

CHEMOSTATSTUDIE UEBER DIE REGULATION DER AMMONIUMASSIMILIERENDEN  
ENZYME IN HYPHOMICROBIUM ZV 620

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von  
SUZANNE DOROTHEA GRAEZER-LAMPART  
Dipl.Natw.ETHZ  
geboren am 26. August 1954  
von Einsiedeln SZ

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. G. Hamer, Referent  
Prof. Dr. Th. Leisinger, Korreferent

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Das Wachstum, die Zellzusammensetzung und die Regulation der Ammonium-assimilierenden Enzyme Glutamat-Dehydrogenase, Glutamin-Synthetase, Glutamat-Synthase und Alanin-Dehydrogenase des methylo trophen, gestielten Bakteriums Hyphomicrobium ZV 620 wurden im Chemostat mit Methanol als Kohlenstoffquelle und Ammonium als Stickstoffquelle untersucht. Die Untersuchungen wurden an Zellen gemacht, die unter folgenden Bedingungen wuchsen:

- a) konstante Verdünnungsrate, variable C/N-Verhältnisse im zufließenden Medium, Kultur ging von Methanol- zu Ammonium-Limitation über
- b) variable Verdünnungsrate, Methanol-Limitation
- c) variable Verdünnungsrate, Ammonium-Limitation

Die Glutamat-Dehydrogenase war bei hoher Ammoniumkonzentration aktiv und wurde bei sehr niedriger reprimiert. Bei Methanol-Limitation nahm die Aktivität mit zunehmender Verdünnungsrate zu. Bei Ammonium-Limitation war die Glutamat-Dehydrogenase dereprimiert bei kleinen Verdünnungsraten.

Die Glutamin-Synthetase war bei niedriger Ammoniumkonzentration aktiver als bei hoher, wobei sowohl die Enzymmenge (deadenylierte+adenylierte Form) als auch der Anteil an deadenylierter Form zunahm. Ein Zusammenhang bestand zwischen der spezifischen Aktivität und der Konzentration der angebotenen Kohlenstoffquelle, denn je mehr Methanol den Zellen bei Ammonium-Limitation zur Verfügung stand, desto höher war die spezifische Aktivität. Die Verdünnungsrate hatte keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität, denn bei Methanol-Limitation war sie über den ganzen Bereich gleichbleibend klein und bei Ammonium-Limitation unverändert gross.

Die spezifische Aktivität der Glutamat-Synthase nahm mit abnehmender Ammoniumkonzentration zu und blieb bei Ammonium-Limitation konstant. Mit zunehmender Verdünnungsrate nahm die Aktivität zu, wobei die Werte bei Methanol-Limitation kleiner waren als diejenigen bei Ammonium-Limitation.

Die Alanin-Dehydrogenase erreichte bei Methanol- und Ammonium-Limitation

eine so geringe Aktivität, dass sie gegenüber anderen Ammonium-assimilierenden Enzymen bedeutungslos ist.

Der C-Gehalt der Zellen schwankte bei allen Bedingungen nur wenig. Bei Methanol-Limitation änderte sich der N- und Proteingehalt der Zellen nicht. Bei Ammonium-Limitation bauten die Zellen Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure auf. Dadurch nahm die Biomasse zu und der N- und Proteingehalt der Zellen nahm ab. Die Ausbeute bezüglich Methanol war bei Ammonium-Limitation niedriger als bei Methanol-Limitation. Die Verdünnungsrate hatte nur einen Einfluss auf den Proteingehalt der Zellen, der mit zunehmender Verdünnungsrate abnahm.

---

The growth, composition of the cells and regulation of the ammonium-assimilating enzymes, glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, glutamate synthase and alanine dehydrogenase of the methylotrophic, budding bacterium Hyphomicrobium ZV 620 were investigated in chemostat culture with methanol as the supplied carbon energy source and ammonium as the nitrogen source. One series of experiments was undertaken with cells grown at various C:N ratios in the inflowing medium and constant dilution rate, such that conditions changed from carbon limitation to nitrogen limitation. A second series of experiments examined growth under either carbon limitation or nitrogen limitation at various dilution rates.

The glutamate dehydrogenase was active at high ammonium concentrations and was repressed at low ammonium concentrations. The activity increased with increasing dilution rates under carbon limited conditions. Under nitrogen limited conditions the enzyme exhibited low activity at low dilution rates.

The glutamine synthetase was more active at low ammonium concentrations, where both the total enzyme level (deadenylylated and adenylylated forms) and the active fraction (deadenylylated form) increased. There was a relationship between enzyme activity and the extent of utilization

of the carbon energy substrate, such that greater methanol utilization resulted in higher enzyme activity under nitrogen limited conditions. Dilution rate did not have any influence on the activity. Under carbon limitation, activity was low and under nitrogen limitation, activity was consistently high.

The activity of the glutamate synthase decreased with decreasing ammonium concentrations and remained constant under nitrogen limitation. With increasing dilution rates, the activity increased. The increase under nitrogen limitation was greater than the increase under carbon limitation.

The activity of the alanine dehydrogenase was very low and was thought to be without significance when compared with the other enzymes involved in ammonium assimilation.

The carbon content of the cells changed very little under the various growth conditions. The nitrogen content and the protein content of the cells did not alter under carbon limitation. Under nitrogen limitation, the cells accumulated poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Therefore, the biomass increased, and both the nitrogen content and the protein content of the cells decreased. The biomass yield coefficient based on methanol was lower under nitrogen limitation than under carbon limitation. Increasing dilution rates resulted in decreasing protein content of the cells.