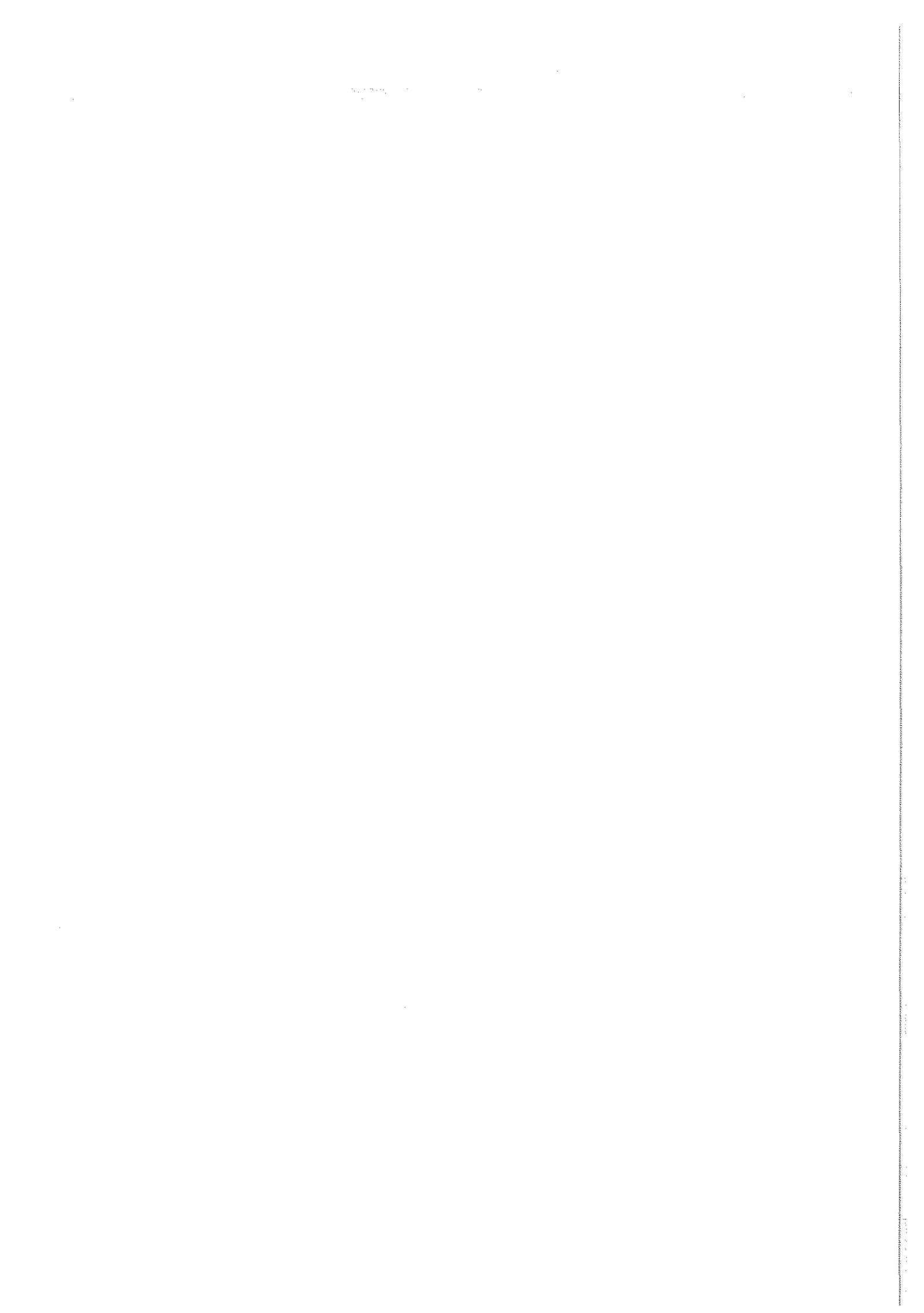
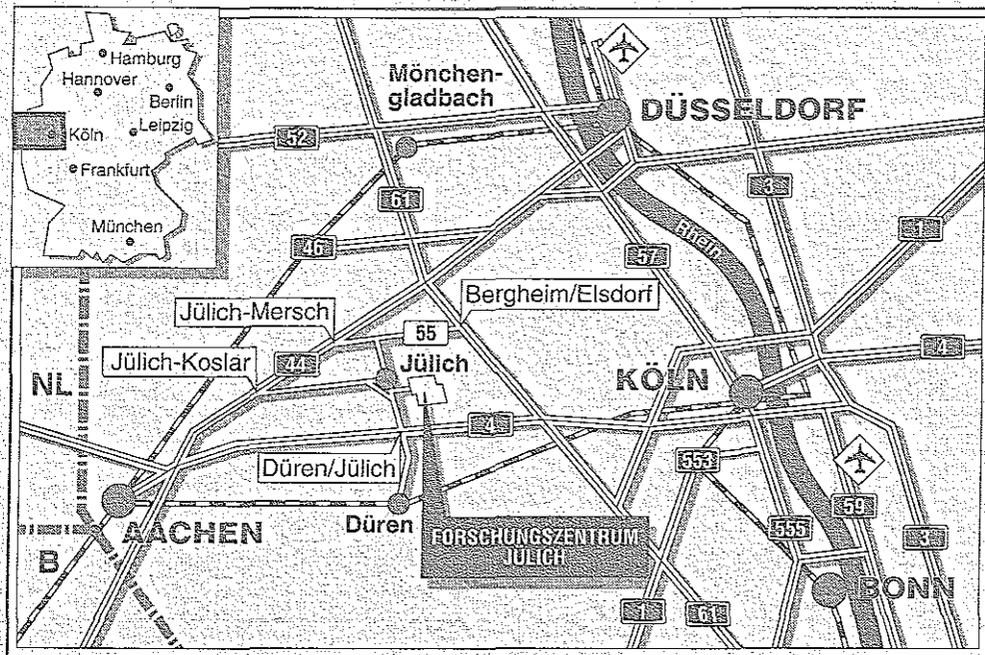


*Institut für Biotechnologie*

**Kernresonanzspektroskopische  
Untersuchungen zur  
Ethanolinhibierung und  
Nebenproduktbildung  
bei *Zymomonas mobilis***

Joachim Strohhäcker





**Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2936**

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-2936

D 21 (Diss. Universität Tübingen)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon : 024 61/61 - 61 02 · Telefax : 024 61/61 - 61 03 · Telex : 833 556-70 kfa d

1000  
900  
800  
700  
600  
500  
400  
300  
200  
100  
0

1000  
900  
800  
700  
600  
500  
400  
300  
200  
100  
0

1000  
900  
800  
700  
600  
500  
400  
300  
200  
100  
0

1000  
900  
800  
700  
600  
500  
400  
300  
200  
100  
0

1000  
900  
800  
700  
600  
500  
400  
300  
200  
100  
0

1000  
900  
800  
700  
600  
500  
400  
300  
200  
100  
0

**Kernresonanzspektroskopische  
Untersuchungen zur  
Ethanolinhibierung und  
Nebenproduktbildung  
bei *Zymomonas mobilis***

Joachim Strohäcker

Handwritten text, possibly a signature or a set of initials, located in the center of the page.

Handwritten text at the bottom of the page, appearing to be a list or a set of notes.

# INHALT

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Chemikalien und Enzyme	9
2.2	Organismen	9
2.3	Nährmedien und Kultivierung	9
2.4	Bestimmung des Bakterienwachstums	11
2.5	NMR-Messungen	12
2.5.1	<i>in-vivo</i> -NMR-Spektroskopie	12
2.5.2	<sup>31</sup> P-NMR-Spektroskopie von Perchlorsäure-Extrakten	13
2.5.3	Bestimmung von <sup>13</sup> C-Anreicherungen	14
2.6	Bestimmung von Enzymaktivitäten	15
2.6.1	Herstellung von zellfreiem Rohextrakt	15
2.6.2	Photometrische Enzymtests	15
2.6.3	NMR-spektroskopische Enzymtests	18
2.6.4	Proteinbestimmung	19
2.7	Bestimmung des Cytoplasmavolumens	19
2.8	Quantitative Bestimmung von Substraten und Produkten	20
2.8.1	Bestimmung mittels enzymatischer Methoden	20
2.8.2	Bestimmung mittels Gaschromatographie	23
2.8.3	Bestimmung mittels HPLC	23

3.	ERGEBNISSE	24
3.1	Der Glucose-Stoffwechsel in <i>Z. mobilis</i>	24
3.1.1	<i>In-vivo</i> - <sup>31</sup> P-NMR-Messungen	24
3.1.2	<i>In-vitro</i> - <sup>31</sup> P-NMR-Messungen	31
3.1.2.1	Identifizierung und Quantifizierung der Signale von Extraktspektren	31
3.1.2.2	Bestimmung intrazellulärer Metabolit- konzentrationen nach einem Glucosepuls	38
3.2	Der Einfluß von Ethanol auf den Glucose-Stoffwechsel in <i>Z. mobilis</i>	42
3.2.1	<i>In-vivo</i> -NMR-Spektroskopie von <i>Z. mobilis</i> -Suspensionen in Gegenwart von Ethanol	42
3.2.2	<sup>31</sup> P-NMR-Spektroskopie von Perchlorsäure-Extrakten	44
3.2.3	Einfluß von Ethanol auf die spezifischen Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase und Enolase	47
3.3	Die Nebenproduktbildung in <i>Z. mobilis</i>	48
3.3.1	Der Einfluß von Substrat und Wachstumsbedingungen auf die Nebenproduktbildung	48
3.3.2	Die Biosynthese der Nebenprodukte	56
3.3.2.1	Fermentationen mit <sup>13</sup> C-angereicherten Zuckern	56
3.3.2.2	Enzymatische Untersuchungen zur Nebenproduktbildung	60
4.	DISKUSSION	66
5.	ZUSAMMENFASSUNG	79
6.	LITERATUR	81
7.	ANHANG	87

## Abkürzungen

AMP, ADP, ATP	Adenosinmono(di, tri)phosphat
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconsäure
l	Liter
m	Meter
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute(n)
NAD(P)/H	Nicotinamidadeninucleotid(Phosphat) oxidiert/reduziert
NMP, NDP, NTP	Nukleosidmono(di, tri)phosphat
OD	Optische Dichte
ppm	parts per million
s	Sekunde(n)
TEA	Triethanolamin
TEP	Triethylphosphat
TG	Trockengewicht
U	Unit
UMP, UDP, UTP	Uridinmono(di, tri)phosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions.

2. It also covers the various methods used to collect and analyze data.

3. The next section describes the different types of data that can be collected.

4. This is followed by a discussion of the various statistical techniques used to analyze the data.

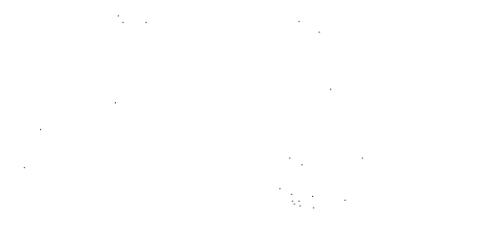
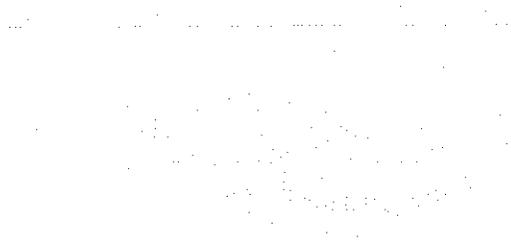
5. The final part of the document discusses the importance of interpreting the results of the analysis.

6. It also covers the various methods used to present the results of the analysis.

7. The document concludes with a summary of the key findings and a discussion of the implications of the results.

8. It also covers the various methods used to present the results of the analysis.

9. The document concludes with a summary of the key findings and a discussion of the implications of the results.



## 1. EINLEITUNG

Die Herstellung alkoholischer Getränke wie Bier und Wein ist ein seit Jahrtausenden genutztes biotechnologisches Verfahren. Die alkoholischen Gärungen erfolgten meist mit Hilfe von Hefen wie *Saccharomyces*-, *Torula*- oder *Kluyveromyces*-Arten (Phaff, 1984). In den letzten Jahren nahm das Interesse an der fermentativen Ethanolproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen zu (Lynd et al., 1991). Dabei gewann die Fermentation mit Bakterien, insbesondere mit dem Bakterium *Zymomonas mobilis*, zunehmend Aufmerksamkeit (Esser und Karsch, 1984; Rogers et al., 1982). Es zeigte sich, daß *Z. mobilis* gegenüber der Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* mehrere Vorteile im Hinblick auf eine effektive Ethanolproduktion aufweist (Bringer et al., 1984a):

die Ethanolproduktionsgeschwindigkeit (g/g·h) ist etwa 5 mal schneller

die Wachstumsrate (1/h) ist ungefähr doppelt so hoch

die Ethanolausbeute beträgt 95% der Theorie gegenüber 90% bei der Hefe.

Außerdem vereinfacht sich die Produktion mit *Z. mobilis*, da nicht wie bei Hefen zwei Prozeßphasen (aerobe Wachstumsphase und anaerobe Produktionsphase) gesteuert werden müssen.

Barker und Hillier isolierten *Zymomonas mobilis* erstmals 1911 in England aus Most, der durch einen hohen Zuckergehalt in Fehlgärung übergegangen war. 1924 isolierte Lindner *Z. mobilis* in Mexiko aus gärendem Agavensaft (Pulque). *Z. mobilis* ist in tropischen Ländern Amerikas, Asiens und Afrikas an der Gärung von zuckerhaltigen Pflanzensäften wie z.B. Palmwein beteiligt. In den 50er Jahren wurde *Z. mobilis* auch als Kontamination beim Bierbrauen erkannt (Swings und de Ley, 1977).

*Z. mobilis* ist ein stäbchenförmiges gramnegatives Bakterium mit einer Länge von 2 bis 6 µm und einem Durchmesser von 1 bis 1.4 µm. Die Zellen hängen oft paarweise zusammen und sind polar begeißelt. Sporenbildung oder Dauerstadien wurden nicht gefunden (Swings und de Ley, 1977).

Entsprechend seinem Vorkommen in Pflanzensäften zeichnet sich *Z. mobilis* durch eine hohe Zuckertoleranz aus (Swings und de Ley, 1977; Struch, 1992). Das Bakterium kann in Gegenwart von Glucosekonzentrationen bis zu 40% wachsen. Diese Toleranz beruht nach Struch et al. (1991) auf einer sehr schnellen Glucoseaufnahme mittels erleichterter Diffusion. So können in Batchfermentationen hohe Glucosekonzentrationen schnell und effizient zu Ethanol und CO<sub>2</sub> umgesetzt werden. Außer Glucose werden noch Fructose und Saccharose verwertet.

Während die meisten Bakterien bei Ethanolkonzentrationen von 1 bis 2% im Wachstum gehemmt werden, hat *Z. mobilis* eine ungewöhnlich hohe Ethanoltoleranz. So können in Batchfermentationen bis zu 13% Ethanol gebildet werden (Rogers et al., 1982). *Z. mobilis* setzt die Zucker anaerob über den Entner-Doudoroff-Weg sowie die Enzyme Pyruvat-Decarboxylase und Alkohol-Dehydrogenase um (Gibbs und DeMoss, 1954; Kinoshita et al., 1985; Neale et al., 1986; Bringer-Meyer et al., 1986). Es ist bislang kein weiteres Bakterium bekannt, das den Entner-Doudoroff-Weg anaerob nutzt (Conway, 1992). Die Energieausbeute beträgt nur 1 mol ATP pro mol Glucose und bedingt den geringen Zellertrag von 3 bis 7 g Zelltrockenmasse pro mol Glucose (Rogers et al., 1982). Eine Energiekonservierung unter aeroben Bedingungen mittels oxidativer Phosphorylierung wurde von Kalnenieks et al. (1993) nachgewiesen. Doch zeigte *Z. mobilis* unter aeroben Bedingungen nur ein geringes Wachstum (Belaich und Senez, 1965), da dann Acetaldehyd zu inhibierenden Konzentrationen akkumulierte (Bringer et al., 1984b).

Trotz der hohen Ethanoltoleranz sinken Wachstumsrate und spezifische Ethanolbildungsrate, wenn Ethanol im Laufe einer Fermentation akkumuliert (Rogers et al., 1982; Osman et al., 1987).

Verschiedene Mechanismen der Ethanolhemmung in Mikroorganismen sind bekannt. In *E. coli* wird das Wachstum schon bei geringen Ethanolkonzentrationen gehemmt durch:

- Störung der Peptidoglykan-Synthese
- unspezifische Herabsetzung der RNA-, DNA- und Proteinbildungsrate
- Störung der Zellteilung.

Weiterhin wurde eine reversible Hemmung der Transportproteine durch Ethanol in *E. coli* gezeigt und eine in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration veränderte Fettsäure-Zusammensetzung der Membranlipide (Ingram und Buttke, 1984).

Als Ursachen der Wachstumsinhibierung in *Z. mobilis* wurden Energiemangel, Inhibierung anaboler Reaktionen und Kofaktorverlust durch Permeabilisierung der Membran diskutiert. Ingram (1986) postulierte, daß Ethanol über eine Permeabilisierung der Membran zum Verlust von Metaboliten führe. In darauf folgenden Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, daß der Kofaktorverlust nur eine geringfügige Rolle spielt (Osman et al., 1987). Vielmehr belegen mehrere Untersuchungen, daß die Membranstruktur von *Z. mobilis* an hohe Ethanolkonzentrationen angepaßt ist. So wurde bei steigenden Ethanolkonzentrationen keine Änderung der Fettsäure-Zusammensetzung beobachtet, die Phospholipidfraktion enthielt konstant 70% cis-Vaccensäurereste (Carey und Ingram, 1983). Außerdem sind in die Membran Hopanoide integriert. Diese pentazyklischen Triterpenoide stabilisieren ähnlich wie die Steroide bei Hefen die Membran. Der

Hopanoidgehalt ist über einen weiten Bereich von Ethanolkonzentrationen konstant und verringert somit die passive Permeabilität der Membran (Hermans et al., 1991).

Bringer-Meyer und Sahm (1988a) konnten zeigen, daß durch Ethanol eher das Wachstum als die Gärungsaktivität beeinträchtigt wird. Eine Inhibierung anaboler Reaktionen durch Ethanol konnte am Beispiel der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nachgewiesen werden, deren Aktivität in Gegenwart von 15% Ethanol nur noch 10% der ursprünglichen Aktivität betrug (Bringer-Meyer und Sahm, 1989). In der gleichen Untersuchung wurde dagegen unter den katabolen Enzymen Pyruvat-Kinase, Glucokinase und Pyruvat-Decarboxylase lediglich die Pyruvat-Kinase in Gegenwart von 10% Ethanol um 14% gehemmt. Die Aktivitäten der Enzyme Glucokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase blieben konstant, wenn die Zellen aus kontinuierlichen Fermentationen mit Ethanolkonzentrationen zwischen 5 und 60 g/l getestet wurden (Park et al., 1988). Millar et al. (1982) konnten zeigen, daß die für den Entner-Doudoroff-Weg spezifischen Enzyme gegenüber Ethanol relativ stabil sind. Im Gegensatz zur Untersuchung von Bringer-Meyer und Sahm (1989) fanden sie jedoch eine Hemmung der Pyruvat-Decarboxylase und auch der Phosphoglycerat-Kinase bei Ethanolkonzentrationen über 5%. Darüberhinaus wiesen sie darauf hin, daß *in vivo* aufgrund geringerer Substratkonzentrationen mit einer Inhibierung weiterer Enzyme durch Ethanol zu rechnen sei (Millar et al., 1982).

*Z. mobilis* bildet außer Ethanol und CO<sub>2</sub> eine Reihe von Nebenprodukten. Bei Wachstum mit Fructose wurden mehr Nebenprodukte gefunden als bei Glucose (McGill und Dawes, 1971). In Batchfermentationen von 15% Fructose wurden 0.2 g/l Lactat, 0.6 g/l Acetat, 0.5 g/l Acetoin, 0.3 g/l Acetaldehyd, 2.5 g/l Glycerin, 5.9 g/l Dihydroxyaceton, 3.7 g/l Mannit und 0.4 g/l Sorbit im Überstand gemessen (Viikari, 1988). Schon früh war erkannt worden, daß auch die Kultivierungsbedingungen die Nebenproduktbildung beeinflussen. So wurde bei der Vergärung von Glucose durch *Z. mobilis* eine Steigerung der Acetoin- und Acetaldehydbildung durch Belüften des Fermenters beobachtet (Schreder et al., 1934).

Im Vergleich zu *Z. mobilis* wird von Hefen ein größerer Anteil des Substrats zu Nebenprodukten umgesetzt. So konnte gezeigt werden, daß *Saccharomyces bayanus* in einer Batchfermentation mit 15% Glucose 3.6 g/l Glycerin produzierte (Amin et al., 1983). Die Nebenproduktbildung der Hefen wurde zur industriellen Produktion von Glycerin genutzt. Durch Zusatz von Hydrogensulfit wurde Acetaldehyd gebunden, das somit nicht mehr als Akzeptor der Reduktionsäquivalente zur Verfügung stand. Daher wurde stattdessen Dihydroxyaceton-Phosphat reduziert und schließlich Glycerin ausgeschieden (Wartenberg, 1989). Im Gegensatz zu *Saccharomyces sp.* wurden die

Reaktionen, die bei *Z. mobilis* zu Glycerin bzw. Dihydroxyaceton führen, bisher nicht beschrieben. Die Kenntnis dieser Reaktionen wäre jedoch wichtig, da durch die Nebenproduktbildung in Batchfermentationen mit Fructose die Ethanolausbeute um ca. 5% verringert wird (Toran-Diaz et al., 1983; Viikari und Korhola, 1986), wobei Glycerin und Dihydroxyaceton die mengenmäßig wichtigsten Nebenprodukte sind. Außerdem wiesen Viikari und Korhola (1986) nach, daß der Zellertrag in Batchfermentationen in Gegenwart von 5 g/l Dihydroxyaceton um 20% sinkt.

Für die Bildung von Glycerin und Dihydroxyaceton wurden zwei Wege vorgeschlagen: Viikari und Korhola (1986) postulierten, daß Glycerin und Dihydroxyaceton ausgehend von den Triosephosphaten gebildet würden. Durch die Bildung von Mannit aus Fructose würde die Redoxbilanz gestört. Infolgedessen würden vermehrt Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat vorliegen und Reaktionen begünstigt, die schließlich zu Dihydroxyaceton und Glycerin führen. Dagegen nahm Sprenger (1993) an, daß Dihydroxyaceton direkt aus Fructose-6-Phosphat entsteht, indem dieses in einer Nebenreaktion der KDPG-Aldolase gespalten würde. Aus Dihydroxyaceton würde durch eine Glycerin-Dehydrogenase Glycerin gebildet.

Die Anwendung der Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) für das Studium biologischer Systeme hat seit den 70-er Jahren an Bedeutung gewonnen. Zwei Messtechniken wurden aus dem Prinzip der Kernspinresonanz entwickelt. Zum einen die Kernspin-Tomographie, die vorwiegend in der medizinischen Forschung und Diagnostik angewandt wird. Zweitens die hochauflösende Kernresonanz-Spektroskopie, mit deren Hilfe u.a. der Metabolismus von Zellen untersucht wird. Zwei technische Fortschritte verbesserten die Nachweisempfindlichkeit der NMR-Spektroskopie erheblich:

- die Entwicklung der gepulsten Fourier-Spektroskopie
- die Einführung supraleitender Hochfeldmagneten.

Die Einführung zweidimensionaler Kernresonanzexperimente (2D-NMR) erweiterte die Anwendungsmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie auf die Untersuchung biologischer Makromoleküle, z.B. zur Proteinstrukturbestimmung (Hausser und Kalbitzer, 1989).

Für Messungen mittels NMR-Spektroskopie geeignet sind alle Kerne mit einer Kernspinquantenzahl  $I > 0$ , insbesondere die Kerne mit  $I = 1/2$  (Friebolin, 1988). Eine Reihe dieser Kerne (H, P, C, N) tragen als Makroelemente in großem Maße zur chemischen Zusammensetzung der Zellen bei. Ihre NMR-spezifischen Eigenschaften sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1: Eigenschaften von in der NMR-Spektroskopie wichtigen Atomkernen

	$^1\text{H}$	$^{31}\text{P}$	$^{13}\text{C}$	$^{15}\text{N}$
Natürliche Häufigkeit [%]	99.9	100	1.1	0.37
Relative Empfindlichkeit [%]	100	6.6	1.6	0.1

Die größte Nachweisempfindlichkeit aller stabilen Isotope hat der  $^1\text{H}$ -Kern, daher kommt der  $^1\text{H}$ -NMR eine besondere Bedeutung zu. Die meisten *in vivo*-Anwendungen werden mit  $^{31}\text{P}$ -NMR durchgeführt. Dazu tragen eine akzeptable Empfindlichkeit von etwa 7% der Protonenempfindlichkeit und eine natürliche Häufigkeit von 100% bei. Der Bereich der chemischen Verschiebung beträgt für biologisch wichtige Moleküle immerhin etwa 30 ppm. In Anbetracht der begrenzten Anzahl phosphorhaltiger freier Metabolite treten weniger Probleme durch Signalüberlagerungen auf als bei der  $^1\text{H}$ -NMR. Allerdings können Metabolite mit einer Konzentration unter 0.1 mM in der Regel nicht mehr detektiert werden. Die Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -NMR wird begrenzt durch die geringe natürliche Häufigkeit - nur 1.1% aller C-Kerne sind NMR-detektierbar -, und durch die geringe relative Empfindlichkeit. Hier bietet sich der Einsatz  $^{13}\text{C}$ -angereicherter Substanzen an. Die resultierenden Signale weisen ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis auf und sie verteilen sich über einen viel größeren Bereich der chemischen Verschiebung als  $^1\text{H}$ - oder  $^{31}\text{P}$ -Signale, wodurch die Auflösung sehr gut ist.

Im Vergleich zu anderen analytischen Verfahren bietet die NMR-Spektroskopie den Vorteil, daß sie eine nicht-invasive Technik ist. Der Stoffwechsel der Zellen kann kontinuierlich gemessen und die Einflüsse verschiedener Bedingungen getestet werden. Darüberhinaus können aus einer Messung, z.B. eines  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums einer Zellsuspension, mehrere Informationen gleichzeitig gewonnen werden:

- der Energiestatus kann anhand der Nukleotide und des pH-Gradienten charakterisiert werden
- alle phosphorylierten Metabolite, die in ausreichender Konzentration vorliegen, werden erfaßt und nicht nur diejenigen, die aufgrund der Vorkenntnisse erwartet werden.

Gegenüber anderen Analyseverfahren werden in der NMR-Spektroskopie nur die freien Metabolite erfaßt. Makromoleküle oder kleine Metabolite, die an Makromoleküle oder Zellstrukturen gebunden sind, gelten als unbeweglich im Verhältnis zur NMR-Zeitskala und sind damit nicht NMR-detektierbar. Daher werden nur die zum Zeitpunkt der Messung tatsächlich am Stoff-Fluß beteiligten Metabolite gemessen.

Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie ist ihre relativ geringe Nachweisempfindlichkeit. Deshalb müssen Proben mit ausreichender Substanzkonzentration eingesetzt werden. Im

Fälle der *in-vivo*-NMR-Spektroskopie wurden daher Zellsuspensionen mit einer Zellkonzentration von  $10^{11}$  Zellen/ml eingesetzt (Ugurbil et al., 1979; Barrow et al., 1984). Dabei mußte ausgeschlossen werden, daß diese Probenbedingungen den Stoffwechsel beeinflussen und zur Messung von Artefakten führen. Beispielsweise wurden Zeiträume von 2 h für *E. coli* (Ugurbil et al., 1979) bzw. 6 h für *Chromatium vinosum* (Nicolay, 1983) angegeben, innerhalb derer eine zuverlässige und reproduzierbare Messung dichter Zellsuspensionen möglich war.

Paramagnetische Ionen können die NMR-Signale erheblich verbreitern. Es wurde gezeigt, daß eine Optimierung der Zellanzucht und Probenvorbereitung zu einer Verbesserung der Linienbreite führt, z.B. durch Zusatz von Komplexbildnern in geeigneter Konzentration (Nicolay et al., 1981).

Mit Hilfe von NMR-Messungen können folgende Informationen über den Metabolismus erhalten werden (Gadian, 1983):

- intrazelluläre Metabolitkonzentrationen
- interner pH-Wert bzw.  $\Delta\text{pH}$
- Reaktionswege und -produkte
- Geschwindigkeitskonstanten von Transportprozessen und Enzymen
- intrazelluläre Kompartimentierung

Wenn mit Hilfe von *in-vivo*-Messungen intrazelluläre Metabolitkonzentrationen ermittelt werden, muß die Sättigung der Kerne durch die für *in-vivo*-Messungen erforderliche schnelle Pulsfolge beachtet werden. Dies bedeutet, daß sich die Signalintensitäten eines Kerns in verschiedenen Molekülen unterscheiden können. Shanks und Bailey (1988) konnten durch die Bestimmung eines Sättigungsfaktors die intrazellulären Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-Bisphosphat und 3-Phosphoglycerat nach einem Glucosepuls erstmals *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae* bestimmen. Aus Extraktspektren können durch Zusatz eines internen Standards absolute Konzentrationen bestimmt werden, wobei das Volumenverhältnis zwischen Probe und Cytoplasma berücksichtigt werden muß (Gadian, 1983). So konnten den Hollander et al. (1986) in *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, daß beim Übergang von anaerobem zu aerobem Glucosestoffwechsel die Konzentration des Glucose-6-Phosphats von 1 mM auf 4 mM ansteigt.

Der intrazelluläre pH-Wert kann aus der chemischen Verschiebung des anorganischen Phosphats bestimmt werden. Dieses liegt bei physiologischem pH-Wert in zwei Formen vor,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Da der chemische Austausch zwischen beiden Formen im Verhältnis zur NMR-Zeitskala schnell erfolgt, erhält man im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum nur ein Phosphatsignal. Die chemische Verschiebung  $\delta$  hängt vom Konzentrationsverhältnis der beiden Ionen und damit vom pH-Wert der Lösung ab. Dieser Zusammenhang wird durch

eine modifizierte Henderson-Hasselbalch-Gleichung ausgedrückt (Hausser und Kalbitzer, 1989):

$$\delta = \delta_{\text{Säure}} + (\delta_{\text{Base}} - \delta_{\text{Säure}}) \cdot (10^{(\text{pH} - \text{pK})}) / (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK})})$$

Die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung des Phosphatsignals vom pH-Wert wird graphisch in einer Titrationskurve dargestellt. Mit Hilfe dieser Titrationskurve lassen sich dann aus den chemischen Verschiebungen in *in-vivo*-Spektren die entsprechenden pH-Werte und der pH-Gradient bestimmen. Auf diesem Weg konnte für *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, daß bei extrazellulären pH-Werten von 3.5 bis 7.2 der intrazelluläre pH-Wert relativ konstant zwischen 7.3 und 7.5 lag, wenn unter aeroben Bedingungen Glucose umgesetzt wurde (den Hollander et al., 1981).

Durch Einsatz von  $^{13}\text{C}$ -markierten Substanzen als Substrate oder Vorstufen von Biosynthesen kann  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie zur Aufklärung von Stoffwechselwegen und Stoff-Flüssen genutzt werden. So konnte mit  $^{13}\text{C}$ -angereicherter Fructose und Glutaminsäure und deren Markierungsverteilung in den Stoffwechselprodukten gezeigt werden, daß *Streptomyces parvulus* in der Produktionsphase einen internen Glutamatpool über den Fructosekatabolismus aufbaut, der für die Synthese des Peptidrings von Actinomycin D notwendig ist (Inbar und Lapidot, 1991). Mit Hilfe von Modellen können aus den Anreicherungsdaten von Intermediaten und Produkten auch Stoff-Flüsse z.B. im Citratcyclus, Glyoxylatcyclus oder in der Gluconeogenese berechnet werden (London, 1988; Cerdan und Seelig, 1990).

Transportvorgänge über die Zellmembran können mittels NMR-Spektroskopie verfolgt werden, wenn die intra- und extrazellulären Metabolitpools getrennte Signale aufweisen. So konnte die Alaninaufnahme durch Erythrocyten in  $^1\text{H}$ -Spin-Echo-Experimenten gezeigt werden (Brindle et al., 1979).

Mittels *in-vivo*-Untersuchungen enzymkatalysierter Reaktionen lassen sich die Raten enzymatischer Reaktionen unter steady-state Bedingungen ermitteln. Als Messtechniken kommen hierfür Sättigungsübertragung (saturation transfer), selektiver Inversionstransfer (inversion transfer) und Isotopenaustauschtechnik zum Einsatz (Alger und Shulman, 1984; Brindle, 1988). So kann mit Hilfe der NMR die Kenntnis der Enzymcharakteristik aus *in-vitro*-Experimenten ergänzt werden.

Barrow et al. (1984) untersuchten den Glucosemetabolismus in *Zymomonas mobilis* mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie. Durch *in-vivo*-Messungen konnten sie einen Anstieg der intrazellulären Konzentrationen der Zuckerphosphate und Nukleosid-Triphosphate nach Glucosezugabe zu Zellsuspensionen nachweisen. Darüberhinaus wiesen ihre Ergebnisse darauf hin, daß die Reaktionen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und

der Phosphoglycerat-Mutase zu den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten im Entner-Doudoroff-Weg bei *Zymomonas mobilis* gehören.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Stoffwechsel von *Z. mobilis* mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Der Glucosemetabolismus sollte durch  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen verfolgt werden und insbesondere der Einfluß von Ethanol auf die Metabolitkonzentrationen und den pH-Gradienten bestimmt werden.

Außerdem sollten mittels Fermentation  $^{13}\text{C}$ -markierter Fructose und Bestimmung der Anreicherungsverteilung in den Produkten die zu den Nebenprodukten Glycerin und Dihydroxyaceton führenden Reaktionen aufgeklärt werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien in analysenreiner Qualität wurden von der Firma Merck AG (Darmstadt) verwendet. Enzyme, Cofaktoren und phosphorylierte Substanzen wurden von den Firmen Boehringer GmbH (Mannheim) bzw. Sigma GmbH (München) bezogen.

Folgende Substanzen wurden von anderen Firmen bezogen:

Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
[U- <sup>14</sup> C]-Taurin, <sup>3</sup> H <sub>2</sub> O	Amersham Buchler, Braunschweig
[2- <sup>13</sup> C]-Fructose, [2- <sup>13</sup> C]-Glucose, [6- <sup>13</sup> C]-Glucose	Omicron Biochemicals, South Bend (USA)

2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) und gereinigte KDPG-Aldolase wurden freundlicherweise von Dr. B. Knappmann (Institut für Enzymtechnologie, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

### 2.2 Organismen

*Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis* ATCC 29191 (ZM6) wurde in den Versuchen eingesetzt. Die kontinuierliche Kultur wurde mit *Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis* ATCC 31821 (ZM4) durchgeführt, um für die Arbeitsgruppe Dr. Sprenger (Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich) Vergleichsdaten zu liefern für den aus *Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis* ATCC 31821 entwickelten *xyIAB<sup>+</sup>tkt<sup>+</sup>*-rekombinanten Stamm *Z. mobilis* CP4/pZY228 (Feldmann et al., 1992).

### 2.3 Nährmedien und Kultivierung

Für die Stammhaltung und Anzucht von *Z. mobilis* wurde folgendes Medium verwendet:

Vollmedium (Bringer et al., 1984b):

Glucose oder Fructose	20 - 150 g/l
Hefeextrakt	5.0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.5 g/l

Das Medium wurde mit KOH auf pH 5.5 eingestellt. Bei einer Zuckerkonzentration von mehr als 50 g/l wurde der Zucker getrennt autoklaviert und dann steril zugegeben.

Für kontinuierliche Fermentationen wurde folgendes Medium eingesetzt:

Minimalmedium (Fein et al., 1983, modifiziert):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1.6 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	1.0 g/l
Citronensäure-Hydrat	0.21 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.01 g/l
Vitaminlösung	10 ml/l
Fructose	100 g/l

Vitamine-Stammlösung (sterilfiltriert):

Biotin	10 mg/100 ml
Ca-Pantothenat	10 mg/100 ml

Das Medium wurde mit KOH auf pH 5.8 eingestellt. Nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurden die Fructose und die Vitamine steril zugesetzt.

#### Stammhaltung

*Z. mobilis* wurde zur Stammhaltung in 30-ml-Röhrchen (Bellco-Glass Inc., New Jersey, USA) mit 10 ml Vollmedium (20 g/l Glucose oder Fructose) anaerob bei Raumtemperatur kultiviert und alle 2 Tage überimpft sowie mikroskopisch auf Kontaminanten überprüft.

#### Vorkultur

Für die Vorkultur wurden 100-ml-Kolben mit 50 ml Vollmedium (20 g/l Glucose oder Fructose) mit 1 ml Stammkultur angeimpft und über Nacht bei 30°C anaerob inkubiert. Über sterile Einwegfilter (0.2 µm; Schleicher und Schüll, Dassel) konnte das gebildete CO<sub>2</sub> entweichen. Die Zellen wurden steril durch Zentrifugation (10 min, 5500-g) geerntet, in sterilem Medium aufgenommen und als Inokulum eingesetzt.

#### Fermentationen

Batchfermentationen wurden in einem 3.7-l-Laborfermenter KLF 2000 (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) mit automatischer pH- und Temperaturregulation durchgeführt. Der Fermenter wurde einschließlich pH-Sonde und Temperaturfühler *in situ* mit der Glucose- bzw. Fructoselösung sterilisiert (121°C, 20 min). Beim Abkühlen wurde steril mit N<sub>2</sub> oder Argon gespült und anschließend die weiteren Medienbestandteile steril über eine

Anstechnadel zugesetzt. Das Arbeitsvolumen der Fermentationen betrug 2.0 l, die Rührerdrehzahl wurde auf 200 Upm eingestellt. Die Fermentationen wurden bei 30°C und pH 5.5 durchgeführt. Für die Einstellung des pH-Wertes wurde 3N KOH eingesetzt. Biomasse, Ethanol- und Substratkonzentration im Fermenter wurden nach steriler Probenahme bestimmt.

Zur Durchführung kontinuierlicher Fermentationen wurde nach Anwachsen der Kultur in einer Batchfermentation auf kontinuierlichen Betrieb umgestellt. Die Durchflußrate wurde über das Volumen des pro Stunde zudosierten frischen Mediums eingestellt. Hierzu wurde zuvor eine Eichkurve des Fördervolumens der Zufütterungspumpe mit dem eingesetzten Pumpenschlauch (Innendurchmesser 3.2 mm) aufgestellt. Das Gewicht des Fermentergefäßes wurde vor einer Waage erfaßt und durch Abpumpen von Kulturflüssigkeit bei Überschreiten des Sollwerts konstant gehalten. Die Kulturflüssigkeit wurde über eine dampfsterilisierte Wärmefalle (80°C) in eine Auffangflasche gepumpt.

Für die Fermentationen mit  $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose bzw. Fructose betrug das Arbeitsvolumen 20 ml. Als Fermentationsgefäß wurde eine 50-ml-Schraubverschlußflasche (Schott, Mainz) in einem Wasserbad bei 30°C über einem Magnetrührer fixiert. Durch ein Gummiseptum wurden pH-Elektrode und Kanülen zur Probenahme, Titration (0.25 N KOH) und Entgasung steril eingeführt.

#### 2.4 Bestimmung des Bakterienwachstums

Das Wachstum der Bakterien wurde über die OD bei 550 nm bestimmt. Die Proben wurden so verdünnt, daß die Extinktion unter 0.25 blieb, um die Proportionalität zwischen Extinktion und Zellkonzentration zu gewährleisten.

Zur Trockengewichtsbestimmung wurden 10 ml Zellsuspension mit bekannter OD in einem Druckfiltrationsgerät (Sartorius, Göttingen) über ein vorher getrocknetes und gewogenes Membranfilter abfiltriert. Anschließend wurde mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gewaschen. Die Filter wurden im Mikrowellenherd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus der Gewichtszunahme pro eingesetzter Probenmenge wurde ein Trockengewicht von 0.23 g/l bei einer OD = 1 ermittelt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension auf ca.  $2 \cdot 10^7$  Zellen/ml verdünnt. In einer Zählkammer (Thoma, Schichtdicke 0.05mm, Raster  $0.0025 \text{ mm}^2$ ) wurden dann die Zellen unter einem Mikroskop gezählt.

## 2.5 NMR-Messungen

### 2.5.1 *in vivo*-NMR-Spektroskopie

Für die *in-vivo*-<sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie wurden konzentrierte Zellsuspensionen verwendet. Die Zellen einer 2-l-Fermentation wurden durch Zentrifugation geerntet (Beckmann Zentrifuge J2-21M/E, 6400·g, 4°C, 20 min) und einmal mit kaltem Puffer (100 mM MES, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 50 mM Glucose, pH 5.8) gewaschen. Das Pellet wurde in geringem Volumen (1 ml/ 6 g Feuchtgewicht) Puffer (1M MES, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM EDTA, pH 5.8) resuspendiert und die Suspension auf Eis aufbewahrt (Barrow et al., 1984). In 10-mm-NMR-Röhrchen (Norell GmbH, Weilheim) wurden 2.1 ml Zellsuspension, 450 µl D<sub>2</sub>O, 60 µl 1 M TEP, 20 µl Entschäumer (1:40 Dehysan; Henkel, Düsseldorf) und destilliertes Wasser oder Ethanol (0 - 10% w/v) ad 2.7 ml pipettiert und sorgfältig gemischt. Die Probe wurde 20 min bei 30°C im NMR-Probenkopf temperiert. In dieser Zeit wurden die Tune- und Shimspulen auf die Probe abgestimmt. Für reproduzierbare Messergebnisse des Glucosemetabolismus mußte gewährleistet werden, daß die zugesetzte Glucoselösung gleichmäßig in der Zellsuspension verteilt wurde. Hierzu wurde die Suspension in einem Silikonschlauch (0.3 mm Innendurchmesser) zurückgezogen. Anschließend wurde die Zellsuspension gleichzeitig mit 0.4 ml einer 50% (w/v) Glucoselösung, die aus einem zweiten Schlauch zugeführt wurde, ins Röhrchen zurückgedrückt. Unmittelbar danach wurde mit der Aufnahme der sequentiellen <sup>31</sup>P-NMR-Spektren begonnen.

Die Messungen wurden mit einem Bruker AMX 400 Widebore NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt. Für jedes Spektrum wurden 180 Messpulse mit Protonen-Entkopplung, einem Pulswinkel von 60° und einer Aquisitionszeit von 0.25 s akkumuliert (Barrow et al., 1984). Es wurde mit lock-Signal gemessen, um Inhomogenitäten des Magnetfelds während der Akkumulation eines Spektrums auszugleichen. Hierfür wurde jeder Probe 15% D<sub>2</sub>O zugesetzt. Die Messzeit eines Spektrums betrug 1 min.

Als primäres Ergebnis einer Messung wurde der FID (free induction decay, Abfall der Quermagnetisierung) erhalten. Das FID-Signal wurde mit Hilfe der AMX-Software durch Fourier-Transformation und eine die Auflösung oder das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis begünstigende Filterfunktion (Apodisation) in ein NMR-Spektrum transformiert (Sanders und Hunter, 1989). Die Phase und die Basislinie des Spektrums wurden korrigiert. Die Positionen und die Intensitäten der Signale wurden über den eingesetzten Standard Triethylphosphat kalibriert. Die Peakpositionen wurden als chemische Verschiebung (ppm) bezogen auf 85% Phosphorsäure (0 ppm) angegeben (Kirk et al., 1986; Hausser und Kalbitzer, 1989). Die Signale wurden mit Hilfe von Literaturangaben zu *in-vivo*-

Spektren von *Escherichia coli* (Ugurbil et al., 1979), *Saccharomyces cerevisiae* (den Hollander et al., 1981) und *Z. mobilis* (Barrow et al., 1984) identifiziert.

### 2.5.2 $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie von Perchlorsäure-Extrakten

Die Proben für die  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie von Perchlorsäure-Extrakten wurden durch Extraktion von Zellsuspensionen hergestellt, wie sie auch für die *in-vivo*- $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie verwendet wurden. Anstelle von  $\text{D}_2\text{O}$  und Triethylphosphat enthielten die Extraktionsansätze destilliertes Wasser. Die Suspensionen wurden 15 min bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert, dann wurde eine 50 % (w/v) Glucoselösung zu einer Endkonzentration von 350 mM zugesetzt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3 ml eiskalter 6 M Perchlorsäure extrahiert und auf Eis gekühlt. Bevor die Extrakte neutralisiert wurden, mußten sie bei  $35000\cdot g$  abzentrifugiert werden (30 min,  $4^\circ\text{C}$ ), um denaturierte Proteine und Zelltrümmer abzutrennen. Ohne diesen Zentrifugationsschritt konnte in den Extraktspektren kein ATP oder UTP nachgewiesen werden, da alkali-reaktivierbare Phosphatasen beim Neutralisieren der Extrakte zum Abbau von ATP und UTP führen können. Der Überstand wurde mit 5 N KOH und 2 M  $\text{KHCO}_3$  neutralisiert und der  $\text{KClO}_4$ -Niederschlag durch Zentrifugation ( $5000\cdot g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) abgetrennt. Der Überstand wurde eingefroren, anschließend lyophilisiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für die Messung wurde das Lyophilisat in 1.5 ml Puffer (75 mM Tris, 150 mM EDTA, pH 8.30) aufgenommen und mit 30  $\mu\text{l}$  TEP und 450  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert auf pH 8.30 eingestellt und destilliertes Wasser dazugegeben, sodaß das Endvolumen 3.0 ml betrug. Schließlich wurde die Probe in ein 10-mm-NMR-Röhrchen filtriert.

Die Extrakte wurden mit Lock-Signal gemessen, hierfür enthielten die Proben 15%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Mess-Signale der ersten 32 Pulse wurden nicht abgespeichert (Dummy-Pulse), um eine Linienverbreiterung durch Temperaturschwankungen zu Beginn der Messung auszuschließen. Anschließend wurden bei Raumtemperatur 1800 Pulse mit  $^1\text{H}$ -Entkopplung, einem Pulswinkel von  $60^\circ$  und einer Aquisitionszeit von 0.5 s akkumuliert, wobei die Messzeit für ein Extraktspektrum 2 h betrug. Die Aquisitionszeit wurde dem NMR-Messignal (FID) der Extraktspektren optimal angepaßt, damit einerseits der Informationsgehalt des FID voll ausgenutzt und andererseits nicht zuviel Rauschen aufgenommen wurde.

Die für die Extraktmessungen optimale  $^1\text{H}$ -Entkopplung wurde mit einem Entkopplerpuls von 500 ms und 25 dB erzielt. Diese Werte wurden durch Variation der Parameter und Beurteilung der daraus resultierenden Linienbreite ermittelt (Tab. 2).

Tab. 2: Einfluß der  $^1\text{H}$ -Entkopplung auf die Linienbreite  $\Delta\nu_{1/2}$  des Standards TEP in  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Perchlorsäure-Extrakten.

Pulslänge [ms]	Pulsstärke [dB]	$\Delta\nu_{1/2}$ (TEP) [Hz]
400	25	1.9
400	30	4.4
500	25	1.7
500	30	3.5

Der FID wurde vor Fourier-Transformation mit einer exponentiellen Filterfunktion bearbeitet. Mittels Fourier-Transformation muß das zeitabhängige Signal, der FID, in ein frequenzabhängiges Spektrum umgerechnet werden. Vor der Fourier-Transformation wurden die Meßdaten in der Regel durch die Multiplikation mit einer geeigneten Funktion gefiltert. Dadurch konnte das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis verbessert oder die Auflösung erhöht werden (Hausser und Kalbitzer, 1989). Für die Bearbeitung der Extraktenspektren wurde eine abfallende Exponentialfunktion verwendet, durch die das Rauschen unterdrückt wurde. Alternativ dazu wurde eine Gaussfunktion genutzt, die zu einer besseren Auflösung führte. Diese konnte jedoch nicht eingesetzt werden, wenn die Spektren zur Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen ausgewertet wurden. Die für jedes Spektrum individuelle Einstellung der Parameter der Gaussfunktion beeinflusste die Signalintensitäten. Damit konnten die Spektren hinsichtlich der Integrale nicht mehr untereinander verglichen werden.

### 2.5.3 Bestimmung von $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen

Die Bestimmung der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung der in den Fermentationen mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Zuckern gebildeten Produkte erfolgte nach der Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren filtrierter Überstände der Kulturflüssigkeit. Nach einer ersten Messung des Überstandes wurden nicht angereicherte Reinsubstanzen (50 mM) zugesetzt und ein zweites  $^{13}\text{C}$ -Spektrum aufgenommen. Protonen-entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit 600 Dummy-Pulsen und 3000 Messpulsen aufgenommen. Die Aquisitionszeit eines Messpulses betrug 0.98 s, die Messzeit zur Aufnahme eines  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums 4 h. Die Integrale der Signale wurden mit Hilfe einer Auswertungs-Software (DOSIS) bestimmt und die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung nach der folgenden Formel bestimmt (Sonntag et al., 1993):

$$^{13}\text{C-Atom \%} = (A_1 / (A_2 - A_1)) \cdot (N / C_S) \cdot 100$$

$A_1, A_2$ : Signalfläche des C-Atoms im ersten bzw. zweiten Spektrum

N: durch Zugabe der Reinsubstanz zugesetzte  $^{13}\text{C}$ -Atome (bei 50 mM Reinsubstanz 0.55 mM  $^{13}\text{C}$ )

$C_S$ : durch GC oder enzymatische Analytik bestimmte Konzentration der betrachteten Substanz

## 2.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 2.6.1 Herstellung von zellfreiem Rohextrakt

Zellen wurden in 1-l-Kolben mit Vollmedium und 5% Glucose herangezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (6400·g, 20 min, 4°C) geerntet. Anschließend wurden die Zellen in Puffer (20 mM MES, pH 6.5, 30 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gewaschen und zu einer OD von ca. 200 resuspendiert. Diese Suspension wurde unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt, indem fünfmal 1 min beschallt wurde mit jeweils 1 min Pause (Output Control 10; Branson Sonifier 250, Branson Sonic Power, Danburg, USA). Die Extrakte wurden mit 35000·g (30 min, 4°C) abzentrifugiert und die Überstände als zellfreier Rohextrakt in den Enzymtests eingesetzt.

### 2.6.2 Photometrische Enzymtests

Die im folgenden aufgeführten Enzymaktivitäten wurden in kontinuierlichen photometrischen Tests ermittelt. Die Messungen wurden an einem Shimadzu Spectrophotometer UV160 (Shimadzu, Düsseldorf) in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke d von 10 mm bei 30°C durchgeführt. Die NADH-Abnahme bzw. -Zunahme wurde als Extinktionsänderung  $\Delta A$  bei 340 nm gemessen. Daraus wurde die spezifische Aktivität z nach der folgenden Formel bestimmt:

$$z = (\Delta A \cdot V \cdot 1000) / (v \cdot \epsilon \cdot d \cdot \Delta t \cdot p) \text{ [U/mg Protein]}$$

V, v: Gesamt-, Probevolumen in l

$\epsilon \cdot d$ :  $6.3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1}$

$\Delta t$ : Zeit in min

p: Proteingehalt in mg/l

Die spezifischen Aktivitäten werden in U/mg Protein angegeben, wobei 1 U die Enzymaktivität ist, die in 1 min 1  $\mu\text{mol}$  Substrat unter den angegebenen Bedingungen umsetzt.

Für jeden Test wurde die Spezifität sowie die Proteinlinearität der Reaktion kontrolliert. Bei Messung der NADH-Abnahme wurde der Anteil der NADH-Oxidase-Aktivität im Rohextrakt berücksichtigt.

Die Inaktivierung der Enzyme durch Denaturierung wurde nach Millar et al. (1982) getestet. 1-ml-Ansätze enthielten 250  $\mu\text{l}$  zellfreien Rohextrakt und Ethanol in Konzentrationen zwischen 0 und 20% (w/v). Diese Ansätze wurden 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit Puffer (20 mM MES, 30 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 6.0) 1:20 verdünnt und auf Eis abgekühlt. Denaturierte Proteine wurden durch Zentrifugation (13000 Upm, 5 min) abgetrennt und der Überstand im Enzymtest eingesetzt.

Folgende Enzymtests wurden durchgeführt:

#### **Enolase (EC 4.2.1.11)**

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach einer Methode von Pawluk et al. (1986). Das von der Enolase gebildete Phosphoenolpyruvat wurde von der Pyruvat-Kinase und der Lactat-Dehydrogenase zu Lactat umgesetzt. Gemessen wurde die mit der Reaktion der Lactat-Dehydrogenase verbundene Abnahme des NADH.

Testansatz:

(2730 - x) $\mu\text{l}$	30 mM TEA, 30 mM KCl, 3 mM $\text{MgCl}_2$ , pH 7.5
50 $\mu\text{l}$	14 mM NADH
100 $\mu\text{l}$	15 mM ADP
10 $\mu\text{l}$	Pyruvat-Kinase (6 U)
10 $\mu\text{l}$	Lactat-Dehydrogenase (6 U)
x $\mu\text{l}$	zellfreier Rohextrakt

Der Test wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  29 mM 2-Phosphoglycerat gestartet.

#### **Glycerin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.6)**

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in der Richtung der Dihydroxyaceton-Reduktion. Gemessen wurde die Abnahme von NADH.

Testansatz:

(2900 - x) $\mu\text{l}$	20 mM MES, 30 mM KCl, 3 mM $\text{MgCl}_2$ , pH 6.5
50 $\mu\text{l}$	14 mM NADH
x $\mu\text{l}$	zellfreier Rohextrakt

Der Test wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  300 mM Dihydroxyaceton gestartet.

### **Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.8)**

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Abnahme von NADH gemessen.

Testansatz:

(2850 - x) $\mu$ l	20 mM MES, 30 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 6.5
50 $\mu$ l	14 mM NADH
x $\mu$ l	zellfreier Rohextrakt

Der Test wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l 30 mM Dihydroxyaceton-Phosphat gestartet.

### **Glycerokinase (EC 2.7.1.30)**

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in einem gekoppelten Test nach Bergmeyer et al. (1984). Gemessen wurde die Zunahme von NADH, das in der Reduktion von Glycerin-3-Phosphat durch die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase gebildet wurde. Das entstandene Dihydroxyacetonphosphat wurde durch das Hydrazin aus dem Gleichgewicht entfernt.

Testansatz:

(925 - x) $\mu$ l	200 mM Glycerin pH 9.5, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM Hydrazin
35 $\mu$ l	81 mM ATP/ 25 mM NAD
5 $\mu$ l	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (8.5 U)
x $\mu$ l	zellfreier Rohextrakt

Der Test wurde durch Zugabe von 35  $\mu$ l 90 mM Glycerin gestartet.

### **KDPG-Aldolase (EC 4.1.2.14)**

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach Knappmann (1993) in einem gekoppelten Test. Gemessen wurde die Abnahme des NADH durch die Reaktion der Lactat-Dehydrogenase mit Pyruvat und NAD.

Testansatz:

(880 - x) $\mu$ l	20 mM K-Phosphatpuffer, pH 6.5
10 $\mu$ l	50 mM NADH
10 $\mu$ l	Lactat-Dehydrogenase (5.5 U)
x $\mu$ l	Enzymsuspension KDPG-Aldolase

Der Test wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l 10 mM 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat gestartet.

### **Phosphoglycerat-Mutase (EC 2.7.5.3)**

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach Bergmeyer et al. (1984). Gemessen wurde die Abnahme von NADH durch die Reaktion der Lactat-Dehydrogenase mit Pyruvat. Pyruvat wurde aus 3-Phosphoglycerat über die Enzyme Phosphoglycerat-Mutase, Enolase und Pyruvatkinase gebildet.

Testansatz:

(2720 - x)  $\mu$ l 100 mM TEA, 30 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.6  
50  $\mu$ l 7 mM 2,3-Bisphosphoglycerat  
50  $\mu$ l 14 mM NADH  
100  $\mu$ l 20 mM ADP  
30  $\mu$ l Enolase (12 U)  
10  $\mu$ l Pyruvatkinase (6 U)  
10  $\mu$ l Lactat-Dehydrogenase (25 U)  
x  $\mu$ l Rohextrakt

Der Test wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l 280 mM 3-Phosphoglycerat gestartet.

#### Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1)

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach Bergmeyer et al. (1984). Gemessen wurde die Abnahme von NADH infolge der Reaktion der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase mit Dihydroxyacetonphosphat.

Testansatz:

(1455 - x)  $\mu$ l 100 mM TEA, pH 7.6  
25  $\mu$ l 14 mM NADH  
5  $\mu$ l Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (8.5 U)  
x  $\mu$ l Rohextrakt

Der Test wurde durch Zugabe von 15  $\mu$ l 317 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat gestartet.

### 2.6.3 NMR-spektroskopische Enzymtests

#### Dihydroxyacetonphosphat-Dephosphatase

Die Aktivität der Dihydroxyacetonphosphat-Dephosphatase wurde mit Hilfe von <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie ermittelt. Alle Messungen wurden bei 30°C durchgeführt. Ein Testansatz enthielt bei einem Gesamtvolumen von 3 ml: 20 mM K-MES pH 6.5, 30 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 15% D<sub>2</sub>O, 7 mM Dihydroxyacetonphosphat und Rohextrakt (4-6 mg Protein). Zunächst wurde der Ansatz ohne Rohextrakt gemessen und die der eingesetzten Menge Dihydroxyacetonphosphat entsprechende Signalintensität im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum ermittelt. Durch Zusatz von Rohextrakt wurde die Reaktion gestartet und mit der sequentiellen Aufnahme von <sup>31</sup>P-NMR-Spektren begonnen. Für ein Spektrum wurden 240 Pulse mit einem Pulswinkel von 60° und einer Aquisitionszeit von 0.3 s akkumuliert, die Messzeit betrug 7.2 min. Aus den Signalintensitäten des Dihydroxyacetonphosphats wurde die Konzentrationsabnahme und damit die Aktivität der Dephosphatase berechnet. Dabei wurde die durch den Zusatz von Rohextrakt bedingte Verdünnung bzw. Abnahme der Signalintensität berücksichtigt. Die chemische

Instabilität des Dihydroxyacetonphosphats wurde in Parallelansätzen ohne Rohextrakt bestimmt und von der ermittelten Aktivität abgezogen.

#### 2.6.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der in den Enzymtests eingesetzten Rohextrakte wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Hierzu wurden 0.1 ml Probe mit 5 ml Bradford-Reagenz gemischt und nach genau 60 s die Extinktion bei 578 nm gemessen. Mit Rinderserumalbumin wurde eine Eichkurve erstellt.

Bradford-Reagenz: 100 ml 85% Phosphorsäure  
40 mg Serva Blau G in 50 ml 95% Ethanol  
mit H<sub>2</sub>O dest. ad 1000 ml

#### 2.7 Bestimmung des Cytoplasmavolumens

Zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen wurde das Cytoplasmavolumen über die Verteilung von radioaktiven Markern (Rottenberg, 1979) und schnelle Trennung der Zellen vom Kulturmedium mittels Siliconölzentrifugation (Klingenberg und Pfaff, 1967) ermittelt.

Hierzu wurden in 400 µl Mikroteströhrchen (Beckmann) 30 µl 20%ige Perchlorsäure und 65 µl Siliconöl (d = 1.04) gefüllt. Nach kurzer Zentrifugation lag die Ölschicht aufgrund ihrer geringeren Dichte über der Perchlorsäure. 500 µl Zellsuspension (OD 6-8) wurden mit 20 µl Raumbestimmungsansatz (5 µl <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O, ca. 40 kBq; 5 µl <sup>14</sup>C-Taurin, ca. 10 kBq; 10 µl <sup>12</sup>C-Taurin, 10 mM) gemischt und 60 s bei 30°C inkubiert. Je 100 µl wurden in 5 Parallelversuchen in die Mikroteströhrchen pipettiert und 30 s in einer Microfuge E (Beckmann) mit 14000 Upm abzentrifugiert. Dadurch gelangten die Zellen durch die Ölschicht in die Perchlorsäure und wurden so vom Medium getrennt. 20 µl der Überstände wurden in Szintillationsgefäße mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und die <sup>3</sup>H- bzw. <sup>14</sup>C-Zerfälle in einem Szintillationszähler (Rack beta 1214, LKB, Schweden) gezählt. Zur Bestimmung der Radioaktivität in den Pellets wurde der die Perchlorsäureschicht enthaltende Teil des Mikroteströhrchens abgetrennt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 750 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Das Sediment wurde durch Zentrifugation ins Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, suspendiert und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Es wurde nochmals zentrifugiert (5 min, 14000 Upm) und 650 µl des Überstandes im Szintillationszähler gezählt.

Taurin und  $^3\text{H}_2\text{O}$  verteilen sich in Überstand und Sediment unterschiedlich:  $^3\text{H}_2\text{O}$  diffundiert in die Zellen und ist über das gesamte sedimentierte Volumen verteilt. Taurin wird von *Z. mobilis* nicht aufgenommen und dient als Maß für das Volumen des in das Sediment mitgeschleppten Mediums. Aus der Verteilung von  $^{14}\text{C}$ -Taurin und  $^3\text{H}_2\text{O}$  in Sediment und Überstand lassen sich unter Berücksichtigung der eingesetzten Volumina Wasser- und Taurinraum errechnen.

$$^3\text{H}_2\text{O-Raum} = (\text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{sed}} \cdot \text{ZV}_{\text{ü}}) / (\text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{ü}})$$

$$\text{Taurinraum} = (\text{dpm } ^{14}\text{C}_{\text{sed}} \cdot \text{ZV}_{\text{ü}}) / (\text{dpm } ^{14}\text{C}_{\text{ü}})$$

$\text{ZV}_{\text{ü}}$  = Volumen des Überstandes (20  $\mu\text{l}$ )

$\text{dpm}_{\text{sed}}$  = dpm des gesamten aufgearbeiteten Sedimentes ( $^{14}\text{C}$  bzw.  $^3\text{H}_2\text{O}$ )

$\text{dpm}_{\text{ü}}$  = dpm des gesamten Überstandes ( $^{14}\text{C}$  bzw.  $^3\text{H}_2\text{O}$ )

Die Differenz von Wasser- und Taurinraum ergibt das Cytoplasmavolumen [ $\mu\text{l}$ / mg Trockengewicht].

## 2.8 Quantitative Bestimmung von Substraten und Produkten

### 2.8.1 Bestimmung mittels enzymatischer Methoden

Glucose, Fructose, Lactat, Glycerin und Dihydroxyaceton wurden photometrisch mittels enzymatischer Tests bestimmt. Die Proben wurden so verdünnt, daß die Konzentrationen zwischen 0.2 und 3 mM betragen. Die in den Tests gebildete oder verbrauchte Menge NAD(P)H war der Menge der zu bestimmenden Substanz äquivalent. NAD(P)H wurde photometrisch bei 340 nm gemessen. Die Konzentration wurde anhand der Extinktionsänderung  $\Delta E$  nach folgender Formel bestimmt:

$$c = (\Delta E \cdot V \cdot \text{MG}) / (\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000) \text{ [g/l]}$$

V,v: Test-, Probenvolumen [ml]

MG: Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

$\varepsilon \cdot d$ :  $6.3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1}$

Die Bestimmung von Glucose und Fructose erfolgte nach einer Methode von Bernt und Bergmeyer (1974).

In Gegenwart von ATP wurde die Glucose durch das Enzym Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert und dann durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase unter Bildung von NADPH zu 6-Phosphogluconat oxidiert.

Testansatz:

500  $\mu$ l 0.75 M TEA, pH 7.6, 10 mM  $MgSO_4$   
50  $\mu$ l 11.5 mM NADP  
50  $\mu$ l 81 mM ATP  
50  $\mu$ l Probe  
950  $\mu$ l Wasser (bidest.)

Der Testansatz wurde gemischt und die Extinktion ( $E_1$ ) nach 3 min gemessen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l Enzymsuspension (Hexokinase, 1.7 U/ml; Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 0.9 U/ml) gestartet. Nach 15 min wurde die Extinktion ( $E_2$ ) gemessen. Bei der Bestimmung der Extinktionsänderung  $\Delta E$  wurde eine Kontrolle mit Wasser (bidest.) anstelle der Probe berücksichtigt.

Fructose wurde in Gegenwart von ATP durch das Enzym Hexokinase zu Fructose-6-Phosphat phosphoryliert und dieses durch die Phosphoglucose-Isomerase zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt. Glucose-6-Phosphat reagierte weiter, wie bei der Bestimmung von Glucose beschrieben wurde.

Für die Messung wurde der Testansatz der Glucose-Bestimmung zugrunde gelegt und zusätzlich nach Messung von  $E_2$  10  $\mu$ l Phosphoglucose-Isomerase (Endkonzentration 4.3 U/ml) hinzugefügt. Nach 15 min wurde die Extinktion ( $E_3$ ) gemessen.

Die Bestimmung von Lactat erfolgte nach einer Methode von Noll (1974).

Lactat wurde durch Lactat-Dehydrogenase in Gegenwart von NAD zu Pyruvat und NADH umgesetzt. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite des Lactats. Daher wurde durch Abfangen des Pyruvats mit Hilfe des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase die Reaktion auf die Seite von Pyruvat und NADH gezogen.

D-Lactat und L-Lactat konnten durch Einsatz von D-Lactat- bzw. L-Lactat-Dehydrogenase unterschieden werden.

Testansatz:

500  $\mu$ l 0.6 M Glycylglycin, pH 10.0, 0.1 M Glutamat  
100  $\mu$ l 47 mM NAD  
700  $\mu$ l Wasser (bidest.)  
50  $\mu$ l Probe  
10  $\mu$ l Glutamat-Pyruvat-Transaminase (11.7 U/ml)

Der Testansatz wurde gemischt und die Extinktion ( $E_1$ ) nach 5 min gemessen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu$ l Enzymsuspension (Lactat-Dehydrogenase) gestartet und die Extinktion ( $E_2$ ) nach 20 min gemessen.

Die enzymatische Bestimmung von Glycerin wurde nach einer Methode von Eggstein und Kuhlmann (1974) durchgeführt. In Gegenwart von ATP wurde Glycerin durch die Glycerokinase zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert. Dabei gebildetes ADP wurde mit Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase zu ATP und Pyruvat umgesetzt, das anschließend in Gegenwart von NADH durch die Lactat-Dehydrogenase unter Bildung von NAD zu Lactat reduziert wurde. Gemessen wurde die Abnahme des NADH.

Testansatz:

- 500  $\mu$ l 0.75 M Glycylglycin, pH 7.4, 10 mM  $MgSO_4$
- 50  $\mu$ l 8 mM NADH, 33 mM ATP, 46 mM PEP
- 50  $\mu$ l Probe
- 950  $\mu$ l Wasser (bidest.)
- 5  $\mu$ l Pyruvatkinase (1.9 U/ml), Lactat-Dehydrogenase (1.8 U/ml)

Der Testansatz wurde gemischt und die Extinktion ( $E_1$ ) nach 5 min gemessen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l Enzymsuspension (Glycerokinase, Endkonzentration 0.27 U/ml) gestartet und die Extinktion ( $E_2$ ) nach 10 min gemessen.

Dihydroxyaceton wurde nach einer Methode von Wieland und Witt (1974) bestimmt. Das Testprinzip entspricht dem der Glycerin-Bestimmung: Dihydroxyaceton wurde durch die Glycerokinase phosphoryliert, die weiteren Reaktionen verliefen wie oben beschrieben. Eine Differenzierung war nur durch die eingesetzte Glycerokinase-Aktivität möglich: 0.2 U/Testansatz setzten Glycerin um, 4 U/Testansatz setzten auch Dihydroxyaceton nach ca. 40 min vollständig um.

Testansatz:

- 500  $\mu$ l 0.75 M Glycylglycin, pH 7.4, 10 mM  $MgSO_4$
- 50  $\mu$ l 8 mM NADH, 33 mM ATP, 46 mM PEP
- 50  $\mu$ l Probe
- 950  $\mu$ l Wasser (bidest.)
- 5  $\mu$ l Pyruvatkinase (1.9 U/ml), Lactat-Dehydrogenase (1.8 U/ml)

Der Testansatz wurde gemischt und die Extinktion ( $E_1$ ) nach 5 min gemessen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l Enzymsuspension (Glycerokinase, Endkonzentration 0.07 U/ml) gestartet und die Extinktion ( $E_2$ ) nach 10-15 min gemessen. Anschließend wurde nochmals Glycerokinase (Endkonzentration 1.4U/ml) zugesetzt und die Extinktion ( $E_3$ ) nach ca. 40 min gemessen.

### 2.8.2 Bestimmung mittels Gaschromatographie

Ethanol, Acetat und Acetoin wurden mit einem Gaschromatographen (Hewlett Packard 5790 A) mit Flammenionisationsdetektor bestimmt. Die Proben wurden 1:1 mit internem Standard (50 mM Methanol in 0.2 N HCl) versetzt. Die Analysenbedingungen waren (nach Finn et al., 1984):

Säule	Porapack QS	80-100 mesh
Säulentemperatur	Ethanol:	140°C
	Acetat/ Acetoin:	170°C
Injektortemperatur	250°C	
Detektortemperatur	250°C	
Trägergas	N <sub>2</sub> (30 ml/ min)	
Probevolumen	2 µl	
Retentionszeiten	Methanol	1.04 min (140°C)
		0.26 min (170°C)
	Ethanol	2.55 min
	Acetat	1.8 min
	Acetoin	5.5 min

Zur Kalibrierung wurden jeweils 10 und 20 mM Lösungen von Ethanol, Acetat und Acetoin eingesetzt.

### 2.8.3 Bestimmung mittels HPLC

Xylose, Fructose, Xylitol und Sorbit wurden mittels HPLC (Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump, 655A-40 Auto Sampler, D-2000 Chromato-Integrator) bestimmt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von ca. 10 mM verdünnt und filtriert.

Die Messbedingungen waren:

Säule	BIORAD Aminex HPX-87C	
Säulentemperatur	85°C	
Eluent	0.6 ml H <sub>2</sub> O dest./ min	
Probevolumen	10 µl	
Detektion	RI-Detektor	
Retentionszeiten	Xylose	12.82 min
	Fructose	15.02 min
	Xylitol	23.76 min
	Sorbit	24.64 min

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Der Glucose-Stoffwechsel in *Z. mobilis*

##### 3.1.1 *In-vivo*-<sup>31</sup>P-NMR-Messungen

Der Zuckerstoffwechsel von *Z. mobilis* sollte an intakten Zellen untersucht werden. Im Gegensatz zu gängigen biochemischen Methoden, die eine Extraktion der Zellen erfordern, eröffnet die NMR-Spektroskopie die Möglichkeit, Stoffwechselfvorgänge in der lebenden Zelle zu analysieren. Zunächst mußte der Versuchsablauf optimiert werden, um den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen nach einem Glucosepuls mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektren reproduzierbar messen zu können. Im Laufe erster Messungen zeigte sich, daß die zeitliche und spektrale Auflösung der Messreihen optimiert sowie der Zustand der eingesetzten Zellen standardisiert werden mußten.

Suspensionen mit hoher Zellkonzentration mußten für die Messungen verwendet werden, da die Nachweis-Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie relativ gering ist. Andererseits wurde bei hohen Zellkonzentrationen das Substrat in kurzer Zeit verbraucht, sodaß nach einem Glucosepuls eine Messzeit von nur wenigen Minuten zur Verfügung stand. Für die NMR-Messungen wurden Zellsuspensionen mit ca.  $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen pro ml Probe eingesetzt, der Anteil des zellinternen Volumens am Probevolumen betrug dann 25 bis 30%. Damit konnten Spektren mit gutem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis in einer Messzeit von einer Minute akkumuliert werden. <sup>31</sup>P-NMR-Spektren wurden jeweils vor und nach Zugabe von 350 mM Glucose aufgenommen. So konnte der Metabolismus nach einem Glucosepuls mit einer zeitlichen Auflösung von einer Minute verfolgt werden.

Neben der zeitlichen Auflösung war die spektrale Auflösung, d.h. die Trennung der verschiedenen Signale innerhalb eines Spektrums wichtig. Die spektrale Auflösung wird als die Linienbreite der Signale bei halber Peakhöhe gemessen und in Hertz angegeben. Bei guten *in-vivo*-Messungen betrug die Linienbreite 7 bis 10 Hz. Sie konnte aber auch 30 bis 40 Hz erreichen, und eine quantitative Auswertung der Spektren war dann nicht mehr möglich. Eine Ursache für die Verbreiterung von NMR-Signalen können paramagnetische Komponenten in der Probe (Mn, Co, Ni) sein. Werden paramagnetische Ionen aber durch Komplexbildner wie z.B. EDTA gebunden, verbessert sich die Linienbreite. Es wurde getestet, ob paramagnetische Ionen durch EDTA komplexiert werden könnten, ohne das Wachstum der Zellen zu beeinträchtigen. Hierzu wurden Wachstumsversuche in Vollmedium mit 1% Glucose und zusätzlich bis zu 1 mM EDTA durchgeführt. Der Zellertrag und die Wachstumsrate waren jedoch in Gegenwart von 100 µM EDTA geringer als in EDTA-freien Ansätzen (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Wachstumsrate  $\mu$  und Zellertrag  $Y_S$  (g/mol) in Batchfermentationen mit EDTA-Zusatz.

*Z. mobilis* wurde in 50-ml-Ansätzen mit 1% Glucose und EDTA (0 - 1 mM) anaerob kultiviert. Wachstumsrate  $\mu$  wurde durch stündliche Messung der  $OD_{550nm}$  während der exponentiellen Phase,  $Y_S$  durch Bestimmung von  $OD_{max}$  berechnet.

EDTA ( $\mu$ M)	Wachstumsrate $\mu$ ( $h^{-1}$ )	Zellertrag $Y_S$ (g TG/mol Glucose)
0	0.38	9.4
100	0.28	7.5
250	0.23	7.2
500	0.18	5.0
1000	0.16	4.7

Dagegen konnten paramagnetische Ionen durch EDTA im Wasch- und Suspensionspuffer gebunden werden. Eine gute Auflösung der Spektren wurde mit 2 mM EDTA im Messansatz erreicht, ohne den Glucoseumsatz durch die Zellsuspensionen zu beeinträchtigen.

Die Linienbreite wird auch durch die Homogenität der Zellen in der Probe beeinflusst (Nicolay et al., 1981). In diesem Zusammenhang mußte beachtet werden, daß die Morphologie der *Z. mobilis*-Zellen sich je nach Wachstumsphase und Kultivierungsbedingungen ändert (Stevnsborg et al., 1986). Daher wurden immer Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase für die *in-vivo*-Messungen eingesetzt. Die Wachstumsphase der Zellen sowie das Alter der Zellsuspensionen beeinflusste auch die Bildung von Zuckerphosphaten und Nukleotiden nach dem Glucosepuls. Ein Vergleich von Zellen der exponentiellen mit solchen der stationären Wachstumsphase zeigte, daß jene in größerem Maße Zuckerphosphate und Nukleotide bildeten (Tab. 4). Die Zellsuspensionen konnten höchstens 3.5 bis 4 h auf Eis gehalten werden, ohne die Bildung von Zuckerphosphaten und Nukleotiden zu beeinträchtigen (Tab. 4). Außerdem nahm die Viskosität der Zellsuspensionen stark zu und erschwerte eine gute Durchmischung der Probe nach der Glucosezugabe.

Tab. 4: Bildung von Zuckerphosphaten (ZP) und NTP in *Z. mobilis*-Zellsuspensionen ( $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml) in Abhängigkeit von Wachstumsphase der Zellen und Alter der Zellsuspension.

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden vor und nach Zugabe von 350 mM Glucose gemessen und die Signale der Zuckerphosphate und Nukleotide durch Kalibrierung mit TEP als internem Standard quantifiziert.

Zellsuspension <sup>a)</sup>	NTP-Maximum <sup>b)</sup>	ZP-Bildung <sup>c)</sup>
exp, < 3.5 h	22	2.3
stat, < 3.5 h	15	1.8
exp, > 3.5 h	13	1.6

a) Die eingesetzten Zellen wurden in der exponentiellen (exp) oder stationären (stat) Wachstumsphase geerntet, die daraus gewonnenen Zellsuspensionen wurden vor der Messung kürzer (< 3.5 h) oder länger (> 3.5 h) als 3.5 h auf Eis gehalten.

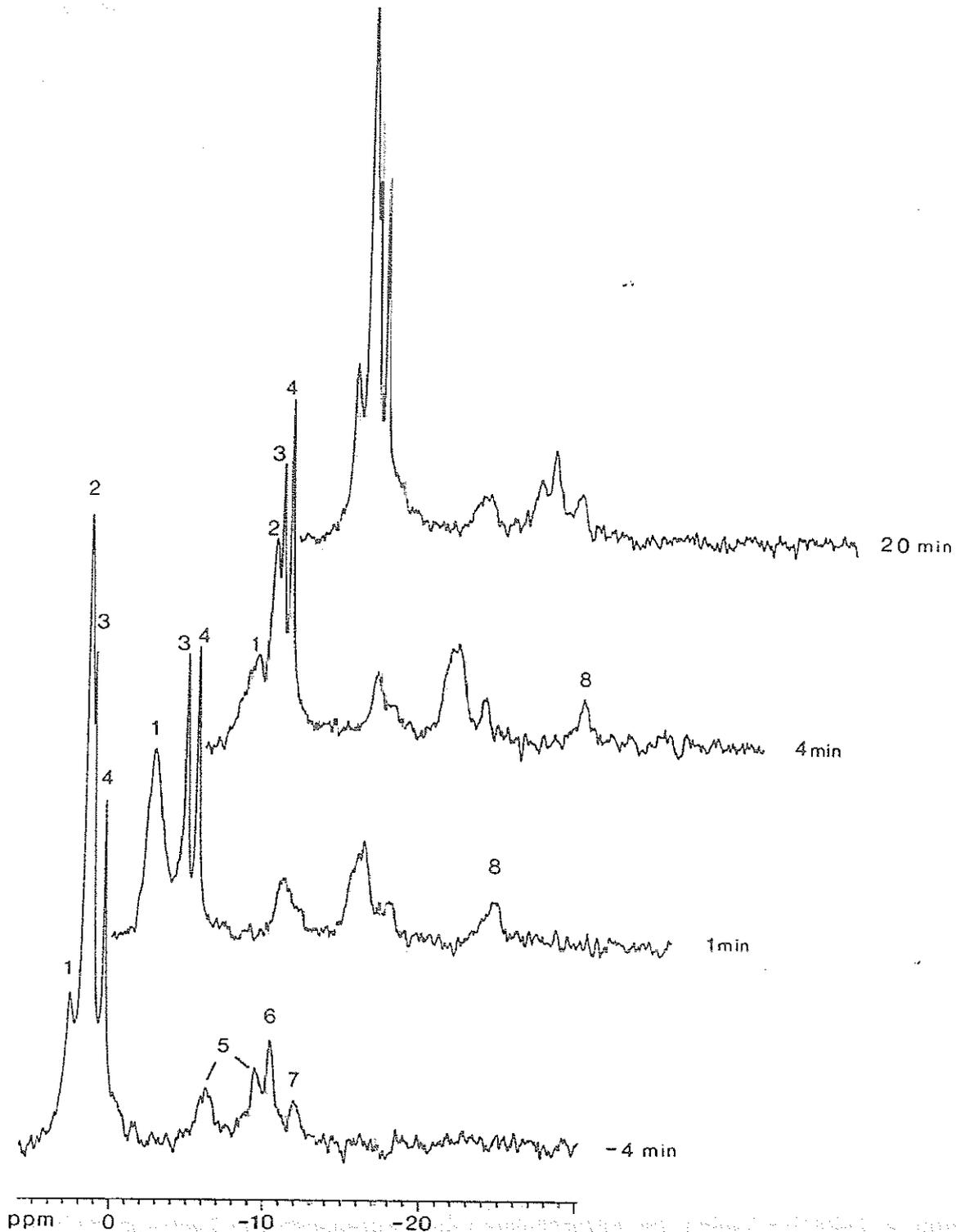
b) Relative Einheiten, 100 = TEP; NTP = 0 vor Glucosezugabe.

c) Quotient aus (Signalintensität der ZP 1 min nach Glucosezugabe) / (Signalintensität der ZP 1 min vor Glucosezugabe).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle *in-vivo*-Messungen in 10-mm-Röhrchen Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt. Sie wurden in EDTA-haltigem Puffer gewaschen und resuspendiert und nicht länger als 3.5 h vor der Messung auf Eis aufbewahrt.

Während des Glucoseumsatzes durch Zellsuspensionen konnten folgende Signale identifiziert werden (siehe Abb. 1): Zuckerphosphate und UDP-Zucker, internes und externes anorganisches Phosphat, Triethylphosphat (TEP), NAD(H), Nukleosid-Diphosphate (NDP) und Nukleosid-Triphosphate (NTP). Die Konzentrationen der phosphorylierten Metabolite wurden mit Hilfe des internen Standards TEP als relative Signalintensitäten bestimmt. Während einer Messreihe konnte die Probe durch die  $\text{CO}_2$ -Entwicklung verdünnt werden, d.h. die Signalintensitäten nahmen durch die im Messvolumen entstehenden Gasblasen ab. Um solche Intensitätsschwankungen auszugleichen, wurden die Signalintensitäten eines Spektrums jeweils relativ zu der TEP-Intensität bestimmt.

Nach einem Glucosepuls verdoppelte sich die Intensität des Zuckerphosphat-Signals, während die Konzentration des internen Phosphats sank (Abb. 2). Gleichzeitig verschob sich das Zuckerphosphat-Signal um ca. 0.5 ppm nach links (Abb. 1). Eine Ursache war eine pH-abhängige Verschiebung des Signals infolge eines Anstiegs des zellinternen pH-Werts (siehe unten). Die Verschiebung des Zuckerphosphat-Signals könnte jedoch zusätzlich auf die Bildung von weiteren Intermediaten hinweisen, die vor dem Glucosepuls nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden waren.



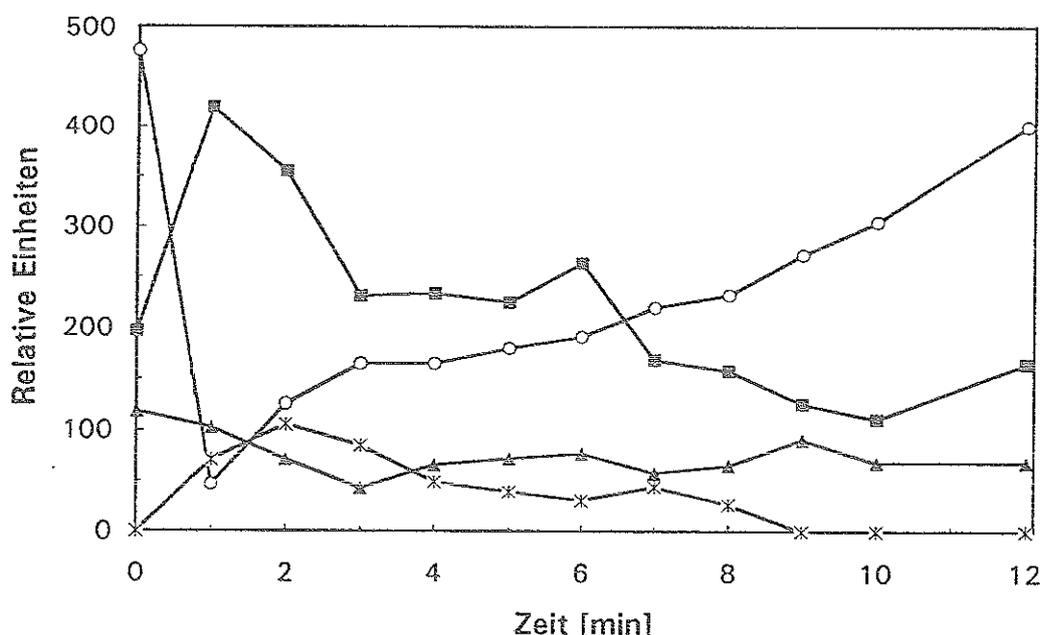
**Abb. 1:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren bei 162 MHz von einer *Z. mobilis*-Suspension

( $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml, in MES-Puffer, pH 5.8,  $30^\circ\text{C}$ ).

Spektren wurden vor (-4 min) und nach (1, 4 und 20 min) Zugabe von 350 mM Glucose bei einer Messzeit von 1 min aufgenommen. 1: Zuckerphosphate; 2/3: intra- und extrazelluläres Phosphat; 4: TEP; 5: NDP; 6: NAD, NADH; 7: UDP-Zucker; 8:  $\beta$ -NTP ( $\alpha$ -NTP und  $\gamma$ -NTP überlappen mit den NDP-Signalen, 5).

Dem Anstieg der Zuckerphosphat-Konzentration folgte die Bildung von Nukleosid-Triphosphaten (NTP) bei gleichzeitiger Abnahme des Nukleosid-Diphosphat-Levels (Abb. 2). Die chemische Verschiebung des  $\beta$ -NTP-Signals zwischen -18 und -19 ppm (Abb. 1) wies darauf hin, daß die NTP mit  $Mg^{2+}$ -Ionen komplexiert sind. Dies konnte durch Referenzmessungen von ATP in Gegenwart bzw. Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  gezeigt werden: Für [ATP-Mg] bzw. freies ATP wurde bei pH 5.8 eine chemische Verschiebung von -18.5 ppm bzw. -21.8 ppm gemessen (nicht gezeigt). Nach 4 min ging die Intensität des Zuckerphosphat-Signals zurück und nach 9 min waren keine NTP mehr nachweisbar (Abb. 2). Die Intensitäten von NAD, NADH und UDP-Zuckern blieben bis zu 20 min nach Glucosezugabe konstant.

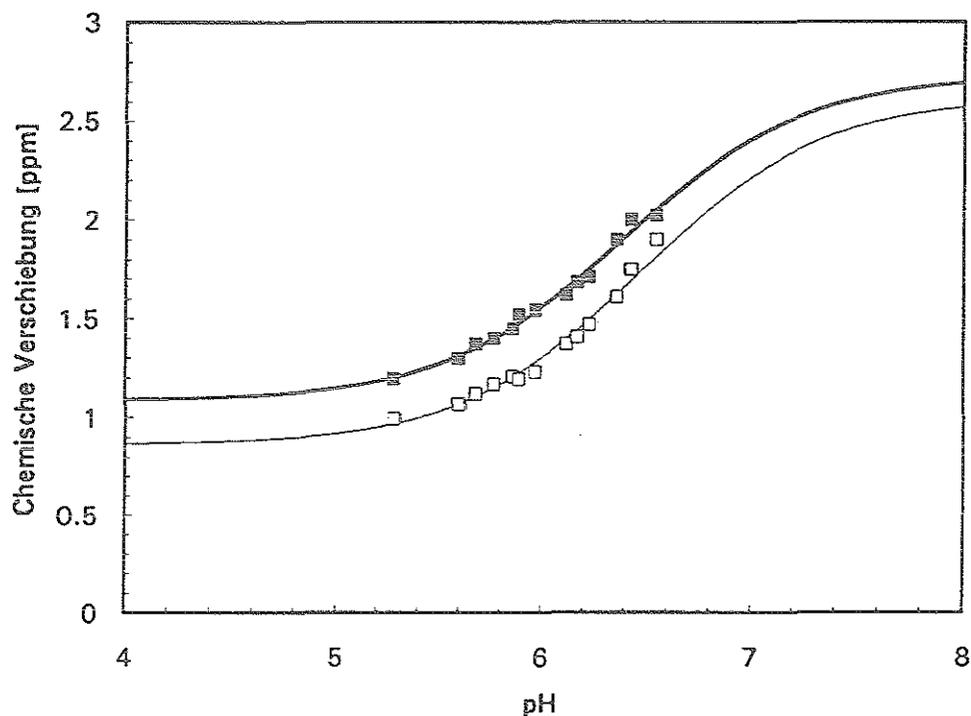
Die Glucose wurde jeweils vollständig umgesetzt. Dies wurde durch eine enzymatische Analyse der Ansätze nach Abschluß der NMR-Messungen kontrolliert.



**Abb. 2:** Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Konzentrationen von Zuckerphosphaten, internem anorganischem Phosphat, NTP und NDP in einer *Z. mobilis*-Zellsuspension ( $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml) nach Zugabe von 350 mM Glucose. Die Konzentrationen wurden aus den Signalintensitäten in sequentiellen  $^{31}P$ -NMR-Spektren ermittelt.

■ : Zuckerphosphate; ○ : internes anorganisches Phosphat; \* : NTP; Δ : NDP.

Die intra- und extrazellulären pH-Werte konnten aus den chemischen Verschiebungen der Signale für internes und externes Phosphat bestimmt werden. Dazu wurde eine Eichkurve der chemischen Verschiebungen dieser Signale in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgestellt (Abb. 3). Die Daten dieser Eichkurve wurden mit Messansätzen aus *Z. mobilis*-Zellsuspensionen ermittelt, die denjenigen für die Untersuchung des Glucoseumsatzes entsprachen. Allerdings wurde statt Glucose der Entkoppler CCCP (100  $\mu$ M) zugesetzt. In dieser Weise deenergetisierte Zellen können keinen pH-Gradienten aufbauen (Ruhmann, 1993), d.h. es gilt  $\text{pH}(\text{in}) = \text{pH}(\text{ex})$ . Damit konnten die gemessenen chemischen Verschiebungen jeweils dem extern bestimmten pH-Wert zugeordnet werden. Der Verlauf der Titrationskurve wurde nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung durch Minimierung der quadratischen Abweichung an die Meßwerte angepaßt und die chemische Verschiebung des  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ - bzw.  $\text{HPO}_4^{2-}$ -Ions sowie der pk-Wert bestimmt (Tab. 5).



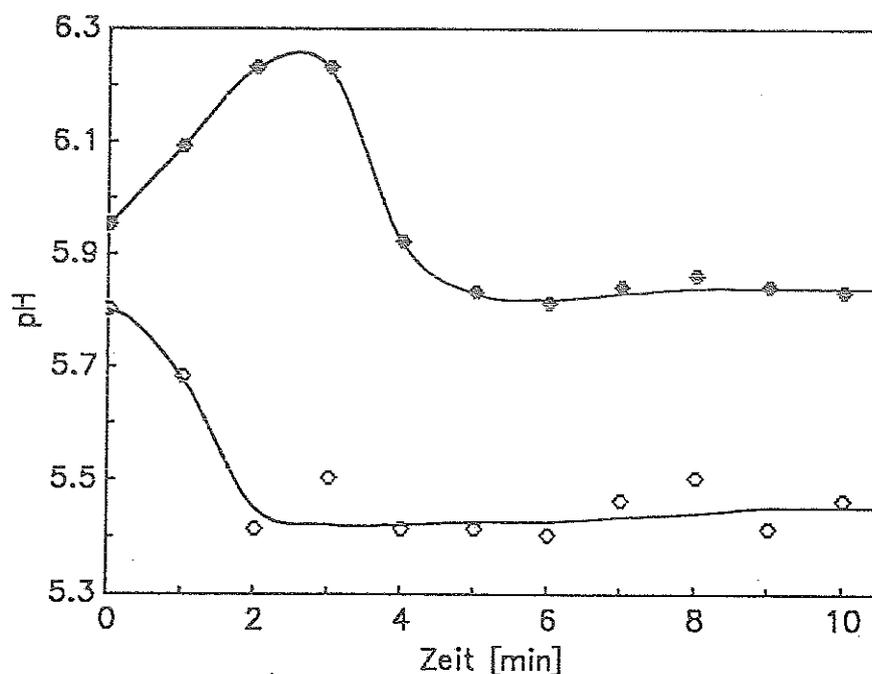
**Abb. 3:** Chemische Verschiebung der Signale des internen (■) und externen (□) Phosphats von *Z. mobilis*-Zellsuspensionen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Suspensionen deenergetisierter Zellen wurden in einem pH-Bereich von 5.2 bis 6.6 aufgenommen. Die Titrationskurven wurden nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung an die Daten angepaßt.

**Tab. 5:** Die chemische Verschiebung  $\delta$  der Phosphationen  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  bzw.  $\text{HPO}_4^{2-}$  und die  $\text{pK}$ -Werte des internen und externen anorganischen Phosphats in *in-vivo*-NMR-Spektren von *Z. mobilis*-Zellsuspensionen ohne Glucosezusatz. Die Bestimmung erfolgte durch Anpassung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung an die Meßwerte der in Abb. 3 gezeigten Phosphat-Eichkurve.

	$\delta (\text{H}_2\text{PO}_4^-)$	$\delta (\text{HPO}_4^{2-})$	$\text{pK}$
internes Phosphat	1.08	2.73	6.40
externes Phosphat	0.86	2.62	6.48

Die intra- und extrazellulären pH-Werte in *Z. mobilis*-Zellsuspensionen konnten aus den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren des Glucoseumsatzes (siehe Abb. 1) bestimmt werden. Die chemischen Verschiebungen des internen und externen anorganischen Phosphats wurden für die vor und nach Glucosepuls aufgenommenen Spektren mit Hilfe der AMX-Software bestimmt. Anschließend konnten über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung und die in Tab. 5 aufgeführten Werte für  $\delta (\text{H}_2\text{PO}_4^-)$ ,  $\delta (\text{HPO}_4^{2-})$  und  $\text{pK}$  die pH-Werte berechnet werden. Nach Zugabe von Glucose zu *Z. mobilis*-Zellsuspensionen stieg in den Zellen der pH-Wert zunächst um 0.2 bis 0.3 Einheiten an und es wurde ein pH-Gradient von bis zu 0.8 pH-Einheiten gebildet (Abb. 4).



**Abb. 4:** Intra- (●) und extrazellulärer (○) pH nach Zugabe von Glucose zu einer *Z. mobilis*-Zellsuspension.

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden vor und nach Zugabe von 350 mM Glucose aufgenommen und aus der chemischen Verschiebung des internen und externen Phosphats die pH-Werte ermittelt.

### 3.1.2 *In-vitro*-<sup>31</sup>P-NMR-Messungen

#### 3.1.2.1 Identifizierung und Quantifizierung der Signale von Extraktspektren

Das nächste Ziel bei der Untersuchung des Glucoseumsatzes in *Z. mobilis* war die Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen einzelner Metabolite, um so die summarische Auswertung der *in-vivo*-Experimente zu ergänzen. Durch die Perchlorsäure-Extraktion wurden einzelne Phasen eines *in vivo* in wenigen Minuten ablaufenden Glucosepulses festgehalten. Extraktmessungen boten die Möglichkeit, durch optimale Probenvorbereitung und lange Meßzeiten Spektren mit hoher Auflösung und mit sehr gutem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu erhalten.

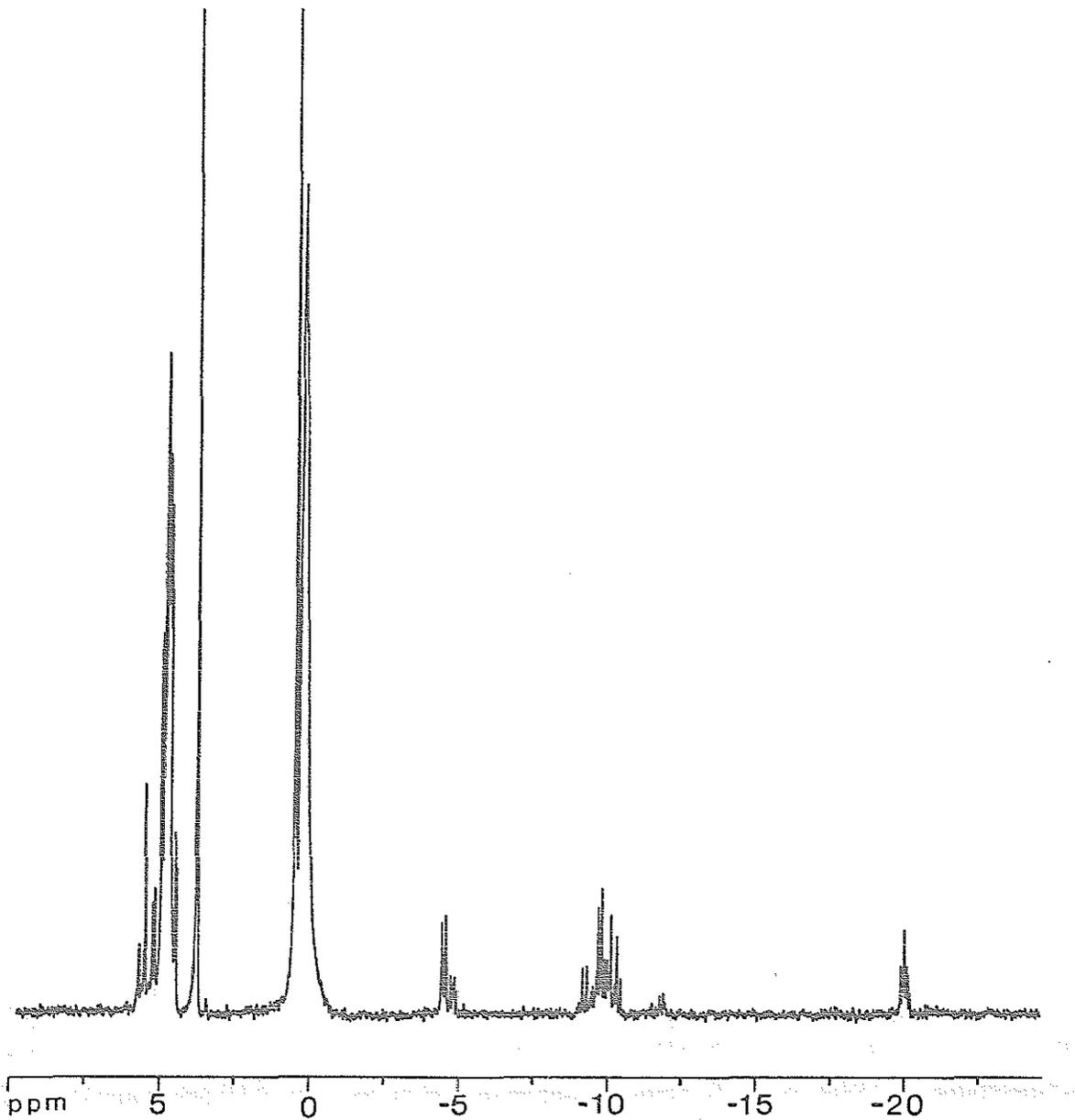
Aus folgenden Gründen wurden für die Extraktionsversuche dichte Zellsuspensionen ( $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml) wie in den *in-vivo*-Messungen verwendet:

1. Die Ergebnisse der Extraktserien sollten mit den *in-vivo*-Messungen vergleichbar sein.
2. Die Extraktserien dienten als Kontrolle dafür, daß der Stoffwechsel während der *in-vivo*-Messungen nicht durch das Magnetfeld beeinflusst wurde.
3. Nur durch Einsatz von ca. 0.5 g Trockenzellmasse pro Extraktion konnte ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis in den Spektren erhalten werden.

Die hohe Zelldichte der extrahierten Suspensionen könnte zur Bestimmung falscher intrazellulärer Konzentrationen führen, falls der Glucoseumsatz nicht in allen Zellen weitestgehend synchron verläuft, z.B. durch Lyse der Zellen oder durch inhomogene Substratverteilung in der Probe. In Kontrollen wurde jedoch gezeigt, daß die hohe Zellkonzentration nicht zu den angesprochenen Problemen führte: Extrakte aus Suspensionen der OD 500 bzw. 100 ergaben vergleichbare <sup>31</sup>P-NMR-Spektren. Lediglich das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis der Spektren von Extrakten aus Suspensionen mit OD 500 war besser, daher war die quantitative Auswertung dieser Extrakte genauer.

*Z. mobilis*-Zellsuspensionen wurden 15 min bei 30°C inkubiert und nach einem Zeitraum von 0.5 bis 15 min nach Glucosezugabe wurden die Zellen mit Perchlorsäure aufgeschlossen. Wie Abb. 5 zeigt, gruppieren sich in den <sup>31</sup>P-NMR-Spektren von Perchlorsäure-Extrakten die Signale der Zuckerphosphate und Nukleotide in fünf Abschnitten des Spektrums. Daher war eine gute Auflösung der dicht beieinanderliegenden Signale die Voraussetzung für eine quantitative Auswertung. Es zeigte sich, daß die Linienbreite der Extraktspektren u.a. durch paramagnetische Komponenten, Komplexbildung phosphorylierter Substanzen mit Mg<sup>2+</sup> sowie pH- und Temperaturschwankungen beeinflusst wurde. Daher mußten die Proben in geeigneter Weise vorbereitet und die Messbedingungen so gewählt werden, daß reproduzierbar geringe Linienbreiten erzielt werden konnten. Dann lagen die Linienbreiten z.B. des

Standards TEP zwischen 1.4 und 2.0 Hz. Im folgenden wird auf die für die spektrale Auflösung wichtigsten Faktoren näher eingegangen.



**Abb. 5:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum bei 162 MHz von einem Perchlorsäure-Extrakt (pH 8.30)

einer *Z. mobilis*-Zellsuspension.

Die Suspension ( $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml) wurde mit 350 mM Glucose versetzt und nach 2 min mit Perchlorsäure extrahiert. Zur Aufnahme des Spektrums wurden 1800 Messpulse akkumuliert.

### Paramagnetische Komponenten und Komplexbildung

Erste Messungen von Perchlorsäure-Extrakten waren aufgrund von Linienbreiten bis zu 10 Hz im Bereich der Zuckerphosphate nicht für eine quantitative Auswertung geeignet. Eine Verbreiterung der Signale im Spektrum konnte durch paramagnetische Komponenten verursacht worden sein, da diese die transversale Relaxation verstärken (Sanders und Hunter, 1989). Um den Einfluß paramagnetischer Komponenten in den Extrakten auf die Linienbreite der Spektren zu beurteilen, wurde eine Analyse der Perchlorsäure-Extrakte in der Zentralabteilung für chemische Analysen der KFA Jülich durchgeführt. Diese Untersuchung ergab, daß die Extrakte Fe, Cr, Cu, Ni, Co und Mn enthielten (Tab. 6). Je nach Ladungszahl können diese Elemente paramagnetisch sein (Holleman-Wiberg, 1985) und somit die spektrale Auflösung der Spektren beeinträchtigen.

**Tab. 6:** Elementaranalyse eines Perchlorsäure-Extraktes einer *Z. mobilis*-Zellsuspension. Die Analyse wurde mittels Atomemissions-Spektroskopie an der Zentralabteilung für chemische Analysen der KFA Jülich durchgeführt. Die Konzentrationen sind in mM, bezogen auf das NMR-Probenvolumen (3ml), angegeben.

Element Konzentration	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn
	1400	52	0.1	32	0.1	0.1
unter 0.1 mM:	Al, B, As, Cr, Pb					
unter 0.1 µM:	Cu, Ni, Co, Mo, Mn, Ti					

Während paramagnetische Komponenten die Linienbreiten aller Signale beeinflussen, können auch die Signale einzelner phosphorylierter Substanzen durch spezifische Wechselwirkungen mit Ionen verbreitert werden. Es zeigte sich, daß in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen das  $\beta$ -ATP-Signal verbreitert war, sodaß seine Triplett-Struktur nicht aufgelöst wurde (Tab. 7). ATP kann als freies Ion und als  $Mg^{2+}$ -Komplex vorliegen. Aufgrund des schnellen Austausches zwischen beiden Formen ist im Spektrum nur noch ein breites Signal zu sehen, das aus der Überlagerung beider Signale entsteht (Hausser und Kalbitzer, 1989). Nach der Elementaranalyse wurde mit einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von ca. 30 bis 40 mM in den Extrakten gerechnet (Tab. 6). In Referenzmessungen mit Reinsubstanzen war das  $\beta$ -ATP-Signal und das Phosphat-Signal auch ohne  $Mg^{2+}$ -Zusatz verbreitert (Tab. 7). Dies beruhte auf eingeschleppten paramagnetischen Ionen, die in Spuren im Phosphat bzw. ATP vorhanden sind. Durch Überschuß von EDTA konnte sowohl der Austausch zwischen Mg-ATP und ATP als auch der Einfluß der paramagnetischen Ionen verhindert und damit eine geringe Linienbreite erzielt werden

(Tab. 7). In den Perchlorsäure-Extrakten erwies sich 75 mM EDTA als optimal, um die Verbreiterung der Signale durch paramagnetische Komponenten und Komplexbildung auszuschließen.

Tab. 7: Einfluß der Konzentrationen  $c$  von  $Mg^{2+}$  und EDTA auf die Linienbreite  $\Delta\nu_{1/2}$ . Wässrige Lösungen von ATP und Phosphat wurden bei pH 8.30 mit 64 Pulsen gemessen und nach Fourier-Transformation die Linienbreite der Signale bestimmt.

$c(Mg^{2+})$	$c(EDTA)$	$\Delta\nu_{1/2}(P_i)$	$\Delta\nu_{1/2}(\beta\text{-ATP})$
0	0	2.10	> 30
5	0	1.95	> 30
0	5	1.70	1.90
0	50	1.40	1.60
30	50	1.40	1.95

#### *pH- und Temperaturschwankungen*

Sowohl der pH-Wert als auch die Temperatur der Probe beeinflussen die chemische Verschiebung der Signale in  $^{31}P$ -NMR-Spektren. Tab. 8 zeigt den Einfluß des pH-Werts auf die Linienbreite: Während bei pH 8.30 eine gute Auflösung erzielt wurde, war eine quantitative Bearbeitung der bei pH 6.0 aufgenommenen Spektren nicht möglich, da hier die Signale zu breit waren.

Tab. 8: Einfluß des pH-Werts auf die Linienbreiten  $\Delta\nu_{1/2}$  in  $^{31}P$ -NMR-Spektren von Perchlorsäure-Extrakten.

3PG: 3-Phosphoglycerat;  $P_i$ : anorganisches Phosphat.

pH	$\Delta\nu_{1/2}(3PG)$ [Hz]	$\Delta\nu_{1/2}(P_i)$ [Hz]	$\Delta\nu_{1/2}(TEP)$ [Hz]	$\Delta\nu_{1/2}(\beta\text{-ATP})$ [Hz]
6.0	9.0	15.0	1.8	60
8.3	1.9	1.7	1.7	3.0

Die Titrationskurven phosphorylierter Substanzen sind im Alkalischen relativ flach (Abb. 3), d.h. die chemische Verschiebung ändert sich in diesem pH-Bereich nur wenig. Dies ist wichtig im Zusammenhang mit der pH- und Temperaturkonstanz während einer NMR-Messung. Durch die Messpulse wird die Probe erwärmt und diese Temperaturänderungen können über die Änderungen der Dissoziationskonstanten phosphorylierter Metabolite den pH-Wert beeinflussen. In gut gepufferten Lösungen

kann sich auch das Verhältnis zwischen protonierter und deprotonierter Form ändern (Morris, 1976). In beiden Fällen führen die Temperaturschwankungen zur Verschiebung der Peakposition. Somit äußern sich Temperaturschwankungen in Bruchteilen von °C im Laufe der Messung als Linienverbreiterung im Spektrum. Daher wurden die Extrakte bei pH 8.30, gepuffert mit 50 mM Tris-Puffer, gemessen, um die Verschiebung der Peakposition möglichst gering zu halten. Außerdem wurden jeder Messung Pulse vorgeschaltet, die nicht zur Akkumulation des Spektrums dienten. Während dieser 'dummy scans' konnte sich die Temperaturregelung auf die Probe einregeln.

Ein alkalischer pH-Wert der Proben war nicht zuletzt deshalb günstig, weil ATP und UTP in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  im Alkalischen stabiler sind als bei pH-Werten unter 7.

Für die Identifizierung und Quantifizierung der Signale mußte ein geeigneter Standard gefunden werden. Im Allgemeinen wird in der  $^{31}P$ -NMR-Spektroskopie 85%ige Phosphorsäure als externer Standard in einer Kapillare im Probenröhrchen eingesetzt. Da das Signal jedoch relativ breit ist und mit anderen Monophosphat-Signalen überlagern kann, ist für die Quantifizierung dem externen ein interner Standard vorzuziehen (Hausser und Kalbitzer, 1989). Ein interner Standard muß chemisch stabil sein, mit anderen Komponenten der Probe keine Wechselwirkungen eingehen und eine von pH-Wert und Ionenstärke unabhängige chemische Verschiebung haben. Es wurden Triethylphosphat (TEP) (Kirk et al., 1986), Phosphocreatin, Methanphosphonsäure-dimethylester (DMMP) (Hausser und Kalbitzer, 1989) und Glycerophosphoryl-Cholin (Navon et al., 1979) auf ihre Eignung als Standards für die Extraktmessungen geprüft. Glycerophosphoryl-Cholin war nicht geeignet, da käufliche Lösungen in zu geringer Konzentration angeboten werden. Die Ergebnisse für TEP, Phosphocreatin und DMMP sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

**Tab. 9:** Eigenschaften von phosphorylierten Substanzen, die als Standard für die  $^{31}P$ -NMR-Spektroskopie eingesetzt werden können.

$^{31}P$ -Spektren von 10 mM TEP, Phosphocreatin (PCr) und Methanphosphonsäure-dimethylester (DMMP) (pH 8.30) wurden in Abständen von mehreren Stunden aufgenommen und die Signalintensität und Linienbreite bestimmt. Außerdem wurde durch Titration mit 5N HCl der Einfluß des pH-Werts auf die chemische Verschiebung untersucht.

	TEP	DMMP	PCr
Linienbreite [Hz]	1.3	n.b.	2.5
Stabilität	+	-	+
chem. Verschiebung	0.44 ppm	39 ppm	-2.12 ppm
pH-Verschiebung	nein	ja	ja

DMMP hydrolysierte vollständig im Laufe von 14 h. Im Hinblick auf die langen Meßzeiten der Extrakte schloß dies eine Anwendung von DMMP aus. Phosphocreatin war stabil, aber seine chemische Verschiebung variierte mit dem pH-Wert. TEP war stabil, hatte eine vom pH-Wert und der Ionenstärke unabhängige chemische Verschiebung und eine geringe Linienbreite. Allerdings überlagerten sich in den Extraktspektren die Signale von TEP (0.44 ppm) und Phosphoenolpyruvat (0.46 ppm). Daher wurden die Extrakte zunächst ohne TEP gemessen, um eventuell vorhandenes Phosphoenolpyruvat zu detektieren. Nach einer zweiten Messung des Extrakts mit TEP wurden die Spektren ausgewertet.

Durch Zugabe von Reinsubstanzen wurden die Signale der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Extrakten zugeordnet und die Konzentrationen der Metabolite in der Probe bestimmt. Literaturdaten konnten nicht zur Identifizierung genutzt werden, da sie bis zu 1 ppm voneinander abweichen und in Extraktspektren im Bereich von 1 ppm bis zu zehn verschiedene Signale auftraten (siehe Abb. 6). Außerdem wurde durch die Zugabe jeder Reinsubstanz ihr spezifischer Kalibrierungsfaktor C ermittelt. Er gibt die relative spezifische Signalintensität einer Substanz bezogen auf den Standard TEP nach folgender Gleichung (IE, Signalintensität; c, Konzentration) an:

$$C = (IE_X/c_X) \cdot (c_{\text{TEP}}/IE_{\text{TEP}})$$

In Tab. 10 sind die chemischen Verschiebungen und die Kalibrierungsfaktoren C der Metabolite, die in den Extraktspektren identifiziert wurden, zusammengefaßt. Mit Hilfe des Kalibrierungsfaktors wurden aus den Signalintensitäten (IE) in den Extraktspektren die intrazellulären Konzentrationen (conc) der Metabolite nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{conc}_X = (IE_X/IE_{\text{TEP}}) \cdot (\text{conc}_{\text{TEP}}/C_X) \cdot (\text{Vol}_{\text{Probe}}/\text{Vol}_{\text{Z}})$$

$\text{Vol}_{\text{Probe}}$ : das Volumen von Extraktionsansatz und NMR-Probe betrug jeweils 3 ml.

$\text{Vol}_{\text{Z}}$ : das intrazelluläre Volumen der im Extraktionsansatz eingesetzten Zellsuspension.

Das intrazelluläre Volumen der Zellen wurde parallel zur Perchlorsäure-Extraktion bestimmt. Es betrug 2.25  $\mu\text{l}/\text{mg}$  TG. Das intrazelluläre Volumen des Extraktionsansatzes wurde über die OD und eine OD/TG-Eichung (0.23 g TG/ OD 1.0) berechnet. Es betrug bei allen Ansätzen zwischen 27 und 30% des Probevolumens.

Tab. 10: Chemische Verschiebungen  $\delta$  und Kalibrierungsfaktoren C von Metaboliten in  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von *Z. mobilis*-Extrakten bei pH 8.30.

Metabolit	$\delta$ a)	Mult./	C <sup>c)</sup>
	[ppm]	J[Hz] <sup>b)</sup>	
6-Phosphogluconat	5.66 ± 0.03	s	1.49
Glucose-6-Phosphat	5.46 ± 0.03	s	1.36
Sedoheptulose-7-Phosphat	5.24 ± 0.03	s	0.71
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	5.16 ± 0.06	s	
3-Phosphoglycerat	5.09 ± 0.06	s	1.41
Coenzym A	5.05 ± 0.03	s	1.38
KDPG	4.89 ± 0.01	s	2.60
KDPG	4.76 nb	s	nb <sup>d)</sup>
KDPG	4.70 nb	s	nb
AMP	4.75 ± 0.04	s	1.62
UMP	4.66 ± 0.05	s	0.94
2-Phosphoglycerat	4.59 ± 0.03	s	1.20
NADPH	4.56 ± 0.03	s	1.88
NADP	4.49 ± 0.03	s	1.97
Phosphat	3.74 ± 0.04	s	nb
Phosphoenolpyruvat	0.46 ± 0.02	s	1.04
$\gamma$ -ATP	-4.52 ± 0.04	d(19.3)	1.44
$\gamma$ -UTP	-4.57 ± 0.02	d(19.4)	1.60
$\beta$ -ADP	-4.86 ± 0.05	d(21.7)	1.31
$\beta$ -UDP	-4.93 ± 0.03	d(21.9)	1.57
$\alpha$ -ADP	-9.29 ± 0.05	d(21.7)	1.52
$\alpha$ -UDP	-9.42 ± 0.02	d(21.9)	1.44
$\alpha$ -ATP	-9.78 ± 0.02	d(19.0)	nb
$\alpha$ -UTP	-9.89 ± 0.03	d(19.2)	1.43
Coenzym A	-9.61 -10.11 ± 0.01	d(20.3)	4.47
NADH	-10.06 ± 0.05	s	3.85
NADP	-10.10 -10.43 ± 0.01	d(20.5)	3.52
NAD	-10.11 -10.43 ± 0.01	d(20.5)	3.22
UDP-Glucose	-10.08 -11.63 ± 0.01	d(20.1)	3.54
$\beta$ -ATP	-19.99 ± 0.03	t(19.2)	1.66
$\beta$ -UTP	-20.08 ± 0.02	t(19.2)	1.78

a) Chemische Verschiebung  $\delta$  bezüglich 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$   $\pm$  Schwankungen aufgrund geringfügig unterschiedlicher Ionenstärke oder pH-Werte der Extrakte.

b) Multiplizität: s, Singulett; d, Dublett; t, Triplett  
und J: Kopplungskonstante in Hz

c) Kalibrierungsfaktor (Bestimmung s. Text)

d) nicht bestimmt

### 3.1.2.2 Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen nach einem Glucosepuls

Der zeitliche Verlauf intrazellulärer Metabolitkonzentrationen nach einem Glucosepuls in *Z. mobilis* konnte durch  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie von Perchlorsäure-Extrakten bestimmt werden. Wie Abb. 6 zeigt, konnten folgende phosphorylierte Intermediate des Glucoseumsatzes über den Entner-Doudoroff-Weg in den Extraktenspektren nachgewiesen werden: Glucose-6-Phosphat, 6-Phosphogluconat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und 3-Phosphoglycerat.

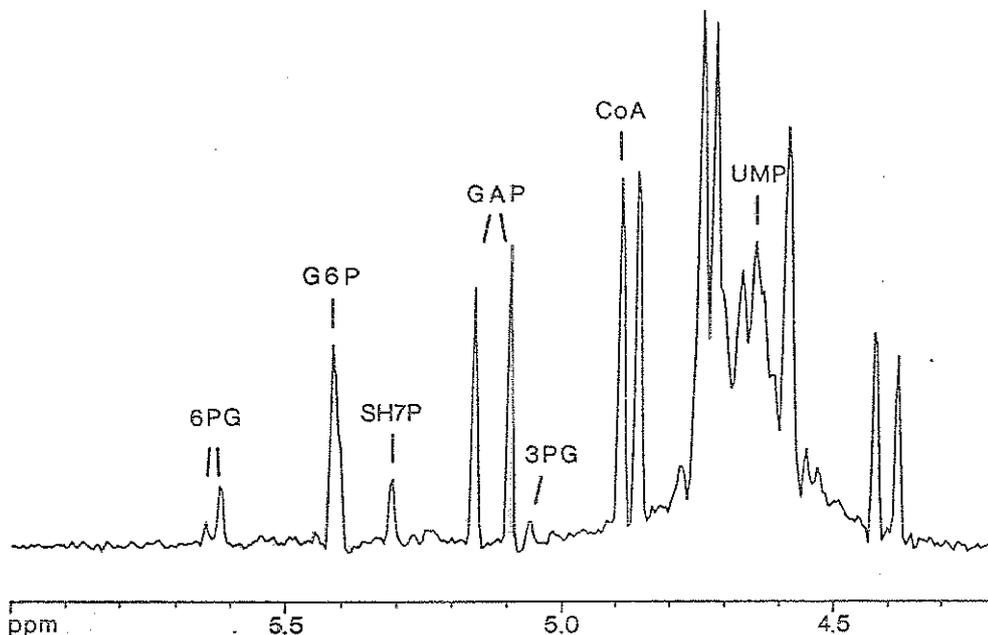


Abb. 6: Zuckerphosphat-Region von einem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum eines Perchlorsäure-Extrakts von *Z. mobilis*.

Die Extraktion wurde 1 min nach Zugabe von 350 mM Glucose zu einer Zellsuspension ( $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml) durchgeführt. 6PG: 6-Phosphogluconat; G6P: Glucose-6-Phosphat; SH7P: Sedoheptulose-7-Phosphat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; CoA: Coenzym A.

Zwischen 5.0 und 4.3 ppm wurden die Resonanzen von Coenzym A, AMP, UMP, NADPH und NADP durch Zugabe der Reinsubstanzen nachgewiesen. Die intrazellulären Konzentrationen von Coenzym A betragen zwischen 3 und 6 mM. Das UMP-Signal konnte in Spektren von Extrakten aus Zellsuspensionen vor Glucosezugabe identifiziert

werden. Nach dem Glucosepuls nahm seine Intensität ab, sodaß es durch andere Resonanzen überlagert wurde und nicht quantifiziert werden konnte. AMP wurde von zwei Signalen mit konstant hoher Intensität bei 4.7 ppm überlagert, daher konnte seine intrazelluläre Konzentration nicht bestimmt werden. Die restlichen ungefähr 75% der Resonanzen zwischen 5.0 und 4.3 ppm (Abb. 6) konnten nicht identifiziert werden. Es handelte sich um Signale, deren Intensitäten vor und nach Glucosepuls konstant blieben. Vier Intermediate des Entner-Doudoroff-Wegs konnten nicht nachgewiesen werden: KDPG, 1,3-Bisphosphoglycerat, 2-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat. 1,3-Bisphosphoglycerat konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, da es eine sehr instabile Substanz ist (Negeläin und Noll, 1984).

Die Signale von 2-Phosphoglycerat und KDPG lagen in einem Bereich mehrerer nicht identifizierter Resonanzen (siehe Abb. 6, 5.0 bis 4.3 ppm). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Signale überlagert wurden, falls 2-Phosphoglycerat und KDPG in Konzentrationen unter 1 mM in den Extrakten vorlagen.

Phosphoenolpyruvat wurde zu keinem Zeitpunkt vor bzw. nach Glucosezugabe nachgewiesen. Um eine Überlagerung durch den Standard TEP auszuschließen, wurden alle Proben zunächst ohne TEP gemessen, anschließend interner Standard zugesetzt und nochmals ein NMR-Spektrum aufgenommen. Folgende Kontrolle wurde durchgeführt, um auszuschließen, daß Phosphoenolpyruvat im Laufe der Extraktion oder der NMR-Messung hydrolysierte:

Zu Ansätzen für die Perchlorsäure-Extraktion wurden Reinsubstanzen in bekannter Konzentration hinzugegeben und ihre Konzentration nach Extraktion, Aufarbeitung und NMR-Messung bestimmt (Tab. 11).

Tab. 11: Stabilität von Reinsubstanzen im Laufe der Perchlorsäure-Extraktion von *Z. mobilis*-Zellsuspensionen.

Reinsubstanzen wurden dem Extraktionsansatz hinzugefügt und die Wiederfindungsrate R als Quotient der Konzentrationen im Extrakt und im Ansatz bestimmt.

Substanz	R
2-Phosphoglycerat	0.9
Erythrose-4-Phosphat	0.08
Phosphoenolpyruvat	0.9
ATP	0.9
Glucose-6-Phosphat	1.1

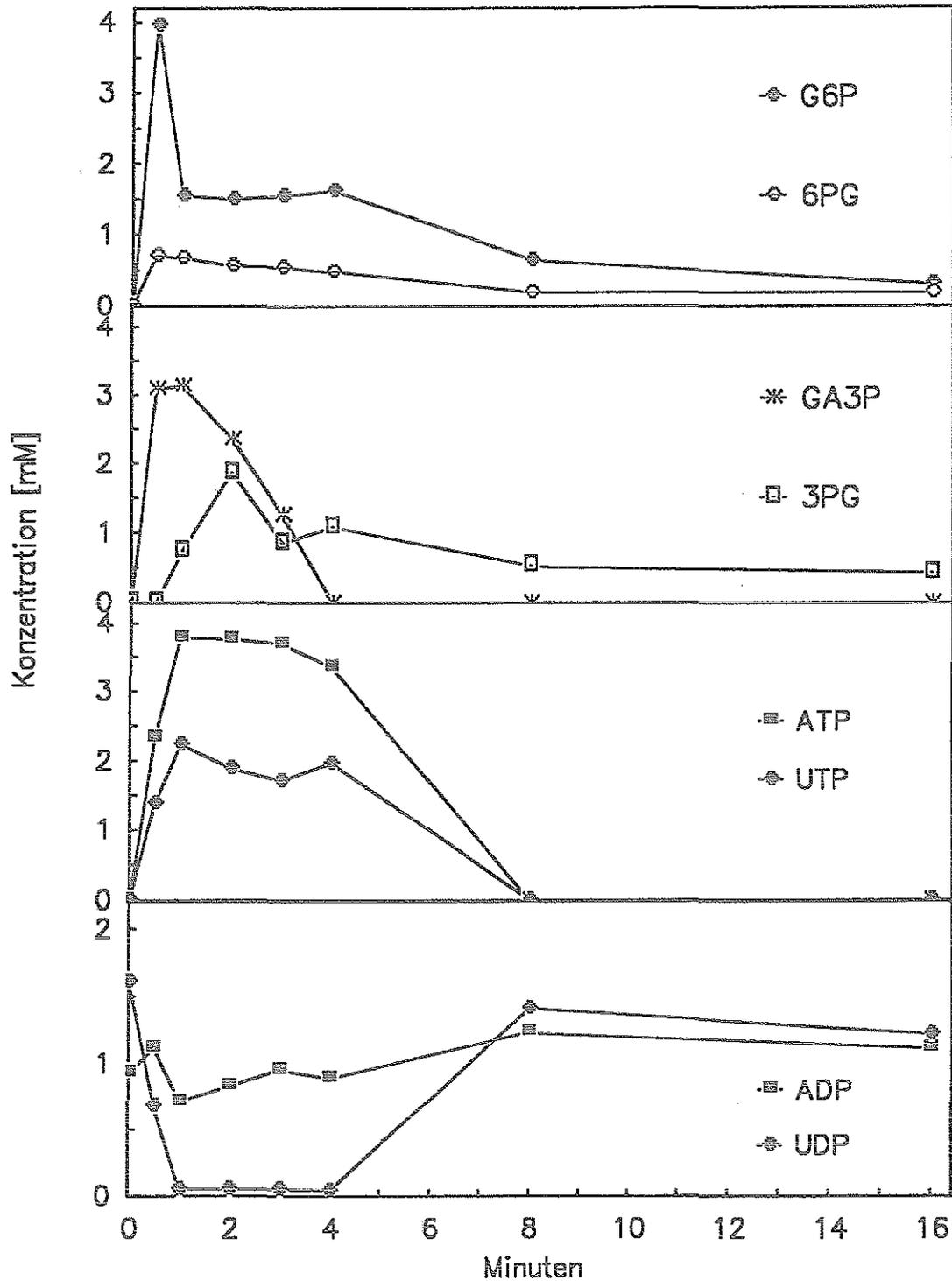


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Konzentrationen von 6-Phosphogluconat, Glucose-6-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-Phosphoglycerat, ATP, UTP, ADP und UDP in einer *Z. mobilis*-Zellsuspension nach Glucosezugabe. Die Suspensionen ( $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml) wurden mit 350 mM Glucose versetzt und nach einem Zeitraum von 0.5 bis 15 min mit Perchlorsäure extrahiert. Die Konzentrationen der Metabolite wurden aus den Signalintensitäten in den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der Extrakte bestimmt.

6PG: 6-Phosphogluconat; G6P: Glucose-6-Phosphat;  
 GA3P: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; 3PG: 3-Phosphoglycerat;

Wie Tab. 11 zeigt, wurde Phosphoenolpyruvat wie auch 2-Phosphoglycerat, Glucose-6-Phosphat und ATP zu annähernd 100% wiedergefunden. Als Negativkontrolle wurde aufgrund seiner Instabilität Erythrose-4-Phosphat (Ballou et al., 1955) eingesetzt und zu 8% wiedergefunden. Daraus folgte, daß Phosphoenolpyruvat in den Extrakten nachweisbar gewesen wäre. Seine intrazelluläre Konzentration blieb nach dem Glucosepuls also unter der Nachweisgrenze dieser Methode von 0.1 mM.

Der zeitliche Verlauf der Konzentrationen der Zuckerphosphate Glucose-6-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 6-Phosphogluconat und 3-Phosphoglycerat sowie der Nukleotide ATP, UTP, ADP und UDP ist in Abb. 7 dargestellt. In den ersten 60 s nach Glucosezugabe wurden intrazellulär 4 mM Glucose-6-Phosphat, 3 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat und zwischen 0.5 und 1 mM 6-Phosphogluconat und 3-Phosphoglycerat nachgewiesen. Der Anstieg von 3-Phosphoglycerat erfolgte erst, als die Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat wieder zurückgingen (Abb. 7).

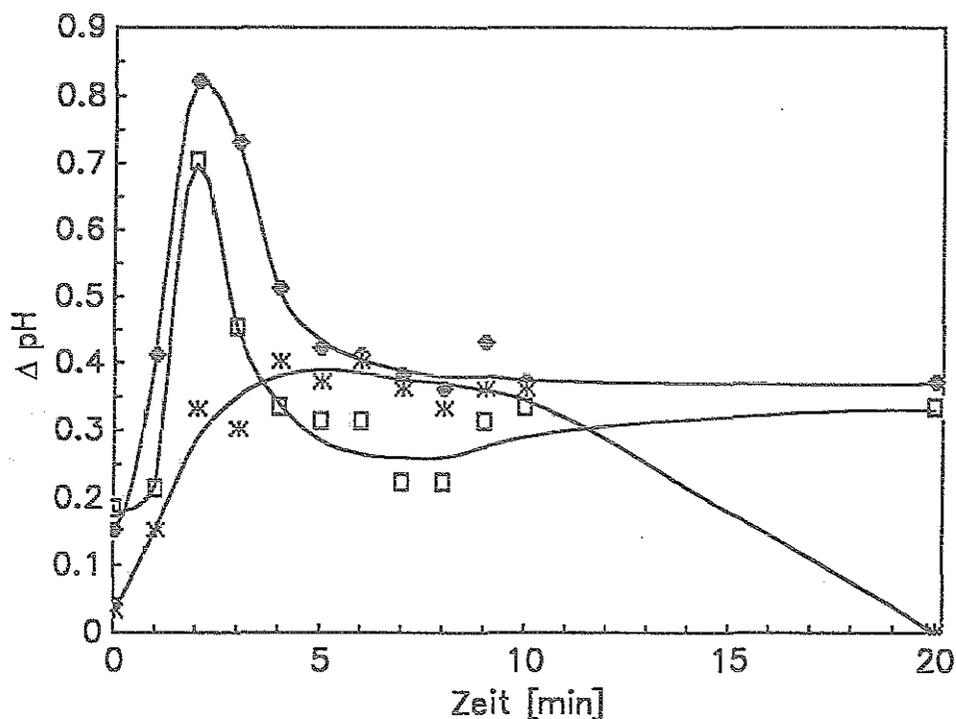
Nach Glucosezugabe wurde ein rascher Anstieg von ATP und UTP beobachtet. Während der ersten vier Minuten setzte sich der NTP-Pool aus fast 4 mM ATP und 2 mM UTP zusammen (Abb. 7). Währenddessen nahm die Konzentration von UDP unter die Nachweisgrenze ab, aber ADP blieb fast konstant bei 1 mM. Nach 8 min waren ATP und UTP wie vor Glucosezugabe nicht mehr nachzuweisen. ATP und UTP konnten anhand ihrer  $\gamma$ - und  $\beta$ -Signale doppelt bestimmt werden. Dies war eine gute interne Kontrolle der Konzentrations-Bestimmung und es zeigte sich, daß die Ergebnisse für  $\gamma$ - und  $\beta$ -Signale übereinstimmten. ADP und UDP ließen sich anhand ihrer  $\alpha$ -P-Signale aufgrund eines höheren Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses besser quantifizieren als über die  $\beta$ -Signale.

Die intrazelluläre Konzentration von NAD und NADH betrug vor und nach Glucosepuls zwischen 2 und 2.5 mM. Zwar konnten die Signale von NAD (zwei Dubletts) und NADH (ein Singulett) aufgelöst werden, aber die Perchlorsäure-Extraktion verändert das Verhältnis zwischen oxidiertem und reduziertem Form. Daher wurde die Konzentration der Pyridinnukleotide als Summe (NAD + NADH) bestimmt. NADP und NADPH blieben unter der Nachweisgrenze von 0.1 mM.

### 3.2 Der Einfluß von Ethanol auf den Glucose-Stoffwechsel in *Z. mobilis*

#### 3.2.1 *In-vivo*-NMR-Spektroskopie von *Z. mobilis*-Suspensionen in Gegenwart von Ethanol

*In-vivo*-Messungen von *Z. mobilis*-Zellsuspensionen hatten gezeigt, daß Zuckerphosphate und Nukleosid-Triphosphate gebildet und ein pH-Gradient von bis zu 0.8 pH-Einheiten aufgebaut wurde, wenn die Zellen mit Glucose versetzt wurden. Daraufhin wurde der Einfluß von Ethanol auf die Bildung von Zuckerphosphaten, Nukleosid-Triphosphaten und den pH-Gradienten während des Glucose-Stoffwechsels untersucht. Hierzu wurden die *Z. mobilis*-Zellsuspensionen vor Glucosezugabe mit Ethanol in Konzentrationen von 0 bis 10% inkubiert und anschließend ein Glucosepuls durch sequentielle  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Die Signalintensitäten der Zuckerphosphate und Nukleosid-Triphosphate wurden bestimmt und der Verlauf der internen und externen pH-Werte aus den chemischen Verschiebungen der Phosphat-Signale ermittelt.



**Abb. 8:** Zeitlicher Verlauf des pH-Gradienten nach Zugabe von Glucose zu *Z. mobilis*-Zellsuspensionen in Gegenwart unterschiedlicher Ethanolkonzentrationen.

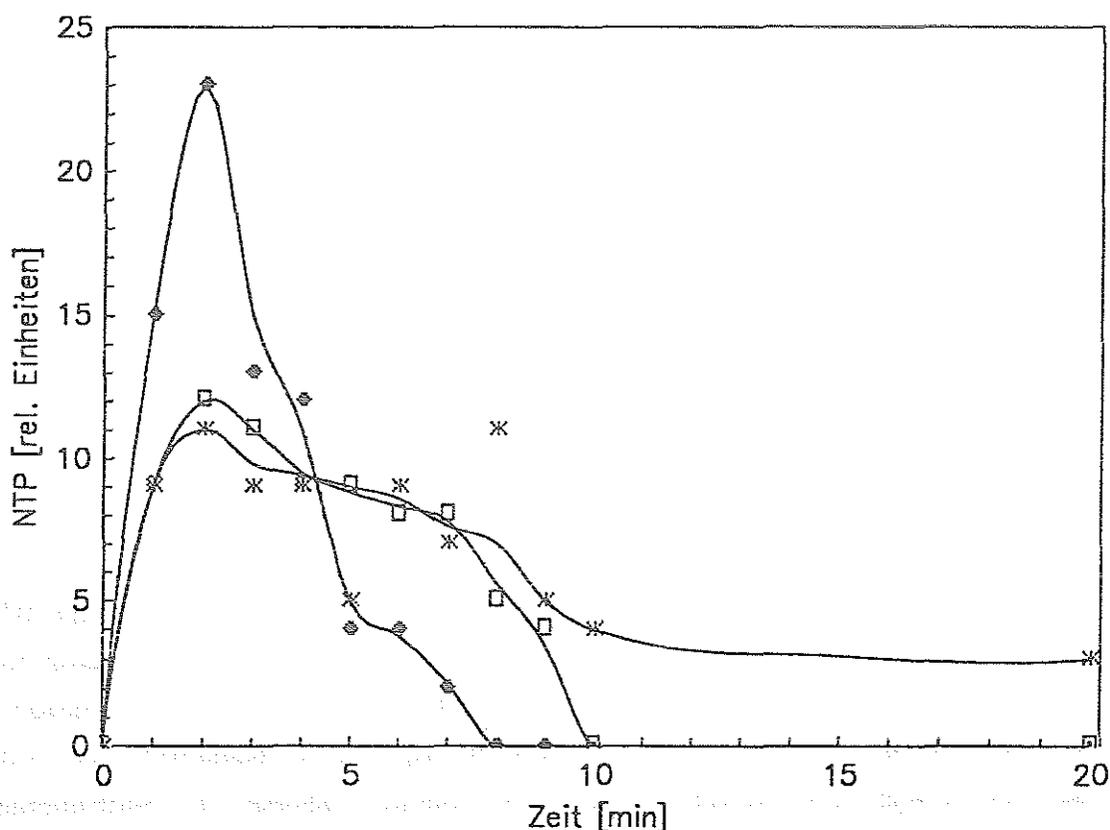
Die internen und externen pH-Werte wurden aus den chemischen Verschiebungen des internen und externen anorganischen Phosphats mit Hilfe von Eichkurven (s. Abb. 3) bestimmt.

●: ohne Ethanolzusatz; □: + 5% Ethanol; \*: + 10% Ethanol

Wie Abb. 8 zeigt, wurde bis zu einem Zusatz von 5% Ethanol die Ausbildung des pH-Gradienten nicht beeinträchtigt. Bei 10% Ethanol jedoch stieg der pH-Gradient langsamer an und erreichte nach vier Minuten nur ca. 50% des in Ansätzen mit geringeren Ethanolkonzentrationen gemessenen maximalen Wertes (Abb. 8).

Dagegen wurde bei allen getesteten Ethanolkonzentrationen (1.25%, 2.5%, 5%, 10%) beobachtet, daß die Bildung von Nucleosid-Triphosphaten um ca. 50% reduziert (Abb. 9) und der Anstieg der Zuckerphosphat-Konzentration auf das Maximum 1 min nach Glucosezugabe schwächer als in Ansätzen ohne Ethanolzusatz war.

Ein Einfluß der Dauer der Inkubation (zwischen 20 und 60 min) mit Ethanol vor Glucosepuls auf die Bildung von Zuckerphosphaten oder Nucleosid-Triphosphaten konnte dagegen nicht festgestellt werden.



**Abb.9:** Einfluß von Ethanol auf den zeitlichen Verlauf der relativen Signalintensitäten von Nucleosid-Triphosphaten in einer *Z. mobilis*-Zellsuspension

mit  $1.8 \cdot 10^{11}$  Zellen/ml nach Zugabe von 350 mM Glucose.

Die Signalintensitäten wurden in sequentiellen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren relativ zum TEP-Signal ermittelt.

♦: ohne Ethanolzusatz; nach Inkubation mit 5% (□) bzw. 10% (\*) Ethanol.

Wie Abb. 9 zeigt, wurde das Maximum der Nucleosid-Triphosphat-Konzentration wie in ethanolfreien Ansätzen nach zwei Minuten erreicht, es nahm aber in Gegenwart von Ethanol langsamer ab. So waren in den Ansätzen mit 10% Ethanol die Nucleosid-Triphosphate sogar noch nach 20 min nachweisbar (Abb. 9). Dadurch wurde nahegelegt, daß Glucose in Gegenwart von Ethanol langsamer umgesetzt wurde. Dies konnte auch durch Bestimmung der Restglucose in den Zellsuspensionen nach Abschluß der NMR-Messungen (30 min nach Glucosepuls) bestätigt werden. Während in den Ansätzen ohne Ethanolzusatz die eingesetzte Glucose vollständig verbraucht wurde und dies einer Glucoseumsatzrate von ca. 3.5 g Glucose/(g Trockenzellgewicht · h) entsprach, konnte in Gegenwart von 10% Ethanol im gleichen Zeitraum nur zwischen 45 und 80% der Glucose umgesetzt werden.

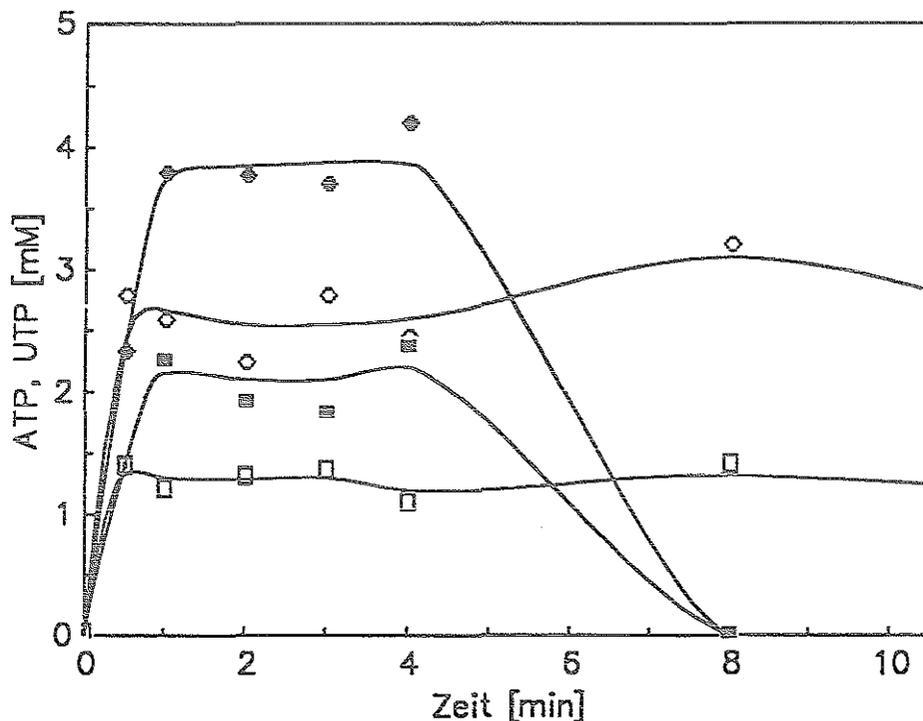
Während der Inkubation der Zellsuspensionen in 10% Ethanol verschoben sich die Signale von Zuckerphosphaten und internem Phosphat schon vor Glucosezugabe in der Weise, daß die Differenz der chemischen Verschiebung von internem und externem Phosphat abnahm (nicht gezeigt). Dies wies darauf hin, daß sich pH-Wert und Ionenstärke des intra- und extrazellulären Milieus während der Inkubation in Ethanol angeglichen hatten. Andererseits wies die Position des  $\beta$ -NTP-Signals darauf hin, daß Ethanol nicht zum Verlust von  $Mg^{2+}$ -Ionen durch Schädigung der Zellmembran führte. Die chemische Verschiebung betrug in allen Messreihen -18.4 ppm, d.h. Nucleosid-Triphosphate waren mit  $Mg^{2+}$ -komplexiert, da das Signal der nicht komplexierten Nucleosid-Triphosphate bei -21 ppm zu erwarten gewesen wäre.

### 3.2.2 $^{31}P$ -NMR-Spektroskopie von Perchlorsäure-Extrakten

Die *in-vivo*-Messungen von *Z. mobilis*-Zellsuspensionen hatten gezeigt, daß die Bildung des pH-Gradienten sowie von Zuckerphosphaten und Nucleosid-Triphosphaten in Gegenwart von Ethanol verringert war. Mit Hilfe von  $^{31}P$ -NMR-Spektren von Perchlorsäure-Extrakten aus Zellsuspensionen, die Glucose in Gegenwart von Ethanol metabolisierten, sollte der Einfluß von Ethanol auf die intrazellulären Konzentrationen der Metabolite des Entner-Doudoroff-Wegs und der Nucleotide untersucht werden. Hierfür wurden die Zellsuspensionen mit Ethanol (0, 5, bzw. 10%) inkubiert und nach Zugabe von Glucose mit Perchlorsäure extrahiert. Die intrazellulären Konzentrationen wurden aus den  $^{31}P$ -NMR-Spektren der Extrakte ermittelt. Der Verlauf der intrazellulären Konzentrationen von Zuckerphosphaten und Nucleosid-Triphosphaten in Ansätzen mit 5% Ethanol zeigte nur geringe Unterschiede zu den ethanolfreien Kontrollen. Dagegen waren die Metabolit-Konzentrationen in Gegenwart von 10% Ethanol deutlich verändert.

Besonders interessant war die Akkumulation von 3-Phosphoglycerat in Gegenwart von 10% Ethanol. Die Konzentration stieg kontinuierlich auf 3.4 mM 15 min nach Glucosepulvers an. Dagegen überstieg die Konzentration in ethanolfreien Ansätzen nicht 1.8 mM und fiel nach 4 min wieder ab. In Zellen, die Glucose in Gegenwart von 10% Ethanol umsetzten, wurde außerdem eine relativ konstante Konzentration von 2 mM Sedoheptulose-7-Phosphat gemessen.

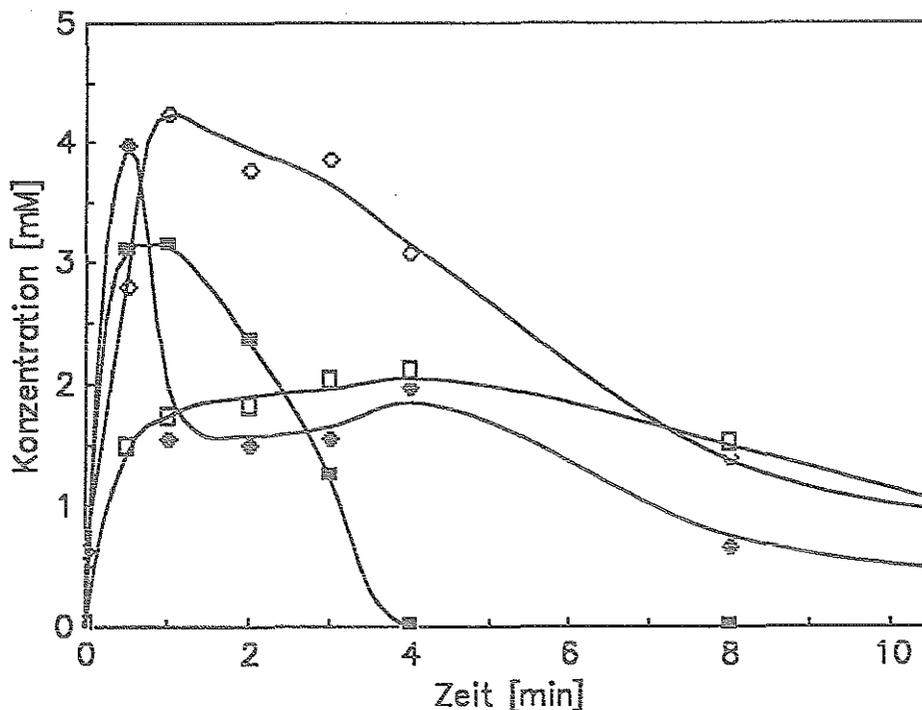
Wie Abb. 10 zeigt, konnten nur 2.5 mM ATP und 1.3 mM UTP nach Glucosezugabe in den Ansätzen mit 10% Ethanol nachgewiesen werden. Dagegen wurden 3.7 mM ATP und 2 mM UTP in den Zellen der ethanolfreien Suspensionen gemessen. Darüberhinaus waren in Gegenwart von 10% Ethanol noch nach 15 min 1.6 mM ATP bzw. 0.8 mM UTP messbar, während in den Ansätzen ohne Ethanol die Nachweisgrenze von 0.1 mM schon nach 8 min unterschritten wurde.



**Abb. 10:** Einfluß von Ethanol auf den Verlauf der Konzentrationen von ATP (●, ○) und UTP (■, □) in *Z. mobilis* nach Zugabe von Glucose zu einer Zellsuspension. Die Konzentrationen wurden in  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Perchlorsäure-Extrakten aus Zellsuspensionen ohne (● : ATP; ■ : UTP) bzw. mit Zusatz von 10% Ethanol (○ : ATP; □ : UTP) bestimmt.

Auch der Verlauf der Konzentrationen von Metaboliten des Entner-Doudoroff-Wegs wurde beeinflusst, wie Abb. 11 für Glucose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat zeigt. In Gegenwart von 10% Ethanol stiegen die Konzentrationen dieser Zuckerphosphate langsamer an und blieben mehr als 10 min erhöht, während ohne Ethanolzusatz die Konzentrationen nach 4 min abfielen (Abb. 11).

Ebenso blieb die Konzentration von 6-Phosphogluconat bis zu 15 min nach Glucosepuls zwischen 0.4 und 0.8 mM, während sie ohne Ethanol im Ansatz auf 0.2 mM absank (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß Glucose in Anwesenheit von 10% Ethanol langsamer umgesetzt wurde.



**Abb. 11:** Einfluß von Ethanol auf den Verlauf der Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat (●, ○) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (■, □) in *Z. mobilis* nach Zugabe von Glucose zu einer Zellsuspension.

Die Konzentrationen wurden in  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Perchlorsäure-Extrakten aus Zellsuspensionen ohne (● : Glucose-6-Phosphat; ■ : Glycerinaldehyd-3-Phosphat) bzw. mit Zusatz von 10% Ethanol (○ : Glucose-6-Phosphat; □ : Glycerinaldehyd-3-Phosphat) bestimmt.

### 3.2.3 Einfluß von Ethanol auf die spezifischen Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase und Enolase

Die intrazelluläre Akkumulation von 3-Phosphoglycerat während des Glucoseumsatzes in Gegenwart von 10% Ethanol wies auf eine Hemmung der Enzyme hin, die 3-Phosphoglycerat umsetzen. Daher wurde der Einfluß von Ethanol auf die spezifischen Aktivitäten von Phosphoglycerat-Mutase und Enolase untersucht. Bei einer Hemmung der Phosphoglycerat-Mutase wäre zu erwarten, daß ihr Substrat 3-Phosphoglycerat akkumuliert. Auch eine Hemmung der Enolase würde zur Akkumulation von 3-Phosphoglycerat führen. Das Gleichgewicht der ihr vorgeschalteten Phosphoglycerat-Mutase-Reaktion liegt auf der Seite von 3-Phosphoglycerat (Bergmeyer et al., 1984), sodaß anstelle des Substrats der Enolase, 2-Phosphoglycerat, wiederum 3-Phosphoglycerat akkumulieren würde. Dies wurde mit Hilfe von  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messungen geprüft. Jeweils 10 mM 3-Phosphoglycerat bzw. 2-Phosphoglycerat wurden mit zellfreiem Rohextrakt in MES-Puffer (pH 6.5, 30°C) inkubiert. In beiden Ansätzen stellte sich ein Gleichgewicht ein, in dem zu 93% 3-Phosphoglycerat vorlag.

Zunächst wurden die spezifischen Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase und der Enolase sowie die Hemmung der spezifischen Aktivitäten durch Ethanol-Inhibierung und Ethanol-Denaturierung gemessen.

Die spezifische Aktivität der Phosphoglycerat-Mutase wurde mit 4.02 U/(mg Protein) und der Enolase mit 7.87 U/(mg Protein) bestimmt. Die Aktivität der NADH-Oxidase des zellfreien Extrakts war jeweils unter 2% der spezifischen Enzymaktivität. Die Aktivitäten von Phosphoglycerat-Mutase und Enolase waren linear zur eingesetzten Proteinmenge von 4.2 bis 16.6 mg Protein.

**Tab. 12:** Einfluß von Ethanol auf die spezifischen Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase und der Enolase im Rohextrakt von *Z. mobilis*.

Die spezifischen Aktivitäten wurden durch photometrische Enzymtests bestimmt. Den Ansätzen zur Bestimmung der Aktivität in Gegenwart von Ethanol wurden entsprechende Mengen Ethanol zugesetzt.

Ethanol im Ansatz [%]	Spezifische Aktivitäten [U/mg Protein]	
	Phosphoglycerat-Mutase	Enolase
0	4.02	7.87
5	3.75	6.68
7.5	3.22	5.67
10	2.78	4.72
12.5	2.56	3.90

Die Inhibierung der Enzymaktivitäten wurde gemessen, indem zu den Ansätzen der photometrischen Enzymtests bis zu 12.5% Ethanol zugesetzt wurde. Hierbei mußte eine Hemmung der im Test eingesetzten Hilfsenzyme (Enolase, Pyruvatkinase, Lactat-Dehydrogenase) ausgeschlossen werden. Daher wurde bei allen Ethanol-Konzentrationen die Linearität zwischen der Proteinmenge des eingesetzten Rohextrakts und der Umsatzgeschwindigkeit im Test überprüft. Die bei beiden Assays festgestellte Proteinlinearität bis 12.5% Ethanol belegt, daß die eingesetzte Menge Rohextrakt und nicht etwa eine von Ethanol verursachte Hemmung der Indikatorenzyme die Umsatzgeschwindigkeit limitierte. Durch Ethanol wurden die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme verringert, und zwar die Phosphoglycerat-Mutase in Gegenwart von 10% Ethanol auf 69.2% und die Enolase auf 60% der Aktivitäten ohne Ethanolzusatz (Tab. 12).

Zur Überprüfung der Hemmung enzymatischer Aktivitäten aufgrund einer Denaturierung der Proteine wurde zellfreier Rohextrakt in Puffer mit Ethanol-Konzentrationen bis zu 20% für 30 min bei 30°C inkubiert (Millar et al., 1982). Obwohl Anteile des zellfreien Extrakts bei 15% und 20% Ethanol denaturierten, waren die Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase und Enolase nicht infolge einer Denaturierung vermindert.

### 3.3 Die Nebenproduktbildung in *Z. mobilis*

#### 3.3.1 Der Einfluß von Substrat und Wachstumsbedingungen auf die Nebenproduktbildung

Während des Wachstums mit Fructose wird ein Teil des Substrats von *Z. mobilis* zu Glycerin, Dihydroxyaceton, Lactat, Acetoin und weiteren Nebenprodukten umgesetzt. Dies führt zu einer geringeren Ethanolausbeute als bei Fermentationen mit Glucose (Viikari und Korhola, 1986; Toran-Diaz et al., 1983). Die Reaktionen, die zu den am meisten gebildeten Nebenprodukten Glycerin und Dihydroxyaceton führen, waren bisher nicht aufgeklärt. Daher sollten die Ursachen und Reaktionen der Nebenproduktbildung untersucht werden. Zunächst sollte geklärt werden, welche Faktoren bei der Nebenproduktbildung eine Rolle spielen. Art und Konzentration des Substrats, Wachstumsphase, Ethanolkonzentration und Osmolarität wurden in Betracht gezogen. Damit sollten Hinweise auf die der Nebenproduktbildung zugrunde liegenden Mechanismen gefunden werden. Aber auch für die Fermentationen mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten war die Kenntnis der Bedingungen wichtig, unter denen *Z. mobilis* Nebenprodukte produziert. Fermentationen mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten sollten

durchgeführt werden, um über die Bestimmung der prozentualen  $^{13}\text{C}$ -Markierung in den Fermentationsprodukten Hinweise auf die Reaktionen der Nebenproduktbildung zu erhalten.

### C-Quelle

Die Bildung von Nebenprodukten durch *Z. mobilis* bei Wachstum mit Glucose bzw. Fructose wurde in 1,5 l-Batchfermentationen analysiert. Wie in Abb. 12 gezeigt, wurde der Verlauf der Fermentationen durch Messung der OD, der Ethanolbildung und der Substratkonzentration verfolgt. Nachdem das Substrat vollständig verbraucht war und die OD konstant blieb, wurden die Nebenprodukte im Kulturüberstand bestimmt.

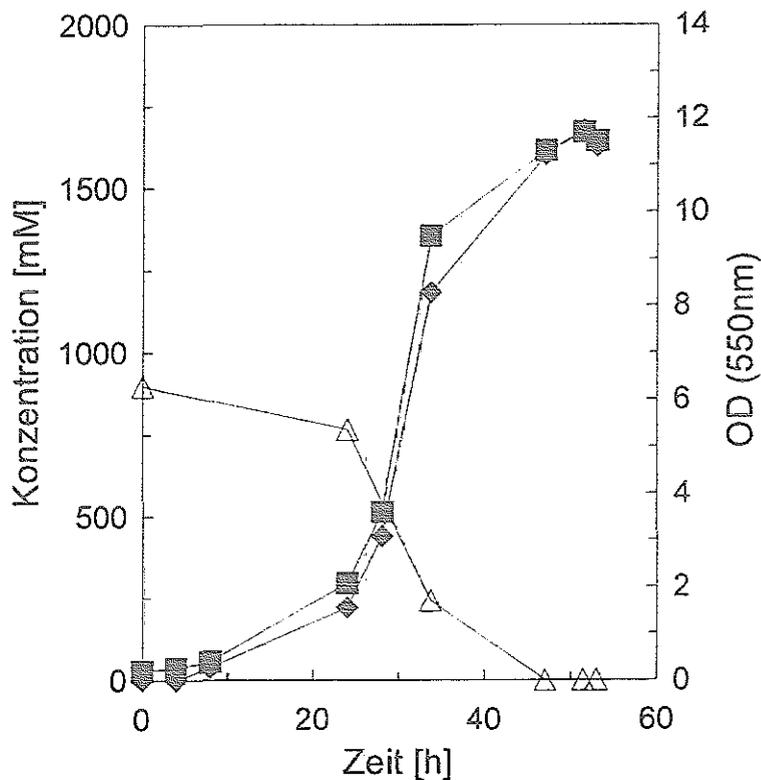


Abb. 12: Verlauf von OD, Fructose- und Ethanolkonzentration bei Wachstum von *Z. mobilis* mit 900 mM Fructose.

*Z. mobilis* wurde in einer 1,5 l-Batchfermentation in Vollmedium bei pH 5.5 kultiviert.

■ : OD; ◆ : Ethanol; Δ : Fructose

Mit Fructose als C-Quelle wurde mehr Dihydroxyaceton, Glycerin und auch Acetat gebildet (Tab. 13) als mit Glucose. Dabei fiel auf, daß bei Einsatz sterilfiltrierter Fructose nur bis zu 1 mM Dihydroxyaceton gebildet wurde, während alle anderen Produkte in vergleichbaren Konzentrationen gemessen wurden. Auch hinsichtlich lag-Phase, Wachstumsrate und OD der stationären Phase unterschieden sich die Fermentationen mit autoklavierter bzw. sterilfiltrierter Fructose nicht. Keine Unterschiede in der Produktbildung wurden festgestellt, wenn Glucose sterilfiltriert anstatt autoklaviert worden war. Diese Beobachtungen führten zur Frage, ob Dihydroxyaceton während des Autoklavierens der Fructose entsteht und somit kein Nebenprodukt des Fructose-Stoffwechsels von *Z. mobilis* ist.

**Tab. 13:** Vergleich der Bildung von Dihydroxyaceton, Glycerin, Acetat, Acetoin und Lactat bei Wachstum von *Z. mobilis* mit Glucose oder Fructose.

*Z. mobilis* wurde in 1.5 l-Batchfermentationen mit je 10% Glucose bzw. Fructose bei pH 5.5 kultiviert. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Konzentrationen der Substanzen im Kulturüberstand bestimmt. Angegeben sind die Ergebnisse jeweils einer typischen Fermentation aus mindestens drei Wiederholungen.

	Produktbildung mit der C-Quelle		
	Glucose (ak) <sup>1</sup>	Fructose (ak)	Fructose (sf) <sup>1</sup>
Dihydroxy- aceton [mM]	0.3	48.0	0.8
Glycerin [mM]	0.8	12.0	10.3
Acetat [mM]	0.8	2.4	4.9
Acetoin [mM]	9.3	10.0	7.6
L-Lactat [mM]	0.5	0.3	0.3
D-Lactat [mM]	4.0	3.2	3.2

<sup>1</sup>: ak: autoklaviert; sf: sterilfiltriert

Fructose kann beim Erhitzen in alkalischer Lösung in Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd gespalten werden, diese Produkte können weiter zu Methylglyoxal und Lactat umgesetzt werden (El Ghazzawi und Schmidt, 1967). In den hier vorgestellten Versuchen wurde die Fructose jedoch bei neutralem pH autoklaviert. Es wurde daher geprüft, ob Dihydroxyaceton auch dann aus Fructose gebildet wird, wenn diese separat bei neutralem pH autoklaviert wird: in diesem Falle würde Dihydroxyaceton als Nebenprodukt von *Z. mobilis* ausscheiden.

Mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie wurden autoklavierte bzw. sterilfiltrierte Fructoselösungen, wie sie auch dem Medium der Fermentationen zugesetzt wurden, verglichen. In den  $^1\text{H}$ -Spektren konnte kein Unterschied festgestellt werden. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von autoklavierter Fructose wurden fünf Signale sehr geringer Intensität gefunden, die im Vergleichsspektrum sterilfiltrierter Fructose nicht nachweisbar waren: die Positionen der Signale waren bei 83.85 ppm, 82.17 ppm, 78.97 ppm, 67.38 ppm und 58.40 ppm. Eine Zuordnung dieser Signale war durch Messungen nach Zusatz von Glucose, Dihydroxyaceton, Glycerin, Methylglyoxal, Pyruvat, Lactat, Acetat oder Acetoin (s. Anhang, Tab. 23) nicht möglich. Es konnte aber ausgeschlossen werden, daß es sich um Signale der getesteten Substanzen handelte.

Die im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von autoklavierter Fructose zusätzlich detektierten Signale hatten ein Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zwischen 14 und 28. Im Vergleich dazu hatte das C1-Signal der  $\alpha$ -Fructopyranose, die 2.4% der Fructose ausmacht und damit in einer Konzentration von 30 mM vorlag, ein Signal-zu-Rauschen-Verhältnis von 40. Damit konnte die Konzentration der unbekannt Substanz auf circa 10 mM geschätzt werden. Eine direkte Umsetzung dieser Substanz - falls die fünf Signale tatsächlich von nur einer Substanz stammen - in Dihydroxyaceton erscheint unwahrscheinlich, da bei der untersuchten Fructosekonzentration in Fermentationen etwa 40 mM Dihydroxyaceton gebildet wurden.

Die Vergleichsmessungen sterilfiltrierter und autoklavierter Fructose zeigten außerdem, daß sich die Fructose während des Autoklavierens nicht umlagerte, denn das Verhältnis der Isomeren blieb gleich: 68.9%  $\beta$ -Pyranose, 2.4%  $\alpha$ -Pyranose, 23.0%  $\beta$ -Furanose, 5.7%  $\alpha$ -Furanose.

Eine abiotische Dihydroxyaceton-Bildung im Laufe der Fermentation wurde durch eine Kontrollfermentation ohne *Z. mobilis* ausgeschlossen: auch nach einem Zeitraum von 120 h konnte kein Dihydroxyaceton im Medium nachgewiesen werden.

Sowohl mit Glucose als auch mit Fructose als C-Quelle bildete *Z. mobilis* D- und L-Lactat, sowie Acetoin (Tab. 13). Allerdings fiel auf, daß Lactat zum größten Teil als D-Isomeres gebildet wurde, was auf eine Bildung des Lactats über Methylglyoxal als Intermediat hinweisen könnte (Gottschalk, 1986). Dagegen spricht, daß Methylglyoxal in  $^{13}\text{C}$ -Spektren von Überständen nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl es als ungeladene Substanz im Überstand zu erwarten gewesen wäre. Außerdem schloß die Markierung des in Fermentationen mit  $[2-^{13}\text{C}]$ -Fructose gebildeten Lactats den Methylglyoxalweg eindeutig aus.

Mannit, Sorbit und auch Acetaldehyd konnten in Überständen aus Glucose- und Fructosefermentationen nicht nachgewiesen werden.

### *Anfangskonzentration der C-Quelle*

In Batchfermentationen mit unterschiedlicher Fructosekonzentrationen wurde untersucht, welchen Einfluß die Anfangskonzentration auf die Nebenproduktbildung hat. Es zeigte sich, daß die in der stationären Phase gemessenen Konzentrationen von Dihydroxyaceton und Glycerin mit steigenden Fructosekonzentrationen zunahmen. Diese Zunahme der Nebenproduktbildung bei einer Steigerung der Fructosekonzentration von 111 mM auf 855 mM war bei Dihydroxyaceton um den Faktor 20 höher als bei Glycerin (Tab. 14).

Tab. 14 : Einfluß der Fructose-Konzentration auf die Bildung der Nebenprodukte  
Dihydroxyaceton und Glycerin.

In Batchfermentationen von *Z. mobilis* wurde Fructose mit Anfangskonzentrationen von 111 mM bis 855 mM eingesetzt. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Konzentrationen von Glycerin und Dihydroxyaceton bestimmt.

Anfangskonzentration Fructose [mM]	Endkonzentration	
	Glycerin [mM]	Dihydroxyaceton [mM]
111	3.4	0.5
293	3.6	6.7
550	8.5	43.0
855	19.1	59.0

### *Wachstumsphase*

Der Anteil der Nebenproduktbildung am Substratumsatz veränderte sich im Laufe einer Fermentation nur in geringem Maße. In der späten exponentiellen Phase nahm die Dihydroxyaceton-Bildung im Verhältnis zur Ethanolbildung geringfügig zu, während die Glycerinbildung eher konstant blieb (Tab. 15).

Der Einfluß der Wachstumsphase auf die Nebenproduktbildung wurde außerdem in Röhrenversuchen untersucht. Zellen aus der frühen (OD 1.44) und späten (OD 10.1) exponentiellen Phase sowie der stationären Phase (OD 11.4) einer Batchfermentation wurden in frischem Vollmedium resuspendiert und in Kulturröhren mit 100 mM Fructose überimpft. Nachdem die Fructose verbraucht war, wurden die Produkte bestimmt. Die Zellen der frühen exponentiellen Phase bildeten etwas weniger

Dihydroxyaceton, die Werte für Glycerin waren dagegen bei Zellen aus allen Wachstumsphasen ähnlich (Tab. 16). Insgesamt wurden nur geringe Konzentrationen an Nebenprodukten erreicht, da die Anfangskonzentration der Fructose in den Röhrcchen nur 100 mM betrug.

**Tab. 15:** Bildung von Ethanol, Glycerin und Dihydroxyaceton (DHA) in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.

*Z. mobilis* wurde in 1.5 l-Batchfermentationen mit 10 % Fructose kultiviert. Es wurden die Produktkonzentrationen bestimmt und daraus die relative Nebenproduktbildung  $q_r$  (mM Nebenprodukt/100 mM Ethanol) berechnet.

OD im Fermenter	Ethanol [mM]	Glycerin [mM]	DHA [mM]	$q_r$ (Glycerin)	$q_r$ (DHA)
2.5	165	1.7	6.0	1.03	3.64
6.5	520	3.1	15.3	0.60	2.94
9.5	907	7.0	42.6	0.77	4.70

**Tab. 16:** Bildung von Dihydroxyaceton (DHA) und Glycerin in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.

*Z. mobilis*-Zellen aus der frühen und späten exponentiellen Wachstumsphase sowie der stationären Phase einer Batchfermentation wurden in Röhrcchen mit 100 mM Fructose überimpft und nach Verbrauch der Fructose die Endkonzentrationen  $c$  von Glycerin und Dihydroxyaceton bestimmt (Mittelwerte aus 2 Versuchen).

Wachstumsphase des Inokulums	$c$ (DHA) [mM]	$c$ (Glycerin) [mM]
frühe exponentielle Phase	0.4	2.4
späte exponentielle Phase	1.0	2.8
stationäre Phase	1.2	2.5

#### *Ethanolkonzentration und Osmolarität*

Die Versuche mit unterschiedlichen Fructosekonzentrationen hatten gezeigt, daß die Nebenproduktbildung mit steigender Anfangskonzentration zunimmt. Daher wurde der Einfluß der Osmolarität im Medium und der Ethanolkonzentration auf die Nebenproduktbildung untersucht. Zellen aus der exponentiellen Phase einer

Fructosefermentation wurden in Röhrchen mit 200 mM Fructose (Kontrolle) und Ethanol- bzw. Xylosezusatz überimpft. Die einem Teil der Röhrchen zugesetzte Ethanolkonzentration (450 mM) entsprach der im Fermenter zum Zeitpunkt, als die Zellen aus dem Fermenter als Inokulum für die R hrchenversuche entnommen wurden. Damit sollte geklärt werden, ob der im Laufe einer Fermentation gebildete Ethanol bei der Nebenproduktbildung eine Rolle spielt.

Durch den Einsatz von 750 mM Xylose sollte eine hohe Osmolarität im Medium erreicht werden. *Z. mobilis* kann mit Xylose zwar nicht wachsen, aber Xylose über den Glucosecarrier aufnehmen (DiMarco und Romano, 1985) und in Anwesenheit eines metabolisierbaren Zuckers in Xylitol umsetzen (Feldmann et al., 1992). Außerdem gleicht sich die interne Xylosekonzentration mit der externen in kurzer Zeit aus (Struch et al., 1991). Im Zusammenhang mit der gesteigerten Nebenproduktbildung bei hohen Fructosekonzentrationen sollte so geklärt werden, ob eine hohe Osmolarität im Medium und in den Zellen die Nebenproduktbildung beeinflusst.

Tab. 17: Einfluß von Ethanol und Osmolarität des Mediums auf die Bildung von Dihydroxyaceton (DHA) und Glycerin.

Röhrchen mit 200 mM Fructose (Kontrolle), + 450 mM Ethanol bzw. + 750 mM Xylose wurden mit *Z. mobilis* angeimpft und nach Erreichen der stationären Phase die Endkonzentrationen  $c$  bestimmt (Mittelwerte aus 2 Ansätzen).

Vollmedium + 200 mM Fructose	$c$ (DHA) [mM]	$c$ (Glycerin) [mM]
Kein Zusatz	3.8	4.9
+ 450 mM Ethanol	1.7	7.3
+ 750 mM Xylose	0	0.3

Wie in Tab. 17 gezeigt ist, wurden in den Ansätzen ohne Zusätze 4.9 mM Glycerin und 3.8 mM Dihydroxyaceton. In den Ansätzen mit Ethanolzusatz wurde die gleiche Menge Nebenprodukte gebildet, jedoch anteilm sig mehr Glycerin. In Gegenwart von Xylose wurden fast keine Nebenprodukte gebildet, allerdings wuchsen die Zellen in diesen Ansätzen auch viel langsamer.

### Kontinuierliche Kultur

Die Ergebnisse aus Batchfermentationen hatten gezeigt, daß die Nebenproduktbildung mit steigender Anfangskonzentration der Fructose zunahm. Im Chemostaten konnte dagegen der Einfluß der Wachstumsrate und der Substratverbrauchsrate auf die Nebenproduktbildung untersucht werden. Es stellte sich heraus, daß in kontinuierlicher Kultur weniger Nebenprodukte gebildet werden (Tab. 18); insbesondere die Dihydroxyaceton-Bildung war mit Konzentrationen unter 1 mM stark vermindert. Die Bildung von Glycerin nahm mit steigenden Durchflußraten zu und erreichte 6.1 mM Glycerin bei der höchsten getesteten Durchfluß- bzw. Wachstumsrate von  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Dabei stieg auch die Fructose-Verbrauchsrate  $q_s$  auf  $7 \text{ g/(g}\cdot\text{h)}$ .

Tab. 18: Einfluß der Durchflußrate im Chemostaten auf die Steady-state-Konzentrationen der Fructose und der Nebenprodukte sowie auf die Biomasse, den Zellertrag  $Y_s$  und die Fructose-Verbrauchsrate  $q_s$ . *Z. mobilis* wurde mit 10% Fructose bei pH 5.5 in Minimalmedium kultiviert. Die Konzentrationen wurden 5 Volumenwechsel nach Einstellen einer Durchflußrate bestimmt.  $Y_s$ : Zellertrag;  $q_s$ : Fructose-Verbrauchsrate.

	Durchflußrate [ $\text{h}^{-1}$ ]		
	0.05	0.075	0.10
	steady-state-Konzentrationen [mM]		
Fructose	3.8	7.7	10.4
Glycerin	2.2	3.2	6.1
Dihydroxyaceton	<0.1	<0.1	0.6
D-Lactat	0.9	0.7	0.7
L-Lactat	0.7	0.3	0.5
Acetoin	1.5	2.8	4.7
Acetat	4.7	3.7	2.2
Zell-Trockengewicht [g/l]	1.48	1.43	1.39
$Y_s$ [g/g]	0.0149	0.0145	0.0141
$q_s$ [g/(g·h)]	3.36	5.17	7.04

### 3.3.2 Die Biosynthese der Nebenprodukte

#### 3.3.2.1 Fermentationen mit $^{13}\text{C}$ -angereicherten Zuckern

Es wurde gezeigt, daß bei Wachstum von *Z. mobilis* mit Fructose die Nebenprodukte Dihydroxyaceton, Glycerin, Lactat, Acetat und Acetoin gebildet werden. Anschließend sollten die Reaktionen der Nebenproduktbildung aufgeklärt werden, da insbesondere für die Bildung von Glycerin und Dihydroxyaceton zwei Wege möglich sind. Für diese Untersuchungen bot sich der Einsatz  $^{13}\text{C}$ -markierter Fructose an. Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Substrats verteilt sich auf die Produkte und läßt damit Rückschlüsse auf die Reaktionen, die zu ihrer Bildung führten, zu. Dies ist in Abb. 13 am Beispiel von [2- $^{13}\text{C}$ ]-Fructose gezeigt:

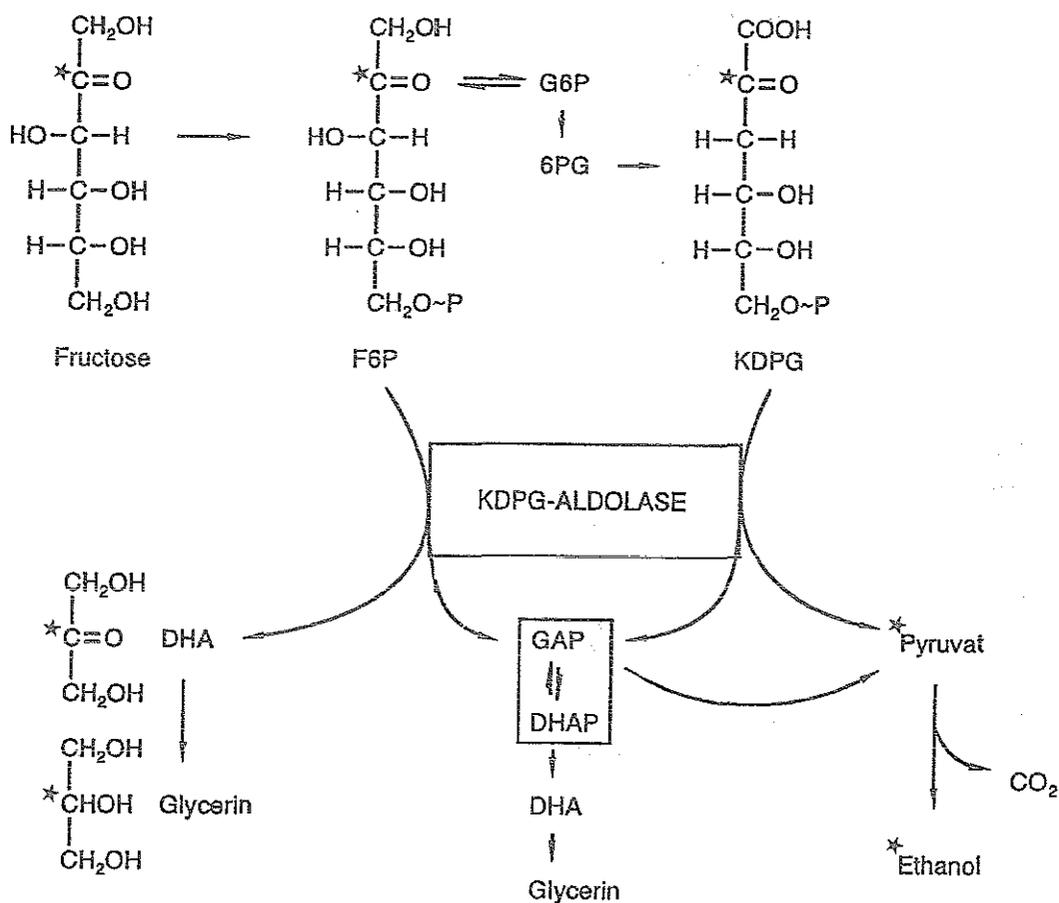


Abb. 13: Schematische Darstellung der Reaktionen, die in *Z. mobilis* zur Bildung von Dihydroxyaceton und Glycerin führen können. Die bei Einsatz von [2- $^{13}\text{C}$ ]-Fructose zu erwartende Verteilung der  $^{13}\text{C}$ -Markierung ist mit (\*) eingezeichnet.

1. Möglichkeit: Werden Dihydroxyaceton und Glycerin durch die Spaltung von Fructose-6-Phosphat in einer Nebenreaktion der KDPG-Aldolase gebildet, dann findet sich die Markierung der [2- $^{13}\text{C}$ ]-Fructose als 100%ige  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den C2-Atomen von Dihydroxyaceton und Glycerin wieder.

2. Möglichkeit: Werden Dihydroxyaceton und Glycerin aus Triosephosphaten gebildet, so wird Fructose-6-Phosphat über den Entner-Doudoroff-Weg umgesetzt. Die Markierung der [2- $^{13}\text{C}$ ]-Fructose findet sich nach Spaltung von KDPG im C2-Pyruvat. Da aber auch das nicht markierte Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Pyruvat umgesetzt wird, ist das C2-Pyruvat insgesamt nur zu 50%  $^{13}\text{C}$ -angereichert. Dihydroxyaceton und Glycerin entstehen aus unmarkiertem Glycerinaldehyd-3-Phosphat, ihre C2-Atome sind daher lediglich zu 1.1%  $^{13}\text{C}$ -markiert (natürliche Häufigkeit).

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, sollte der Weg der Nebenproduktbildung durch Bestimmung der prozentualen Anreicherung in den Produkten einer Fermentation von [2- $^{13}\text{C}$ ]-Fructose aufgeklärt werden.

Diese Fermentationen wurden in möglichst kleinem Maßstab (20 ml) Arbeitsvolumen durchgeführt, um 100%ig markierte Zucker in einer Konzentration von 100 g/l einsetzen zu können. Die prozentuale  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Produkten wurde nach Erreichen der stationären Phase bestimmt, indem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Überstände aufgenommen wurden.

Die prozentuale Anreicherung der C2-Atome in Dihydroxyaceton und Glycerin lag im Bereich der natürlichen Häufigkeit von 1.1% (Tab. 19). Diese Daten sprechen für eine Bildung von Dihydroxyaceton und Glycerin aus Triosephosphaten. Wie auch in den Versuchen mit unmarkierter Fructose wurde kein Dihydroxyaceton gebildet, wenn die Fructose sterilfiltriert worden war.

Die prozentuale Anreicherungen von C2-Lactat, C2- und C3- Acetoin betragen zwischen 43.7 und 51.4% und lagen damit im Bereich der erwarteten 50%igen  $^{13}\text{C}$ -Markierung des C2-Pyruvats. Aus Abb. 14 wird deutlich, daß bei Fermentationen von [2- $^{13}\text{C}$ ]-Zuckern für das C2-Atom des Lactats die gemessene Markierung von ca. 50 % zu erwarten war, wenn Lactat aus Pyruvat über eine Lactat-Dehydrogenase gebildet wird.

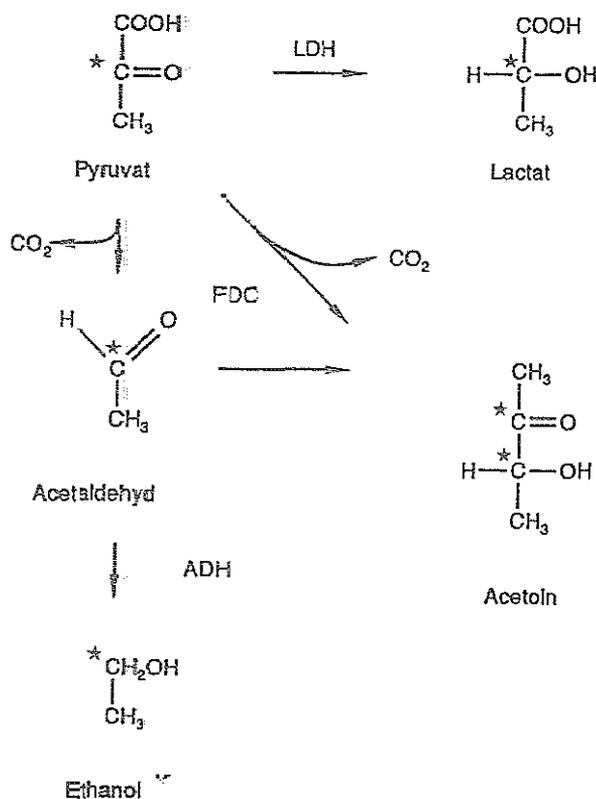
**Tab. 19:** Prozentuale  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen von Dihydroxyaceton, Glycerin, Lactat und Acetoin nach Fermentation von  $[2-^{13}\text{C}]$ -Fructose,  $[2-^{13}\text{C}]$ -Glucose und  $[6-^{13}\text{C}]$ -Glucose.

20-ml-Batchfermentationen wurden mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Zuckern durchgeführt. Von den Überständen ohne bzw. mit Zusatz von Reinsubstanzen wurden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aufgenommen und die Produktkonzentrationen extern (gaschromatographisch bzw. enzymatisch) bestimmt. Aus diesen Daten wurde die prozentuale Anreicherung berechnet.

Produkte	C-Quelle			
	$[2-^{13}\text{C}]$ -Fructose		$[2-^{13}\text{C}]$ -Glucose	$[6-^{13}\text{C}]$ -Glucose
	ak <sup>(1)</sup>	sf <sup>(1)</sup>	ak <sup>(1)</sup>	ak <sup>(1)</sup>
DHA				
-C <sub>1/3</sub>	1.1	-	-	-
-C <sub>2</sub>	1.1	-	-	-
Glycerin				
-C <sub>1/3</sub>	1.1	1.2	nb <sup>(1)</sup>	50.3
-C <sub>2</sub>	1.4	1.4	nb <sup>(1)</sup>	2.5
Lactat				
-C <sub>1</sub>	nb <sup>(1)</sup>	nb <sup>(1)</sup>	nb <sup>(1)</sup>	nb <sup>(1)</sup>
-C <sub>2</sub>	44.0	43.7	51.3	1.1
-C <sub>3</sub>	0.7	0.7	1.1	45.0
Acetoin				
-C <sub>1</sub>	0.5	0.9	0.7	51.8
-C <sub>2</sub>	47.6	49.0	48.5	0.6
-C <sub>3</sub>	47.8	49.5	51.4	0.6
-C <sub>4</sub>	1.1	1.1	0.7	45.1

<sup>(1)</sup>: ak, autoklaviert; sf, sterilfiltriert; nb, nicht bestimmt

Die Anreicherung von C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Acetoin konnte erst nach Spin-Echo-Experimenten bestimmt werden. Im Falle einer Bildung von Acetoin aus Pyruvat und Acetaldehyd durch die Pyruvat-Decarboxylase (Bringer und Sahn, 1988b) wären für C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Acetoin ca. 50% Anreicherung zu erwarten (Abb. 14). Dann wäre die Hälfte der  $^{13}\text{C}$ -Atome an Position C<sub>2</sub> mit einem  $^{13}\text{C}$ -Atom in Position C<sub>3</sub> benachbart (siehe Tab. 20). Dieser Anteil würde aufgrund der  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplung als Dublett erscheinen, die mit einem  $^{12}\text{C}$  benachbarten  $^{13}\text{C}$ -Atome dagegen als Singulett. Gleiches gilt für das C<sub>3</sub>-Acetoin.



**Abb. 14:** Schematische Darstellung der Reaktionen in *Z. mobilis*, die ausgehend von Pyruvat zur Bildung von Lactat, Ethanol und Acetoin führen. Die Verteilung der  $^{13}\text{C}$ -Markierung bei Wachstum mit  $[2-^{13}\text{C}]$ -Fructose ist eingezeichnet: mit (\*) markierte Atome sind zu 50%  $^{13}\text{C}$ -angereichert. Erläuterungen siehe Text.

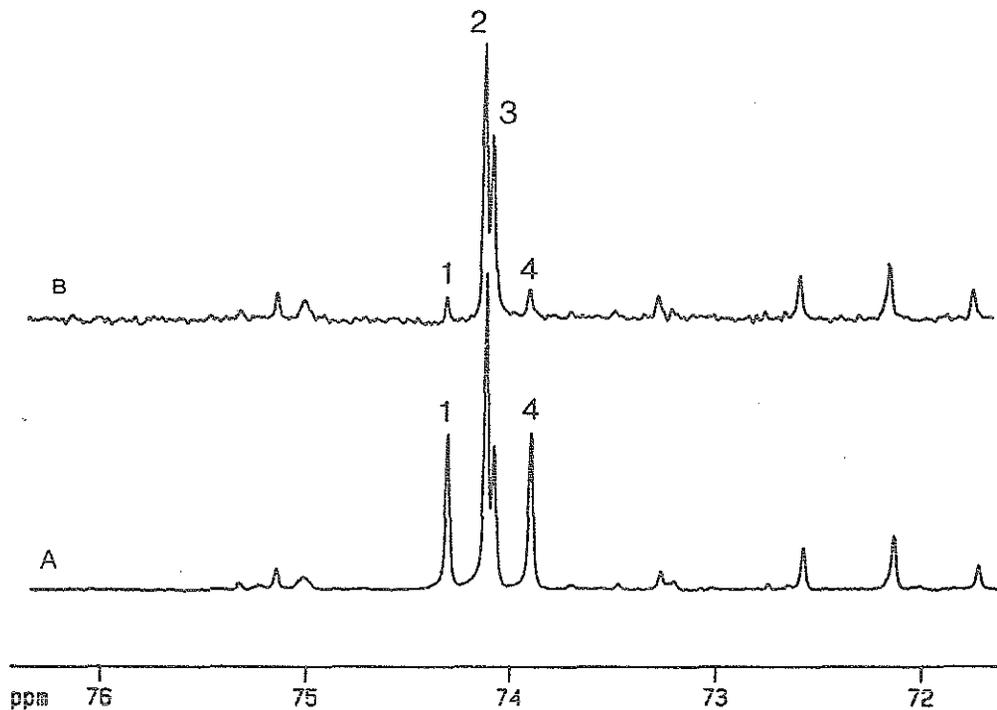
**Tab. 20:** Einfluß der Isotopenverteilung im Acetoin auf die Signalstruktur im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum.

Für die Annahme der relativen Häufigkeiten von  $^{12}\text{C}$  bzw.  $^{13}\text{C}$  an den Positionen 2 und 3 des Acetoin wurde davon ausgegangen, daß Acetoin entsprechend Abb. 14 gebildet wird.

Acetoin-C2	$^{12}\text{C}$	$^{13}\text{C}$	$^{12}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
Acetoin-C3	$^{12}\text{C}$	$^{12}\text{C}$	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
rel. Häufigkeit	25%	25%	25%	25%
Signal	-	Singulett	Singulett	Dublett

Abb. 15 zeigt einen Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums mit dem C3-Signal von Acetoin. Zur eindeutigen Zuordnung der Signale 1 und 4 als C3-Signal, das aufgrund der Kopplung mit  $^{13}\text{C}2$ -Acetoin zum Dublett wird, war ein Spin-Echo-Experiment notwendig: durch Signalunterdrückung aufgrund der Kopplung mit der C2-Resonanz konnte die Intensität

der Signale 1 und 4 verringert werden (Abb. 15B). Damit war gezeigt, daß es sich tatsächlich um ein Dublett und nicht um Signale anderer Substanzen handelte wie z.B. Signal 3 in Abb. 15B. Daraus wiederum ergab sich eine prozentuale Anreicherung von ca. 50%, die dem Wert entsprach, der bei einer Bildung von Acetoin aus Pyruvat und Acetaldehyd zu erwarten war (Abb. 14).



**Abb. 15:** Ausschnitt aus einem <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum bei 100.6 MHz eines Kulturüberstandes einer Fermentation von *Z. mobilis* mit [2-<sup>13</sup>C]-Fructose (A).  
 B: Spin-Echo-Messung derselben Probe zur Unterdrückung des C3-Acetoin-Dubletts, das durch Kopplung mit dem C2-Acetoin entsteht.  
 1,4: C3-Acetoin (Dublett); 2: C3-Acetoin (Singulett); 3: nicht identifiziertes Signal

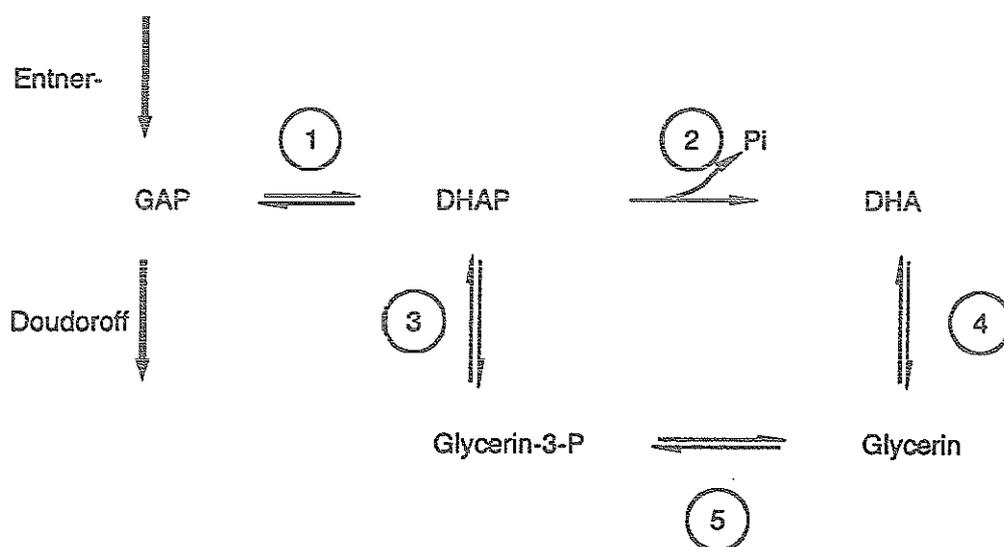
### 3.3.2.2 Enzymatische Untersuchungen zur Nebenproduktbildung

#### *Nebenreaktion der KDPG-Aldolase mit Fructose-6-Phosphat*

Die Frage, ob eine Nebenreaktion der KDPG-Aldolase mit Fructose-6-Phosphat zur Bildung von Dihydroxyaceton führt, sollte auch an der gereinigten KDPG-Aldolase

überprüft werden. Die Aktivität der Enzympräparation wurde in einem kontinuierlichen photometrischen Enzymtest mit KDPG als Substrat bestimmt. Die spezifische Aktivität betrug 54.9 U/mg Protein.

Die Aktivität der KDPG-Aldolase mit Fructose-6-Phosphat wurde in einem diskontinuierlichen Test bestimmt, in dem das gebildete Dihydroxyaceton quantifiziert wurde. Bei der Wahl der Testbedingungen mußten sowohl die geschätzte Aktivität der Nebenreaktion als auch die Lage des Gleichgewichts berücksichtigt werden. Aufgrund der in den Fermentationen erreichten Konzentrationen von Dihydroxyaceton und Glycerin wäre zu erwarten, daß die Aktivität der Nebenreaktion ca. 10 % der Aktivität mit KDPG beträgt. Die Gleichgewichts-Konstante  $k_{eq}$  für die KDPG-Aldolase aus *Pseudomonas putida* (Wood, 1972) beträgt ungefähr  $10^{-3}$  M. Startet man die Reaktion mit 10 mM Substrat, würden im Gleichgewicht ca. je 4.5 mM Spaltprodukte vorliegen. Auch für die KDPG-Aldolase aus *Z. mobilis* liegt das Gleichgewicht mit verschiedenen Substraten zu ca. 70 % auf Seiten der Spaltprodukte (Knappmann, 1993). Im Rahmen dieser Überlegungen wurden die Ansätze zum Nachweis der Nebenreaktion durchgeführt. Dennoch konnte eine Spaltung von Fructose-6-Phosphat durch die KDPG-Aldolase nicht nachgewiesen werden, d.h. es wurde kein Dihydroxyaceton gebildet.



**Abb. 16:** Schema der möglichen Reaktionen, die in *Z. mobilis* zur Bildung von Glycerin und Dihydroxyaceton aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat führen können.

1: Triosephosphat-Isomerase; 2: Phosphatase; 3: Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase; 4: Glycerin-Dehydrogenase; 5: Glycerokinase

*Photometrische Enzymtests zur Bildung von Nebenprodukten aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat*

Die Nebenprodukte Dihydroxyaceton und Glycerin könnten aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat gebildet werden (Viikari und Korhola, 1986). Abb. 16 zeigt, daß nach der Bildung von Dihydroxyacetonphosphat durch die Triosephosphat-Isomerase (TPI) zwei Wege möglich sind:

1. Eine Phosphatase setzt Dihydroxyacetonphosphat zu Dihydroxyaceton um, das durch die Glycerin-Dehydrogenase zu Glycerin reduziert wird.
2. Dihydroxyacetonphosphat wird reduziert zu Glycerin-3-Phosphat und dieses wird zu Glycerin umgesetzt (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, Glycerokinase).

Die vermehrte Bildung der Nebenprodukte bei Wachstum mit Fructose könnte darauf beruhen, daß die entsprechenden Enzymaktivitäten durch die C-Quelle induziert werden. Um diese Möglichkeit nachzuweisen, wurden alle Enzymtests mit zellfreien Rohextrakten aus Zellen, die auf Glucose bzw. Fructose gewachsen waren, vergleichend durchgeführt. Außerdem wurde überprüft, ob die Enzymaktivitäten in Gegenwart von Fructose oder Fructose-6-Phosphat erhöht sind. Die Ergebnisse sind in Tab. 21 zusammengefaßt.

Tab. 21: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Enzyme Triosephosphat-Isomerase (TPI), Glycerin-Dehydrogenase, Glycerokinase und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase in *Z. mobilis* nach Wachstum auf Glucose bzw. Fructose.

C-Quelle	Fructose	Glucose
	Spez. Aktivität [U/mg Protein]	
TPI	0.77	0.93
Glycerin-DH	0.19	0.20
Glycerokinase	nn	nn
Glycerin-3-Phosphat-DH	nn	nn

nn: nicht nachweisbar

Die C-Quelle hatte keinen Einfluß auf die Aktivitäten im Rohextrakt: Triosephosphat-Isomerase und Glycerin-Dehydrogenase konnten mit spezifischen Aktivitäten von 0.77 bis 0.93 bzw. 0.19 bis 0.20 U/mg Protein nachgewiesen werden. Die Aktivitäten

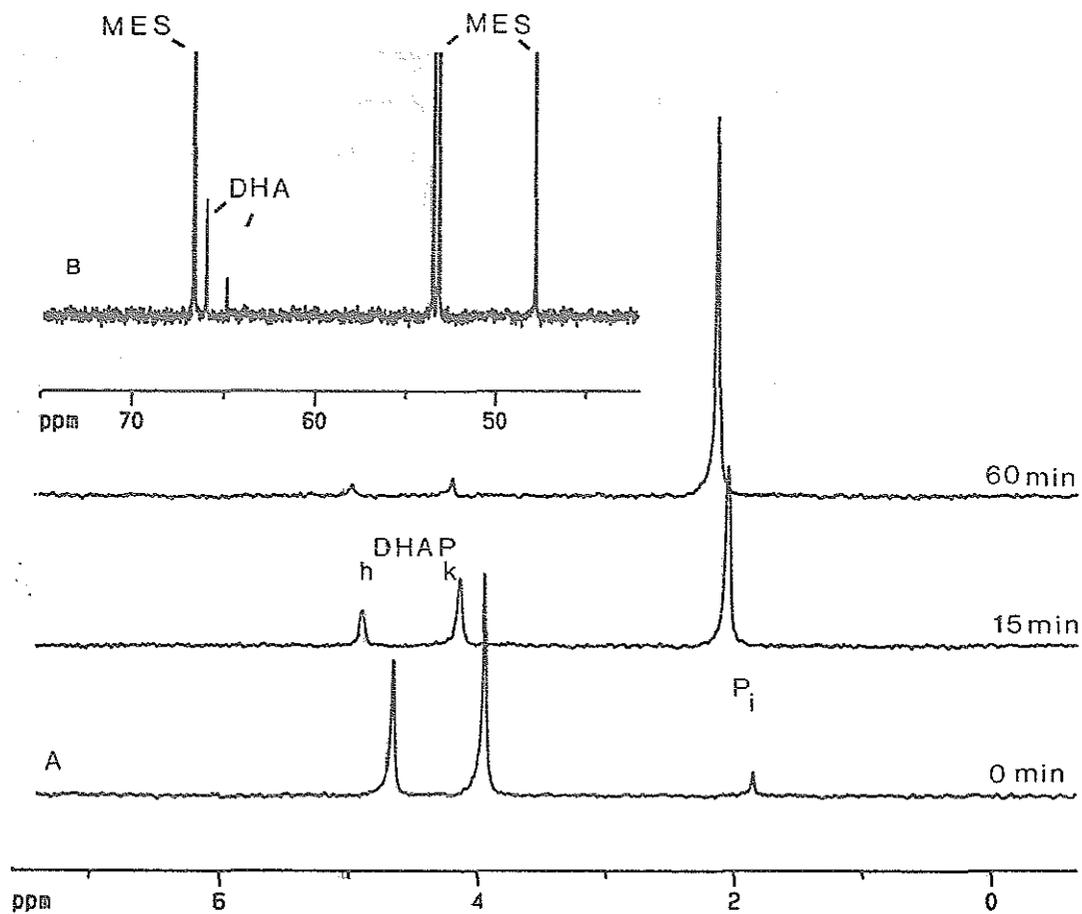
wurden durch Zusatz von Fructose bzw. Fructose-6-Phosphat zum Testansatz nicht erhöht.

Glycerokinase und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase konnten nicht nachgewiesen werden. Glycerokinase wurde mit einem kontinuierlichen und einem diskontinuierlichen Enzymtest in Richtung Glycerin-Phosphorylierung getestet. Als positive Kontrolle wurde in den Tests Glycerokinase aus *Candida mycoderma* eingesetzt. Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase konnte ebenfalls weder in kontinuierlichen noch diskontinuierlichen Enzymtests mit Glycerin-3-Phosphat als Substrat nachgewiesen werden. Hier wurde Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel zur Kontrolle der Enzymtests eingesetzt.

#### *Messung von Enzymaktivitäten mittels NMR-Spektroskopie*

Durch NMR-Messungen konnte eine Phosphatase nachgewiesen werden, die Dihydroxyacetonphosphat in Dihydroxyaceton und Phosphat spaltet. Diese Aktivität wurde in sequentiellen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren in Verbindung mit  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren nachgewiesen. Für die Messung der Aktivität wurde zunächst ein  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Dihydroxyacetonphosphat aufgenommen, in dem Dihydroxyacetonphosphat mit je einem Signal für die Keto- und Hydratform (Kuchel et al., 1990) nachgewiesen werden konnte (Abb. 17 A). Nach Zugabe von zellfreiem Rohextrakt aus *Z. mobilis* nahmen die Intensitäten dieser Signale ab, das des anorganischen Phosphats dagegen zu. In einem nach 60 min aufgenommenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum wurde neben den Signalen des MES-Puffers auch das Reaktionsprodukt Dihydroxyaceton nachgewiesen (Abb. 17 B). Wurde nun noch NADH zugegeben, führte dies zur Bildung von Glycerin und NAD durch die Glycerin-Dehydrogenase. Glycerin konnte in einem weiteren  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Aus der Abnahme der Signalintensitäten des Dihydroxyacetonphosphats konnte die spezifische Aktivität der Phosphatase im Rohextrakt bestimmt werden. Sie betrug 0.31 U/mg Protein, wenn die Zellen auf Fructose gezogen worden waren; wurde der Rohextrakt aus Zellen, die auf Glucose gewachsen waren, hergestellt, so wurde eine spezifische Aktivität von 0.26 U/mg Protein bestimmt.



**Abb. 17:** A:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren eines Enzymassays mit 7 mM Dihydroxyacetonphosphat, vor (0 min) und nach Start der Reaktion (15 und 60 min) durch Zugabe von Rohextrakt.

DHAP(h)/(k): Hydrat- bzw. Ketoform des Dihydroxyacetonphosphats;

$\text{P}_i$ : anorganisches Phosphat.

B:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Ausschnitt) des Enzymassays 60 min nach Start der Reaktion. DHA: Dihydroxyaceton; MES: MES-Puffer.

Die Spezifität der Phosphatase für Dihydroxyacetonphosphat wurde durch Vergleich der Aktivitäten mit unterschiedlichen Substraten untersucht. Es wurden  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Dihydroxyacetonphosphat, Glycerin-3-Phosphat, 3-Phosphoglycerat bzw. Sedoheptulose-7-Phosphat vor und nach Zugabe von Rohextrakt aufgenommen. Die Aktivität der Phosphatase war mit anderen Substraten deutlich niedriger (Tab. 22). Für die Berechnung der angegebenen Aktivitäten wurde die chemische Instabilität der

phosphorylierten Substanzen berücksichtigt, indem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Parallelansätzen ohne Rohextrakt aufgenommen wurden.

**Tab. 22:** Vergleich der relativen Aktivitäten der Phosphatase in *Z. mobilis*-Rohextrakt bei verschiedenen Substraten (100% = 0.31 U/mg Protein)

Substrat	Relative Aktivität [%]
Dihydroxyacetonphosphat	100
Glycerin-3-Phosphat	43
3-Phosphoglycerat <sup>(a)</sup>	6
Sedoheptulose-7-Phosphat	3

(a) 3-Phosphoglycerat wurde durch die Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase bzw. Enolase teilweise zu 2-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat umgesetzt. Daher wurde die Summe dieser drei Signale zur Berechnung der relativen Aktivität der Phosphatase mit 3-Phosphoglycerat eingesetzt.

Nachdem die Phosphatabspaltung aus Dihydroxyacetonphosphat nachgewiesen war, wurde untersucht, ob diese mit einer Substratketten-Phosphorylierung gekoppelt wird. Um dies nachzuweisen, wurde an Ansätzen außer Dihydroxyacetonphosphat auch ADP zugesetzt. Nach Zugabe von Rohextrakt wurden  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren aufgenommen, in denen jedoch kein ATP und damit auch keine Kopplung mit einer Substratketten-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte.

Damit war gezeigt worden, daß die Nebenprodukte Dihydroxyaceton und Glycerin aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat über die Reaktionen einer Phosphatase und einer Glycerin-Dehydrogenase gebildet werden.

#### 4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Ethanol auf den Glucose-Stoffwechsel sowie die Nebenproduktbildung in *Z. mobilis* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Konzentrationen intrazellulärer Metabolite *in vivo* zu messen. Dazu mußte zunächst eine geeignete Methodik entwickelt werden. Zwei NMR-Messprinzipien wurden beschrieben, die es erlauben, trotz der geringen Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie *in-vivo*-Spektren mit akzeptablem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu erhalten. Einerseits wurden konzentrierte Zellsuspensionen eingesetzt und so z. B. der Energiestoffwechsel von *Escherichia coli* untersucht (Ugurbil et al., 1978). Allerdings ist eine ausreichende Nährstoffversorgung in konzentrierten Suspensionen nicht über längere Zeit möglich, da sich die Substrat- und Produktkonzentrationen schnell ändern. Eine zweite Methode ermöglicht dagegen die Messung von Suspensionen niedriger Zelldichte. In einem speziell entwickelten NMR-Bioreaktor werden die Zellen zwischen Bioreaktor- und Messvolumen rasch ausgetauscht und so eine deutliche Verbesserung der Messempfindlichkeit erzielt (de Graaf et al., 1992). Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit Suspensionen hoher Zelldichte durchgeführt, da die Entwicklung eines NMR-Bioreaktors auf der Basis des zweiten Messprinzips noch nicht abgeschlossen war.

Für die Versuche mit dichten Zellsuspensionen mußten die Bedingungen genau definiert werden, unter denen reproduzierbare NMR-Messergebnisse nach einem Glucosepuls erzielt werden konnten. Es wurde gezeigt, daß mit Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase bis zu maximal 3,5 Stunden nach der Zellernte reproduzierbare Ergebnisse erhalten wurden. Dasselbe Erfahrung machten Ugurbil et al. (1979): sie konnten *E. coli*-Zellsuspensionen höchstens 2 h bis zur NMR-Messung aufbewahren. Danach bildeten die *E. coli*-Zellen nach Substratzugabe immer weniger ATP und die Messungen selbst wurden durch zunehmende Linienbreiten (über 50 Hz) beeinträchtigt. Die Linienbreite des externen Phosphates der *in-vivo*-Spektren in dieser Arbeit betrug 7 bis 20 Hz (nach Fourier-Transformation ohne Filterfunktion) nach Optimierung der Probenvorbereitung und Messbedingungen. Linienbreiten extrazellulärer Signale in *in-vivo*-Spektren bis zu 125 Hz wurden berichtet (Herrero et al., 1985). Dennoch reichte die in dieser Arbeit erzielte relativ gute Auflösung nicht aus, einzelne Metabolite zu identifizieren. Eine bessere Auflösung von 1.7 bis 2.5 Hz wurde jedoch in Spektren von Perchlorsäure-Extrakten erzielt, in denen Zuckerphosphate und Nukleotide identifiziert und ihre intrazellulären Konzentrationen bestimmt werden konnten.

Außer dem Einfluß der Probenvorbereitung auf den physiologischen Zustand der Zellen mußte auch berücksichtigt werden, daß elektromagnetische Felder Stoffwechselfvorgänge beeinflussen können (Grundler et al., 1992). Die Durchführung von Perchlorsäure-Extraktionen für *in-vitro*-NMR-Messungen bot die Möglichkeit, die Störung des Stoffwechsels unter *in-vivo*-Messbedingungen zu untersuchen. Die Versuchsbedingungen bis zur Herstellung der Perchlorsäure-Extrakte entsprachen genau denjenigen der *in-vivo*-Versuche, allerdings wurde die Glucosezugabe zur Zellsuspension außerhalb des Einflußbereichs des NMR-Magneten durchgeführt. Da die Ergebnisse der *in-vivo*-Messungen und der Extraktmessungen übereinstimmten, kann man davon ausgehen, daß im Rahmen dieser Arbeit das Magnetfeld den Stoffwechsel von *Z. mobilis* nicht beeinflusste.

*Z. mobilis* metabolisiert Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg (Gibbs und DeMoss, 1954). In den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Perchlorsäure-Extrakten nach Glucosepuls wurden vier phosphorylierte Intermediate dieses Stoffwechselwegs bestimmt. Glucose-6-Phosphat, 6-Phosphogluconat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und 3-Phosphoglycerat wurden mit intrazellulären Konzentrationen bis zu 4.1 mM nachgewiesen. Auch von Algar und Scopes (1985) wurden in *Z. mobilis*-Zellsuspensionen mittels enzymatischer Bestimmung ähnliche Werte (0.15-3.9 mM) gefunden. Unter vergleichbaren Bedingungen wurden in *E. coli* u.a. 13 mM Fructosebisphosphat (Ugurbil et al., 1978) und in *S. cerevisiae* 10 mM Fructosebisphosphat (Shanks und Bailey, 1988) durch NMR-Spektroskopie gemessen. Als Ursache dieser relativ hohen Konzentrationen wurde eine Kontrolle des Glucosemetabolismus auf der Ebene der Triosephosphate angenommen. Diese Annahme konnten den Hollander et al. (1986) durch einen Austausch der  $^{13}\text{C}$ -Markierung (Scrambling) zwischen dem C1- und C6-Atom des Fructosebisphosphats bei geringerem Kohlenstoff-Fluß unter aeroben Bedingungen nachweisen.

Eine allosterische Regulation der Enzyme des Glucosemetabolismus in *Z. mobilis* konnte dagegen durch *in-vitro*-Studien nicht nachgewiesen werden (Algar und Scopes, 1985). Aus einer Gegenüberstellung der gemessenen Enzymaktivitäten mit der maximalen Glucose-Aufnahmerate von  $900 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  schlossen Algar und Scopes (1985), daß die Aktivitäten der Enzyme Glucokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Enolase und Alkohol-Dehydrogenase limitierend für den Kohlenstoff-Fluß werden könnten. Damit wird verständlich, daß nach einem Glucosepuls Glucose-6-Phosphat und 3-Phosphoglycerat Konzentrationen über 1 mM erreichten: Glucose-6-Phosphat wegen der erwähnten relativ niedrigen Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 3-Phosphoglycerat aufgrund der Lage des Gleichgewichts zwischen 3-Phosphoglycerat und 2-Phosphoglycerat sowie aufgrund der niedrigen Enolase-Aktivität. Die Aktivität der

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ist nach den Überlegungen von Algar und Scopes nicht limitierend, sodaß sich die ebenfalls relativ hohe Konzentration von Glycerinaldehyd-3-Phosphat nach einem Glucosepuls nicht mit Hilfe der *in vitro* gemessenen Enzymaktivitäten erklären läßt.

*Z. mobilis* konnte nach einer kurzen Phase der Glucoseverarmung zwischen Zellernte und Start der NMR-Messungen die dann angebotene Glucose rasch phosphorylieren und über den Entner-Doudoroff-Weg umsetzen. Dies ist insofern bemerkenswert, als weder *in vivo* noch *in vitro* mit  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie bei einer Nachweisgrenze von 0,1 mM Nukleosidtriphosphate in den Zellen vor der Glucosezugabe nachgewiesen werden konnten, die nach einem Glucosepuls für die Phosphorylierung des Substrats hätten eingesetzt werden können. In ihren Studien zur Energetik von *Z. mobilis* hatte Ruhrmann (1993) mit biochemischen Methoden ebenfalls kein ATP in glucoseverarmten Zellen feststellen können. Die Bestimmung intrazellulärer Konzentrationen aus  $^{31}\text{P}$ -Spektren von Extrakten ergab für Zellen, die Glucose metabolisierten, 4 mM ATP und 2 mM UTP. Diese Werte entsprechen den Ergebnissen aus vergleichbaren Ansätzen mit biochemischen Analysemethoden (Ruhrmann, 1992; Lazdunski und Belaich, 1972). Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit festgestellten unverzüglich ablaufenden Glucoseumsatz mit Energiekonservierung führte in einem zellfreien System mit *Z. mobilis*-Extrakt die Substratphosphorylierung zu ATP-Mangel und verzögertem Umsatz während der ersten Minuten nach Glucosezugabe (Algar und Scopes, 1985). Möglicherweise kann *Z. mobilis* zunächst ATP mit Hilfe der Adenylatkinase aus ADP bilden und damit Glucose phosphorylieren. Die spezifische Aktivität der Adenylatkinase wurde von Algar und Scopes (1985) mit  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  in *Z. mobilis* nachgewiesen. Allerdings müßte diese Reaktion reguliert werden, um ein Leerlaufen des ADP-Pools während einer Hungerphase zu verhindern. In den *in-vitro*  $^{31}\text{P}$ -Messungen war aufgefallen, daß ADP mit einer relativ konstanten intrazellulären Konzentration von 1 mM gemessen wurde. Diese veränderte sich auch nicht nach einem Glucosepuls, während die Konzentrationen von ATP und UTP anstiegen. Eine konstante ADP-Konzentration könnte für einen hohen Glucoseumsatz notwendig sein, da ADP als Cosubstrat der Phosphoglycerat-Kinase und der Pyruvatkinase zur Verfügung stehen muß. Der  $k_m$ -Wert der Pyruvatkinase für ADP wurde mit 0.17 mM bestimmt (Pawluk et al., 1986), sodaß eine maximale Umsatzrate bei 1 mM ADP gewährleistet bleibt. *Z. mobilis* hat mehrere Möglichkeiten, um ADP aus ATP zu regenerieren:

Erstens wird ATP in Reaktionen der Biosynthese verbraucht. Zweitens könnte die energiereiche Phosphatgruppe von ATP auf UDP durch eine Nukleosid-Diphosphat-Kinase übertragen werden. Dafür spricht, daß in den Extraktspektren nach einem Glucosepuls eine Abnahme der UDP-Konzentration von 1,6 mM unter 0,1 mM und andererseits die Bildung von 2 mM UTP gemessen wurde. Drittens kann ADP durch die

Adenylatkinase aus ATP und AMP gebildet werden (Algar und Scopes, 1985). Eine Bestätigung dieser Annahme war durch die NMR-Messungen nicht möglich, da der AMP-Pool aufgrund der Signalüberlagerung in der Monophosphat-Region der Spektren nicht verfolgt werden konnte. Schließlich kann ATP durch eine ATPase umgesetzt werden. In *Z. mobilis* wurde eine membrangebundene ATPase des  $F_0F_1$ -Typs charakterisiert, die mit ATP und UTP aktiv ist und einen pH-Gradienten aufbaut. Es wurde ein Anteil der ATPase am ATP-Turnover von 20% berechnet (Reyes und Scopes, 1991).

Die Aktivität der ATPase in energetisierten Zellen wurde in den *in-vivo*-Messungen auch durch den Aufbau des pH-Gradienten von bis zu 0.8 pH-Einheiten deutlich. Der intrazelluläre pH-Wert betrug zwischen 5.9 und 6.4 in Zellen, die Glucose metabolisierten. Dies entspricht Messungen der Protonenmotorischen Kraft in *Z. mobilis*, bei denen eine pH-Homöostase mit einem internen pH-Wert von pH 6.0 bis 6.4 festgestellt wurde (Ruhmann, 1992).

$^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie sowohl *in vivo* als auch von Extrakten zeigte, daß Ethanol den Glucosemetabolismus in *Z. mobilis* beeinflusst. Der Aufbau des pH-Gradienten war ebenso betroffen wie die Bildung von Zuckerphosphaten und der Energiestatus der Zellen. Auch bei *Saccharomyces cerevisiae* war durch NMR-Messungen eine langsamere Bildung von Zuckerphosphaten und ein verringerter Anstieg des internen pH-Werts bei Glucoseumsatz unter Ethanoleinfluß festgestellt worden (Loureiro-Dias und Santos, 1990). In Gegenwart von Ethanol war die Glucoseumsatzrate von Zellsuspensionen verringert. Sie betrug in den Zellsuspensionen ohne Ethanol ca.  $9 \text{ g} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ . Dieser Wert wurde auf der Basis der eingesetzten Trockenmasse, der eingesetzten und vollständig verbrauchten Glucose und der nach Glucosezugabe über 4 min erhöhten und relativ konstanten Signalintensitäten der Nukleosidtriphosphate bestimmt. Dagegen wurden in Gegenwart von 10% Ethanol bis zu 20 min nach einem Glucosepuls Nukleosidtriphosphate nachgewiesen, d.h. das angebotene Substrat wurde unter Ethanoleinfluß langsamer umgesetzt. Für *Z. mobilis* wurde anhand der Glucoseabnahme in Zellsuspensionen eine 60%ige Hemmung des Glucoseumsatzes in Gegenwart von 10% Ethanol gezeigt (Osman und Ingram, 1985). Die Autoren nahmen an, daß Ethanol die Funktion der Membran als Permeabilitätsbarriere einschränkt, da sie eine Abnahme der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen und des Nukleotidpools der Zellen messen konnten. Auch in kontinuierlichen Kulturen wurde gezeigt, daß bei Ethanol-Konzentrationen über 60 g/l der Glucoseumsatz absinkt (Lee et al., 1980). Durch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Ethanol-Konzentrationen bis 10% wurde der Glucoseumsatz nicht vollständig gehemmt. Eine vollständige Hemmung wurde erst bei Ethanol-Konzentrationen über 150 g/l (Hermans, 1992) bzw. 200 g/l (Osman und Ingram, 1985) nachgewiesen. Damit weist der Katabolismus von *Z. mobilis* eine mit ethanoltoleranten Hefestämmen vergleichbare Ethanoltoleranz auf (Ingram und Buttke, 1984).

Ein Einfluß der Inkubationszeit mit Ethanol konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Allerdings beschränkten sich die untersuchten Zeitintervalle auf 20 bis 60 min. Längere Inkubationszeiten konnten nicht überprüft werden, da schon ohne Ethanol die Glucoseumsatzrate in konzentrierten Zellsuspensionen nach längerer Glucoseverarmung abnahm. Eine Abnahme der Ethanolbildungsrate in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Ethanol wurde z.B. bei der Hefe *Kluyveromyces fragilis* festgestellt: Bei 100 g/l Ethanol nahm die Ethanolbildungsrate in 20 Stunden um die Hälfte ab (Chen et al., 1990).

Die in den *in-vivo*-Spektren gemessene geringere Glucoseumsatzrate sowie der verringerte pH-Gradient müssen von einer möglichen Hemmung des Wachstums abgegrenzt werden. Es wurde gezeigt, daß bei Konzentrationen über 70 g/l Ethanol das Wachstum von *Z. mobilis* vollständig gehemmt wird (Stevnsborg und Lawford, 1986). Die Ursache hierfür war die Einstellung von Zellteilung, DNA- und Fettsäuresynthese sofort nach Ethanolzugabe und nicht Inhibierung durch Energiemangel (Hermans, 1992). Die im Vergleich zum Katabolismus höhere Ethanolsensitivität des Anabolismus von *Z. mobilis* wurde durch Enzymmessungen bestätigt: In Gegenwart von 10% Ethanol nahm die PEP-Carboxylase-Aktivität auf 58% des Werts der ethanolfreien Kontrolle ab, während die Aktivität der Pyruvat-Decarboxylase unverändert blieb (Bringer-Meyer und Sahm, 1989). Anhand der Daten dieser Arbeit können jedoch nur Aussagen zur Hemmung des Katabolismus getroffen werden, da die NMR-Messungen der konzentrierten Zellsuspensionen lediglich einen Vergleich des Stoffwechsels bis zu 20 min nach Glucosepuls ermöglichten.

Die in den *in-vivo*-Spektren gemessene geringere Glucoseumsatzrate in Gegenwart von Ethanol könnte durch eine Hemmung sowohl der Glucoseaufnahme als auch der katabolen Reaktionen verursacht werden. Die Daten dieser Arbeit geben keinen Hinweis auf eine Hemmung der Glucoseaufnahme durch Ethanol. Glucose wird in *Z. mobilis* nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion über einen Carrier mit hoher Aktivität aufgenommen (DiMarco und Romano, 1985). Messungen der intrazellulären Glucosekonzentration in kontinuierlicher Kultur bzw. in Zellsuspensionen nach Ethanolzugabe bis zu 90 g/l zeigten, daß die Ethanolbildungsrate, aber nicht der Glucosetransport in Abhängigkeit von der Ethanol-Konzentration absinkt (Hermans, 1992). Bei zunehmenden Ethanol-Konzentrationen ist der Glucosetransport also nicht limitierend für die Ethanolbildung.

Die Aktivität der Glucokinase liegt im Bereich der maximalen Glucoseaufnahmerate von *Z. mobilis* (Algar und Scopes, 1985). Eine Limitierung des Glucoseumsatzes durch Ethanol-Inhibierung der Glucokinase konnte jedoch durch Messungen der spezifischen

Aktivität im Rohextrakt in Gegenwart von Ethanol ausgeschlossen werden (Millar et al., 1982; Park et al., 1988; Bringer-Meyer und Sahm, 1989). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit lag Glucose-6-Phosphat nach einem Glucosepuls auch in Gegenwart von 10% Ethanol in intrazellulären Konzentrationen weit über dem  $k_m$ -Wert von 0.17 mM der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase vor (Scopes et al., 1985). Dagegen wäre bei einer Limitierung des Glucoseumsatzes auf der Ebene des Glucosetransporters oder der Glucokinase zu erwarten, daß die Konzentration von Glucose-6-Phosphat auf Konzentrationen um den  $k_m$ -Wert der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase absinkt. Die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird durch Ethanol nicht inhibiert (Park et al., 1988).

Ethanolkonzentrationen von bis zu 10% hatten keinen Einfluß auf die intrazelluläre Konzentration von 6-Phosphogluconat. Diese lag zwischen 0.5 und 0.9 mM nach Glucosepuls und damit weit über dem  $k_m$ -Wert der Dehydratase von 0.04 mM (Scopes und Griffiths-Smith, 1984).

Die intrazelluläre Konzentration von KDPG konnte wegen der Signalüberlagerungen in den Extraktspetren nicht bestimmt werden. Eine Akkumulation in Gegenwart von Ethanol erscheint aufgrund der konstanten Signalmuster im Bereich der Peakposition des KDPG unwahrscheinlich. Für die KDPG-Aldolase wurde wie auch für die 6-Phosphogluconat-Dehydratase eine spezifische Aktivität gemessen, die weit über der für die maximale Glucoseumsatzrate in *Z. mobilis* erforderlichen Aktivität liegt (Algar und Scopes, 1985). Eine Limitierung des Glucoseumsatzes durch Ethanol auf der Ebene der Lactonase, 6-Phosphogluconat-Dehydratase und KDPG-Aldolase konnte somit nicht nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit fanden Millar et al. (1982) bei einem Vergleich der Ethanolstabilität der Enzyme von *Z. mobilis* und *S. cerevisiae*, daß die für den Entner-Doudoroff-Weg spezifischen Enzyme im Bereich zwischen 0-15% Ethanol nur geringfügig gehemmt wurden.

In Gegenwart von 10% Ethanol waren die intrazellulären Konzentrationen von Glycerinaldehyd-3-Phosphat erhöht, Sedoheptulose-7-Phosphat und 3-Phosphoglycerat akkumulierten. Die stetige Akkumulation von 3-Phosphoglycerat wies auf eine Limitierung der glykolytischen Reaktionen hin. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase und Enolase in Gegenwart von 10% Ethanol um 30 bzw. 40% verringert waren. In einer Studie der Enzymaktivitäten in *Z. mobilis* wurde darauf hingewiesen, daß die im Verhältnis zur maximalen Glucoseumsatzrate niedrige Aktivität der Enolase zur Limitierung des Kohlenstoff-Flusses führen könnte (Algar und Scopes, 1985). Die Ethanolinhibierung der Enolase und der Phosphoglycerat-Mutase führte damit zur 3-Phosphoglycerat-Akkumulation und zu einer geringeren Glucoseumsatzrate, die sich in erhöhten Konzentrationen von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Glucose-6-Phosphat zeigte.

Auch für die Pyruvat-Kinase wurde gezeigt, daß ihre Aktivität in Gegenwart von 10% Ethanol um 14% abnimmt (Bringer-Meyer und Sahm, 1989). Dennoch konnte eine Akkumulation von Phosphoenolpyruvat in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Der Grund dürfte darin zu sehen sein, daß die zu Phosphoenolpyruvat führenden Reaktionen der Phosphoglycerat-Mutase und Enolase stärker gehemmt wurden als die Pyruvat-Kinase. Dagegen konnte durch  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie von *Streptococcus lactis*-Extrakten nachgewiesen werden, daß durch die Inhibierung der Pyruvat-Kinase mit dem negativen Effektor Phosphat eine Akkumulation von Phosphoenolpyruvat, 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat induziert wurde (Thompson und Torchia, 1984). Möglicherweise wurde in *Z. mobilis* die intrazelluläre Phosphoenolpyruvat-Konzentration in Gegenwart von Ethanol geringfügig erhöht. Der  $K_m$ -Wert der Pyruvat-Kinase wurde mit 0.08 mM bestimmt (Pawluk et al., 1986), sodaß in fermentierenden *Z. mobilis*-Zellen die Phosphoenolpyruvat-Konzentration auch nach einer Erhöhung durch Ethanol-Inhibierung der Pyruvat-Kinase unter der Nachweisgrenze von Extraktspiegeln liegen kann. Phosphoenolpyruvat reduziert als negativer allosterischer Effektor der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Anderson und Dawes, 1985) deren Aktivität in einer Konzentration von 1 mM auf 8% der vollen Aktivität. In einer entsprechenden Konzentration liegt Phosphoenolpyruvat auch in Gegenwart von 10% Ethanol nicht vor, aber eine geringfügig erhöhte Konzentration würde die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase hemmen können. Dies könnte ein zweiter Grund - außer der generell niedrigeren Glucoseumsatzrate - dafür sein, daß die Glucose-6-Phosphat-Konzentration in Gegenwart von 10% Ethanol langsamer absinkt als in den ethanolfreien Kontrollen.

Die Akkumulation von Sedoheptulose-7-Phosphat kann mit der Inhibierung glykolytischer Enzyme nicht erklärt werden. Sedoheptulose-7-Phosphat kann in *Z. mobilis* ausgehend von 6-Phosphogluconat durch die Reaktionen der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Phosphoribose-Isomerase, Phosphoribose-Epimerase und Transketolase gebildet werden (Feldmann et al., 1992). Als zweites Produkt entsteht Glycerinaldehyd-3-Phosphat, das auf üblichem Weg metabolisiert werden kann. Demnach konkurrieren um 6-Phosphogluconat die beiden Enzyme 6-Phosphogluconat-Dehydratase des Entner-Doudoroff-Wegs und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Die Dehydratase wird durch 3-Phosphoglycerat inhibiert (Scopes und Griffiths-Smith, 1984). Daher könnte eine ethanolinduzierte Akkumulation des 3-Phosphoglycerat zur Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydratase einerseits und einer vermehrten Sedoheptulose-7-Phosphat-Bildung ausgehend von der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase andererseits führen.

Eine durch Ethanol verursachte Verminderung der Glucoseumsatzrate in Zellsuspensionen führte auch zu einer geringeren Substratstufenphosphorylierung: die

ATP- und UTP-Konzentrationen erreichten nur 50% der Werte in Ansätzen ohne Ethanolzusatz. Darüberhinaus wurde über die ATPase ein ebenfalls um ca. 50% reduzierter pH-Gradient aufgebaut. Die Glucoseumsatzrate nahm auch im Laufe von *Z. mobilis*-Batchfermentationen ab (Osman et al., 1987). Die Autoren stellten mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Extrakten aus Zellen der frühen und späten exponentiellen Wachstumsphase einen Anstieg der intrazellulären Zuckerphosphate fest, ohne jedoch einzelne Substanzen zu identifizieren. Eine ethanolinduzierte Schädigung der Membran wurde als Ursache für eine Abnahme des  $\Delta\text{pH}$  angenommen. Diese  $\Delta\text{pH}$ -Abnahme sowie verringerte Aktivitäten der Pyruvat-Kinase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase sollten für die verringerte Fermentationsaktivität verantwortlich sein. Zwei Beobachtungen belegen, daß nicht nur die steigende Ethanol-Konzentration (bis 6.2%) zur Erklärung herangezogen werden kann:

1. Durch elektrophoretische Analysen wurde gezeigt, daß die Pyruvat-Kinase in *Z. mobilis*-Zellen der stationären Phase nicht mehr nachweisbar ist, da sie durch Proteolyse abgebaut wurde (An et al., 1991).
2. Die Aktivität der ATPase ist vom pH-Wert abhängig und geht unterhalb pH 5 stark zurück (Hermans, 1992). Daher kann die von Osman et al. (1987) beobachtete Abnahme des pH-Gradienten auch auf die Abnahme des externen pH-Werts während der nicht pH-kontrollierten Batchfermentation zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit nahm der ATP-Gehalt in zweistufigen kontinuierlichen Fermentationen mit bis zu 100 g/l Ethanol nicht ab (Hermans, 1992). Allerdings verringerte sich unter diesen Bedingungen die Aktivität der ATPase um 70%, was die ebenfalls gefundene Abnahme des pH-Gradienten auf 0.1 pH-Einheiten erklärte.

Ethanol nimmt somit über die Hemmung enzymatischer Aktivitäten Einfluß auf die Glucoseumsatzrate (Phosphoglycerat-Mutase, Enolase: diese Arbeit), auf den pH-Gradienten über die ATPase (Hermans, 1992) und auf den Anabolismus über die PEP-Carboxylase (Bringer-Meyer und Sahm, 1989).

Von Viikari (1988) wurde gezeigt, daß die Nebenproduktbildung die Ethanolproduktivität in *Z. mobilis* verringert. In Batchfermentationen mit Glucose wurde eine Ethanolausbeute von 95% der Theorie, mit Fructose dagegen nur von 90% der Theorie ermittelt (Viikari, 1988). Diese verringerte Ethanolausbeute wurde auf eine vermehrte Nebenproduktbildung mit dem Substrat Fructose zurückgeführt.

Ein Vergleich von Batchfermentationen mit Glucose bzw. Fructose in dieser Arbeit zeigte, daß von *Z. mobilis* ZM6 Lactat, Acetoin, Acetat, Glycerin und Dihydroxyaceton als Nebenprodukte gebildet wurden. Nur die Konzentrationen von Glycerin und Dihydroxyaceton waren nach Fructosewachstum erhöht im Vergleich zu Glucosewachstum. Als weitere Nebenprodukte in Fructose-Batchfermentationen wurden von Viikari und Korhola (1986) Mannit und Sorbit erwähnt, wobei dort die Mannitbildung als Auslöser der Nebenproduktbildung diskutiert wurde. Bei hohen Fructosekonzentrationen würde durch eine Mannit-Dehydrogenase ein Mangel an Reduktionsäquivalenten verursacht. Dieser würde zu einer Verschiebung der Produktbildung in Richtung Dihydroxyaceton und Glycerin führen. Allerdings wäre für die Glycerinbildung ein NADH-Überschuß erforderlich, der erst in der späten Wachstumsphase zum Auftreten von Glycerin im Kulturmedium führen würde. Dies konnte in den Fermentationen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Glycerin wurde unabhängig von der Wachstumsphase in einem relativ konstanten Verhältnis zu Ethanol gebildet. Für die Mannit-Dehydrogenase wurde ein  $k_m$ -Wert von 180 mM gemessen, sodaß eine Mannitbildung erst bei hohen intrazellulären Konzentrationen von Fructose erwartet werden kann (Viikari und Korhola, 1986). Bei einer extrazellulären Fructosekonzentration von 80 g/l wurden intrazellulär 200 mM Fructose gemessen (Struch, 1992). Dennoch wurde bei einer Steigerung der Fructose-Anfangskonzentration bis 150 g/l keine Bildung von Mannit beobachtet, das somit nicht generell die Nebenproduktbildung in *Z. mobilis* auslösen kann. Allerdings wurde bei höheren Fructose-Anfangskonzentrationen mehr Glycerin und Dihydroxyaceton gefunden.

Neben der Ethanolausbeute ist auch die Biomasseausbeute bei Wachstum mit Fructose verringert. Viikari und Korhola (1986) führten dies einerseits auf einen von ihnen gezeigten toxischen Effekt des Dihydroxyaceton zurück und andererseits auf ATP-Mangel. Sie berechneten einen ATP-Verlust von 26% bezogen auf den aus dem eingesetzten Substrat möglichen Energiegewinn. Es erscheint in Anbetracht des vom Wachstum entkoppelten Katabolismus (Lazdunski und Belaich, 1977) fraglich, inwieweit diese verringerte ATP-Ausbeute tatsächlich eine Verringerung der Biomasse-Synthese verursacht.

Die Sterilisation der Fructose beeinflusste wie auch die Fructose-Anfangskonzentration die Bildung von Glycerin und Dihydroxyaceton. Die Konzentrationen des Dihydroxyaceton waren drastisch verringert, wenn in Batchfermentationen die Fructose nicht autoklaviert sondern sterilfiltriert worden war. Eine abiotische Dihydroxyaceton-Bildung aus autoklavierter Fructose konnte zwar ausgeschlossen werden, aber eine Erklärung dieses Phänomens steht noch aus. Auch bei anderen Mikroorganismen hatte die Methode der Sterilisation des Substrats Einfluß auf das Wachstum. So wurde ein auf

hitzesterilisierter Glucose verbessertes Wachstum u.a. für *Lactobacillus*-Stämme und Propionibakterien berichtet (El Ghazzawi und Schmidt, 1967).

In kontinuierlicher Kultur betragen die steady-state-Konzentrationen von Dihydroxyaceton unter 1 mM und die Glycerinbildung war um ca. 50% gegenüber Batchfermentationen verringert. Wie beim Vergleich der Ethanolausbeute und der Nebenproduktbildung bei Batchfermentationen mit Fructose bzw. Glucose wird auch hier ein Zusammenhang zwischen Nebenproduktbildung und Ethanolausbeute deutlich: bei geringerer Nebenproduktbildung steigt die Ethanolausbeute. So wurde in Untersuchungen der Kinetik der kontinuierlichen Kultur von *Z. mobilis* mit 100 g/l Fructose eine Ethanolausbeute von 96% der Theorie ermittelt (Toran-Diaz et al., 1984; Jain et al., 1985), die damit dem Wert von kontinuierlichen Glucosefermentationen vergleichbar ist (Rogers et al., 1982).

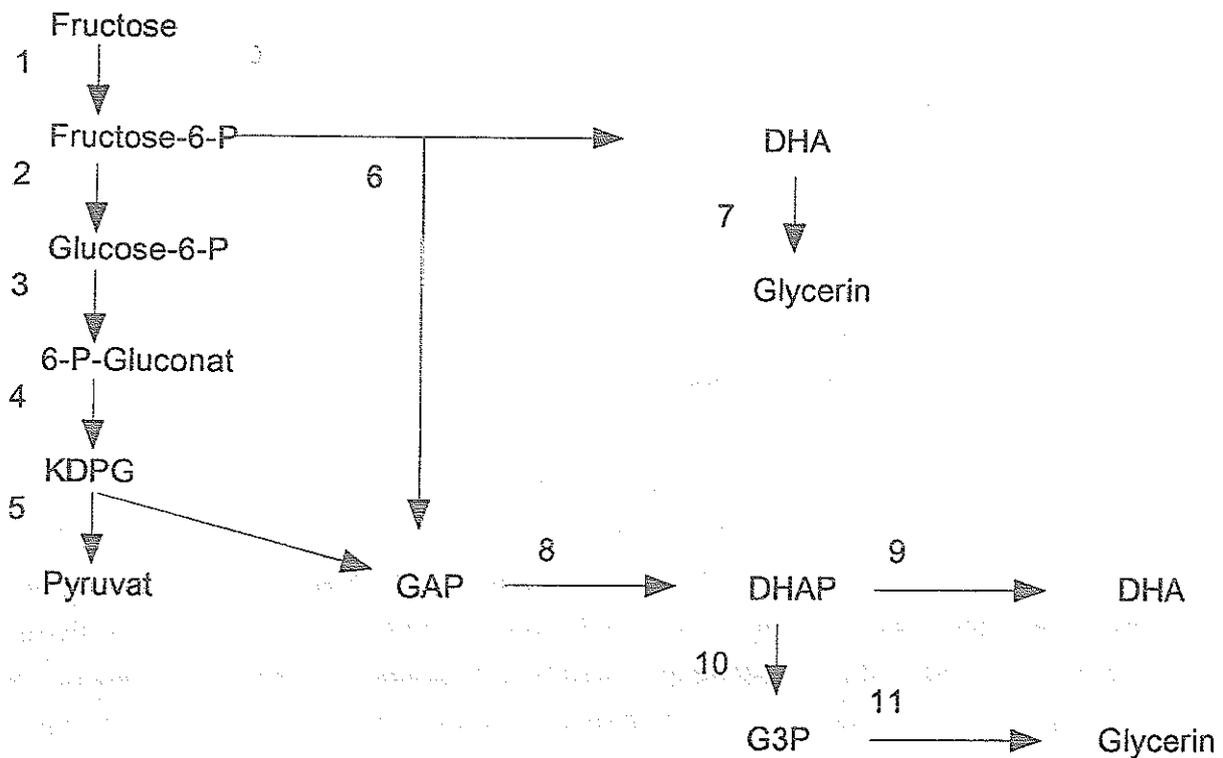
Eine spezifische Steigerung der Glycerinproduktion durch Zusatz von  $\text{NaHSO}_3$  in Anlehnung an die Glycerinproduktion mit Hefen (2. Neuberg'sche Vergärungsform) war nicht erfolgreich: Zusatz von  $\text{NaHSO}_3$  hemmte das Wachstum von *Z. mobilis* (Strohdeicher und Bringer-Meyer, pers. Mitteilung).

Lactat, Acetoin und Acetat wurden als Nebenprodukte auch in Glucosefermentationen gebildet. Bis zu 22 mM Lactat wurde in kontinuierlichen Fermentationen mit 200 g/l Glucose gefunden (Hermans, 1992). In einem Vergleich mit *Saccharomyces bayanus* wurde Lactat als typisches Nebenprodukt der Ethanolproduktion mit *Z. mobilis* charakterisiert, während von der Hefe hauptsächlich Glycerin und Succinat gebildet wurden (Amin et al., 1983). Von beiden Organismen wurde Acetoin gebildet. Schon 1934 war von Schreder et al. gezeigt worden, daß bei der Fermentation von Glucose durch *Z. mobilis* durch Belüftung die Acetoin- und die Acetaldehydbildung zunehmen. Die Synthese von Acetoin erfolgt in *Z. mobilis* und *S. carlsbergensis* durch die Pyruvat-Decarboxylase, wobei eine C-C-Bindung zwischen Acetaldehyd und enzymgebundenem Hydroxyethyl-Thiaminpyrophosphat geknüpft wird (Bringer-Meyer und Sahm, 1988b). Im Zusammenhang mit der für eine Decarboxylase ungewöhnlichen Katalyse einer C-C-Verknüpfung wurde die Homologie der Pyruvat-Decarboxylase mit der Acetolactat-Synthase der Valin-/Isoleucin-Biosynthese diskutiert (Bornemann et al., 1993).

In Fermentationen mit hohen Fructose-Konzentrationen konnte in der vorliegenden Arbeit keine Sorbitproduktion festgestellt werden. Im Gegensatz dazu bildete *Z. mobilis* VTT-E-78082 mit Fructose als einziger C-Quelle nur 0.3 g/l Sorbit, aber bis zu 17 g/l Sorbit bei Wachstum mit je 7.5% Glucose und Fructose (Viikari, 1984). Sorbit wird durch Reduktion von Fructose bei gleichzeitiger Oxidation von Glucose zu Gluconat von einer

Glucose-Fructose Oxidoreduktase gebildet (Zachariou und Scopes, 1986). Die Glucose-Fructose Oxidoreduktase wurde als periplasmatisches Enzym mit fest gebundenem NADP charakterisiert (Loos et al., 1991).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden in der Literatur zwei mögliche Wege für die Bildung von Glycerin und Dihydroxyaceton diskutiert (Abb. 18). Viikari (1988) nahm an, daß ausgehend von Glycerinaldehyd-3-Phosphat die Reaktionen der Triosephosphat-Isomerase und einer Phosphatase zu Dihydroxyaceton, sowie einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und Phosphatase zu Glycerin führen würden. Demgegenüber wurde eine direkte Bildung von Dihydroxyaceton aus Fructose-6-Phosphat durch eine Nebenreaktion der KDPG-Aldolase von Sprenger (1993) postuliert.



**Abb. 18:** Schema der möglichen Reaktionen, die in *Z. mobilis* bei Wachstum mit Fructose zur Bildung von Glycerin und Dihydroxyaceton führen können.

GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; G3P: Glycerin-3-Phosphat; DHA: Dihydroxyaceton; DHAP: DHA-Phosphat. Enzymaktivitäten: 1, Fructokinase; 2, Glucose-6-Phosphat-Isomerase; 3, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Lactonase; 4, 6-Phosphogluconat-Dehydratase; 5/6, KDPG-Aldolase/ hypothetische Nebenreaktion; 7, Glycerin-Dehydrogenase; 8, Triosephosphat-Isomerase; 9, DHAP-Phosphatase; 10, G3P-Dehydrogenase; 11, Glycerokinase

Die KDPG-Aldolase katalysiert die Spaltung des in der offenen Form vorliegenden KDPG zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Nur 9% des KDPG liegen in der Kettenform vor, weitere 50% als  $\beta$ -Furanose und 41% als  $\alpha$ -Furanose (Midelfort et al., 1977). Eine Spaltung von Fructose-6-Phosphat durch die Aldolase konnte in dieser Arbeit sowohl durch Fermentation von [2- $^{13}$ C]-Fructose als auch durch *in-vitro*-Tests der gereinigten Aldolase nicht gezeigt werden. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit von KDPG und Fructose-6-Phosphat scheint die Aldolase Fructose-6-Phosphat nicht als Substrat zu akzeptieren. Für die KDPG-Aldolase aus *Pseudomonas putida* wurden folgende Merkmale als entscheidend für die Substratspezifität nachgewiesen: eine 3-Deoxy-Gruppe, eine 4-Hydroxy-Gruppe in erythro-Stellung und eine 6-Phospho-Gruppe (Wood, 1972). Fructose-6-Phosphat wird vermutlich nicht als Substrat akzeptiert, da es in 3-Stellung eine Hydroxy- und keine Deoxy-Gruppe aufweist. In Syntheserichtung kann die KDPG-Aldolase mehrere Substratanaloga des Glycerinaldehyd-3-Phosphat verwerten, aber Pyruvat kann nicht durch Dihydroxyaceton ersetzt werden (B. Knappmann, pers. Mitteilung).

Mittels Enzymmessungen konnte gezeigt werden, daß Dihydroxyaceton aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat über die Triosephosphat-Isomerase und eine Dihydroxyaceton-Phosphatase gebildet wird, und Glycerin aus Dihydroxyaceton durch eine Glycerin-Dehydrogenase. Alternativ dazu könnte Glycerin aus Dihydroxyaceton-Phosphat über Glycerin-3-Phosphat gebildet werden. Die erforderlichen Enzymaktivitäten der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und Glycerokinase konnten in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Gegen diesen Reaktionsweg spricht auch, daß das hypothetische Intermediat Glycerin-3-Phosphat als kompetitiver Inhibitor ( $k_i = 0.4$  mM) der 6-Phosphogluconat-Dehydratase nachgewiesen wurde (Scopes und Griffiths-Smith, 1984). Die Nebenproduktbildung würde somit zu einer verringerten Glucoseumsatzrate führen. Es wurden jedoch vergleichbare Substratverbrauchsraten mit Fructose bzw. Glucose bestimmt (Rogers et al., 1982).

Obwohl die Reaktionen zum Dihydroxyaceton und Glycerin aufgedeckt wurden, bleibt der Grund für die Nebenproduktbildung unklar. Eine Aktivierung der zu den Nebenprodukten führenden Enzyme durch Fructose oder Fructose-6-Phosphat ließ sich nicht nachweisen. Eine Induktion der beteiligten Enzyme wurde nicht gefunden, die Aktivitäten der Triosephosphat-Isomerase, Dihydroxyaceton-Phosphatase und Glycerin-Dehydrogenase waren in Fructose- und Glucose-gewachsenen Zellen gleich. Eine von der Kohlenstoff-Quelle abhängige Regulation der Expression wurde für die Fructokinase (Zembrzuski et al., 1992) und die Phosphoglucose-Isomerase (Hesman et al., 1991) nachgewiesen: die Enzymaktivitäten waren verdoppelt, wenn die Zellen auf Fructose

anstatt auf Glucose kultiviert wurden. In beiden Fällen konnte eine höhere Transkriptionsrate als Ursache der erhöhten Aktivität nachgewiesen werden (ebenda).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das gramnegative und anaerobe Bakterium *Zymomonas mobilis* setzt Glucose und Fructose schnell und in hoher Ausbeute zu Ethanol um. Bei Ethanol-Konzentrationen über 60 g/l sinkt die Fermentationsaktivität ab. Außerdem werden bei Wachstum mit Fructose außer Ethanol vermehrt Nebenprodukte gebildet. In dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Kernresonanz-Spektroskopie der Einfluß von Ethanol auf den Stoffwechsel von *Zymomonas mobilis* und die zu den Nebenprodukten führenden Reaktionen aufgeklärt werden.

Für die Untersuchungen des Glucose-Stoffwechsels mittels *in-vivo*-<sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie wurden konzentrierte *Z. mobilis*-Zellsuspensionen eingesetzt, sodaß der Anteil des zellinternen Volumens am Probevolumen 25 bis 30% betrug. Die Änderungen der intrazellulären Metabolite und des intrazellulären pH-Wertes nach Zugabe von Glucose zu einer Zellsuspension konnten mit einer zeitlichen Auflösung von einer Minute verfolgt werden. In Gegenwart von 10% Ethanol war die Glucoseumsatzrate der Zellsuspensionen geringer und die Bildung von Zuckerphosphaten, Nukleosidtriphosphaten und dem pH-Gradienten verringert.

Mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie von Perchlorsäure-Extrakten aus Zellsuspensionen konnten intrazelluläre Metabolitkonzentrationen nach einem Glucosepuls bestimmt werden. Dabei wurden folgende Metabolite erfaßt: Glucose-6-Phosphat, 6-Phosphogluconat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-Phosphoglycerat, Sedoheptulose-7-Phosphat, ATP, UTP, ADP, UDP, NAD(H) und Coenzym A. Die Konzentrationen der Metabolite des Entner-Doudoroff-Wegs erreichten nach Zugabe von Glucose zu einer Zellsuspension ohne Ethanolzusatz bis zu 4 mM. ATP und UTP wurden mit 4 mM bzw. 2 mM während des Glucoseumsatzes bestimmt, dagegen blieb ADP konstant bei ca. 1 mM. In Gegenwart von 10% Ethanol akkumulierte 3-Phosphoglycerat innerhalb von 15 min nach Glucosezugabe bis zu einer Konzentration von 3.4 mM, während in Ansätzen ohne Zusatz von Ethanol zu diesem Zeitpunkt nur noch 0.3 mM 3-Phosphoglycerat gemessen wurden. Enzymmessungen zeigten, daß die Aktivitäten der Phosphoglycerat-Mutase und Enolase in Gegenwart von 10% Ethanol um 31 bzw. 40% inhibiert waren. Außerdem wurden durch die *in-vitro*-NMR-Messungen in Ansätzen mit 10% Ethanolzusatz ca. 2 mM Sedoheptulose-7-Phosphat nachgewiesen, nicht jedoch in Messreihen ohne Ethanolzusatz.

Die Bildung der Nebenprodukte Glycerin, Dihydroxyaceton, Lactat, Acetat und Acetoin durch *Zymomonas mobilis* wurde in Batchfermentationen mit Glucose bzw. Fructose als Kohlenstoff- und Energiequelle verglichen. Mit steigenden Fructose-

Anfangskonzentrationen in Batchfermentationen wurde mehr Glycerin und Dihydroxyaceton gebildet.

Die Reaktionen, mit denen *Z. mobilis* Glycerin und Dihydroxyaceton bildet, wurden untersucht. Eine Nebenreaktion der KDPG-Aldolase, die durch Spaltung von Fructose-6-Phosphat zu Dihydroxyaceton führt, konnte durch *in-vitro*-Messungen mit gereinigter Aldolase und aufgrund der Anreicherungsmuster in Glycerin und Dihydroxyaceton nach Fermentation von [2-<sup>13</sup>C]-Fructose ausgeschlossen werden.

In Enzymmessungen wurde erstmals gezeigt, daß in *Z. mobilis* das Nebenprodukt Dihydroxyaceton aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat durch die Reaktionen der Triosephosphat-Isomerase und einer Dihydroxyaceton-Phosphatase gebildet wird. Die spezifische Aktivität der Dihydroxyaceton-Phosphatase konnte mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie mit 0.31 U/mg Protein bestimmt werden. Glycerin wird aus Dihydroxyaceton durch eine Glycerin-Dehydrogenase mit einer spezifischen Aktivität von 0.19 U/mg Protein gebildet.

## 6. LITERATUR

- Algar, E. M., und R. K. Scopes. 1985. Studies on cell-free metabolism: Ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. J. Biotechn. 2:275-287.
- Alger, J. R., und G. Shulman. 1984. NMR studies of enzymatic rates *in vitro* and *in vivo* by magnetization transfer. Quart. Rev. Biophys. 17:83-124.
- Amin, G., E. Van den Eynde, und H. Verachtert. 1983. Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation using batch and immobilized cell systems of *Z. mobilis* and *S. bayanus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:1-5.
- An, H., R. K. Scopes, M. Rodriguez, K. F. Keshav, und L. O. Ingram. 1991. Gel electrophoretic analysis of *Z. mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. J. Bacteriol. 173:5975-5982.
- Anderson, A. J., und E. A. Dawes. 1985. Regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase in *Zymomonas mobilis* CP4. FEMS Microbiol. Lett. 27:23-27.
- Ballou, C. E., H. O. L. Fischer, und D. L. MacDonald. 1955. The synthesis and properties of D-Erythrose 4-phosphate. J. American Chem. Soc. 20:5967-5970.
- Barrow, K. D., J. G. Collins, R. S. Norton, P. L. Rogers, und G. M. Smith. 1984. <sup>31</sup>P Nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. J. Biol. Chem. 259:5711-5716.
- Belaich, J. P., und J. C. Senez. 1965. Influence of aeration and pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 89:1195-1200.
- Bernt, E., und H. U. Bergmeyer. 1974. D-Glucose-Bestimmung und Glucose-6-P-Dehydrogenase. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1241-1246.
- Bergmeyer, H. U., J. Bergmeyer, und M. Graßl (ed). 1984. Methods of enzymatic analysis. Vol. 2. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bornemann S., D. H. G. Crout, H. Dalton, D. W. Hutchinson, G Dean, N. Thomson, und M. M. Turner. 1993. Stereochemistry of the formation of lactaldehyde and acetoin produced by the pyruvate decarboxylases of yeast (*Saccharomyces* sp.) and *Z. mobilis*: different Boltzmann distributions between bound forms of the electrophile, acetaldehyde, in the two enzymatic reactions. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1:309-311.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein: utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Brindle, K. M., F. F. Brown, I. D. Campbell, C. Grathwohl, und P. W. Kuchel. 1979. Application of spin-echo nuclear magnetic resonance to whole-cell systems. Biochem. J. 180:37-44.
- Brindle, K. M. 1988. NMR methods for measuring enzyme kinetics *in vivo*. Progr. NMR Spectroscopy 20:257-293.
- Bringer-Meyer, S., H. Sahm, und W. Swyzen. 1984a. Ethanol production by *Z. mobilis* and its application on an industrial scale. Biotechnol. Bioeng. Symp. 14:311-319.
- Bringer-Meyer, S., R. K. Finn, und H. Sahm. 1984b. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 139:376-381.
- Bringer-Meyer, S., K.-L. Schimz, und H. Sahm. 1986. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. Arch. Microbiol. 146:105-110.
- Bringer-Meyer, S., und H. Sahm. 1988a. Metabolic shifts in *Zymomonas mobilis* in response to growth conditions. FEMS Microbiol. Rev. 54:131-142.
- Bringer-Meyer, S., und H. Sahm. 1988b. Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by PDC of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Biocatalysis 1:321-331.
- Bringer-Meyer, S., und H. Sahm. 1989. Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:529-536.

Carey, V. C., und L. O. Ingram. 1983. Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effects of ethanol and glucose. J. Bacteriol. 154:1291-1300.

Cerdan, S., und J. Seelig. 1990. NMR studies of metabolism. Ann. Rev. Biophys. Chem. 19:43-67.

Chen, C., M. C. Dale, und M. R. Okos. 1990. The long-term effects of ethanol on immobilized cell reactor performance using *K. fragilis*. Biotechnol. Bioengin. 36:975-982.

Conway, T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol. Rev. 103:1-28.

De Graaf, A. A., R. M. Wittig, U. Probst, J. Strohäcker, S. M. Schoberth, und H. Sahm. 1992. Continuous-flow NMR bioreactor for *in vivo* studies of microbial cell suspensions with low biomass concentrations. J. Magn. Res. 98:654-659.

Den Hollander, J. A., K. Ugurbil, T. R. Brown, und R. G. Shulman. 1981. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in Yeast. Biochemistry 20:5871-5880.

Den Hollander, J. A., K. Ugurbil, und R. G. Shulman. 1986. <sup>31</sup>P and <sup>13</sup>C NMR studies of intermediates of aerobic and anaerobic glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 25:212-219.

DiMarco A. A., und A. H. Romano. 1985. D-Glucose transport system of *Z. mobilis*. Appl. Environ. Microbiol. 49:151-157.

Eggstein, M. und E. Kuhlmann. 1974. Triglyceride und Glycerin. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1871-1877.

El Ghazzawi, E., und K. Schmidt. 1967. Hexosen-Umwandlungen in Nährlösungen: Fructose-Verwertung durch *Clostridium acetivum* Wieringa. Zbl. Bakt. II 121:569-575.

Esser, K., und T. Karsch. 1984. Bacterial ethanol production: Advantages and disadvantages. Proc. Biochem. 19(3):116-121.

Fein, F. E., R. C. Charley, K. A. Hopkins, B. Lavers, und H. G. Lawford. 1983. Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 5:1-6.

Feldmann, S. D., H. Sahm, und G. A. Sprenger. 1992. Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild type and recombinant strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:354-361.

Finn, R. K., S. Bringer, und H. Sahm. 1984. Fermentation of arabinose to ethanol by *Sarcina ventriculi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19:161-166.

Friebolin, H. 1988. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung. Verlag Chemie, Weinheim.

Gadian, D. G. 1983. NMR and its application to living systems. Clarendon Press, Oxford.

Gibbs, M., und R. D. DeMoss. 1954. Anaerobic dissimilation of <sup>14</sup>C-labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. J. Biol. Chem. 207:689-694.

Gottschalk, G. 1986. Bacterial metabolism. Springer Verlag, New York.

Grundler, W., F. Kaiser, F. Keilmann, und J. Walleczek. 1992. Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems. Naturwissenschaften 79:551-559.

Hausser, K. H., und H. R. Kalbitzer. 1989. NMR für Mediziner und Biologen. Springer Verlag, Berlin.

Hermans, M. A. F., B. Neuss, und H. Sahm. 1991. Content and composition of hopanoids in *Zymomonas mobilis* under various growth conditions. J. Bacteriol. 173:5592-5595.

Hermans, M. A. F. 1992. Untersuchungen zum Einfluß von Ethanol auf den Stoffwechsel von *Zymomonas mobilis*. Dissertation, Universität Düsseldorf.

- Herrero, A. A., R. F. Gomez, und M. F. Roberts. 1985.  $^{31}\text{P}$  NMR Studies of *Clostridium thermocellum*. Mechanism of end product inhibition by ethanol. J. Biol. Chem. 260:7442-7451.
- Hesman, T. L., W. O. Barnell, und T. Conway. 1991. Cloning, characterization, and nucleotide sequence analysis of a *Z. mobilis* phosphoglucose isomerase gene that is subject to carbon source-dependent regulation. J. Bacteriol. 173:3215-3223.
- Holleman, A. F., und E. Wiberg. 1985. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Verlag W. de Gruyter, Berlin.
- Inbar, L., und A. Lapidot. 1991. Metabolic regulation in *Streptomyces parvulus* during actinomycin D synthesis, studied with  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -labeled precursors by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and by gas chromatography-mass spectroscopy. J. Bacteriol. 170:4055-4064.
- Ingram, L. O., und T. M. Buttke. 1984. Effects of alcohols on micro-organisms. Adv. Microbial Physiol. 25:253-29.
- Ingram, L. O. 1986. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. TIBTECH Rev. 40-44.
- Jain, W. K., I. Toran-Diaz, und J. Baratti. 1985. Continuous production of ethanol from fructose by immobilized growing cells of *Z. mobilis*. Biotechnol. Bioeng. 27:613-620.
- Kalnenieks, U., A. A. de Graaf, S. Bringer-Meyer, und H. Sahm. 1993. Oxidative phosphorylation in *Z. mobilis*. Arch. Microbiol. 160:74-79.
- Kinoshita, S., T. Kakizono, K. Kadota, K. Das, und H. Taguchi. 1985. Purification of two alcohol dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:249-254.
- Kirk, K., J. E. Raftos, und P. W. Kuchel. 1986. Triethylphosphate as an internal  $^{31}\text{P}$  NMR reference in biological samples. J. Magn. Reson. 70:484-487.
- Klingenberg, M., und E. Pfaff. 1967. Means of terminating reactions, p. 680-684. In Colowick, S. P., N. O. Kaplan, R. W. Estabrook, and M. E. Pullmann (eds.) Methods in enzymology, Vol. 10, Academic Press, New York.
- Knappmann, B. R. 1993. Untersuchungen zum Einsatz der 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat-Aldolase aus *Zymomonas mobilis* für die chemische Synthese. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Kuchel, P. W., H. A. Berthon, W. A. Bubb, L. M. McIntyre, N. K. Nygh, und D. R. Thorburn. 1990.  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR studies of the pentose phosphate pathway in human erythrocytes. Biomed. Biochim. Acta 49:105-110.
- Lazdunski, A., und J. P. Belaich. 1972. Uncoupling in bacterial growth: ATP pool variation in *Z. mobilis* cells in relation to different uncoupling conditions of growth. J. Gen. Microbiol. 70:187-197.
- Lee, K., J. M. L. Skotnicki, D. E. Tribe, und P. L. Rogers. 1980. Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. Biotechn. Lett. 2:339-344.
- London, R. E. 1988.  $^{13}\text{C}$  Labeling in studies of metabolic regulation. Progr. NMR Spectroscopy 20:337-383.
- Loos, H., M. Völler, B. Rehr, Y.-D. Stierhof, H. Sahm, und G. A. Sprenger. 1991. Localisation of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Z. mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 84:211-216.
- Loureiro-Dias, M. C., und H. Santos. 1990. Effects of ethanol on *Saccharomyces cerevisiae* as monitored by *in vivo*  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. Arch. Microbiol. 153:384-391.
- Lynd, L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols, und C. E. Wyman. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science 251:1318-1323.
- McGill, D. J., und E. A. Dawes. 1971. Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*. Biochem. J. 125:1059-1068.

- Midelfort, C. F., R. K. Gupta, und H. P. Meloche. 1977. Specificity of 2-keto-3-deoxygluconate-6-p aldolase for open chain form of 2-keto-3-deoxygluconate-6-p. J. Biol. Chem. 252:3486-3492.
- Millar, D. G., K. Griffiths-Smith, E. Algar, und R. K. Scopes. 1982. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. Biotechn. Lett. 4:601-606.
- Morris, J. G. 1976. Physikalische Chemie für Biologen. Verlag Chemie Weinheim.
- Neale, A. D., R. K. Scopes, J. M. Kelly, und R. E. H. Wettenhall. 1986. The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterisation and physiological roles. Eur. J. Biochem. 54:119-124.
- Negelein, E., und F. Noll. 1984. D-glycerate 1,3-bis-phosphate, p. 542-546. In H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, and H. Grassl (ed.), Methods of enzymatic analysis, vol. 6. Verlag Chemie, Weinheim.
- Nicolay, K., R. Kaptein, K. J. Hellingwerf, und W. N. Konings. 1981.  $^{31}\text{P}$  NMR studies of energy transduction in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Eur. J. Biochem. 116:191-197.
- Nicolay, K. 1983. NMR studies of the bioenergetics and metabolism of microorganisms. Dissertation, Universität Utrecht.
- Noll, F. 1974. Bestimmung mit LDH, GPT und NAD. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.) Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1521-1525.
- Osman, Y. A., und L. O. Ingram. 1985. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. J. Bacteriol. 164:173-180.
- Osman, Y. A., T. Conway, S. J. Bonetti, und L. O. Ingram. 1987. Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: enzyme and metabolite levels during batch fermentation. J. Bacteriol. 169:3726-3736.
- Park, I. L., S. H. Kwon, und K. J. Lee. 1988. Effect of ethanol on selected enzymes of the Entner-Doudoroff pathway in *Z. mobilis*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 16:402-406.
- Pawluk, A., R. K. Scopes, und K. Griffiths-Smith. 1986. Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Z. mobilis*. Biochem. J. 238:275-281.
- Phaff, H. J. 1984. Industriell nutzbare Mikroorganismen. In: Gruss, P., R. Herrmann, A. Klein (Hrsg.) Industrielle Mikrobiologie. Spektrum der Wissenschaft. S. 22-36.
- Reyes, L., und R. K. Scopes. 1991. Membrane-associated ATPase from *Z. mobilis*; purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta 1068:174-178.
- Rogers, P. L., K. J. Lee, M. L. Skotnicki, und D. E. Tribe. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem. Engin. 23:37-84.
- Rottenberg, H. 1979. The measurement of membrane potential and  $\Delta\text{pH}$  in cells, organelles, and vesicles, p. 547-569. In Fleischer, S., and L. Packer (ed.), Methods in enzymology 55, Academic Press, Inc., New York.
- Ruhrmann, J. 1993. Untersuchungen zu Energetik und Transportvorgängen bei *Zymomonas mobilis*. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Sanders, K. M., und B. K. Hunter. 1989. Modern NMR spectroscopy: a guide for chemists. Oxford University Press.
- Schreder, K., R. Brunner, und R. Hampe. 1934. Die anaerobe und aerobe Gärung von *Pseudomonas-Lindneri-Kluyver* in glucosehaltiger anorganischer Nährlösung. Biochem. Zeitschr. 273:223-242.
- Scopes, R. K., und K. Griffiths-Smith. 1984. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 6-phosphogluconate dehydratase from *Zymomonas mobilis*. Anal. Biochem. 136:530-534.
- Scopes, R. K., V. Testolin, A. Stoter, K. Griffiths-Smith, und E. M. Algar. 1985. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 228:627-634.

- Scopes, R. K., and K. Griffiths-Smith. 1986. Fermentation capabilities of *Z. mobilis* glycolytic enzymes. *Biotechnol. Lett.* 8:653-656.
- Shanks, V. J., and J. E. Bailey. 1988. Estimation of intracellular sugar phosphate concentrations in *Saccharomyces cerevisiae* using  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance. *Biotechn. Bioengin.* 32:1138-1152.
- Sonntag, K., L. Eggeling, A. A. de Graaf, und H. Sahm. 1993. Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Quantification by  $^{13}\text{C}$ - and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 213:1325-1331.
- Sprenger, G. A. 1993. Approaches to broaden the substrate and product range of the ethanologenic bacterium *Z. mobilis* by genetic engineering. *J. Biotechnol.* 27:225-237.
- Stevnsborg, N., und H. G. Lawford. 1986. Performance assessment of two patent strains of *Z. mobilis* in batch and continuous fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:106-115.
- Stevnsborg, N., H. G. Lawford, N. Martin, und T. Beveridge. 1986. Effect of growth temperature on the morphology and performance of *Z. mobilis* ATCC 29191 in batch and continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:116-123.
- Struch, T., B. Neuss, S. Bringer-Meyer, und H. Sahm. 1991. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:518-523.
- Struch, T. 1992. Untersuchungen zur Zuckertoleranz in *Zymomonas mobilis*. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Swings, J., und J. de Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* 41:1-46.
- Thompson, J., und D. A. Torchia. 1984. Use of  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and  $^{14}\text{C}$  fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 158:791-800.
- Toran-Díaz, I., C. Delezon, und J. C. Baratti. 1983. The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on fructose media. *Biotechnol. Lett.* 5:409-414.
- Toran-Díaz, I., V. K. Jain, und J. C. Baratti. 1984. Ethanol production from fructose in continuous culture by free and flocculent cells of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 6:389-394.
- Ugurbil, K., H. Rottenberg, P. Glynn, und R. G. Shulman. 1978.  $^{31}\text{P}$  NMR studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 75:2244-2248.
- Ugurbil, K., R. G. Shulman, und T. R. Brown. 1979. High-resolution  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance studies of *Escherichia coli* cells *in vivo*, p. 537-589. In R. G. Shulman (ed.) *Biological applications of magnetic resonance*, Academic Press, Inc., New York.
- Viikari, L. 1984. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:118-123.
- Viikari, L., und M. Korhola. 1986. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:471-476.
- Viikari, L. 1988. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 7:237-261.
- Wartenberg, A. 1989. Einführung in die Biotechnologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Wieland, O., und I. Witt. 1974. Dihydroxyaceton. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.) *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bd. 2, Verlag Chemie, Weinheim, S. 1487-1490.
- Wood, W. A. 1972. 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic and Related Aldolases, p. 281-302. In Boyer, P. D. (ed.), *The Enzymes* Vol. VII, Academic Press, Inc., New York.
- Zachariou, M., und R. K. Scopes. 1986. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Z. mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.* 167:863-869.

Zembrzuski, B., P. Chilco, X. Liu, J. Liu, T. Conway, und R. Scopes. 1992. Cloning, sequencing, and expression of the *Z. mobilis* fructokinase gene and structural comparison of the enzyme with other hexose kinases. *J. Bacteriol.* **174**:3455-3460.

86

## 7. ANHANG

Tab. 23: Chemische Verschiebungen  $\delta$  [ppm] in  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren.  
Zusammenstellung der Daten aus Messungen von Kulturüberständen,  
Reinsubstanzlösungen und Enzymtests, bei pH-Werten zwischen 5 und 6.

Substanz	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
$\text{HCO}_3^-$	161.2						
Ethanol	58.5	17.9					
Acetaldehyd	199.9	30.8					
Acetat	182.2	24.1					
Alanin	176.7	51.7	17.3				
DHA	65.9	213.0	65.9	(64.7) <sup>a</sup>			
Glyceraldehyd	89.9	74.0	62.0				
Glycerin	63.6	73.2	63.6				
Lactat	183.2	69.6	21.1				
Pyruvat	171.2	206.1	27.5				
Acetoin	26.0	216.5	74.1	19.3			
MES	65.8	53.5	53.2	46.8			
Valin	175.3	61.6	30.2	19.1	17.9		
Citrat	179.7	46.8	76.0	46.8	179.7	182.3	
Fructose:							
$\alpha$ -Pyranose	66.3	99.1	71.3	71.6	62.2	62.2	
$\beta$ -Pyranose	65.0	99.1	68.7	70.8	70.3	64.4	
$\alpha$ -Furanose	64.0	105.5	83.1	77.1	82.3	62.2	
$\beta$ -Furanose	63.8	102.5	76.5	75.5	81.7	63.5	
Sorbit	63.6	72.3	70.8	72.1	74.1	64.0	
Glucose:							
$\alpha$ -Pyranose	92.9	72.5	73.8	70.6	72.3	61.7	
$\beta$ -Pyranose	96.7	75.1	76.6	70.6	76.8	61.7	
Mannit	64.3	72.0	70.4	70.4	72.0	64.3	
NAD	nb	140.9	134.8	146.9	129.7	143.4	166.4
NADH	nb	139.4	101.2	22.3	106.4	125.1	173.8

DHA, Dihydroxyaceton; nb, nicht bestimmt

<sup>a</sup> vermutlich C2 der Hydratform





1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is crucial for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. It highlights the need for consistent data collection procedures and the use of advanced analytical techniques to derive meaningful insights from the data.

3. The third part focuses on the implementation of data-driven decision-making processes. It provides a framework for how to integrate data analysis into the organization's strategic planning and operational management.

4. The final part discusses the challenges and opportunities associated with data management. It identifies key areas for improvement and offers practical recommendations for overcoming common obstacles.

5. The document concludes by summarizing the key findings and reiterating the importance of a data-centric approach for long-term success. It encourages the organization to continue exploring new data sources and analytical methods to stay competitive in a rapidly changing market.



**Juli-2936**

**Juli 1994**

ISSN 0944-2952