versuchsreihen mit Glucose als Substrat wurden vier repräsentative, unterschiedliche Osmolalitäten eingestellt: 0,4 Osmol/kg (sehr geringer Osmostreß), 1,3 Osmol/kg (geringer Osmostreß), 1,8 Osmol/kg (hoher Osmostreß) und 2,4 Osmol/kg (sehr hoher Osmostreß). In den folgenden Tabellen sind die gesamten gemessenen und berechneten Daten aus den kontinuierlichen Versuchsreihen aufgelistet. Es werden neben BTM, Substratverbrauch und Lysinkonzentration auch die spezifischen Substratverbrauchsraten r_S und die spezifischen Lysinbildungsraten r_{Lys} zusammengefaßt (berechnet nach Gleichung 6 f).

Tabelle 18: Daten aus kontinuierlichen Versuchsreihen bei Wachstum von *C. glutamicum* MH20-22B auf Glucose bei 0,4 Osmol/kg

D = μ **[h^{-1}]**	**BTM** **[g/l]**	**Ds** **[g/l]**	**r_S** **[g/g*h]**	**Lysin** **[g/l]**	**r_{Lys}** **[g/g*h]**
0,02	20,0	92,8	0,11	11,4	0,019
0,13	15,4	54,1	0,44	7,8	0,065

Tabelle 19: Daten aus kontinuierlichen Versuchsreihen bei Wachstum von *C. glutamicum* MH20-22B auf Glucose bei 1,3 Osmol/kg

D = μ **[h^{-1}]**	**BTM** **[g/l]**	**Ds** **[g/l]**	**r_S** **[g/g*h]**	**Lysin** **[g/l]**	**r_{Lys}** **[g/g*h]**
0,06	22,7	90,5	0,26	19,5	0,055
0,13	24,7	90,5	0,47	12,8	0,067
0,20	17,2	62,9	0,73	4,7	0,055

In den folgenden Tabellen wird die Auflistung der gemessenen und berechneten Daten aus kontinuierlicher Versuchsführung fortgesetzt. Für die einzelnen Versuche wurden mehrere Bioreaktoren gleicher Bauart eingesetzt, wodurch sich zunächst das jeweilige Reaktionsvolumen von Versuch zu Versuch technisch bedingt unterschied und daraus resultierend unterschiedliche Verdünnungsraten bei gleicher Zulaufrate erhalten wurden.

Tabelle 20: Daten aus kontinuierlichen Versuchsreihen bei Wachstum von *C. glutamicum* MH20-22B auf Glucose bei 1,8 Osmol/kg

D = μ **[h^{-1}]**	**BTM** **[g/l]**	Ds **[g/l]**	**r_S** **[g/g*h]**	**Lysin** **[g/l]**	**r_{Lys}** **[g/g*h]**
0,06	19,4	85,6	0,28	18,3	0,060
0,13	21,5	83,2	0,50	9,2	0,055
0,20	22,3	72,6	0,64	4,5	0,040
0,29	12,6	40,9	0,93	0,2	0,005

Tabelle 21: Daten aus kontinuierlichen Versuchsreihen bei Wachstum von *C. glutamicum* MH20-22B auf Glucose bei 2,4 Osmol/kg

D = μ **[h^{-1}]**	**BTM** **[g/l]**	Ds **[g/l]**	**r_S** **[g/g*h]**	**Lysin** **[g/l]**	**r_{Lys}** **[g/g*h]**
0,06	16,3	78,2	0,31	14,0	0,055
0,09	17,2	76,2	0,41	12,2	0,065
0,13	12,1	52,3	0,55	4,0	0,042

Bevor speziell auf die Bildung von L-Lysin in Abhängigkeit von der Wachstumsrate und bei unterschiedlichem hyperosmotischem Streß eingegangen wird, werden die spezifischen Substratverbrauchsraten in der folgenden Abbildung zusammengefaßt. Die mittels Gleichung 6 (und folgende) berechneten spezifischen Substratverbrauchsraten in Abhängigkeit von der Wachstumsrate dargestellt.

Obwohl für die Versuchsreihe bei 0,4 Osmol/kg lediglich zwei sicher etablierte Fließgleichgewichte zur Verfügung standen, wurden die berechneten Daten zu Vergleichszwecken mit in die Abbildung aufgenommen. Selbstverständlich bedeutet das Ende der Regressionsgeraden nach 0,15 h^{-1} nicht, daß *C. glutamicum* MH20-22B unter diesen Bedingungen nicht auch bei höheren Verdünnungsraten gewachsen wäre. Es ist davon auszugehen, daß *C. glutamicum* MH20-22B bei 0,4 Osmol/kg mindestens bei vergleichbaren Verdünnungsraten wie auch bei 1,8 Osmol/kg wachsen würde (also mindestens bis 0,29 h^{-1}).

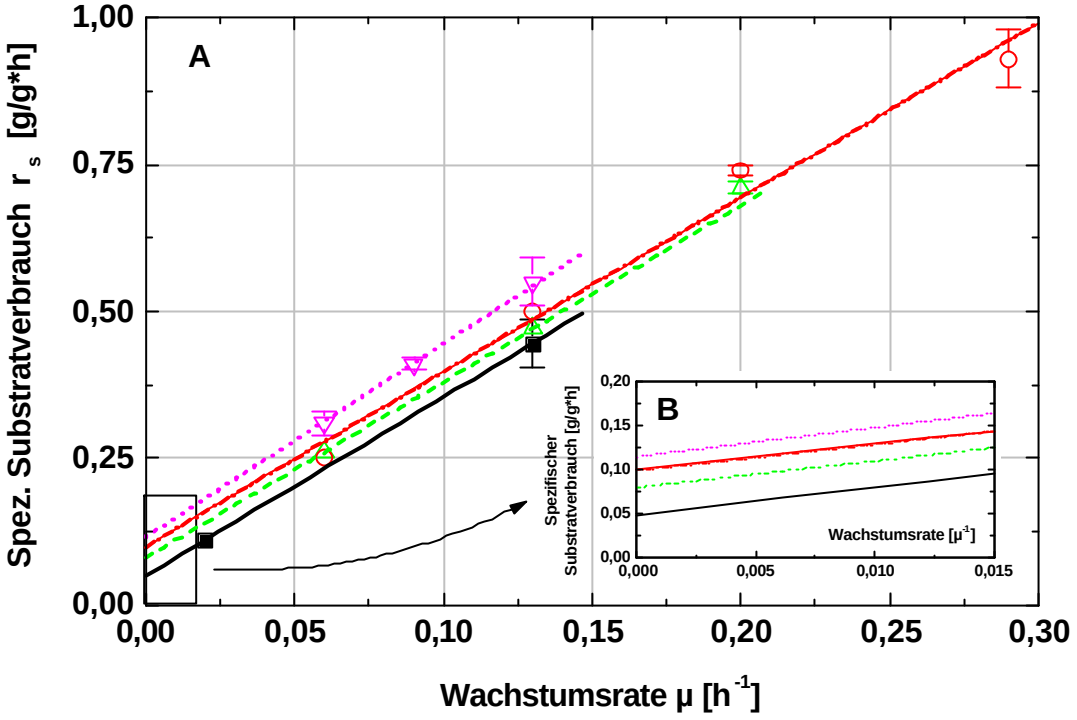


Abbildung 40: Spezifische Substratverbrauchsraten von *C. glutamicum* MH20-22B aus Fließgleichgewichten in kontinuierliche Kultur bei unterschiedlichem osmotischen Streß. **A**: Substratverbrauch und **B**: Ausschnitt der Extrapolation im Bereich sehr kleiner Wachstumsraten aus A. Dargestellt sind: ■ 0,4 Osmol/kg, ? 1,3 Osmol/kg, ○ 1,8 Osmol/kg und ∇ 2,4 Osmol/kg

Der spezifische Substratverbrauch stieg mit steigender Wachstumsrate linear an. Die aus Versuchen mit Schüttelkolben ermittelten maximalen spezifischen Wachstumsraten von circa 0,35 h^{-1} [siehe auch Peter 1997] konnten mit der kontinuierlichen Versuchsführung nicht erreicht werden. Die maximal beobachtete Wachstumsrate war 0,29 h^{-1} bei 1,8 Osmol/kg. Bei 1,3 Osmol/kg wurden Fließgleichgewichte im Bereich D > 0,20 h^{-1} zwar nicht bestimmt, es ist aber davon auszugehen, daß wie auch bei 1,8 Osmol/kg mindestens eine Wachstumsrate von 0,29 h^{-1} unter diesen Bedingungen eingestellt werden könnte. Bei 2,4 Osmol/kg konnte keine stabile Wachstumsrate > 0,20 h^{-1} eingestellt werden. In dieser Darstellung der Verbrauchsraten bestätigt sich einerseits die Erwartung, daß mit steigendem Osmostreß auch der spezifische Substratverbrauch zunimmt. Jedoch sind andererseits die Steigungen (und damit die wahren Substratausbeuten; siehe Gleichung 8) für die untersuchten Bedingungen ihrer Größe nach identisch. Die spezifischen Verbrauchsraten unterscheiden sich – anders als bei Stamm *C. glutamicum melassolicola* ATCC 17965 [Guillouet und Engasser 1995] beobachtet (siehe Abbildung 4) – nur sehr geringfügig in Abhängigkeit vom Osmostreß. Das deutet – wie auch schon in den Experimenten mit Schüttelkolben – auf eine sehr wirkungsvolle Kompensation bei hohem Osmostreß hin.

Mit den berechneten spezifischen Substratverbrauchsraten in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei unterschiedlichem Osmostreß ließen sich weitere wichtige kinetische Parameter ermitteln.

Im Gegensatz zur beobachteten Ausbeute $Y_{X/S}$ ergaben sich bei der Ermittlung der wahren Ausbeute $Y_{TG_X/S}$ bei kleinen Wachstumsraten meist abweichende Werte, da bei geringen Wachstumsraten der Anteil der notwendigen Erhaltungsenergie zunehmend größer wurde. Die wahre Ausbeute läßt sich nach Gleichung 9 ermitteln, indem die reziproken Steigungen der spezifischen Substratverbrauchsrate in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bestimmt werden. Analog werden die Erhaltungsenergien nach Gleichung 9 durch Bestimmung der jeweiligen Abszissenabschnitte ermittelt. Die beobachteten absoluten Ausbeuten, die wahren Ausbeuten und die jeweiligen Erhaltungsenergie-Terme sind in Abbildung 41 dargestellt. Da es sich in Teil B der Abbildung 41 um Ableitungen aus Abbildung 40 handelt, wurde keine absoluten Fehler ermittelt.

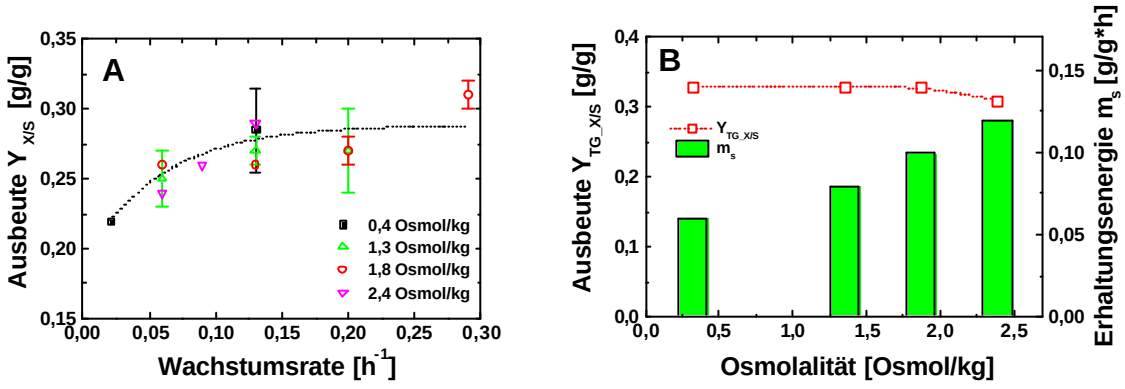


Abbildung 41: **A**: Beobachtete Substratausbeuten $Y_{X/S}$ (Glucose) von *C. glutamicum* MH20-22B aus Fließgleichgewichten in kontinuierliche Kultur bei unterschiedlichem osmotischen Streß. Dargestellt sind: ■ 0,4 Osmol/kg, ? 1,3 Osmol/kg, ○ 1,8 Osmol/kg und ∇ 2,4 Osmol/kg **B**: Berechnete wahre Ausbeuten $Y_{TG_X/S}$ (Steigungen aus Abbildung 40) und Erhaltungsenergien m_s ■ (r_s-Achsenabschnitte aus Abbildung 40)

Die beobachteten Ausbeuten $Y_{X/S}$ auf Glucose waren unabhängig von der Osmolalität bei Wachstumsraten von μ>0,10 h^{-1} im Bereich von 0,3 g/g (Abbildung 41-A). Wurden die Zellen jedoch bei kleineren Wachstumsraten gezogen, so verringerte sich die beobachtete Ausbeute mit sinkender Wachstumsrate bis zu 0,22 g/g.

Die wahre Ausbeute $Y_{TG_X/S}$ blieb wie erwartet mehr oder weniger konstant bei 0,33 g/g. Die berechnete Erhaltungsenergie stieg mit steigender Osmolalität von 0,06 g/g*h bei 0,4 Osmol/kg auf 0,12 g/g*h bei 2,4 Osmol/kg und verdoppelte sich somit bei einer Vergrößerung der Osmolalität um 2,0 Osmol/kg.

4.5.2 Lysinbildung in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei unterschiedlichem hyperosmotischem Streß

Zusätzlich zu den ermittelten Parametern zur Beschreibung des Substratverbrauchs sind die kinetischen Daten der L-Lysinbildung von besonderer ökonomischer Bedeutung, da sich mit ihnen Problembereiche in der Prozeßführung analysieren lassen. Nachfolgend werden zunächst die beobachteten L-Lysinkonzentrationen im Medium in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei unterschiedlichem Osmostreß in einer Abbildung zusammengefaßt. Dabei wurde auf die Darstellung der Daten bei 0,4 Osmol/kg verzichtet.

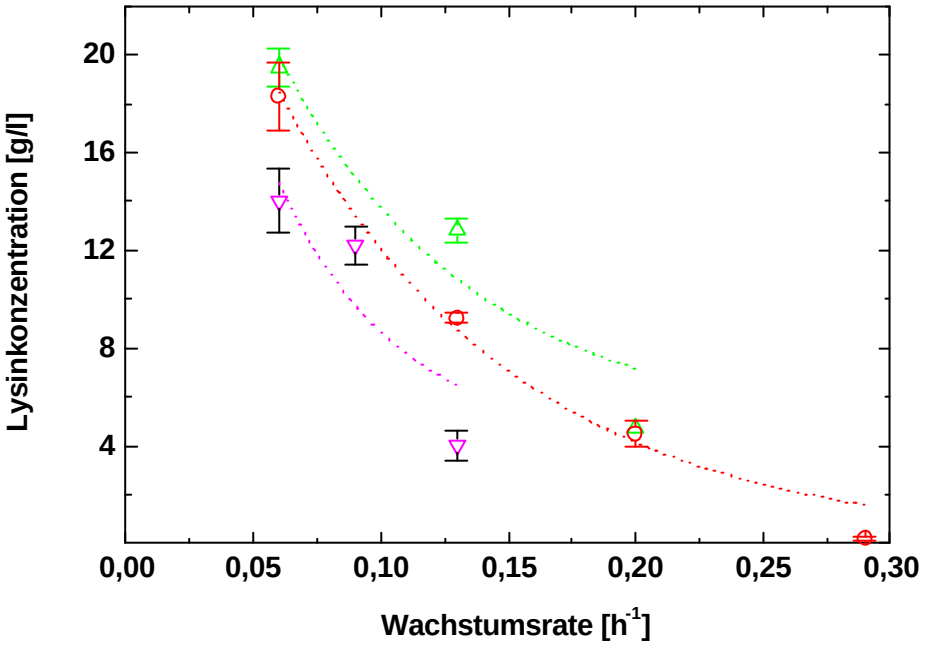


Abbildung 42: Die Lysinkonzentration im Medium in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei unterschiedlichem osmotischen Streß. Die Konzentrationen wurden durch kontinuierliche Versuchsführung mit *C. glutamicum* MH20-22B in Mineralsalzmedium ermittelt. Dargestellt sind: ? 1,3 Osmol/kg, ○ 1,8 Osmol/kg und ▽ 2,4 Osmol/kg

Die L-Lysinkonzentration war bei kleinen Wachstumsraten am größten. Das bedeutet jedoch nicht, daß nichtwachsende Zellen unendlich viel L-Lysin produzieren. Da der Bereich sehr kleiner Wachstumsraten experimentell außerordentlich schwierig zugänglich ist, konnten in der vorliegenden Arbeit die spezifischen L-Lysinbildungsraten zuverlässig nur bis circa 0,05 h^{-1} bestimmt werden. Unterhalb dieser Wachstumsraten wurde stammspezifisch ein Bereich maximaler L-Lysinkonzentration durchlaufen, jedoch produzierten nichtwachsende Zellen auch kein L-Lysin [Lee *et al.* 1995]. Mit zunehmender Wachstumsrate verringerte sich auch die Konzentration von L-Lysin im Medium. Bei sehr hoher Wachstumsrate wurde bei

1,8 Osmol/kg nahezu kein L-Lysin mehr in das Medium ausgeschieden. Mit zunehmender Osmolalität sank bei vergleichbarer Wachstumsrate die Konzentration von L-Lysin signifikant, was insbesondere bei 0,13 h^{-1} vergleichbar war. Analog zu den spezifischen Substratverbrauchsraten lassen sich auch spezifische L-Lysinbildungsraten ermitteln. Die aus Tabelle 18 bis Tabelle 22 verfügbaren spezifischen Lysinbildungsraten wurden in der folgenden Abbildung in Abhängigkeit von der Wachstumsrate und hyperosmotischen Streß aufgetragen:

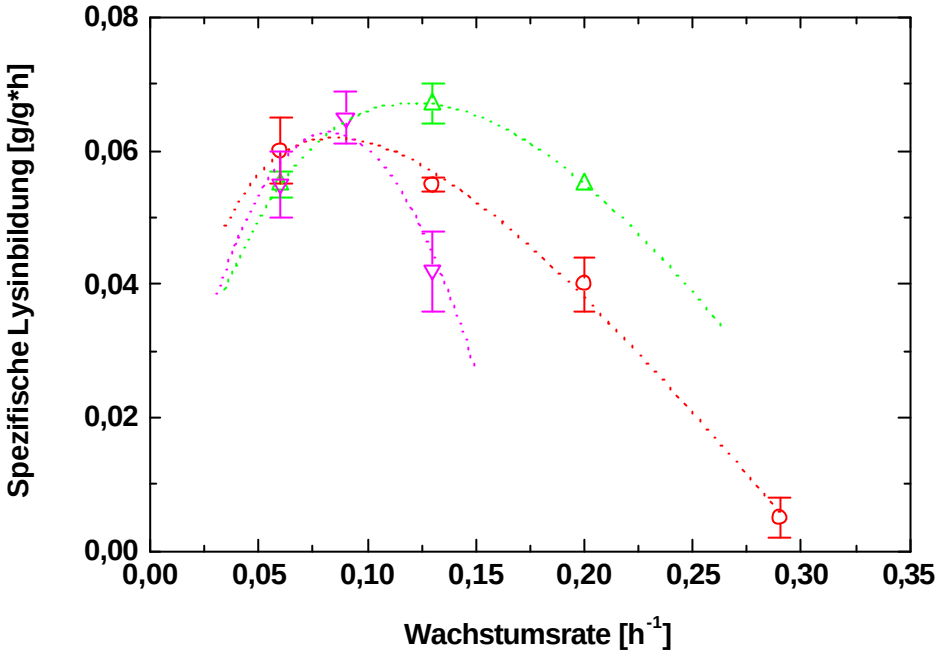


Abbildung 43: Die spezifische Lysinbildungsrate in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei unterschiedlichem osmotischen Streß. Die Konzentrationen wurden durch kontinuierliche Versuchsführung mit *C. glutamicum* MH20-22B in Mineralsalzmedium ermittelt. Dargestellt sind: ? 1,3 Osmol/kg, ○ 1,8 Osmol/kg und ∇ 2,4 Osmol/kg (Modellierung nach Luong)

Die spezifische L-Lysinbildungsrate durchlief unabhängig von der Osmolalität bei allen getesteten Bedingungen stets ein Maximum höchster Produktivität. Diese maximalen Produktivitäten vergrößerten sich mit abnehmendem Osmostreß leicht von circa 0,06 g/g*h bei 1,8 Osmol/kg auf etwa 0,07 g/g*h bei 1,3 Osmol/kg und wurden ausnahmslos im Bereich von 0,05 bis 0,15 h^{-1} – einem Bereich optimaler Wachstumsrate $\mu_{opt.}$ für die L-Lysinbildung – beobachtet. Dies bestätigt frühere Beobachtungen, daß L-Lysin ein typisches Produkt der Übergangsphase vom exponentiellen Wachstum in die Stationärphase ist und bei kleinen Wachstumsraten gebildet wird. Im Bereich sehr kleiner Wachstumsraten ($\mu < 0{,}01$ h^{-1}), welcher experimentell nicht zugänglich war, deuteten die zur Verfügung stehenden Daten unabhängig vom Osmostreß auf einen gegen Null strebenden Verlauf hin. Unterschiede

konnten in der Abhängigkeit der spezifischen Produktivität im Bereich von Wachstumsraten > $\mu_{opt.}$ festgestellt werden. Je höher der eingestellte Osmostreß in diesem Bereich war, desto geringer war die L-Lysinproduktivität. Da das gewählte Modell nach Luong (siehe Gleichung 12) den Verlauf der spezifischen L-Lysinbildung bei 1,8 Osmol/kg ohne Festsetzung eines der Parameter ($r_{Lys.max.}$ oder $\mu_{krit.}$) ausgezeichnet beschrieb, wurde der Verlauf der anderen Daten ebenfalls mit diesem Modell angepaßt. Die berechneten spezifischen Lysinbildungsraten wurden nach Luong einer Modellierung unterworfen, um den Verlauf nicht analysierter Wachstumsraten vorherzusagen. Hierbei wurde vorausgesetzt, daß nichtwachsende Zellen *de facto* auch kein Lysin in das Medium ausscheiden. Es konnten abhängig vom Osmostreß durch Modellbildung mit den vorhandenen Daten kritische Wachstumsraten $\mu_{krit.}$ ermittelt werden, ab welchen von den Zellen kein L-Lysin mehr in das Medium ausgeschieden würde, wobei eine zuverlässige Vorhersage lediglich für 1,8 Osmol/kg möglich war. Die modellierten kritischen Wachstumsraten $\mu_{krit.}$ und die berechneten Wachstumsraten $\mu_{opt.}$ mit maximaler L-Lysinproduktionsrate sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 22: $\mu_{krit.}$ und $\mu_{opt.}$ für die spezifische Lysinbildung bei Wachstums auf Glucose mit *C. glutamicum* MH20-22B bei unterschiedlichem hyperosmotischem Streß (nach Luong, siehe Gleichung 12)

	1,3 Osmol/kg	**1,8 Osmol/kg**	**2,4 Osmol/kg**
$\mu_{krit.}$ [h^{-1}]	0,34 ± 0,03	0,30 ± 0,01	0,17 ± 0,02
$\mu_{opt.}$ [h^{-1}]	0,13	0,08	0,08
$r_{Lys.max}$ [g/g*h]	0,067	0,062	0,063

Die spezifischen L-Lysinbildungsraten und die modellierten Parameter zeigten, daß sich die optimale Produktivität von L-Lysin unabhängig von der Osmolalität des Mediums in einem engen Bereich der spezifischen Wachstumsrate bewegte. Außerhalb dieses Bereiches wurde die maximale spezifische L-Lysinbildungsrate bei kleineren und größeren Wachstumsraten schnell unterschritten. Für den Bereich $\mu > \mu_{opt.}$ konnte gezeigt werden, daß kritische Wachstumsraten $\mu_{krit.}$ existieren, ab denen kein L-Lysin mehr synthetisiert wurde. Es konnten die spezifischen Substratverbrauchsraten *C. glutamicum* MH20-22B für Glukose in Abhängigkeit von der Osmolalität und der Wachstumsrate bestimmt werden. Es wurde gezeigt, daß die Glukoseverbrauchsraten mit zunehmender Wachstumsrate und zunehmendem Osmostreß anstiegen. Die wahren Substratausbeuten wahren unter allen untersuchten Bedingungen nahezu gleich und betrugen 0,33 g BTM/g Glukose. Der Anteil der Erhaltungsenergie stieg von 0,06 g/g*h bei 0,4 Osmol/kg auf 0,12 g/g*h bei 2,4 Osmol/kg. Die maximale L-Lysinproduktivität war zwar unabhängig vom Osmostreß, jedoch sank die absolute L-Lysinkonzentration mit steigender Osmolalität. Es wurden optimale Wachstumsraten für die L-Lysinproduktion bestimmt und kritische Wachstumsraten simuliert.

4.5.3 Langsame Anpassung an steigenden osmotischen Streß bei konstanter Verdünnungsrate

Bisher wurden Untersuchungen zur Physiologie und zur Regulation der Transportaktivität in *Corynebacterium* in Abhängigkeit vom osmotischen Streß stets unter Schockbedingungen durchgeführt [Guillouet und Engasser 1995, Peter *et al.* 1998]. In dieser Arbeit wurde eine kontinuierliche Kultur nach sechs hydrodynamischen Verweilzeiten bei $\mu = 0{,}1\ h^{-1}$ einem konstant steigendem Osmogradienten unterworfen (Abbildung 44). Nachdem die Kultur in der fünften Verweilzeit in einen Fließgleichgewichts-Zustand überging wurde der Osmogradient nach sechs Verweilzeiten gestartet. Der Gradient war so konzipiert, daß über eine Verweilzeit (hier 10 h) eine Änderung um circa 3,0 Osmol/kg auftrat. Der Verlauf ausgewählter *offline* und *online* Meßwerte ist in Abbildung 44 wiedergegeben.

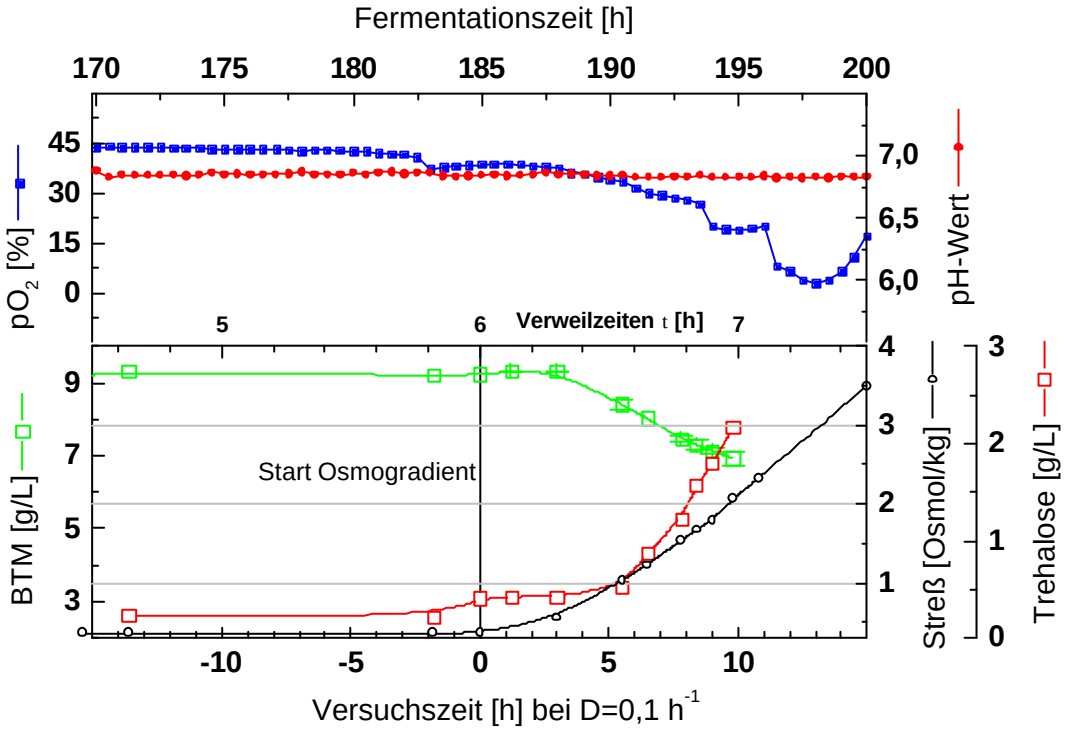


Abbildung 44: *offline* Meßwerte der kontinuierliche Kultur von C. glutamicum MH20-22B mit langsamer Anpassung an osmotischen Streß bei $D=0{,}1\ h^{-1}$. BTM [g/l] Trehalose im Medium [g/l] und ○ Osmostreß [Osmol/kg] sowie ■ pO_2 [%] und ● pH.

Bei dieser Art der experimentellen Fragestellung handelt es sich letztlich um eine Auswaschung, da die im Bioreaktor entstehende Osmolalität (5,0 Osmol/kg nach 8,5 Verweilzeiten) das Wachstum inhibierte und somit die Verdünnungsrate in diesem Experiment die maximale Wachstumsrate überstieg. In der folgenden Abbildung wurde

zusätzlich die Änderung des Sauerstoffgehaltes im Medium als Maß der Stoffwechselaktivität der Zellen in einem verlängerten Bereich von drei Verweilzeiten (25 Stunden Versuchszeit) analysiert.

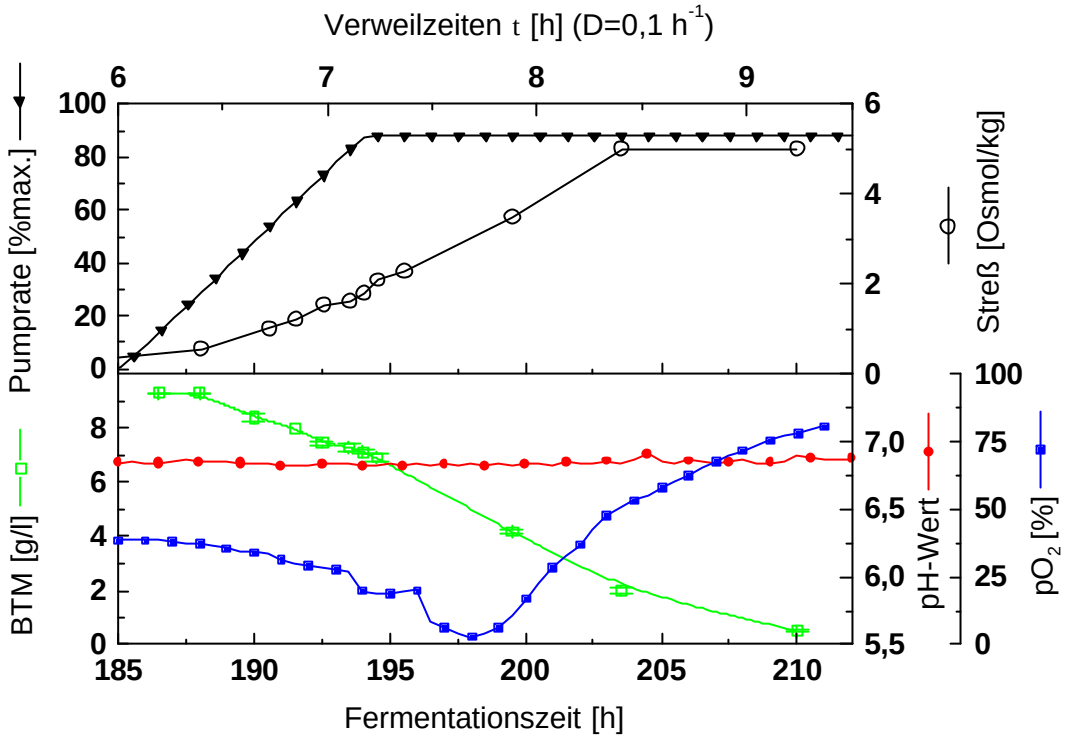


Abbildung 45: *online*-Meßwerte und Osmostreß des Experimentes mit langsamer Anpassung an osmotischen Streß bei konstanter Verdünnungsrate D=0,1 h^{-1}. %Pumprate bedeutet den prozentualen Anteil maximaler Pumprate der Gradientenpumpe. Dargestellt sind: ? Pumprate [%], ○ Osmostreß [Osmol/kg] und BTM [g/l] sowie ■ pO_2 [%] und ● pH.

Erst ab einer Osmolalität von circa 0,75 Osmol/kg war ein Effekt auf die BTM meßbar, welche bis zu diesem Zeitpunkt (ungefähr 3 Stunden der Versuchszeit) nahezu konstant blieb. Auch die Konzentration an externer Trehalose blieb bis dahin unverändert.

Nach Übersteigen von 0,75 Osmol/kg im Medium war eine zunehmende Verringerung des Gelöstsauerstoffgehaltes (pO_2) ersichtlich. Dies war ein Zeichen für stark zunehmende Atmungsaktivität, jedoch gekoppelt mit einem Absinken der BTM. Weiterhin war ein Ansteigen der Trehalosekonzentration nach circa 6 Sunden im Medium meßbar. Nach ungefähr 13 Stunden Versuchszeit begann der Gelöstsauerstoffgehalt wieder anzusteigen und näherte sich einem Sättigungswert an, wobei circa 3 Verweilzeiten nach Versuchsbeginn nahezu die gesamte Biomasse ausgewaschen war.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Anpassung des L-Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B an hyperosmotischen Streß untersucht. Während des Verlaufs verschiedener L-Lysinfermentationen mit realitätsnaher Medienzusammensetzung und Fermentationsdauer wurden im Besonderen die Veränderungen des Cytoplasmavolumens, der Zellbildung und der L-Lysinproduktion in Abhängigkeit von konstant eingestelltem hyperosmotischen Streß untersucht. Der jeweilige Anteil an verbrauchter Erhaltungsenergie bei steigendem Osmostreß sowie spezifischer Substratverbrauch und spezifische L-Lysinbildungsrate konnten wachstumsratenabhängig ermittelt werden.

5.1 Aktivierung des Transporters ProP nach Deletion von *ectP* und *betP* und die beobachtete Restaufnahmerate für Betain

Im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B wurden in den Genen, welche für die Aufnahmesysteme für kompatible Solute kodieren, jeweils zentrale Bereiche von circa 1000 bp deletiert. Die Zielsetzung war, die osmotisch regulierte Aufnahme kompatibler Solute wie Betain oder Ectoin funktionell zu unterbinden und dann die resultierenden physiologischen Effekte zu untersuchen. Zwei Konstruktionen wurden hergestellt: *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 (kurz: Δ2) mit deletierten *ectP* und *betP* sowie *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 (kurz: Δ3) mit deletierten *ectP*, *betP* und *proP*. In beiden Mutanten sollte dem nach bisherigem Stand der Forschung keine osmotisch regulierte Betainaufnahme mehr möglich sein. Es war bereits bekannt, daß für die Betainaufnahme in Stämmen ohne Betain-Transporter (ausgehend vom Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032) eine sehr geringe Restaktivität bestand (0,5 nmol/min*mg BTM). Aus Fermentationen, bei welchen in einem Zeitraum von circa acht Stunden die *lag* Phase und die exponentielle Wachstumsphase untersucht wurden, schlußfolgerte man, daß diese Restaktivität jedoch nicht für eine physiologische Regeneration nach Einwirkung von hyperosmotischem Streß ausreicht [Peter 1997, Peter *et al.* 1998].

Der Stamm Δ2 transportierte im Gegensatz zum Elternstamm Ectoin und Prolin mit nahezu verdoppelter Rate in die Zelle (siehe Abbildung 15 auf S. 41). Da die Mutante Δ2 nur noch ProP und PutP zur Verfügung hatte, um kompatible Solute zu transportieren (siehe Abbildung 3 auf S. 7) und PutP lediglich zur anabolen Prolinaufnahme konstitutiv synthetisiert wird, mußte folglich eine Aktivierung des Transporters ProP vermutet werden. Dies schien zunächst etwas überraschend, da für ProP bisher noch keine Bedingungen gefunden wurden, bei denen entweder die chromosomale Kopie von *proP* genetisch oder ProP katalytisch aktiviert wurde. Die Vermutung war somit nur mit Gewißheit durch biochemische Untersuchungen mit einem Stamm zu vertreten, in welchem alle Transporter außer ProP transportdefekt waren. Mit der Konstruktion der Stämme

C. glutamicum MH20-22B $\Delta 3^+$ und *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ konnte durch zwei unabhängige Konstruktionen gezeigt werden, daß die überproportional gestiegene Aufnahme von Ectoin und Prolin ausschließlich auf die Aktivität von ProP zurückzuführen war. Im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B $\Delta 3^+$ war der Transporter ProP deletiert (jedoch durch Expression von *proP* auf pHP5 komplementiert) und in *C. glutamicum* MH20-22B Δ3‘ stand nur noch ProP allein als osmotisch regulierter Transporter zur Verfügung. Auch diese Stämme zeigten die erhöhten Aufnahmeraten für Ectoin und Prolin. Zusätzlich konnte im Kontrollstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ3‘ (*ectP*$^-$, *putP*$^-$, *betP*$^-$) eine leichte Erhöhung der Transportaktivitäten für Ectoin und Betain beobachtet werden, die aber geringer als in den *C. glutamicum* MH20-22B-Mutanten war.

Es konnte gezeigt werden, daß die Veränderung der Aufnahmeraten auf eine Aktivierung des Transporters ProP nach der Deletion der Transporter EctP und BetP zurückzuführen sein mußte. Wie aber läßt sich eine solche Aktivierung erklären? Zwei Möglichkeiten müssen diskutiert werden. Daß durch die entsprechenden Klonierungsschritte ungewollte genetische Veränderungen der DNA-Sequenz entstanden sind, wäre zwar trivial, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. So ist durchaus denkbar, daß bei der Rekombination der DNA im Chromosom möglicherweise eine Repressorbindestelle verlorengegangen ist und somit eine verstärkte Aktivität zu verzeichnen war. Weiterhin könnten gerade im stromaufwärts gelegenen DNA-Bereich Bindestellen für Sigmafaktoren kodiert sein, welche durch die Stammkonstruktion beschädigt worden sind. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß durch die ursprüngliche chemische Mutagenese, welche zur Isolation von *C. glutamicum* MH20-22B führte, DNA-Bereiche mutiert worden sind, die entweder Regulationsproteine für ProP kodieren oder aber Bindestellen für regulatorische Proteine darstellen und erst nach Deletion von *ectP* und *betP* regulatorische Bedeutung erlangen. Dafür spricht auch, daß mit dem vergleichbaren Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ3‘ (Tabelle 2 & Abbildung 15-5), welcher lediglich mit dem Transporter ProP ausgestattet war, keine Aktivierung von ProP in vergleichbarem Maße beobachtet wurde. Ein Analyse der stromaufwärts vom Strukturgen gelegenen DNA-Sequenz und der Position der einzelnen Gene im Genom von *C. glutamicum* MH20-22B im Vergleich zum Elternstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 sowie detaillierte Untersuchungen der Expressionsregulation der verschiedenen Mutanten dürfte Aufschluß über die vorhandenen Unstimmigkeiten bringen. Möglicherweise beeinflußte auch die Stärke des osmotischen Reizes und die gleichzeitige Deletion von *betP* und *ectP* die beobachtete Höhe der Aktivität derart, daß *proP* tatsächlich erst bei extremen Streßsignalen exprimiert wird und somit unter Kontrolle eines äußerst schwachen Promotors stehen könnte.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß sowohl in der Mutante Δ2 als auch in der Mutante Δ3 die Aufnahme von Betain möglich war, wenn auch mit extrem verringerter Rate. Die beobachtete Restaufnahmerate von 2 bis 3 nmol/min*mg BTM war in den konstruierten Stämmen Δ2 und Δ3 durchschnittlich 5fach höher als in den vergleichbaren

Konstruktionen mit dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 als Elternstamm. Die beobachtete Restaktivität nach Deletion von BetP und EctP ermöglichte dem Stamm Δ2 ein zum Elternstamm *C. glutamicum* MH20-22B vergleichbares Wachstum und eine vergleichbare L-Lysinbildung bei hohen Osmostreß (2,5 Osmol/kg), falls Betain im Medium verfügbar war. Auch der Stamm Δ3 konnte mit Betain im Medium bei hohem Osmostreß deutlich besser wachsen als ohne Betain, obwohl alle bekannten Betain-Transporter – ja alle bekannten osmotisch regulierten Transporter in diesem Stamm deletiert wurden. Es muß geschlußfolgert werden, daß es sich möglicherweise nicht – wie bisher angenommen – um eine unspezifische Restaktivität handelt, sondern von *C. glutamicum* ein weiteres (bisher unbekanntes) spezifisches Betain-Transportsystem mit geringer Transportgeschwindigkeit synthetisiert werden kann. Diese Vermutung wurde durch das Genom-Sequenzierprojekt der Degussa-Hüls AG für *C. glutamicum* bestätigt, da in der Zwischenzeit neben den DNA-Sequenzen der bekannten Transporter *ectP*, *betP* und *proP* ein weiterer *open reading frame* mit Sequenzähnlichkeiten zu *ectP* und *betP* gefunden wurde [Morbach, persönliche Mitteilung]. Da EctP und BetP zur Betain/Cholin/Carnithin-Transporterfamilie (BCCT) der Natrium-Solutsymporter-Superfamilie (SSSS, siehe Abbildung 51) gehören, und sowohl starke Ähnlichkeiten der DNA-Sequenz als auch der Transporteigenschaften aufweisen, ist wahrscheinlich, daß dieses nicht identifizierte, putative Transportersystem ebenfalls in diese Familie einzuordnen wäre. Im Gegensatz dazu gehört ProP zur *major facilitator family* (MFS) und ist damit phylogenetisch nur wenig mit EctP und BetP und dem putativem System verwandt.

5.2 Veränderung des Cytoplasmavolumens von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und unterschiedlichem Osmostreß

Obwohl es als eine allgemein bekannte und vor allem unspektakuläre Information hingenommen wird, daß sich das Cytoplasmavolumen und somit das Zellvolumen eines Bakteriums im Laufe des Wachstums verändert, existieren keine publizierten Daten, welche diese These belegen. In dieser Arbeit wurden die Veränderungen des Cytoplasma- und des Zellvolumens von *C. glutamicum* MH20-22B im Verlaufe einer typischen Fermentation in Abhängigkeit von hyperosmotischen Streß detailliert untersucht. Damit stehen erstmals Daten zur Variabilität des Zellvolumens als Funktion der Wachstumsphase eines Gram-positiven Bakteriums zu Verfügung.

Das Volumen einer einzelnen Zelle blieb während einer typischen Fermentation (Anwachsphase, Exponentialphase und Stationärphase) keineswegs unveränderlich. Vielmehr zeigte das Cytoplasmavolumen Veränderungen, welche stets nach einem gleichen Muster abliefen. Die Cytoplasmavolumina erreichten präzise zum Zeitpunkt der maximalen Wachstumsrate (dX/dt) ihren größten Wert. Diese maximalen Cytoplasmavolumina waren bei geringem Osmostreß größer als bei hohem Osmostreß und verliefen im untersuchten Bereich

von 1,0 bis 2,5 Osmol/kg mit linearer Abhängigkeit von der Osmolalität. Abbildung 19 zeigt die von *C. glutamicum* MH20-22B angewandte Strategie der Anpassung der Zellen an unterschiedlichen Osmostreß in Hinblick auf das Cytoplasma- und Zellvolumen: Das Cytoplasmavolumen blieb in der Anwachs- und der Stationärphase relativ klein. In beiden Phasen waren die Volumina nahezu gleich groß und unterschritten ein Zellvolumen von durchschnittlich 0,30 μm^3 nicht. Die Volumina der Anwachsphase waren wie erwartet von gleicher Größe wie die Volumina stationärer Zellen, da zum Animpfen einer Testreihe ja stets stationäre Zellen benutzt wurden. Die Zellen schienen bestrebt zu sein, den beobachteten minimalen Schwellenwert unabhängig von der Osmolalität im Medium aufrecht zu erhalten. Dagegen regulierten die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (also bei $\mu_{max.}$) ein spezifisches, maximales Cytoplasmavolumen $V_{C, max.}$ in umgekehrt proportionaler Abhängigkeit vom Osmostreß ein. Das kompatible Solut Betain vergrößerte $V_{C, max.}$ während der Exponentialphase um durchschnittlich 20%, hatte jedoch keinen Einfluß auf die Volumina in der Stationärphase. $V_{C, max.}$ stand in direktem Zusammenhang mit der maximal möglichen Wachstumsrate (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Im Bereich zwischen maximalen Zellvolumina und minimalen Schwellenwert-Volumina änderten sich Wachstumsraten und Volumina ebenfalls in linearen Abhängigkeit (siehe Abbildung 18).

Trotz dieser linearen Verbindungen zwischen Zellvolumen und Wachstumsrate sowie Osmolalität ist es vorstellbar, daß gerade in den Grenzbereichen von sehr kleiner und sehr großer Osmolalität die Volumenregulation nicht mehr durch diesen einfachen Zusammenhänge beschrieben werden kann. Sichere Interpretationen sind lediglich für den Bereich von 0,5 bis circa 3,0 Osmol/kg möglich [siehe auch Ruffert *et al.* 1997]. Es ist durchaus vorstellbar, daß die Volumenregulation einem sigmoiden Verlauf mit absoluten Extremwerten folgt, also bei sehr großen Osmolalitäten (>3,0 Osmol/kg) einem Minimalwert zustrebt und bei sehr kleinen Osmolalitäten einem Maximalwert zustrebt, wie auch für *E. coli* beobachtet [Record *et al.* 1998]. Für einen möglichen Minimalwert des Zellvolumens bei Osmolalitäten > 3,0 Osmol/kg spricht die Beobachtung, daß stationäre (also nichtwachsende) Zellen ein Minimalvolumen von circa 0,3 μm^3 aufrechterhalten. Da sich beim Wachstum bei sehr großen Osmolalitäten die maximale Wachstumsrate stetig verringert und im Bereich von > 4,0 Osmol/kg Wachstum nur noch mit äußerst geringen Raten – falls überhaupt – möglich scheint (Daten nicht gezeigt), werden „wachsende“ Zellen bei sehr hohen Osmolalitäten prinzipiell zu stationären Zellen. Gelten in diesem Bereich die Beobachtungen von dX/dt proportional zu V_C, so wäre die Annahme eines Minimalvolumens der „Exponentialphase“ bei extrem großer Osmolalität plausibel, jedoch experimentell nur sehr schwierig zugänglich. Treffen die Beobachtungen der stationären Phase auch für den Bereich großer Osmolalitäten zu, sollte Betain unter diesen Bedingungen seine fördernde Eigenschaft bei der Volumenregulation verlieren. Folgendes Modell der Abhängigkeit des maximalen Cytoplasmavolumens von der Osmolalität erscheint einerseits anhand der gemessenen Daten

und andererseits unterschiedlicher Literaturangaben [Skjerdal *et al.* 1995, Cayley *et al.* 2000] für *C. glutamicum* physiologisch schlüssig:

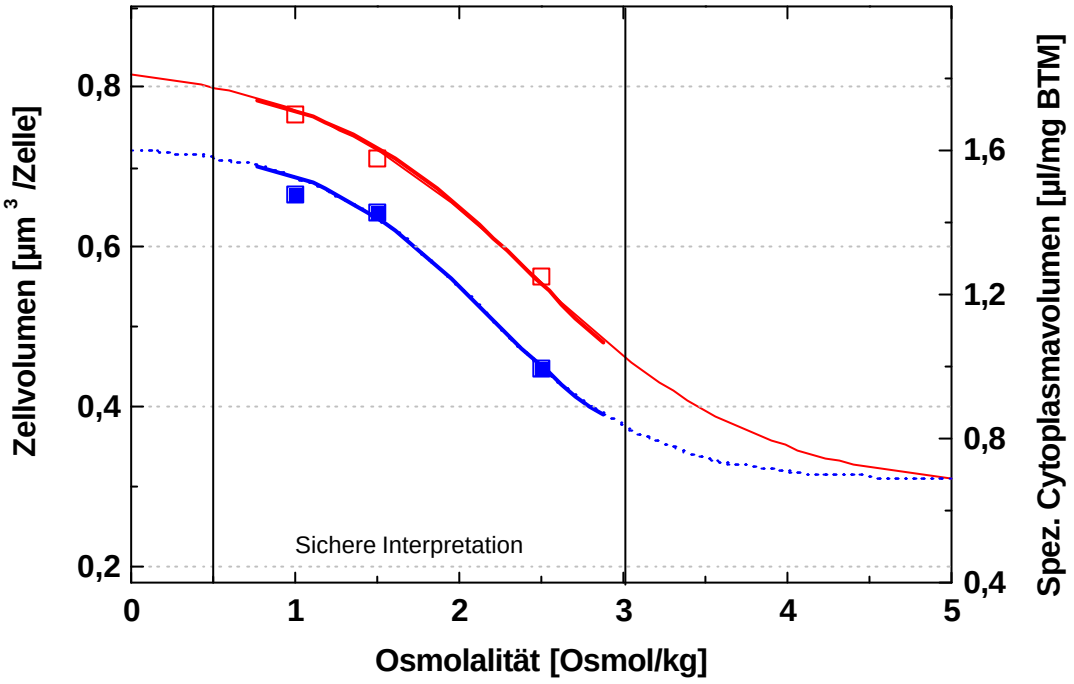


Abbildung 46: Modellierter Verlauf des Zellvolumens in Abhängigkeit von der Osmolalität in Mineralsalzmedium. Dargestellt sind: exponentiell wachsende Zellen mit Betain und ■ exponentiell wachsende Zellen ohne Betain. Beide Datensätze wurden einer Modellierung unterworfen. (·····: ohne Betain, —: ohne Betain, Hervorhebung: Daten aus Abbildung 19)

Im Bereich extrem kleiner Osmolalitäten (< 0,3 Osmol/kg) wurden für *E. coli* sehr hohe Zellvolumina beobachtet, dennoch scheint die Annahme plausibel, daß Zellen dies sich praktisch in destilliertem Wasser befinden, nicht überleben können, sondern nach einer gewissen Inkubationszeit bersten oder aber lysieren sollten [Cayley *et al.* 2000]. Ob, und in welcher Art und Weise dieser Prozeß jedoch praktisch bei *C. glutamicum* als Gram-positiven Organismus vor sich geht, bleibt Spekulation. Ruffert beobachtete zwar keine Lyse bis zu einer Osmolalität von 0,34 Osmol/kg [Ruffert *et al.* 1997], aber zusätzlich auch ein zunehmend langsamer steigendes Zellvolumen im Bereich von 0,81 Osmol/kg bis 0,34 Osmol/kg. Nottebrock [persönliche Mitteilung] konnte in destilliertem Wasser keine vollständige Lyse von *C. glutamicum* beobachten. Wie in Abbildung 46 dargestellt, ist für *C. glutamicum* anhand der Datenlage wohl eher die sigmoide Annäherung an ein Maximalvolumen bei hypoosmotischem Streß wahrscheinlich – obwohl sich besonders hier der experimentelle Zugang extrem schwierig gestaltet; ja vielmehr für Chemoorganotrophe aufgrund von nötigen gelösten Nährstoffen im Wasser, welche die Osmolalität erhöhen,

unmöglich ist. Betain vergrößerte das Cytoplasmavolumen von Zellen mit $\mu_{max.}$ bei geringer Osmolalität erheblich (um circa 20% unter den getesteten Bedingungen in dieser Arbeit), änderte aber nicht die maximale Wachstumsrate. Also ist auch für den Bereich der Osmolalität von < 0,3 Osmol/kg ein solcher Effekt zu erwarten, was in der Modellierung der Daten in Abbildung 46 berücksichtigt wurde.

5.3 Anpassung des Metabolismus von *C. glutamicum* MH20-22B und Mutanten mit Defekten in den Aufnahmeproteinen für kompatible Solute unter Einwirkung von hyperosmotischem Osmostreß

Um die Anpassung des Metabolismus von *C. glutamicum* MH20-22B an unterschiedlichen hyperosmotischen Streß zu untersuchen, wurden einerseits zeitabhängige Experimente mit konstantem Osmostreß in Schüttelkolben sowie zeitunabhängige Experimente mit kontinuierlicher Kulturführung bei konstanter Wachstumsrate und konstantem Osmostreß durchgeführt. In den Versuchen mit Schüttelkolben und kontinuierlicher Versuchsführung wurde der vorher eingestellte Osmostreß über den Versuchszeitraum nicht verändert. Im *batch*-Ansatz der Schüttelkolben-Reihe bei 1,0 Osmol/kg, 1,5 Osmol/kg und 2,5 Osmol/kg zeigte sich wie auch schon bei der Untersuchung der Cytoplasmavolumina, daß die osmoprotektive Substanz Betain auf die Zellbildung des Wildtyps selbst (BTM, dX/dt) keinen fördernden Einfluß hatte. Erst bei extrem hoher Osmolalität verkürzte die Betainzugabe den Zeitraum vom Animpfen bis zum Erreichen der maximalen Wachstumsrate und somit auch den Eintritt in die stationäre Phase.

Eine signifikante physiologische Reaktion auf hyperosmotischen Streß wurde von *C. glutamicum* MH20-22B im Gegensatz zu *E. coli* [Meury 1988, Dinnbier *et al.* 1988] erst bei hohem Osmostreß (2,5 Osmol/kg) beobachtet. Geringere Osmolalitäten wie 1,0 Osmol/kg und 1,5 Osmol/kg veränderten den Zellstoffwechsel nur unwesentlich. Das ist wahrscheinlich mit der Gram-positiven, wesentlich stabileren Zellwandstruktur zu begründen [Whatmore und Reed 1990]. Der dadurch notwendige größere Turgordruck für die Zellteilung in *C. glutamicum* verlangt *vice versa* eine erhöhte Osmolalität im Cytoplasma (siehe auch Gleichung 3) und somit ist eine verbesserte Fähigkeit bei der Anpassung an höheren Osmostreß *a priori* zu erwarten.

Die ermittelten cytoplasmatischen Konzentrationen osmoprotektiver Substanzen in Abhängigkeit von der Osmolalität und der Fermentationszeit bestätigen bereits publizierte Daten [Guillouet und Engasser 1995, Skjerdal *et al.* 1995]. Prolin wurde als osmoprotektive Substanz bevorzugt während der exponentiellen Wachstumsphase synthetisiert, wogegen Trehalose als osmoprotektive Substanz verstärkt in der stationären Phase synthetisiert wurde. Während die Prolinkonzentration im Cytoplasma mit steigender Osmolalität extrem stark anstieg, war dieser Effekt für Trehalose nicht in gleichem Maße zu beobachten. Qualitativ wurde diese physiologische Reaktion auf hyperosmotischen Streß auch in *E. coli* beobachtet

[Dinnbier *et al.* 1988, Strøm und Klaasen 1993]. Glutaminsäure und Kaliumionen spielten in der Langzeit-Osmoregulation von *C. glutamicum* MH20-22B keine bestimmende Rolle, da die cytoplasmatischen Konzentrationen mehr oder weniger unabhängig vom osmotischen Streß während der gesamten Fermentationszeit von 48 Stunden konstant durchschnittlich 200 mmol/l betrugen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß durch Betainzusatz die cytoplasmatische Konzentration von Prolin, welches *C. glutamicum* MH20-22B in der exponentiellen Wachstumsphase bei hyperosmotischem Streß synthetisierte, unter allen Versuchsbedingungen erheblich verringerte wurde. Die Konzentration der Trehalose im Cytoplasma wurde durch die Zugabe von Betain allerdings nur wenig verringert. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die Nutzung von Betain als Zusatzstoff in der Fermentation die Konzentration des unerwünschten Nebenproduktes Trehalose im Medium beträchtlich verringerte. In der folgenden Abbildung ist eine Zusammenfassung der zugänglichen Daten des Stammes *C. glutamicum* MH20-22B als idealisierte Darstellung der Reaktion auf extrem hohen hyperosmotischen Streß dargestellt:

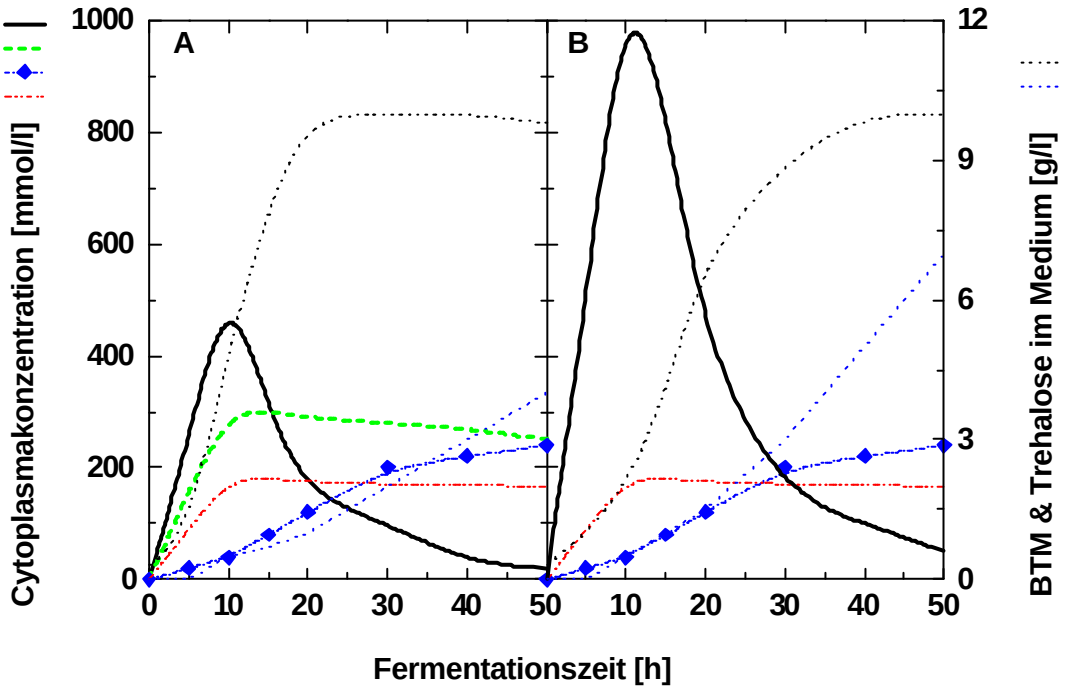


Abbildung 47: Idealisierte Darstellung der Anpassung von *C. glutamicum* MH20-22B an extrem hohen hyperosmotischen Streß (2,5 Osmol/kg). A: mit Betain und B: ohne Betain. Konzentrationen von — Prolin, -·-·- Glutaminsäure, _ _ _ Betain, ◆ Trehalose im Cytoplasma sowie ····· BTM und ····· Trehalose im Medium

Falls den Zellen Betain im Medium angeboten wurde, wurde diese osmoprotektive Substanz durch die Transporter EctP und BetP in die Zelle transportiert und im Cytoplasma angehäuft. Auch bei hohem Osmostreß von 2,5 Osmol/kg betrug die Betainkonzentration unter den nachgestellten realen Fermentationsbedingungen nicht mehr als 300 mmol/l. Diese cytoplasmatische Betainkonzentration war jedoch wesentlich geringer als die Betainkonzentration in Zellen des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032 nach hyperosmotischen *shifts* im biochemischen Test [Ruffert *et al.* 1997]. Allerdings waren aus diesen Zellen vor dem *shift* Experiment jegliche kompatiblen Solute durch hypoosmotische Waschschritte aus dem Cytoplasma entfernt worden, wodurch Betain bei akutem Osmostreß als einziges kompatibles Solut zur Verfügung stand und bis zu 1000 mmol/l akkumuliert wurde [Farwick *et al.* 1995, Ruffert *et al.* 1997].

Daraus und aus der starken Verringerung der Prolinkonzentration in Anwesenheit von Betain kann geschlossen werden, daß Betain für *C. glutamicum* eine außerordentlich wirksame osmoprotektive Substanz ist. Ohne Betain mußte *C. glutamicum* wesentlich mehr Prolin synthetisieren, um auftretenden Osmostreß in gleicher Weise zu kompensieren, woraus folgt, daß Prolin für *C. glutamicum* eine qualitativ „schlechtere“ osmoprotektive Substanz darstellt. Besonders offensichtlich wird dies in der aus Daten der Anpassung bei 2,5 Osmol/kg abgeleiteten idealisierten Darstellung in Abbildung 47. Ohne Betain im Medium war die Gesamtsumme analysierter gelöster Substanzen im Cytoplasma nahezu verdoppelt, was aber fast ausschließlich auf die Erhöhung der Prolinkonzentration zurückging. Biophysikalische Untersuchungen an Proteinsystemen *in vitro* haben ergeben, daß der osmoprotektive Effekt eines kompatiblen Solutes sehr von der chemischen Struktur und somit von der Interaktion mit dem Hydrathüllenwasser im Cytoplasma abhängig ist. So wurde in unabhängigen Studien gezeigt, daß ein der Hofmeister-Reihe von Salzen vergleichbarer Effekt bei der Wirksamkeit von kompatiblen Soluten beobachtet werden kann [Record *et al.* 1998, Qu *et al.* 1998, Courtenay *et al.* 2000]. Dieser bisher experimentell *in vitro* beschriebene Effekt konnte in dieser Arbeit bei einem Vergleich der osmoprotektiven Wirksamkeit von Prolin und Betain für *C. glutamicum* MH20-22B *in vivo* qualitativ gezeigt werden. Weiterhin kann aus den Daten interpretiert werden, daß eine aktive Kompensation von Osmostreß durch Synthese von Prolin lediglich in der Wachstumsphase erfolgte. In der stationären Phase waren die Konzentrationen der analysierten Solute im Cytoplasma in *C. glutamicum* MH20-22B nahezu unabhängig von der Osmolalität. Für *C. glutamicum* als Bodenbakterium favorisierte die Evolution offensichtlich die Entwicklung effektiver Aufnahmesysteme für Betain (EctP und BetP) im Gegensatz zur Eigensynthese, da diese Substanz im Erdreich aus pflanzlichem Material verfügbar ist. Nur für den Fall, daß kein Betain (oder Ectoin) aufgenommen werden kann, muß Prolin als Ersatz synthetisiert werden.

Trehalose wurde von den Zellen in das Medium exkretiert. Es muß vorerst Spekulation bleiben, welcher Natur dieser Transportprozeß war. Es muß aber ein Regulationsmechanismus der Exkretion existieren, denn mit steigender Osmolalität wurde

auch eine proportional erhöhte Konzentration im Medium gemessen. Es kann vermutet werden, daß Trehalose in Abhängigkeit vom Osmostreß zwar mit unterschiedlichen Raten synthetisiert wird, jedoch kein geeigneter Mechanismus in *C. glutamicum* existiert, den Zucker im Cytoplasma in höherer Konzentration (> 300 mmol/l) anzuhäufen, denn scheinbar exkretiert *C. glutamicum* Trehalose bei sehr hohem Osmostreß ungenutzt für die Osmoregulation ins Medium. Weiterhin deutete dies darauf hin, daß kein geeigneter Transporter zur Aufnahme von Trehalose aus dem Medium in *C. glutamicum* existiert. Da für *E. coli* wurde gezeigt wurde, daß die Trehalosesynthese nicht durch *feed back* inhibiert wird [Strøm und Klaasen 1993] läßt sich in *C. glutamicum* möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus nachweisen. Die Gene der verschiedenen Trehalose-Synthesegene (siehe Anhang) wurden durch Sequenzanalyse bereits gefunden und kloniert. Expressionsstudien sollten die Frage beantworten, ob zur Osmoregulation die *de novo* Synthese aus Glukose mit OstA/OtsB [Strøm und Klaasen 1993] und der Abbau aus Maltooligosacchariden mit TreY/TreZ [Strøm und Klaasen 1993] aktiviert sind oder aber nur eine Variante favorisiert wird. Aus zeitunabhängigen Versuchen mit langsamer Anpassung an Osmostreß lassen sich weitere Schlüsse zur Anpassung an hyperosmotischen Streß ziehen. Erst ab einer Osmolalität von circa 0,75 Osmol/kg reagierte *C. glutamicum* MH20-22B auf Osmostreß, welcher durch metabolische Aktivitäten kompensiert werden mußte – was sich in einem sinkendem Gelöstsauerstoffgehalt im Medium (verstärkter Stoffwechsel der Zellen) zeigte. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde ein Ansteigen der Trehalosekonzentration im Medium erst meßbar, als eine Osmolalität von circa 1,0 Osmol/kg im Medium erreicht wurde. Somit begann die verstärkte Exkretion von Trehalose ins Medium erst, nachdem bereits viel früher Stoffwechselaktivitäten als Antwort auf den steigenden Osmostreß beobachtet werden konnten.

Entgegen den Erwartungen zeigte sich, daß die Deletion der Transportproteine EctP und BetP in Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 keine verschlechterte Anpassung an hyperosmotischen Streß zur Folge hatte. Vielmehr war der Stamm in der Lage, sowohl bei Verfügbarkeit von Betain als auch ohne den auftretenden Osmostreß in gleicher Weise zu kompensieren, wie dies für den Wildtyp beobachtet wurde. Auch der Stamm *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 war in der Lage, Osmostreß durch Aufnahme von Betain zu kompensieren. Allerdings konnte für diese Mutante ein stark verlangsamtes Wachstum sowie eine verzögerte Aufnahme von Betain gegenüber den anderen Stämmen beobachtet werden. Möglicherweise besitzen beide Mutanten eine verschlechterte Fähigkeit zur Trehalosesynthese, da im Cytoplasma geringere Konzentrationen beobachtet wurden.

5.4 L-Lysinbildung und Substratverbrauch von *C. glutamicum* MH20-22B in Abhängigkeit von der Osmolalität

Kawahara *et al.* berichteten 1990, daß die L-Lysinbildung mit *Brevibacterium lactofermentum* AJ 12319 durch Zusatz der osmoprotektiven Substanz Betain „stimulatorisch“ beeinflußt wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte aber für *C. glutamicum* MH20-22B gezeigt werden, daß Betain zwar keinen Einfluß auf die eigentliche L-Lysinbildung hat, aber die L-Lysinkonzentration im Medium bei hohem Osmostreß indirekt positiv durch eine Verschiebung des Eintritts der Zellen in die exponentielle Wachstumsphase und einer damit verbundenen früheren L-Lysinbildung beeinflußt.

Der Schlüssel zum Verständnis des „Betaineffektes“ ist die Zellbildung, also die förderliche Wirkung des Betains auf die Bildung von Biomasse bei hohem Osmostreß. Falls dem Medium Betain zugesetzt wurde, erreichten die Zellen im *batch* Prozeß bei hoher Osmolalität (2,5 Osmol/kg) die stationäre Phase schneller (siehe Abschnitt 5.2). Das bestätigte zunächst auch die bereits publizierten Daten [Kawahara *et al.* 1990a]. Die Konzentrationen von L-Lysin und BTM bei Abbruch der Fermentationen im Schüttelkolben nach 48 Stunden wurden allerdings nicht von Betain beeinflußt. Da die Konzentration von L-Lysin im Medium ausschließlich mit der BTM in Abhängigkeit von der Fermentationszeit korreliert war, läßt sich der positive Effekt des Betain auf die beschriebene Wachstumsförderung bei hohem Streß zurückführen. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache unterstützt, daß zum Ende der Fermentation stets vergleichbare L-Lysinkonzentrationen (+/-) Betain beobachtet wurden, und lediglich während des Übergangs in die stationäre Phase bei hohem Osmostreß deutliche Unterschiede (+/-) Betain festgestellt wurden (siehe Abbildung 34).

Biomassebildung, Substratverbrauch, L-Lysinbildung und Trehalosebildung waren abhängig von der Osmolalität des Mediums. So waren zwar die Prozeßkennzahlen $Y_{i/S}$ und bei geringem und moderatem Osmostreß für alle untersuchten Stämme von *C. glutamicum* der Größenordnung nach vergleichbar (Abbildung 36 und Abbildung 37), änderten sich bei hohem Osmostreß jedoch signifikant. Die Ausbeuten an Biomasse $Y_{X/S}$ und L-Lysin $Y_{Lys/S}$ sanken, während der Trehaloseumsatz $Y_{Tre/S}$ stark zunahm. Entscheidend verminderte Betain lediglich bei hoher Osmolalität das Verhältnis von Trehalose zu verbrauchtem Substrat – die Ausbeuten an Biomasse und L-Lysin blieben unverändert. Diese Verschiebung der Stoffflüsse deutete auf eine Umstellung des Metabolismus bei hohem Osmostreß hin. Bei einem Streß von 2,5 Osmol/kg wurden circa 20% weniger Zellen im Vergleich zu geringerem Streß gebildet. Dieser Verlust an BTM ist durch die notwendige Kompensation des Stresses durch einen erhöhten Bedarf an Erhaltungsenergie einerseits und die verstärkte Eigensynthese osmoprotektiver Substanzen wie Prolin und Trehalose andererseits zu erklären. Durch diese Stoffwechselumstellung sank bei allen beobachteten Stämmen auch die substratbezogene Ausbeute an L-Lysin.

Neben den Schüttelkolbenversuchen wurde die kontinuierliche Kulturführung benutzt, um die Abhängigkeit der Substratverbrauchsrate, der L-Lysinbildungsrate vom Osmostreß und den Anteil der Erhaltungsenergie nichtwachsender Zellen als Funktion der Osmolalität für *C. glutamicum* MH20-22B zu ermitteln. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Schüttelkoben wurde bei der kontinuierlichen Versuchsführung Glukose als Kohlenstoffquelle benutzt. Es konnte gezeigt werden, daß *C. glutamicum* MH020-22B unter typischen L-Lysin-Produktionsbedingungen mit steigendem Osmostreß einen erhöhten Anteil von Energie ausschließlich für die Erhaltung des Stoffwechsels aufwenden mußte. Bei einer Erhöhung der Osmolalität von 0,4 Osmol/kg auf 2,4 Osmol/kg stieg der Anteil an Erhaltungsenergie um circa 50% auf 0,12 g Glucose/gBTM*h an (siehe auch Abbildung 40). Die folgende Abbildung zeigt ein Modell der Abhängigkeit der L-Lysinbildung bei unterschiedlichen Wachstumsraten vom osmotischen Streß im Medium, welches aus den gemessenen Daten abgeleitet wurde.

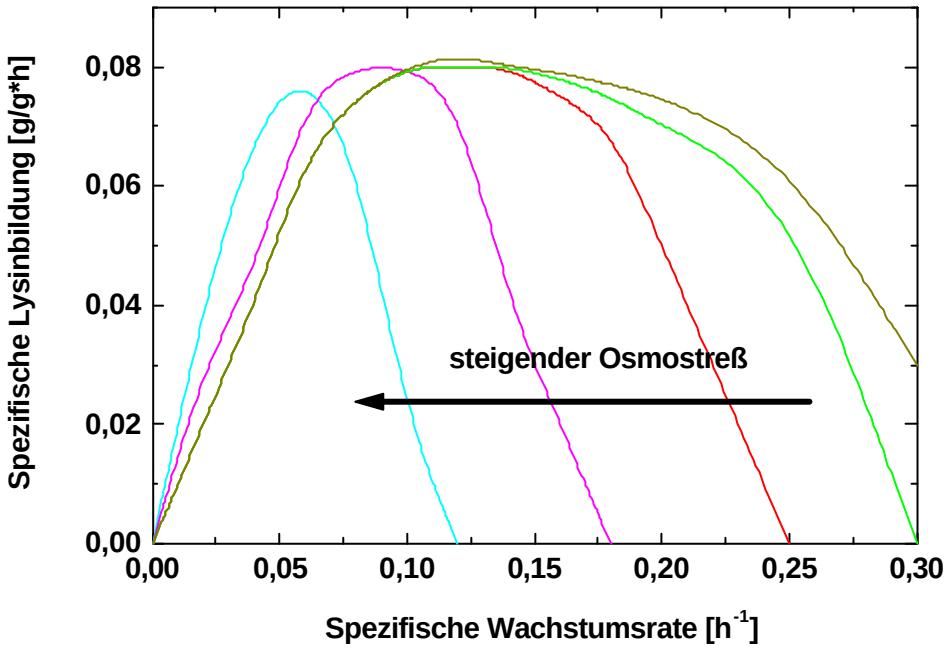


Abbildung 48: Modell der L-Lysinbildung von *C. glutamicum* MH20-22B bei unterschiedlichen Wachstumsraten in Abhängigkeit von hyperosmotischen Streß

Die Untersuchungen deuteten darauf hin, daß, wie in Abbildung 48 gezeigt, die maximale spezifische L-Lysinbildungsrate von circa 0,07 g L-Lysin/gBTM*h unabhängig von der Osmolalität war, wobei bei höherem Osmostreß auch weniger L-Lysin im Medium gemessen wurde. Es konnte ein Bereich mit ausgeprägter maximaler spezifischer L-Lysinbildung bei Wachstumsraten von durchschnittlich 0,08 h^{-1} bis 0,13 h^{-1} ermittelt werden. Dieser Bereich korrelierte gut mit der optimalen Wachstumsrate (0,1 h^{-1}) in Bezug auf die spezifische

L-Lysinbildung im *fed batch* Prozeß [Kelle *et al.* 1996]. Im Bereich suboptimaler Wachstumsraten verläuft die spezifische L-Lysinbildung wahrscheinlich unabhängig vom Osmostreß, wobei die L-Lysinbildung mit sinkender Wachstumsrate ebenfalls sinkt und kein L-Lysin mehr von nichtwachsenden Zellen gebildet wird. Die untersuchten Fließgleichgewichte deuteten darauf hin, das im Bereich $\mu > \mu_{opt.}$ die spezifische L-Lysinbildung sehr sensitiv auf Änderungen des Osmostresses reagierte. In diesem Bereich konnten durch Modellierung auf kritische Wachstumsraten geschlossen werden, die mit steigendem Osmostreß signifikant sanken. Aufgrund der schwierigen experimentellen Zugänglichkeit wurde mit vorhandenen Daten simuliert, daß bei geringem Osmostreß von 1,3 Osmol/kg von *C. glutamicum* MH20-22B bis zu einer Wachstumsrate von 0,34 h^{-1} L-Lysinbildung beobachtet werden kann, diese kritische Wachstumsrate jedoch mit steigendem Streß bei 2,4 Osmol/kg auf 0,17 h^{-1} sinkt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Anpassung des L-Lysin-Produzenten *C. glutamicum* MH20-22B und verschiedener Mutanten mit defekten Aufnahmesystemen für kompatible Solute an hyperosmotischem Streß untersucht werden. Von besonderem Interesse waren Veränderungen der Biomassebildung, des Zellvolumens, des Substratverbrauchs und der L-Lysinbildung.

Es wurde gezeigt, daß der Ectoin-Prolin-Transporter ProP nach Deletion von *ectP* und *betP* im Stamm *C. glutamicum* MH20-22B aktiviert wurde und dadurch Ectoin und Prolin mit etwa 3fach erhöhter Rate von circa 40 nmol/min*mg BTM im Vergleich zum Elternstamm aufgenommen wurden. Damit wurden erstmals Bedingungen der Aktivierung für ProP in *C. glutamicum* gefunden. Bei der bisher als Restaktivität interpretierten Betainaufnahmerate handelt es sich wahrscheinlich um Aufnahme durch einen bisher unbekannten Transporter der BCCT-Transporterfamilie. Diese Restaktivität reichte aus, um in den Zellen bei hohem Osmostreß genügend Betain für eine Kompensation zu akkumulieren.

Es konnte für *C. glutamicum* als Gram-positiven Mikroorganismus *in vivo* gezeigt werden, daß das Zellvolumen in der Wachstumsphase im Bereich von 1,0 bis 2,5 Osmol/kg umgekehrt proportional zum Osmostreß reguliert wurde – das Zellvolumen vergrößerte sich mit abnehmendem Osmostreß. Die Zellvolumina in der stationären Phase wurden nicht reguliert und betrugen unabhängig vom Osmostreß circa 0,3 μm^3. Betain vergrößerte bei maximalen Wachstumsraten das Zellvolumen um 20%, hatte aber keinen Einfluß auf stationären Zellen. Eine signifikante physiologische Reaktion auf hyperosmotischen Streß in *C. glutamicum* MH20-22B wurde erst bei hohem Osmostreß von 2,5 Osmol/kg beobachtet. Geringere Osmolalitäten veränderten den Zellstoffwechsel nur unwesentlich. *C. glutamicum* MH20-22B synthetisierte zur Anpassung an hyperosmotischen Streß während der exponentiellen Wachstumsphase bis zu 1 mol/l Prolin und in der stationären Phase bis zu 250 mmol/l Trehalose. Wenn Betain im Medium verfügbar war, wurde es durch BetP und

EctP akkumuliert. Betainaufnahme wurde von den Zellen gegenüber Prolinsynthese bevorzugt, da mit Betain die Prolinkonzentration im Cytoplasma signifikant reduziert wurde. Betain vermittelte wahrscheinlich einen effektiveren Schutz gegen Dehydratisierung von Proteinen. Dieser Zusammenhang wurde hier *in vivo* für *C. glutamicum* gezeigt, wobei eine aktive Kompensation von Osmostreß durch Prolinsynthese nur in der Wachstumsphase erfolgte. Die chromosomale Deletion der Betain-Transporter EctP und BetP beeinflußte die Bildung von Biomasse und die Physiologie der Anpassung an Osmostreß nur unwesentlich, da Betain unter diesen Bedingungen wahrscheinlich durch einen bisher unbekannten Transporter der BCCT-Transporterfamilie weiterhin aufgenommen werden konnte.

Für die L-Lysinsynthese wurde gezeigt, daß die glukosebezogene Ausbeute im *batch* Prozeß erst nach einer Erhöhung der Osmolalität auf 2,5 Osmol/kg signifikant verringert wurde, wobei die Biomasseausbeute in gleicher Größenordnung sank. Die glukosebezogene L-Lysinausbeute sank bei einer Erhöhung von 1,0 Osmol/kg auf 2,5 Osmol/kg in einem typischen Fermentationsprozeß von 20% auf durchschnittlich 8%. Dieser Verlust ließ sich auf eine erhöhte Stoffwechselleistung zur Kompensation des Stresses zurückführen. Unter diesen Bedingungen wurde wesentlich mehr Trehalose synthetisiert. Betain hatte auf die Ausbeute von L-Lysin keinen Einfluß, aber mit Betain als Zusatz erreichte *C. glutamicum* MH20-22B die exponentielle Wachstumsphase bei den untersuchten Bedingungen etwa 12 Stunden früher, was in einer ähnlichen Verschiebung der L-Lysinkonzentration resultierte. Der Anteil von Trehalose am Gesamtkohlenstoffumsatz stieg bei der Erhöhung des Stresses auf 2,5 Osmol/kg von 4% auf circa 12%, konnte aber durch den Zusatz von Betain deutlich auf 7% reduziert werden. Der spezifische Substratverbrauch zum Erhalt des Zellstoffwechsels nahm mit steigender Osmolalität von 0,06 g Glukose/gBTM*h bei 0,4 Osmol/kg auf 0,12 Glukose/gBTM*h bei 2,5 Osmol/kg zu. Die maximale spezifische L-Lysinbildung von 0,07 g L-Lysin/gBTM*h war nahezu unabhängig vom Osmostreß und wurde in einem Bereich von 0,08 h^{-1} bis 0,13 h^{-1} beobachtet.

C. glutamicum MH20-22 zeigte eine erstaunliche Unempfindlichkeit gegenüber hohem osmotischen Streß. Im Gegensatz zu *E. coli* war Wachstum in Bereichen von 2,5 Osmol/kg problemlos möglich, wenn auch mit verminderter Wachstumsrate. Es wurde gezeigt, daß sich das Zellvolumen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und vom Osmostreß änderte. Betain verbesserte die Produktion von L-Lysin durch einen schnelleren Beginn der Produktionsphase bei hohem Osmostreß, veränderte die Ausbeute jedoch nicht. Die Konzentration von Trehalose wurde durch Betain als Zusatzstoff bei hohem Osmostreß um 50% reduziert. Prolin wurde als Ersatz für Betain während der Wachstumsphase synthetisiert, falls Betain nicht aufgenommen werden konnte. Betain kompensierte die Auswirkungen von hohem Osmostreß wesentlich effektiver als Prolin oder Trehalose, was hier *in vivo* gezeigt werden konnte. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß durch konsequente Einhaltung einer optimalen Wachstumsrate für die L-Lysinproduktion Fermentationen bei hohem Osmostreß mit unverändert maximaler Produktivität möglich sind.

7 Anhang und Zusatzinformationen

7.1 Zwei mögliche L-Lysinbiosynthese-Wege in *C. glutamicum*

Allen L-Lysin-überproduzierenden Corynebakterien ist eine L-Lysin *feedback* inhibierte Aspartatkinase (*lysC*) [Eggeling und Sahm 1999] sowie eine erhöhte Ausscheidungsrate für L-Lysin gemeinsam [Bröer *et al.* 1993]. L-Asparaginsäure aus dem TCZ ist die Vorstufe für L-Lysin. Über verschiedene Zwischenstufen und Verzweigungspunkt L-Δ^1-Piperidin-2,6-dicarbonsäure entsteht letztlich L-Lysin, welches durch den Transporter LysE im Symport mit OH^--Ionen ins Medium ausgeschieden wird. Aus L-Asparginsäureemialdehyd können sowohl L-Lysin, als auch L-Methionin, L-Isoleucin und L-Threonin [Morbach 1996, Ziegler unveröffentlicht] entstehen. Nach der Synthese von L-Δ^1-Piperidin-2,6-dicarbonsäure bestehen in *C. glutamicum* zwei Stoffwechselwege. Der *dap*-Weg und der *ddh*- Weg [Eggeling und Sahm 1994, Park *et al.* 1997]. D,L-Diaminopimelinsäure wird in einem letzten Reaktionsschritt während des Wachstums hauptsächlich für die Zellwand-Synthese verstoffwechselt, oder aber beim Übergang in die stationären Phase in L-Lysin umgesetzt [diese Arbeit, Abschnitt 4.5.2]. Hierin zeigt sich auch die Notwendigkeit, eine stringente Wachstumskontrolle während der L-Lysinproduktion anzuwenden, welche in der vorliegenden Arbeit durch Limitierung einer auxotrophen Aminosäure erzielt wurde. Eine schematische Übersicht über die L-Lysin-Biosynthesewege ab der L-Asparaginsäure zeigt Abbildung 49 [nach Schrumpf *et al.* 1991].

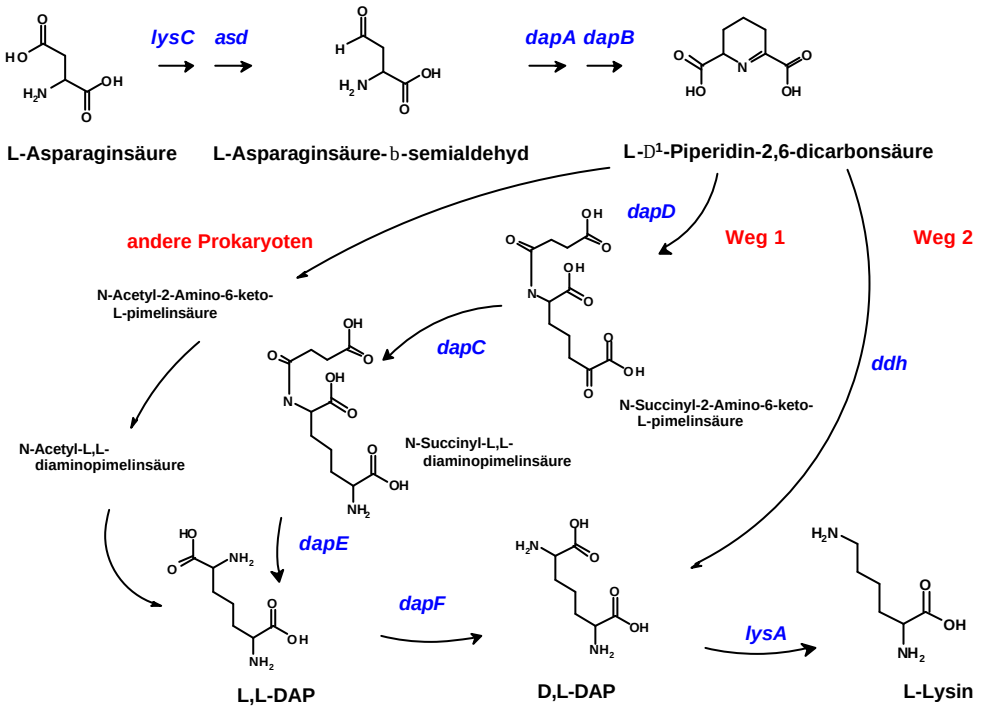


Abbildung 49: L-Lysin-Biosynthesewege. Die Wege 1 und 2 können von *C. glutamicum* genutzt werden. Die entsprechenden Gene wurden *kursiv* hervorgehoben

7.2 Der Degussa-Hüls Prozeß der L-Lysinherstellung

Sowohl Glukose als auch Saccharose werden je nach Verfügbarkeit für den Produktionsprozeß als kommerzielle Kohlenstoff-Quellen eingesetzt. Ammoniumsulfat (Stickstoffdünger) dient als Stickstoffquelle. Hauptprodukt der Fermentation ist L-Lysin mit den Nebenprodukten Trehalose, Lactat und Malat [Pfefferle, persönliche Kommunikation]. L-Lysin wird von der Degussa-Hüls AG als Biolys®60 vertrieben: „Biolys®60 ist ein hellbraunes, staubfreies und sehr gut rieselfähiges Granulat von hohem Schüttgewicht ... und enthält mindestens 46,8% L-Lysin in Form des Sulfatsalzes."

Abbildung 50: Das L-Lysin der Degussa-Hüls AG: Biolys®60 (Quelle: Degussa-Hüls AG)

Die bisher bestehende Produktionsanlage von Degussa-Hüls in der Slowakischen Republik erwies sich mit ihrer Kapazität von 13.000 t/a als zu klein. Deshalb wurde in einem *Joint Venture* zwischen der Degussa-Hüls AG und der Cargill Inc. die Midwest Lysine in Blair (Nebraska, USA) etabliert. Die Kapazität erreicht dort circa 75.000t/a Biolys®60. Zur Fermentation des dienen mehrere Rührkessel mit einer Kapazität von circa 15 m^3 Reaktionsvolumen. Das Besondere am patentierten Degussa-Hüls Prozeß mit *C. glutamicum* ist das *downstreaming* nach einer Fermentationszeit von ungefähr 4 Tagen.

Gegenüber anderen Strategien zur Aufarbeitung des Produktes L-Lysin wird von der Degussa-Hüls prinzipiell nur ein *downstream*-Schritt angewandt. Die gesamte Fermentationsbrühe wird mit den Bakterien sprühgetrocknet. Dadurch entsteht ein granuliertes Endprodukt das neben L-Lysin noch andere Nebenprodukte der Fermentation und enthält, jedoch aufgrund dieser Zusammensetzung ausschließlich als Zusatzstoff in der Futtermittelindustrie Verwendung findet.

7.3 Kinetik der hyperosmotischen Osmoregulation in *C. glutamicum*

Um eine drohende Plasmolyse zu verhindern und Volumen und Turgordruck auf ein physiologisch notwendiges Niveau zu bringen, müssen kompatible Solute von *C. glutamicum* entweder synthetisiert oder aus der Umgebung aufgenommen werden (siehe Abschnitt 1.2). Prinzipiell kann *C. glutamicum* Prolin und Trehalose als Antwort auf hyperosmotischen Streß synthetisieren, nimmt jedoch unter diesen Bedingungen vorzugsweise Betain, Ectoin aber auch Prolin aus der Umgebung auf [Farwick *et al.* 1995, diese Arbeit]. Die in diesen Anpassungsprozeß involvierten Gene und Proteine sind nach dem derzeitigen Stand der Forschung in den folgenden Abschnitten beschrieben.

7.3.1 Osmotisch aktivierte Syntheseproteine

Was genau ist über die Syntheseproteine und deren Regulationsmechanismen bekannt? Es konnte gezeigt werden, daß die Proteine **ProA**, **ProB** und **ProC** die Synthese von Prolin aus Glutaminsäure in drei Reaktionsschritten katalysieren, jedoch wurden nur Vermutungen über die Regulation der Genexpression oder der Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Osmostreß diskutiert, ohne belastbare Daten zur Verfügung zu haben [Ankri *et al.* 1996].

Aufgrund der Synthese bei geringen Wachstumsraten in Abhängigkeit vom Osmostreß müssen die Trehalose-Synthesegene durch hyperosmotischen Streß aktiviert werden. Für die Synthese von Trehalose sind in Mikroorganismen und höheren Organismen zwei grundlegend verschiedene Stoffwechselwege bekannt. Dies ist einerseits die *de novo* Synthese aus Glukose und andererseits die Degradation aus Polysacchariden – nach der Entdeckung in einem Archeabakterium auch *Sulfolobus*-Weg genannt. Da jedoch zu diesen Genen in *C. glutamicum* noch keine grundlegenden Arbeiten durchgeführt worden sind, wurden in der nachfolgenden Tabelle 23 die aus der Literatur bekannten Trehalose-Synthesegene aufgeführt:

Tabelle 23: Bekannte Trehalose-Synthesegene (A: eukaryotisch; B: prokaryotisch)

Protein	A	B	Funktion
1. ***„de-novo“*-Synthese** [Strøm und Klaasen 1993]			
Trehalose-Phosphat-Synthase	*tps1*	***otsA***	Trehalosephosphat-Synthese
Trehalose-Phosphat-Synthase	*tps2*	***otsB***	Dephosphorylierung
Trehalose-Phosphat-Synthase	*tps3*	***otsB2***	?
2. *„Sulfolobus“*-Weg (Degradation) [Strøm und Klaasen 1993]			
Glycogenenzym	*?*	***treX***	Glycogenspaltung
Maltooligosyltrehalose-Synthase	*?*	***treY***	Synthese von Maltooligosyl-Treh.
Maltooligosyltrehalose-Trehalosesynthase	*?*	***treZ***	Abspaltung von Trehalose

Nach der *C. glutamicum*-Genomanalyse durch die Degussa-Hüls AG wurden für *C. glutamicum* Gene beider Synthesewege gefunden [Morbach, persönliche Kommunikation] – sowohl der *de novo* Synthese als auch überraschenderweise die des Degradations-Weges. In welcher Art und Weise diese Gene exprimiert werden – und ob überhaupt beide Stoffwechselwege unter allen natürlichen Bedingungen aktiviert sind, wird sich in Zukunft zeigen. Unstrittig ist jedoch, daß *C. glutamicum* Trehalose als Nebenprodukt während der L-Lysin-Fermentation synthetisiert – also einen der beiden Wege permanent nutzen muß.

7.3.2 Osmotisch aktivierte Transportproteine

1997 wurden in *C. glutamicum* erstmals Proteine gefunden, welche durch osmotischen Streß aktivierbar waren und sich in ganzen ruhenden Zellen auf den ersten Blick wie perfekte Osmometer verhielten [Peter *et al.* 1997]. Die Aufnahme der kompatiblen Solute Ectoin, Betain und Prolin wurde zunächst biochemisch charakterisiert, bevor die zugehörigen Transportproteine und deren Gene kloniert werden konnten. *Corynebacterium glutamicum* besitzt drei bekannte osmotisch aktivierte und regulierte Transportproteine welche durch die Gene ***ectP***, ***betP*** und ***proP*** kodiert werden.

Tabelle 24: Die kinetischen Eigenschaften der Soluttransporter (Quelle: Peter 1997)

System	Substrat	K_m [µmol/l]	Cosubstrat	Osmoregulation	
				Expression	Aktivität
PutP	Prolin	7,6	Na^+	konstitutiv	Nein
BetP	Betain	8,6	Na^+	Ja	Ja
ProP	Prolin	48	H^+	Ja	Ja
	Ectoin	132			
EctP	Ectoin	63			
	Betain	333	Na^+	konstitutiv	Ja
	Prolin	1200			

EctP transportiert das breiteste Substratspektrum (Ectoin, Betain und Prolin) mit der höchsten Affinität zu Ectoin im Symport mit H^+ und ist somit entweder als evolutiv ältester oder jüngster Transporter anzusehen. BetP katalysiert mit höchster Affinität und Substratspezifität die Aufnahme von Betain im Symport mit Na^+. ProP wiederum transportiert sowohl Betain als auch Prolin, wobei Prolin das bevorzugte Substrat ist. Zusätzlich kodiert *putP* für einen weiteren Prolintransporter, welcher jedoch nicht osmotisch reguliert wird und lediglich für die anabole Prolinaufnahme dient. In der folgenden Abbildung sind die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Transporter untereinander aufgeführt.

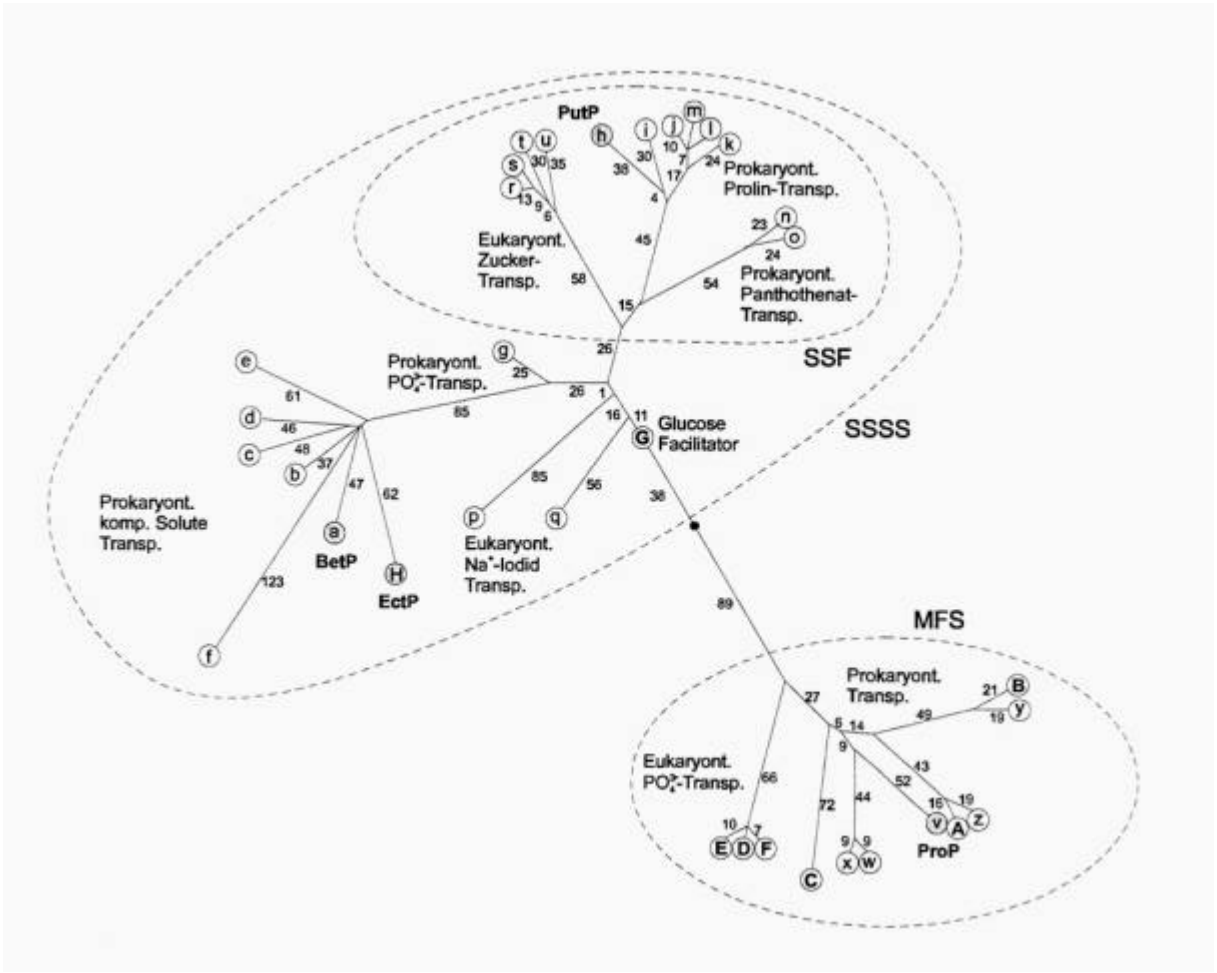


Abbildung 51: Phylogenetische Beziehungen von EctP, BetP, ProP und PutP (Quelle: Peter 1997) Die Abkürzungen bedeuten: *Sodium/Solute Symporter Superfamily* (SSSS), *Sodium/Solute Symporter Family* (SSF) und *Major Facilitator Family* (MFS). Nicht hervorgehoben ist die Familie, der BetP und EctP angehören: *Betaine/Choline/Carnitin Transporter* (BCCT)

BetP und EctP gehören als Betain-Transporter in die Subfamilie der BCCT-Familie. Zu dieser Betain/Cholin/Carnitin-Transporterfamilie gehören auch BetT aus *E. coli*, CaiT aus *E. coli* und OpuD aus *B. subtilis*. Detailliertere Beschreibungen sind in den originalen Publikationen zu finden [Peter *et al.* 1998, Wood 1999].

Bisher wurde die osmotisch regulierte Aktivierung von Transportprozessen in *C. glutamicum* lediglich enzymatisch untersucht. Ob bestimmte DNA-Regionen vergleichbar zu *tonE* oder dem *„osmotic response element*“ (ORE) in höheren Organismen [Kultz *et al.* 1999] durch osmotischen Streß stromabwärts liegende DNA-Bereiche in ihrer Transkription beeinflussen, bleibt abzuwarten – da solche regulatorisch wirkenden DNA-Bereiche auch in Prokaryoten gefunden wurden [Wood 1999].

7.4 Kaliumkonzentrationen im Cytoplasma

In den folgenden Tabellen sind die Kaliumkonzentrationen im Cytoplasma in Abhängigkeit von der Fermentationszeit und dem osmotischen Streß aufgelistet, da diese Konzentrationen nicht in den Abbildungen im Kapitel 4.4 aufgeführt sind (n.b.: nicht bestimmt).

Tabelle 25: Kaliumkonzentrationen [mmol/l] im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B bei unterschiedlichem Osmostreß in Abhängigkeit von der Fermentationszeit

Zeit [h]	**1,0 Osmol/kg**		**1,5 Osmol/kg**		**2,5 Osmol/kg**	
	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain
10	110 ± 1	96 ± 2	118 ± 9	107 ± 7	123 ± 8	137 ± 10
12	79 ± 0	76 ± 5	136 ± 14	117 ± 3	150 ± 3	150 ± 12
20	65 ± 2	65 ± 1	81 ± 8	81 ± 13	181 ± 12	117 ± 10
24	87 ± 25	126 ± 0	143 ± 2	142 ± 22	89 ± 3	89 ± 0
40	118 ± 2	101 ± 0	115 ± 3	54 ± 2	110 ± 4	88 ± 2
48	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 26: Kaliumkonzentrationen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ2 bei unterschiedlichem Osmostreß in Abhängigkeit von der Fermentationszeit

Zeit [h]	**1,0 Osmol/kg**		**1,5 Osmol/kg**		**2,5 Osmol/kg**	
	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain
10	146 ± 4	111 ± 1	113 ± 3	105 ± 6	156 ± 0	112 ± 4
12	119 ± 5	70 ± 5	167 ± 2	100 ± 6	144 ± 0	150 ± 0
20	92 ± 5	69 ± 11	90 ± 6	83 ± 18	202 ± 4	134 ± 5
24	83 ± 16	101 ± 22	139 ± 18	101 ± 0	116 ± 2	121 ± 0
40	93 ± 0	109 ± 6	87 ± 23	92 ± 9	109 ± 16	85 ± 9
48	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 27: Kaliumkonzentrationen im Cytoplasma von *C. glutamicum* MH20-22B Δ3 bei unterschiedlichem Osmostreß in Abhängigkeit von der Fermentationszeit

Zeit [h]	**1,0 Osmol/kg**		**1,5 Osmol/kg**		**2,5 Osmol/kg**	
	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain	ohne Betain	10 mM Betain
10	214 ± 3	152 ± 2	100 ± 5	155 ± 14	258 ± 24	306 ± 0
12	168 ± 5	118 ± 4	138 ± 6	140 ± 12	245 ± 12	344 ± 36
20	113 ± 9	89 ± 12	132 ± 6	125 ± 12	218 ± 22	140 ± 0
24	102 ± 23	116 ± 12	172 ± 8	176 ± 8	202 ± 12	200 ± 23
40	116 ± 0	115 ± 0	133 ± 4	134 ± 11	109 ± 7	126 ± 12
48	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

8 Literaturliste

1. **Abe, S., K. I. Takayama und S. Kinoshita** 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **13**: 279-301
2. **Abee, T., R. Palmen, K. J. Hellingwerf und W.N. Konings** 1990. Osmoregulation in *Rhodobacter sphaeroides* J. Bacteriol. **172(1)**:149-154
3. **Allansson, L. S. Khatibi, T. Gustavsson, F. Blomstrand, T. Olsson und E. Hansson** 1999. Single-cell volume estimation by three-dimensional wide field microscopy applied to astroglial primary cultures. J. Neurosci. Methods **93(1)**:1-11
4. **Ankri, S., I. Serebrijski, O. Reyes und G. Leblon** 1996. Mutations in the *C. glutamicum* Proline Biosynthetic Pathway: a Natural Bypass of the *proA* Step. J. Bacteriol. **178(15)**:4412-4419
5. **Bathe, B., J. Kalinowski, und A. Pühler** 1996. A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. Mol. Gen. Genet. **252**:255-265.
6. **Birnboim, H. C. und J. Doly** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**:1513-1537
7. **Bremer, E. und R. Krämer** 2000. Coping with Osmotic Challenges: Osmoregulation through Accumulation and Release of Compatible Solutes in Bacteria. *In*: Storz, G. und R. Hengge-Aronis (Editoren) Bacterial Stress Responses. ASM Press Washington D.C. pp.79-97
8. **Bröer, S., L. Eggeling, und R. Krämer** 1993. Strains of *Corynebacterium glutamicum* with Different Lysine Productivities May Have Different Lysine Excretion Systems. Appl. Environ. Microbiol. **59**:316-321
9. **Brown, G. R., I. C. Sutcliff, D. Bendell und S. P. Cummings** 2000. The modification of the membranes of *Oceanomonas baumannii* when subjected to both osmotic and organic solvent stress. FEMS Microbiol. Lett. **189**:149-154
10. **Burg, M. B.** 1995. Molecular basis of osmotic regulation. Am. J. Physiol. **268(6Pt2)**:F983-996
11. **Burg, M. B., E. D. Kwon, und D. Kültz** 1997. Regulation of Gene Expression by Hypertonicity. Ann. Rev. Physiol. **59**:437-455
12. **Calamita, G., W.R. Bishai, G. M. Preston, W.B. Guggino und P. Agre** 1995. Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli.* J. Biol. Chem. **270**: 29063-29066
13. **Canovas, D., C. Vargas, L. N. Csonka, A. Ventosa, und J. J. Nieto** 1996. Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. J. Bacteriol. **178**:7221-7226
14. **Cayley, D. S., H. J. Guttman, und M. T. Record, Jr.** 2000. Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. Biophys. J. **78**:1748-1764

15. **Cayley, S., B. A. Lewis und T. M. Record Jr.** 1992. Origins of the osmoprotective Properties of Betaine and Proline in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **174**:1586-1595

16. **Chamberlin, M. E., und K. Strange** 1989. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. Am. J. Physiol. **257**:C159-C173

17. **Chatterjee, M. und S. P. Chatterjee** 1997. Microbial production of L-Lysine: A Review. Hind. Antibiot. Bull. **39**:20-49

18. **Chrispeels, M.J. und P. Agre** 1994. Aquaporins: Water channel proteins of plant and animal cells. Trends Biochem. Sci. **19**: 421-425

19. **Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. PNAS **86**:2172-2175

20. **Courtenay E. S., M. W. Capp, C. F. Anderson, M. T. Record Jr..** 2000. Vapor Pressure Osmometry Studies of Osmolyte-Protein Interactions: Implications for the Action of Osmoprotectants in vivo and for the Interpretation of "Osmotic Stress" Experiments in vitro. Biochemistry. **39(15)**: 4455-4471

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

22. **Csonka, L. N., und W. Epstein** 1996. Osmoregulation. *In* Neidhardt *et al.* (Editoren), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (vol.2). ASM Press Washington D.C., pp.1210-1223

23. **Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmid und E. P. Bakker** 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. Arch. Microbiol. **150**: 348-357

24. **Eggeling, L.** 1994. Biology of L-Lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. Amino Acids. **6**:261-272

25. **Eggeling, L., und H. Sahm** 1999. L-Glutamate and L-Lysine: traditional products with impetous developments. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**:146-153

26. **Farinas, J. V. Simanek und A. S. Verkman** 1995. Cell volume measurement by total internal reflection microfluorimetry: application to water and solute transport in cells transfected with water channel homologs. Biophys. J. **68(4)**:1613-1620

27. **Farwick, M., R. M. Siewe, und R. Krämer** 1995. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **177**:4690-4695

28. **Förster, C., S. Marienfeld, V. F. Wendisch und R. Krämer** 1998. Adaptation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* to hyperosmotic stress: different osmoresponse to NaCl an mannitol stress. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:219-226

29. **Frackman, S. G. Kobs, D. Simpson und D. Storts** 1998. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *In*: Promega Notes **65**:27-29

30. **Frings, E., J. Kunte, und E. Galinski** 1993. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. FEMS Microbiol. Lett. **109**:25-32

31. **Fulda, S., S. Mikkat, W. Schröder, und M. Hagemann** 1999. Isolation of salt-induced periplasmic proteins from *Synechocystis sp*. strain PCC 6803. Arch. Microbiol. **171**:214-217

32. **Galinski, E.A. und H.G. Trüper** 1994. Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. **15**: 95-108

33. **Ginzburg, M., und B. Z. Ginzburg** 1976. Regulation of cell volume and ion concentrations in a *Halobacterium*. J. Membr. Biol. **26**:153-171

34. **Gouffi, K., V. Pichereau, J. P. Rolland, D. Thomas, T. Bernard, und C. Blanco** 1998. Sucrose is a nonaccumulated osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti.* J. Bacteriol. **180**:5044-5051

35. **Grant, S.G.N., J. Jessee, F. R. Bloom und D. Hanahan** 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **166**: 253-259

36. **Guillot, A. D. Obis und M.-Y. Mistou** 2000. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. Int. J. Food Microbiol. **55**:47-51

37. **Guillouet, S., und J. M. Engasser** 1995. Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure - influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**:496-500

38. **Guillouet, S., und J. M. Engasser** 1996. Kinetics of volume variation of *Corynebacterium glutamicum* following saline osmotic upshifts. Biotechnol. Lett. **18**:145-148

39. **Heide v. d., T. und B. Poolman** 2000. Glycine Betaine Transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. J. Bacteriol. **182(1)**:203-206

40. **Hempel, C., R. W. Erb, W.-D. Deckwer, V. Hecht** 1998. Plasmid stability of recombinant *Pseudomonas sp*. B13 FR1 pFRC20P in continuous culture. Biotechnol. Bioeng. **57(1)**:62-70

41. **Hirao, T., T. Nakano, T. Azuma, M. Sugimoto, und T. Nakanishi** 1989. L-Lysine production in continuous culture of an L-Lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**:269-273

42. **Hodgson, J.** 1994. Bulk Amino-Acid Fermentation: Technology and Commodity Trading. Bio/Technology. **12**:152-15

43. **Hohmann, S., R. M. Bill, G. Kayingo und B. A. Prior** 2000. Microbial MIP channels. Trends Microbiol. **8(1)**:33-38

44. **Ikeda, M. und R. Katsumata** 1999. Hyperproducing of tryptophan *by Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. Appl. Environ. Microbiol. **86(6)**:2497-2502

45. **Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene **96**: 23-28

46. **Jetten, M. S., M. T. Follettie, und A. J. Sinskey** 1995. Effect of different levels of aspartokinase on the lysine production by *Corynebacterium lactofermentum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**:76-82

47. **Kase, H. und K. Nakayama** 1972. L-Isoleucine production by analog-resistant mutants derived from threonine producing *Corynebacterium glutamicum*. Agric. Biol. Chem. **41**:109-116

48. **Kawahara, Y., T. Oshumi, Y. Yoshihara, und S. Ikeda** 1989. Proline in the Osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. **53**:2475-2479

49. **Kawahara, Y., Y. Yoshihara, S. Ikeda, H. Yoshii, und Y. Hirose** 1990a. Stimulatory effect of glycine betaine on L-Lysine fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34**:87-90

50. **Kawahara, Y., Y. Yoshihara, S. Ikeda, und Y. Hirose** 1990b. Effect of glycine betaine, an osmoprotective compound on the growth of *Brevibacterium lactofermentum* Appl. Microbiol. Biotechnol. **33**:574-577

51. **Keilhauer, C., L. Eggeling und H. Sahm** 1993. Isoleucine in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. J. Bacteriol. **175**:5595-5603

52. **Kelle, R., B. Laufer, C. Brunzema, D. Weusterbotz, R. Krämer, und C. Wandrey** 1996. Reaction Engineering Analysis of L-Lysine Transport by *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol. Bioeng. **51**:40-50

53. **Kempf, B., und E. Bremer** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch. Microbiol. **170**:319-330

54. **Kinoshita, S., S. Udaka, und M. Shimono** 1957. Studies on the amino acid fermentation. Part I Production of L-Glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. **3**:193-205

55. **Kiss, R. D., und G. Stephanopoulos** 1992. Metabolic Characterization of a L-Lysine-Producing Strain by Continuous Culture. Biotechnol. Bioeng. **39**:565-574

56. **Koizumi, S., Y. Yonetani, A. Maruyama und S. Teshiba** 2000. Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **53**:674-679

57. **Koo, S.P., C.F. Higgins und I.R Booth** 1991. Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium* - Evidence for a glycine betaine efflux system. J. Gen. Microbiol. **137**: 2617-1625

58. **Korchev, J. E., J. Gorlik, M. J. Lab, E. V. Sviderskaya und C. L. Johnston** 2000. Cell volume measurement using scanning ion conductance microscopy. Biophys. J. **78**:451-457

59. **Krämer, R.** 1994. Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. FEMS Microbiol. Rev. **13**:75-94

60. **Krämer, R.** 1996. Genetic and physiological approaches for the production of amino acids [Review]. J. Biotechnol. **45**:1-21

61. **Krämer, R., E. Boles, L. Eggeling, A. Erdmann, M. Gutmann, W. Kronemeyer, F. Palmieri, und S. Zittrich** 1994. Mechanism and energetics of amino-acid transport in coryneform bacteria. Biochim. Biophys. Acta. **1187**:245-249

62. **Kultz, D., und L. Csonka** 1999. What sets the TonE during osmotic stress? PNAS. **96**:1814-1816

63. **Lang, F., G. L. Busch, und H. Volkl** 1998. The diversity of volume regulatory mechanisms. Cell Physiol. Biochem. **8**:1-45

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

65. **Lechene, C.** 1985. Cellular volume and cytoplasmic gel. Biol. Cell. **55**:177-80

66. **Leclercq, B.** 1998. Lysine: Specific effects of lysine on broiler production: comparison with threonine and valine. Poult. Sci. **77(1)**:118-123

67. **Lee, H.-W., J.-G. Pan, und J.-M. Lebeault** 1995. Characterization of kinetic parameters and metabolic transition of *Corynebacterium glutamicum* on L-lysine production in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43:**1019-1027

68. **Leuchtenberger, W.** 1996. Amino acids – technical production and use. *In*: Rehm, H. und G. Reed (Editoren). Products of primary metabolism. Biotechnology (vol.6). VCH Weinheim, pp.455-502

69. **Liebl, W.** 1992. The Genus *Corynebacterium* - Nonmedical. *In*: Balows, A., H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K-H. Schleifer (Editoren) The Prokaryotes (vol.2). Springer Verlag New York, pp.1157-1171

70. **Liebl, W., A. Bayerl, W. Ludwig, und K. H. Schleifer** 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. **65**:299-304

71. **Lindenroth, P. und K. Mopper** 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. Anal. Chem. **51**:1667-1674

72. **Luong, J.H.T.** 1987. Generalization of Monod Kinetics for Analysis of Growth Data with Substrate Inhibition. Biotechnol. Bioeng. **29**: 242-247

73. **Marin, K., E. Zuther, T. Kerstan, A. Kunert, und M. Hagemann** 1998. The *ggpS* gene from *Synechocystis sp*. strain PCC 6803 encoding glucosyl- glycerol-phosphate synthase is involved in osmolyte synthesis. J. Bacteriol. **180:**4843-4849

74. **Martinac, B.** 1993. Mechanosensitive ion channels: Biophysics and physiology. *In*: M. B. Jackson (Editor) Thermodynamics of membrane receptors and channels. CRC Press Boca Raton, pp327-352

75. **Meury, J.** 1988. Glycine betaine reverses the effect of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli.* Arch. Microbiol. **149**:232-239

76. **Milner, K. J. und J. M. Wood** 1996. Osmoadaptation in rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **50**:101-136

77. **Möckel, B., Kalinowski, J. Bathe, B. Weißendorn, A. A. Pühler und W. Pfefferle** 1999. Whole genome sequencing of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *In*: Tagungsband DECHEMA 1999 Wiesbaden (Band I). p.88

78. **Morbach, S., H. Sahm und L. Eggeling** 1996. L-Isoleucine production with *C. glutamicum*: Further flux increase and limitation of export. Appl. Environ. Microbiol. **62**:4354-4351

79. **Mullis, K, Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **51(Pt1)**:263-273

80. **Nottebrock, D.** 2000. Mechanosensitive Kanäle in *Corynebacterium glutamicum*. **Diplomarbeit**, Universität zu Köln

81. **Ölz, R., K. Larsson, L. Adler und L. Gustafsson** 1993. Energy Flux and Osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in Chemostats under NaCl stress. J. Bacteriol. **175(8)**:2205-2213

82. **O'Neill, W. C.** 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. Am. J. Physiol. **276**:C995-C1011

83. **Park, S. M., A. J. Sinskey, und G. Stephanopoulos** 1997. Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. Biotechnol. Bioeng. **55**:864-879

84. **Parsegian, V. A., R. P. Rand und D. C. Rau** 2000. Osmotic stress, crowding, preferential hydration and binding: A comparison of perspectives. PNAS. **97(8)**:3987-3992

85. **Peter, H.** 1997. Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen bei *Corynebacterium glutamicum.* **Dissertation**, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

86. **Peter, H., A. Bader, A. Burkovski, C. Lambert und R. Krämer** 1997. Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low affinity uptake system for compatible solutes. Arch. Microbiol. **168**:143-151

87. **Peter, H., A. Burkovski und R. Krämer** 1996. Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. J. Bacteriol. **178**: 5229-5234

88. **Peter, H., B. Weil, A. Burkovski, R. Krämer, und S. Morbach** 1998. *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. J. Bacteriol. **180:**6005-6012

89. **Pfeuffer, J., U. Flogel, und D. Leibfritz** 1998. Monitoring of cell volume and water exchange time in perfused cells by diffusion-weighted 1H NMR spectroscopy. NMR Biomed. **11**:11-18

90. **Poolman, B., und E. Glaasker** 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. Mol. Microbiol. **29**:397-407

91. **Pourkomailian und Booth** 1994. Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for feedback regulation of the activity of the two transport systems. Microbiology. **140(Pt11)**:3131-3138

92. **Proctor L. M., R. Lai und R. P. Gunsalus** 1997. The methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila* TM-1 possesses a high-affinity glycine betaine transporter involved in osmotic adaptation. Appl. Environ. Microbiol **63(6)**:2232-2257

93. **Qu, Y., C. L. Bolen und D. W. Bolen** 1998. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. PNAS **95**:9268-9273

94. **Record, M. T. Jr., E. S. Courtenay, D. S. Cayley, und H. J. Guttman** 1998a. Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. Trends Biochem. Sci. **23**:143-148

95. **Record, M. T. Jr., W. Zhang und C. F. Anderson** 1998b. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects and osmotic effects of salts. Adv. Protein Chem. **51**:281-353

96. **Rottenberg, H.** 1979. The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles, and vesicles Meth. Enzymol. **LV**:547-569

97. **Rübenhagen, R., H. Rönsch, H. Jung, R. Krämer, und S. Morbach** 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. J. Biol. Chem. **275**:735-741

98. **Ruffert, S.** 1998. Funktion und Regulation mechanosensitiver Efflux-Systeme für kompatible Solute in *Corynebacterium glutamicum*. **Dissertation**, Universität zu Köln

99. **Ruffert, S., C. Berrier, R. Krämer, und A. Ghazi** 1999. Identification of mechanosensitive ion channels in the cytoplasmic membrane of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **181**:1673-1676

100. **Ruffert, S., C. Lambert, H. Peter, V. F. Wendisch, und R. Krämer** 1997. Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. Europ. J. Biochem. **247**:572-580

101. **Saiki, R.K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239(4839):487-491

102. **Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2^{nd} ed.). Cold Spring Habor Laboratory Press New York, USA

103. **Schäfer, A., A. Schwarzer, J. Kalinowski, und A. Pühler** 1994. Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress- sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli.* J. Bacteriol. **176**:7309-7319

104. **Schlegel, H. G,** 1992. Allgemeine Mikrobiologie (7., überarb. Aufl.). Georg Thieme Verlag Stuttgart. p.102

105. **Schoberth, S. M., N. K. Bar, R. Krämer und J. Karger** 2000. Pulsed high-field gradient in vivo NMR spectroscopy to measure diffusional water permeability in *Corynebacterium glutamicum*. Anal. Biochem. **279(1)**:100-105

106. **Schrumpf, B., A. Schwarzer, J. Kalinowski, A. Pühler, L. Eggeling, und H. Sahm** 1991. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **173**:4510-516

107. **Schrumpf, B., Eggeling, L. und H. Sahm** 1992 Isolation and prominent characteristics of an L-Lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**:566-571

108. **Schuster, R.** 1988. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. J. Chrom. **431(2)**: 271-284

109. **Shabala, S. O. Barbourina und I. Newman** 2000. Ion-specific mechanisms of osmoregulation in bean mesophyll cells. J. Experim. Bot. **51(348)**:1243-1253

110. **Shehata, T. E., und E. S. Kempner** 1977. Growth and cell volume of *Euglena gracilis* in different media. Appl. Environ. Microbiol. **33**:874-877

111. **Simon, R., U. Priefer und A. Pühler** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. **1**:784-791

112. **Skjerdal, O. T., H. Sletta, S. G. Flenstad, K. D. Josefsen, D. W. Levine, und T. E. Ellingsen** 1995. Changes in cell volume, growth and respiration rate in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43:**1099-1106

113. **Smith, G. M., L.T. Smith, P.N.M. Gerhardt und R. Ko** 1998. Solute transport enzymes related to stress tolerance in *Listeria monocytogenes*: a review. J. Food Biochem. **22**:269-285

114. **Srinivas, S. P. und J. A. Bonanno** 1997. Measurement of changes in cell volume based on fluorescent quenching. Am. J. Physiol. **272(4Pt1)**:C1405-1414

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

116. **Strand, A., V. Hurry, S. Henkes, N. Huner, P. Gustafsson, P. Gardestrom, und M. Stitt** 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. Plant Physiol. **119**:1387-1398

117. **Strøm, A. R. und I. Klaasen** 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol. Microbiol. **8(2)**:205-210

118. **Susenbeth, A.** 1995. Factors affecting lysine utilization in growing pigs: an analysis of literature data. Live. Prod. Sci. **43**:193-204

119. **Vieira, J. und J. Messing** 1982. The pUC plasmids, an Ml3mp7 - derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**: 259-268

120. **Welsh, D. T., R. Guyoneaud und P. Caumette** 1998. Utilization of the compatible solutes sucrose and trehalose by purple sulfur and nonsulfur bacteria. Can. J. Microbiol. **44**:974-979

121. **Weusterbotz, D., R. Kelle, M. Frantzen, und C. Wandrey** 1997. Substrate controlled fed-batch production of L-Lysine with *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol. Progress. **13**:387-393

122. **Whatley, S., und B. Hill** 1979. The relationship between RNA content, cell volume and growth in ageing human embryonic mesenchymal cells. Cell. Biol. Int. Rep. **3**:671-683

123. **Whatmore, A. M., und R. H. Reed** 1990. Determination of turgor pressure in Bacillus subtilis: a possible role for K+ in turgor regulation. J. Gen. Microbiol. **136**:2521-2526

124. **Wiggins, P. M.** Role of Water in Some Biological Processes 1990. Microbiol. Rev. **54(4)**:432-449

125. **Winkler, H. H., und T. H. Wilson** 1966. The role of energy coupling in the transport of beta-galactosides by *Escherichia coli.* J. Biol. Chem. **241**:2200-2211

126. **Woldringh, C. L., P. G. Huls, und N. O. Vischer** 1993. Volume growth of daughter and parent cells during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* a/alpha as determined by image cytometry. J. Bacteriol. **175**:3174-3181

127. **Wood, M. J.** 1999. Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**:230-262

128. **Wood, M. J., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Krämer,. B. Poolman, T. v. d. Heide und L. T. Smith** 2000. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. (in Vorbereitung)

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

130. **Zeng, A. P.** 1999. Continuous Culture. *In*: Demain, A. L. und J. E. Davies (Editoren). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (2nd ed.), ASM Press Washington D.C., pp.151-164

131. **Zimmermann, J., H. Voss, C. Schwager, J. Stegemann, H. Erfle, K. Stucky, T. Kristensen, und W. Ansorge** 1990. A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. Nucleic Acids Res. **18**:1067

132. **Zoratti M. und V. Petronilli** 1988. Ion-conducting channels in a Gram-positive bacterium. FEBS Lett. **240**:105-109

Statistik der zitierten Literatur

2000 (**15**); 1999 (**11**); 1998 (**17**); 1997 (**9**); 1996 (**11**); 1995 (**9**); vor 1995 (**60**)

DANKSAGUNGEN

Danksagungen sind eine delikate Angelegenheit – aber zum Glück etwas ganz Persönliches.

Besonderer Dank gilt meinen engen Freunden aus Wallhausen sowie aus der Studienzeit in Braunschweig und Edinburgh. Die haben zwar primär nichts mit meiner Doktorarbeit zu tun, jedoch waren gerade diese Fremdlinge – biotechnisch gesehen – immer ausgezeichnete Zuhörer, selbst wenn es um Corynebakterien ging.

Am Institut für Biochemie gebührt meine Hochachtung all den Helfern, ohne die ein ordentlicher Forschungsbetrieb nicht zu denken wäre. Stellvertretend für die technischen Mitarbeiter waren Frau Sitek oder Herr Wersch stets zur Stelle, wenn einmal eilig autoklaviert werden mußte und repäsentativ für die Werkstätten waren Herr Pyschny, Herr Khamis und Herr Pillunat über alle Maßen schnell, wenn (was häufig vorkam) ein technisches Problem im Biotechnikum gelöst werden mußte. Ohne die freundliche Begrüßung durch den Institutspförtner Herrn Schmitz und ohne das Lächeln von Frau Benová wäre die Arbeit auch nur halb so schnell vorangegangen. Vielen Dank für die Unterstützung!

Stellvertretend für die „erste“ und die „dritte“ Laborwelt danke ich Dr. Massow und Dr. Burkovski, die zusammen mit Ihren Arbeitsgruppen stets bereits waren, chemische oder molekularbiologische Probleme interdisziplinär bei den Hörnern zu packen.

Corpsstudenten sind zwar keine aus ihnen geworden, aber in fröhlichen wie auch in anstrengenden Zeiten zogen wir an einem Strang, um die Millionen-Dollar-Frage zu beantworten! Dafür danke ich den Kollegen „meiner“ Osmogruppe! Ungewöhnlich war die Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ruffert und Frau Dr. Förster, aber die häufigen Diskussionen vermittelten mir einen ordentlichen Schatz an osmotisch wirksamen Wissen. René Rübenhagen, Udo Burger, Ralf Steger und Andreas Wolf danke ich für Ihre kritischen Anmerkungen zur ersten Version der Dissertation und natürlich für die zahllosen Dispute, welche wissenschaftlich unschätzbar bleiben. Frau Dr. Morbach als Chefin *de luxe* danke ich besonders, denn mit Ihrer Geduld entschärfte sie so manches molekularbiologische Problem, welches bereits unlösbar schien und schaffte stets eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Danke!

Ohne die moralische, finanzielle und tatkräftige Unterstützung meiner Familie – insbesondere meiner Eltern und vor allem Jocelyn – wäre es nur beschwerlich möglich gewesen, die Doktorarbeit im geplanten Zeitraum zufriedenstellend anzufertigen. Herzlichen Dank!

Professor Dr. Krämer danke ich aufrichtig für eine außerordentlich interessante Aufgabe und das mir entgegengebrachte Vertrauen, die überaus konstruktive Zusammenarbeit und die vielen, unschätzbaren Ratschläge in Bezug auf Wissenschaft und Forschung!

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und diejenigen Stellen der Arbeit (einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen), welche anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen; sie wurde – abgesehen von den unten aufgeführten Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht und eine solche Veröffentlichung wird vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vorgenommen werden.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von Professor Dr. R. Krämer betreut.

Köln, den 9. November 2000

Hendrik Rönsch

TEILPUBLIKATIONEN

Rübenhagen, R., H. Rönsch, H. Jung, R. Krämer, und S. Morbach 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. J. Biol. Chem. **(275):**735-41

Rönsch, H., R. Krämer, und S. Morbach 2001. Osmoresponsive volume regulation in the L-Lysine producer *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. (in Vorbereitung)

Rönsch, H., R. Krämer, und S. Morbach 2001. Effect of the compatible solute glycine betaine on cytoplasmic proline concentrations in the L-Lysine producer *Corynebacterium glutamicum*. (in Vorbereitung)

LEBENSLAUF

Geboren am:	**5. Juli 1972 in Sondershausen**

Mitgliedschaften	seit 1994 Corps Teutonia-Hercynia zu Braunschweig seit 1998 DECHEMA e.V.
Juli 1991	**Allgemeine Hochschulreife** am INSTITUT ZUR VORBEREITUNG AUF DAS AUSLANDSSTUDIUM (IVA) in Halle/Saale
September 1994	**Vordiplom** in Biotechnologie an der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT in Braunschweig
Oktober 1995	**Master of Science (MSc) in Biotechnology** an der HERIOT-WATT UNIVERSITY in Edinburgh, Schottland
Oktober 1997	**Diplom** in Biotechnologie an der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT in Braunschweig
Januar 2000	**Betriebswirtschaftslehre** für Naturwissenschaftler an der UNIVERSITÄT KÖLN
November 2000	**Promotion** am Institut für Biochemie der UNIVERSITÄT KÖLN am Lehrstuhl von Prof. Dr. Krämer in Kooperation mit der DEGUSSA-HÜLS AG, Bereich Futtermitteladditive