

**– Metabolische ^{13}C -Stoffflussanalyse –
vom isotopisch stationären zum instationären Fall**

Dissertation
zu Erlangung des akademischen Grades
DOKTOR-INGENIEUR

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Karsten Grönke
aus Krefeld

eingereicht dem
Fachbereich Maschinenbau der



1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Wiechert
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Datum der mündlichen Prüfung:

21. Dezember 2010

Meiner Familie, die mich jederzeit unterstützt hat

*„Kein engeres Band gibt es unter den Menschen
als gemeinschaftlich gewollte, begonnene und
durchgeführte Unternehmungen.“*

Leopold von Ranke

Kurzdarstellung

Die Untersuchung der Stoffwechselfvorgänge von Mikroorganismen in Produktionsprozessen mit einem sich zeitlich ändernden metabolischen Zustand war mit der etablierten Methode der ^{13}C -Stoffflussanalyse (SFA) auf Grund der langen Markierungszeiten bisher nicht möglich. Die fortschreitende Entwicklung auf dem Gebiet der massenspektrometrischen Analyse ermöglicht es heute, die Markierung direkt in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels zu messen, wo sich ein isotopisch stationärer Zustand schon nach deutlich kürzerer Zeit einstellen kann. Übergreifendes Ziel dieser Arbeit war es, diese Markierungsdaten zu nutzen und die Dauer der Markierungszeit soweit zu verkürzen, dass der Stoffwechsel von Bakterien in Produktionsprozessen – Batch- oder Fedbatch-Prozessen – untersucht werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wird die isotopisch stationäre SFA auf Basis der Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite des Zentralstoffwechsels für den *E. coli* K12 Wildtyp und einen Produktionsstamm betrachtet. Bei Zugabe markierter Glukose direkt zu Beginn der Kultivierung und mehrstündiger Markierung in der exponentiellen Wachstumsphase (Batch) wurden mit dem Wildtyp zu Literaturdaten vergleichbare Stoffflüsse bestimmt. Zur Untersuchung der Stoffwechselveränderungen im Produktionsprozess von (3R,4R)-Dihydroxy-3,4-Dihydrobenzoesäure wurde mit Hilfe des *Sensorreaktors* (El Massaoudi 2004) zu verschiedenen Zeitpunkten des Fedbatch Prozesses markiert. Bei der SFA zeigten sich große Abweichungen zwischen den gemessenen und angepassten Markierungsdaten. Die Erweiterung des metabolischen Modells um zusätzliche unmarkierte Zuflüsse führte zu einer wesentlich besseren Anpassung und biologisch erklärbaren Stoffflüssen. Auf Basis des Vergleichs mit optimalen Flüssen (*Flux Balance Analyse*) wurden genetische Optimierungspotentiale abgeleitet.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die SFA auf Basis von isotopisch instationären Markierungsdaten untersucht. Es wird die Entwicklung einer schnellen Probenahmetechnik zur Gewinnung von zeitlich aufgelösten Markierungsdaten vorgestellt. Es wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Methoden zur Extraktion der Metabolite untersucht und die Ergebnisse werden hier diskutiert. Mit einem *E. coli* Wildtyp wurden zwei Markierungsexperimente durchgeführt und die Markierungsanreicherung und Metabolitkonzentrationen im Zentralstoffwechsel gemessen. In der Glykolyse wird wie erwartet schon nach wenigen Sekunden ein isotopisch stationärer Zustand erreicht. Die Markierungsanreicherung im Zitronensäurezyklus ist hingegen sehr viel langsamer. Als mögliche Ursache wird ein Rückfluss aus Speicherpools außerhalb des Zentralstoffwechsels diskutiert. Durch die Berücksichtigung von unmarkierten Rückflüssen in den Zentralstoffwechsel im metabolischen Modell kann eine gute Anpassung der Markierungsverläufe erreicht werden. Verschiedene Modellvarianten wurden untersucht und werden hier diskutiert. Im Vergleich zur isotopisch stationären SFA wurde festgestellt, dass die Standardabweichung der berechneten Flüsse vielfach geringer ist. Insbesondere die anaplerotischen Flüsse und die Austauschflüsse sind wesentlich besser bestimmt.

In dieser Arbeit wird prinzipiell gezeigt, dass auf Basis der Daten aus einem Markierungsexperiment mit sehr kurzen Markierungszeiten von wenigen Sekunden Dauer mit Hilfe der isotopisch instationären SFA zuverlässig die Stoffflüsse im Zentralstoffwechsel bestimmt werden können. Es werden das Potenzial aber auch die notwendigen Weiterentwicklungen der neuen Methode diskutiert.

Abstract

With the established tools of ^{13}C -Metabolic Flux Analysis (MFA) up to now it is not possible to analyse the metabolism of microorganisms in biotechnological production processes because of the long labelling time. Due to the proceeding development in mass spectrometry it is now possible to measure the ^{13}C -labelling directly in the intracellular metabolites of the central metabolism (glycolysis, pentose-phosphate-pathway and citric acid cycle). Here it is assumed that an isotopic steady state will be reached in a much shorter time. Main objective of this work was to use this data and reduce the labelling time to make it possible to analyse the cell metabolism in production processes that are mainly batch and fed batch processes.

In the first part of this work the isotopic stationary MFA based on the labelling data of intracellular metabolites will be investigated for an *E. coli* K12 wildtype and a production strain. By adding ^{13}C -labelled glucose at the beginning of the cultivation and labelling for several hours in a batch experiment comparable results with literature data are found for the wildtype. For investigation of metabolic changes in the production process of (3R,4R)-Di-hydroxy-3,4-di-hydrobenzoic acid the cells were labelled for different time periods of the fed batch process by using the *sensor reactor* (El Massaoudi 2004). The MFA showed big differences between the measured and fitted labelling data. By expansion of the metabolic model with unlabelled fluxes into the metabolic network the calculated data matched much better and biological meaningful metabolic fluxes are calculated. Based on the comparison with optimal fluxes (*Flux Balance Analysis*) potentials for genetic optimization are presented.

In the second part of this work the use of isotopic instationary data for MFA is investigated. The development of a fast sampling device for mapping the labelling enrichment is presented. Different methods for metabolite extraction described in literature are tested and the results are discussed. Two labelling experiments were performed during the cultivation of the *E. coli* K12 wildtype and the labelling enrichment and the metabolite pool sizes of the central metabolism were measured. As expected in glycolysis an isotopic steady state is reached after a few seconds. In the citric acid cycle the labelling enrichment is much slower. As a possible reason for that a reflux of unlabelled metabolites from large pools outside of the central metabolism is discussed. After incorporation of unlabelled refluxes into the metabolic network model a good fitting of the labeling enrichment is reached. Several model variants were analyzed and are discussed here. In comparison with the isotopic stationary MFA the standard deviation of the calculated fluxes is generally lower. Particularly the anaplerotic fluxes and the exchange fluxes are better determined.

In this work it is in principle shown that with the isotopic instationary MFA the metabolic fluxes of the central metabolism can be determined with good reliability based on the data of a very short labelling experiment with a few seconds duration. The potential of this new method and the necessary further developments are discussed.

Inhaltsverzeichnis

I. EINFÜHRUNG UND GRUNDLAGEN

1	THEMATISCHE EINORDNUNG DER ARBEIT	3
2	PROBLEMSTELLUNG	5
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	8
4	PHYSIOLOGIE VON BAKTERIEN	10
4.1	<i>Escherichia coli</i>	10
4.2	Substrataufnahmemechanismen	11
4.3	Glukosemetabolismus	11
4.3.1	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse)	13
4.3.2	Pentose-Phosphat-Weg	13
4.3.3	Zitronensäurezyklus und anaplerotische Reaktionen	15
4.3.4	Biosynthese der aromatischen Aminosäuren	16
4.4	Austauschrate der Metabolitpools	18
5	REAKTIONSTECHNIK	19
5.1	Prozessführung	19
5.2	Berechnung charakterisierender Größen	20
6	BIOCHEMISCHE ANALYTIK	22
6.1	HPLC-gekoppeltes Massenspektrometer (LC-MS/MS)	22
6.2	LC-MS/MS-Analyse von ¹³ C-Markierungen	25
6.3	NMR-Spektroskopie	27
6.4	Vergleich von NMR und MS-Analytik der ¹³ C-Markierung	27
7	STOFFFLUSSANALYSE (SFA)	30
7.1	Prinzip der ¹³ C-Stoffflussanalyse	30
7.2	Markierungsexperiment und Markierungsanreicherung	31
7.3	Isotopisch stationäre ¹³ C-Markierungsexperimente	34
7.4	Isotopisch instationäre ¹³ C-Markierungsexperimente	36
7.5	Mathematische Modellierung	37
7.5.1	Definition der Zustandsvariablen	38
7.5.2	Fluss- und Markierungsbilanzen	39
7.5.3	Isotopisch instationärer Fall	40
7.5.4	Sensitivitätsanalyse	40
7.5.5	Messmodell	41

7.6	Parameteranpassung.....	41
7.7	Statistische Auswertung.....	43
7.8	Experimentelles Design.....	43
7.9	Generelles Vorgehen bei der SFA.....	44
8	FLUX-BALANCE-ANALYSE	46
II. MATERIAL UND METHODEN		
9	BIOLOGISCHE SYSTEME	49
9.1	Charakterisierung von <i>E. coli</i> F82pC22.....	49
9.2	Stammhaltung.....	50
9.3	Vorkultur	50
10	KULTIVIERUNGEN IM SENSORREAKTOR.....	51
10.1	Ausstattung des Bioreaktors	51
10.1.1	Inokulierungseinheit.....	52
10.1.2	Substrataufgabereinheit	52
10.2	Regelung des Kultivierungsprozesses.....	53
10.3	Vorbereitung der Kultivierung	53
10.4	Durchführung der Kultivierungen	54
11	DURCHFÜHRUNG DER ¹³C-MARKIERUNGSEXPERIMENTE	55
11.1	Batch-Experiment mit dem Wildtyp <i>E. coli</i> K12	55
11.2	Fedbatch-Experimente mit <i>E. coli</i> F82pC22.....	56
11.2.1	Fermentationsverlauf und Planung der Experimente	56
11.2.2	Ermittlung eines geeigneten Markierungssubstrats.....	57
11.2.3	Zeitdauer der ¹³ C-Markierungsexperimente.....	58
11.2.4	Markierungsexperimente im Sensorreaktor	59
11.2.5	Betrieb des Sensorreaktors (Slave)	60
11.2.6	Betrieb des 42-Liter-Produktionsreaktors (Master)	61
11.2.7	Online-Glukosemessung und Regelung der Glukosezufuhr	61
11.2.8	Regelung der Aminosäurezufuhr	62
11.2.9	Steuerung des Master-Slave-Betriebs	62
11.3	Isotopisch instationäre Markierungsexperimente.....	63
11.3.1	Experimentelles Design.....	63
11.3.2	Aufbau und Durchführung der Experimente.....	64

12 ANALYTISCHE METHODEN	66
12.1 Stoppen des Zellstoffwechsels	66
12.2 Freisetzen der Metabolite (Extraktion).....	66
12.3 Bestimmung der Biomassekonzentration.....	67
12.3.1 Optische Dichte (OD ₆₀₀).....	67
12.3.2 Biotrockenmasse (BTM)	67
12.4 Extrazelluläre Analytik.....	67
12.4.1 Glukosekonzentration Schnelltest	67
12.4.2 Glukosekonzentration mit Enzymtest	67
12.4.3 Organische Säuren mittels HPLC	68
12.4.4 Aminosäuren mittels HPLC	68
12.5 LC-MS/MS-Analytik der intrazellulären Metabolite	68
12.6 NMR-Analyse der ¹³ C-Markierungsmuster	69
13 DURCHFÜHRUNG DER ¹³C-STOFFFLUSSANALYSEN.....	70
13.1 Extrazelluläre Raten und Kohlenstoffbilanz	70
13.2 Berechnung der Standardabweichung der Messungen	71
13.3 Berechnung der intrazellulären Konzentrationen	71
13.4 Isotopenkorrektur der MS-Daten.....	71
13.5 Berechnung von Markierungsanteilen	72
13.6 Konsistenzkontrolle der Markierungsmuster	72
13.7 Parameteranpassung und Berechnung der Stoffflüsse.....	72
13.8 Verwendete Netzwerkmodelle.....	73
13.8.1 Netzwerkmodell des E. coli K12 Wildtyps	73
13.8.2 Netzwerkmodell für E. coli F82pC22	76
13.8.3 Netzwerkmodell der isotopisch instationären SFA	77
14 FLUX-BALANCE-ANALYSE	78
14.1 Stöchiometrisches Modell.....	78
14.2 Optimierung der Produktausbeute.....	78

III. ISOTOPISCH STATIONÄRE STOFFFLUSSANALYSE

15	STATIONÄRE ¹³C-STOFFFLUSSANALYSE FÜR <i>E. COLI</i> K12	81
15.1	Markierungsexperiment	81
15.2	Markierungsmessung	82
15.3	Parameteranpassung	85
15.4	Ermittelte Stoffflüsse des Netzwerks	86
15.5	Vergleich der Netto-Flüsse mit Literaturdaten	88
15.6	Diskussion und Folgerungen	90
16	STOFFFLUSSANALYSEN MIT <i>E. COLI</i> F82PC22	91
16.1	Konzentrationsverläufe, spezifische Raten und C-Bilanzen	91
16.2	Vergleich der Konzentrationsverhältnisse mit <i>E. coli</i> K12	96
16.3	Theoretische Produktausbeute von <i>E. coli</i> F82pC22	97
16.4	Ergebnisse der ¹³ C-Markierungsmessungen	98
16.4.1	Massen isotopomere der intrazellulären Metabolite	98
16.4.2	2D-NMR Messung der proteinogenen Aminosäuren	98
16.5	Stoffflussanalysen mit den LC-MS/MS-Datensätzen	100
16.5.1	Parameteranpassung für die Phase 1	100
16.5.2	Berechnete Stoffflüsse der Phase 1	101
16.5.3	Mögliche Gründe für die Abweichungen bei der Anpassung	102
16.5.4	Erweiterung des <i>E. coli</i> Modells für F82pC22	104
16.5.5	Parameteranpassung mit den zusätzlichen Austauschflüssen	105
16.5.6	Berechnete Stoffflüsse mit dem erweiterten <i>E. coli</i> Modell	106
16.6	Ergebnisse der <i>Flux-Balance-Analyse</i>	108
16.6.1	Vergleich der Netto-Füsse mit der optimalen Stoffflusslage	110
16.7	Vorschläge zur Erhöhung der CHD-Ausbeute	111
16.8	Stoffflussanalyse mit dem NMR-Datensatz	112
17	FOLGERUNGEN AUS TEIL III	114

IV. ISOTOPISCH INSTATIONÄRE STOFFFLUSSANALYSE

18	ENTWICKLUNG EINER SCHNELLEN PROBENAHMEEINHEIT	119
18.1	Stopp des Zellstoffwechsels	120
18.2	Probenahmeventil.....	121
18.3	Probenahmeteller für Probengefäße	123
18.4	Charakterisierung der Probenahmeeinheit.....	127
18.4.1	Ermittlung des Probenvolumens	127
18.4.2	Test der Isolierung des Probenahmetellers.....	129
19	ENTWICKLUNG EINES MOBILEN SYSTEMS	130
20	STEUERUNG UND REGELUNG DES REAKTORSYSTEMS	132
20.1	Hardwarekomponenten	133
20.2	Softwaremodule.....	134
20.3	Funktionsumfang der Steuer- und Regeleinheit	136
20.3.1	Die Benutzeroberfläche.....	137
21	FREISETZUNG DER INTRAZELLULÄREN METABOLITE	139
22	MARKIERUNGSEXPERIMENT UND ¹³C-STOFFFLUSSANALYSE	142
22.1	Markierungsexperiment	142
22.2	Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen.....	145
22.2.1	Überprüfung des metabolisch stationären Zustands.....	145
22.2.2	Vergleich der Metabolitkonzentrationen mit Literaturdaten.....	146
22.2.3	Einflussfaktoren auf die gemessenen Metabolitkonzentrationen.....	147
22.3	Markierungsmessung mittels LC-MS/MS	152
22.4	Gründe für die langsame Dynamik der Anreicherung.....	154
22.5	Anpassung der Metabolitkonzentration.....	157
22.6	Anpassung der Markierungsverläufe.....	159
22.7	Vergleich der Stoffflüsse von zwei Experimenten.....	162
23	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	166
23.1	Zusammenfassung.....	166
23.2	Folgerungen und Ausblick.....	169

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
13CFLUX	Programm zur Durchführung von ¹³ C-Stoffflussanalysen
13CFLUX/INST	Erweitertes Programm für isotopisch instationäre ¹³ C-SFA
AD	Analog/Digital
ANSI C	Name einer Programmiersprache
BM	Biomasse
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BTM	Biotrockenmasse [g l ⁻¹]
CAN	Schnittstellentyp
CER, CTR	CO ₂ -Bildungsrate [mol l ⁻¹ h ⁻¹]
CHL	Chloroform
EDP	Entner-Douderoff-Weg
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas-Weg bzw. Glykolyse
ESI	Ionenstoßionisation
EtOH	Ethanol
FBA	Flux-Balance-Analyse (Metabolische Netzwerkanalyse)
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria-Bertani Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie
MeOH	Methanol
MFA	Metabolic Flux Analysis
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
NMR	Nuklearmagnetresonanz Spektroskopie
OD _{xyz}	optische Dichte [-] gemessen bei Wellenlänge (nm) xyz
OTR	Sauerstoffübertragungsrate [mol l ⁻¹ h ⁻¹]
OUR _{vol}	volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate [mol l ⁻¹ h ⁻¹]
PCA	Perchlorsäure
pH	pH-Wert = -log([H ₃ O ⁺]/[H ₃ O ⁺] ₀) [-]
PID	Regler mit proportional-, integral- und differential Anteil
pO ₂	Sauerstoffgehalt in der Flüssigphase [%]
PPP	Pentose-Phosphat-Weg
PTS	Phosphotransferasesystem
Q	Quadrupol
RSA	Relative Standardabweichung [%]
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
SFA	Stoffflussanalyse
TCA	Zitronensäurezyklus
TRACE	Gerät zur enzymatischen online-Messung
V _N	Molares Normvolumen (22,4 l/mol für ideale Gase)

Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Erläuterung
\varnothing, d	m	Durchmesser
π	$\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ bzw. $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$	Produktionsrate
σ	$\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ bzw. $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$	Verbrauchsrate
ω	-	Skalierungsfaktor
ε_y	-	Messfehlervektor
μ	h^{-1}	Spezifische Wachstumsrate
v^{net}	-	Nettoflussvektor
v^{xch}	-	Austauschflussvektor
ν	-	Vektor der Netzwerkparameter v, X, x^{inp}
c_i	g l^{-1} bzw. mol l^{-1}	Konzentration der Komponente i
c_s	g l^{-1} bzw. mol l^{-1}	Substratkonzentration
c_x	g l^{-1}	Biomassekonzentration
F_g	l h^{-1} bzw. vvm	Volumenstrom Gas
F_v, \dot{V}	l h^{-1}	Volumenstrom Flüssigkeit
K_s	g l^{-1} bzw. mol l^{-1}	Sättigungskonzentration
m	g, kg	Masse
M_y	-	Messmatrix
N	-	Stöchiometrischer Vektor
n_c		Anzahl der C-Atome im Molekül
m_i	mol/mol	Gasvolumenanteil der Komponente i
r_i	$\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ bzw. $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$	Reaktionsrate der Komponente i
t, τ	s bzw. h	Zeit
T	$^{\circ}\text{C}$	Temperatur
t_d	-	Verdopplungszeit [h]
V	l	Volumen
X	-	Poolgrößenvektor
x	-	Isotopomerenverteilung
x^{inp}	-	Isotopomeren-Input-Verteilungsvektor
y	-	Messvektor
$Y_{p/s}$	mol/mol bzw. g/g	substratspezifische Produktausbeute
$Y_{p/x}$	mol/mol bzw. g/g	biomassespezifische Produktausbeute
$Y_{x/s}$	mol/mol bzw. g/g	substratspezifische Biomasseausbeute
z	eV	Ladung

Metabolitverzeichnis

Abkürzung	Metabolit
13PG	1,3-Diphosphatglycerat
2PG	2-Phosphoglycerat
3,4-CHD	(3R,4R)-Dihydroxy-3,4-Dihydrobenzoesäure
3PG	3-Phosphoglycerat
6PG	Gluconat-6-phosphat
AcCoA	Acetyl-CoA
AcN	Cis-Aconitat
ADP	Adenosindisphosphat
AKG	α -Ketoglutarat, 2-Oxoglutarat
ASP	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
AMP, c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHOR	Chorismat
CIT	Citrat
CO ₂	Kohlendioxid
DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat
F6P	Fruktose-6-phosphat
FAD, FADH	Flavin-adenine-dinucleotide, reduziert
FBP	Fruktose-1,6-biphosphat
FUM	Fumarat
G6P	Glukose-6-phosphat
GAP	Glyceraldehyd-3-phosphat
GDP, GTP	Guanosin-di-phosphat, Guanosin-tri-phosphat
GLUK	Glukose
GLUT	Glutamat
GLYOX	Glyoxylat
H ⁺ , ¹ H	Proton
ICIT	Isocitrat
MAL	Malat
NAD, NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
NADP, NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduziert
OAA	Oxalacetat
P5P	Summenpool von Rib5P, Ru5P und Xyl5P
P5Pxch	Pool im Austausch mit P5P

Abkürzung	Metabolit
PEP	Phosphoenolpyruvat
PG6	Summenpool von 6PG und PGL
PGL	6-Phosphoglucono- δ -lacton
Phe	Phenylalanine
PYRr	Pyruvat
PYRxch	Pool im Austausch mit Pyruvat
Rib5P	Ribose-5-phosphat
Rul5P	Ribulose-5-phosphat
S3P	Shikimat-3-phosphat
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
SUCC	Succinat
SucCoA	Succinyl-CoA
Tyr	Tyrosin
Trp	Tryptophan
xPG	Summenpool von 1,3-, 2- und 3-Phosphoglycerat
Xyl5P	Xylulose-5-phosphat

Enzymverzeichnis

Bezeichnung des Enzyms	Gen, Subunit	EC-Nummer
2-Oxoglutarate-Dehydrogenase	sucA, lpd, sucB	1.2.4.2
3-Dehydroquinat-Dehydrotase	aroD	4.2.1.10
3-Dehydroquinat-Synthase	aroB	4.2.3.4
2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate-Aldolase	aroF, aroG, aroH	2.5.1.54
5-Enolpyrovoyl-shikimat-3-phosphate-Synthase	aroA	2.5.1.19
6-Phosphofructo-Kinase	pfkA, pfkB	2.7.1.11
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	gnd	1.1.1.44
Aconitat-Hydratase	acnA	4.2.1.3
Fructose bisphosphate-Aldolase	fbaA, fbaB	4.1.2.13
Chorismat-Mutase	tyrA	1.3.1.12
Chorismat-Synthase	aroC	4.2.3.5
Citrate-Synthase	gltA	2.3.3.1
Enolase	eno	4.2.1.11
Fructose-1,6-biphosphatase	glpX	3.1.3.11
Fumarase A, B, C	fumA	4.2.1.2
G3P-Dehydrogenase	glpD	1.1.99.5
Glucono-Lactonase / 6-Phosphoglucono-Lactonase	pgl	3.1.1.31
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	zwf	1.1.1.49
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	gapA	1.2.1.12
Glycerol-Kinase	glpK	2.7.1.30
Isocitrat-Dehydrogenase	icd	1.1.1.42
Isocitrate-Lyase	aceA	4.1.3.1
Isocitrate-Dehydrogenase	icd	1.1.1.42
Malat-Synthase	aceB, glcB	2.3.3.9
Malat-Dehydrogenase	mdh	1.1.1.37
Malate-Quinone-Oxidoreductase	mqo	1.1.99.16
Methylcitrate-Synthase	prpC	2.3.3.1
Oxaloacetate-Decarboxylase	eda	4.1.2.14
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	pck	4.1.1.32/.49
Phosphogluco-Isomerase	pgi	5.3.1.9
Phosphogluconat-Dehydratase	edd	4.2.1.12
Phosphoglycerat-Kinase	pgk	2.7.2.3
Phosphoglycerat-Mutase	gpmM, ytjC	5.4.2.1
Prephenat-Dehydrogenase / Chorismat-Mutase	pheA	4.2.1.51
Pyruvat-Dehydrogenase	aceE,aceF	1.2.1.51

Bezeichnung des Enzyms	Gen, Subunit	EC-Nummer
Pyruvat-Kinase I / II	pykF, pykA	2.7.1.40
Ribose-5-phosphate Isomerase	rpiA, rpiB	5.3.1.6
Ribulose phosphate-3-epimerase	rpe	5.1.3.1
Shikimat-Dehydrogenase	aroE	1.1.1.25
Shikimat-Kinase I / II	aroK, aroL	2.7.1.71
Succinat-Dehydrogenase	sdhA-D	1.3.5.1
Succinyl-CoA-Synthase	sucC, sucD	6.2.1.5
Transaldolase	talA, talB	2.2.1.2
Transketolase	tktA, tktB	2.2.1.1
Triosephosphat-Isomerase	tpiA	5.3.1.1
Tyrosin-Aminotransferase	tyrB	2.6.1.57
Zucker-Phosphatase	yidA	3.1.3.21

Teil I

Einführung & Grundlagen

Der erste Teil der Arbeit dient der thematischen Einordnung (Kapitel 1) und gibt dem Leser eine kurze Einführung in die Problematik (Kapitel 2). Desweiteren werden die Zielsetzung und die Arbeitspakete der Arbeit definiert (Kapitel 3). Die in den folgenden Abschnitten (Teil II-IV) dargestellten Methoden und Ergebnisse sind in Bezug zu dieser Aufgabenstellung zu sehen. Für das Verständnis der Arbeit wird ein Grundwissen im Bereich der Mikrobiologie und der Arbeit mit Mikroorganismen sowie der Reaktionsführung von Bioreaktoren vorausgesetzt. Kenntnisse in der Analytik von intrazellulären Metaboliten sowie der Bilanzierung von Stoffströmen und der ^{13}C -Stoffflussanalyse sind für das Verständnis hilfreich.

Eine kurze Einführung in die biologischen Grundlagen der Substrataufnahme und des Glukosemetabolismus (Glykolyse, Pentose-Phosphatweg und Zitronensäurezyklus) von *Escherichia coli*, dem in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten Mikroorganismus, erfolgt in Kapitel 4. Das Kapitel 5 gibt einen kurzen Überblick über den Betrieb von Bioreaktoren und die in der Arbeit verwendeten Größen zur Charakterisierung. Die theoretischen Hintergründe der analytischen Methoden sind in Kapitel 6 beschrieben. Die Kapitel 7 und 8 führen in die Problematik der mathematischen Modellierung von metabolischen Netzwerken ein und beschreiben die theoretischen Hintergründe der ^{13}C -Stoffflussanalyse und der *Flux-Balance-Analyse*.

1 Thematische Einordnung der Arbeit

Trotz des relativ einfachen Aufbaus einzelliger Organismen sind die in der Zelle ablaufenden Stoffwechselfvorgänge sehr komplex. In einer einzelnen Zelle von *Escherichia coli* finden über 1000 enzymatische Reaktionen statt an denen über 900 Metabolite beteiligt sind. Es sind 193 verschiedene Stoffwechselwege bekannt, die der Energiegewinnung und dem Zellaufbau dienen (Keseler et al. 2005). Nicht alle dieser Reaktionswege sind ständig aktiv, sondern viele werden nur bei Bedarf aktiviert, z.B. damit sich die Mikroorganismen an ändernde Umgebungsbedingungen anpassen können. Die einzelnen enzymatischen Reaktionen unterliegen einer komplexen Regulation durch aktivierende und hemmende Substanzen (Schomburg 2001). Bei der Entwicklung biotechnologischer Produktionsprozesse besteht daher das Problem, dass man nur wenig Informationen über die während der Kultivierung vorliegenden Stoffwechselfvorgänge in der Zelle besitzt und man deshalb auf aufwändige empirische Untersuchungen angewiesen ist. Die in den letzten Jahrzehnten unter dem Begriff *Metabolic Engineering* vorangetriebenen Entwicklungen führen zu einem zunehmenden Verständnis der metabolischen Vorgänge und genetischen Hintergründe und einer Beschleunigung von Prozessentwicklungen. Der Begriff umfasst dabei alle Techniken und Methoden zur gezielten Veränderung von spezifischen biochemischen Reaktionen oder der Einführung neuer Reaktionswege zur Verbesserung der Produktbildung oder der zellulären Eigenschaften von Organismen (Stephanopoulos 1999).

Hierzu gehören auch alle analytischen Methoden zur Aufklärung der genetischen Ausstattung, der Transkription, der Reaktionen, Reaktionswege und des Stofftransports sowie der intrazellulären Metabolitkonzentrationen. Diese werden allgemein als „omics“-Methoden bezeichnet. Der Schwerpunkt der Entwicklung hat sich dabei in den letzten 10 bis 15 Jahren über die Betrachtung einzelner Gene und enzymatischer Reaktionen hinaus zur Untersuchung des Zusammenspiels der genetischen und metabolischen Netzwerke verschoben. Dies wird allgemein unter den Stichworten: Metabolische Kontrollanalyse (*Metabolic Control Analysis*), metabolische / regulatorische Netzwerke oder Systembiologie beschrieben (Kell 2004; Oliver 2006; Vemuri and Aristidou 2005).

Bei der Untersuchung von metabolischen Netzwerken wird davon ausgegangen, dass sich bei konstanten Umgebungsbedingungen die Stoffwechselfvorgänge in der Zelle nicht ändern (metabolisch stationärer Zustand). Je nach Vorgehensweise bei der Untersuchung unterscheidet man dynamische und stationäre Methoden. Die dynamischen Methoden beruhen auf einer Auslenkung des metabolisch stationären Zustands durch eine Veränderung der Umgebungsbedingungen, z.B. durch die schlagartige Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration (Chassagnole et al. 2002; Rizzi et al. 1996; Schaefer et al. 1999; Theobald et al. 1993).

Dies führt zu einer erhöhten Glukoseaufnahme und damit einer Änderung der Konzentrationen der intrazellulären Metabolite (Metabolitpools). Die Veränderung verläuft in sehr kurzen Zeiträumen von hundertstel bis wenigen Sekunden (vgl. Kapitel 4.4), daher sind schnelle Probenahmesysteme notwendig, die eine definierte Probemenge aus dem Reaktor entnehmen und den Stoffwechsel innerhalb von Millisekunden stoppen und so den Stoffwechselzustand „einfrieren“ (Kapitel 12.1 und 18). Zur Analytik der Metabolite müssen diese vollständig und ohne den Stoffwechselzustand zu verändern aus den Zellen freigesetzt werden. Es wurden diverse Methoden zum Aufschluss der Zellen und zur Extraktion der Metabolite entwickelt (Kapitel 21). Die Analytik erfolgt mit enzymatischen oder massenspektrometrischen Methoden (12.5). Die Darstellung der dynamischen Veränderung der Metabolitkonzentrationen nach Zugabe der Glukose erlaubt einen Rückschluss auf die Geschwindigkeit von Enzymreaktionen und gibt Hinweise auf hemmende Reaktionsschritte im metabolischen Netzwerk.

Bei der stationären Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen werden hingegen störungsfreie Methoden angewandt bei denen der metabolische Zustand unverändert bleibt. Eine anerkannte Methode zur Aufklärung der komplexen Vorgänge in den Zellen ist die in den letzten Jahrzehnten entwickelte sogenannte Stoffflussanalyse (Heijden et al. 1994; Nielsen et al. 1991; Varma and Palsson 1994). Diese versucht, den sich in einem Fließgleichgewicht befindenden – metabolisch stationären – Zustand des Stoffwechsels einer Zelle über Flüsse (Reaktionsraten) zwischen den Metaboliten zu beschreiben. Als Basis zur Beschreibung des Stoffwechsels der Zelle dient ein stöchiometrisches Netzwerk. Durch die Messung extrazellulärer Konzentrationsverläufe und den daraus berechneten Raten können die intrazellulären Reaktionsraten einfacher Netzwerke berechnet werden. Reale Netzwerke sind allein auf Basis dieser Informationen nicht berechenbar, da diese Systeme auf Grund von parallelen und zyklischen Reaktionswegen, bidirektionalen Reaktionen und Problemen bei der Bilanzierung von Kofaktoren und Energie unterbestimmt sind. Es sind daher zusätzliche Informationen notwendig, die man aus Markierungsexperimenten mit ^{14}C - bzw. ^{13}C -markierten Substraten (Schmidt et al. 1998; Stephanopoulos 1998; Stephanopoulos 1999; Wiechert and de Graaf 1996) erhält.

Bei der inzwischen etablierten *stationären ^{13}C -Stoffflussanalyse (^{13}C -SFA)* werden isotopisch stationäre Markierungsdaten verwendet, die in den proteinogenen Aminosäuren gemessen werden, wobei bis zum Erreichen eines isotopisch stationären Markierungszustands sehr lange Markierungszeiten (mehrere Generationen) notwendig sind (siehe 7.3). Für die Dauer der Markierungsexperimente müssen die Zellen in einem metabolisch stationären Zustand gehalten werden, weshalb man diese Experimente in der Regel in einem Chemostaten durchführt. Dabei werden unmarkierte Zellen aus dem Reaktor ausgewaschen und im Idealfall wird die Markierung nur in den während des Markierungsexperiments neu gebildeten Zellen analysiert. Die Weiterentwicklung dieser Methode ist Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit.

2 Problemstellung

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen eines Projektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft (TA 241/2-1) entstanden. Dieses Projekt hatte zum Ziel die *stationäre ¹³C-Stoffflussanalyse* auf instationäre Prozessbedingungen (Batch- und Fed-Batch) zu übertragen. Während einer (Fed-)Batch Kultivierung ändern sich laufend die äußeren Bedingungen (Nährstoffbedarf, Zelldichte, extrazelluläre Konzentrationen usw.) und somit auch die Stoffwechselfvorgänge der untersuchten Organismen. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse von Chemostat-Experimenten nicht auf reale Produktionsbedingungen – die in der Regel Fed-Batch Prozesse sind – übertragbar. Zur Durchführung der *¹³C-Stoffflussanalyse* ist jedoch ein metabolisch stationärer Zustand notwendig. Zur Analyse des Stoffwechsels zu verschiedenen Zeiten eines Fed-Batch Produktionsprozesses muss daher die Dauer eines Markierungsexperiments stark verkürzt werden, um sich einem metabolisch stationären Zustand anzunähern. Es wird erwartet, dass eine Verkürzung der Markierungsdauer möglich wird, wenn man die Markierung nicht wie bisher in den proteinogenen Aminosäuren der Biomasse sondern direkt in den intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels analysiert. Die Stoffwechselwege sind ausgehend von Glukose im Vergleich zu den Aminosäuresynthesewegen wesentlich kürzer. In der Literatur ist die Stoffflussanalyse auf Basis von LC-MS/MS Daten (Massenisotopomeren) der intrazellulären Metabolite nur von wenigen Autoren für die Hefe *S. cerevisiae* und das Bakterium *E. coli* beschrieben (Schaub et al. 2008; Toya et al. 2007; van Winden 2002) beschrieben.

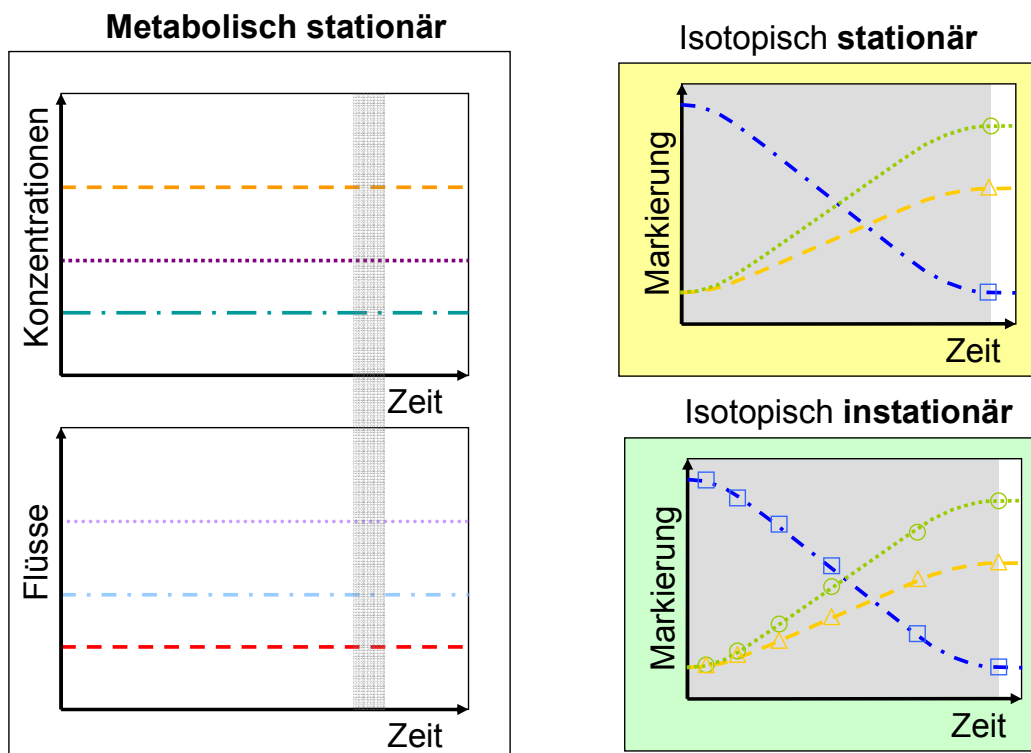
Eine weitere Verkürzung der Markierungszeiten auf wenige Sekunden Dauer sollte möglich sein, wenn nicht mehr bis zum Erreichen des isotopisch stationären Zustands gewartet wird, sondern zeitlich aufgelöste instationäre Markierungsdaten für die *¹³C-Stoffflussanalyse* verwendet werden (Wiechert and Nöh 2005). Bei sehr kurzen Markierungszeiten kann in jedem Fall von einem metabolisch stationären Zustand ausgegangen werden, und es sollte möglich werden, auch sehr dynamische Phasen einer Fermentation zu untersuchen. Es wird erwartet, dass durch die Nutzung von isotopisch instationären Daten zusätzliche Informationen über den Stoffwechsel gewonnen werden und die Aussagekraft der *¹³C-Stoffflussanalyse* erhöht werden kann.

Die Abbildung 2.1 verdeutlicht die verschiedenen Konzepte und experimentellen Methoden zur Gewinnung von isotopisch stationären und instationären *¹³C*-Markierungsdaten. Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der intrazellulären Stoffflüsse und Metabolitkonzentrationen (Poolgrößen) und der *¹³C*-Markierung in den Metabolitpools im Chemostaten und in (Fed-)Batch Prozessen. Im Chemostaten sind die äußeren Bedingungen konstant und die Zelle befindet sich in einem metabolisch stationären Zustand, d.h. die Flüsse und Poolgrößen sind konstant.

Nach der Zugabe von ^{13}C -markierter Glukose verändert sich der Markierungszustand der intrazellulären Metabolite bis nach einiger Zeit alle unmarkierten Zellbestandteile aus dem Reaktor ausgewaschen sind und sich ein isotopisch stationärer Zustand in den Metabolitpools und den proteinogenen Aminosäuren einstellt. Zu diesem Zeitpunkt wird in einem Markierungsexperiment eine Probe genommen und die ^{13}C -Markierung analysiert. Bei (Fed-)Batch Prozessen ändern sich laufend die äußeren Bedingungen und damit die Flüsse und Poolgrößen. Nur für sehr kurze Zeiträume und für bestimmten Phasen der Kultivierung – z.B. exponentielles Wachstum – kann man von annähernd (quasi) metabolisch stationären Bedingungen ausgehen.

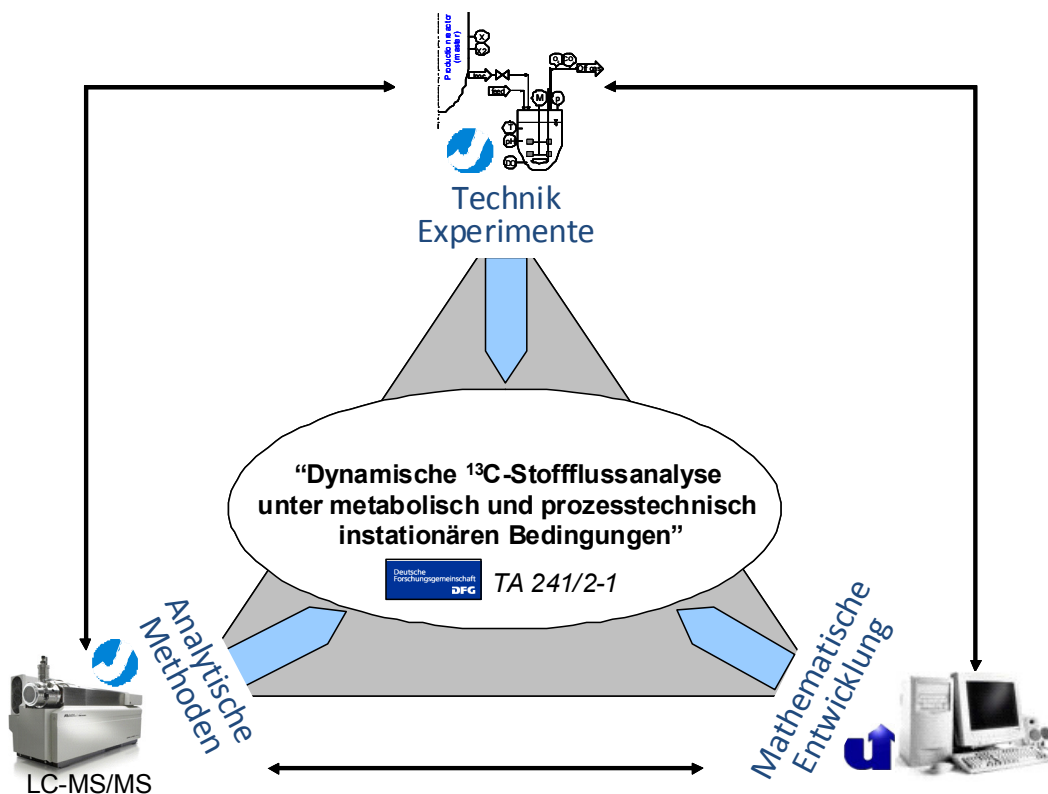
Bei der isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalyse wird nicht mehr auf den isotopisch stationären Zustand gewartet sondern es wird durch wiederholte Probenahme die zeitliche Markierungsanreicherung in den Metabolitpools verfolgt. Zusätzlich werden die Poolgrößen zum Zeitpunkt der Zugabe des markierten Substrats analytisch bestimmt. Weitere Erläuterungen zum Konzept der isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalyse finden sich in Kapitel 7.

Abbildung 2.1: Erläuterung der Konzepte – isotopisch stationär und isotopisch instationär – zur Gewinnung von Markierungsdaten für die ^{13}C -Stoffflussanalyse (Wahl 2007). In beiden Konzepten müssen sich die Zellen während der Markierungsphase (grau hinterlegt) in einem metabolisch stationären Zustand befinden. Zu Beginn der Markierungsphase ändert sich zunächst der Markierungszustand in den Metabolitpools. Im isotopisch stationären Fall wird nur am Ende der Markierungsphase eine Probe (Symbol) genommen. Im isotopisch instationären Fall wird die Markierungsanreicherung über die Zeit verfolgt.



Die Entwicklung der Methoden und Techniken zur Durchführung von isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalysen ist sehr komplex und erfordert ein Fachwissen aus unterschiedlichen Bereichen. Es müssen einerseits Techniken und Methoden zur Durchführung der Markierungsexperimente entwickelt werden, andererseits werden sensitive Messmethoden benötigt, um die Poolgrößen und Markierungszustände der niedrig konzentrierten intrazellulären Metabolite zu analysieren und drittens müssen mathematische Tools entwickelt werden, um basierend auf diesen Messdaten Stoffflussanalysen durchführen zu können. Die Bearbeitung des Projekts erfolgte aus diesem Grund in einem interdisziplinären Team in dem das Fachwissen aus jedem der drei Teilbereiche vertreten war. Die massenspektrometrischen Methoden wurden von Bing Luo (Luo et al. 2007) am Institut für Biotechnologie (IBT-2) des Forschungszentrums Jülich entwickelt. Die Entwicklung der mathematischen Tools und die Berechnung der Stoffflüsse auf Basis der isotopisch instationären Daten erfolgte von Katharina Nöh an der Universität Siegen (Nöh 2006). Die Entwicklung der experimentellen Techniken und Methoden, die Durchführung der Markierungsexperimente sowie die biologische Bewertung der durchgeführten Stoffflussanalysen war Aufgabe der vorliegenden Arbeit. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Projektstruktur und die enge Verzahnung der drei Teilbereiche.

Abbildung 2.2: Projektstruktur des DFG-Projekts „Dynamische ^{13}C -Stoffflussanalyse unter metabolisch und prozesstechnisch instationären Bedingungen“ zur Durchführung von isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalysen



3 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es zunächst die stationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse basierend auf isotopisch stationären ^{13}C -Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite zu etablieren. Anschließend sollte ein Produktionsprozess mit Hilfe der stationären ^{13}C -Stoffflussanalyse untersucht und basierend auf diesen Ergebnissen und dem Vergleich mit den für eine maximale Produktionsrate mittels *Flux-Balance-Analyse* (FBA) berechneten optimalen Stoffflüssen Vorschläge für eine genetische Optimierung des Stamms erarbeitet werden. Die Ergebnisse zur stationären ^{13}C -Stoffflussanalyse sind im Teil III der Arbeit dargestellt.

Aufbauend auf diesen Vorarbeiten sollte eine Technik und Methode erarbeitet werden, um isotopisch instationäre ^{13}C -Stoffflussanalysen mit dem Sensorreaktorsystem durchzuführen. Hierzu musste der Sensorreaktor um eine schnelle Probenahmeinheit erweitert werden. Zusätzlich sollte die Bedienung des Reaktorsystems vereinfacht und der Ablauf der Markierungsexperimente weitgehend automatisiert werden. Für die isotopisch instationäre Stoffflussanalyse werden neben den Markierungsdaten auch die Konzentrationen (Poolgrößen) der intrazellulären Metabolite benötigt. Zur Quantifizierung der Metabolite müssen diese vollständig aus den Zellen extrahiert werden. Hierzu wurden verschiedene in der Literatur beschriebene chemische Zellaufschluss- und Extraktionsmethoden untersucht.

Abschließend sollten die neu entwickelten Techniken und Methoden zur Durchführung von isotopisch instationären ^{13}C -Markierungsexperimenten mit einem *E. coli* Wildtyp eingesetzt und die gewonnenen Daten für ^{13}C -Stoffflussanalysen genutzt werden. Die Berechnung der Stoffflüsse erfolgte an der Universität Siegen unter Verwendung des dort entwickelten Tools 13CFLUX/INST (Nöh and Wiechert 2006; Wiechert et al. 2001). Die Bereitstellung von biologischen und biochemischen Informationen zur Modellerstellung und die Bewertung der Ergebnisse aus biologischer Sicht waren Teil dieser Arbeit. Die Weiterentwicklung des Reaktorsystems, die Untersuchungen zur Metabolitextraktion und die Ergebnisse zur isotopisch instationären Stoffflussanalyse sind im Teil IV der Arbeit dargestellt.

Als Zielsetzung und Aufgaben dieser Arbeit können zusammenfassend die folgenden Punkte genannt werden:

- Etablierung der Methoden zur Durchführung von stationären ^{13}C -Stoffflussanalysen auf Basis von LC-MS/MS Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite des Zentralstoffwechsels und Vergleich der Ergebnisse mit Literaturwerten (Kapitel 15).
- Anwendung der Methode zur Untersuchung dreier Phasen eines Produktionsprozesses mit einem rekombinanten *E. coli* Stamm zur Herstellung von (3R,4R)-Dihydroxy-3,4-Dihydrobenzoesäure (Kapitel 16.1 bis 16.5).
- Ermittlung theoretisch optimaler Stoffflusslagen mittels *Flux-Balance-Analyse* und Vergleich mit den Ergebnissen der ^{13}C -Stoffflussanalysen zur Ableitung von Vorschlägen für eine genetische Stammverbesserung (Kapitel 16.6).
- Erweiterung des Sensorreaktors um eine schnelle Probenahmeinheit und Test des Probenahmesystems (Kapitel 18).
- Entwicklung einer Steuer- und Regeleinheit für eine vereinfachte Bedienung des Reaktorsystems und eine weitgehende Automatisierung der Durchführung von isotopisch instationären Markierungsexperimenten (Kapitel 19), sowie die Gestaltung des Sensorreaktors als mobile Einheit (Kapitel 20).
- Test verschiedener chemischer Extraktionsmethoden für eine vollständige und reproduzierbare Extraktion der intrazellulären Metabolite des Zentralstoffwechsels und die Analyse der Metabolitkonzentrationen mittels der LC-MS/MS Methode (Kapitel 21).
- Durchführung von ^{13}C -Markierungsexperimenten mit einem *E. coli* Wildtyp zur Gewinnung von Daten zur isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalyse (Kapitel 22.1 bis 22.3).
- Durchführung von ^{13}C -Stoffflussanalysen in Kooperation mit der Universität Siegen unter Nutzung des Tools 13CFLUX/INST auf Basis der isotopisch instationären Daten (Kapitel 22.4 und 22.7).

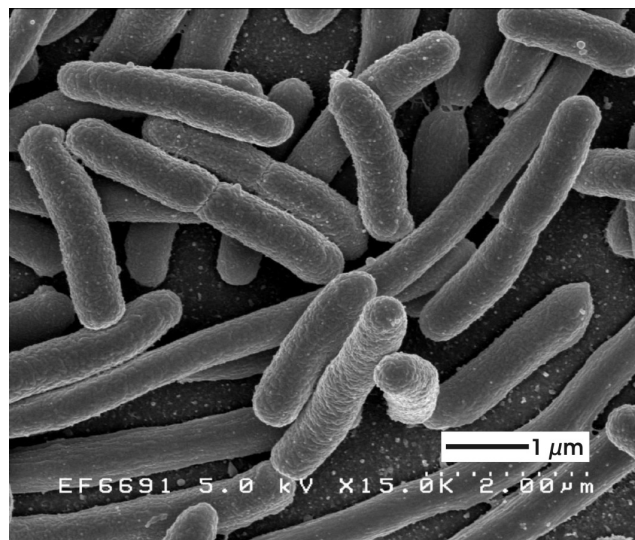
4 Physiologie von Bakterien

Zum Verständnis der nachfolgenden Kapitel werden in diesem Abschnitt die Grundlagen zum untersuchten Organismus und den betrachteten Stoffwechselwegen beschrieben.

4.1 *Escherichia coli*

Das zur Gattung der Prokaryonten und in die Familie der *Enterobacteriaceae* gehörende Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde erstmals 1885 vom deutschen Kinderarzt Theodor Escherich (1857-1911) als *Bacterium coli communale* beschrieben (Escherich 1885). Das Bakterium besitzt eine Stäbchengröße von 1,0 bis 4,0 μm , ist gram-negativ, nicht sporulierend und durch peritrich insertierte Geißeln gut beweglich.

Abbildung 4.1: REM-Darstellung von *Escherichia Coli* (Quelle: National Institute of Allergy and Infectious Diseases).



E. coli gehört zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen (Schlegel 2007). Als prototropher Organismus kann *E. coli* auf einfachen synthetischen Nährlösungen kultiviert werden. Die optimalen Bedingungen liegen bei einer Temperatur von 37°C (mesophil) und einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7,3 (neutrophil). Unter optimalen Bedingungen wird eine maximale Generationszeit von 20 Minuten erreicht. Der Organismus ist sowohl molekularbiologisch als auch genetisch sehr gut untersucht. Das relativ kleine Genom mit ca. $4,65 \cdot 10^6$ Basenpaaren (entspricht etwa 5000 Genen) ist vollständig sequenziert (Blattner et al. 1997). Damit entwickelte sich *E. coli* zum Modellorganismus in der Forschung und zum wichtigsten Produzenten von heterologen Proteinen (z.B. Insulin) und Feinchemikalien (z.B. Aminosäuren) in der Industrie.

4.2 Substrataufnahmemechanismen

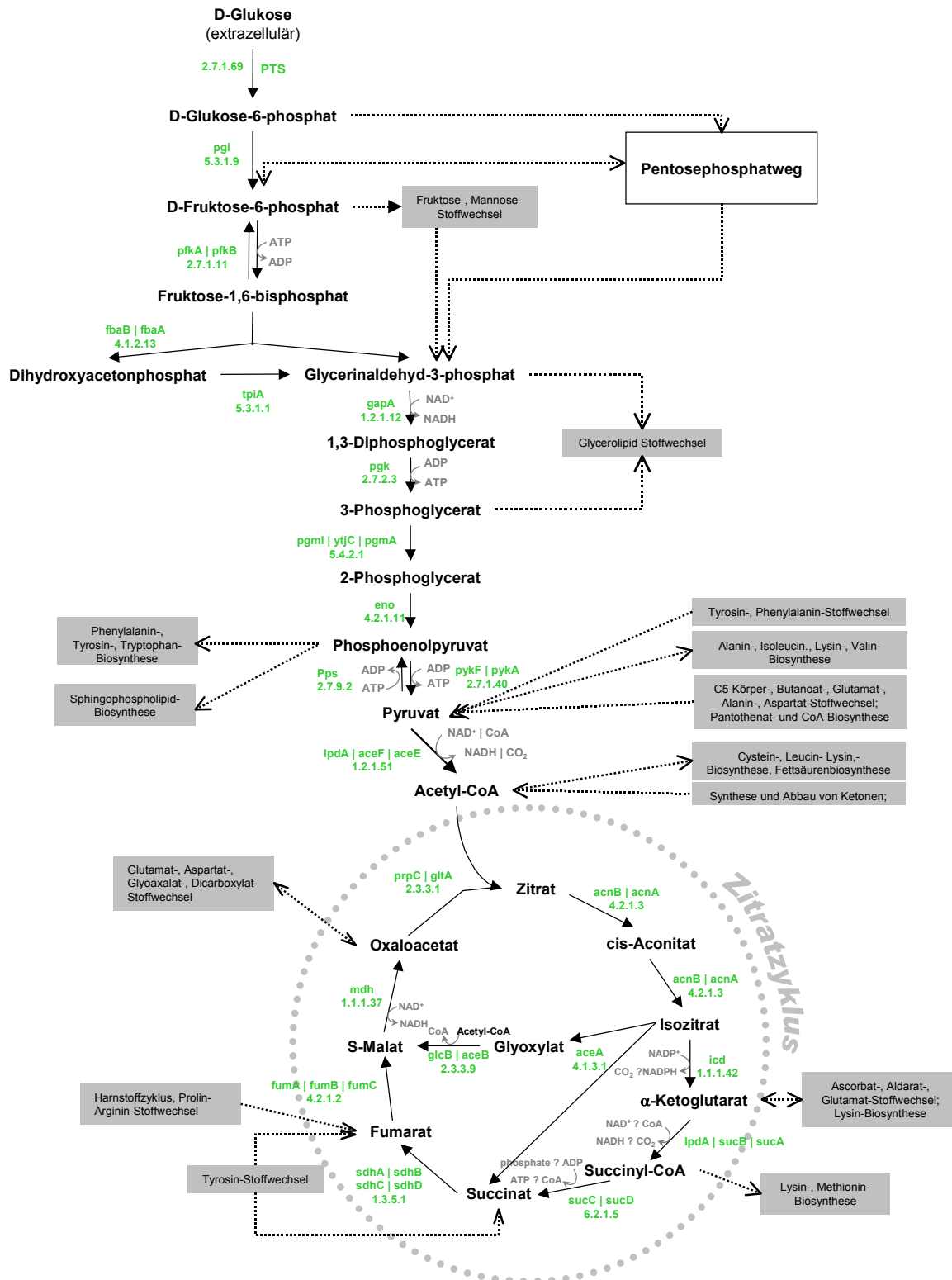
Zur Erhaltung des Stoffwechsels müssen Nährstoffe in das Innere der Zelle gelangen. Die Zellwand hält Makromoleküle mit einer Molekularmasse von etwa ≥ 600 g/mol zurück, kleinere Moleküle können nahezu ungehindert passieren. Für den Transport über die Cytoplasmamembran werden vier Transportmechanismen unterschieden (Schlegel 2007). Der Transport von Zuckern, wie Glukose, erfolgt in *E. coli* nach dem Mechanismus der Gruppen-translokation über spezifische von Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängige Phosphotransferase-systeme (PTS). Diese sind nicht nur für den Transport verantwortlich, sondern übernehmen auch regulatorische Funktionen, so dass die Aufnahme und Verstoffwechslung anderer Kohlenstoffquellen unterdrückt wird (Katabolit-Repression). Vor dem Transport in die Zelle wird durch ein integrales Membranprotein die Phosphat-Gruppe von PEP über eine gekoppelte enzymatische Kaskade auf das Glukosemolekül übertragen. Das so aktivierte Glukose-6-phosphat (G6P) wird dann aufgenommen und steht für den Metabolismus zur Verfügung. In der Netto-Reaktion wird für 1 mol Glukose 1 mol PEP benötigt, aus dem dann 1 mol Pyruvat (PYR) entsteht.

4.3 Glukosemetabolismus

Glukose ist ein bevorzugtes Substrat für *E. coli*. Diese wird selektiv über das PTS-System aufgenommen und als Glukose-6-phosphat dem zentralen Stoffwechsel zur Verfügung gestellt. Die Metabolisierung des G6P zu PYR kann über drei verschiedene Stoffwechselwege erfolgen, wobei die Glykolyse und der Pentose-Phosphat-Weg gegenüber dem Entner-Douderoff-Weg die bevorzugten Abbauewege sind. Das Pyruvat kann dann in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden, wo es unter Abspaltung des Wasserstoffs zu CO_2 oxidiert wird. Der Wasserstoff wird auf Koenzyme übertragen, welche in der Atmungskette zur Erzeugung der energiereichen Verbindung Adenosintriphosphat (ATP) dienen. Im Unterschied zu anderen Bakterienarten verfügt *E. coli* nur über zwei Phosphorylierungsmöglichkeiten in seiner Atmungskette. Dadurch können in einer aeroben Kultur aus dem vom reduzierten Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) bereitgestellten Wasserstoff nur zwei Moleküle Adenosin-triphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) regeneriert werden (P/O-Quotient = 2). Es hat sich jedoch gezeigt, dass diese scheinbare energetische Ineffizienz keinen Nachteil für den Organismus darstellt.

Beim Abbau (Katabolismus) der Glukose werden Synthesestufen und Energie in Form von ATP für die anabolen Stoffwechselwege der Biomassesynthese bereitgestellt. Damit der katabole Teil des Stoffwechsels auch unter wechselnden Substratangeboten in der Lage ist die Bereitstellung zu gewährleisten, verfügt *E. coli* über verschiedene katabole Routen zwischen denen er flexibel umschalten kann. Die katabolen Stoffwechselwege für den Abbau von Glukose sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

Abbildung 4.2: Abbau von Glukose über die katabolen Stoffwechselwege Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Zitronensäurezyklus und die Abflüsse in andere Stoffwechselwege mit den beteiligten Enzymen und Kofaktoren. Die Pfeilspitze gibt die bevorzugte Reaktionsrichtung bei der Glukoseverwertung an. Die meisten der gezeigten Reaktionen sind jedoch unter den natürlichen Umgebungsbedingungen reversibel.



4.3.1 Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse)

Die Glykolyse (EMP-Weg) ist der wichtigste Abbauweg von Glukose zu Pyruvat. Neben Pyruvat liefert er Energie in Form von ATP und Reduktionsäquivalente in Form von NADH. Die Gesamtreaktion verläuft als Bilanz nach folgender Gleichung:



In der **Glukoneogenese** wird die Glykolyse in Teilen rückwärts durchlaufen. Dieser Weg dient der Neubildung von Glukose aus Nicht-Kohlenhydraten wie z.B. Pyruvat, Laktat oder Oxalacetat (OAA) unter Verbrauch von ATP. In Abwesenheit von Zuckern kann so die Zelle auch auf diesen Substraten wachsen. Aus energetischen Gründen und zur gezielten Regulation werden in der Glukoneogenese teilweise andere Enzymsysteme verwendet. Eine besondere Rolle kommt den sogenannten anaplerotischen Reaktionen zu (4.3.3). Ein weiteres für die Glukoneogenese spezifisches Enzym ist die *Fruktose-1,6-Biphosphatase*, welche die Reaktion von Fruktose-1,6-phosphat (FBP) zu Fruktose-6-phosphat (F6P) katalysiert.

4.3.2 Pentose-Phosphat-Weg

Der Pentose-Phosphat-Weg (PPP) dient der Bereitstellung von Ribose-5-phosphat (Rib5P) als Vorstufe für Nukleotide und Nukleinsäuren sowie des reduzierten NADPH, welches als Reduktionsäquivalent für die Biosynthese dient. Der Weg ist an drei Stellen mit der Glykolyse verknüpft und kann zu einem Zyklus geschlossen werden, in dem G6P in F6P, Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP), NADPH und CO₂ umgewandelt wird.

Im oxidativen Zweig des PPP wird zunächst G6P zu Ribulose-5-phosphat (Ru5P) umgesetzt, welches dann reversibel zu Rib5P und Xylulose-5-phosphat (Xyl5P) isomerisiert. Dabei wird NADPH im Verhältnis 2:1 gebildet. Zusammengefasst werden Rib5P, Ru5P und Xyl5P als Pentose-5-phosphate (P5P) bezeichnet.

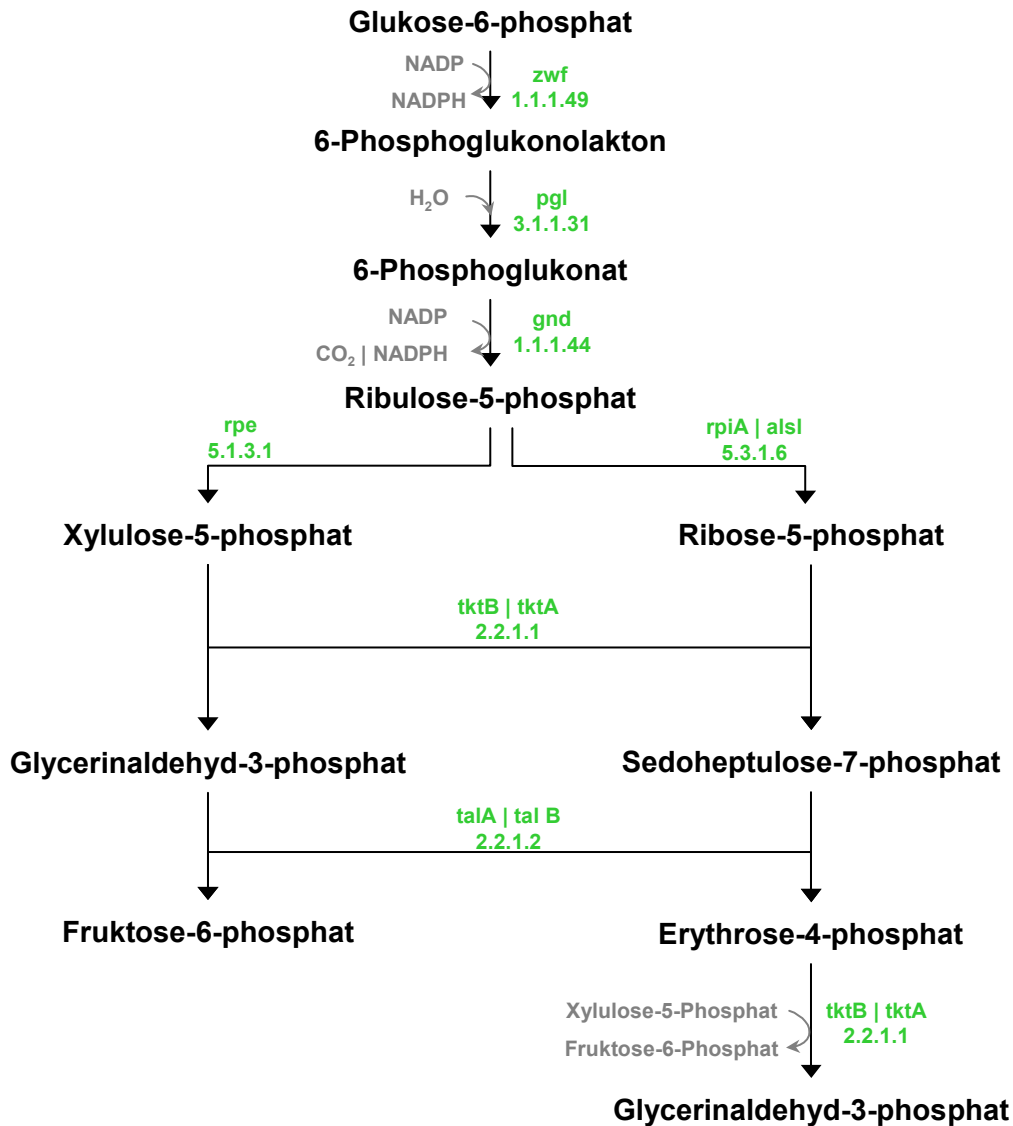


Ist in der Zelle ein höherer NADPH-Bedarf vorhanden kann der gebildete Überschuss an P5P über die reversiblen Reaktionen Transketolase und Transaldolase abgebaut werden, wobei als Endprodukte F6P und GAP entsteht, die wieder in die Glykolyse eingeschleust werden.



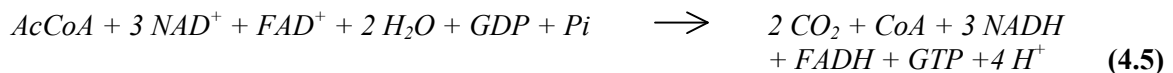
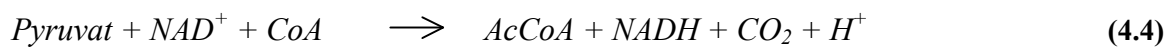
Da alle Reaktionen reversibel sind ist die Bildung von P5P aus F6P und GAP möglich. Dies wird genutzt, wenn in der Zelle Pentose-5-phosphate (z.B. für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren aus Erythrose-4-phosphat (E4P)), nicht aber NADPH gebraucht werden.

Abbildung 4.3: Pentose-Phosphat-Weg mit den Metaboliten, Enzymen und Kofaktoren. Die Pfeilspitze gibt die bevorzugte Reaktionsrichtung an. Die meisten der gezeigten Reaktionen sind jedoch unter den natürlichen Umgebungsbedingungen reversibel.



4.3.3 Zitronensäurezyklus und anaplerotische Reaktionen

Der Zitronensäurezyklus, auch Citratzyklus oder TCA genannt, stellt nicht nur den oxidativen Endabbau der Kohlenstoffquelle zu CO_2 dar, sondern er dient gleichzeitig der Bereitstellung wichtiger Biosynthesestufen. Der von Acetyl-CoA (AcCoA) in den Zyklus eingebrachte Acetyl-Rest wird beim einmaligen Durchlaufen des TCA zu CO_2 oxidiert und der Wasserstoff dabei auf Dinukleotide (z.B. FADH_2 , NADH) übertragen, die als Energie- und Reduktionsäquivalente dienen. AcCoA wird hauptsächlich durch die *Pyruvat-Dehydrogenase* (*pdh*) bereitgestellt (Abbildung 4.2).



Zur Bereitstellung von Biosynthesestufen aus dem Zitronensäurezyklus existieren Auffüllungsreaktionen, die sogenannten **anaplerotischen Reaktionen**. Diese spielen insbesondere während der Wachstumsphase eine große Rolle. Die wichtigste bei *E. coli* ist die *PEP-Carboxylase* (*ppc*), bei der PEP zu Oxalacetat carboxyliert wird und somit 4 Kohlenstoffatome für Biosynthesestufen bereitgestellt werden. Weitere enzymatische Reaktionen des Knotens um PEP, PYR, Malat (MAL) und OAA sind die der *PEP-Carboxykinase* (*pckA*) und der Malat-Enzyme (*maeB*, *sfcA*). Die Reaktionen unterliegen einer komplexen allosterischen Regulation durch die Metabolite der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus und die Kofaktoren (Sauer and Eikmanns 2005).

Eine Variante des Citratzyklus ist der **Glyoxylatzyklus**, der es der Zelle ermöglicht, Kohlenhydrate aus Fetten aufzubauen und diese als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Beim Abbau von Fettsäuren entstehen zwei AcCoA, welche in den Citratzyklus eingeschleust werden. Beim Glyoxylatzyklus wird das gebildete Isocitrat durch die *Isocitrat-Lyase* in Succinat und Glyoxylat zerlegt. Katalysiert durch die *Malat-Synthase* entsteht bei der Vereinigung mit einem weiteren Molekül AcCoA der Metabolit MAL. Die Aktivierung des Glyoxylatzyklus erfolgt durch eine Inaktivierung der *Isocitrat-Dehydrogenase* durch das Enzym *Isocitrat-Dehydrogenase-phosphatase*.

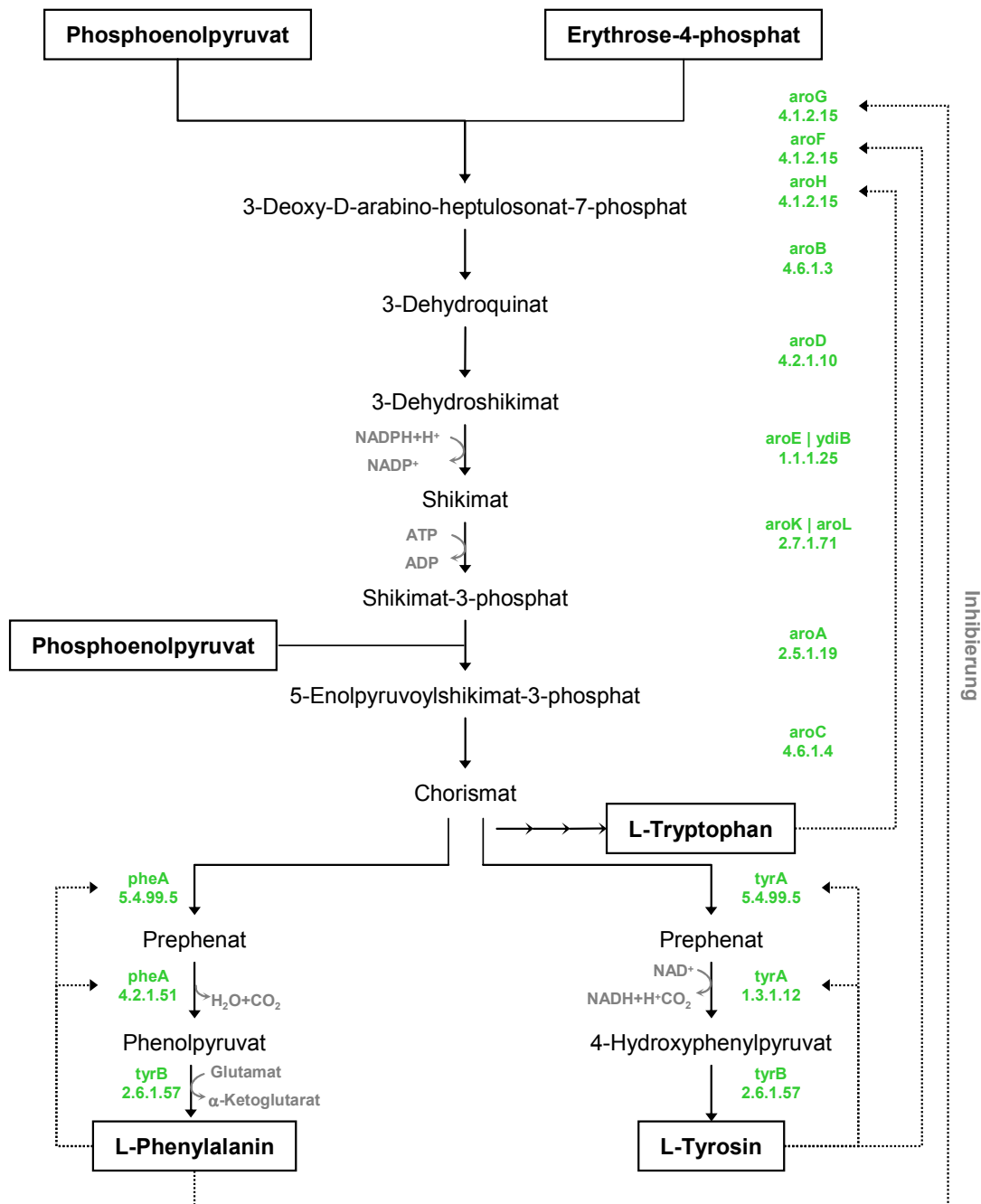
4.3.4 Biosynthese der aromatischen Aminosäuren

Die drei aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (Phe), L-Tyrosin (Tyr) und L-Tryptophan (Trp) entstehen aus den im Zentralstoffwechsel gebildeten Metaboliten PEP und E4P im sogenannten Aromatenbiosyntheseweg oder Shikimat-Weg. Chorismat (CHOR) stellt einen Knotenpunkt in diesem Weg dar, von dem die Synthesewege zu den drei genannten Aminosäuren abzweigen (Haslam et al. 1968; Knaggs 2003). Chorismat ist auch die Vorstufe zu dem in *E. coli* nicht natürlichen Metaboliten 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzoesäure (3,4-CHD). Der Stoffwechselweg wird in Kapitel 16 genauer betrachtet.

Für die Bildung von einem Mol Chorismat werden zwei Mol PEP und ein Mol E4P gebraucht, die aus der Glykolyse und dem Pentose-Phosphat-Weg bereitgestellt werden. Der Aromatenbiosyntheseweg ist ein auf mehreren Ebenen reguliertes System, da die metabolischen Kosten zur Bildung von Phe, Tyr und Trp – ausgedrückt in ATP-Äquivalenten – im Vergleich zu anderen Aminosäuren sehr hoch sind (Atkinson 1977). Die Bereitstellung der aromatischen Aminosäuren und anderer Metabolite des Biosynthesewegs werden dem aktuellen Bedarf und damit dem Wachstum der Zellen angepasst. Die Regulation des Synthesewegs erfolgt im wesentlichen am Eingang bei der Bildung von 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) und am Knotenpunkt Chorismat. Die DAHP-Synthase (Haslam et al. 1968) wird in *E. coli* durch drei isofunktionelle Enzyme (*aroF*, *aroG*, *aroH*) katalysiert. Die Expression und Aktivität der Enzyme wird durch die aromatischen Aminosäuren kontrolliert (Pittard 1996).

Für die folgenden Enzyme bis zum Chorismat ist, mit Ausnahme der von *aroL* codierten *Shikimat-Kinase II*, keine Regulation bekannt (Tribe et al. 1976). Die Reaktion vom Shikimat zum Shikimat-3-phosphat wird durch zwei isofunktionelle Enzyme katalysiert (*aroK*, *aroL*), wobei die konstitutiv gebildete *Shikimat-Kinase I* eine wesentlich geringere Aktivität zeigt, so dass die Hauptlast der Synthesearbeit bei *aroL* liegt. Die Aktivität der *Shikimat-Kinase II* wird durch die Anwesenheit von Tyr und Trp bis auf 1/10 des ursprünglichen Wertes reduziert (Ely and Pittard 1979). Der Eingang in die Biosynthesewege der drei aromatischen Aminosäuren ausgehend von Chorismat wird durch die Endprodukte Feedback-inhibiert. Phe inhibiert die durch *pheA* codierte *Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydratase* und Tyr inhibiert die durch *tyrA* codierte *Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydrogenase*. Die Kontrolle findet dabei über *Attenuation* statt, d.h. dass die Transkription gestoppt wird, sobald die Konzentration der Aminosäure einen bestimmten Wert übersteigt. Sinkt die Konzentration wieder, wird die Transkription fortgesetzt.

Abbildung 4.4: Reaktionen des Aromatenbiosynthesewegs mit den beteiligten Metaboliten, Enzymen, Kofaktoren und Regulationsmechanismen. Die Pfeilspitze gibt die bevorzugte Reaktionsrichtung bei der Bildung der drei Aminosäuren aus den Metaboliten des Zentralstoffwechsels an und sagt nichts über die Reversibilität der Reaktionen aus.



4.4 Austauschrate der Metabolitpools

Für die Planung und Auslegung eines schnellen Probenahmesystems für die isotopisch stationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse (vgl. Kapitel 18) ist es notwendig, die Geschwindigkeit zu kennen mit der sich die Markierungsinformation in einem Pool ändert. Die Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymreaktionen ist von der Substrat- und Enzymkonzentration und aktivierenden bzw. hemmenden Substanzen in der Zelle abhängig. Im metabolisch stationären Fall sind die Enzymreaktionen in einem metabolischen Netzwerk einer Zelle konstant (metabolischer Fluss). In der folgenden Tabelle ist anhand von Literaturwerten der intrazellulären Konzentrationen (Kummel et al. 2006a) und Stoffflüsse (Fischer and Sauer 2003; Fischer et al. 2004; Yang et al. 2003; Zhao and Shimizu 2003) für den Organismus *E. coli* die mittlere Verweilzeit (= Poolgröße/Fluss) eines Metabolitpools berechnet.

Tabelle 4-1: Abschätzung der mittleren Verweilzeit für die Metabolitpools von *E. coli* auf Basis von Literaturwerten der Metabolitkonzentrationen und Stoffflüsse.

Metabolitpool	Poolgröße [mmol/l]	Stofffluss [mmol/(l*s)]	Mittlere Verweilzeit [s]
AcCoA	1,0	0,56	1,8
AKG	1,0	0,26	3,9
ASP	1,0	0,09	10,8
CIT	20,0	0,29	69,4
DHAP	5,0	1,01	5,0
F6P	0,7	0,42	1,7
FBP	4,0	0,49	8,1
G6P	4,0	0,61	6,6
GAP	2,0	0,57	3,5
MAL	10,0	0,22	46,3
OAA	0,1	0,39	0,3
PEP	3,0	0,92	3,3
PG6	1,0	0,17	5,7
xPG	1,0	1,01	1,0
PYR	3,0	0,73	4,1
Ru15P	1,0	0,17	5,7

Wie die Abschätzung zeigt, liegt die Zeit für die mittlere Verweilzeit eines Metabolitpools für die meisten Metabolite unter 10 Sekunden. Dies macht deutlich, dass zur Verfolgung von metabolischen Änderungen, wie Konzentration oder Markierungszustand, eine Probenahme erforderlich ist, die es erlaubt mehrere Proben pro Sekunde aus einem Reaktor zu entnehmen und den Stoffwechsel innerhalb von Millisekunden zu stoppen. Entsprechende Probenahmesysteme sind z.B. in (Ostergaard et al. 2001; Weuster-Botz 1997) beschrieben.

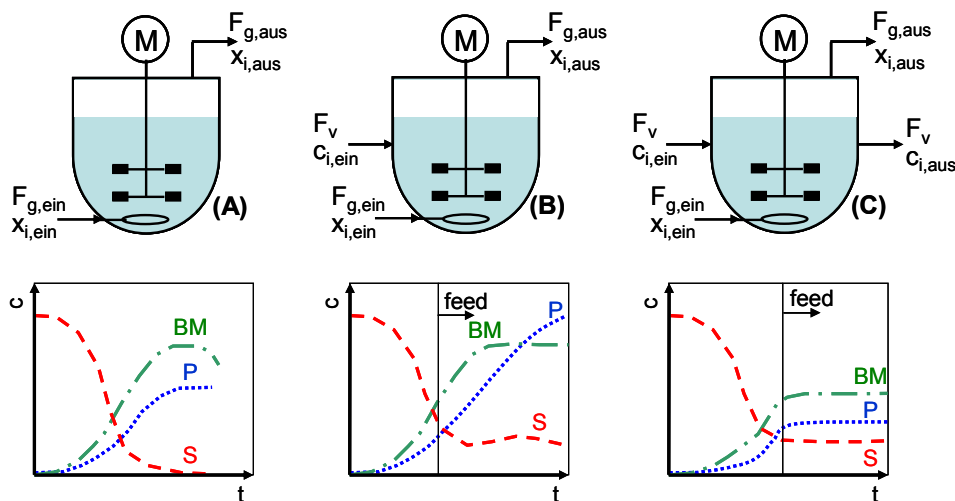
5 Reaktionstechnik

Die folgenden Kapitel geben eine kurze Übersicht über die Betriebsweise von Reaktoren und die Berechnung charakteristischer Größen zur Beschreibung von Bioprocessen. Zum Verständnis der nachfolgenden Kapitel werden grundlegende Kenntnisse der Reaktionstechnik von Bioreaktoren vorausgesetzt. Eine Einführung in die Thematik gibt u.a. (Chmiel 2005; Nielsen and Villadsen 2002; Schuegerl 1997).

5.1 Prozessführung

Bioreaktoren werden nach Art des Reaktortyps (Strömungsrühr, Rührkessel, Säulenreaktor) und der Betriebsführung (Satz-, Zulauf-, kontinuierlicher Betrieb) unterschieden. Die in dieser Arbeit verwendeten Reaktoren werden vereinfacht als ideal gerührte Rührkessel betrachtet, die im Satz- und Zulaufverfahren eingesetzt werden. Die Betriebsführung hat dabei einen großen Einfluss auf die Zeitprofile der Substrat- und Produktkonzentration.

Abbildung 5.1: Betriebsweise von Bioreaktoren. (A) Satzbetrieb (Batch), (B) Zulaufbetrieb (Fed-Batch), (C) Chemostat (kontinuierlich betriebener Reaktor).



Das **Satzverfahren (Batch)** stellt die einfachste Form der Betriebsführung dar. Es werden dem Reaktor dabei außer Luft, Antischaum- und pH-Korrekturmittel keine weiteren Substanzen zugefügt und außer geringen Probenvolumina auch nichts entzogen. Bei großen Reaktoren mit im Vergleich zum Reaktorvolumen nur geringen Volumenänderungen können diese Einflüsse vernachlässigt und der Reaktor als geschlossenes System betrachtet werden. Zu Beginn der Reaktion werden alle benötigten Nährstoffe im Reaktor vorgelegt und dieser mit der Vorkultur beimpft. Die Zellen beginnen zu wachsen, bis eine Limitierung durch ein Substrat oder eine Inhibierung durch ein gebildetes Produkt auftritt. Die Wachstumskurve im Satzverfahren lässt sich in sechs Phasen einteilen: *Lagphase*, *exponentielle Phase*, *Übergangsphase 1*, *stationäre Phase*, *Übergangsphase 2* und *Absterbephase*.

Beim **Zulaufverfahren (Fedbatch)** werden ein oder mehrere Medienbestandteile während der Fermentation zugeführt, wodurch die Wachstums- und/oder Produktbildungsphase verlängert werden kann. Eine verlängerte Wachstumsphase führt zu einer höheren Biomassekonzentration und damit zu einer höheren volumenspezifischen Produktionsrate am Ende des Prozesses. Eine zu hohe Biomassekonzentration im Reaktor kann zu verfahrenstechnischen Problemen in Bezug auf die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung führen. Daher wird das Wachstum über die Zugabe einer für das Wachstum notwendigen Komponente, z.B. einer Aminosäure, kontrolliert. Die Wachstums- und Produktbildungsphase kann somit entkoppelt und die Syntheseleistung der Organismen für das gewünschte Produkt genutzt werden, ohne weiteres Substrat für die Biomassebildung zu verbrauchen.

Beim **kontinuierlichen Betrieb (Chemostat)**, wird der Reaktor von einem konstanten Volumenstrom durchströmt. Über die Auswaschrata (*Dilution rate*) kann die Wachstumsgeschwindigkeit eingestellt werden. Es stellen sich konstante äußere Bedingungen mit niedrigen Konzentrationen im Reaktor ein. Der metabolische Zustand der Zellen kann für eine lange Zeit aufrecht erhalten werden, weshalb diese Reaktionsführung häufig zur Charakterisierung von Mikroorganismen eingesetzt wird. In der industriellen Produktion spielt der Chemostat keine Rolle und wird daher in dieser Arbeit nicht näher betrachtet.

5.2 Berechnung charakterisierender Größen

Über die Massebilanzen für den Reaktor können die spezifischen Produktbildungs- und Substratverbrauchsdaten berechnet werden.

Wachstumsrate:

$$\mu = \frac{dc_x}{c_x \cdot dt} + \frac{F_V}{V} \quad (5.1)$$

c_x : Biomassekonzentration

spezifischer Substratverbrauch:

$$\sigma = \frac{dc_s}{c_x \cdot dt} = \frac{F_V}{V} \cdot \frac{(c_s^0 - c_s)}{c_x} + \frac{r_s}{c_x} \quad (5.2)$$

c_s^0 : Substratkonzentration im Zulauf

spezifische Produktbildung:

$$\pi = \frac{dc_p}{c_x \cdot dt} = \frac{r_p}{c_p} - \frac{F_V}{V} \cdot \frac{c_p}{c_x} \quad (5.3)$$

c_p : Produktkonzentration

r_p : spezifische Produktbildungsrate

Die Sauerstoff- und Kohlendioxidtransportraten sind über die Massebilanzen der Gasphase bestimmt. Für die **Sauerstoffaufnahme** (*OUR*) und die **CO₂-Bildungsrate** (*CER*) gelten die folgenden Gleichungen:

$$OUR = \frac{F_g}{V} \cdot (c_{O_2,in} - c_{O_2,aus}) = \frac{F_g}{V \cdot 22,414} \cdot \left(m_{O_2}^{in} - \frac{1 - m_{O_2}^{in} - m_{CO_2}^{in}}{1 - m_{O_2}^{aus} - m_{CO_2}^{aus}} \cdot m_{O_2}^{aus} \right) \quad \left[\frac{mol}{l \cdot h} \right] \quad (5.4)$$

$$CER = \frac{F_g}{V} \cdot (c_{CO_2,aus} - c_{CO_2,in}) = \frac{F_g}{V \cdot 22,414} \cdot \left(m_{CO_2}^{aus} \cdot \frac{1 - m_{O_2}^{in} - m_{CO_2}^{in}}{1 - m_{O_2}^{aus} - m_{CO_2}^{aus}} - m_{O_2}^{in} \right) \quad \left[\frac{mol}{l \cdot h} \right] \quad (5.5)$$

m_i : Gasvolumenanteile der Komponente i

V_N : molares Normvolumen (für ideale Gase 22,414 l/mol)

Die differentiellen **Ausbeutekoeffizienten** (Yield) sind folgendermaßen definiert:

substratspezifischer Biomasse-Ausbeutekoeffizient:

$$Y_{x/s} = \frac{dc_x}{dc_s} = \frac{\mu}{\sigma} \quad (5.6)$$

substratspezifischer Produkt-Ausbeutekoeffizient:

$$Y_{p/s} = \frac{dc_p}{dc_s} = \frac{\pi}{\sigma} \quad (5.7)$$

biomassespezifischer Produkt-Ausbeutekoeffizient:

$$Y_{p/x} = \frac{dc_p}{dc_x} = \frac{\pi}{\mu} \quad (5.8)$$

Zur Beschreibung von Fermentationsprozessen wird häufig auch die integrale oder differentielle **Raum-Zeit-Ausbeute** verwendet. Diese ist definiert als:

$$RZA_{integr} = \frac{c_{p,max} - c_{p,t=0}}{t_{max}} \quad (5.9)$$

$$RZA_{diff} = \frac{dc_p}{dt} \quad (5.10)$$

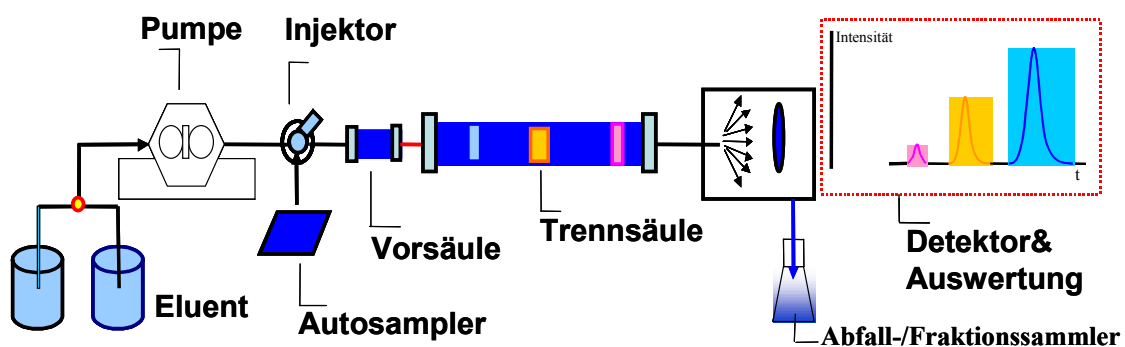
6 Biochemische Analytik

Zur Gewinnung von ^{13}C -Markierungsdaten wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Messmethoden eingesetzt. Zur Analyse der Markierungen und Quantifizierung der intrazellulären Metabolite wurde ein HPLC-gekoppeltes Massenspektrometer eingesetzt. Die ^{13}C -Markierung in den proteinogenen Aminosäuren wurde mit der Magnetresonanzspektroskopie (NMR) gemessen. Die Funktionsweise der verwendeten Geräte soll in diesem Kapitel kurz erläutert werden. Ausführliche Darstellungen zu diesen Techniken finden sich u.a. in (Bovey et al. 1988; Keeler 2005; Siuzdak 1996). Die unterschiedlichen Markierungsdaten, die man mit diesen beiden Messmethoden erhält, sind in Kapitel 6.4 dargestellt. Die Anwendung dieser Messtechniken für die ^{13}C -Stoffflussanalyse wird ausführlich in (de Graaf 2000; Szyperski 1998; Wiechert et al. 2001; Wittmann et al. 2002; Zhao and Shimizu 2003) diskutiert.

6.1 HPLC-gekoppeltes Massenspektrometer (LC-MS/MS)

Die *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie* (HPLC, kurz LC) ist eine Methode, bei der die Trennung in einer mit Adsorbens gefüllten Säule (stationäre Phase) mit Hilfe einer flüssigen mobilen Phase erfolgt. Die Trennung basiert auf den folgenden vier Prinzipien: *Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch und -ausschluss*. Eine HPLC-Anlage besteht aus folgenden Komponenten: Elutionsmittelreservoir, Pumpe, Injektor, Trennsäule (Vorsäule) und einem Detektor, z.B. einem Massenspektrometer.

Abbildung 6.1: Funktioneller Aufbau einer HPLC-Anlage

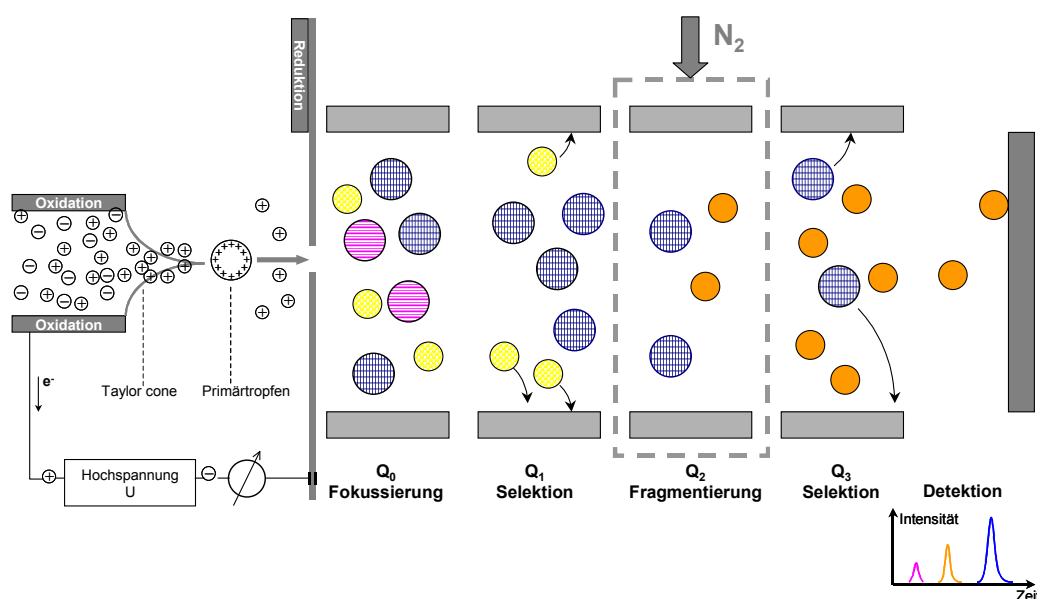


Die *Massenspektrometrie (MS)* wird in der instrumentellen Analytik zur Aufklärung der Struktur von organischen Molekülen und – auf Grund des hohen Auflösungs- und Nachweisvermögens – zur qualitativen und quantitativen Analyse von komplex zusammengesetzten Proben eingesetzt. Bei der Massenspektrometrie (MS) werden die zu untersuchenden Komponenten auf Grund ihres Verhältnisses von Masse (m) zu Ladung (z) in einem elektrischen Feld getrennt und detektiert. Vor der Analyse müssen die Substanzen in ein ionisiertes Gas überführt werden.

Die Ionisation bestimmt in hohem Maße das detektierte Massenspektrum und erfolgt durch elektromagnetische oder Teilchenstrahlung. Nach der Ionisation werden die Teilchen in Richtung des Trennsystems beschleunigt. Je nach Anwendungsgebiet und benötigter Auflösung existieren unterschiedliche Verfahren zur Trennung der Ionen. Dabei muss ein Kompromiss zwischen hoher Auflösung und hohem Ionenstrom (hohe Sensitivität) gefunden werden. Im Detektor wird der Ionenstrom in ein elektrisches Signal umgewandelt, dessen Stärke proportional der Anzahl der Ionen ist.

Ein in der organischen und biochemischen Analytik weit verbreiteter Massenanalysator ist das **Quadrupol-Massenspektrometer**. Dieses zeichnet sich durch eine hohe Ionentransmission von der Quelle bis zum Detektor, eine leichte Fokussier- und Kalibrierbarkeit und eine hohe Stabilität des Signals im Dauerbetrieb aus. Es besteht aus vier parallelen, stabförmigen Metallelektroden, die symmetrisch angeordnet sind und unter dem Einfluss eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfelds nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor durchlassen. Die kommerziell erhältlichen Quadrupolanalysatoren haben einen maximalen Massenbereich bis etwa $m/z=4000$ und erreichen Auflösungsgrade zwischen 500 und 5000. Eine über die reine Massenanalyse hinausgehende Strukturanalyse von Molekülen wird möglich, wenn man mehrere Quadrupole verwendet. Üblicherweise kommen sogenannte Triple-Quadrupol-Massenspektrometer zum Einsatz, bei denen vier Quadrupole (Q_0 bis Q_3) in Reihe geschaltet sind. Q_0 wird nur mit Wechselstrom betrieben und dient der Fokussierung der Ionen zur Verbesserung des Eintritts in den zentralen Ionenweg. Q_1 und Q_3 sind die Messquadrupole zur Selektion der Massen. Q_2 dient als Kollisionskammer, in der durch Einleitung eines neutralen Gases (N_2 , He, Ar) und der Beschleunigung der Ionen mit etwa 20-150 kV eine Fragmentierung stattfindet.

Abbildung 6.2: Schematischer Aufbau und Funktionsprinzip eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit ESI-Quelle im selected reaction monitoring (SRM)-Modus



Mit der Kopplung von HPLC und Massenspektrometer kann die Identifizierbarkeit in Vielkomponentengemischen wesentlich verbessert werden, da neben der Retentionszeit zusätzlich eine Trennung nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis – kurz Masse genannt – erfolgt. Dadurch ist es möglich, auch Substanzen mit gleicher oder überlappender Retentionszeit zu unterscheiden, sofern sie nicht die gleiche Masse besitzen (isobare Komponenten). Diese Vorteile werden jedoch auch mit Nachteilen für die chromatographische Trennung erkauft, da man auf die Verwendung MS-kompatibler flüchtiger Puffersubstanzen und Lösungsmittel angewiesen ist. Hierdurch verringern sich die chromatographischen Freiheitsgrade. Die HPLC wird daher nicht mehr zur vollständigen Trennung des Gemisches eingesetzt, sondern dient eher der Probenvorbereitung für den MS-Detektor. Dabei kommt es besonders darauf an, die Analyten von den störenden Komponenten der Probenmatrix zu trennen. Die Ionisierung der Analyten reagiert sehr empfindlich auf Verunreinigungen, so dass in ungünstigen Fällen das Signal des Analyten nahezu vollständig von der Matrix unterdrückt wird (Ionensuppression).

Das Problem bei der Kopplung der Verfahren besteht darin, die sich in einem Lösungsmittel befindenden Analytmoleküle aus der HPLC bei Normaldruck in das Hochvakuum des Massenspektrometers als gasförmige Ionen zu bringen. Erst die Entwicklung der Atmosphärendruck-Ionisationsverfahren (API) machte dies möglich und führte zu einem verbreiteten Einsatz des MS als leistungsfähigen Detektor für die HPLC. Die sogenannte **Elektrosprayionisation (ESI)** wird in der Regel für sehr polare Verbindungen eingesetzt, die bereits in Lösung leicht Ionen bilden oder bereits ionisch vorliegen (Proteine, Aminosäuren, Zuckerphosphate, Karbonsäuren). Im Vergleich zu anderen Ionisationstechniken ist der Ionisationsprozess bei der ESI sehr effektiv und wesentlich schonender. In der Regel werden die Molekülonen erhalten. Bei negativer Ionisierung (*negative mode*) werden $[M-H]^-$ -Anionen und bei positiver Ionisierung $[M-X]^+$ -Kationen erhalten, wobei X nicht zwangsläufig ein Proton sein muss, sondern es auch zur Anlagerung anderer Kationen, wie Na^+ , K^+ oder NH_4^+ kommt. Dies macht die Interpretation der Spektren im *positive mode* nicht immer einfach.

Mit dem Triple-Quadrupol-MS können verschiedene Experimente durchgeführt werden, die auch als **MS/MS-Analyse** bezeichnet werden. Die am häufigsten eingesetzte Methode, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das sogenannte *selected reaction monitoring* (SRM). In diesem Modus wird Q_1 auf die Masse des Vorläufer-Ions (*precursor ion*) und Q_3 auf die Masse des Produkt-Ions (*product ion*) eingestellt. Mit dieser Methode können auch Moleküle in einem Gemisch ohne vorherige chromatographische Trennung identifiziert und quantifiziert werden. Der SRM-Modus zeichnet sich durch die höchste Empfindlichkeit aus.

6.2 LC-MS/MS-Analyse von ^{13}C -Markierungen

Am Beispiel des Phosphoenolpyruvats wird die Analyse von ^{13}C -Markierungsmustern mit der LC-MS/MS-Technik gezeigt. Das PEP-Molekül besitzt die Masse $M = 168,0 \text{ g/mol}$ und drei C-Atome, so dass mit dem Massenspektrometer vier verschiedene Massen ($m/z+0$, $m/z+1$, $m/z+2$, $m/z+3$) direkt detektiert werden können.

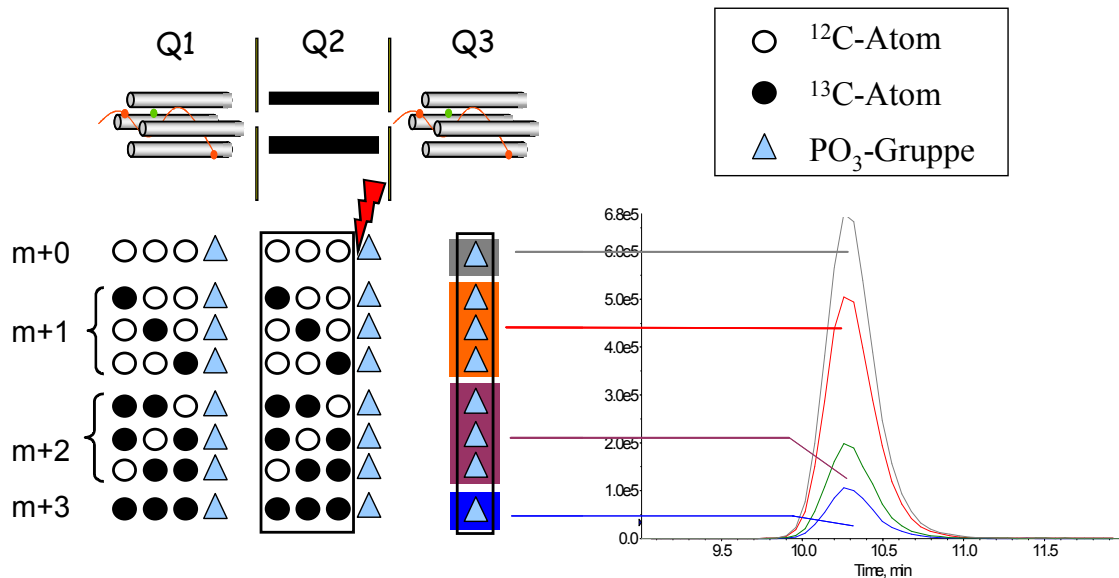
Tabelle 6-1: Massenselektion und Fragmentierung von Phosphoenolpyruvat in einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer

	Quadrupol Q1		Quadrupol Q2	Quadrupol Q3
Scan	Massenselektion 1		Fragmentierung	Massenselektion 2
1	$m/z+0$	167,0 g/mol	Fragmente von $m/z+0$	PO_3^- : 78,9 g/mol
2	$m/z+1$	168,0 g/mol	Fragmente von $m/z+1$	PO_3^- : 78,9 g/mol
3	$m/z+2$	169,0 g/mol	Fragmente von $m/z+2$	PO_3^- : 78,9 g/mol
4	$m/z+3$	170,0 g/mol	Fragmente von $m/z+3$	PO_3^- : 78,9 g/mol

Die Abbildung 6.3 verdeutlicht die Analyse des Moleküls im Massenspektrometer. Im ersten Schritt erfolgt die Trennung des Probengemischs mit der *HPLC*. Dabei geht es vor allem darum, Komponenten mit gleicher Masse und gleichem Fragmentierungsmuster und die Probenmatrix zu entfernen. Die Massenanalyse erfolgt dann über das Zeitintervall, in dem das PEP-Signal am Ausgang der *HPLC* zu erwarten ist. Ein Teilstrom der mobilen Phase aus der *HPLC* wird zur Ionenquelle (ESI) geleitet. Hier erfolgt bei negativer Ionisierung die Abspaltung eines Protons, wodurch das Molekül-Ion mit der Masse $m/z-1$ entsteht. Im Q_1 erfolgt nun die erste Massenselektion. Es werden alle Massen bis auf die gewünschte gefiltert und das Precursor-Ion gelangt zum Q_2 , wo eine Fragmentierung des Moleküls stattfindet.

Beim PEP wird bevorzugt die PO_3^- -Gruppe abgespalten, da diese sehr gut in der Lage ist, die negative Ladung zu stabilisieren. Die Abspaltung von PO_3^- und H_2PO_4^- bei MS/MS-Experimenten ist eine häufig zu beobachtende Reaktion, die auch bei anderen Molekülen mit diesen Gruppen, z.B. den Zuckerphosphaten, auftritt. Das Q_3 ist so eingestellt, dass nur Fragment-Ionen mit der Masse des PO_3^- -Ions ($m/z= 78,9$) passieren können. Am Detektor kommen daher nur die Fragment-Ionen an, die sowohl die Bedingungen von Q_1 als auch von Q_3 erfüllen. Etwa alle 50 ms werden die Parameter des Q_1 geändert, so dass alle auftretenden Massen des ^{13}C -markierten PEP-Moleküls analysiert werden können. Für jedes Masse-zu-Ladung-Verhältnis des Moleküls erhält man eine Peakfläche, die zur Quantifizierung der Massenanteile ausgewertet wird.

Abbildung 6.3: Massenanalyse von ^{13}C -markiertem Phosphoenolpyruvat im Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mittels Massenselektion im **Q1**, Fragmentierung im **Q2** und Detektion im **Q3**. Die Größe der gemessenen Peakflächen entsprechen der Menge an Molekülen mit der Masse $m/z+i$ in der Probe.



Über die Größe der Peakflächen erhält man pro Molekül n_c+1 sogenannte Massenisotopomere (n_c entspricht der Anzahl an C-Atomen), dabei wird der Isotopomerenanteil der unmarkierten und vollmarkierten Komponente direkt erhalten. Mit **Isotopomer** werden die verschiedenen möglichen Markierungszustände eines Metaboliten beschrieben. Jedes C-Atom kann markiert oder unmarkiert sein und ein Metabolit besitzt daher 2^{n_c} Markierungszustände (Isotopomere). Isotopomere werden üblicherweise in der „binären“ Form (z.B. A#101) dargestellt, wobei eine 0 für unmarkiert und eine 1 für markiert steht. Die Anteile der mehrfach markierten Komponenten ergeben sich durch Linearkombination der Isotopomerenanteile.

Mit der Massenspektrometrie ist nur eine Aussage über die Anzahl der markierten C-Atome im Molekül möglich und keine über die Position der markierten C-Atome. Zusätzliche Informationen können durch eine geeignete Fragmentierung des Moleküls und Messung der Fragmente erhalten werden, wobei die Sensitivität der Messung jedoch mit zunehmender Fragmentierung geringer wird. Der große Vorteil der Analyse von ^{13}C -Markierungsmustern mittels Triple-Quadrupol-Massenspektrometer liegt in der hohen Sensitivität der Messung, so dass auch Metabolite mit nur geringer Konzentration analysiert werden können. Durch die doppelte Massenselektion (im Q1 und Q3) können auch komplexe Stoffgemische mit nur wenig Aufwand in der Vortrennung untersucht werden. Heute können die ^{13}C -Markierungsmuster der meisten Metabolite des Zentralstoffwechsels analysiert werden (Luo et al. 2007; Oldiges et al. 2007; van Winden 2002).

6.3 NMR-Spektroskopie

Die Messung der Markierungsanreicherung mittels NMR-Spektroskopie kann über zwei unterschiedliche Methoden erfolgen. Mit der *¹H-NMR-Spektroskopie* werden die Resonanzfrequenzen der an ein Kohlenstoff(C)-Atom gebundenen Protonen gemessen. Für jedes Isotop des C-Atoms entstehen dabei unterschiedliche Messsignale. Durch die ¹H-NMR-Messung können, unter der Voraussetzung, dass alle C-Atome mindestens ein Proton gebunden haben, die Markierungsanreicherungen für jedes C-Atom ermittelt werden. Diese als Positionsanreicherung bezeichnete Messung ist eine Linearkombination von Isotopomerenanteilen (Jeffrey et al. 1991). Die Spektren von ¹H-NMR-Messungen sind sehr komplex und die Sensitivität ist im Vergleich zur Massenspektrometrie gering, so dass eine Analyse ohne vorherige Reinigung und Aufkonzentrierung des Metaboliten nicht möglich ist.

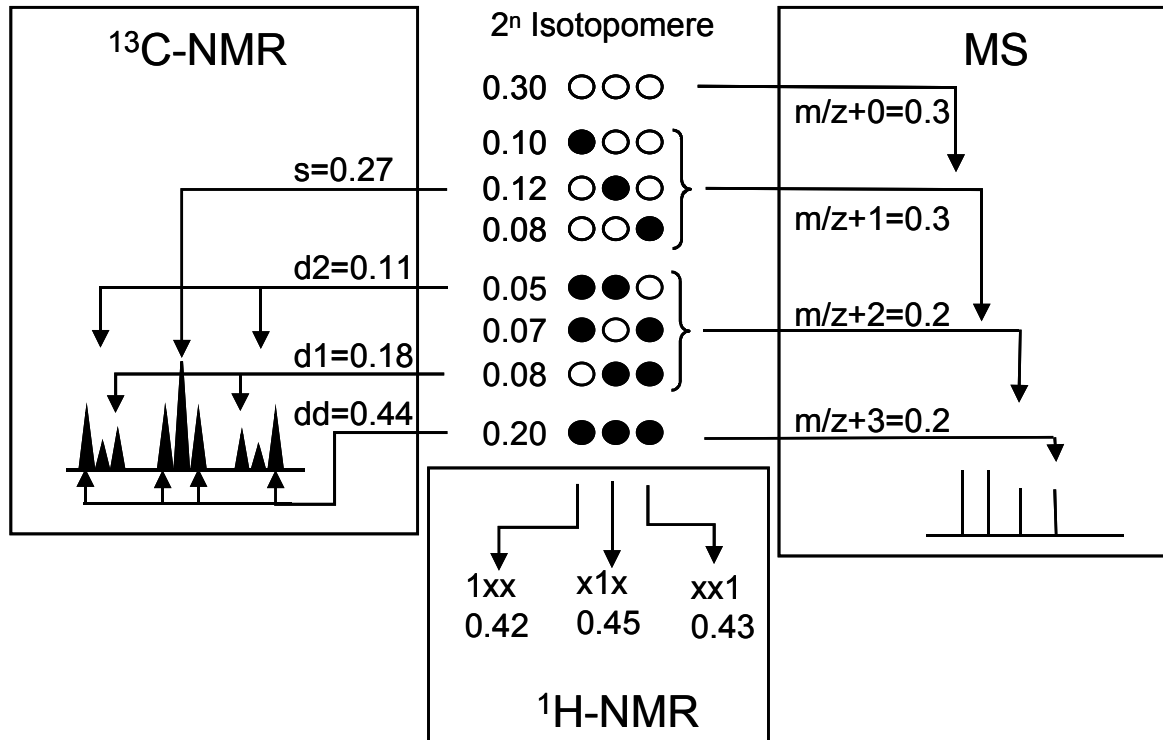
Mit der hochauflösenden *¹³C-NMR-Spektroskopie* können die Resonanzfrequenzen der ¹³C-Atome und die Wechselwirkung mit benachbarten ¹³C-Atomen direkt gemessen werden. Je nach elektronischem Charakter und der räumlichen Umgebung der Nachbaratome entstehen unterschiedliche Signale, die Aufschluss über Position und Anzahl der benachbarten ¹³C-Atome geben. Die Datenauswertung erfolgt über Kalibrierungsmessungen oder den Vergleich mit publizierten NMR-Daten. Häufig kommt es jedoch zu einer Überlagerung der Spektren, so dass eine vollständige Trennung aller Isotopomere eines Moleküls allein auf Basis der ¹³C-NMR-Spektroskopie nicht möglich ist. Die Technik ist daher im Vergleich zur Massenspektrometrie wenig sensitiv.

Häufig werden die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Analyse zur sogenannten *2D [¹³C, ¹H] COSY NMR*-Methode gekoppelt (Dauner 2000; van Winden et al. 2001). Dies hat den Vorteil, dass gegenüber der ¹H-NMR Messung mehr Informationen über die Isotopomere erhalten werden und eine aufwändige Aufreinigung nicht mehr erforderlich ist. Die Sensitivität entspricht jedoch der ¹³C-NMR-Methode, so dass nur sehr hoch konzentrierte Metabolite mit einem hohen Markierungsanteil ohne vorherige Aufkonzentrierung gemessen werden können.

6.4 Vergleich von NMR und MS-Analytik der ¹³C-Markierung

In der folgenden Abbildung ist die Messung der ¹³C-Markierung mittels ¹H-NMR, ¹³C-NMR und MS für ein Molekül mit n=3 C-Atomen dargestellt. Das Molekül besitzt somit acht Isotopomere. Diese sind in der Mitte der Zeichnung mit den zugehörigen Anteilen dargestellt. Je nach Messmethode erhält man unterschiedliche Messsignal, die Informationen über die Isotopomere des Moleküls liefern. Die erhaltenen Markierungsinformationen sind in der Abbildung rechts, links und unterhalb der Isotopomere dargestellt.

Abbildung 6.4: ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und MS-Messung der Positionsmarkierungsanteile und der Isotopomeren-Anteile eines Moleküls mit 3 C-Atomen. Weiße Kreise (#0) entsprechen ^{12}C , schwarze Kreise (#1) ^{13}C -Atomen. In der sogenannten Cumomer-Schreibweise bei der ^1H -NMR steht 0 für ein ein ^{12}C -, 1 für ein ^{13}C - und x für ein ^{12}C - oder ^{13}C -Atom.



Die ^{13}C -NMR-Analytik liefert Informationen über die Umgebung der markierten C-Atome. In der Abbildung links ist das Ergebnis für das mittlere C-Atom dargestellt. Über die Stärke der jeweiligen Messsignale erhält man die Mengenverhältnisse von Singulett (s), Doublett (d1, d2) und Doppeldoublett (dd). Diese Verhältnisse ergeben sich aus dem zugehörigen Isotopomerenanteil geteilt durch die Summe aller Anteile bei denen das mittlere C-Atom markiert ist. Vergleichbare Informationen erhält man für die markierten endständigen C-Atome. Eine Aussage über den Isotopomerenanteil der unmarkierten Moleküle (im Beispiel 0.30) erhält man mittels ^{13}C -NMR nicht. Maximal erhält man mittels ^{13}C -NMR bei diesem Beispiel fünf unabhängige Datensätze.

Bei der ^1H -NMR Analytik erhält man für jedes C-Atom den Markierungsanteil, der sich aus der Summe der Isotopomerenanteile mit einer Markierung dieses C-Atoms ergibt. Da man keine Informationen über die benachbarten C-Atome erhält, ist keine direkte Berechnung der einzelnen Isotopomerenanteile möglich. Man erhält bei der ^1H -NMR Analytik drei unabhängige Datensätze.

Die **Massenspektrometrie (MS)** liefert Informationen über die Anteile von unmarkierten (+0), einfach (+1), zweifach (+2) und vollständig (+3) markierten Molekülen. Diese werden als Massenisotopomere (MI) bezeichnet (siehe 6.2). Die MI-Anteile ergeben sich aus der Summe der Isotopomerenanteile bei denen die entsprechende Anzahl an C-Atomen markiert ist. Die Massenspektrometrie ist die einzige Messmethode, die direkt Informationen über die unmarkierten Anteile liefert. Bei der MS-Analytik erhält man drei unabhängige Datensätze.

Mit keiner der Messmethoden können alle Isotopomerenanteile erhalten werden. Erst die Kombination der Methoden ergibt theoretisch einen vollständigen Datensatz für einen Metaboliten. In der Praxis wird die Messung der Isotopomere dadurch erschwert, dass z.B. die Sensitivität der NMR-Messung nicht ausreicht, nicht alle C-Atome der ^1H -NMR-Analyse zugänglich sind oder es zur Überlagerung von Multiplett-Spektren kommt. Vor der Durchführung des Markierungsexperiments muss daher geklärt werden, ob mit dem eingesetzten Markierungssubstrat und den Isotopomerendaten für verschiedene Metabolite alle Flüsse in einem gegebenen Netzwerk bestimmt werden können. Neben dem eingesetzten Markierungssubstrat sind die verwendete Messmethode und die zu messenden Metabolite weitere Designparameter für die Durchführung von ^{13}C -Stoffflussanalysen.

7 Stoffflussanalyse (SFA)

In diesem Kapitel sind die theoretischen Grundlagen der ^{13}C -Stoffflussanalyse zusammenfassend dargestellt. Dabei werden das Prinzip und die zu treffenden Annahmen, die Durchführung von ^{13}C -Markierungsexperimenten und die wesentlichen Unterschiede zwischen dem isotopisch stationären und dem instationären Fall kurz erläutert. Ausführliche Betrachtungen zur ^{13}C -Stoffflussanalyse finden sich u.a. in (Christensen and Nielsen 2000; Klapa and Stephanopoulos 2000; Stephanopoulos 1999; Szyperski 1998; Wiechert and de Graaf 1996).

7.1 Prinzip der ^{13}C -Stoffflussanalyse

Das Ziel der ^{13}C -Stoffflussanalyse ist die quantitative Analyse intrazellulärer Stoffflüsse während eines metabolisch stationären Zustands in einem Organismus. Als **Fluss** wird die Reaktionsrate \mathbf{r} [mol/h] einer enzymatischen Reaktion bezeichnet. Diese Daten bilden die Grundlage für die gezielte Verbesserung von Stoffwechselleistungen mit den Methoden des *Metabolic Engineering*. Die Stoffflussanalyse leistet dabei einen wichtigen Beitrag zur Beantwortung folgender Fragen:

- Welche Enzyme sind *in vivo* aktiv, wie hoch ist die Aktivität und in welche Richtung läuft eine Reaktion ab?
- Wie ändert sich der physiologische Zustand in einer Zelle bei verschiedenen Bedingungen und welche Regulationsmechanismen wirken?
- Welche Veränderungen ergeben sich durch eine genetische Manipulation der Zelle?

Dabei beschränkt sich die Analyse im Allgemeinen auf den Zentralstoffwechsel (Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg, Zitrat- und Glyoxylatzyklus) und die wesentlichen Produktionswege in rekombinanten Organismen. Die Methoden der ^{13}C -Stoffflussanalyse wurden inzwischen für viele industriell interessante Organismen angewendet (Arauzo-Bravo and Shimizu 2001; Fischer and Sauer 2003; Petersen et al. 2000).

Die experimentelle Basis sind gemessene extrazelluläre Flüsse und ^{13}C -Markierungsdaten, die in einem Markierungsexperiment gewonnen werden. Durch die Kombination von Metabolit-Bilanzierungen und Markierungsmessungen können auch parallele Stoffwechselwege, bidirektionale Reaktionsschritte (d.h. eine Reaktion, die in Hin- und Rückrichtung zugleich abläuft), zyklische Reaktionen und Spalt-Reaktionen ohne Annahmen zur Kofaktor- oder Energiebilanz quantifiziert werden, die allein auf Basis von stöchiometrischen Bilanzierungen nicht zugänglich sind.

Zur Auswertung von Markierungsexperimenten und zur Verwendung der Daten zur ^{13}C -Stoffflussanalyse müssen folgende Annahmen getroffen werden (Wiechert 1996):

- i. Innerhalb eines für die Systembeschreibung gewählten Kompartments sind die Metaboliten homogen verteilt (*Homogenität*).
- ii. Das System befindet sich während der gesamten Dauer des Markierungsexperiments in einem metabolisch stationären Zustand (*Metabolische Stationarität*).
- iii. Alle Reaktionsschritte des betrachteten biochemischen Netzwerks und insbesondere die Positionswechsel von Kohlenstoffatomen sind bekannt (*Biochemische Systemkenntnis*).
- iv. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die Affinität sind bei jeder Enzymreaktion für markierte und unmarkierte Metabolite gleich (*kein Isotopen-Masseneffekt*).
- v. Die Probenvorbereitung und der Messvorgang beeinflussen nicht die beobachtete Größe (*Verzerrungsfreiheit der Messung*).

Die Annahmen werden für alle ^{13}C -Stoffflussanalysen zugrundegelegt. Auf Basis dieser Annahmen können die Markierungsexperimente mathematisch modelliert und die Stoffflüsse berechnet werden.

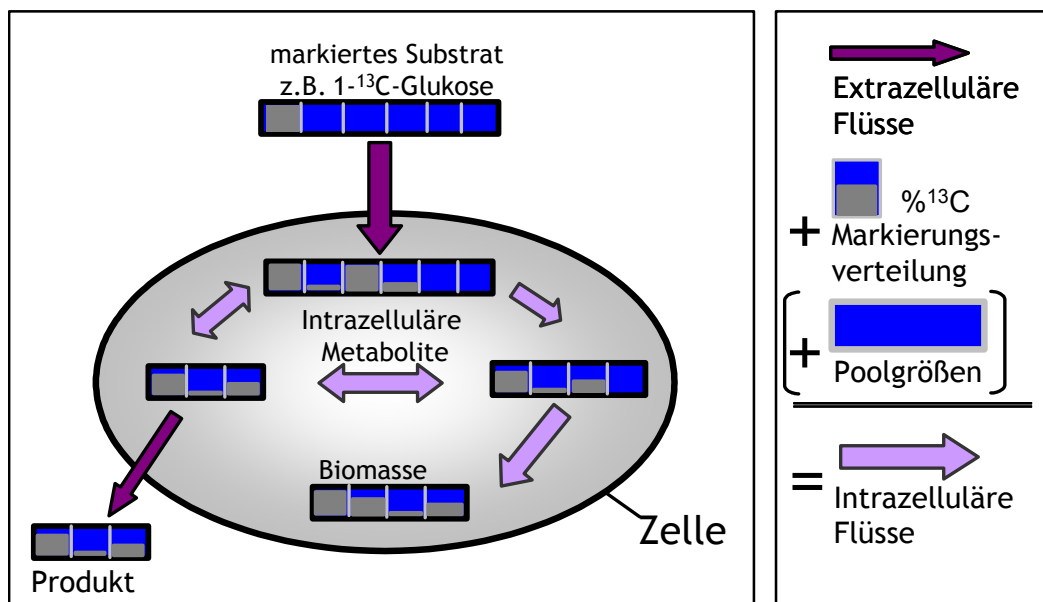
7.2 Markierungsexperiment und Markierungsanreicherung

In einem ^{13}C -Markierungsexperiment wird bei einer Kultivierung das natürlich markierte Substrat durch eine ^{13}C -markierte Variante des Substrats ersetzt. In der Natur kommen die ^{13}C -Isotope mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,1 % vor, so dass auch in der unmarkierten Biomasse ein geringer Anteil bereits markiert ist. Dies kann bei der Auswertung durch einen Korrekturfaktor berücksichtigt werden. Die Markierung verteilt sich über den gesamten Stoffwechsel und kann in den Intermediaten, im Produkt und/oder der Biomasse mit modernen Analysemethoden (NMR, MS) gemessen werden. Die wichtigsten heute eingesetzten Substrate sind 1- ^{13}C - und $^{13}\text{C}_6$ -Glukose, bei denen an C-Position 1 bzw. an allen Positionen das natürliche ^{12}C -Atom durch das Isotop ^{13}C ersetzt wurde. Die Preise für diese Substrate sind in den letzten Jahren erheblich gesunken und liegen je nach Menge zwischen 60-100 €/g. Daneben werden auch andere Substrate, wie z.B. ^{13}C -Acetat oder ^{13}C -Ethanol eingesetzt. Die Wahl des markierten Substrats hat einen großen Einfluss auf die Bestimmbarkeit der intrazellulären Flüsse.

Als Rohdaten für die Stoffflussanalyse werden im isotopisch stationären Fall nur die aus Konzentrationsmessungen bestimmten extrazellulären Flüsse und die gemessenen Markierungsanteile benötigt. Als extrazelluläre Flüsse werden dabei alle Flüsse bezeichnet, die das betrachtete Reaktionsnetzwerk verlassen. Dazu zählen im Fall des Zentralstoffwechsels auch die Abflüsse in die Biomasse.

Diese Abflüsse können bei bekannter Zusammensetzung der Biomasse über die Wachstumsrate bestimmt werden. Die Abflüsse aus der Zelle werden über die Messung der Produktkonzentration im Medium und im Abgas bestimmt. Im isotopisch instationären Fall müssen zusätzlich noch die intrazellulären Metabolitkonzentrationen bestimmt werden.

Abbildung 7.1: Prinzip der Durchführung von ^{13}C -Markierungsexperimenten und Daten, die aus diesen Experimenten gewonnen werden können und die für die ^{13}C -Stoffflussanalyse benötigt werden (extrazelluläre Flüsse, Markierungsverteilung, Poolgrößen). Der Begriff Pool beschreibt die Gesamtheit aller Moleküle einer bestimmten Stoffgruppe innerhalb eines räumlichen Abschnitts des metabolischen Systems.

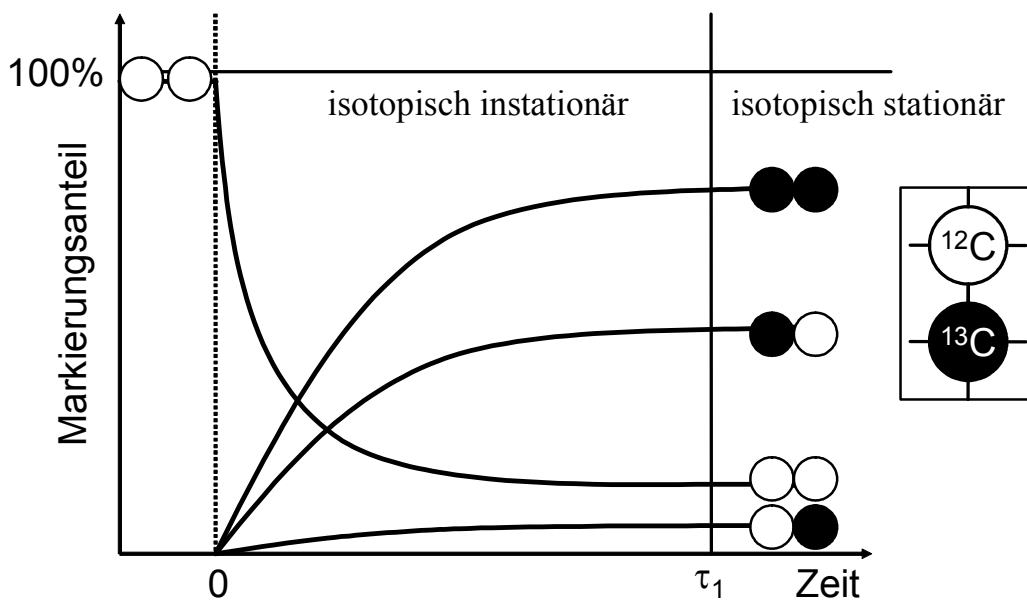


Die wesentliche Voraussetzung für die ^{13}C -Stoffflussanalyse ist die Gewährleistung eines metabolisch stationären Zustands für die Dauer des Markierungsexperiments, d.h. dass die intrazellulären Stoffflüsse und damit auch die intrazellulären Metabolitkonzentrationen zeitlich konstant sind. Im Gegensatz dazu ist die ^{13}C -Markierung der intrazellulären Metaboliten eine zeitabhängige Größe, die sich jedoch nach einiger Zeit asymptotisch einem isotopisch stationären Zustand annähert. In einem isotopisch stationären Zustand sind die Markierungsanteile zeitlich konstant, da pro Zeitabschnitt die gleiche Menge Markierung in eine C-Atom-Position zu- und abfließt (*Fließgleichgewicht*).

Den Verlauf der Markierungsanreicherung (siehe auch Kapitel 2) in den Metaboliten zeigt die folgende Abbildung 7.2. Bis zur Zugabe des markierten Substrats zum Zeitpunkt Null sind alle intrazellulären Metabolite und die gesamte Biomasse natürlich markiert. Nach der Zugabe beginnt die Bildung von markierten Intermediaten im Zentralstoffwechsel und die Einlagerung in die Biomasse.

Auf Grund der geringen Metabolitkonzentrationen und der hohen intrazellulären Flüsse wird in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels theoretisch innerhalb kurzer Zeit (wenige Sekunden bis Minuten) ein isotopisch stationärer Zustand erreicht. Die Bestandteile der Biomasse (Proteine, Zellwände, Lipide, DNA, RNA etc.) stellen die Endprodukte des Stoffwechsels dar. Hier findet – mit Ausnahme weniger Proteine – kein Austausch mit markierten Komponenten statt, so dass sich der Markierungszustand der vor dem Start des Markierungsexperiments im Reaktor vorliegenden Biomasse nur geringfügig ändert.

Abbildung 7.2: Zeitlicher Verlauf des ^{13}C -Markierungsanteils in den Metaboliten



In der *isotopisch instationären Phase* ($0 \leq t \leq \tau_1$) befindet sich die Markierung der Metaboliten noch im Übergangszustand zu einer zeitlich konstanten Markierungsverteilung und der Markierungszufluss in die Biomasse während dieser Phase ist dementsprechend ebenfalls nicht konstant.

In der *isotopisch stationären Phase* ($\tau_1 \leq t \leq \tau_1 + \Delta t$) verändern sich die Markierungsanteile der Metaboliten nicht mehr messbar, da pro Zeit die gleiche Menge Markierung in eine C-Atom-Position zu- und abfließt (Fließgleichgewicht). Der Markierungszufluss in jede Komponente der neu gebildeten Biomasse ist dementsprechend konstant.

7.3 Isotopisch stationäre ¹³C-Markierungsexperimente

Bei den meisten heute durchgeführten ¹³C-Stoffflussanalysen werden Daten aus isotopisch stationären Markierungsexperimenten verwendet. Die Analyse der isotopisch stationären Markierungsdaten erfolgt dabei meist in den proteinogenen Aminosäuren durch die Hydrolyse der Proteine. Dabei wird angenommen, dass die Intermediate des Zentralstoffwechsels direkt auf einem linearen Stoffwechselweg zu den Komponenten der Biomasse führen und Effekte wie Proteinabbau keine Rolle spielen, so dass eine Rückvermischung vernachlässigbar ist. Unter dieser Voraussetzung entsprechen die in der Biomasse gemessenen Markierungen denen in den Vorläufer-Metaboliten des Zentralstoffwechsels (*retrobiosynthetischer Ansatz*). Diese Methode hat den Vorteil, dass eine große Anzahl an Markierungsdaten sowohl mit NMR- als auch mit MS-Messmethoden gewonnen werden kann.

Bis zum Erreichen eines ausreichend hohen Markierungsanteils in der Biomasse sind Markierungszeiten von mehreren Stunden notwendig. Die Markierungsexperimente werden daher bevorzugt in einem Chemostaten durchgeführt, da nur in einer *kontinuierlichen Kultur* ein kontrollierter metabolisch stationärer Zustand über einen langen Zeitraum gewährleistet werden kann. In einem Chemostaten wird der Anteil der noch unmarkierten „alten“ und der in der isotopisch instationären Phase gebildeten Biomasse ausgewaschen, wodurch sich die Markierung der Biomasse asymptotisch einem isotopisch stationären Zustand annähert. Ein vollständiger Austausch der Biomasse wird theoretisch erst nach einer unendlich langen Markierungszeit erreicht. Aus Kostengründen werden die meisten Experimente jedoch nach drei bis vier Verweilzeiten abgebrochen und die Markierung in der Gesamtzellmasse gemessen. Durch die Vermischung mit „alter“ Biomasse kommt es zu einer Verzerrung der Messung, die durch einen geeigneten Korrekturfaktor (*Wash-out Correction*) ausgeglichen werden muss. Dabei wird vereinfacht angenommen, dass direkt nach Zugabe des markierten Substrats in den Intermediaten ein isotopisch stationärer Zustand erreicht wird.

Ein wesentlicher Nachteil des kontinuierlichen Reaktors ist die Schwierigkeit, die gewonnenen Daten auf Produktionsbedingungen – die meist Batch- und Fedbatch-Prozesse sind – zu übertragen. Daneben treten bei langen Markierungsexperimenten häufig Probleme mit der Stabilität des Systems auf, insbesondere bei rekombinanten Produktionsorganismen. Diese sind genetisch auf die Produktbildung optimiert sind und gegenüber ihren natürlichen Verwandten oder anderen Organismen biologisch im Nachteil. Durch natürliche Mutationen oder eine Kontamination werden – ohne entsprechende Gegenmaßnahmen – die Produktionsorganismen mit der Zeit durch besser angepasste Organismen aus dem Reaktor verdrängt. Die auf Grund der langen Markierungszeiten entstehenden hohen Kosten für das markierte Substrat beschränken zusätzlich den breiten Einsatz der Methode in der Praxis.

Auf Grund der oben genannten Nachteile muss das Ziel für die Anwendung der ^{13}C -Stoffflussanalyse bei industriellen Prozessen sein, Markierungsexperimente in **Batch- und Fedbatch-** Kulturen durchzuführen. Das Problem bei dieser Prozessführung ist, dass sich die äußeren Bedingungen ständig ändern und ein metabolisch stationärer Zustand für längere Zeit nur in exponentiell wachsenden Kulturen erreicht wird. Für bestimmte Phasen einer Fedbatch-Kultivierung kann man für wenige Stunden von einem annähernd metabolisch stationären Zustand ausgehen, wenn sich die äußeren Bedingungen nur langsam ändern (*quasi steady state*). Dies wurde in den Arbeiten von (Drysch et al. 2003; Wahl et al. 2004) ausgenutzt, um ^{13}C -Stoffflussanalysen im Laufe einer Fedbatch-Fermentation durchzuführen. Die Markierungsdauer betrug in diesen Experimenten etwa 2 bis 3 Stunden, wobei davon ausgegangen wurde, dass sich innerhalb kurzer Zeit (Sekunden bis Minuten) ein annähernd isotopisch stationärer Zustand einstellt. Die ^{13}C -Markierung wurde mittels NMR in den proteinogenen Aminosäuren oder einigen hochkonzentrierten extrazellulären Produkten gemessen (Kapitel 16.8).

Der Nachteil dieser Methode ist, dass bei nicht oder nur langsam wachsenden Kulturen in der Produktionsphase nur sehr wenige Markierungsinformationen aus den proteinogenen Aminosäuren vorliegen und diese – auf Grund der nach dieser Zeit geringen Markierungsmenge – mit großen Fehlern behaftet sind. Ein weiteres Problem ist, dass im Gegensatz zur kontinuierlichen Kultur die vor dem Start des Markierungsexperiments im Reaktor vorliegende und die während des Übergangs zum isotopisch stationären Zustands gebildete Biomasse nicht aus dem Reaktor ausgewaschen wird. Durch die Vermischung von natürlich markierter und nach Zugabe des markierten Substrats gebildeter Biomasse (bzw. Produkte) kommt es zu einer Verfälschung des Messsignals, was ohne entsprechende Korrektur zu fehlerhaft berechneten intrazellulären Flüssen führt.

Die genannten Probleme können voraussichtlich vermieden werden, wenn die Markierungsinformationen nicht in den proteinogenen Aminosäuren, sondern direkt in den intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels gemessen werden (Kapitel 15ff.). Auf Grund der im Vergleich zur Biomasse schnelleren Markierungsanreicherung in den Metabolitpools wird angenommen, dass ein isotopisch stationärer Zustand innerhalb weniger Minuten erreicht wird und die vor Zugabe des markierten Substrats gebildeten Metabolite aus dem Zentralstoffwechsel verdrängt werden. Für die Gewinnung der intrazellulären Metabolite aus dem Cytosol der Zellen und die Messung der Markierungsinformation sind spezielle Zellaufschluss- und Extraktionsmethoden und hochsensitive massenspektrometrischen Messmethoden notwendig (Buchholz et al. 2001; Luo et al. 2007; Oldiges 2005; van Winden 2002).

7.4 Isotopisch instationäre ^{13}C -Markierungsexperimente

Die Limitierungen der isotopisch stationären ^{13}C -Stoffflussanalyse können durch die Verwendung von isotopisch instationären Markierungsdaten vermieden werden (Nöh and Wiechert 2006). In der Literatur sind einige wenige Ansätze zur Nutzung von isotopisch instationären Markierungsdaten für die ^{13}C -Stoffflussanalyse beschrieben (Aboka et al. 2009; Heinzle et al. 2008; Maier et al. 2009; Schaub et al. 2008; Zhao et al. 2008). Bei diesen wird die Markierungsanreicherung in den intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels verfolgt. Auf Grund der schnellen Änderung des Markierungszustands (siehe 4.4) ist zur Verfolgung der Markierungsanreicherung in den Metabolitpools eine schnelle Probenahmetechnik erforderlich. Diese muss in der Lage sein, eine Probenahme in Zeitabständen von unter einer Sekunde und einen schnellen Stopp des Stoffwechsels zu gewährleisten (siehe Kapitel 18). Neben den zeitlich aufgelösten Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite werden zur Berechnung der intrazellulären Flüsse zusätzlich die Metabolitkonzentrationen benötigt. Die zur isotopisch instationären Stoffflussanalyse benötigten Daten können mittels hochsensitiver massenspektrometrischer Messmethoden gemessen werden (Luo et al. 2007).

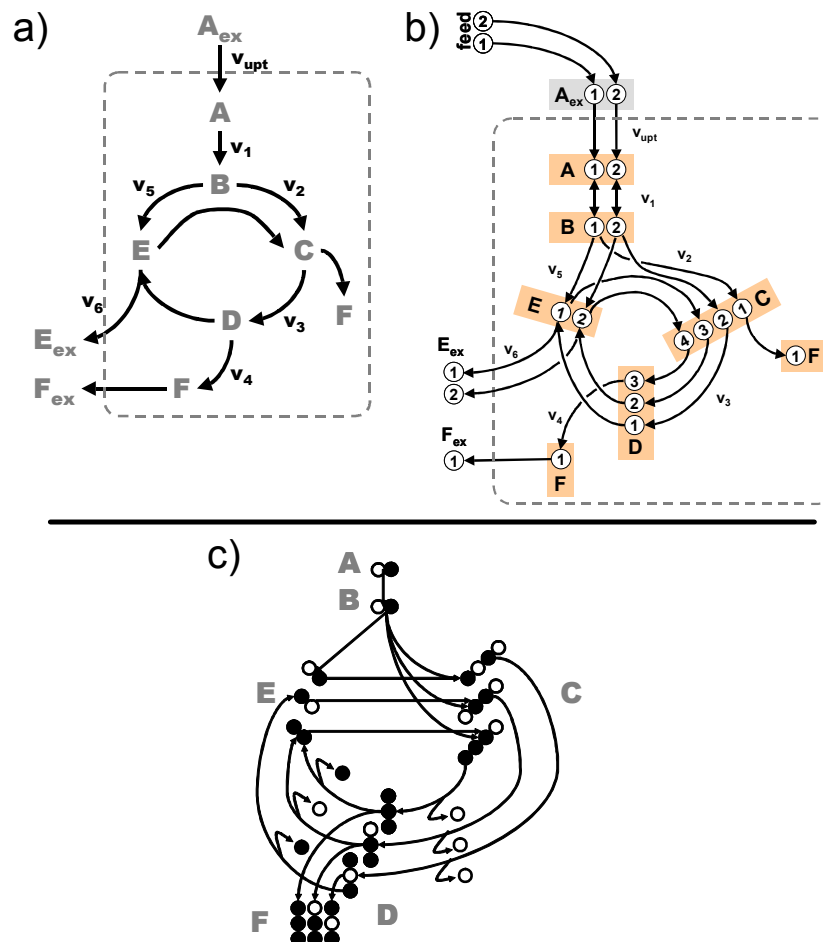
Die gewonnenen isotopisch instationären Markierungsdaten zusammen mit den Poolgrößen können für eine *isotopisch instationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse* verwendet werden (Nöh and Wiechert 2003). Für die Dauer des Markierungsexperiments muss jedoch weiterhin die metabolische Stationarität des Stoffwechsels gewährleistet werden. Die von Katharina (Nöh 2006) durchgeführten Simulationsstudien für den Zentralstoffwechsel von *E. coli* haben gezeigt, dass schon weniger als zehn Messpunkte ausreichen, um eine ^{13}C -Stoffflussanalyse mit guter statistischer Sicherheit durchzuführen. Dabei zeigte sich auch, dass in den Metabolitpools der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs nach wenigen Sekunden ein isotopisch stationärer Zustand erreicht wird. Für eine ^{13}C -Stoffflussanalyse auf Basis der isotopisch instationären Markierungsdaten sollten daher Markierungszeiten von wenigen Minuten ausreichend sein. Durch die verkürzten Markierungszeiten wird es möglich, Markierungsexperimente in nahezu jeder Phase eines Produktionsprozesses durchzuführen, da für diese kurze Zeit ein metabolisch stationärer Zustand fast immer gewährleistet werden kann. Ein Wachstum der Zellen – wie bei der Analyse der Markierung in den proteinogenen Aminosäuren – ist nicht notwendig.

Die isotopisch instationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse bietet zusätzlich den Vorteil, dass durch die wiederholte Probenahme im Vergleich zur isotopisch stationären Stoffflussanalyse wesentlich mehr Markierungsdaten vorliegen, wodurch die statistische Sicherheit der berechneten Stoffflüsse vermutlich signifikant erhöht werden kann.

7.5 Mathematische Modellierung

Das Kernstück der mathematischen Modellierung von Markierungssystemen stellen Bilanzgleichungen dar. Dabei wird zwischen den Metabolit- (Stöchiometrie) und den C-Atom- bzw. Isotopomeren- Bilanzen unterschieden. In den nachfolgenden Abschnitten wird eine kurze Einführung zur mathematischen Modellierung gegeben. Ausführliche Darstellungen hierzu finden sich in (Klapa and Stephanopoulos 2000; Nöh and Wiechert 2003; Wiechert 1996). Die Abbildung 7.3 zeigt beispielhaft verschiedene Netzwerke, welche die Grundlage für die Berechnung der intrazellulären Stoffflüsse bilden. Das metabolische Netzwerk (a) bildet die *biologische* Basis. Hier sind alle für die Stoffflussanalyse wesentlichen Metabolit-Pools und die Verknüpfungen (Flüsse) dargestellt. Das C-Atom-Transitions-Netzwerk (b) zeigt die für jede Reaktion zwischen den Metabolitpools auftretende Positionsänderung der Kohlenstoffatome (*biochemische* Basis). Im Isotopomeren-Netzwerk (c) sind die für jeden Metaboliten möglichen Markierungszustände dargestellt. Diese bilden die Basis für die Simulation der Stoffflüsse.

Abbildung 7.3: Beispieldarstellung von a) Metabolisches Netzwerk, b) C-Atom-Transitions-Netzwerk und c) Isotopomeren-Netzwerk. v_i bezeichnen die Flüsse, Großbuchstaben die Metabolit-Pools. Im Isotopomerenetzwerk sind nicht alle Möglichkeiten dargestellt, sondern nur die bei einem Input von A#01 tatsächlich entstehenden.



7.5.1 Definition der Zustandsvariablen

Als Zustandsvariablen zur Beschreibung von Markierungssystemen werden die Werte von Stoffflüssen und prozentuale Markierungsanteile von C-Atomen bzw. Isotopomeren verwendet. Für jede Reaktion werden zwei Variablen eingeführt, die den jeweiligen Fluss in Hin- (\rightarrow) und Rückrichtung (\leftarrow) bezeichnen. Die Hin- und Rückflüsse aller Reaktionsschritte werden im Hin- (v^{\rightarrow}) und Rückflussvektor (v^{\leftarrow}) zusammengefasst. Mit diesen Vektoren werden der Gesamtflussvektor (v) und der Netto-Flussvektor (v^{net}) definiert:

$$v = \begin{pmatrix} v^{\rightarrow} \\ v^{\leftarrow} \end{pmatrix} \quad \text{mit} \quad v \geq 0 \quad [v] = \frac{\text{mol}}{L \cdot h} \text{ bzw. } \frac{\text{mol}}{g_{BTM} \cdot h} \quad (7.1)$$

$$v^{net} = v^{\rightarrow} - v^{\leftarrow}$$

Zur Beschreibung und Quantifizierung des Austauschs zwischen zwei Pools wird ein **Austauschfluss** (v^{xch}) definiert. Die Größe des Austauschflusses kann wichtige Hinweise zu den physiologischen Vorgängen *in vivo* liefern (Wiechert 2007).

$$v^{xch}(v^{\rightarrow}, v^{\leftarrow}) = \min(v^{\rightarrow}, v^{\leftarrow}) \quad (7.2)$$

Durch die folgende Definition wird der Austauschfluss auf einen Wertebereich zwischen Null und Eins abgebildet. Diese wird bei den in dieser Arbeit durchgeführten Stoffflussanalysen zur Darstellung der Austauschflüsse verwendet.

$$v^{xch[0,1]}(v^{\rightarrow}, v^{\leftarrow}) = \frac{v^{xch}(v^{\rightarrow}, v^{\leftarrow})}{1 + v^{xch}(v^{\rightarrow}, v^{\leftarrow})} \quad (7.3)$$

Nach thermodynamischen Gesichtspunkten kann jede chemische Reaktion in beide Richtungen ablaufen. Auch wenn eine Richtung thermodynamisch stark bevorzugt ist findet ein stetiger Austausch zwischen Substrat- und Produkt-Pool statt. Grundsätzlich sind daher alle Flüsse im Modell als **bidirektional** zu betrachten. In vielen Fällen kann jedoch eine Flussrichtung vernachlässigt werden, z.B. wenn die nachfolgende Reaktion einen Rückfluss verhindert. Der Fluss wird dann als **unidirektional** betrachtet. Auch alle extrazellulären Flüsse, d.h. Flüsse, die in das Reaktionsnetzwerk ein- bzw. austreten werden grundsätzlich als unidirektional betrachtet.

Ein zweiter Satz von Variablen beschreibt die prozentualen Anteile markierten Materials in den einzelnen Metabolit-Pools. Bei der Verwendung von Isotopomeren sind das für jeden Metaboliten 2^{n_c} Variablen. Die Anteile aller Isotopomere für jeden Metaboliten im betrachteten Netzwerk werden sortiert im **Isotopomeren-Verteilungsvektor** x zusammengefasst.

Durch das gewählte Input-Substrat sind die Anteile der Input-Isotopomere bereits vorgegeben, die im **Isotopomeren-Input-Verteilungsvektor** x^{inp} zusammengefasst werden.

$$x \text{ und } x^{inp} \text{ mit } x_i \in [0,1] \text{ und } \sum x_i = 1 \quad (7.4)$$

7.5.2 Fluss- und Markierungsbilanzen

Im Fall eines metabolisch stationären Zustands stehen die in einen Pool ein- und austretenden Flüsse im Gleichgewicht, und es ergeben sich für die **Metabolit-Bilanzen** einfache lineare Gleichungen. Mit dem bekannten stöchiometrischen Vektor N und dem oben definierten Netto-Flussvektor v^{net} lassen sich diese folgendermaßen darstellen:

$$N \cdot v^{net} = N \cdot v^{\rightarrow} - N \cdot v^{\leftarrow} = 0 \quad (7.5)$$

In den meisten Fällen realer Netzwerke übersteigt die Anzahl der zu bestimmenden Flüsse (Variablen) die Anzahl der Gleichungen, so dass sich eine bestimmte Menge an Freiheitsgraden – sogenannte freie Flüsse (*free fluxes*) – ergeben. Die anderen Flüsse werden als abhängig (*constraint*) bezeichnet. In den seltenen Fällen einfacher Netzwerke können durch die Messung von extrazellulären Flüssen die Gleichungssysteme gelöst werden. Treten in einem Netzwerk parallele Stoffwechselwege, zyklische Reaktionswege, bidirektionale oder spaltnde Reaktionsschritte auf, ist eine Lösung ohne zusätzliche Annahmen nicht mehr möglich.

Die **Isotopomeren-Bilanzen** einzelner Metabolite liefern zusätzliche Informationen. Jeder Pool setzt sich aus den Isotopomeren $A\#ij$ zusammen. Für jeden intrazellulären Isotopomeren-Pool kann eine Bilanzgleichung aufgestellt werden, die die folgende allgemeine Form hat:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Änderung der Menge} \\ \text{des Isotopomers } A\#ij \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Isotopomere, die} \\ \text{in } A\#ij \text{ eintreten} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Isotopomere, die} \\ \text{A\#ij verlassen} \end{array} \right] \quad (7.6)$$

Die Bilanzierung eines realen metabolischen Netzwerks ergibt ein sehr großes Gleichungssystem (mehr als 500 Gleichungen allein für den Zentralstoffwechsel). Dieses lässt sich nicht mehr fehlerfrei von Hand aufstellen, daher werden sowohl die stöchiometrischen als auch die Isotopomeren-Bilanzen heute automatisch vom Rechner erstellt. Die Lösung dieser großen, teilweise nichtlinearen Systeme ist rechentechnisch sehr aufwändig. Erst durch die explizite Lösung solcher Systeme mit Hilfe von Matrizenoperationen ist es möglich geworden, eine Simulation mit vertretbarem Zeitaufwand durchzuführen. Ein Werkzeug für die Aufstellung und Lösung der Bilanzgleichungen ist das in dieser Arbeit verwendete 13CFLUX zur Lösung isotopisch stationärer ^{13}C -Stoffflussanalysen (Wiechert and de Graaf 1997).

7.5.3 Isotopisch instationärer Fall

Für die Modellierung eines isotopisch instationären Markierungsexperiments werden zusätzlich zu den Flüssen die absoluten Poolgrößen der beteiligten Metabolite benötigt. Für die Modellierung instationärer Markierungsexperimente (Nöh and Wiechert 2006; Wiechert and Nöh 2005) werden die Größen aller intrazellulären Pools im **Poolgrößenvektor** X zusammengefasst.

$$X = \begin{pmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \vdots \end{pmatrix} \quad \text{mit} \quad [X_i] = \frac{\text{mol}}{L} \text{ bzw. } \text{mol} \quad (7.7)$$

Da auf Grund des metabolisch stationären Zustands die Poolgröße X_i jedes Metaboliten konstant ist, ist die Änderung der Isotopomeren nur eine Funktion der Flüsse (v), des Isotopomeren-Verteilungsvektors des Input-Substrats (x^{inp}) und des Isotopomeren-Verteilungsvektors aller Metabolite (x) (Wiechert and Wurzel 2001).

$$\text{diag}(X) \cdot \dot{x} = f(v, x^{inp}, x) \quad (7.8)$$

In Wiechert und Wurzel (2001) konnte gezeigt werden, dass für alle praktisch relevanten Systeme $x(t)$ immer gegen den gleichen stationären Zustand des Systems tendiert, welcher durch $0 = f(v, x^{inp}, x)$ beschrieben werden kann. Dies bedeutet, dass der stationäre Zustand ein Sonderfall des isotopisch instationären Zustands für $t \rightarrow \infty$ ist.

Für die Lösung der Gleichungssysteme im isotopisch instationären Fall wurde ebenfalls an der Universität Siegen (Nöh 2006) ein Werkzeug (13CFLUX/INST) entwickelt, welches in dieser Arbeit verwendet wurde.

7.5.4 Sensitivitätsanalyse

Die Sensitivitätsanalyse untersucht, wie sich das Modell bei Variation der Eingangsparameter verändert. Sie bildet die Basis für die statistischen Untersuchungen und die Anpassung der Parameter. Bei der isotopisch instationären Stoffflussanalysen ist zu beachten, dass auch die Sensitivitäten zeitabhängig sind (Nöh and Wiechert 2006; Wiechert and Nöh 2005). Die Abhängigkeit des Modells von v_i als Element des Input-Parameter-Vektors $v = (v, X, x^{inp})^T$ wird durch folgende Gleichung beschrieben (Deuffhard und Bornemann 2002):

$$\frac{\partial \text{diag}(X)}{\partial v_i} \cdot \dot{x} + \text{diag}(X) \cdot \frac{\partial \dot{x}}{\partial v_i} = \frac{\partial f}{\partial x} \cdot \frac{\partial x}{\partial v_i} + \frac{\partial f}{\partial v_i}, \quad i = 1, \dots, \dim(v_i) \quad (7.10)$$

7.5.5 Messmodell

Die intrazellulären Stoffflüsse werden auf Basis der gemessenen Markierungsmuster berechnet. Das Messmodell beschreibt den Zusammenhang zwischen der Isotopomerenverteilung und den mit einer bestimmten Messkonfiguration bestimmten Messwerten. Es wird angenommen, dass alle Messfehler unabhängig und normalverteilt sind mit dem Standard-Verteilungsvektor σ . In (Möllney et al. 1999) ist ein sehr allgemeines skaliertes Messmodell beschrieben, welches alle bzgl. der Isotopomerenverteilung x linearen Messvorgänge abbilden kann:

$$y_i = \omega_i \cdot M_y \cdot x + \varepsilon_{y,i} \quad , \quad \text{cov}(\varepsilon_{y,i}) = \sum_{y,i} \quad (7.11)$$

Hierbei ist:

- x Isotopomeren-Verteilungsvektor
- y Messvektor y mit m Messwerten $y = (y_1, \dots, y_m)^T$
- ω_i Skalierungsfaktor des i -ten Elements, der die Abhängigkeit des Messsignals von den Messbedingungen (z.B. Gerätetyp, Messdauer, Probenumfang) beschreibt.
- M_y Messmatrix, die bis auf den Skalierungsfaktor den linearen Zusammenhang zwischen den einzelnen Isotopomerenanteilen und dem Messvektor y abbildet.
- ε_y Messfehlervektor, der multivariat normalverteilt mit dem Erwartungswert $E(\varepsilon_{y,i}) = 0$ und der bekannten Kovarianzmatrix Σ_y angenommen wird.

7.6 Parameteranpassung

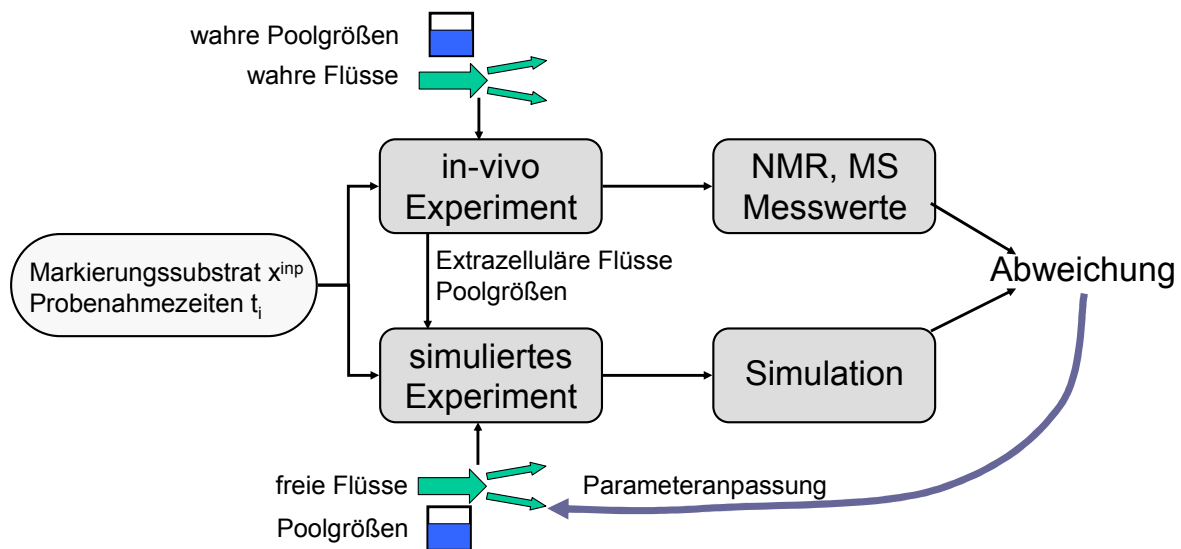
Im Gegensatz zur Simulation, wo mit bekannten Stoffflüssen (und Poolgrößen) die Markierungsmuster in den Metaboliten berechnet werden, geht man bei der Berechnung bzw. Schätzung der Stoffflüsse den umgekehrten Weg: die Suche nach den intrazellulären Stoffflüssen (und Poolgrößen), die die gemessenen Markierungsdaten bestmöglich reproduzieren. Zur Anpassung (*Fit*) der Parameter (v , X , ω) verwendet man numerische Optimierungsalgorithmen und es wird folgender Ablauf verfolgt:

1. Für die Flüsse (v) werden „realistische“ Annahmen getroffen oder diese werden soweit möglich gemessen.
2. Die Werte der linear unabhängigen Flüsse des Gleichungssystems – die sogenannten freien Flüsse – bilden mit der bekannten Zusammensetzung des Input-Substrats x^{inp} und im isotopisch instationären Fall zusätzlich den gemessenen Poolgrößen (X) und den Probenahmezeitpunkten die Eingangswerte für die Simulation.
3. Aus der Simulation ergibt sich eine Isotopomeren-, Fluss- und Poolgrößen-Verteilung des betrachteten Netzwerks.

4. Die daraus resultierenden Messwert-Vorhersagen werden mit den vorliegenden Messungen verglichen und die Abweichungen, gewichtet mit der jeweiligen Standardabweichung der Messung, in der Fehlerquadratsumme (*Residuum*) zusammengefasst.
5. Basierend auf der berechneten Abweichung wird eine systematische Variation der Eingangsparameter vorgenommen unter Verwendung von Optimierungsalgorithmen.
6. Die Parameter werden dann in einer iterativen Prozedur angepasst, in der die Schritte 1-5 wiederholt durchlaufen werden.

Für die hier verwendeten gradientenbasierten Optimierungsverfahren ist es notwendig, die Sensitivität der Isotopomer-Verteilung bezüglich der Parameter (Flüsse und Poolgrößen) zu kennen. Diese lassen sich sowohl numerisch als auch analytisch berechnen, wobei die analytische Lösung wesentlich zeitsparender ist (Wiechert 2001). Die Sensitivitäten werden auch für die anschließende statistische Analyse der Daten benötigt. In der folgenden Abbildung ist der Ablauf der Anpassung der intrazellulären Stoffflüsse und Poolgrößen zur Reproduktion der Messdaten dargestellt.

Abbildung 7.4: Prinzip der ^{13}C -Stoffflussanalyse. Die aus einem ^{13}C -Markierungsexperiment experimentell gewonnenen Daten sind ein Abbild der (wahren) intrazellulären Stoffflüsse einer Zelle. Mit einem Modell werden die Markierungsdaten simuliert. Durch Anpassung der Parameter (die metabolischen Flüsse) des Modells wird eine bestmögliche Anpassung angestrebt.



7.7 Statistische Auswertung

Nach der Schätzung der Parameter ist eine detaillierte statistische Analyse der Daten extrem wichtig, da die eingehenden Messungen fehlerbehaftet und die scheinbar gut angepassten Flüsse und Poolgrößen statistisch nicht haltbar sind. Von (Möllney et al. 1999) wurden folgende statistische Techniken etabliert.

1. Die Sensitivitäten der gemessenen Werte in Bezug auf die geschätzten Flüsse und Poolgrößen werden in der **Output-Sensitivitäts-Matrix** gesammelt. Diese gibt an, welche Parameter die größten Einflüsse auf die Messungen haben.
2. Aus der Output-Sensitivitäts-Matrix kann die **Kovarianz-Matrix** der Flüsse berechnet werden. Mit dieser kann ein Konfidenzintervall für jeden Fluss und Poolgröße erstellt werden.
3. Die **Parameter-Sensitivitäts-Matrix**, die ebenfalls aus der Output-Sensitivitäts-Matrix berechnet wird, beschreibt den Einfluss einer Änderung der Messung auf die Parameter. Damit können die Messungen mit dem größten Einfluss identifiziert werden.
4. Durch einen χ^2 -Test der sich aus der Anpassung ergebenden minimalen Fehler-Quadrat-Summe kann die Güte der Anpassung bewertet werden und mögliche große Messfehler entdeckt und dann aus dem Datensatz entfernt werden.

7.8 Experimentelles Design

Vor dem Experiment muss die Frage beantwortet werden, ob mit den verfügbaren Informationen aus dem Markierungsexperiment eine Analyse der interessierenden Stoffflüsse überhaupt möglich ist. Daraus ergeben sich dann Art und der Umfang der Messungen zur Analyse der Isotopomeren-Verteilung. Prinzipiell sollten so viele Parameter wie möglich gemessen und eine Kombination aus verschiedenen Messmethoden verwendet werden. Diese teilweise redundanten Daten können dann für eine Überprüfung und statistische Analyse der gefundenen Flüsse verwendet werden.

Basierend auf den statistischen Informationen kann ein experimentelles Design durchgeführt werden mit dem Ziel, ein optimales Input-Substrat zu finden mit welchem die Flüsse am besten bestimmt werden können. Bei den isotopisch instationären Markierungsexperimenten sind auch die Probenahmezeitpunkte während des Markierungsexperiments Designkriterien, da die Sensitivitäten zeitabhängig sind. Beim experimentellen Design wird für einen auf realistischen Annahmen beruhenden Parametersatz (Flüsse und Poolgrößen) das D-Optimalitäts-Kriterium durch Variation der Substratmischung optimiert. Dabei ist es möglich, bestimmte Flüsse stärker gegenüber anderen zu gewichten. Der Suchraum wird durch experimentelle Gegebenheiten eingeschränkt, z.B. durch Verfügbarkeit und Preis des Markierungssubstrats oder biologische Beschränkungen.

7.9 Generelles Vorgehen bei der SFA

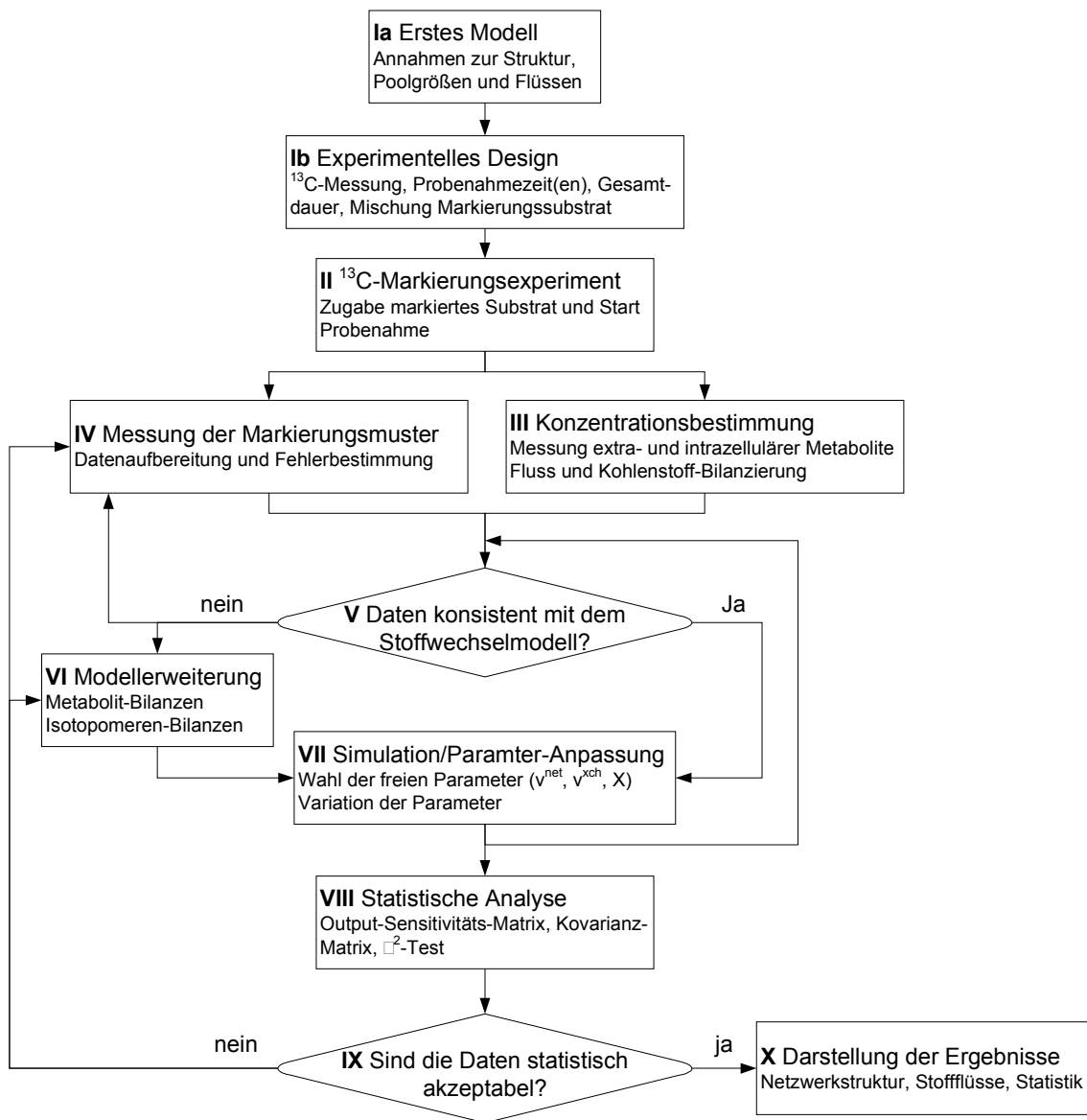
In diesem Kapitel wird die generelle Vorgehensweise bei der Durchführung von ^{13}C -Stoffflussanalysen beschrieben, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Abbildung auf der folgenden Seite verdeutlicht die einzelnen Schritte.

Im **Schritt Ia** erfolgt die Erstellung eines ersten Modells mit entsprechenden Annahmen zur Struktur, den Flüssen und Poolgrößen. Im **Schritt Ib** wird vor den Markierungsexperimenten ein experimentelles Design durchgeführt. Auf der Basis von gemessenen intra- und extrazellulären Metabolitkonzentrationen bzw. Literaturdaten wird festgelegt in welchen Metaboliten die ^{13}C -Markierung mit der LC-MS/MS voraussichtlich gemessen werden kann. Mit gemessenen extrazellulären Flüssen und realistischen Annahmen für die unbekanntes intrazellulären Flüsse (und Poolgrößen für die isotopisch instationäre SFA) wird mit einem ersten Netzwerkmodell eine optimale Markierungssubstrat-Mischung berechnet. Anhand dieser Daten wird auch die Dauer der Markierungsexperimente abgeschätzt. Für die isotopisch instationären Markierungsexperimente werden zusätzlich optimale Probenahmezeitpunkte berechnet.

Im **Schritt II** wird das Markierungsexperiment durchgeführt, indem zu einem bestimmten Zeitpunkt der Fermentation das markierte Substrat zugegeben und mit dem markierten Substrat weiter fermentiert wird. In den während der Fermentation genommenen Proben werden im **Schritt III** die extrazellulären und intrazellulären Metabolitkonzentrationen bestimmt und die extrazellulären Stoffflüsse bilanziert. Eine C-Bilanz stellt sicher, dass keine extrazellulären Stoffflüsse übersehen wurden.

Im **Schritt IV** werden in den Proben aus dem Markierungsexperiment die Markierungsmuster gemessen, die Messfehler bestimmt und die Daten für die mathematische Modellierung vorbereitet. Im **Schritt V** wird überprüft ob die Markierungsdaten mit dem Stoffwechselmodell und den angenommenen Biosynthesewegen konsistent sind, d.h. ob die Messwerte von Metaboliten und Aminosäuren, die aus gleichen Vorläufern entstehen, vergleichbar sind. Dieser Vergleich gibt Auskunft über die Güte der Messung und das Netzwerkmodell.

Mit den Messdaten aus dem Markierungsexperiment wird in **Schritt VI** das fertige Netzwerkmodell für die Stoffflussanalyse aufgestellt und im **Schritt VII** auf Basis der Messdaten die unbekanntes Parameter (Stoffflüsse und Poolgrößen) angepasst. Um möglichst ein globales Minimum im Flussraum zu finden wird zunächst ein evolutionäres Optimierungsverfahren verwendet. Diese Flusssschätzung wird dann mit einem lokalen Optimierungsverfahren verfeinert.

Abbildung 7.5: Vorgehensweise bei der Durchführung von ^{13}C -Stoffflussanalysen

Anschließend wird im **Schritt VIII** eine statistische Analyse der angepassten Parameter durchgeführt. Hierbei wird die Güte der Anpassung über die Fehlerquadratsumme überprüft. Die Messungen mit dem größten Beitrag zur Fehlerquadratsumme werden identifiziert und die Standardabweichungen für die Parameter berechnet. Im **Schritt IX** wird überprüft, ob die Anpassung an die Messdaten und die berechneten Stoffflüsse nach statistischen Gesichtspunkten akzeptabel sind. Ist dies nicht der Fall muss das Modell verändert oder erweitert werden bzw. eine vermutlich fehlerhafte Messung aus dem Markierungsdatensatz entfernt werden. Im letzten **Schritt X** werden die Netzwerkstruktur und die Parameter aus der Anpassung mit der berechneten Standardabweichung dargestellt.

8 Flux-Balance-Analyse

Bei der *Flux-Balance-Analyse (FBA)* wird der stationäre Zustand eines metabolischen Netzwerks ermittelt, der sich unter bestimmten physiologischen Voraussetzungen ergibt. Die Basis bildet das stöchiometrische Netzwerk der Metabolite (Massenbilanz). Zusätzlich wird häufig die Energie, ausgedrückt als ATP/ADP, und die Reduktionsäquivalente (NADH, NADPH) bilanziert. Auch die Kombination mit thermodynamischen Daten ist möglich (Beard et al. 2004; Kummel et al. 2006b). Kinetische Parameter oder die Enzymregulation spielen hier keine Rolle (Schilling et al. 1999b).

Da das stöchiometrische Netzwerk meist unterbestimmt ist, hat das Gleichungssystem mehrere mögliche Lösungen. Durch zusätzliche Nebenbedingungen, die sich auf Basis von experimentellen Daten oder biochemischen Beschränkungen ergeben – z.B. Substrataufnahmerate, Unidirektionalität der Flüsse, $ATP + ADP = \text{konst.}$ – wird die Anzahl an Freiheitsgraden reduziert. Durch die Optimierung einer Zielfunktion unter den gegebenen Randbedingungen können auch bei unterbestimmten Systemen physiologisch bedeutsame Lösung erhalten werden (Kauffman et al. 2003).

Im Gegensatz zur Stoffflussanalyse zielt die FBA nicht auf die Ermittlung der intrazellulären Flüsse, sondern will im wesentlichen Antworten auf die folgenden Fragen geben (Edwards et al. 2001; Mahadevan and Schilling 2003; Schuster et al. 1999):

1. Welche maximale Ausbeute oder welche maximale Produktionsrate kann für ein Produkt erreicht werden?
2. Welche Stoffflusslagen ergeben sich unter bestimmten Voraussetzungen in einem metabolischen Netzwerk?
3. Gibt es Reaktionsschritte im Netzwerk, die einen wesentlichen Einfluss auf die Größe anderer Flüsse ausüben?

Insbesondere die ersten beiden Fragestellungen sind für die Stammoptimierung wichtig und spielen auch in dieser Arbeit eine Rolle (Kapitel 16.6). Weiterführende Informationen zum Einsatz der FBA und den mathematischen Hintergründen finden sich u.a. in (Klamt and Stelling 2003; Schilling et al. 1999a).

TEIL II

Materialien & Methoden

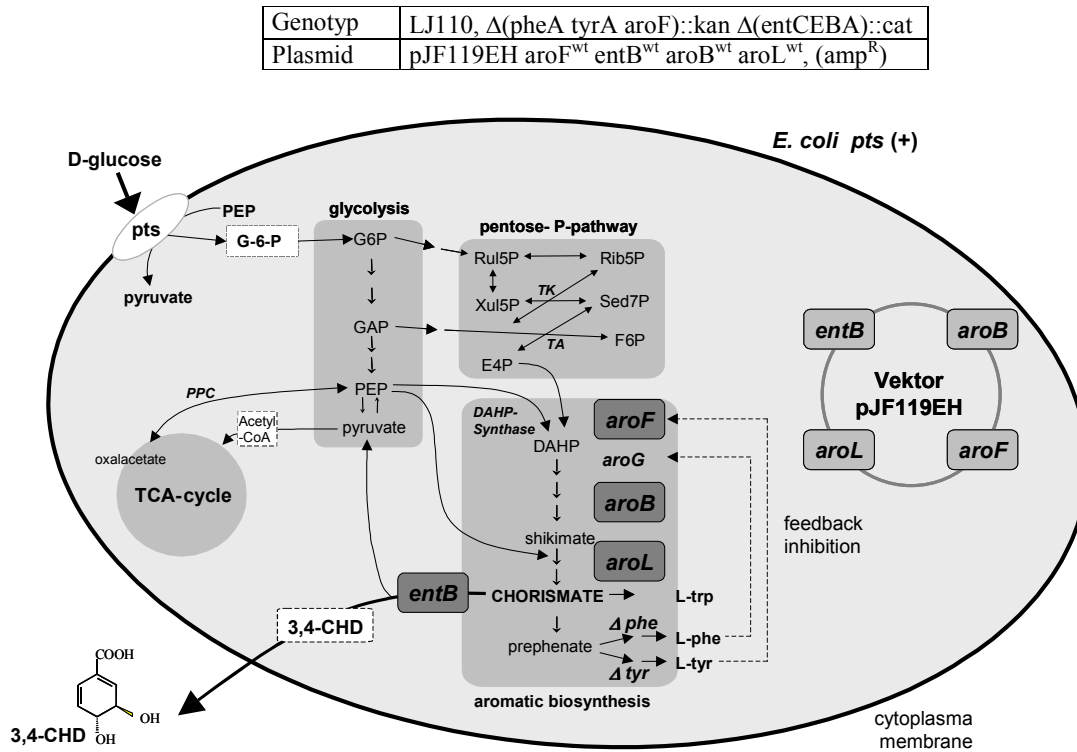
In diesem Abschnitt werden die verwendeten Materialien und Methoden kurz vorgestellt. Zum Teil finden sich Hinweise zu anderen Arbeiten in denen diese näher erläutert sind. In Kapitel 9 ist der in dieser Arbeit untersuchte 3,4-CHD Produzent *E. coli* F82pC22 charakterisiert und die Stammhaltung beschrieben. Die Kultivierungen im Sensorreaktor des *E. coli* Wildtyps und des Stamms F82pC22 zur Durchführung der Markierungsexperimente sind in Kapitel 10 und 11 dargestellt. Im Kapitel 12 sind die in dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden zur Messung der intra- und extrazellulären Konzentrationen und der Markierungsmuster der Metabolite beschrieben. Die auf Basis dieser Messergebnisse durchgeführten ¹³C-Stoffflussanalysen und die verwendeten metabolischen Netzwerke sind in Kapitel 13 dargestellt. Im Kapitel 14 ist die Methode der *Flux-Balance-Analyse* zur Berechnung der optimalen Ausbeute des Produkts 3,4-CHD dargelegt.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen kamen zwei *E. coli*-Stämme zum Einsatz. Die grundlegenden Untersuchungen zur isotopisch stationären und instationären ^{13}C -Stoffflussanalyse basierend auf LC-MS/MS-Markierungsdaten wurden mit dem Wildtyp-Stamm K12 durchgeführt. Die Parallelkultivierungen zur Untersuchung der Produktion der chiralen Transdiolverbindung 3,4-CHD erfolgten mit dem rekombinanten *E. coli* F82pC22. Dieser Stamm wird im folgenden Kapitel kurz erläutert.

9.1 Charakterisierung von *E. coli* F82pC22

Der Stamm F82pC22 wurde ausgehend von *E. coli* K12 W3110 (Zeppenfeld et al. 2000) durch gezielte chromosomale Deletion einzelner Gene erzeugt. Zur Verhinderung des Abflusses in Richtung der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) wurden die kodierenden Gene *pheA* und *tyrA* deletiert. Der Stamm ist dadurch auxotroph für diese beiden Aminosäuren. Damit ist es möglich über gezielte Zugabe von L-Phe und L-Tyr das Wachstum zu steuern. Zusätzlich wurde das Gen *aroF^{wt}* deletiert, welches für die DAHP-Synthase kodiert. Die Gene des Aromatenbiosynthesewegs (*aroF^{wt}*, *aroB^{wt}* und *aroL^{wt}*) und das für die Biosynthese des Produkts wichtige Gen *entB^{wt}* (kodierend für die Isochorismat-Lyase) sind als zusätzliche Kopie auf einem Plasmid enthalten, welches auf dem Expressionsvektor pJF119EH basiert. Das Plasmid enthält einen Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren, glukoseresistenten, synthetischen *tac*-Promoter und trägt eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker. Die Klonierungsarbeiten erfolgten in Zusammenarbeit des Instituts für Biotechnologie 1 (IBT-1) und der DSM Biotech GmbH. In der folgenden Abbildung sind die wesentlichen Biosynthesewege des Stamms zur Produktion von 3,4-CHD dargestellt.

Abbildung 9.1: Vereinfachte Darstellung des metabolischen Netzwerks von *E. coli* F82pC22 mit dem Expressionsvektor pJF119EH, auf dem die Gene der Biosynthese von 3,4-CHD enthalten sind (Bujnicki 2007).



9.2 Stammhaltung

Die verwendeten Stämme wurden zur Aufbewahrung als Glycerolkultur bei -80°C eingefroren. Zur Herstellung dieser Kryokulturen wurde von einer Luria-Bertani (LB)-Agar-Platte in einen 1 l-Schüttelkolben mit 100 ml LB-Medium (zu den Medien siehe Anhang A.2) überimpft und im Schüttelkolbeninkubator bei 37°C und 150 U/min bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von ungefähr 3-4 kultiviert. Nach mikroskopischer Kontrolle auf Kontamination wurden 100 ml Glycerol zugesetzt und in Kryokulturröhrchen zu je 1,8 ml aliquotiert.

9.3 Vorkultur

Zur 10%-igen Inokulation des Bioreaktors mit einer stoffwechselaktiven Kultur wurde aus den Glycerolkryokulturen der Stammhaltung eine Vorkultur angesetzt. Hierzu wurden je nach benötigter Menge einer bis mehrere 0,5 oder 1 Liter-Schüttelkolben mit 70-200 ml Vorkulturmedium befüllt und autoklaviert. Die Spurenelemente und die Glukoselösung wurden erst nach dem Autoklavieren steril über einen Spritzenfilter zugegeben. Die Kolben wurden mit wenigen Mikrolitern der Kryokultur angeimpft, so dass über Nacht (12-14 h) eine Kultur mit einer OD_{600} von etwa 4 gewachsen war. Die Kultivierung erfolgte in einem Schüttelkolbeninkubator bei 37°C mit 150 U/min.

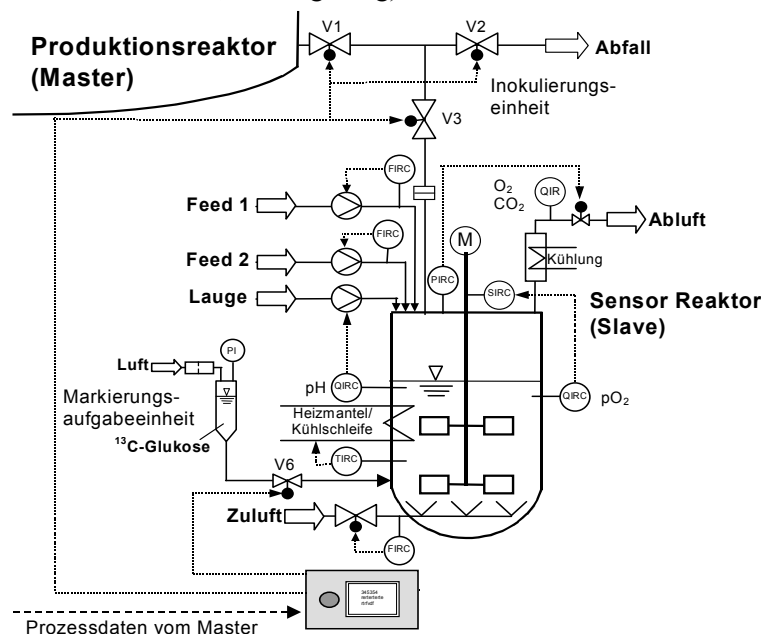
10 Kultivierungen im Sensorreaktor

Der Prototyp des Sensorreaktors wurde von (El Massaoudi 2004; El Massaoudi et al. 2003) entwickelt und besteht aus dem Bioreaktor, einer Inokulierungseinheit und einer Einheit zur Aufgabe des markierten Substrats (s. Abbildung 10.1). Im sogenannten Master-Slave-Betrieb kann der Reaktor parallel zu einem Produktionsreaktor betrieben werden. Eine detaillierte Aufstellung der Komponenten findet sich im Anhang A.1.

10.1 Ausstattung des Bioreaktors

Zur Durchführung der ^{13}C -Markierungsexperimente wurde ein 2 Liter-Bioreaktor aus Edelstahl mit einem Arbeitsvolumen von 0,3 – 1,2 Liter verwendet. Dieser ist zur Verbesserung des Sauerstoffeintrags mit Strombrechern ausgestattet. Die Zufuhr von steriler Luft in den Reaktor erfolgt über einen Begasungsring. Zur Vermischung der Phasen ist eine magnetgekoppelte Rührwelle mit zwei Scheibenrührern installiert, welche über einen Elektromotor angetrieben wird. Im Deckel, der mittels Spannring am Behälter befestigt ist und leicht entfernt werden kann, befinden sich mehrere Anschlüsse. An diese können über Sterilkupplungen Schläuche zur Zufütterung, Probenahme und Inokulierung angeschlossen werden. Zusätzlich befinden sich im Deckel Vorrichtungen für verschiedene Messsonden zur Prozesskontrolle (Druck, Temperatur, pH- und pO_2 -Wert).

Abbildung 10.1: Reaktorsystem (Slave) mit den für die Parallelkultivierung und die isotopisch instationären Markierungsexperimente notwendigen Einrichtungen und Regelgrößen. Die Messstellen sind wie in der Verfahrenstechnik üblich bezeichnet (T=Temperatur, P= Druck, F= Durchfluss, S= Drehzahl, Q=Konzentration (pO_2 , pH, O_2 , CO_2), I= Anzeige, R= Meßwertaufnahme, C= Regelung)



Zur Regelung der Temperatur verfügt der Reaktor über einen äußeren Heizmantel und eine mit Kühlwasser durchflossene Rohrschlaufe im Inneren des Reaktors. Die Regelung des Drucks im Reaktor erfolgt über die Öffnungsweite eines Proportionalventils, welches im Gasauslass installiert ist. Um die Verdunstung gering zu halten, wird der Abgasstrom beim Verlassen des Reaktors gekühlt. Nach einer weiteren Trocknung werden mit einem Analysegerät der O₂-Anteil (paramagnetisch) und der CO₂-Anteil (Nah-Infrarot-Messung) im Abgasstrom erfasst.

10.1.1 Inokulierungseinheit

Zum Animpfen des Sensorreaktors aus einem Produktionsreaktor kann dieser über eine Inokulierungseinheit mit dem Produktionsreaktor verbunden werden. Die Inokulierungseinheit ist über einen 25 mm Anschluss (Ingold) an den Produktionsreaktor angeschlossen und über eine Schnellkupplung mit dem Sensor-Reaktor verbunden. Mit der Inokulierungseinheit kann ein Liter innerhalb von etwa 3 Sekunden vom Produktionsreaktor in den Sensorreaktor übertragen werden, so dass bei den untersuchten Organismen die Gefahr einer Sauerstofflimitation ausgeschlossen werden kann (El Massaoudi 2004). Die Einheit besteht im Wesentlichen aus einem Edelstahlrohr und drei pneumatischen Membranventilen. Die inokulierte Menge kann über die Öffnungszeit der Ventile bestimmt werden. Zusätzlich sind Anschlüsse für Druckluft und Dampf zur Reinigung und Sterilisation vorhanden. Zur Sterilisation wird die Einheit für 30 Minuten mit Dampf von 121°C gespült.

10.1.2 Substrataufgabeeinheit

Die Substrataufgabeeinheit besteht aus einem Edelstahlbehälter mit 65 ml Volumen und einem Magnetventil (Bürkert GmbH & Co. KG, D). Der Behälter kann mit steriler Druckluft (4 bar) überlagert werden. Diese Einheit ist mit dem Bioreaktor über eine Schnellkupplung verbunden, welche in Höhe der Rührer an der Behälterwand angebracht ist. Beim Öffnen des Ventils wird das vorgelegte Substrat in 0,5 bis 1 Sekunde in den Reaktor gegeben und dort mit dem Medium vermischt. Nach Messungen von El Massaoudi (2004) beträgt die Mischzeit (ϕ_{90}) für 20 ml Volumen mit 250 g/l Glukose 720 ms bei einem Reaktorvolumen von 1 Liter und einer Drehzahl von 500 U/min. Zur Sterilisation wird der Behälter zusammen mit dem Reaktor autoklaviert und das Ventil für etwa eine Stunde zunächst mit NaOH (5 M) und anschließend mit sterilem Wasser bis zu einem neutralen pH-Wert gespült.

10.2 Regelung des Kultivierungsprozesses

Die Regelung des Systems und die Prozessdatenerfassung erfolgte über eine kommerziell erhältliche Labfors-Steuereinheit (Firma Infors) und einen Windows-Rechner mit einem LabView™ Tool zur Datenerfassung und Steuerung des Master-Slave-Betriebs. Mit einem zweiten Windows-Rechner wurden die Ventile der Inokulationseinheit und der Pulsaufgabereinheit ebenfalls über ein LabView™ Tool gesteuert. Für die isotopisch instationären Experimente wurde dieser Aufbau durch eine in dieser Arbeit entwickelte Steuer- und Regelungseinheit ersetzt (siehe Kapitel 20 und Anhang A1.1).

10.3 Vorbereitung der Kultivierung

Vor jeder Fermentation wurde die pH-Elektrode mit zwei Pufferlösungen (pH = 7,0 und pH = 4,0) kalibriert und zusammen mit den anderen Messsonden in den Reaktor eingebaut. Die Salze des verwendeten Minimalmediums (siehe Anhang A.2) wurden in H₂O gelöst und die Lösung in den Reaktor gegeben. Vor dem Autoklavieren wurde der Reaktor mit Druckluft auf seine Dichtigkeit geprüft und alle Anschlüsse mit Alufolie abgedeckt. Anschließend wurde der Reaktor zusammen mit der in einer Schottflasche angesetzten Glukoselösung in den Autoklaven gegeben und für 30 Minuten bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die übrigen Medienbestandteile mit einer Spritze mit Spritzenfilter (0,2 µm) über ein Septum zugegeben. Die Glukoselösung wurde über eine Schnellkupplung angeschlossen und Glukose in den Reaktor gegeben, so dass sich die gewünschte Startkonzentration von 6 g/l einstellte. Der pH-Wert im Reaktor wurde durch die manuelle Zugabe einer Base eingestellt. Der Reaktor wurde auf eine Temperatur von 37°C geregelt und anschließend die pO₂-Elektrode zuerst mit Stickstoffgas (N₂) und dann mit Luft auf 0 % und 100 % kalibriert. Der Nullwert wurde im drucklosen Reaktor ermittelt, der Maximalwert bei einem Volumenstrom von 5 vvm und 0,9 bar Überdruck. Die Rührerdrehzahl betrug in beiden Fällen 800 U/min. Gleichzeitig konnte die Abgasanalytik kalibriert werden, der Nullwert (0 %) von O₂ und CO₂ mit Stickstoff und der Maximalwert von O₂ (20,9 %) mit Luft. Der maximale CO₂-Wert (5 %) wurde mit einem Kalibrier gas eingestellt.

10.4 Durchführung der Kultivierungen

Vor Beginn der Fermentation wurden die Sollwerte der Regelparameter eingestellt ($p=0$ bar; $T=37^{\circ}\text{C}$; $F_g=1$ l/min; $\text{pH}=7,0$; pO_2 30 %), anschließend die Vorkultur über einen Schlauch mit Schnellkupplung in den Reaktor gegeben und die Datenaufzeichnung gestartet. Die Drehzahl wurde über den Regler automatisch erhöht, um den steigenden Sauerstoffbedarf der Kultur zu decken. Bei einer Drehzahl von etwa 950 U/min wurden manuell zunächst der Druck im Reaktor und später auch die Luftzufuhr erhöht. Nachdem die im Reaktor vorgelegte Glukose auf eine Konzentration von etwa 1 g/l abgesunken war, wurde die Glukosezufuhr gestartet. Die Dosierung der Glukose erfolgte entweder über eine Schlauchpumpe, für die zuvor eine Kalibriergerade erstellt wurde, oder über einen Dosimaten (Firma Metrohm), der eine wesentlich genauere Dosierung erlaubt. Die Glukosezufuhr wurde manuell an den aktuellen Verbrauch angepasst, so dass eine Glukosekonzentration zwischen 1 und 5 g/l eingehalten wurde. Die Glukosevorlage wurde gewogen, um daraus zusammen mit den gemessenen Glukosekonzentrationen die Verbrauchsrate zu berechnen. Zu Beginn der Fermentation und dann in regelmäßigen Abständen wurden Proben gezogen, um den pH-Wert, die Biomassekonzentration und die Substrat- und Produktkonzentrationen zu bestimmen. Der durch 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 g gewonnene zellfreie Überstand der Proben wurde bis zur Analyse bei -28°C eingefroren.

11 Durchführung der ^{13}C -Markierungsexperimente

11.1 Batch-Experiment mit dem Wildtyp *E. coli* K12

In diesem Experiment sollte die ^{13}C -Stoffflussanalyse auf Basis von Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite mit dem *E. coli* Wildtyp untersucht werden. Hierzu wurde ein Markierungsexperiment im Batch-Betrieb durchgeführt, in dem von Anfang an mit markierter Glukose gefüttert wurde. Der generelle Aufbau des Reaktorsystems ist in Kapitel 10 beschrieben und in Abbildung 10.1 dargestellt. Das Experiment wurde mit dem Wildtyp *E. coli* K12 und dem Minimalmedium I (Anhang A.2) entsprechend der Vorgehensweise von Kapitel 10.3 und 10.4 durchgeführt. Um die Kosten für die ^{13}C -markierte Glukose gering zu halten, wurde nur ein Reaktionsvolumen von 0,35 l verwendet. Für die Vorkultur und die Fermentation wurde eine Mischung aus natürlicher (30 w%), vollmarkierter $^{13}\text{C}_6$ (35 w%) und 1- ^{13}C -Glukose (35 w%) verwendet. Während der Fermentation wurden regelmäßig Proben genommen, um den Fermentationsverlauf zu verfolgen.

Am Ende der Batchphase – bei einer $\text{OD}_{600} = 20$ (etwa 7 g/l BTM) – wurden 200 ml des Reaktorinhalts in 600 ml -50°C kalter Methanollösung schnell abgekühlt (*gequencht*), um den Metabolismus zu stoppen. Anschließend wurde die Mischung in 50 ml Zentrifugengefäße aliquotiert und die Metabolite des Zentralstoffwechsels mit alkalischem Ethanol extrahiert. Die ^{13}C -Markierungsmuster wurden in den intrazellulären Metaboliten mittels LC-MS/MS analysiert (12.5). In der folgenden Tabelle sind die Parameter des Experiments dargestellt:

Tabelle 11-1: Experimentelle Parameter des ^{13}C -Markierungsexperiments

Parameter	Erläuterung
Stamm	<i>E. coli</i> K12
Medium	Minimalmedium I
Glukosemischung	30% natürlich markiert 35% vollmarkiert ($\text{U-}^{13}\text{C}$) 35% 1- ^{13}C -markiert
V_{Start}	350 ml
Probenahme	Ende der Batchphase (ca. 9h)
Markierungsmessung	Intrazelluläre Metabolite
T	37°C
pH-Wert	7,0
$p\text{O}_2$ -Wert	30%
BTM_{Ende}	7 g/l
Quenching	-50°C (60% MeOH)
Extraktion	0,3 M Kalilauge in 25 % Ethanol

11.2 Fedbatch-Experimente mit *E. coli* F82pC22

Ziel dieses Experimenten war es die intrazellulären Stoffflüsse mit Hilfe der ^{13}C -Stoffflussanalyse zu verschiedenen Zeiten einer Fermentation zu ermitteln, um hieraus Stammoptimierungspotentiale abzuleiten. Basis sind die Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite des Zentralstoffwechsels. Die Stoffflüsse sollten dann mit den Ergebnissen einer ^{13}C -Stoffflussanalyse auf Basis von 2D-NMR Daten der proteinogenen Aminosäuren und den berechneten Werten aus einer Flux-Balance-Analyse verglichen werden. Die Experimente wurden im Sensorreaktor durchgeführt, der parallel zu einem 42 Liter Produktionsreaktor betrieben wurde.

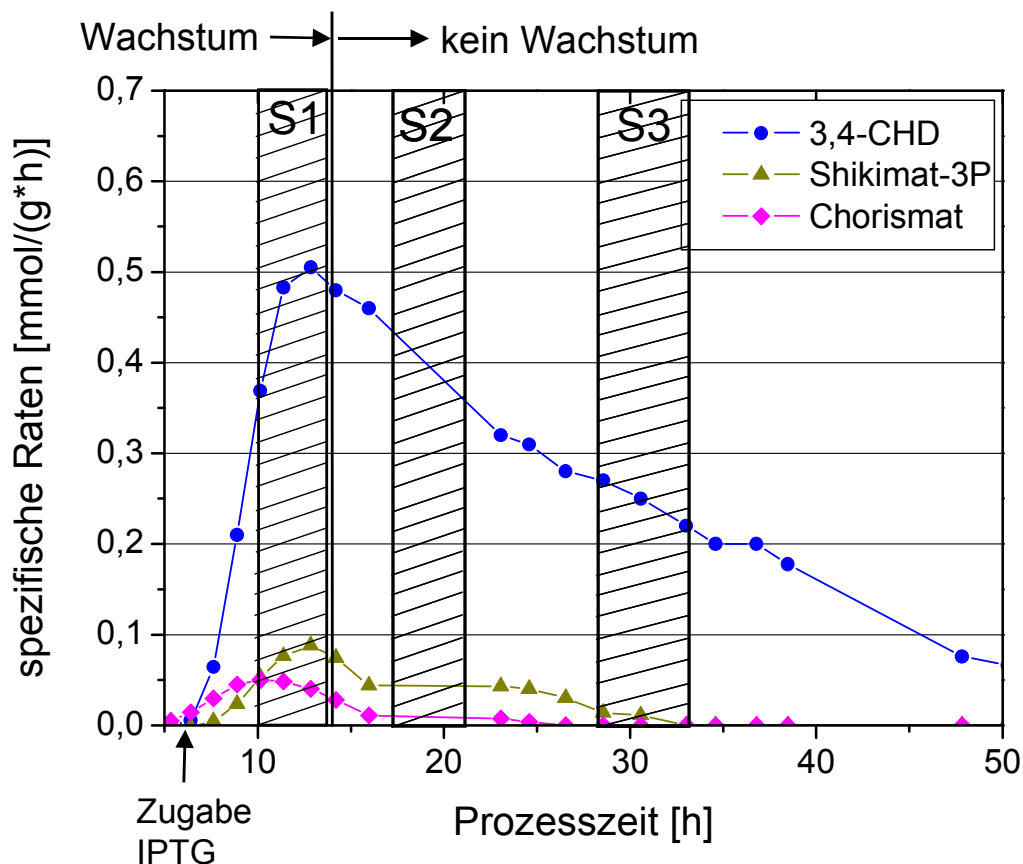
11.2.1 Fermentationsverlauf und Planung der Experimente

Auf Basis des *E. coli* W3110 wurde ein Stamm für die Produktion von 3,4-CHD entwickelt (siehe Kapitel 9.1). Die Arbeiten zur Prozessentwicklung wurden von Robert Bujnicki am IBT-2 im Forschungszentrum Jülich durchgeführt (Bujnicki 2007). Das entwickelte Fermentationsverfahren zur Produktion von 3,4-CHD besteht aus drei Ablaufphasen. Der Prozess startet mit einer Batchphase, in der alle Substrate und die zum Wachstum benötigten Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin im Überschuss vorhanden sind. In dieser Phase wächst der Stamm exponentiell. Am Ende der Batchphase, nach ca. 5-6 Stunden, wird Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in den Reaktor gegeben. Hierdurch wird die Transkription der Gensequenzen auf dem Plasmid induziert und die zur Produktion von 3,4-CHD notwendigen Enzyme (*aroF*, *aroB*, *aroL* und *entB*) werden verstärkt gebildet. Neben dem gewünschten Produkt werden auch die auf dem Biosyntheseweg von 3,4-CHD liegenden Metabolite Shikimat-3-phosphat (S3P) und Chorismat ins Medium abgegeben. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass die Menge der gebildeten Vorprodukte nicht schnell genug zum Endprodukt 3,4-CHD umgesetzt werden können und sich dadurch in der Zelle anreichern. Dabei kommt es anscheinend zu einem Rückstau im Reaktionsweg, so dass zunächst Chorismat und der vorhergehende Metabolit S3P gebildet wird.

Nachdem die Substrate vollständig aufgebraucht sind, werden die Glukose und die beiden Aminosäuren (Phe, Tyr) geregelt zugegeben. Die Kultur wächst mit einer konstanten Wachstumsrate weiter. Ab einer Biotrockenmassekonzentration von 20 g/l (nach ca. 12-15 Stunden) wird die Regelung der Aminosäuren gestoppt und eine konstante Zufuhr eingestellt, so dass eine zunehmende Limitierung durch Phe und Tyr auftritt und die Kultur nur noch mit einer geringen spezifischen Wachstumsrate ($\mu < 0,05 \text{ h}^{-1}$) wächst. Chorismat und S3P werden nun nicht mehr gebildet und stattdessen geht ein zunehmender Kohlenstoff-Anteil ins Zitrat, der ins Medium ausgeschieden wurde.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass pro Mol 3,4-CHD ein Mol PYR gebildet wird und durch die höhere Pyruvatkonzentration in der Zelle der Zitronensäurezyklus aktiviert wird. Im TCA kommt es dann zu einer Anreicherung von Zitrat, da dieses nicht schnell genug abgebaut werden kann. Auf eine Aktivierung des Zitronensäurezyklus deutet auch die erhöhte CO_2 -Bildung zum Ende der Fermentation hin. In der folgenden Abbildung sind die spezifischen Bildungsraten einiger extrazellulärer Produkte im Laufe der Fermentation zusammen mit den Zeiten für die ^{13}C -Markierungsexperimente (S1, S2 und S3) dargestellt.

Abbildung 11.1: Spezifische Produktionsraten von 3,4-CHD, Chorismat und S3P und die geplanten Zeiträume (S1, S2 und S3) für die Durchführung der Markierungsexperimente.



11.2.2 Ermittlung eines geeigneten Markierungssubstrats

Die Ermittlung des Markierungssubstrats, für das die Bestimmtheit (geringste Standardabweichung) der Flüsse am höchsten ist erfolgte durch nichtlineare multivariate Regression. Basierend auf einem *E. coli* Netzwerkmodell und geschätzten Flussgrößen der freien Flüsse wurde das Konfidenzintervall der Flüsse unter Variation der Anteile des Markierungssubstrats minimiert. Besonderes Gewicht wurde dabei auf den Fluss von G6P in den Pentose-Phosphat-Weg und die anaplerotischen Flüsse gelegt. Zur Minimierung der Kosten wurde als Nebenbedingung angenommen, dass mindestens 50 % der Glukose unmarkiert sind und als markiertes Substrate nur vollmarkierte und $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierte Glukose verwendet wird.

Für das erste Markierungsexperiment wurde ein Substratverhältnis (unmarkiert: $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiert: vollmarkiert) von 50:17:33 und für das zweite und dritte Markierungsexperiment von 50:21:29 ermittelt. Es zeigte sich, dass das Verhältnis von $1\text{-}^{13}\text{C}$ - zu vollmarkierter Glukose in der Nähe des Optimums nur eine geringe Sensitivität hat. Daher wurde für alle Experimente eine Mischung von 50:25:25 (Gewichtsanteile) gewählt. Die Berechnungen wurden von Aljoscha Wahl durchgeführt (Wahl 2007).

11.2.3 Zeitdauer der ^{13}C -Markierungsexperimente

Bei der Dauer des Markierungsexperiments der ersten Phase wurde ein Kompromiss zwischen einem für die NMR-Messung ausreichend hohen Markierungsanteil in der Biomasse und minimalen Kosten des Markierungssubstrats geschlossen. Die Zeit für die Einstellung eines isotopisch stationären Zustands in den gemessenen intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels wurde über Literaturwerte der Poolgrößen (Kummel et al. 2006b) und die in früheren Versuchen gemessene Glukoseaufnahme mit der folgenden Gleichung (Wiechert 2001) abgeschätzt. Hierbei wurde angenommen, dass sich die Markierung auf einem linearen Reaktionspfad verteilt und keine Rückreaktionen in den Zentralstoffwechsel auftreten:

$$t \approx 4 \cdot \frac{\sum \text{Poolgrößen}}{\text{Substrataufnahmerate}} \quad (11.1)$$

Mit dieser Gleichung berechnen sich die folgenden Markierungszeiten, die für die Einstellung eines stationären Zustands im Zentralstoffwechsel mindestens notwendig sind.

Tabelle 11-2: Abschätzung der Markierungszeit bis zur Einstellung eines isotopisch stationären Zustands in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels für *E. coli* F82pC22

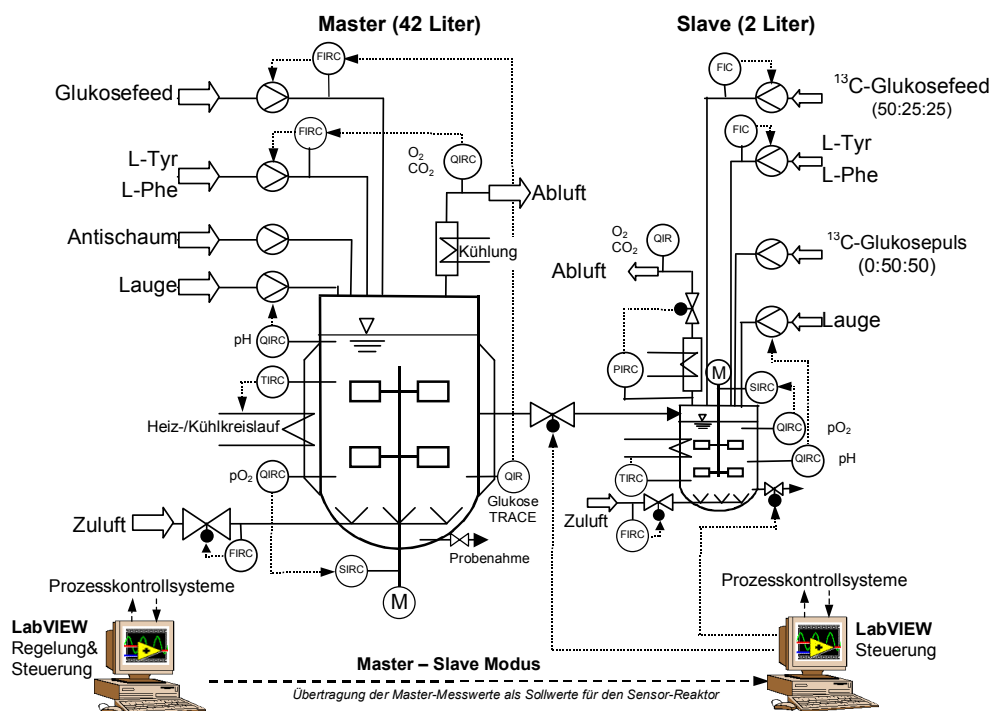
Experiment	Summe Poolgrößen [mmol/L]	Substrataufnahme [mmol/(L*s)]	Markierungszeit berechnet [min]	Markierungszeit gewählt [min]
1	100	0,60	11,0	160
2	100	0,20	33,0	180
3	100	0,15	44,0	270

Die gewählten Markierungszeiten waren wesentlich länger. Als Abbruchkriterium wurde im ersten Experiment eine Verdopplung der Biomassekonzentration gewählt. Im zweiten und dritten Experiment wächst die Biomasse nur mit einer sehr geringen Wachstumsrate, so dass eine Markierungsmessung mittels 2D-NMR in den proteinogenen Aminosäuren auf Grund des geringen Markierungsanteils nicht möglich war. Die Messung sollte stattdessen im Produkt 3,4-CHD gemessen werden. Aus diesem Grund wurde die Markierungszeit so gewählt, dass die extrazelluläre Konzentration des Produkts 3,4-CHD um etwa 1/3 zunimmt, so dass der Markierungsanteil für eine 2D-NMR Analyse hoch genug ist.

11.2.4 Markierungsexperimente im Sensorreaktor

Zur Durchführung der Experimente wurde der Sensorreaktor mit der Inokulierungseinheit an einen 42-Liter Bioreaktor (Firma Bioengineering) angeschlossen. Je dreimal im Laufe der Fermentation wurde der Sensorreaktor aus dem Produktionsreaktor inokuliert und im sogenannten Master-Slave-Modus parallel zu diesem betrieben (Kapitel 11.2.9).

Abbildung 11.2: Kultivierungen im Master-Slave-Betrieb. Über einen Prozessrechner werden die Daten des Produktionsreaktors mit Hilfe einer in LabVIEW™ erstellten Software auf den Sensor-Reaktor übertragen. Die Messstellen sind wie in der Verfahrenstechnik üblich bezeichnet (T=Temperatur, P= Druck, F= Durchfluss, S= Drehzahl, Q=Konzentration (pO₂, pH, O₂, CO₂), I= Anzeige, R= Meßwertaufnahme, C= Regelung).



Das gewünschte Markierungsverhältnis wurde durch Zugabe einer Mischung aus 1-¹³C- und vollmarkierter zu der unmarkierten Glukose im Reaktor eingestellt (Kapitel 11.2.5). Die gewählte Zeitdauer für die Parallelkultivierungen betrug zwischen 2,7 und 4,5 Stunden (Kapitel 11.2.3). Am Ende jedes Experiments wurde der Zellstoffwechsel mit -50°C kaltem Methanol gestoppt. Die intrazellulären Metabolite wurden mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung aus den Zellen extrahiert und die Markierungsmuster in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels mittels LC-MS/MS analysiert (Kapitel 12.5). Zusätzlich wurden die Markierungsmuster mit 2D-NMR gemessen. Im ersten Experiment erfolgte die Messung in den proteinogenen Aminosäuren. Im 2. und 3. Experiment war die Markierungsanreicherung in der Biomasse auf Grund der geringen Wachstumsrate für eine NMR-Analyse zu gering, und die Analyse erfolgte daher im hochkonzentrierten extrazellulären Produkt 3,4-CHD.

Tabelle 11-3: Parameter der Parallelkultivierungen zur Untersuchung von *E. coli* F82pC22

Parameter	Erläuterung			
Stamm	<i>E. coli</i> F82pC22	Markierungsdauer		
Medium	Minimalmedium II	<u>Experiment</u> <u>Dauer</u>		
Glukosemischung		1.		2,7 h
unmarkiert:	50 % (w/w)	2.		3,0 h
vollmarkiert	25 % (w/w)	3.		4,5 h
^{13}C markiert	25 % (w/w)			
V_{Start}	0,98; 0,97; 0,99 liter	Markierungsmessung		
T	37 °C	<u>Experiment</u>	<u>NMR</u>	<u>LC-MS/MS</u>
pH-Wert	7,6	1.	Aminosäuren	Metabolite
pO ₂ -Wert	30 %	2.	3,4-CHD	Metabolite
Quenching	-50°C (60% MeOH)	3.	3,4-CHD	Metabolite
Extraktion	0,3 M KOH			

11.2.5 Betrieb des Sensorreaktors (Slave)

Der Reaktor wurde wie in Kapitel 10.3 beschrieben vorbereitet. Vor jeder Parallelfermentation wurde das genaue Inokulationsvolumen durch dreimalige Inokulierung und Messung des Volumens im Reaktor bestimmt. Zusätzlich wurde das inokulierte Volumen vor dem Start der Parallelfermentation durch Wiegen des Sensorreaktors überprüft. Die Kenntnis des Volumens ist wichtig für eine exakte Dosierung der Aminosäurezufuhr und der Einstellung des genauen Markierungsverhältnisses. Nachdem sich nach etwa 15 Minuten ein stabiler Prozesszustand im Sensor-Reaktor eingestellt hatte, wurde zur unmarkierten Glukose (gemessen mittels Schnelltest (Kapitel 12.4.1)) im Reaktor über einen Dosimaten eine Mischung von ^{13}C und vollmarkierter Glukose innerhalb von wenigen Sekunden zudosiert, so dass sich das gewünschte Markierungsverhältnis einstellte. Dieses Verhältnis wurde über die gesamte Dauer der Fermentation konstant gehalten. Durch manuelle Anpassung der Glukosezufuhr wurde die Glukosekonzentration im Sensor-Reaktor zwischen 1-3 g/l gehalten. Da der untersuchte Stamm auxotroph für die Aminosäuren Phe und Tyr ist, wurde zusätzlich über einen dritten Dosimaten eine Mischung dieser Aminosäuren zudosiert. Die Zugabe orientierte sich am Master-Reaktor und wurde manuell angepasst. Während der Fermentation wurden alle 30 Minuten aus beiden Reaktoren Proben entnommen und analysiert. Anhand der gemessenen Werte von Biomasse und Glukose wurde die Aminosäure- und Glukosezufuhr in beiden Reaktoren angepasst. Nach dem Ende jeder Fermentation wurde der Reaktor entleert und zweimal mit sterilem Wasser gespült.

11.2.6 Betrieb des 42-Liter-Produktionsreaktors (Master)

Der 42-Liter-Reaktor der Firma Bioengineering war wie der Sensor-Reaktor mit Sonden zur Messung von Druck, Temperatur, pH-Wert und pO_2 -Wert ausgestattet. Die Regelung der Parameter erfolgte über integrierte PID-Regler. Die Prozessdaten wurden mittels Profi-Bus an eine LabView™-Software übertragen, wo sie graphisch dargestellt und gespeichert wurden. Der Anteil von O_2 und CO_2 wurde in einem Teilstrom des Abgases mit einem Analysegerät (Binos 100) bestimmt und die Werte über einen analog/digital-Wandler ebenfalls an den Prozessrechner übertragen. Als zusätzliche Ausstattung verfügte der Bioreaktor über ein System zur Online-Messung der Glukose (TRACE, siehe 11.2.7). Das über eine serielle Schnittstelle an den Prozessrechner übertragene Messsignal der Glukosekonzentration wurde dort zur Berechnung der optimalen Glukosezufuhr verarbeitet und dieser Wert an eine Dosierstrecke (Firma Sartorius) mit Schlauchpumpe geleitet, welche die Glukosezufuhr regelte. Eine zweite Dosierstrecke wurde zur Zugabe der beiden Aminosäuren verwendet. Diese wurde indirekt über den Sauerstoffverbrauch der Kultur geregelt (11.2.8).

11.2.7 Online-Glukosemessung und Regelung der Glukosezufuhr

Die Online-Messung der Glukosekonzentration erfolgte mit einem TRACE-Analysegerät (Firma Trace Analytics) über eine amperometrische Messung des bei der enzymatischen Umsetzung mit Glukoseoxidase entstehenden Wasserstoffperoxids. Die Messung erfolgte im Abstand von 2,5 Minuten. Die Kalibration erfolgte mit Standardlösungen von 4 und 20 g/l Glukose, welche nach jeweils 100 Messungen automatisch wiederholt wurde. Die Regelung der Glukosekonzentration erfolgte über einen parameteradaptiven Regler (Striegel 1993). Die Echtzeitbestimmung der geschätzten Konzentration und die Vorhersage des Verbrauchs beruhen auf einem erweiterten semikontinuierlichen Kalman-Filter. Der Filter minimiert die Varianz des Schätzfehlers aller geschätzten Größen beim Eintreffen eines diskreten totzeitbehafteten Analysewerts. Diese Werte werden dann an den Regler übermittelt, der die Stellgröße entsprechend verändert, um den eingestellten Sollwert einzuhalten. Dieses Regelkonzept ist besonders geeignet bei verrauschten und totzeitbehafteten Zustandsgrößen und einem nichtlinearen Verhalten der Regelstrecke, wie es insbesondere in der Wachstumsphase der Kultur auftritt. Der Regler wurde in die LabView™-Prozesssoftware implementiert und die vom Regler berechnete Stellgröße an eine Sartorius-Dosierstrecke weitergeleitet. Diese lieferte die aktuellen Ist-Werte zurück, die zusammen mit den Soll-Werten gespeichert wurden.

11.2.8 Regelung der Aminosäurezufuhr

Die Regelung der Aminosäurezufuhr von L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurde insbesondere in der Wachstumsphase der Kultur notwendig, da einerseits eine optimale Versorgung der Zellen sichergestellt und andererseits eine Akkumulation von L-Tyrosin verhindert werden muss. Diese wirkt inhibierend auf die DAHP-Synthase (Frost and Draths 1995; Knaggs 2003; Pittard 1996). Die Regelung der Aminosäurezufuhr erfolgte indirekt über die volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate. Dieses Regelkonzept wurde in der Arbeit von (Gerigk et al. 2002) zur Produktion von L-Phenylalanin etabliert.

$$\dot{V}_{L\text{-Tyr}} = \frac{OUR_{\text{vol}} - 30}{m} \quad (11.2)$$

$\dot{V}_{L\text{-Tyr}}$	volumetrische L-Tyrosinverbrauchsrate in [mmol/(l*h)]
OUR_{vol}	volumetrische Sauerstoffverbrauchsrate in [mmol/(l*h)]
m	Zulauffaktor in [mmol/g]

Die Sauerstoffverbrauchswerte wurden auf Basis der Abgaswerte ermittelt und daraus über Gleichung 11.2 die Zulauftrate berechnet. Als Zulauffaktor wurde ein Wert von 2 gewählt, um eine Limitierung von Tyr und eine leichte Akkumulation von Phe sicherzustellen. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Regelung unterbrochen und ein konstanter Aminosäurezufluss von ca. 0,4 g/(l*h) für den Erhaltungsstoffwechsel eingestellt.

11.2.9 Steuerung des Master-Slave-Betriebs

Zur Realisation vergleichbarer Prozessbedingungen im Produktions- (Master) und Sensorreaktor (Slave) wurden die Prozessdaten (T, p, pH, $p\text{O}_2$) des Produktionsreaktors auf den Sensorreaktor mittels einer LabViewTM-Software übertragen. In diesem als Master-Slave-Modus bezeichneten Betrieb wird aus fünf aufeinanderfolgenden Datenpunkten (Abstand je einer Sekunde) des Masters ein gleitender Mittelwert gebildet und als Sollwert an den Slave übergeben. Damit können über einen Zeitraum von 3-4 Stunden vergleichbare Fermentationsverläufe realisiert werden (Drysch et al. 2003; El Massaoudi et al. 2003; Wahl et al. 2004). Die Übereinstimmung der Kultivierungen in beiden Reaktoren wurde anhand der Verbrauch- und Produktionsraten (z.B. σ_{Glc} , OTR, μ , π_i , CER) überprüft.

11.3 Isotopisch instationäre Markierungsexperimente

Bei diesen ^{13}C -Markierungsexperimenten mit dem *E. coli* K12 Wildtyp sollte die Markierungsanreicherung in den intrazellulären Metaboliten verfolgt und auf Basis dieser isotopisch instationären Daten eine ^{13}C -Stoffflussanalyse durchgeführt werden (siehe Kapitel 22).

11.3.1 Experimentelles Design

Vor der Durchführung der Markierungsexperimente wurde an der Universität Siegen (Nöh 2006) auf Basis eines einfachen Modells des *E. coli* Wildtyps, den ermittelten Flüssen aus dem stationären Experiment (Kapitel 15.4) und gemessenen Poolgrößen ein experimentelles Design durchgeführt. Hierbei wurden ein optimales Markierungssubstrat und mehrere Probenahmezeitpunkte ermittelt, bei der die Bestimmtheit der Flüsse am höchsten ist. Um eine Glukoselimitierung vor der Markierungsaufgabe zu verhindern, wurde als Nebenbedingung angenommen, dass 20 Prozent des Substrats vor der Markierungsaufgabe bereits im Reaktor sind (unmarkierter Anteil). Bei der Modellierung der Markierungsanreicherung in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels zeigte sich, dass voraussichtlich schon nach etwa 10 Sekunden ein isotopisch stationärer Zustand in den meisten Metaboliten erreicht wird. Um den pro Messpunkt hohen Rechenaufwand gering zu halten, wurden elf Probenahmezeitpunkte bis 16 Sekunden nach der Markierungsaufgabe festgelegt, die für die instationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse verwendet wurden. Anschließend wurden im Abstand von etwa einer Minute weitere Proben entnommen bis die Glukose nahezu aufgebraucht war. Die ermittelten optimalen Parameter sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 11-4: Optimale Probenahmezeitpunkte und optimales Markierungssubstrat

<i>Design-Variablen</i>	
Probenahmezeiten ξ_{ns} [s]	Markierungssubstrat x^{inp}
Probe 1	0,38
Probe 2	0,77
Probe 3	1,16
Probe 4	1,62
Probe 5	2,20
Probe 6	3,03
Probe 7	4,21
Probe 8	6,03
Probe 9	8,0
Probe 10	10,0
Probe 11	16,0

11.3.2 Aufbau und Durchführung der Experimente

Der generelle Aufbau und die Durchführung der Fermentation sind in Kapitel 10 beschrieben. Für die Messung der Markierungsanreicherung in den intrazellulären Metaboliten wurde der Sensorreaktor um eine schnelle Probenahmeeinheit erweitert (Kapitel 18). Die Aufgabe der markierten Glukose erfolgte mit der Substrataufgabeeinheit (10.1.2). Die Bedienung des Systems, die Regelung der Fermentation und die Steuerung der Probenahme wurden über eine neu entwickelte Regel- und Steuereinheit realisiert (Kapitel 20).

Abbildung 11.3: Aufbau des Reaktorsystems und Durchführung der isotopisch instationären Markierungsexperimente mit Pulsaufgabe- und schneller Probenahmeeinheit. Die Messstellen sind wie in der Verfahrenstechnik üblich bezeichnet (T=Temperatur, P=Druck, F= Durchfluss, S= Drehzahl, Q=Konzentration (pO_2 , pH, O_2 , CO_2), I= Anzeige, R= Meßwertaufnahme, C= Regelung).

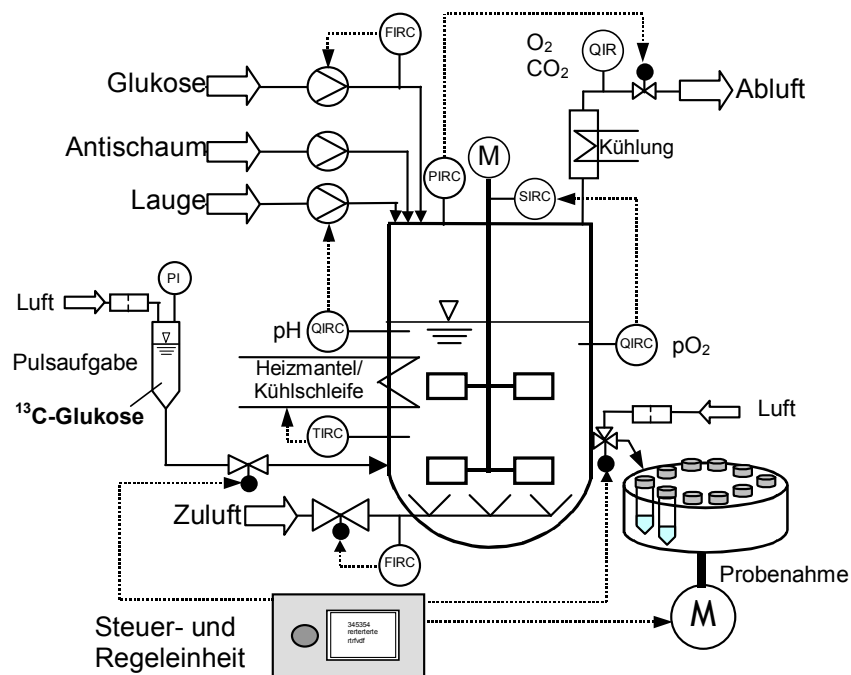


Tabelle 11-5: Experimentelle Parameter der isotopisch instationären Markierungsexperimente

Parameter	Erläuterung	Parameter	Erläuterung
Stamm	<i>E. coli</i> K12	pO_2 -Wert	30%
Medium	Minimalmedium I	pH-Wert	7,0
Markierungs-substrat	52% vollmarkierte ($^{13}\text{C}_6$) 48% 1- ^{13}C Glukose	$\text{BTM}_{\text{Start}_{13\text{C}}}$	~12 g/l
V_{Start}	700 ml	Quenching	-50°C (60% MeOH)
T	37°C	Extraktion	0,3 M KOH in 25 % EtOH

Der Reaktor wurde 10%-ig mit der Vorkultur ($OD_{600} \approx 4$) angeimpft. Das Startvolumen betrug 0,7 l. Nach einer etwa 6-stündigen Batchphase wurde die Glukosezufuhr (unmarkiert) gestartet und manuell so eingestellt, dass die Konzentration im Reaktor zwischen 1-3 g/l gehalten wurde. Zu Beginn etwa alle 2 Stunden und später alle 30 Minuten wurden Proben genommen und offline analysiert. Bei einer optischen Dichte von etwa $OD_{600} = 30$ (≈ 10 g/l BTM) wurde eine Glukosekonzentration von etwa 1 g/l eingestellt. Diese wurde durch mehrmalige Probenahme und Analyse der Glukosekonzentration mit dem ACCUCHECK-Sensor überprüft. Sobald die gewünschte Konzentration erreicht war, wurde das Experiment gestartet. Es wurden zunächst fünf Proben im Abstand von je einer Sekunde genommen, um die Metabolitkonzentrationen des Zentralstoffwechsels zu bestimmen. Anschließend wurde mit der Substrataufgabereinheit eine definierte Mischung aus $^{13}C_6$ - und $1-^{13}C$ markierter Glukose aufgegeben und die schnelle Probenahme gestartet. Die Menge an ^{13}C -markierter Glukose war so berechnet, dass nach der Zugabe eine Glukosekonzentration von 6 bzw. 8 g/l im Reaktor erreicht wurde. Zur Überprüfung des Markierungsverhältnisses wurde sofort nach Aufgabe der ^{13}C -markierten Glukose manuell eine Probe aus dem Reaktor entnommen und die Glukosekonzentration analysiert. Nach der Markierungsaufgabe wurde keine weitere Glukose in den Reaktor gegeben, so dass die Glukosekonzentration bis zum Ende des Markierungsexperiments sank und das Markierungsverhältnis konstant blieb.

Nach Abschluss der schnellen Probenahme wurden weiter manuell Proben im Abstand von zunächst 1 und später 2 Minuten genommen bis die Glukose im Reaktor aufgebraucht war. Alle Proben für die intrazellulären Messungen wurden in $-50^\circ C$ kalter wässriger Methanol-lösung (60% v/v) schlagartig abgekühlt (gequencht). Die intrazellulären Metabolitkonzentrationen und die Markierungsmuster wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Etwa alle 10 bis 15 Minuten wurden zusätzlich Proben genommen und der Zellüberstand offline analysiert. Anhand der Konstanz von Wachstums-, Produktions- und Verbrauchsrate wurde die Stationarität des metabolischen Zustands überprüft.

12 Analytische Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Methoden zum Stopp des Zellstoffwechsels und zum Zellaufschluss (12.1 und 12.2), sowie zur Analyse der extrazellulären Konzentrationen mittels optischer, gravimetrischer, enzymatischer und chromatographischer Verfahren beschrieben (12.3 und 12.4). Die LC-MS/MS- und NMR-Methoden zur Messung der intrazellulären Konzentrationen und der ^{13}C -Markierungen sind in Kapitel 12.5 und 12.6 dargestellt.

12.1 Stoppen des Zellstoffwechsels

Zum Stopp des Zellstoffwechsels wurde ein vielfach in der Literatur beschriebenes Verfahren verwendet (de Koning and van Dam 1992; Jensen et al. 1999). Hierbei werden die Zellen innerhalb von wenigen Millisekunden in einer kalten Methanollösung abgekühlt (gequencht). Neben der Geschwindigkeit ist ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens, dass eine einfache Trennung der intra- und extrazellulären Metabolite erfolgen kann. Während der Versuche wurde das Kulturmedium mit den darin enthaltenen Zellen, im Verhältnis 1:3 (z.B. 5 in 15 ml bei der schnellen Probenahme), in eine -50°C kalte wässrige Methanollösung (60% (v/v)) gegeben. Die Zellsuspension wurde bei -28°C gelagert und die Zellen innerhalb von einer Stunde durch Zentrifugation (10.286 g, -20°C , 5 Minuten) abgetrennt. Der methanolische Überstand wurde dekantiert und die Flüssigkeitsreste mit einer Pipette abgesaugt. Anschließend erfolgte die Extraktion der intrazellulären Metabolite.

12.2 Freisetzen der Metabolite (Extraktion)

Es wurden vier verschiedene in der Literatur beschriebene Methoden untersucht (siehe Kapitel 21): (1) alkalisches Ethanol (Hajjaj et al. 1998), (2) Perchlorsäure (Hajjaj et al. 1998), (3) siedendes Ethanol (Gonzalez et al. 1997) und (4) Chloroform/Methanol (de Koning and van Dam 1992). Es wurden die intrazellulären Metabolite aus jeweils etwa 70 mg Biotrockenmasse (*E. coli*) extrahiert und mittels LC-MS/MS-Analyse quantifiziert (5-fach-Bestimmung). Vor der Extraktion wurde das Zellpellet in 500 μl MeOH (reinst) resuspendiert, um eine bessere Vermischung mit den Detergentien zu erreichen. Mit Ausnahme von (3) wurden alle Schritte der Extraktion bei einer Temperatur von -20°C in einer temperierten Kühlwanne durchgeführt. Für den Aufschluss mit siedendem Ethanol wurde ein Heizbad (95°C) verwendet. Das Ethanol wurde nach dem Zellaufschluss durch Gefriertrocknung entfernt und die Probe wieder in 1 ml Wasser aufgenommen. Bei (1) und (2) wurden die Proben über Nacht bei -80°C eingefroren. Nach der Extraktion wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10.286 g, 10 min, 4°C) entfernt und der Zellextrakt vor der Analyse filtriert (0,2 μm). Die Zellextrakte wurden bei -28°C bis zur Analyse gelagert. Bei den ^{13}C -Markierungsexperimenten (Kapitel 15, 16 und 22) wurden die Metabolite mit alkalischem Ethanol extrahiert (1).

12.3 Bestimmung der Biomassekonzentration

12.3.1 Optische Dichte (OD_{600})

Zur schnellen Erfassung der Biomassekonzentration im Reaktor wurde die optische Dichte mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Shimadzu UV-160) gegen eine Kochsalzlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz hängt die Stärke der Adsorption von der Zelldichte ab. Der lineare Messbereich bei einer Wellenlänge von 600 nm liegt etwa zwischen 0,03 und 0,4. Die Proben wurden daher mit 0,9 % NaCl-Lösung entsprechend verdünnt.

12.3.2 Biotrockenmasse (BTM)

Die Biotrockenmasse wurde gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden 2 bis 10 ml der Probe durch einen getrockneten und gewogenen Sterilfilter (Porengröße 0,2 μm) filtriert und der Filter anschließend mit derselben Menge 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Die Filter wurden dann für 24 Stunden im Trockenschrank (80°C) getrocknet und im Exsikkator abgekühlt. Die mittels Wägung bestimmte Gewichts Differenz geteilt durch das Probenvolumen entspricht der Biotrockenmasse [g_{BTM}/l].

12.4 Extrazelluläre Analytik

Für den Glukoseschnelltest mittels ACCUCHECK-Sensor konnten die Proben nach geeigneter Verdünnung direkt verwendet werden. Für den zweistufigen enzymatischen Glukosetest und die Analytik der extrazellulären Metabolite mittels HPLC wurden die Zellen durch Zentrifugation (13.000 g, 10 Minuten) entfernt und der zellfreie Überstand bei -28°C gelagert. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit deionisiertem Wasser.

12.4.1 Glukosekonzentration Schnelltest

Zur schnellen Bestimmung der Glukosekonzentration im Laufe der Fermentation wurde ein ACCUCHECK-Sensor (Roche Diagnostics) verwendet. Der Messbereich des Sensors liegt zwischen 0,1 und 6 g/l. Bei Bedarf wurde die Probe mit einer Kochsalzlösung (0,9 %) verdünnt. Für die Messung wird eine Probemenge von etwa 10 μl auf den Sensor aufgetragen. Die in der Probe enthaltene Glukose wird durch das auf dem Sensor immobilisierte Enzym Glukoseoxidase in Glukonolakton umgewandelt. Das entstehende H_2O_2 wird amperometrisch gemessen, wobei die gebildete Menge proportional zur Glukosekonzentration ist.

12.4.2 Glukosekonzentration mit Enzymtest

Zusätzlich zu diesem schnellen Verfahren wurde ein zweistufiger enzymatischer Glukosetest eingesetzt (siehe Anhang A.3). Bei diesem Test wird die zur Glukosekonzentration proportionale NADH-Bildung bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt (Bergmeyer 1984). Die Messungen wurden als Doppelbestimmung in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Aus dem Messwert wurde die Glukosekonzentration über eine zu jeder Messreihe erstellte 8-Punkt-Standardreihe mit Konzentrationen von 0,05 bis 0,5 g/l bestimmt.

12.4.3 Organische Säuren mittels HPLC

Die organischen Säuren α -Ketoglutarat, Acetat, Chorismat, Fumarat, Laktat, Malat, Pyruvat, Shikimat, Uracil und Zitrat im Fermentationsüberstand wurden mit einer Ionen-Ausschluss-Chromatographie getrennt und von einem Dioden-Array-Detektor detektiert. Der Fermentationsüberstand wurde vor der Messung mit deionisiertem Wasser entsprechend verdünnt. Eine ausführliche Beschreibung der analytischen Methode findet sich in (Oldiges 2005). Die Methodenparameter sind im Anhang A.4 dargestellt. Für die Messung des Produkts 3,4-trans-CHD wurde neben dieser Methode eine weitere HPLC Analyse, basierend auf einer Reversed-phase Chromatographie, eingesetzt. Diese ist in (Bujnicki 2007) beschrieben.

12.4.4 Aminosäuren mittels HPLC

Die Aminosäuren Alanin, Glutamat, Lysin, Phenylalanin, Tyrosin und Valin im Fermentationsüberstand wurden nach einer Derivatisierung mit *o*-Phtaldialdehyd (OPA) über eine Reversed-phase Chromatographiesäule getrennt (Oldiges 2005). Bei der Derivatisierung reagiert das OPA-Reagenz in Gegenwart von Mercaptoethanol (Ethanthiol) zu fluoreszierenden Isoindolen, die mit einem Fluoreszenzdetektor bei $\lambda = 330$ nm angeregt und bei $\lambda = 450$ nm detektiert werden. Die Methodenparameter sind im Anhang A.4 dargestellt. Die quantitative Auswertung erfolgte über eine Standardgerade. Die Proben wurden vor der Analyse geeignet mit Wasser verdünnt.

12.5 LC-MS/MS-Analytik der intrazellulären Metabolite

Zur Analyse der intrazellulären Metabolite des Zentralstoffwechsels und der freien Aminosäuren wird eine Kopplung von HPLC und Massenspektrometer (LC-MS/MS) eingesetzt. Zur Analyse der Konzentrationen und Markierungsmuster der Metabolite wurde eine von Bing Luo (2006) etablierte LC-MS/MS-Methode eingesetzt. Die verwendeten Geräte und Methodenparameter sind im Anhang A.5 dargestellt. Zur Quantifizierung der Metabolite wird die Standard-Additions-Methode verwendet. Diese Methode wird bei Matrix belasteten Proben zur Korrektur der Einflüsse der Probenmatrix eingesetzt (Bader 1980). Hierbei wurden zu einem Gemisch des Zellextrakts von 5 unabhängigen – aber zur gleichen Zeit – genommenen Proben unterschiedliche Mengen einer Standardlösung zugesetzt und mit Wasser aufgefüllt, so dass sich ein einheitliches Volumen ergibt. Über den linearen Zusammenhang, der sich aus der Auftragung der gemessenen Peakflächen über der Standardkonzentration ergibt, kann die Konzentration der Nullprobe (ohne zusätzlichen Standard) bestimmt werden, wobei die Verdünnung beachtet werden muss. Die sich ergebende Korrelation zwischen Konzentration und Peakfläche wurde dann zur Berechnung der Metabolitkonzentrationen in den Proben verwendet.

12.6 NMR-Analyse der ¹³C-Markierungsmuster

In den Parallelfermentationsexperimenten mit *E. coli* F82pC22 wurden zusätzlich die Markierungsmuster in den proteinogenen Aminosäuren und im extrazellulären Produkt 3,4-CHD (bzw. Shikimat) mittels 2D [¹³C, ¹H] COSY NMR bei der Firma DSM (Delft, Niederlande) analysiert.

Zur Analyse der Markierungsmuster in den Aminosäuren wurde nach dem Quenchen des Reaktorinhalts ein Teil der Biomasse (~3 g BTM) mit -28°C kaltem wässrigem Methanol (50% v/v) gewaschen und anschließend das Methanol durch Zentrifugation (10.286 g, -20°C, 5 min) abgetrennt. Das Zellpellet wurde in 15 ml HCl-Lösung (6 M) resuspendiert und die Proteine bei 105°C für 14 Stunden hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde anschließend filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm) und das klare braune Filtrat gefriergetrocknet.

Im zweiten und dritten Markierungsexperiment war das Zellwachstum gering, so dass in der Biomasse nur wenig markiertes Substrat zu finden war. Daher wurde das Markierungsmuster im extrazellulären Produkt 3,4-trans-CHD gemessen. Hierzu wurde ein Teil des Zellüberstands filtriert (10.286 g, 4°C, 5 min.) und anschließend lyophilisiert. Da die Markierung im 3,4-trans-CHD durch die starke Verdünnung mit unmarkiertem Produkt teilweise sehr gering war, wurde zusätzlich das Markierungsmuster von Shikimat gemessen, welches als Vorläufer-Metabolit dasselbe C-Skelett besitzt und hauptsächlich in der späten Phase der Fermentation gebildet wird.

Zur Auswertung der Spektren wurde ein spezielles Analysetool verwendet (van Winden et al. 2001). Dabei wird das reale Spektrum durch vier Parameter eines Modells von Pearson (VII) dargestellt, wodurch die Anzahl der Parameter zur Beschreibung des Spektrums stark reduziert werden kann. Die Modellparameter werden durch eine Anpassung des Modells an das gemessene Spektrum bestimmt. Aus den Modellparametern können die relativen Intensitäten (Markierungsverhältnisse) bestimmt werden. Aus dem Vergleich von Anpassung und gemessenem Spektrum wird der Messfehler abgeleitet.

13 Durchführung der ^{13}C -Stoffflussanalysen

Nachfolgend werden die Aufbereitung der Messdaten (Kapitel 13.1 bis 13.6), die Parameteranpassung (Kapitel 13.7) und die verwendeten metabolischen Netzwerke des *E. coli* K12 Wildtyps und des Stamms *E. coli* F82pC22 vorgestellt (Kapitel 13.8).

13.1 Extrazelluläre Raten und Kohlenstoffbilanz

Die Wachstums-, Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten wurden auf der Basis von gemessenen und geglätteten extrazellulären Konzentrationsverläufen und den Substratzufuhrdaten berechnet. Die Glättung erfolgte mit der Funktion Spline der Microsoft® Excel Toolbox XLXtrFun¹. Dabei wurde die Volumenveränderung im Reaktor durch Probenahme und Substratzufuhr beachtet.

Mit Hilfe der Wachstumsrate wurde der Abfluss aus dem Zentralstoffwechsel in die Biomasse berechnet. Dabei wurde eine lineare Korrelation zwischen Metabolitbedarf und Biomassewachstum angenommen (Fischer et al. 2004). Zur Berechnung wurden die in der folgenden Tabelle angegebenen Werte für *E. coli* verwendet. Zur Kontrolle ob alle Produkte erfasst sind wurde abschließend mit den berechneten Raten eine Kohlenstoffbilanz aufgestellt.

Tabelle 13-1: Metabolitbedarf für die Bildung von Biomasse bei exponentiell wachsenden Zellen von *E. coli* B/r in μmol pro Gramm Biotrockenmasse (Neidhardt et al. 1996)

Vorläufer Co-Faktor	Bedarf [$\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$]
G6P	209
F6P	72
P5P	899
E4P	361
DHAP	124
XPG	1614
PEP	775
PYR	2968
AcCoA	2437
OAA	1633
AKG	1289

¹ www.netrax.net/~jdavita/XIXtrFun.htm; XIXtrFun.xll (c) Scott Allen Rauch, Advanced Systems Design and Development, 1993-1999

13.2 Berechnung der Standardabweichung der Messungen

Für die statistische Analyse der berechneten Flüsse wurden die Standardabweichungen der Messwerte der extrazellulären Flüsse und der Markierungsdaten benötigt. Für das Experiment mit dem Stamm *E. coli* F82pC22 wurden die Aufnahme- und Produktionsraten der Zellen auf Basis der Messungen der extrazellulären Konzentrationen mit dem von Aljoscha Wahl (2007) am IBT-2 entwickelten MATLAB™ Tool ‚FitFedBatch.m‘ ermittelt. Aus der Abweichung zwischen Anpassung und Messwert wurden die Standardabweichungen der Raten berechnet (Kapitel 16.1). Die Standardabweichungen der LC-MS/MS-Markierungsdaten wurden auf Basis von drei unabhängigen Messungen bestimmt. Die Standardabweichungen der NMR-Daten wurden mit einem MATLAB™ Tool zur Berechnung der Markierungsanteile der Singulett, Doublett und Doppeldoublett (van Winden et al. 2001) auf Basis des Signal-zu-Rausch-Verhältniss ermittelt (Kapitel 16.4).

Für das Experiment mit dem *E. coli* Wildtyp wurde die Standardabweichung für die extrazellulären Raten (μ , σ_{Glc} , π_{Ace} , π_{CO_2}) aus drei vergleichbaren Wachstumsexperimenten ermittelt (Anhang B.1). Aus der mittleren Wachstumsrate wurden die Abflüsse in die Biomasse ermittelt. Die Standardabweichungen für die Messwerte der Massenisotopomere wurden aus fünf Proben ermittelt, die unabhängig voneinander mit der gleichen Extraktionsmethode behandelt wurden.

13.3 Berechnung der intrazellulären Konzentrationen

Die Berechnung der intrazellulären Konzentrationen erfolgte analog zu der Arbeit von (Buchholz 2002). Hierbei wird die Verdünnung bei der Extraktion aus der Volumenveränderung durch das Extraktionsmittel (2000 μl), die Neutralisation (30 μl), dem Zwischenzellvolumen (interzelluläres Volumen = 326 μl) und dem intrazellulären Volumen berechnet. Das intrazelluläre Volumen berechnet sich hierbei aus der Konzentration der Biotrockenmasse, dem Probenvolumen und dem spezifischen Zellvolumen (2,78 $\mu\text{l}/\text{mg}$). Der Wert für das spezifische Zellvolumen wurde der Arbeit von (Pramanik and Keasling 1997) entnommen. Eine Darstellung der Berechnung findet sich im Anhang A.6.

13.4 Isotopenkorrektur der MS-Daten

Um die Markierungsanreicherung in den Kohlenstoffatomen der Metabolite zu erfassen, mussten die Daten der Massenisotopomere für die natürliche Isotopenverteilung der anderen Atome (N, O, H, P, S) korrigiert werden. Hierzu wurde ein 2005 am IBT-2 von Aljoscha Wahl entwickeltes MATLAB™ Tool („MSCorr.m“) verwendet.

13.5 Berechnung von Markierungsanteilen

Zur Darstellung der zeitlichen Verläufe der Massenisotopomere und zur Berechnung der Stoffflüsse wurden die Markierungsanteile verwendet. Hierzu wurde die mit dem Massenspektrometer gemessene Peakfläche für ein Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) durch die Summe aller für einen Metaboliten gemessenen Flächen geteilt. Daher ergibt die Summe aller Markierungsanteile immer Eins, auch wenn nicht alle Massen eines Metabolits gemessen werden können.

13.6 Konsistenzkontrolle der Markierungsmuster

Die Messdaten der Markierungsmuster von proteinogenen Aminosäuren wurden mit einer Methode von (van Winden 2002) auf Konsistenz überprüft. Dabei wird geschaut, ob die proteinogenen Aminosäuren, die aus gleichen Vorläufer-Metaboliten entstehen auch vergleichbare Markierungsmuster haben. Im isotopisch stationären Zustand sind die Markierungen der Metabolite, die in einem linearen Reaktionsweg liegen, gleich. Aminosäuren, die aus diesen Metaboliten entstehen, müssen daher auch gleiche Markierungsmuster aufweisen. Unterschiede deuten auf Messfehler bzw. nicht beachtete oder unbekannte Synthesewege hin und eine kritische Prüfung der Messdaten und des Modells ist dann vorzunehmen.

13.7 Parameteranpassung und Berechnung der Stoffflüsse

Für die ^{13}C -Stoffflussanalysen auf Basis der Markierungsmuster der Proben, die am Ende der Batch- und Fedbatch-Markierungsphasen aus dem Reaktor entnommen wurden (Kapitel 11.1 und 11.2), wurde das Werkzeug 13CFLUX (Wiechert 2001) zur Durchführung von isotopisch stationären Stoffflussanalysen verwendet.

Für die Berechnungen auf Basis der isotopisch instationären Markierungsdaten wurde das Tool 13CFLUX/INST eingesetzt, welches speziell für die isotopisch instationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse entwickelt wurde (Nöh and Wiechert 2004). Die Parameteranpassung ist ein sehr rechenintensiver Prozess. Daher wurde die Parameteranpassung zur Berechnung der Stoffflüsse und Poolgrößen von Katharina Nöh auf einem Rechencluster an der Universität Siegen durchgeführt. Für die Anpassung der Messdaten werden abhängig von den Startwerten im Schnitt zwischen mehreren Stunden und einigen Tagen benötigt. Die Parameteranpassung wurde mit verschiedenen Varianten des Netzwerkmodells durchgeführt mit dem Ziel, ein Modell zu finden, welches die Vorgänge in der Zelle am besten abbildet. In Kapitel 22.7 werden einige dieser Varianten diskutiert.

13.8 Verwendete Netzwerkmodelle

13.8.1 Netzwerkmodell des *E. coli* K12 Wildtyps

Als Basis für die ^{13}C -Stoffflussanalysen wurde ein in der Literatur für *E. coli* vielfach beschriebenes stöchiometrisches Netzwerk mit den zugehörigen C-Atom-Transitionen verwendet (Emmerling et al. 2002; Nöh et al. 2006; Wahl et al. 2004; Zhao and Shimizu 2003). Bei diesem sind eine Reihe von Pools zusammengefasst, die in einem linearen oder zyklischen Reaktionsweg ohne weitere Zuflüsse liegen oder zwischen denen hohe Austauschflüsse existieren. Dieses als *Pool-lumping* bezeichnete Vorgehen wird in der stationären Stoffflussanalyse oftmals zur Vereinfachung komplexer Stoffflussnetzwerke angewendet und ist möglich, wenn bei einer Reaktion keine Veränderung des Markierungsmusters auftritt.

In der **Glykolyse** sind die Pools Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zum Pool *GAP* und die auf einem linearen Reaktionsweg liegenden Phosphoglycerate (1,3-PG, 3-PG und 2-PG) im Modell zum Pool *xPG* zusammengefasst. Das Substrat Glukose wird bei *Escherichia coli* über das PTS-System aufgenommen. Dabei entsteht pro Mol Glukose aus einem Mol Phosphoenolpyruvat ein Mol Pyruvat. Als Nebenbedingung muss daher gelten, dass der Fluss *emp6* ($\text{PEP} \rightarrow \text{PYR}$) größer als die Glukoseaufnahme (*upt*) ist.

Im **Pentose-Phosphat-Weg** sind die auf einem linearen Reaktionsweg liegenden Metabolite 6-Phosphoglucono- δ -lacton und Gluconat-6-phosphat im Pool *PG6* zusammengefasst. Zwischen den Metaboliten Ribulose-5-phosphat (Ru5P), Ribose-5-phosphat (Rib5P) und Xylulose-5-phosphat (Xyl5P) existieren große Austauschflüsse. Aus diesem Grund weisen diese Metabolite gleiche Markierungsmuster auf und können zu einem Pool *P5P* zusammengefasst werden (Fischer and Sauer 2003).

Der von Gluconat-6-phosphat (6PG) abzweigende **Entner-Doudoroff-Weg** (*edp*) wurde im Modell vereinfacht durch die Reaktion $\text{edp: PG6} \rightarrow \text{GAP} + \text{PYR}$ dargestellt.

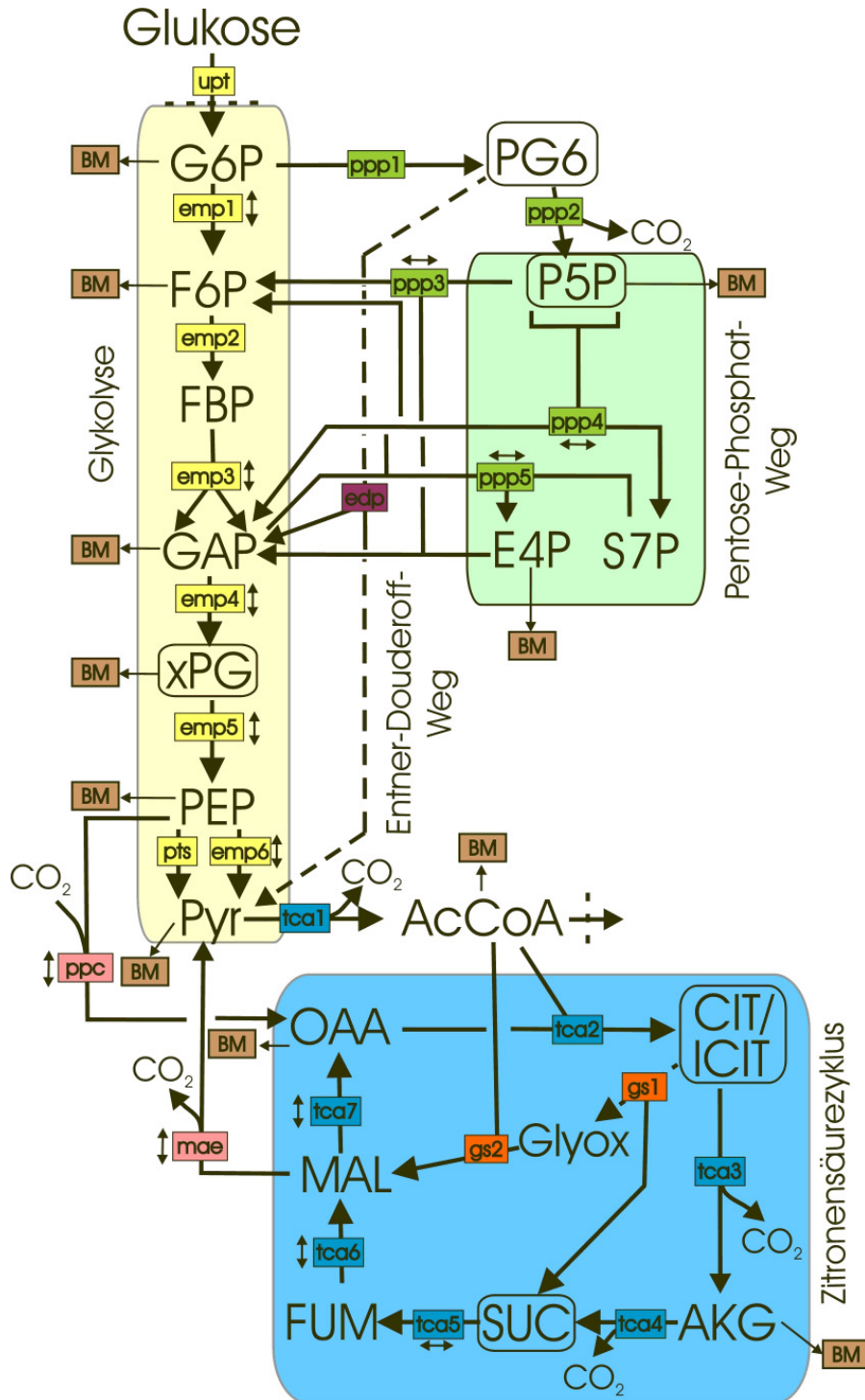
Im **Zitronensäurezyklus (TCA)** wurden die im zyklischen Reaktionsweg liegenden Metabolite Citrat (CIT), cis-Aconitat (AcN) und Isocitrat, von denen keine Markierungsmessungen vorliegen, zum Pool *ICIT* zusammengefasst. Der Metabolit Succinyl-CoA wurde zusammen mit Succinat zu einem Pool (*SUC*) zusammengefasst.

Die **anaplerotischen Reaktionen** (*pckA*, *ppc*, *maeB*, *sfcA*), die die Metabolite Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (PYR) der Glykolyse mit den Metaboliten Malat (MAL) und Oxaloacetat (OAA) des Zitronensäurezyklus (TCA) verbinden, wurden im Modell durch zwei bidirektionale Reaktionen (*ppc*: $\text{PEP} \leftrightarrow \text{OAA}$ und *mae*: $\text{MAL} \leftrightarrow \text{PYR}$) dargestellt.

Tabelle 13-2: Netzwerk- und C-Atom-Transitionsmodell für den *E. coli* K12 Wildtyp.

Name des Flusses	Reaktion	C-Atom-Verteilung
upt	Glc \rightarrow G6P	#ABCDEF \rightarrow #ABCDEF
emp1	G6P \rightarrow F6P	#ABCDEF \rightarrow #ABCDEF
emp2	F6P \rightarrow FBP	#ABCDEF \rightarrow #ABCDEF
emp3	FBP \rightarrow GAP + GAP	#ABCDEF \rightarrow #ABC + #FED
emp4	GAP \rightarrow xPG	#ABC \rightarrow #ABC
emp5	xPG \rightarrow PEP	#ABC \rightarrow #ABC
emp6	PEP \rightarrow PYR	#ABC \rightarrow #ABC
edp	PG6 \rightarrow GAP + PYR	#ABCDEF \rightarrow #ABC + #DEF
ppp1	G6P \rightarrow PG6	#ABCDEF \rightarrow #ABCDEF
ppp2	PG6 \rightarrow P5P + CO ₂	#ABCDEF \rightarrow #BCDEF + #A
ppp3	P5P + E4P \rightarrow GAP + F6P	#ABCDE + #abcd \rightarrow #CDE + #ABabcd
ppp4	P5P + P5P \rightarrow S7P + GAP	#ABCDE + #abcde \rightarrow #ABabcde + #CDE
ppp5	GAP + S7P \rightarrow E4P + F6P	#ABC + #abcdefg \rightarrow #defg + #abcABC
tcc1	PYR \rightarrow AcCoA + CO ₂	#ABC \rightarrow #BC + #A
tcc2	OAA + AcCoA \rightarrow Cit Cit	#ABCD + #ab \rightarrow #DCBAba
tcc3	ICIT \rightarrow AKG + CO ₂	#ABCDEF \rightarrow #ABCEF + #D
tcc4	AKG \rightarrow SUC + CO ₂	#ABCDE \rightarrow #BCDE + #A
tcc5a	SUC \rightarrow FUM	#ABCD \rightarrow #ABCD
tcc5b	SUC \rightarrow FUM	#ABCD \rightarrow #DCBA
tcc6	FUM \rightarrow MAL	#ABCD \rightarrow #ABCD
tcc7	MAL \rightarrow OAA	#ABCD \rightarrow #ABCD
gs1	ICIT \rightarrow GlyOx + SUC	#ABCDEF \rightarrow #AB + #DCEF
gs2	GlyOx + AcCoA \rightarrow MAL	#AB + #ab \rightarrow ABba
ppc	PEP + CO ₂ \rightarrow OAA	#ABC + #a \rightarrow #ABCa
mae	MAL \rightarrow PYR + CO ₂	#ABCD \rightarrow #ABC + #D

Abbildung 13.1: Stoffflussnetzwerk mit Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Zitronensäurezyklus für *E. coli* K12, welches für die ^{13}C -Stoffflussanalyse auf Basis der isotopisch stationären Markierungsdaten aus dem Batch-Experiment verwendet wurde. Die zusammengefassten Pools sind mit einem Oval dargestellt, Doppelpfeile neben den Flussbezeichnungen kennzeichnen Flüsse, die als bidirektional angenommen wurden.



13.8.2 Netzwerkmodell für *E. coli* F82pC22

Als Basis für das Netzwerkmodell von *E. coli* F82pC22 wurde das für den *E. coli* Wildtyp in Kapitel 13.8.1 beschriebene Modell verwendet. Dieses wurde um den Syntheseweg zur Bildung des Produkts 3,4-CHD erweitert.

Tabelle 13-3: Erweiterung des *E. coli*- Netzwerk- und Isotopomerenmodell um den Biosyntheseweg für das Produkt 3,4-CHD

Name	Reaktion	C-Atom-Verteilung
chd1	PEP + E4P → DAHP	#ABC + #abcd → #ABCabcd
chd2	DAHP → SHIK	#ABCDEFG → #BCDEFGA
chd3	PEP + SHIK → CHOR	#ABC + abcdefg → #abcdefgBAC
chd4	CHOR → CHD + PYR	#ABCDEFGHIJ → #ABCDEFG + #IHJ

Für die Stoffflussanalyse auf Basis der 2D-NMR-Markierungsdaten der proteinogenen Aminosäuren, musste das Modell zusätzlich um die – stark vereinfachten – Biosynthesewege der gemessenen Aminosäuren erweitert werden. Bei einigen Aminosäuren entsprechen die Markierungsmuster denen der Vorläufermetaboliten des Zentralstoffwechsels, da sich auf den linearen Reaktionswegen vom Zentralstoffwechsel zu den entsprechenden Aminosäuren das Kohlenstoff-Gerüst nicht verändert. Bei den folgenden Aminosäuren: *Alanin*, *Arginin*, *Asparat*, *Glutamat*, *Methionin*, *Prolin*, *Serin/Cystein* und *Threonin* wurden die gemessenen Markierungsmuster der Aminosäuren daher direkt den Vorläufermetabolit zugeordnet, so dass die Reaktionswege dieser Aminosäuren nicht gesondert modelliert werden mussten.

Tabelle 13-4: Erweiterung des Netzwerk- und Isotopomerenmodells um die Aminosäurebiosynthesewege der gemessenen Aminosäurepools für die SFA auf Basis der 2D-NMR Daten

Name	Reaktion	C-Atom-Verteilung
val	PYR + PYR → Val + CO ₂	#ABC + #abc → #ABbcC + #a
leu	Val + AcCoA → Leu + CO ₂	#ABCDE + #ab → #abBCDE + #A
his	P5P → His	#ABCDE → #EDCBA
trp	CHOR + P5P → Trp + PYRCO ₂	#ABCDEFGHIJ + #abcde → #edcbaJEFGHI + #ABCDE
pyrco2	PYRCO ₂ → PYR + CO ₂	#ABCD → #ABC + #D
ile	OAA + PYR → Ile + CO ₂	#ABCD + #abc → #ABbCDc + #a
lys	OAA + PYR → Lys + CO ₂	#ABCD + #abc → #ABCDcb + #a

13.8.3 Netzwerkmodell der isotopisch instationären SFA

Das verwendete Modell des *E. coli* K12 Wildtyps entspricht im wesentlichen dem im 13.8.1 für die stationäre Stoffflussanalyse beschriebenen Netzwerkmodell. Zusätzlich zu den Netto- und Austauschflüssen (ν) und den Markierungsdaten (\mathbf{x} , \mathbf{x}^{inp}) werden bei der instationären Stoffflussanalyse die Poolgrößen benötigt, die im Vektor \mathbf{X} zusammengefasst sind. Die Markierungsdaten $\mathbf{x}(t)$ müssen zeitlich aufgelöst vorliegen. Auf Grund der vorausgesetzten metabolischen Stationarität während des Markierungsexperiments werden die Poolgrößen und die gemessenen extrazellulären Flüsse (\mathbf{w}) nur zu einem Zeitpunkt des Experiments benötigt.

In der stationären Stoffflussanalyse ist das Zusammenfassen (*Pool lumping*) von Metabolitpools, die in einem linearen Reaktionsweg liegen und bei denen keine Änderung des Markierungszustands stattfindet bzw. bei Metaboliten zwischen denen große Austauschflüsse existieren zur Vereinfachung des Modells und zur Beschleunigung der Flussberechnung möglich. Dieses Konzept lässt sich nicht ohne weiteres auf die isotopisch instationäre Stoffflussanalyse übertragen, da jeder Pool zu einer – je nach Größe des Pools unterschiedlichen – zeitlichen Verzögerung der Markierungsanreicherung führt. Findet bei der Reaktion zwischen zwei Pools keine Veränderung des C-Skeletts statt und existieren keine Zu- und Abflüsse für einen der beiden Pools ist ein Zusammenfassen in der Regel möglich. Es muss jedoch die zeitliche Verzögerung in jedem Pool durch eine Vergrößerung des Gesamtpools (Summe der Poolgrößen) beachtet werden. Im hier verwendeten *E. coli* Netzwerk wurden die folgenden zusammengefassten Pools xPG (13PG+2PG+3PG), PG6 (PGL+6PG), CIT/ICIT (Cit+AcN +ICit), SUCFUM (Succ, SucCoA, FUM) und P5P (Rib5P +Rul5P+Xyl5P) eingeführt.

Dass ein Zusammenfassen dieser Pools möglich ist, wurde von Katharina Nöh durch Simulationsstudien gezeigt (Nöh and Wiechert 2006). Das für die instationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse verwendete Netzwerkmodell besteht aus insgesamt 23 Metabolitpools (davon 17 gemessen), 86 Netto- und Austauschflüssen (davon 20 als freie Flüsse gewählt) und 12 Abflüssen in die Biomasse, die aus der Wachstumsrate und der Biomassezusammensetzung berechnet werden konnten (Kapitel 13.1). Das Netzwerkmodell ist im Anhang A.9 dargestellt.

14 Flux-Balance-Analyse

14.1 Stöchiometrisches Modell

Zur Berechnung der für eine maximale Produktbildung optimalen Stoffflusslagen des *E. coli* F82pC22 mittels FBA wurde ein stöchiometrisches Modell (Anhang A.8) verwendet, welches im wesentlichen dem für die ^{13}C -Stoffflussanalyse entspricht. Im Unterschied zu dem Modell für die Stoffflussanalyse wurden keine Pools zusammengefasst und es wurden zusätzlich die Co-Faktoren (ATP, ADP, AMP, NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺) bilanziert.

Es wurde angenommen, dass die NAD(P)-trans-Hydrogenase (Reaktion *thy*) nicht limitierend ist und somit ATP in ausreichender Menge über die oxidative Phosphorylierung aus NADH bereitgestellt werden kann (Bizouarn et al. 2000). Hierzu wurde eine Reaktion *resp* definiert, die pro Proton 1,8 ATP liefert. Die Regeneration von AMP ist über die Adenylate-Kinase (Reaktion *e1*) möglich.

Um auch das Wachstum während der drei Experimente abzubilden, wurde eine Reaktion mit der Bezeichnung *grow* definiert. Die zum Wachstum benötigten Metabolite und Co-Faktoren müssen aus dem Stoffwechsel bereitgestellt werden. Hierzu wurden Koeffizienten a_1 bis a_{14} definiert, die die Mengen der für das Wachstum benötigten Metaboliten und Co-Faktoren bezeichnen (Anhang A.8).

14.2 Optimierung der Produktausbeute

Die Berechnung der optimalen Stoffflusslage für eine maximale Ausbeute erfolgte mit dem frei zugänglichen Programm *MetaTool* (Pfeiffer et al. 1999). Hierbei werden für ein vorgegebenes metabolisches Netzwerk sogenannte Elementarmoden (Schuster et al. 2002) berechnet. Dies sind alle stöchiometrisch möglichen Wege vom Substrat zum Produkt, die sich nicht weiter in eine Linearkombination von Flussvektoren zerlegen lassen und somit zu sehr einfachen Lösungen führen, da ein Maximum an Flüssen Null ist. Aus diesen Elementarmoden können dann optimale Flusslagen abgeleitet werden, die es erlauben, theoretisch maximal mögliche Ausbeuten zu berechnen (Schuster et al. 1999; Schuster and Hilgetag 1994). Die Ergebnisse der *Flux-Balance-Analyse* sind in Kapitel 16.6 dargestellt.

Teil III

Isotopisch stationäre
¹³C-Stoffflussanalysen

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse aus dem Batch-Markierungsexperiment mit dem *E. coli* K12 Wildtyp (Kapitel 15) und dem Fed-Batch Markierungsexperimente mit dem 3,4-CHD Produzenten *E. coli* F82pC22 (Kapitel 16) dargestellt und werden diskutiert. Bei diesen Experimenten wurde am Ende einer mehrstündigen Markierungsphase eine Probe genommen und die Markierung in den intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels massenspektrometrisch analysiert. Beim Experiment mit dem Stamm *E. coli* F82pC22 wurde zum Vergleich zusätzlich die Markierung mit 2D-NMR in den proteinogenen Aminosäuren analysiert (16.4). Mit diesen Daten wurden unter Nutzung des Programms 13CFLUX isotopisch stationäre ^{13}C -Stoffflussanalysen (16.5 und 16.8) durchgeführt.

Ziel des Experiments mit dem *E. coli* Wildtyp war es, zu untersuchen, ob die auf Basis der massenspektrometrisch gemessenen Markierungsdaten ermittelten Stoffflüsse vergleichbar sind zu Literaturdaten bei denen die Stoffflüsse auf Basis von Markierungsdaten der proteinogenen Aminosäuren bestimmt wurden. Zudem wurde mit den im Programm 13CFLUX etablierten statistischen Methoden die Güte der Messdaten untersucht.

Beim Experiment mit dem Stamm *E. coli* F82pC22 sollte mittels ^{13}C -Stoffflussanalyse die Veränderung der Stoffwechselforgänge eines Produktionsstamms im Laufe einer Fermentation untersucht werden. Hierzu wurde der Sensorreaktor parallel zu einem Produktionsreaktor betrieben und drei Markierungsexperimente durchgeführt. Auf Basis der Markierungsdaten wurden für alle drei Phasen die Stoffflüsse ermittelt und die Ergebnisse mit den berechneten Stoffflüssen einer *Flux-Balance-Analyse* (16.6) verglichen.

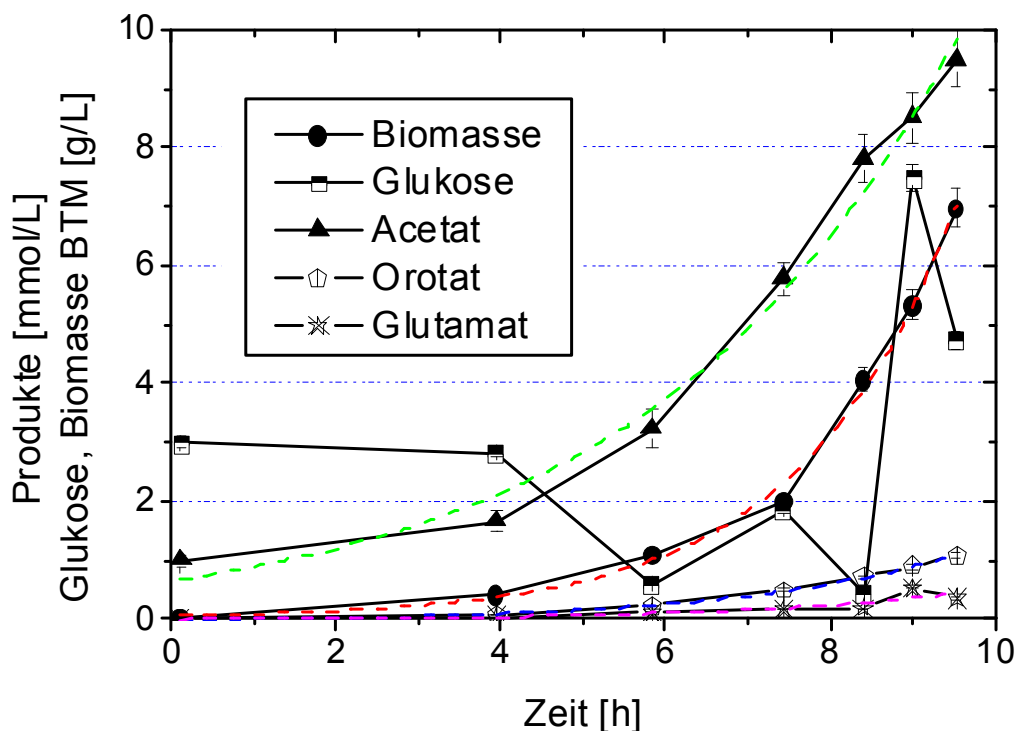
15 Stationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse für *E. coli* K12

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der stationären Stoffflussanalyse des Wildtyps von *E. coli* K12 basierend auf den gemessenen Massenisotopomeren der intrazellulären Metabolite dargestellt. Während des Markierungsexperiments wurde vom Beginn der Fermentation bis zur Ernte der Zellen eine Mischung von ^{13}C -markierter Glukose konstanter Zusammensetzung zur Kultur gegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase. Nach der chemischen Extraktion der Metabolite des Zentralstoffwechsels wurde die Markierung mittels LC-MS/MS gemessen. Die Stoffflussanalyse erfolgte auf Basis dieser Daten und den gemessenen extrazellulären Raten.

15.1 Markierungsexperiment

In der folgenden Abbildung ist der Konzentrationsverlauf von Biomasse, Glukose und den Nebenprodukten dargestellt. Nach etwa 6 Stunden wurde die Glukosezufuhr gestartet und damit die Glukosekonzentration im Bereich zwischen 0,5 und 2 g/l gehalten. Am Ende der Fermentation kam es durch eine zu hohe Glukosezugabe zu einem Anstieg der Konzentration auf etwa 7 g/l. Wie in Abbildung 15.1 zu sehen, hatte dies keine Auswirkungen auf die Biomasse- und Acetatbildung in diesem Zeitraum. Bei *E. coli* ist eine erhöhte Acetat-Bildung erst bei einer höheren Glukosekonzentration zu erwarten (Holms 1996).

Abbildung 15.1: Konzentrationsverläufe während des Markierungsexperiments mit *E. coli* K12 und exponentielle Anpassung der Messdaten (gestrichelte Linien).



Anhand der zeitlichen Veränderung der Biotrockenmasse sieht man, dass der *E. coli*-Stamm mit dem verwendeten Minimalmedium nur eine sehr kurze Lag-Phase hatte und dann exponentiell wächst. In vergleichbaren Wachstumsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die exponentielle Wachstumsphase bis zu einer Biotrockenmasse von etwa $17 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{l}$ anhält. Die Ernte der Biomasse erfolgte bei einer Konzentration von etwa $7 \text{ g}_{\text{BTM}}/\text{l}$. Auch die Bildung der Produkte verläuft exponentiell, wie die Anpassung der Messdaten (gestrichelte Linien) zeigt. Auf Grund des durchgehend exponentiellen Wachstums der Kultur kann man davon ausgehen, dass sich der Stoffwechsel während des Markierungsexperiments in einem annähernd stationären Zustand befand. Neben der Biomasse wurden nur Acetat und CO_2 gebildet. Die Konzentration anderer Nebenprodukte war auch nach 9 Stunden noch unter 1 mmol/l .

In der folgenden Tabelle sind die Verbrauchs- und Produktionsraten der Fermentation dargestellt. Die gezeigten Raten wurden auf Grundlage der gemessenen und in Abbildung 15.1 dargestellten extrazellulären Konzentrationen berechnet. Die angegebenen Standardabweichungen beruhen auf den Messergebnissen von drei Kultivierungen (siehe Anhang B.1). Die mit diesen Raten erstellte Kohlenstoff-Bilanz konnte zu über 99% geschlossen werden.

Tabelle 15-1: Verbrauchs- und Produktionsraten während des ^{13}C -Markierungsexperiments und Anteil an der Kohlenstoffbilanz

	Glukose [mmol/(g·h)]	Biomasse [1/h]	Acetat [mmol/(g·h)]	Orotat [mmol/(g·h)]	CER¹ [mmol/(g·h)]
Rate	-5,90 ($\pm 0,10$)	0,56 ($\pm 0,02$)	0,67 ($\pm 0,03$)	0,06 ($\pm 0,001$)	8,70 ($\pm 0,49$)
C-Bilanz	-100 %	68 %	4 %	1 %	26 %

¹CER = Carbon excretion rate (CO_2 -Bildungsrate)

15.2 Markierungsmessung

Nach der Extraktion wurden die Markierungsmuster in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels und den freien Aminosäuren mittels LC-MS/MS gemessen und die Daten für die natürliche Isotopenanreicherung korrigiert. In der Tabelle 15-2 sind die massenspektrometrisch gemessenen Metabolite und Massenisotopomere angegeben, die für die Stoffflussanalyse verwendet wurden. Auf Grund einer teilweise zu geringen Konzentration konnten nicht alle Massen gemessen werden. Die Ermittlung der relativen Standardabweichungen erfolgte auf der Basis von 5 Proben, von denen jeweils die Metabolite extrahiert und die Massenisotopomere gemessen wurden. Die Markierungsdaten wurden auf Konsistenz überprüft, um mögliche Messfehler und Abweichungen zur Modellvorstellung zu entdecken.

Tabelle 15-2: Mittels LC-MS/MS gemessene Massenisotopomere für die Metabolite des Zentralstoffwechsels und der freien Aminosäuren (0 = m/z+0; 1 = m/z+1; etc.)

Metabolit	Massenisotopomere [-] Standardabweichung [-]						
	0	1	2	3	4	5	6
AKG	0,003 ±0,001	0,289 ±0,056	0,260 ±0,022	0,239 ±0,044	0,130 ±0,022	0,080 ±0,017	
DHAP	0,455 ±0,235	0,205 ±0,124	0,035 ±0,020	0,305 ±0,161			
F6P	0,289 ±0,035	0,372 ±0,053		0,026 ±0,010	0,013 ±0,012	0,030 ±0,009	0,271 ±0,055
FBP	0,242 ±0,052	0,334 ±0,074	0,035 ±0,008	0,050 ±0,011	0,042 ±0,005	0,029 ±0,006	0,268 ±0,061
FUM	0,200 ±0,126	0,258 ±0,037	0,318 ±0,091	0,130 ±0,066	0,094 ±0,007		
G6P	0,271 ±0,052	0,365 ±0,069	0,036 ±0,009	0,028 ±0,002	0,021 ±0,003	0,025 ±0,005	0,255 ±0,046
PEP	0,485 ±0,099	0,135 ±0,026	0,030 ±0,006	0,350 ±0,068			
PYR	0,452 ±0,066	0,171 ±0,020	0,023 ±0,003	0,354 ±0,040			
xPG	0,495 ±0,094	0,127 ±0,024	0,025 ±0,008	0,353 ±0,073			
Rib5P	0,353 ±0,076	0,142 ±0,040	0,118 ±0,049	0,149 ±0,049	0,041 ±0,028	0,197 ±0,046	
SUC	0,146 ±0,014	0,255 ±0,020	0,334 ±0,029	0,191 ±0,016	0,074 ±0,006		
Xyl5P/Rul5P	0,358 ±0,099	0,129 ±0,051	0,164 ±0,031	0,138 ±0,052	0,028 ±0,010	0,184 ±0,054	
ALA	0,536 ±0,091	0,144 ±0,071	0,016 ±0,006	0,304 ±0,082			
ASN	0,240 ±0,066	0,264 ±0,126	0,216 ±0,102	0,188 ±0,090	0,092 ±0,048		
ASP	0,256 ±0,031	0,251 ±0,031	0,221 ±0,024	0,172 ±0,019	0,102 ±0,011		
GLUT	0,129 ±0,007	0,188 ±0,008	0,268 ±0,012	0,234 ±0,010	0,122 ±0,006	0,060 ±0,003	
PRO	0,228 ±0,037	0,177 ±0,011	0,225 ±0,015	0,200 ±0,014	0,110 ±0,007	0,059 ±0,005	
THR	0,303 ±0,074	0,228 ±0,024	0,190 ±0,015	0,176 ±0,016	0,105 ±0,008		

In der *Glykolyse* sind im Rahmen der Messgenauigkeit die Markierungsmuster der Metabolite Glukose-6-phosphat (G6P), Fruktose-6-phosphat (F6P) und Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP) gleich. Zusätzlich sieht man, dass hier neben den Massen 0, 1 und 6 (entsprechend der Markierung des eingesetzten Substrats) auch die Massen 2, 3, 4 und 5 auftreten. Diese entstehen beim Stofffluss über den Pentose-Phosphat-Weg.

Durch die bidirektionale Reaktion der Glukosephosphat-Isomerase ($\text{G6P} \rightleftharpoons \text{F6P}$) findet sich diese Markierung auch im G6P wieder, so dass G6P eine andere Zusammensetzung als das eingesetzte Markierungssubstrat aufweist. Die Markierung von Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP) konnte nicht gemessen werden. Da jedoch die Markierung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und den, mit der verwendeten LC-MS/MS Methode nicht trennbaren, isobaren Phosphoglycerate (1,3-PG, 3-PG und 2-PG) im Rahmen der Messgenauigkeit gleich ist, kann man davon ausgehen, dass auch GAP ein vergleichbares Markierungsmuster aufweist. Auch die Massenisotopomerenanteile von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (PYR) sind trotz der verschiedenen Enzymreaktionen mit den Metaboliten des Zitronensäurezyklus vergleichbar. Die Aminosäure Alanin (ALA) entsteht aus Pyruvat und hat daher wie erwartet ein ähnliches Markierungsmuster.

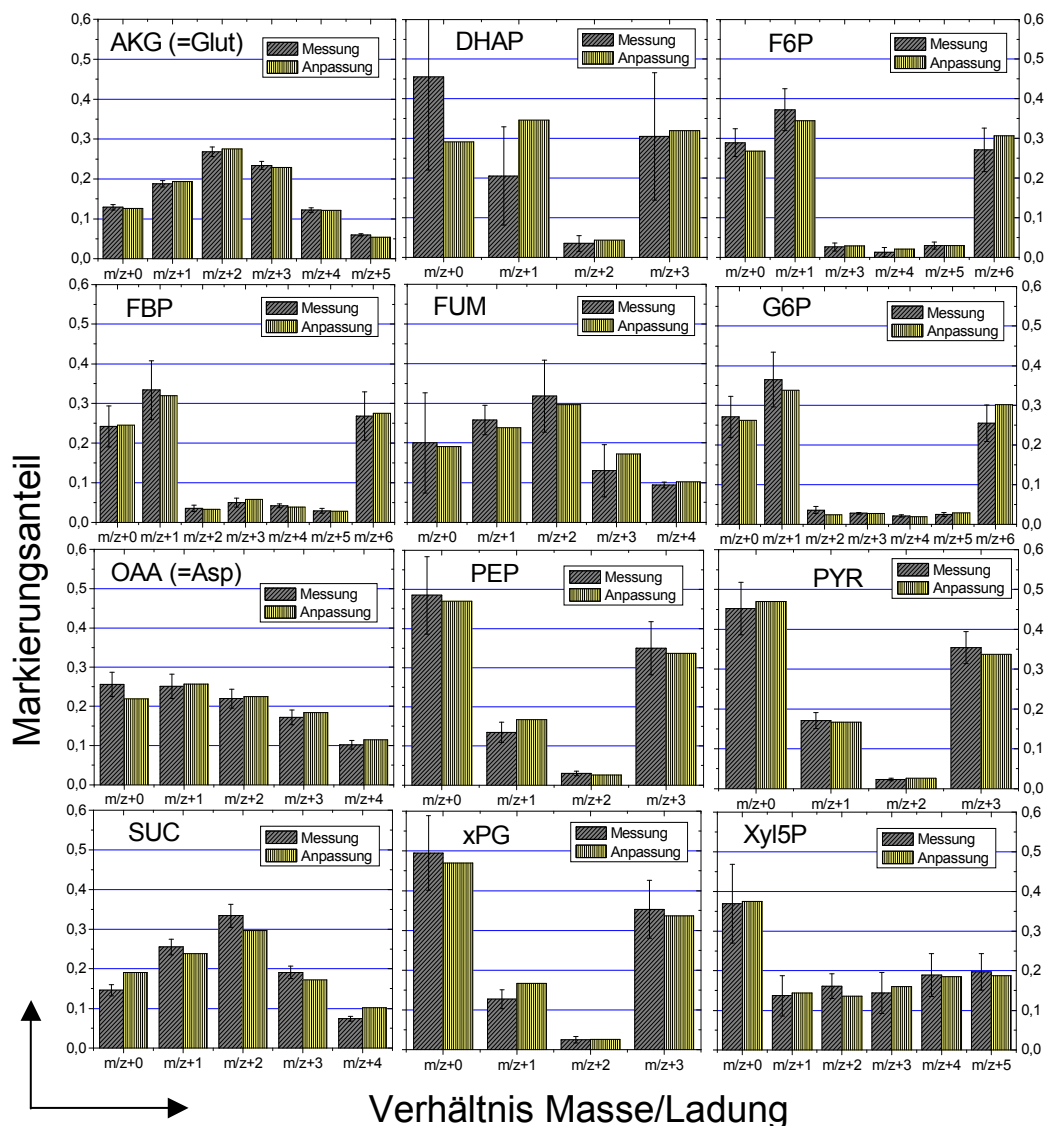
Im ***Pentose-Phosphat-Weg*** weisen die Pentosen Ribulose-5-phosphat (Ru5P), Ribose-5-phosphat (Rib5P) und Xylulose-5-phosphat (Xyl5P) gleiche Markierungsmuster auf, was auf einen hohen Austauschfluss zwischen den Metaboliten zurückzuführen ist. Die Markierungen von Erythrose-4-phosphat (E4P) konnten auf Grund einer zu geringen Konzentration nicht bestimmt werden.

Im ***Zitronensäurezyklus (TCA)*** konnten die Massenisotopomere von α -Ketoglutarat (AKG), Succinat (SUC) und Fumarat (FUM) gemessen werden. Die gemessenen Massenisotopomere der im zyklischen Reaktionsweg liegenden Metabolite SUC und FUM sind gleich. Mit der gleichen Analyseverfahren war es auch möglich die Markierungsmuster der Aminosäuren Aspartat (ASP), Asparagin (ASN), Threonin (THR), Prolin (PRO) und Glutamat (GLUT) zu analysieren. Diese sind über lineare Reaktionswege ohne Änderung des C-Gerüsts mit dem Metaboliten des Zitronensäurezyklus verbunden, so dass man davon ausgehen kann, dass diese zu Oxalacetat (\equiv ASP, ASN, THR) und α -Ketoglutarat (\equiv GLUT und PRO) gleiche Markierungsmuster aufweisen. Bei den Aminosäuren ASP, ASN und THR war dies im Rahmen der Messgenauigkeit gegeben. Die Markierungsmessung $m/z+0$ und $+1$ von AKG war zu den Werten von GLUT und PRO verschieden und daher wurden diese Messungen nicht für die Anpassung verwendet.

15.3 Parameteranpassung

Mit dem im Kapitel 13.7 dargestellten Modell und den gemessenen isotopisch stationären Markierungsmustern der intrazellulären Metabolite wurde mit dem Programm 13CFLUX eine Stoffflussanalyse durchgeführt. Mit Ausnahme von DHAP ($m/z+0$ und $m/z+1$) wurde eine gute Anpassung - bei 17 Anpassungsparametern (freie Flüsse) - für die gemessenen Massen-isotopomere erreicht (siehe Abbildung 15.2). Die Fehlerquadratsumme (FQS) als Maß für die Güte der Anpassung ist für den Messdatenumfang (97 Markierungs- und Flussmessungen) mit einem Wert von 89 gering. Die größten Anteile an der FQS wurden von der Markierungsmessung von Prolin und Succinat sowie der CO₂-Bildungsrate geliefert (siehe Anhang B.1).

Abbildung 15.2: Messung und Parameteranpassung der Massen-isotopomere für das stationäre Markierungsexperiment mit dem Wildtyp von *E. coli* K12. Die Anpassung des Markierungsmusters von Rib5P entspricht der von Xyl5P und ist daher hier nicht gezeigt.



15.4 Ermittelte Stoffflüsse des Netzwerks

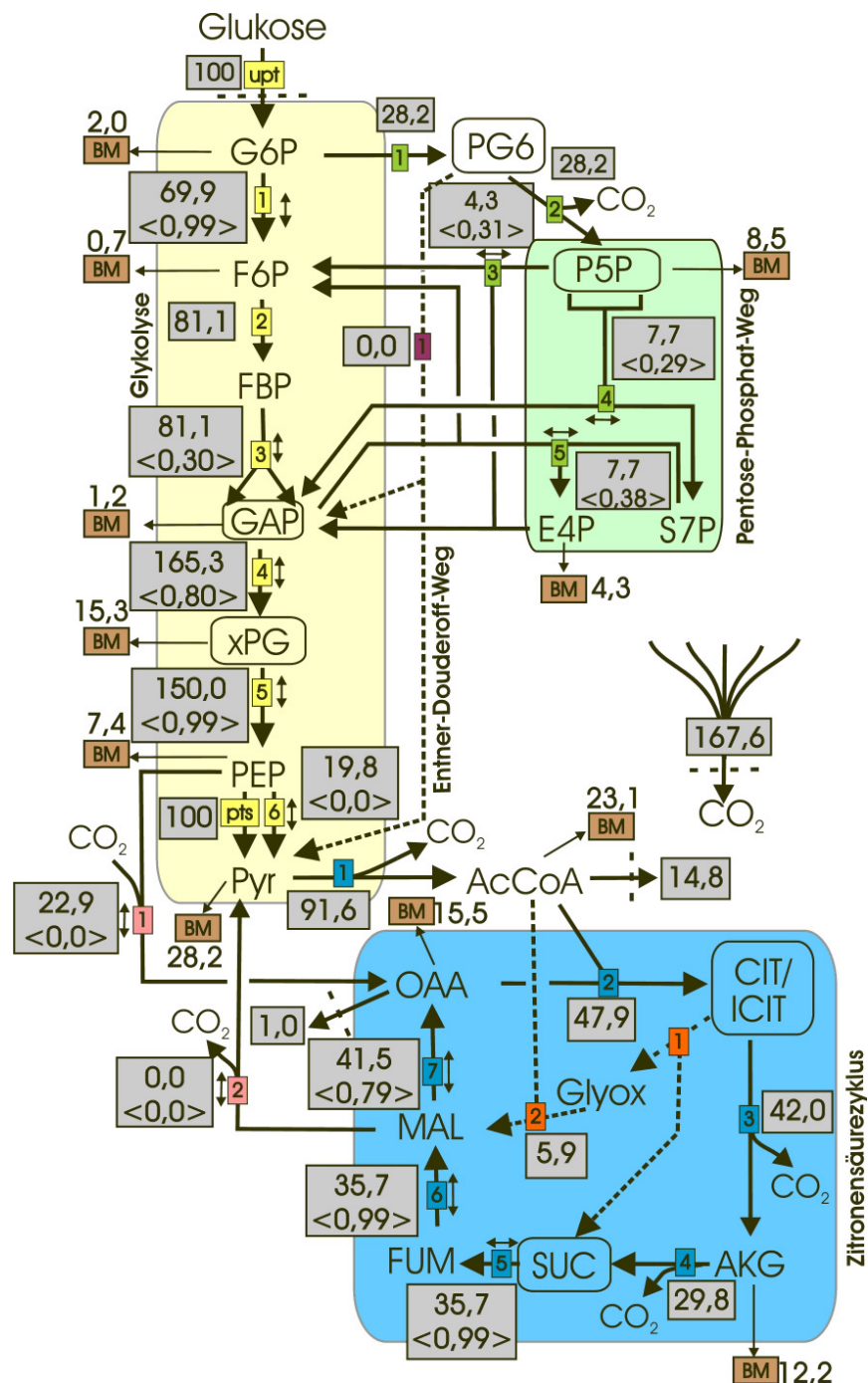
In der folgenden Tabelle sind die berechneten Flüsse zusammen mit den ermittelten Standardabweichungen dargestellt. Es zeigt sich, dass die Netto-Flüsse der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus gut bestimmbar sind. Die Flüsse im Pentose-Phosphat-Weg und der Anaplerosis (*mae*, *ppc*) sind etwas schlechter bestimmt. Die Flüsse des Glyoxylat-Wegs (*gs1/2*) und der Fluss des Entner-Douderoff-Wegs (*edp*) sind auf Basis der vorliegenden Daten nicht bestimmbar. In der Glykolyse sind hohe Austauschflüsse bei $\text{G6P} \leftrightarrow \text{F6P}$ und $\text{xPG} \leftrightarrow \text{PEP}$, und im Zitronensäurezyklus zwischen $\text{SUC} \leftrightarrow \text{FUM}$, $\text{FUM} \leftrightarrow \text{MAL}$ und $\text{MAL} \leftrightarrow \text{OAA}$ feststellbar. Viele der Austauschflüsse, vor allem *emp4*, *ppp4*, *tcc5a/b*, *tcc6*, *tcc7*, *ppc* und *mae* sind praktisch nicht bestimmbar.

Tabelle 15-3: Berechnete Stoffflüsse und Standardabweichungen für das Markierungsexperiment mit dem *E. coli* K12 Wildtyp. Die grau hinterlegten Flüsse wurden als freie Flüsse gewählt.

Name des Flusses	Nettoflüsse		Austauschflüsse	
	Net [mmol/(g _{BTM} *h)]	relative Standard- abweichung [%]	Xch[01] [-]	relative Standard- abweichung [%]
upt	5,90 (±0,17)	8,8	--	--
emp1	4,12 (±0,45)	11,0	0,99 (±0,04)	4,2
emp2	4,79 (±0,45)	9,4	--	--
emp3	4,79 (±0,45)	9,4	0,30 (±0,12)	42,2
emp4	9,75 (±0,45)	4,6	0,80 (±2,6)	325,7
emp5	8,85 (±0,45)	5,1	0,99 (±0,13)	12,9
emp6	7,06 (±0,58)	8,2	--	--
edp	0,00 (±0,50)	--	--	--
ppp1	1,66 (±0,45)	27,2	--	--
ppp2	1,66 (±0,36)	21,4	--	--
ppp3	0,25 (±0,12)	47,2	0,21 (±0,08)	26,8
ppp4	0,45 (±0,12)	26,1	0,29 (±0,26)	89,4
ppp5	0,45 (±0,12)	26,1	0,38 (±0,07)	19,2
tcc1	5,40 (±0,36)	6,7	--	--
tcc2	2,83 (±0,13)	4,5	--	--
tcc3	2,48 (±0,35)	14,1	--	--
tcc4	1,76 (±0,35)	19,9	--	--
tcc5a/b	1,05 (±0,06)	6,1	0,99 (±1,2)	125,6
tcc6	2,10 (±0,13)	6,1	0,99 (±2,3)	237,2
tcc7	2,45 (±0,39)	15,9	0,79 (±50,9)	6475,1
gs1/2	0,35 (±0,33)	96,2	--	--
ppc	1,35 (±0,37)	27,2	0,0 (±0,39)	--
mae	0,00 (±0,27)	--	0,0 (±1,3E+06)	--

In der folgenden Abbildung ist die auf die Glukoseaufnahme normierte Stoffflusslage im Zentralstoffwechsel für das durchgeführte Experiment dargestellt.

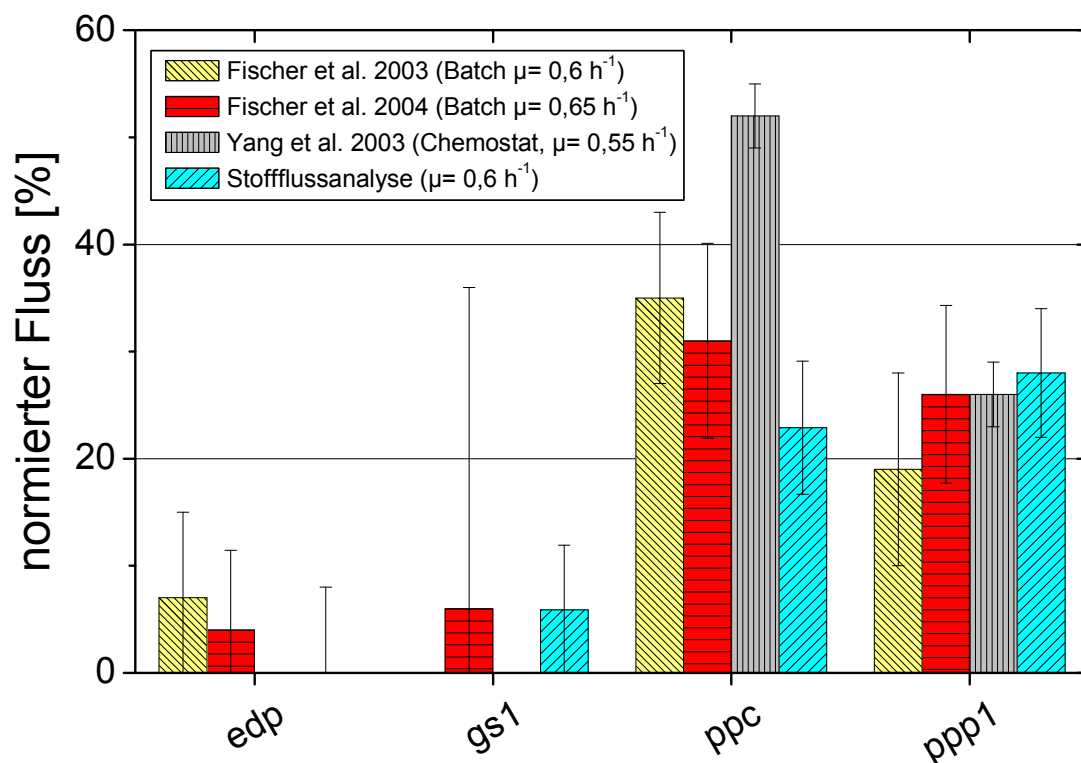
Abbildung 15.3: Mit Hilfe der Stoffflussanalyse ermittelte Stoffflusslage (normiert auf die Glukoseaufnahme) für das exponentielle Wachstum des Wildtyps *E. coli* K12. Die Pfeile geben die (bevorzugte) Richtung der Enzymreaktion unter den Kultivierungsbedingungen an. Bidirektionale Flüsse sind durch einen Doppelpfeil gekennzeichnet. Die Größe des Flusses ist im Kasten neben dem Pfeil dargestellt. Die obere Zahl steht für den Nettofluss und die untere Zahl (in $\langle \rangle$) für den Austauschfluss im Wertebereich $[0;1]$. Die Abflüsse in die Biomasse sind mit **BM** gekennzeichnet.



15.5 Vergleich der Netto-Flüsse mit Literaturdaten

Die angepassten freien Flüsse bestimmen die Stoffflusslage des Netzwerks. In der folgenden Abbildung sind die auf die Glukoseaufnahme normierten freien Netto-Flüsse des stationären Experiments im Vergleich mit Literaturwerten des *E. coli* K12 Wildtyps dargestellt. Die Wachstumsbedingungen waren bei allen Markierungsexperimenten vergleichbar. Bei Yang et al. (2003) wurde ein Chemostat verwendet, in den Arbeiten von Fischer and Sauer (2003), Fischer et al. (2004), Zhao and Shimizu (2003) wurden die Markierungsexperimente in einer Batch-Kultur durchgeführt. Die Markierungen wurden mittels GC-MS bzw. 2D-NMR (Yang et al. 2003) in den proteinogenen Aminosäuren gemessen. Bei den in der Literatur verwendeten Modellen wurden nur die Netto-Flüsse betrachtet und die Unidirektionalität der Flüsse vorausgesetzt.

Abbildung 15.4: Vergleich der berechneten (freien) Nettoflüsse des stationären Experiments für den Wildtyp *E. coli* K12 mit Literaturwerten vergleichbarer Experimente



Es zeigt sich, dass der Fluss des Entner-Doudoroff-Wegs (*edp*) in allen Arbeiten nicht gut bestimmt werden kann. In der Arbeit von Yang et al. (2003) wurde der Fluss *edp* daher im Modell nicht betrachtet. Die Größe des Flusses über Glyoxylat ist in der Arbeit von Fischer et al. (2004) vergleichbar mit der in dieser Arbeit gefundenen. Die angegebene Standardabweichung ist jedoch sehr groß. Die Autoren Yang et al. (2003) und Fischer und Sauer (2003) stellten fest, dass auch ohne einen Fluss über Glyoxylat (*gs1*) eine gute Anpassung der Markierungsmessungen möglich ist und haben diesen Fluss daher im Modell vernachlässigt.

Bei den Flüssen der Anaplerosis zeigte sich, dass vorwiegend die PEP-Carboxylase (*ppc*: $\text{PEP} \rightarrow \text{OAA}$) aktiv ist. Diese ist während des Wachstums als Auffüllreaktion für den Zitronensäurezyklus notwendig. Die Schwankungsbreite dieses Flusses ist bei den in der Literatur beschriebenen Flüssen mit Werten zwischen 24 und 52 Prozent am Größten. Die Aktivität der *Malic enzymes* (*mae*: $\text{MAL} \rightarrow \text{PYR}$) ist mit Werten zwischen 0 und 9 Prozent wesentlich geringer. Die Bestimmtheit dieses Flusses ist in allen Arbeiten gering. Es kann festgestellt werden, dass die Flüsse um den Knoten PEP/OAA und PYR/MAL mit der stationären Stoffflussanalyse nur schlecht bestimmt werden. Eine bessere Bestimmtheit der Flüsse kann mit der gleichzeitigen Zufuhr von markiertem Acetat erreicht werden, wie es in der Arbeit von Petersen et al. (2000) für *Corynebakterium glutamicum* gezeigt wurde. Ein vergleichbares Experiment ist allerdings bei *E. coli* nicht möglich, da die Aufnahme von Acetat bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose gehemmt ist. Bei vielen in der Literatur beschriebenen Stoffflussanalysen wurde daher das Netzwerk-Modell vereinfacht, indem die Pools PEP/PYR und MAL/OAA zusammengefasst wurden und der Fluss *mae^{net}* somit nicht mehr berechnet werden muss (Schmidt et al. 1997; Wahl et al. 2004; Zhao and Shimizu 2003).

Der Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg (*ppp1*) ist innerhalb der Standardabweichung vergleichbar und liegt zwischen 19 und 28 Prozent, wobei die Werte von Fischer und Sauer (2003) am stärksten abweichen. Die Werte von Yang et al. (2003) und Fischer et al. (2004), sowie die in dieser Arbeit auf Basis der Massenisotopomere der intrazellulären Metabolite bestimmten Flüsse, liegen sehr dicht beieinander.

Bei den in der Literatur für den *E. coli* Wildtyp beschriebenen Modellen wurden nur Nettoflüsse betrachtet. Aus diesem Grund konnte für die Austauschflüsse kein Vergleich der beiden Methoden angestellt werden. Die Stoffflussanalyse auf Basis der Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite zeigte jedoch, dass viele Austauschflüsse (*emp4^{xch}*, *ppp4^{xch}*, *tcc5a/b^{xch}*, *tcc6^{xch}*, *tcc7^{xch}*, *ppc^{xch}*) bei der stationären Stoffflussanalyse praktisch unbestimmbar sind.

15.6 Diskussion und Folgerungen

Die gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Stoffflussanalyse auf Basis von massenspektrometrisch bestimmten Markierungsdaten intrazellulärer Metabolite für die Durchführung von Markierungsexperimenten in der exponentiellen Wachstumsphase – bei der während der gesamten Wachstumsphase ^{13}C -markierte Glukose gefüttert wird – eine Alternative zu dem bisherigen retrobiosynthetischen Ansatz darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Markierungsmessung in den intrazellulären Metaboliten zu vergleichbaren Ergebnissen führt wie der bisher verfolgte retrobiosynthetische Ansatz (Messung der Markierung in den proteinogenen Aminosäuren mit 2D-NMR oder GC-MS). Der Umfang der gemessenen Markierungsdaten war ausreichend, um die Netto-Flüsse mit vergleichbarer Standardabweichung zu bestimmen.

Der große Vorteil der Verwendung von Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite für die stationäre Stoffflussanalyse liegt darin, dass die Markierung direkt aus dem Teil des Stoffwechsels stammt für den man auch die Stoffflüsse berechnet. Somit erhält man einen direkten Zugang zum Zentralstoffwechsel und es müssen keine Annahmen bezüglich der Aminosäurebildungswege getroffen werden. Das für die ^{13}C -Stoffflussanalyse benötigte Stoffwechselmodell ist dadurch wesentlich einfacher, wodurch Fehlerquellen im Modell minimiert werden und sich die Rechenzeiten verkürzen.

Bei der ^{13}C -Stoffflussanalyse wurde angenommen, dass sich innerhalb weniger Sekunden bis Minuten ein isotopisch stationärer Zustand im Zentralstoffwechsel der Zellen einstellt. Aus diesem Grund wird vermutet, dass sich durch die Markierungsmessung im Zentralstoffwechsel die Dauer von Markierungsexperimenten wesentlich verkürzen lässt. Dies würde die Möglichkeit bieten, auch kurze (quasi-)stationäre Phasen einer Fermentation mit der Methode der ^{13}C -Stoffflussanalyse zu untersuchen. Im Gegensatz zur Messung in den proteinogenen Aminosäuren ist bei dieser Methode auch kein Biomassewachstum während der Markierungsphase notwendig, was das Einsatzgebiet der ^{13}C -Stoffflussanalyse auf die häufig eingesetzten Produktionsprozesse ohne Biomassewachstum ausweitet. Dies sollte in den folgenden Experimenten mit dem Stamm *E. coli* F82pC22 im Laufe eines realen Produktionsprozesses untersucht werden.

16 Stoffflussanalysen mit *E. coli* F82pC22

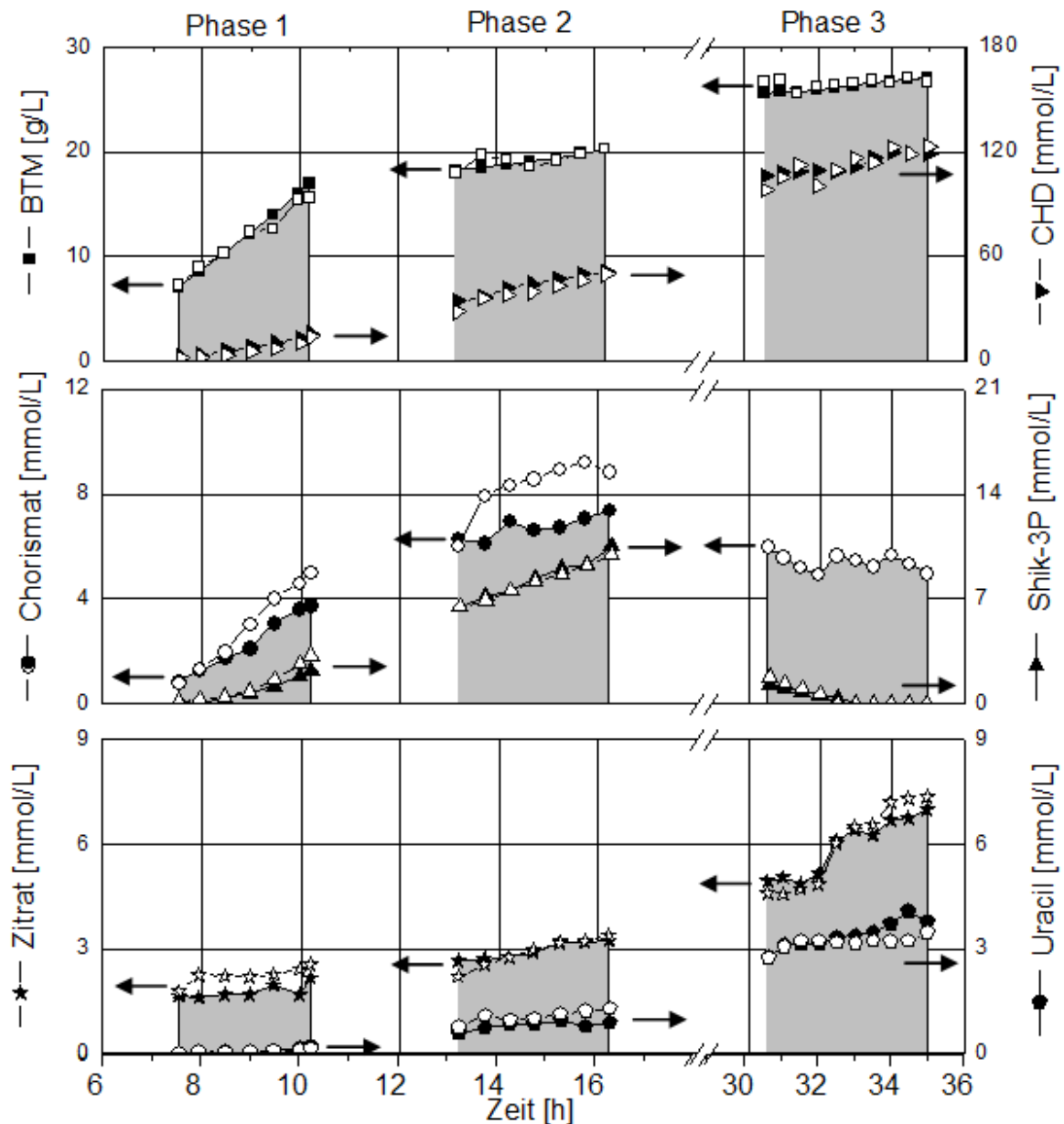
Bei der Entwicklung des Produktionsprozesses für *E. coli* F82pC22 (Bujnicki 2007) wurde festgestellt, dass nach der Limitierung der zugeführten Aminosäuren in der Produktionsphase eine Stoffwechselveränderung eintritt (siehe 11.2), die zu einer zeitlichen Abnahme der spezifischen Produktionsrate und der Glukoseaufnahme verbunden mit einem starken Anstieg der CO₂-Produktion führt. Die Gründe für die Veränderungen im Metabolismus des Stamms wurden in dieser Arbeit mit der Methode der stationären ¹³C-Stoffflussanalyse untersucht, um auf Basis dieser Ergebnisse Vorschläge zur Optimierung des *E. coli* Stamms zu machen. Gleichzeitig wurde die neu entwickelte Methode zur Durchführung von ¹³C-Stoffflussanalysen auf Basis von LC-MS/MS-Daten der intrazellulären Metabolite (Kapitel 15) für zeitlich kurze Markierungsexperimente ohne bzw. mit nur geringem Biomassewachstum angewendet. Diese Ergebnisse wurden mit der klassischen Methode der ¹³C-Stoffflussanalysen auf Basis von 2D-NMR-Messdaten proteinogener Aminosäuren verglichen.

Zur Untersuchung der Stoffwechselveränderungen wurden drei Markierungsexperimente zu verschiedenen Zeiten der Fermentation durchgeführt. Dabei wurde der Sensorreaktor parallel zu einem Produktionsreaktor betrieben und markierte Glukose kontinuierlich in den Sensorreaktor zugefüttert. Die Ergebnisse der Parallelkultivierungen und die berechneten extrazellulären Raten sind in Kapitel 16.1 dargestellt. Am Ende eines jeden Markierungsexperiments wurden die Zellen geerntet und die Markierungsmuster in den intrazellulären Metaboliten, im Produkt 3,4-CHD und in den proteinogenen Aminosäuren gemessen. Die Ergebnisse der NMR- und LC-MS/MS-Messungen sind in Kapitel 16.4 gezeigt. Auf Basis der extrazellulären Raten und der Markierungsmuster wurden mehrere ¹³C-Stoffflussanalysen durchgeführt (16.5 und 16.8) und die Ergebnisse mit der für die Produktbildung optimalen Stoffflusslagen – berechnet mittels *Flux-Balance-Analyse* – verglichen (16.6).

16.1 Konzentrationsverläufe, spezifische Raten und C-Bilanzen

Durch die Übertragung der Prozessparameter vom Produktions- auf den Sensorreaktor und der manuellen Anpassung der Zufuhrraten von Glukose und den Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden in beiden Reaktoren annähernd gleiche Fermentationsbedingungen gewährleistet. In der folgenden Abbildung sind die Konzentrationsverläufe von 3,4-CHD und den Nebenprodukten beider Reaktoren dargestellt.

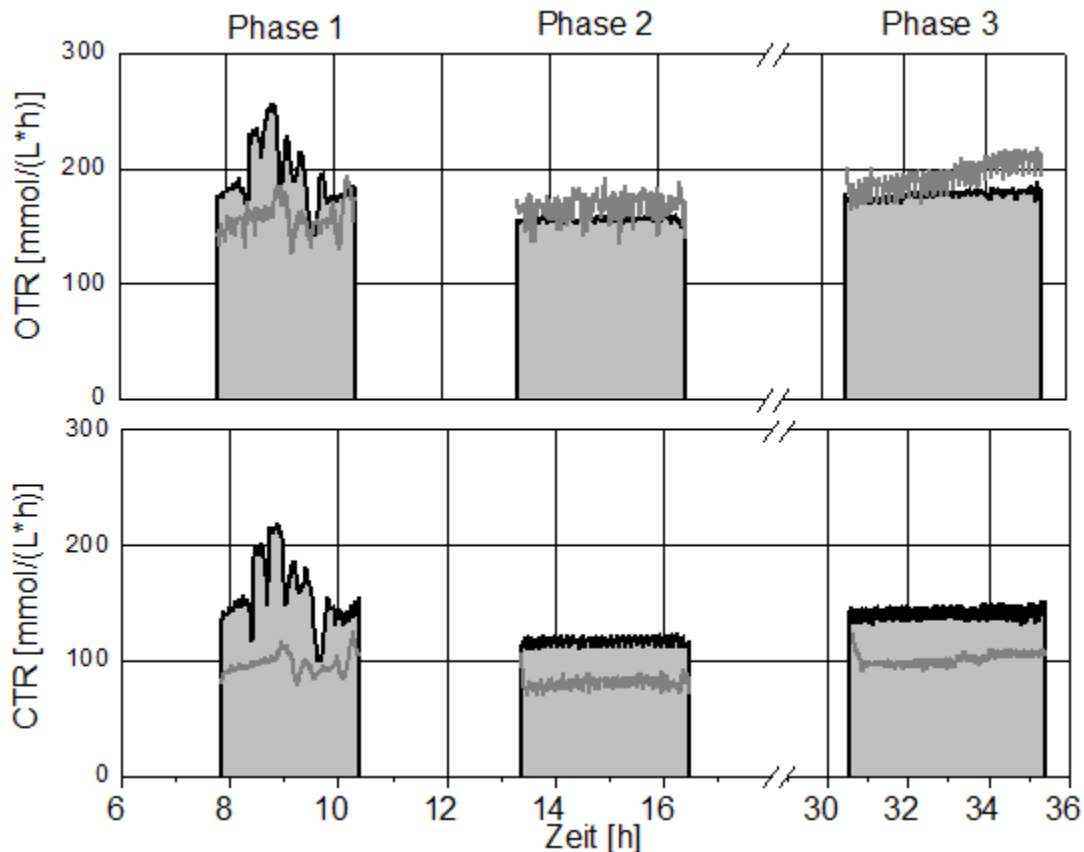
Abbildung 16.1: Vergleich der Konzentrationsverläufe im Master- (■►●▲★◆) und Sensorreaktor (□▷○△☆◇) im Laufe der drei Parallelkultivierungen von *E. coli* F82pC22. Die Daten des Produkts CHD und der Nebenprodukte Shikimate-3-phosphate und Uracil sind auf der rechten y-Achse dargestellt. Die den Messwerten zugehörigen Achsen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Im dritten Markierungsexperiment konnte Chorismat im Master nicht gemessen werden. Die Zeit-(x-)Achse ist unterbrochen, um alle drei Experimente in einer Grafik darstellen zu können.



Es zeigt sich, dass größtenteils eine sehr gute Übereinstimmung in den zeitlichen Verläufen erzielt werden konnte. Unterschiede sieht man vor allem bei Chorismat, hier ist im Sensor-Reaktor die biomassespezifische Bildungsrate im 1. und 2. Experiment geringfügig höher. Im Produktionsreaktor konnte im dritten Experiment auf Grund einer Peaküberlagerung bei der HPLC-Messung die Chorismat-Konzentration nicht bestimmt werden.

Neben den Konzentrationen in der Flüssigphase wurden auch die Abgaskonzentrationen von O_2 und CO_2 gemessen. Die folgende Abbildung zeigt die berechnete Transportrate von Sauerstoff und Kohlendioxid der beiden Reaktoren.

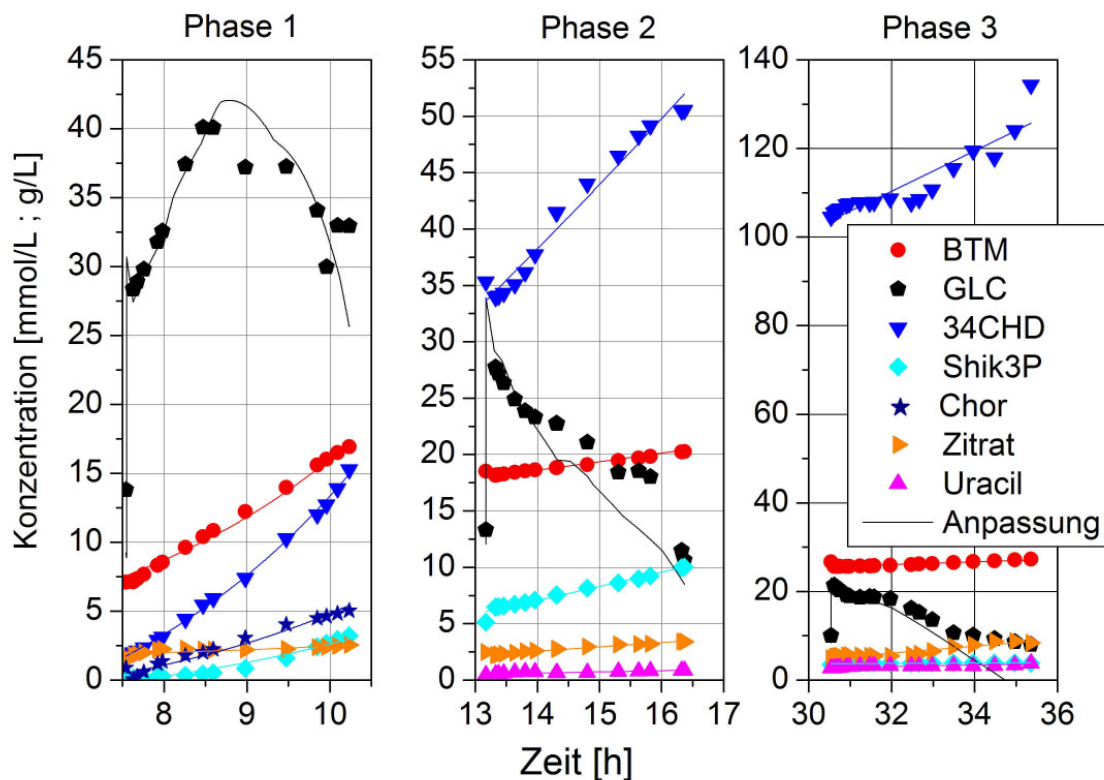
Abbildung 16.2: Vergleich der Raten von Sauerstoff (OTR) und CO_2 (CTR) im Master- (—) und Sensorreaktor (—) der Parallelkultivierungen mit *E. coli* F82pC22. Die Zeit-Achse ist unterbrochen, um alle drei Experimente in einer Grafik darstellen zu können.



Die Abweichung bei der CO_2 -Transportrate ist wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Messung der CO_2 - Abgaskonzentration im Sensorreaktor zurückzuführen. Vermutlich wurde durch eine falsche Kalibrierung des Messsignals bei der Datenaufzeichnung ein etwa um den Faktor 1,5 geringerer Werte aufgezeichnet.

Mit den gemessenen Konzentrationen wurden die für die Stoffflussanalysen benötigten extrazellulären spezifischen Raten berechnet. Hierzu wurde ein von Aljoscha Wahl (2005) am IBT-2 entwickeltes Matlab™ basiertes Optimierungstool (*FitFedBatch.m*) verwendet, welches die spezifischen Raten so anpasst, dass die Abweichung zwischen gemessener und berechneter Konzentration minimal wird. Die Anpassungen für alle drei Experimente sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

Abbildung 16.3: Gemessene Konzentrationen im Sensor-Reaktor und die durch Variation der spezifischen Raten optimierte Anpassung der Konzentrationsverläufe.



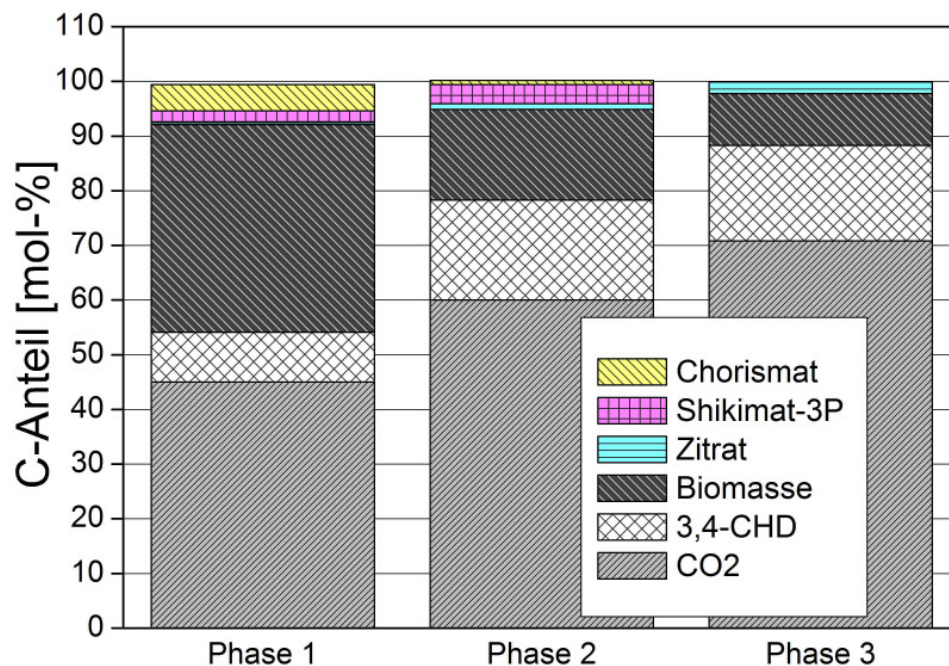
Die überwiegend sehr guten Anpassungen zeigen, dass die extrazellulären Raten während der Markierungsexperimente nahezu konstant waren bzw. sich nur geringfügig änderten (siehe auch OTR und CTR in Abbildung 16.1). Es kann daher von einem quasi-stationären metabolischen Zustand der Zellen ausgegangen werden. Die Abweichungen bei der Glukosekonzentration sind zu einem großen Teil auf die fehlerbehaftete Messung der Glukosekonzentration und der Glukosezufuhr zurückzuführen. Die berechneten spezifischen Raten sind in der folgenden Tabelle für den Produktions- und den Sensorreaktor dargestellt.

Tabelle 16-1: Vergleich der spezifischen Raten der wesentlichen Haupt- und Nebenprodukte im Master- und Sensorreaktor bei allen drei Markierungsexperimenten.

		Spezifische Raten in [mmol/(g·h)] bzw. [1/h] (für Biomassewachstum)							
Phase	Reaktor	Glukose	Biomasse	3,4-CHD	CO ₂	Shik.	Chor.	Zitrat	Uracil
Phase 1 (7,6 - 10,2 h)	42 Liter	-5,30	0,29	0,44	14,9	0,08	0,10	0,01	0
	Sensor	-5,43	0,31	0,43	-	0,10	0,16	0,02	0
Phase 2 (13,3 - 16,4 h)	42 Liter	-2,00	0,05	0,29	7,2	0,06	0,01	0,01	0,005
	Sensor	-2,00	0,05	0,31	-	0,06	0,01	0,02	0,005
Phase 3 (30,6 - 35,4 h)	42 Liter	-1,40	0,02	0,20	5,9	0,00	-	0,02	0,005
	Sensor	-1,41	0,02	0,21	-	0,00	0,00	0,03	0,01

Die berechneten Raten zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung beider Reaktoren. Im 2. und 3. Markierungsexperiment war das Biomassewachstum durch die Aminosäurelimitierung wie beabsichtigt gering. Gleichzeitig nehmen aber auch die anderen spezifischen Raten gegenüber dem ersten Experiment ab. Insbesondere die Glukoseaufnahme und die Produktbildung sinkt im Laufe der Fermentation sehr stark. Nur bei Zitrat und Uracil ist eine leichte Zunahme der Bildungsraten zu beobachten. Auf Grund der fehlerhaften CO_2 -Messung wurde für den Sensor-Reaktor keine spezifische CO_2 -Bildungsrate berechnet. Mit den berechneten spezifischen Raten wurde eine Kohlenstoffbilanz für den Sensorreaktor aufgestellt, die in der folgenden Abbildung dargestellt ist. Zur Berechnung des CO_2 -Anteils wurde die Bildungsrate des Produktionsreaktors verwendet. Die C-Bilanz konnte fast vollständig geschlossen werden.

Abbildung 16.4: Auf Basis der extrazellulären Raten erstellte Kohlenstoffbilanz der drei Markierungsexperimente (Phase 1 bis Phase 3) mit dem Stamm *E. coli* F82pC22



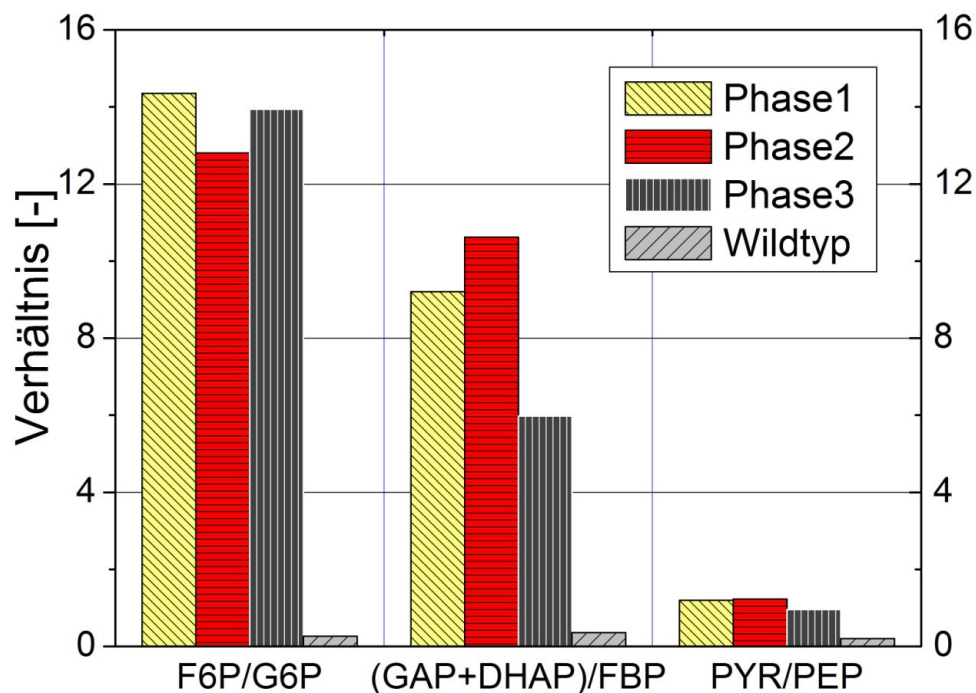
Die Kohlenstoffbilanz zeigt, dass im Laufe der Fermentation der für die Biomassebildung verwendete C-Anteil sinkt und ein zunehmend größerer Kohlenstoffanteil in die 3,4-CHD Produktbildung geht (vgl. Kapitel 11.2.1). Dieser Anteil bleibt bis zum Ende der Fermentation konstant. Der Grund hierfür ist die zunehmende L-Phe/L-Tyr-Limitierung und die damit verbundene Wachstumslimitierung. Gleichzeitig werden durch die Induktion des Plasmids mit IPTG (nach etwa 6 Stunden) die Enzyme des Produktbildungswegs verstärkt gebildet. Die Kohlenstoffbilanz zeigt das typische Produktspektrum des Stamms mit einer verstärkten Bildung der Nebenprodukte S3P und Chorismat nach der Induktion und der Bildung von Zitrat zum Ende der Fermentation (Abb. 16.3). Der Kohlenstoffanteil für die CO_2 -Bildung nimmt im Laufe der Fermentation stetig zu und beträgt im dritten Experiment etwa 70 %.

16.2 Vergleich der Konzentrationsverhältnisse mit *E. coli* K12

Die erhöhte CO₂-Bildung und die beobachtete Zunahme der Ausscheidung von Zitrat ins Medium ist vermutlich auf eine erhöhte Aktivität des Zitronensäurezyklus zurückzuführen. Diese könnte durch eine hohe intrazelluläre Pyruvatkonzentration verursacht sein, da pro Mol 3,4-CHD ein Mol Pyruvat gebildet wird (vgl. Kapitel 11.2).

Zur Überprüfung der Hypothese der hohen Pyruvatkonzentration in der Zelle wurde das Konzentrationsverhältnis von PYR zu PEP im Stamm *E. coli* F82pC22 mit dem Wildtyp verglichen (Abbildung 16.5). Dabei konnte festgestellt werden, dass dieses Verhältnis im Produktionsstamm etwa 5-fach höher ist als im *E. coli* K12 Wildtyp. Es zeigte sich, dass auch andere Metabolitverhältnisse der Glykolyse im Vergleich zum Wildtyp erhöht sind, u.a. F6P/G6P und (GAP+DHAP)/FBP. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine kinetische Inhibierung der katalysierenden Enzyme erklären. Durch die mit der Produktion von 3,4-CHD verbundene Pyruvatbildung kommt es vermutlich zu einem „Stau“ von Metaboliten in der Glykolyse, da Pyruvat inhibierend auf verschiedene Enzyme der Glykolyse (Williamson 1965) und auch die *Pyruvat-Dehydrogenase* (Williams et al. 1990; Zollner 1999) wirkt und der Fluss durch die Glykolyse daher im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist. Damit lässt sich auch die im Laufe der Fermentation abnehmende Glukoseaufnahme erklären, da die Phosphotransferase über das PTS-System durch hohe Pyruvatkonzentrationen gehemmt wird (Dimitrova et al. 2003).

Abbildung 16.5: Vergleich verschiedener intrazellulärer Metabolit-Konzentrationsverhältnisse im Laufe der Fermentation von *E. coli* F82pC22 mit dem K12 Wildtyp (Kapitel 15)



16.3 Theoretische Produktausbeute von *E. coli* F82pC22

Als Referenz für die Leistung des *E. coli* Stamms F82pC22 wurde das theoretische Optimum der Produktbildung für die verschiedenen Wachstumsraten der untersuchten Phasen mit der *Flux-Balance-Analyse* (siehe Kapitel 8 und 14) berechnet. Die in jeder Phase pro Mol Glukose erzielten CHD-Ausbeuten und die rechnerisch ermittelten optimalen Werte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 16-2: Vergleich der pro mol Glukose theoretisch möglichen Produktausbeuten und der spezifischen CO₂-Bildung mit den experimentell ermittelten Werten der drei untersuchten Phasen. Im Optimum (kein Wachstum) wird die höchste Ausbeute erzielt.

	Ausbeute CHD CO₂-Bildung	Optimum μ= 0,0 1/h	Phase 1 μ= 0,31 1/h	Phase 2 μ= 0,05 1/h	Phase 3 μ= 0,02 1/h
theoretisch	Y _{CHD} [mol-%]	76	53	67	72
	Y _{CO₂} [mol-%]	67	24	43	58
Experiment	Y _{CHD} [mol-%]	--	8	16	15
	Y _{CO₂} [mol-%]	--	276	358	385

Für das Wachstum werden verschiedene Metabolite und Co-Faktoren benötigt, die im Zentralstoffwechsel aus der aufgenommenen Glukose bereitgestellt werden. Die benötigte Menge ist abhängig von der Wachstumsrate und berechnet sich nach Tabelle 13-1 (Kapitel 13.1). Die maximal erzielbare theoretische Ausbeute der Bildung von 3,4-CHD von 76 Prozent ergibt sich ohne Wachstum. Auf Grund des Verbrauchs von Glukose für das Biomassewachstum während der Fermentation, verringert sich die optimale Ausbeute je nach Wachstumsrate auf 72, 64 bzw. 53 Prozent. Je höher die Produktausbeute, desto mehr CO₂ wird gebildet, da für die Produktbildung NADPH und ATP benötigt wird. Dieses wird – im theoretisch optimalen Fall – vorwiegend im Zitronensäurezyklus gebildet, wobei CO₂ als Nebenprodukt entsteht. Neben CO₂ und Biomasse entstehen im optimalen Fall keine weiteren Nebenprodukte. Zu einer ausführlichen Darstellung der optimalen Stoffflüsse siehe Kapitel 16.6. Der Vergleich der theoretischen Werte mit den im Experiment erzielten Ausbeuten zeigt, dass diese mit maximal 16 Prozent (in Phase 2) wesentlich geringer sind. Zugleich werden pro Mol Glukose große Mengen an CO₂ gebildet, dadurch geht ein großer Teil des aufgenommenen Kohlenstoffs für die Produktbildung verloren. Die im Folgenden durchgeführten Stoffflussanalysen sind eine gut geeignete Methode, um die Gründe für die festgestellten Unterschiede herauszufinden.

16.4 Ergebnisse der ^{13}C -Markierungsmessungen

16.4.1 Massenisotopomere der intrazellulären Metabolite

Für alle drei Experimente konnten mit der LC-MS/MS-Methode die Markierungsmuster der meisten Metabolite des Zentralstoffwechsels gemessen werden. Die angegebenen Standardabweichungen wurden auf Basis der im stationären Markierungsexperiment mit dem *E. coli* Wildtyp ermittelten relativen Standardabweichungen berechnet (siehe 13.2). Die Ergebnisse der Messung sind im Anhang B.2 dargestellt.

Der Vergleich der Markierungsanteile zeigt, dass die Markierungsverhältnisse von G6P und FBP in allen drei Experimenten im Rahmen der Standardabweichung gleich sind. Das Markierungsmuster von F6P hingegen unterscheidet sich von diesen beiden Messungen deutlich, insbesondere im ersten und dritten Experiment. Da FBP ohne Veränderung des Kohlenstoffgerüsts direkt aus F6P gebildet wird, sollten die Markierungsmuster der beiden Metabolite jedoch gleich sein. Mit Ausnahme des ersten Experiments wurden die Messungen von F6P nicht für die Anpassung verwendet.

Die Markierungsmessungen von Rib5P und Xyl5P/Rul5P sowie von SUC und FUM sind wie erwartet im Rahmen der Standardabweichung gleich.

16.4.2 2D-NMR Messung der proteinogenen Aminosäuren

Für das erste Markierungsexperiment wurden zusätzlich mittels 2D-NMR die Markierungsmuster der durch saure Hydrolyse aus der Biomasse gewonnenen Aminosäuren gemessen. In der zweiten und dritten Phase war das Wachstum zu gering, so dass die Markierungsanreicherung nicht ausreichend war, um die Markierungsmuster mittels 2D-NMR zu messen. Stattdessen wurde die Markierung in den extrazellulären Produkten 3,4-CHD und Shikimat gemessen. Da die Messung der Markierungsmuster mittels NMR sehr aufwändig ist, wurde keine Mehrfachmessung durchgeführt. Die angegebenen Standardabweichungen wurde aus dem Signal-Rausch-Verhältnis der gemessenen Peaks berechnet. Die Ergebnisse der Messung sind im Anhang B.2 dargestellt.

Die Konsistenzanalyse der Aminosäuredaten zeigte, dass große Unterschiede bei der Messung von Serin und Glycin auftreten. Glycin kann direkt über die *Glycin-hydroxymethyl-transferase* aus Serin gebildet werden, so dass dann beide Moleküle das gleiche C-Gerüst aufweisen. Jedoch sind für Glycin noch weitere Bildungswege bekannt, beispielsweise entsteht Glycin auch beim Abbau von Threonin (Kanehisa et al. 2006; Keseler et al. 2005). Umgekehrt kann Threonin auch aus Glycin gebildet werden, da das den Abbau von Threonin katalysierende Enzym, die *Threonin-aldolase*, als unspezifisch reversibel beschrieben wird (Liu et al. 1998).

Die alternativen Biosynthesewege für Threonin und Glycin wurden auf Grund fehlender biologischer Informationen, und um das Modell möglichst einfach zu halten, im Modell nicht betrachtet. Die Messung von Glycin wurde nicht für die Modellanpassung verwendet.

Mit den unterschiedlichen Bildungswegen von Threonin kann auch der Unterschied zwischen den Markierungsmustern von Aspartat und Threonin erklärt werden, welche bis zu 20% voneinander abweichen. Aspartat entsteht direkt durch Transaminierung aus Oxalacetat und ist Vorläufer für die Aminosäuren Threonin und Methionin. Die Markierungsmuster von Threonin und Methionin für C_α stimmen jedoch sehr gut überein. Der Unterschied wurde im Modell durch eine erhöhte Standardabweichung berücksichtigt.

Auch die Markierungsmessungen von Glutamat und Prolin sind unterschiedlich. Glutamat, welches durch Transaminierung aus α -Ketoglutarat entsteht, ist ein direkter Vorläufermetabolit für Prolin. Da keine anderen Wege in *E. coli* bekannt sind, ist die Abweichung vermutlich auf einen Messfehler zurückzuführen. Dies wurde im Modell ebenfalls durch eine größere Standardabweichung berücksichtigt.

Bei den Markierungsmessungen für C_α von Lysin und Aspartat beträgt der Unterschied bis zu 60 % vom Mittelwert. Lysin entsteht über mehrere Zwischenschritte aus Aspartat. Weitere Biosynthesewege von Lysin sind für *E. coli* nicht bekannt. Da sich die Markierungsmessung des C_α von Lysin auch von den Messung von Methionin und Threonin stark unterscheidet, kann vermutet werden, dass die Messung von C_α für Lysin fehlerhaft ist. Aus diesem Grund wurde die Messung nicht für die Modellanpassung verwendet.

Die gemessenen Markierungsdaten der extrazellulären Produkte (3,4-CHD, Shikimat) aus dem 2. und 3. Markierungsexperiment sind auf Grund der im Vergleich zu den Aminosäuren geringeren Markierungsanreicherung mit großen Fehlern behaftet. Die mit diesen Daten durchgeführten ^{13}C -Stoffflussanalysen führten teilweise zu physiologisch nicht sinnvollen Ergebnissen und die berechneten Stoffflüsse zeigten sehr große Standardabweichungen. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der Stoffflussanalysen auf Basis dieser Daten in den folgenden Kapiteln nicht dargestellt.

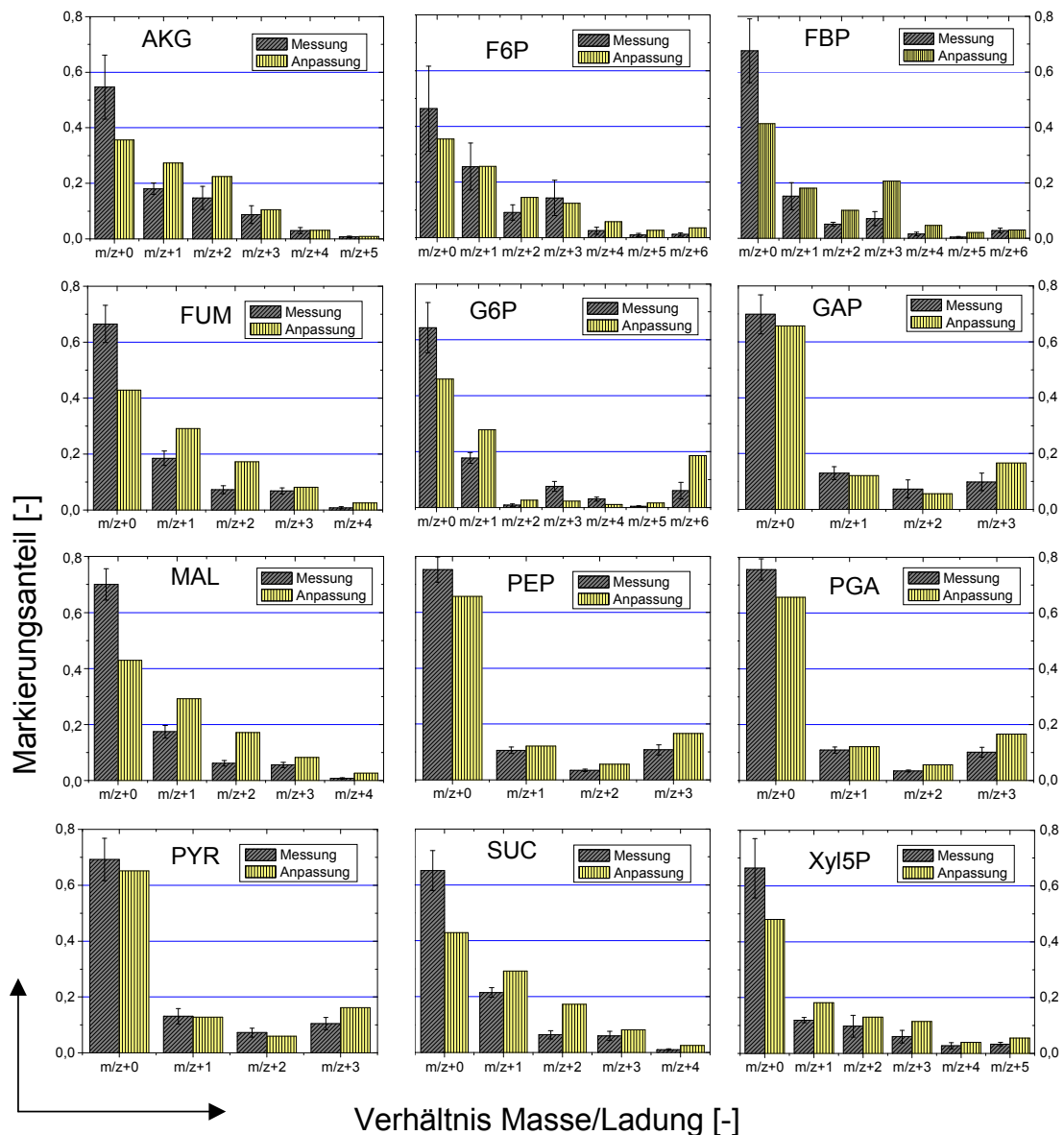
16.5 Stoffflussanalysen mit den LC-MS/MS-Datensätzen

Auf Basis der Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite und den gemessenen extrazellulären Raten aus den drei Markierungsexperimente wurden ^{13}C -Stoffflussanalysen durchgeführt. Im Kapitel 16.5.1 bis 16.5.4 sind die Ergebnisse der Phase 1 beispielhaft dargestellt. In Kapitel 16.5.5 und 16.5.6 sind die Ergebnisse für alle drei Markierungsexperimente im Vergleich dargestellt.

16.5.1 Parameteranpassung für die Phase 1

Mit dem in Kapitel 13.8.2 beschriebenen *E. coli*-Modell wurden die Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite durch Variation der freien Flüsse (17 Parameter) angepasst. Die Parameteranpassung des ersten Markierungsexperiments zeigt die folgende Abbildung.

Abbildung 16.6: Parameteranpassung der gemessenen Massen isotopomere der intrazellulären Metabolite für die Phase 1 der Fermentation mit *E. coli* F82pC22

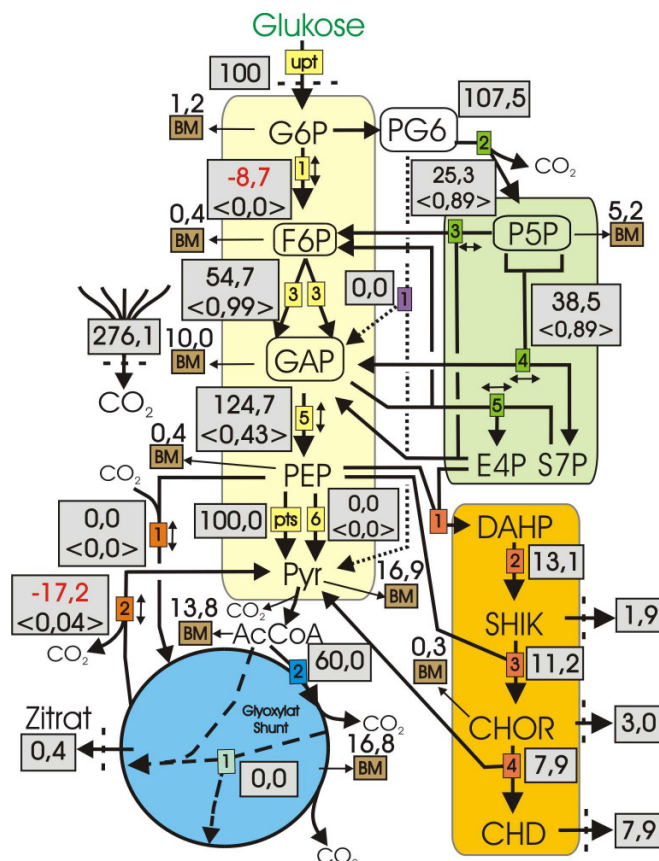


Es zeigten sich bei der Anpassung größere Abweichungen zwischen den gemessenen und berechneten Markierungsanteilen. Insbesondere die Anpassung der unmarkierten Anteile ($m/z+0$) stimmte bei den meisten Metaboliten nicht mit der Messung überein. Die ermittelte Fehlerquadratsumme (FQS) ist bei einem geringeren Datenumfang (72 Markierungs- und Flussmessungen) als beim *E. coli* Wildtyp (Kapitel 15.3) mit einem Wert von 425 wesentlich größer. Die unmarkierten Anteile tragen dabei den größten Anteil zur FQS bei.

16.5.2 Berechnete Stoffflüsse der Phase 1

In der folgenden Abbildung sind die berechneten Stoffflüsse für die Phase 1 dargestellt. Hierbei fällt insbesondere der Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg (*ppp1*) auf, der im Vergleich zum Fluss des *E. coli* K12 Wildtyps sehr groß ist. Der Fluss *emp1* (G6P \rightarrow F6P) nimmt einen negativen Wert an. Die Flüsse *edp* und *gs1/2* wurden zu Null berechnet. Der anaplerotische Fluss *mae* (MAL \rightarrow PYR) ist negativ. Die hier für Phase 1 dargestellten Verhältnisse lassen sich auch bei den Stoffflussanalysen der Phase 2 und 3 beobachten.

Abbildung 16.7: Stoffflusslage basierend auf den LC-MS/MS-Daten der intrazellulären Metabolite für die Phase 1 der Fermentation mit *E. coli* F82pC22. Die Pfeile geben die (bevorzugte) Richtung der Enzymreaktion unter den Kultivierungsbedingungen an. Bidirektionale Flüsse sind durch einen Doppelpfeil gekennzeichnet. Die Größe des Flusses ist im Kasten neben dem Pfeil dargestellt. Die obere Zahl steht für den Nettofluss und die untere Zahl (in $\langle \rangle$) für den Austauschfluss. Die Abflüsse in die Biomasse sind mit **BM** gekennzeichnet.



Die berechneten Flüsse unterscheiden sich wesentlich von der bisher in der Literatur für *E. coli* beschriebenen Stoffflussverteilung (Fischer et al. 2004; Yang et al. 2003; Zhao and Shimizu 2003). Insbesondere der hohe Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg und der negative Fluss zwischen G6P und F6P ist auffällig. Dies lässt sich jedoch erklären, wenn man sich das Isotopomeren-Netzwerk näher anschaut. Bei der Reaktion $\text{PG6} \rightarrow \text{P5P}$ (*ppp2*) wird das erste C-Atom von G6P abgespalten. Da etwa 25% der eingesetzten Glukose an Position C1 markiert ist, wird durch den Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg und die Reaktionen *ppp3* und *ppp4* der Anteil unmarkierter Metabolite im gesamten Netzwerk erhöht. Dem eingesetzten mathematischen Optimierer gelingt es dadurch, die gemessenen unmarkierten Anteile ($m/z+0$) der Metabolite besser anzupassen. Gleichzeitig erhöht der Optimierer den Anteil an unmarkierter Glukose und somit ebenfalls die Menge an unmarkierten Metaboliten. Auch der anaplerotische Fluss *mae* ($\text{MAL} \rightarrow \text{PYR}$) wird durch die Rückvermischung mit unmarkierten Metaboliten beeinflusst. Der Fluss nimmt einen negativen Wert an, was bisher in der Literatur für *E. coli* noch nicht beschrieben wurde.

16.5.3 Mögliche Gründe für die Abweichungen bei der Anpassung

Die Anpassung der Markierungsdaten zeigte einige große Abweichungen – insbesondere bei den unmarkierten Anteilen ($m/z+0$) – und eine Erhöhung des unmarkierten Anteils im gesamten Netzwerk, was einen signifikanten Einfluss auf die berechneten Stoffflüsse hatte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass noch kein isotopisch stationärer Zustand im Netzwerk erreicht wurde. Nach den theoretischen Überlegungen in Kapitel 11.2.3 sollte die in den Markierungsexperimenten erzielte Markierungszeit zur Erreichung eines isotopisch stationären Zustands mehr als ausreichend sein. Nachfolgend werden mehrere physiologische Gründe für die starke Verzögerung bei der Einstellung des isotopisch stationären Zustands diskutiert.

Eine mögliche Erklärung ist in der Dynamik des biologischen Systems zu suchen. Durch den ständigen Auf- und Abbau von Proteinen gelingt es der Zelle, sich schnell an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Die Autoren (Mosteller et al. 1980; Nath and Koch 1970) konnten zeigen, dass die Proteinlebensdauer in *E. coli* sehr unterschiedlich ist. Sie reicht von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden und hängt wesentlich von den Umweltbedingungen ab. Nicht mehr benötigte, falsch gefaltete oder durch Mutation veränderte Proteine werden von proteolytischen Enzymen bis hin zu den Aminosäuren zerlegt. Diese können direkt als Bausteine für neue Proteine verwendet werden, oder sie werden an verschiedene Stellen des Zentralstoffwechsels – vor allem im unteren Teil der Glykolyse und im Zitronensäurezyklus – wieder eingeschleust (Stryer 1994). Dort dienen sie der Gewinnung von Energie oder als Zwischenprodukte für weitere Biosynthesewege. Dies erlaubt es den Zellen sehr ökonomisch mit den vorhandenen Ressourcen umzugehen.

Durch die Wiederverwertung von Metaboliten aus Proteinen und anderen Zellbestandteilen im Zentralstoffwechsel der Zelle wird die Zeit bis zur Einstellung eines isotopisch stationären Zustands vermutlich stark verzögert. Die Markierungszeit war anscheinend nicht ausreichend, um die gesamte Menge an unmarkierten Metaboliten, die in den Zentralstoffwechsel zurückfließen, auszutauschen. Im Vergleich zum Experiment mit dem *E. coli* Wildtyp (Kapitel 15) war die Markierungszeit mit 2,7 gegenüber 9,5 Stunden in diesem Experiment wesentlich geringer. Die Biomassekonzentration nahm nur um das 2,3-fache zu. Beim Wildtyp betrug die Steigerung das 70-fache. Ein weiterer Unterschied war, dass im Fall des Experiments mit dem Wildtyp die markierte Glukose direkt zu Beginn des Experiments zugegeben wurde, so dass nur sehr wenig unmarkierte Biomasse im Reaktor vorhanden war. Die neu gebildeten Zellen bestehen schon zu einem großen Teil aus markierten Metaboliten und somit erfolgt beim Proteinabbau in den neu gebildeten Zellen nur eine sehr geringe Rückvermischung mit unmarkierten Metaboliten. Ein vergleichbarer Zustand wird auch nach sehr langer Zeit bei den Markierungsexperimenten in einem Chemostaten erreicht, da hier die unmarkierte und nicht vollständig markierte Biomasse mit der Zeit aus dem Reaktor ausgewaschen wird.

Eine weitere mögliche Erklärung für die lange Zeit bis zur Einstellung eines isotopisch stationären Zustands sind große unmarkierte Pools. Insbesondere im Zitronensäurezyklus betragen die intrazellulären Konzentrationen einiger Metabolite – z.B. Zitat, Malat oder Succinat – bis zu 20 mmol/l. Auch von Pools außerhalb des Zentralstoffwechsels – z.B. Glutamat – ist bekannt, dass diese sehr hohe Konzentrationen haben (Tabelle 4-1). Zusätzlich können große extrazelluläre Pools eine Rolle spielen, da Mikroorganismen in der Lage sind, extrazelluläre Metabolite aufzunehmen und zu verstoffwechseln. Durch große unmarkierte Pools inner- oder außerhalb des Zentralstoffwechsels verzögert sich die Markierungsanreicherung. Viele dieser Pools liegen im Zitronensäurezyklus oder sind mit diesem verbunden, weshalb eine Verzögerung der Markierungsanreicherung hier besonders zu vermuten ist.

Vergleichbare Ergebnisse wurden von (van Winden 2002) für die Hefe *S. cerevisiae* gefunden. Bei Markierungsversuchen mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter Glukose und vollmarkiertem Ethanol in einer kontinuierlichen Kultur bei einer Wachstumsrate von $0,1\text{ h}^{-1}$ zeigte sich bei der massenspektrometrischen Analyse der Markierung in 16 Metaboliten des Zentralstoffwechsels, dass nach vierzig Minuten der Markierungszustand in den Metaboliten der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs stationär war. In den Metaboliten des Zitronensäurezyklus wurde auch nach sechzig Minuten kein isotopisch stationärer Zustand erreicht.

Auch hier zeigte die Berechnung der Stoffflüsse, dass sich die Stoffflusslage signifikant von den Daten unterscheidet, die durch Markierung der Biomasse für 3-4 Verweilzeiten im Chemostaten und Messung der Markierung in den proteinogenen Aminosäuren resultieren. Die größten Unterschiede wurden dabei für die Flüsse um den Pyruvat-Oxalacetat-Knoten und dem Fluss über Glyoxylat festgestellt. Für die beobachteten Unterschiede wurden die durch den Proteinabbau verursachte Rückvermischung mit unmarkierten Metaboliten und große Pools, die in Verbindung mit dem Zitronensäurezyklus stehen, verantwortlich gemacht. Obwohl der Stoffwechsel von Hefen nicht direkt mit Bakterien vergleichbar ist, sind doch viele Stoffwechselforgänge sehr ähnlich, so dass man davon ausgehen kann, dass hier ähnliche Mechanismen zu einer Verzögerung der Markierungsanreicherung führen.

16.5.4 Erweiterung des *E. coli* Modells für F82pC22

Auf Basis der Ergebnisse im Kapitel 16.5.2 wurde das *E. coli*-Modell um zusätzliche Flüsse erweitert, die eine Vermischung mit unmarkierten Metaboliten an verschiedenen Stellen des Zentralstoffwechsels darstellen. Der Abfluss in die Biomasse wurde um diesen Fluss vergrößert, damit die Gesamtbilanz geschlossen bleibt (Abbildung 16.8). Die Flüsse der unmarkierten Metabolite wurden als zusätzliche freie Flüsse definiert.

Abbildung 16.8: Darstellung der Erweiterung des *E. coli*-Modells mit zusätzlichen Flüssen

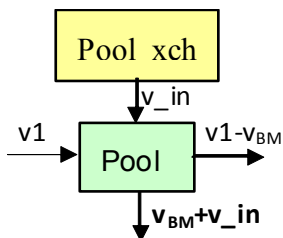


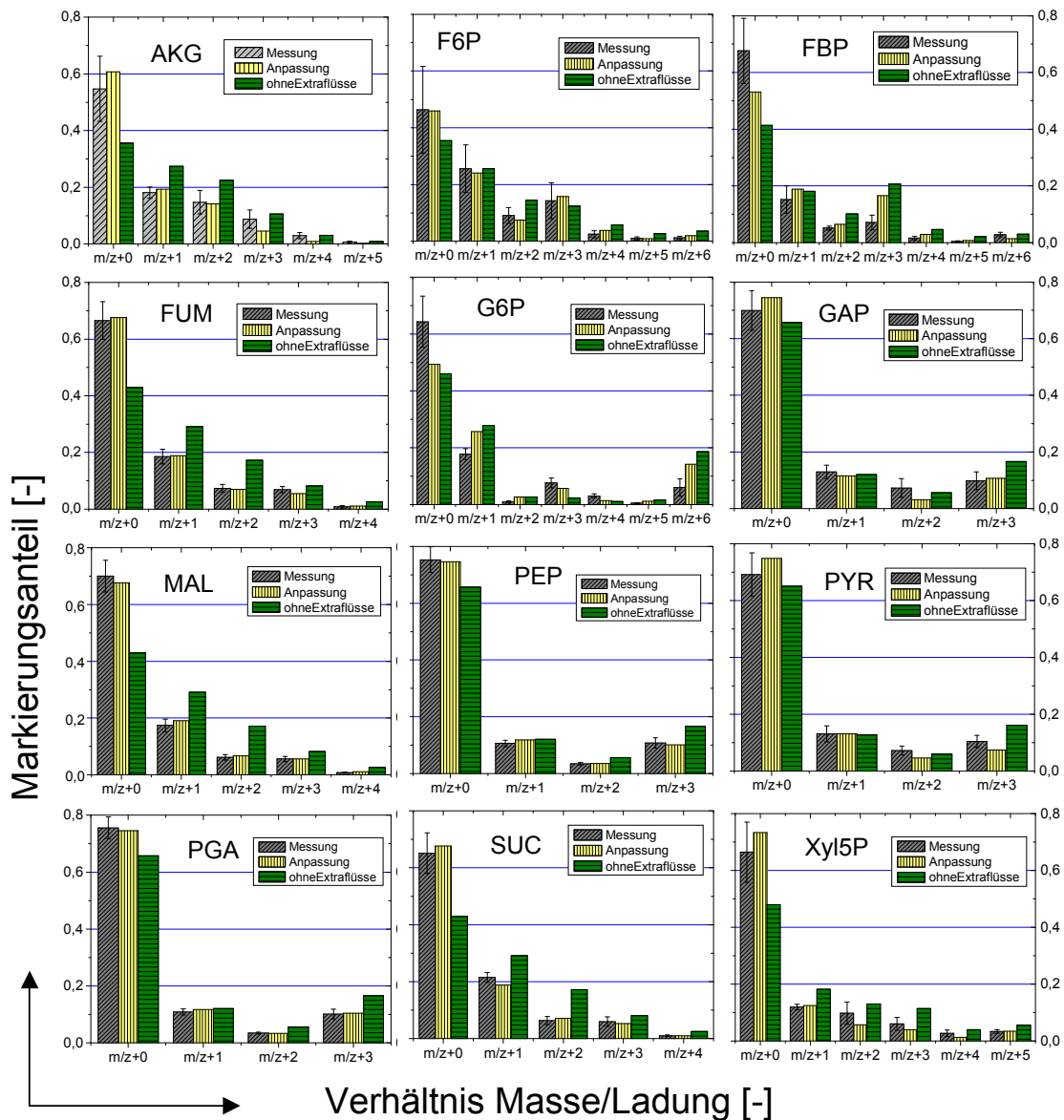
Tabelle 16-3: Zusätzliche Flüsse im Netzwerkmodell von *E. coli* zur Verbesserung der Anpassung der Markierungsdaten

Name des Flusses	Reaktion	C-Atom-Verteilung
pyr_in	PYR_xch → PYR	#ABC → #ABC
akg_in	AKG_xch → AKG	#ABCD → #ABCD
oaa_in	OAA_xch → OAA	#ABCD → #ABCD
p5p_in	P5P_xch → P5P	#ABCDE → ABCDE

16.5.5 Parameteranpassung mit den zusätzlichen Austauschflüssen

Mit dem erweiterten Modell wurden für alle drei Markierungsexperimente ^{13}C -Stoffflussanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse der Parameteranpassung für das erste Markierungsexperiment sind beispielhaft in der folgenden Abbildung dargestellt. Eine Darstellung der Anpassung für alle drei Markierungsexperimente und eine Tabelle mit den gemessenen und angepassten Werten und der Fehlerquadratsumme der Anpassung findet sich im Anhang B.2.

Abbildung 16.9: Anpassung der gemessenen Massen isotopomere der intrazellulären Metabolite für das Modell mit den zusätzlichen Austauschflüssen und Vergleich zur Anpassung ohne Austauschflüsse.



Durch die Erweiterung des *E. coli*-Modells konnte die Anpassung wesentlich verbessert werden. Die ermittelte Fehlerquadratsumme ist mit einem Wert von 92 für die Phase 1 (72 Markierungs- und Flussmessungen), 40 für die Phase 2 und 48 für die Phase 3 (jeweils 65 Markierungs- und Flussmessungen) sehr viel geringer als zuvor (vgl. Kapitel 15.3).

16.5.6 Berechnete Stoffflüsse mit dem erweiterten *E. coli* Modell

Durch Anpassung der Markierungsdaten unter Variation der freien Flüsse wurden die Stoffflüsse berechnet. In Tabelle 16-4 sind die mit den LC-MS/MS-Daten ermittelten Stoffflüsse für die drei Phasen der Fermentation zusammen mit der Standardabweichung dargestellt.

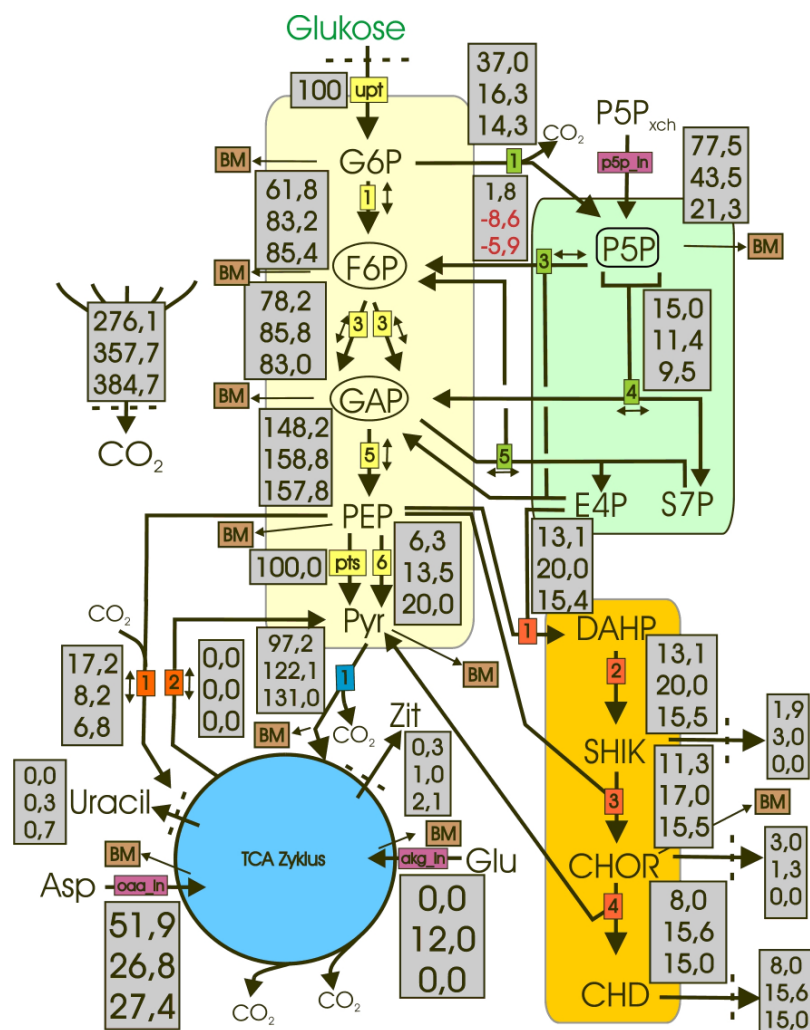
Tabelle 16-4: Berechnete Nettoflüsse mit Standardabweichung (RSD) für alle drei Markierungsexperimente von *E. coli* F82pC22. Die grau hinterlegten Flüsse wurden als freie Flüsse gewählt. Die Flüsse *edp*, *gs1/2* und *mae* sind nicht bestimmbar und wurden für die Ermittlung der Standardabweichung konstant (*constraint*) gesetzt.

Fluss	Phase 1		Phase 2		Phase 3	
	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$	RSD [%]	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$	RSD [%]	$\frac{mmol}{g_{BTM} \cdot h}$	RSD [%]
upt	5,38 ($\pm 0,34$)	6,4	1,98 ($\pm 0,13$)	6,4	1,40 ($\pm 0,01$)	0,7
pyr_in	0,00 ($\pm 3,98$)	--	0,00 ($\pm 1,14$)	--	0,00 ($\pm 0,80$)	--
akg_in	0,00 ($\pm 1,34$)	--	0,24 ($\pm 0,89$)	--	0,00 ($\pm 0,35$)	--
oaa_in	2,79 ($\pm 3,59$)	121,5	0,53 ($\pm 1,42$)	268,1	0,38 ($\pm 0,56$)	146,5
p5p_in	4,17 ($\pm 1,75$)	42,0	0,86 ($\pm 0,48$)	55,7	0,30 ($\pm 0,20$)	66,7
emp1	3,32 ($\pm 0,91$)	27,4	1,65 ($\pm 0,31$)	18,8	1,19 ($\pm 0,20$)	17,1
emp2	4,21 ($\pm 0,30$)	7,2	1,70 ($\pm 0,10$)	6,1	1,22 ($\pm 0,07$)	5,6
emp3	4,21 ($\pm 0,30$)	7,2	1,70 ($\pm 0,10$)	6,1	1,22 ($\pm 0,07$)	5,6
emp4	8,48 ($\pm 0,30$)	3,6	3,22 ($\pm 0,10$)	3,2	2,30 ($\pm 0,07$)	2,9
emp5	7,98 ($\pm 0,30$)	3,8	3,15 ($\pm 0,10$)	3,3	2,27 ($\pm 0,07$)	3,0
emp6	5,72 ($\pm 0,30$)	5,3	2,25 ($\pm 0,10$)	4,6	1,40 ($\pm 0,07$)	4,8
edp	0,00	--	0,00	--	0,00	--
ppp1/2	1,99 ($\pm 0,91$)	45,9	0,32 ($\pm 0,31$)	96,2	0,20 ($\pm 0,20$)	101,4
ppp3	0,10 ($\pm 0,30$)	309,3	-0,17 ($\pm 0,10$)	60,4	-0,13 ($\pm 0,07$)	52,1
ppp4	0,81 ($\pm 0,30$)	37,8	0,23 ($\pm 0,10$)	45,8	0,16 ($\pm 0,07$)	43,2
ppp5	0,81 ($\pm 0,30$)	37,8	0,23 ($\pm 0,10$)	45,8	0,16 ($\pm 0,07$)	43,2
tcc1	5,25 ($\pm 0,30$)	5,8	2,42 ($\pm 0,10$)	4,3	1,81 ($\pm 0,07$)	3,7
tcc2	4,49 ($\pm 0,30$)	6,8	2,30 ($\pm 0,10$)	4,5	1,77 ($\pm 0,07$)	3,8
tcc3	4,47 ($\pm 0,30$)	6,8	2,28 ($\pm 0,10$)	4,5	1,74 ($\pm 0,07$)	3,9
tcc4	4,07 ($\pm 0,30$)	7,5	2,22 ($\pm 0,10$)	4,6	1,71 ($\pm 0,07$)	3,9
tcc5a/b	4,07 ($\pm 0,30$)	7,5	2,22 ($\pm 0,10$)	4,6	1,71 ($\pm 0,07$)	3,9
tcc6	4,07 ($\pm 0,30$)	7,5	2,22 ($\pm 0,10$)	4,6	1,71 ($\pm 0,07$)	3,9
tcc7	4,07 ($\pm 0,30$)	7,5	2,22 ($\pm 0,10$)	4,6	1,45 ($\pm 0,07$)	3,9
gs1/2	0,00	--	0,00	--	0,00	--
ppc	0,93 ($\pm 0,09$)	9,4	0,16 ($\pm 0,01$)	6,1	0,36 ($\pm 0,04$)	10,2
mae	0,00	--	0,00	--	0,00	--

Die auf Basis der isotopisch stationären Markierungsdaten praktisch nicht bestimmbar Nettoflüsse *edp*, *gs1/2* und *mae* wurden zu Null berechnet (vgl. 15.4). Die unmarkierten Zuflüsse sind nur mit großem Fehler bestimmbar. Es zeigt sich, dass die Sensitivität der Anpassung für die Zuflüsse *pyr_in* und *akg_in* gering ist, und es konnte gezeigt werden (Ergebnisse hier nicht dargestellt), dass eine gute Anpassung auch ohne diese beiden Zuflüsse möglich ist, wobei sich vergleichbare Flüsse ergeben. Gegenüber den Modellen ohne die zusätzlichen Zuflüsse (vgl. Kapitel 16.5.1) verbesserte sich die Bestimmtheit der Nettoflüsse in der Glykolyse und dem Zitronensäurezyklus. Im Pentose-Phosphat-Weg dagegen wurde die Standardabweichung geringfügig größer. Die Bestimmtheit der Nettoflüsse ist mit Ausnahme der unmarkierten Zuflüsse und der Flüsse *ppp1*, *ppp2*, *ppp3*, *ppp4* gut. Die Austauschflüsse sind im Anhang B.2 dargestellt und werden hier nicht diskutiert.

In der folgenden Abbildung sind die auf die Glukoseaufnahme normierten Nettoflüsse für die drei Phasen der Fermentation dargestellt.

Abbildung 16.10: Vergleich der normierten Nettoflüsse für die drei Phasen der Fermentation mit dem Stamm *E. coli* F82pC22 (Darstellung ohne EDP und mit vereinfachtem TCA).



Die größten Unterschiede zum Modell ohne unmarkierte Zuflüsse (Abbildung 16.7) zeigen sich beim Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg, der nun in der Größenordnung des Wildtyps liegt und dem anaplerotischen Fluss *ppc*, dessen Größe nun ebenfalls dem des Wildtyps entspricht. Unterschiede zur SFA mit dem Wildtyp (Kapitel 15.4) finden sich beim Fluss in den TCA (*tcc1*), der hier wesentlich größer ist, womit sich auch die große Menge an gebildetem CO₂ erklären lässt.

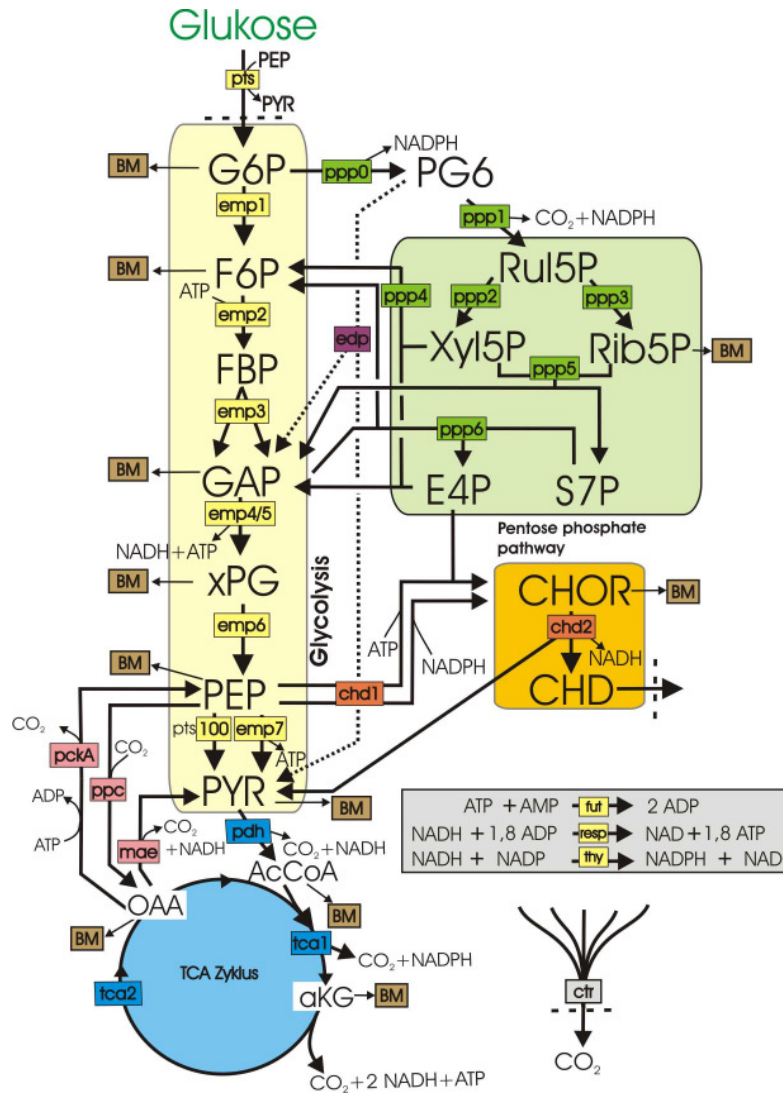
Bei den Zuflüssen aus unmarkierten Pools außerhalb des betrachteten Netzwerks zeigte sich, dass im Pentose-Phosphat-Weg (*p5p_in*) und beim Zitronensäurezyklus (*oaa_in*) sehr große Zuflüsse auftreten. Die Größe dieser unmarkierten Zuflüsse sinkt von der Wachstumsphase (Phase 1) zur Produktionsphase (Phase 2 und 3). Der zweite Fluss in den TCA (*akg_in*) ist mit Ausnahme der Phase 2 Null. Der Fluss in den unteren Teil der Glykolyse (*pyr_in*) ist in allen drei Phasen Null.

Der Vergleich der Nettoflüsse aus allen drei Markierungsexperimenten zeigt, dass im Laufe der Fermentation der Fluss in den Pentose-Phosphat-Weg (*ppp1*) geringer wird. Verbunden damit sinkt der Fluss *ppp3* (*Transketolase*) und wird in der Phase 2 und 3 negativ. Gleichzeitig steigt der über die Pyruvat-Kinasen (*pykF*, *pykA*) katalysierte Fluss in den Zitronensäurezyklus (*tca1*), was sich auch in einer steigenden Menge an gebildeten Zitrat und Uracil äußert (Tabelle 16-1). Die Menge an gebildetem CO₂ nimmt dadurch ebenfalls zu. Die Produktion von CHD verdoppelt sich von Phase 1 zu Phase 2 und nimmt zum Ende der Kultivierung (Phase 3) wieder leicht ab. Damit verbunden nimmt die Menge an gebildeten Shikimat von Phase 1 zu Phase 3 zu. Die Chorismatbildung nimmt hingegen ab (vgl. Abbildung 16.1).

16.6 Ergebnisse der *Flux-Balance-Analyse*

Zum Vergleich der im vorherigen Kapitel ermittelten Stoffflüsse mit einer für die Produktbildung optimalen Stoffflusslage wurde das theoretische Optimum auf Basis eines Stoffflussnetzwerks und der in jeder Phase aktuellen Wachstumsrate berechnet (Kapitel 8 und 14). In folgenden sind die theoretischen Optima zusammen mit den aus der ¹³C-Stoffflussanalyse ermittelten Stoffflüssen für die drei Phasen der Fermentation dargestellt.

Abbildung 16.11: Vergleich der ermittelten Stoffflüsse mit der optimalen Stoffflusslagen für die drei Phasen der Fermentation (vereinfachte Darstellung).



		Phase	μ [1/h]	Glykolyse			PP.-Weg			TCA			Anaplerosis		CHD
				emp2/3	emp6	emp7	ppp0/1	ppp4	ppp5/6	pdh	tca1	tca2	ppc	mae	chd2
Optimum	1	0,00	75	98	-54	0	-51	25	22	22	22	0	0	76	
	2	0,30	77	108	-14	0	-37	16	21	7	0	17	0	53	
	3	0,05	76	102	-39	0	-45	22	20	14	11	7	0	67	
¹³ C-SFA	1	0,02	75	100	-47	0	-48	24	22	19	18	3	0	72	
	2	0,30	78	148	6	37	2	15	97	84	76	17	0	8	
	3	0,05	86	159	14	16	-9	11	122	116	112	8	0	16	
	3	0,02	83	158	20	14	-6	9	131	127	123	7	0	15	

16.6.1 Vergleich der Netto-Flüsse mit der optimalen Stoffflusslage

Die Ergebnisse zeigen, dass im Fall „kein Wachstum“ die Produktbildung maximal wird. Pro Mol aufgenommener Glukose können somit theoretisch 0,76 mol CHD gebildet werden. Die anaplerotischen Flüsse (*ppc*, *mae*, *pckA*) sind in diesem Fall Null. Das bei der Glukoseaufnahme (Pts-System) und der CHD-Bildung entstehende Pyruvat wird zu einem großen Teil über die *PEP-Synthetase* wieder in Phosphoenolpyruvat umgewandelt und steht für die Produktbildung zur Verfügung. Ein geringer Teil des entstehenden PYR wird im Zitronensäurezyklus in CO₂ umgewandelt. Dies dient der Bereitstellung der benötigten Energie in Form von ATP und den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH. Das für die Produktbildung benötigte E4P entsteht über die *Transketolase* (*ppp4*) und *Transaldolase* (*ppp6*) aus F6P und GAP und nicht aus G6P (*ppp0/1*).

Mit zunehmender Wachstumsrate sinkt die CHD-Ausbeute bis 53 % in Phase 1 ($\mu=0,3 \text{ h}^{-1}$), da viele Metabolite des Zentralstoffwechsels für die Biomassebildung bereitgestellt werden (Tabelle 16-2). Der Fluss in den Zitronensäurezyklus (*pdh*) bleibt in etwa konstant. Durch die Bereitstellung von AcCoA, AKG, OAA für die Biomassebildung nimmt der Fluss (*tca1*, *tca2*) ab und muss durch die *PEP-Carboxylase* (*ppc*) wieder aufgefüllt werden. Im Optimum sind der Entner-Doudoroff-Weg (*edp*), der Glyoxylatweg (*gs1/2*) und die anaplerotischen Flüsse (*pckA*, *mae*) – mit Ausnahme von *ppc* – sowie der Fluss von G6P in den Pentose-Phosphat-Weg (*ppp0/1*) Null.

Bei den mittels Stoffflussanalyse ermittelten Flüssen zeigt sich, dass die CHD-Ausbeuten mit 8 bis 16 % sehr viel geringer sind als die für die jeweilige Phase der Fermentation berechneten Optima. Dies ist vor allem auf den großen Fluss in den Zitronensäurezyklus zurückzuführen. Die von der *PEP-Synthetase* (*pps*) katalysierte Rückreaktion von Pyruvat zu PEP ist anscheinend unter den Prozessbedingungen nicht bzw. nur gering aktiv oder wird durch hohe intrazelluläre Metabolitkonzentrationen von 3-Phosphoglycerate oder Oxalacetate gehemmt (Chulavatnatol and Atkinson 1973). Dadurch steht nicht ausreichend PEP für die CHD-Bildung bereit, und ein großer Teil der aufgenommenen Glukose wird im Zitronensäurezyklus zu CO₂ umgesetzt. Die limitierende Menge an PEP zeigte sich bereits bei dem im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp geringeren Metabolitverhältnis PEP/PYR (Kapitel 16.2).

Ein weiterer Unterschied zum theoretischen Optimum ist der hohe Fluss von G6P in den Pentose-Phosphat-Weg. Das für die Produktbildung benötigte E4P wird bei der Fermentation mit dem *E. coli* F82pC22 zu großen Teilen über die *G6P-Dehydrogenase* gebildet. Dadurch geht ein Teil des aufgenommenen Kohlenstoffs durch die CO₂-Bildung verloren.

Wie die optimalen Stoffflusslagen zeigen, ist es ökonomisch sinnvoller die benötigten Mengen E4P über die Transketolase (*ppp4*) und Transaldolase (*ppp6*) aus F6P und GAP zu bilden. Das zur Synthese von CHD benötigte NADPH kann im Zitronensäurezyklus über die Isocitrate Dehydrogenase (Seelig and Colman 1978) und aus NADH mittels des Enzyms *NAD(P)-trans-Hydrogenase* gebildet werden (Clarke and Bragg 1985).

Die mit Hilfe der ^{13}C -Stoffflussanalyse in der Fermentation des *E. coli* F82pC22 gefundenen Unterschiede zur optimalen Stoffflusslage sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für einen *E. coli* Stamm zur Produktion von L-Phenylalanin (Wahl et al. 2004) und den Arbeiten von (Frost and Draths 1995; Li et al. 1999). Die Aminosäure L-Phenylalanin wird wie das Produkt 3,4-CHD aus Chorismat gebildet. Die Stoffflussanalyse dieses Stamms zeigte ebenfalls einen im Laufe der Fermentation zunehmenden Fluss in den Zitronensäurezyklus und eine damit verbundene hohe CO_2 -Produktion.

16.7 Vorschläge zur Erhöhung der CHD-Ausbeute

Eine Erhöhung der Ausbeute an gewünschtem Produkt kann durch eine verbesserte Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat erreicht werden. Ein Erfolg versprechender Weg hierfür ist eine Erhöhung der *PEP-Synthetase*-Aktivität durch Überexpressierung des kodierenden Gens *ppsA*. Die Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat kann voraussichtlich zusätzlich verbessert werden, wenn die Bildung von PYR aus PEP durch Deletion der Gene *pykA*, *pykF* verhindert wird. Das für das Wachstum benötigte Pyruvat wird weiterhin in ausreichender Menge durch das PTS-System bereitgestellt, da pro Mol aufgenommener Glukose ein Mol PYR aus PEP entsteht. Das Wachstum sollte daher durch diese Maßnahme nicht wesentlich beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass die *PEP-Synthetase* durch folgende Metabolite des Zentralstoffwechsels gehemmt wird: GAP, AKG, MAL, OAA und PEP. Dies macht den Einsatz einer feedback-resistenten Variante dieses Enzyms sinnvoll (Chulavatnatol and Atkinson 1973; Cooper and Kornberg 1974).

Zusätzlich kann durch eine Erhöhung der Transketolaseaktivität (*ppp4*) die Bildung von E4P aus F6P und GAP beschleunigt werden. Die Autoren (Chandran et al. 2003; Gosset et al. 1996; Patnaik et al. 1995; Yi et al. 2002) propagieren ebenfalls die Überexpressierung von *ppsA* und *tktA* zur Erhöhung des Flusses in den Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren. Als weitere Maßnahme ist eine Deletion der Gene für die Kodierung der *G6P-Dehydrogenase* denkbar. Hierdurch kann der Fluss in den E4P Pool über die *Transketolase* umgeleitet werden, so dass die CO_2 -Produktion verringert wird. Durch diese Veränderung verringert sich die Menge an NADPH, die bereitgestellt wird. Dies sollte jedoch keinen Einfluss auf die CHD-Bildung haben, da die *Shikimate Dehydrogenase* auch NADH als Reduktionsequivalent nutzen kann (Lindner et al. 2005).

16.8 Stoffflussanalyse mit dem NMR-Datensatz

Für das erste Markierungsexperiment liegt neben den Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite zusätzlich ein umfangreicher Datensatz aus den NMR-Messungen der proteino-genen Aminosäuren vor. Zum Vergleich der Methoden wurde basierend auf diesem Datensatz ebenfalls eine ^{13}C -Stoffflussanalyse durchgeführt. Vergleichbare Experimente mit *E. coli* sind in (Drysch et al. 2003) und Wahl et al. (2004) beschrieben.

Vor dem Start des Markierungsexperiments ist bereits eine größere Menge an unmarkierten Zellen im Reaktor. Auf Grund des Fed-Batch-Betriebs werden diese Zellen im Laufe des Markierungsexperiments nicht ausgewaschen. Die Stoffflussanalyse mit den LC-MS/MS-Daten hat zudem gezeigt, dass auch bis zum Ende des ersten Markierungsexperiments noch kein isotopisch stationärer Zustand erreicht wurde. Die gemessenen ^{13}C -Markierungsdaten sind daher verfälscht und eine Korrektur der Messsignale ist notwendig. Diese erfolgte durch Erweiterung des in Kapitel 13.8.2 beschriebenen *E. coli*-Modells um einen zusätzlichen unmarkierten Zufluss in jeden gemessenen Aminosäurepool (Tabelle B-6 im Anhang B.2). Es ergeben sich neun zusätzliche freie Flüsse. Mit dieser Methode wird die „Verdünnung“ des Messsignals durch unmarkierte Metabolite dargestellt (Antoniewicz et al. 2007). Die Größe der unmarkierten Zuflüsse gibt einen Hinweis auf den Anteil an unmarkierten Aminosäuren im Reaktor.

Die Anpassung der NMR-Markierungsdaten durch Variation der Flüsse ist – mit wenigen Ausnahmen – gut (Abbildung B-2 im Anhang B.2). Das ermittelte *Residuum* ist mit einem Wert von 1745 jedoch sehr groß (105 Fluss- und Markierungsmessungen). Dies ist zum einen auf den größeren Datenumfang und zum anderen auf die im Vergleich zu den MS-Daten wesentlich geringere Standardabweichung der Messwerte zurückzuführen. Einige Messwerte sind vermutlich mit einem großem Fehler behaftet. Die Messwerte für C_α von Arg, His, Leu, Met, Ala, C_β von Glu/Gln, Asp, Thr, Ala, C_γ von Glu/Gln, Pro, Val und C_δ von Pro, Lys liefern einen sehr großen Beitrag zur Fehlerquadratsumme. Ohne diese Messungen ergibt sich für die FQS ein Wert von 452.

Eine Tabelle mit den berechneten Netto- und Austauschflüssen sowie eine Abbildung der auf die Glukoseaufnahme normierten Flüsse findet sich im Anhang B.2. Die berechneten Netto-Flüsse sind mit Ausnahme des Flusses in den Pentose-Phosphat-Weg (*ppp1*) vergleichbar mit der auf Basis der LC-MS/MS-Daten ermittelten Stoffflusslage (16.5.6). Der Fluss *ppp1* ist nur etwa halb so groß, wodurch sich auf Grund der stöchiometrischen Abhängigkeit für den Fluss *ppp3* ein negativer Wert ergibt. Da die Reaktionen des Pentose-Phosphat-Wegs reversibel sind, ist ein Fluss in beide Richtungen möglich (Kanehisa et al. 2006). Die Flüsse des Entner-Doudoroff-Wegs (*edp*), sowie die anaplerotischen Flüsse (*ppc*, *mae*) sind auf Basis der NMR-Daten ebenfalls nicht identifizierbar und wurden zu Null berechnet.

Mit Ausnahme des Glyoxylat-Shunts (*gs1/2*) sind die Flüsse auf Basis der NMR-Daten im Vergleich zur SFA mit den LC-MS/MS-Daten schlechter bestimmt. Viele Flüsse – insbesondere in der Glykolyse – sind nur mit einer großen Standardabweichung bestimmbar. Dies ist zum einen auf die größere Fehlerquadratsumme bei der Anpassung der Markierungsdaten und zum anderen auf die zusätzlichen unmarkierten Zuflüsse zurückzuführen, da diese praktisch nicht bestimmbar sind. Bei den unmarkierten Zuflüssen zeigt sich, dass diese bei den Aminosäuren, die aus den beiden Vorläufermetaboliten des Zitronensäurezyklus AKG und OAA gebildet werden, besonders groß sind. Hier scheint ein großer Anteil der Pools noch unmarkiert zu sein bzw. gibt es an dieser Stelle Rückflüsse aus unmarkierten Pools außerhalb des Zentralstoffwechsels.

Mit den NMR-Daten wurde zusätzlich eine Stoffflussanalyse mit einem Modell ohne die zusätzlichen unmarkierten Zuflüsse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich trotz der schlechteren Anpassung ähnliche Stoffflüsse ergeben. Im Unterschied zur SFA mit den MS-Daten hat die Abweichung vom isotopisch stationären Zustand nur einen geringen Einfluss. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass mit der NMR-Methode nur die markierten Anteile gemessen werden und die unmarkierten Metabolite keinen Einfluss auf die Messung haben. Durch die Vermischung mit unmarkierten Metaboliten wird hauptsächlich die Singulett-Messung beeinflusst, da in der unmarkierten Biomasse die natürlichen ^{13}C -Isotope nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,1 % vorkommen. Die Auswirkung der unmarkierten Biomasse auf die Messergebnisse der Doublets und Doppeldoublets ist vernachlässigbar, da diese in der Natur nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,012 % vorkommen.

17 Folgerungen aus Teil III

Die rasante Entwicklung der letzten Jahre auf dem Gebiet der LC-MS/MS-Analytik von intrazellulären Metaboliten macht es heute möglich, auch sehr niedrig konzentrierte Metabolite zuverlässig zu quantifizieren. Die hohe Auflösung der aktuellen Massenspektrometer ermöglicht es, Moleküle zu trennen, die sich in nur einer Masse (m/z) unterscheiden. Aus diesem Grund kann diese Analysemethode genutzt werden, um die Massenisotopomere von intrazellulären Metaboliten zu bestimmen (Luo et al. 2007; Mashego et al. 2007; Oldiges et al. 2007). Diese Daten sind geeignet, um die intrazellulären Stoffflüsse mittels ^{13}C -Stoffflussanalyse zu ermitteln. Der Vorteil gegenüber dem bisher verfolgten retrobiosynthetischen Ansatz liegt in der direkten Messung im Zentralstoffwechsel der Zellen und der – durch die große Anzahl an Metaboliten – prinzipiell höheren Informationsmenge. Auf Grund der hohen Geschwindigkeit der Stoffwechselfvorgänge und dynamischen Simulationen (Nöh and Wiechert 2006) wurde erwartet, dass sich in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels schon nach kurzer Zeit ein isotopisch stationärer Zustand einstellt, so dass sich die Markierungszeiten und damit die hohen Kosten für das markierte Substrat verringern lassen.

Die mit dem *E. coli* Wildtyp durchgeführte ^{13}C -Stoffflussanalysen hat gezeigt, dass die auf Basis von LC-MS/MS-Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite ermittelten Stoffflüsse vergleichbar sind mit den Ergebnissen des retrobiosynthetischen Ansatzes. Die Nettoflüsse des Entner-Doudoroff-Wegs, der Anaplerosis und des Glyoxylat-Wegs sind mit der isotopisch stationären ^{13}C -Stoffflussanalyse weder auf Basis von Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite noch der proteinogenen Aminosäuren gut zu bestimmen. Die Bestimmtheit der Stoffflüsse lässt sich nur durch Modellvereinfachungen, d.h. die Annahme unidirektionaler Flüsse (z.B. des Flusses *mae*) oder fehlender Aktivität (z.B. des EDP oder des Glyoxylat-Wegs), verbessern. Der Nettofluss von G6P in den Pentose-Phosphat-Weg konnte auf Basis der massenspektrometrischen Markierungsdaten der intrazellulären Metabolite besser bestimmt werden. Bei den Austauschflüssen zeigte sich, dass ein großer Teil dieser Flüsse mit der stationären ^{13}C -Stoffflussanalyse schlecht bestimmt ist.

Als weiteres wichtiges Ergebnis wurde festgestellt, dass sich nicht wie erwartet innerhalb von wenigen Minuten ein isotopisch stationärer Zustand der Markierung in den intrazellulären Metaboliten einstellt. Die Anpassung der Markierungsdaten aus den Experimenten mit dem Stamm *E. coli* F82pC22 zeigte, dass es auch nach einer über 3-stündigen Markierungszeit noch zu großen Abweichungen zur Messung – insbesondere bei den unmarkierten Anteilen – kommt. Die bisher bei allen Stoffflussanalysen getroffene Annahme einer unidirektionalen Verteilung der Markierung aus dem Zentralstoffwechsel in die Pools der Biomasse und zu den extrazellulären Produkten scheint nicht mehr haltbar zu sein.

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise, dass es durch Rückflüsse aus großen Speicherpools außerhalb des Zentralstoffwechsels und Abbauvorgänge von Proteinen und anderen Zellbestandteilen zu einer Vermischung von markierten und unmarkierten Metaboliten kommt. Auf Grund der Rückvermischung mit unmarkierten Metaboliten verzögert sich die Einstellung eines isotopisch stationären Zustands und es stellt sich auch nach mehrstündiger Markierungszeit ein Markierungszustand ein, der durch die bisher verwendeten Modelle nicht wiedergegeben werden kann. Durch die Erweiterung der Modelle um unmarkierte Zuflüsse in den Zentralstoffwechsel konnte mit den MS-Daten eine gute Anpassung erreicht werden und es wurden physiologisch erklärbare Stoffflüsse berechnet. Die durch die Messung in den intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels erhoffte Verkürzung der Markierungsdauer konnte jedoch auf Grund der zeitlichen Verzögerung der Markierungsanreicherung nicht realisiert werden.

Eine Lösung dieses Problems ist die Verwendung von isotopisch instationären Markierungsdaten. Im folgenden Teil der Arbeit wird eine neu entwickelte Technik und Methode zur Durchführung von isotopisch instationären Markierungsexperimenten vorgestellt. Die Verwendung von isotopisch instationären Daten für die ^{13}C -Stoffflussanalyse verspricht eine wesentliche Verkürzung der Markierungsdauer und eine Erhöhung der Informationsmenge, die zu einer besseren Bestimmtheit der berechneten Flüsse führen sollte (Nöh and Wiechert 2006; Wiechert and Nöh 2005). Zum Nachweis dieser auf Basis von Simulationen gewonnenen Erkenntnisse wurden zwei Markierungsexperimente und auf Basis der dort gewonnenen isotopisch instationären Daten ^{13}C -Stoffflussanalysen durchgeführt, dessen Ergebnisse ebenfalls im folgenden Teil der Arbeit präsentiert werden.

Teil IV

Isotopisch instationäre
 ^{13}C -Stoffflussanalysen

Die Ergebnisse der isotopisch stationären ^{13}C -Stoffflussanalysen im ersten Teil der Arbeit haben gezeigt, dass sich im Vergleich zum retrobiosynthetischen Ansatz die Markierungszeit durch die Markierungsmessung in den intrazellulären Metaboliten nicht wie erhofft wesentlich verkürzen lässt. Eine Verringerung der Markierungszeit auf wenige Sekunden bis zu einigen Minuten lässt sich in zukünftigen Markierungsexperimenten nur dadurch erreichen, dass nicht bis zum Erreichen des isotopisch stationären Zustands gewartet wird, sondern die instationären Markierungsdaten zur Stoffflussanalyse verwendet werden (siehe Kapitel 22).

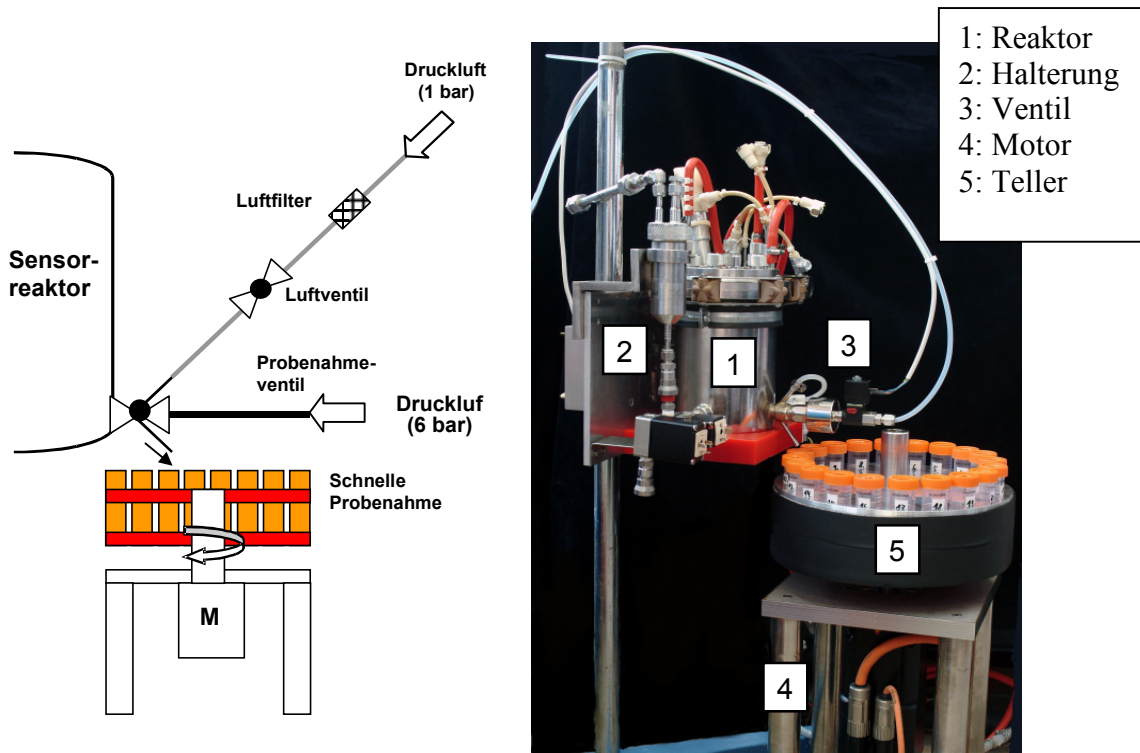
Die Techniken und Methoden zur Gewinnung der hierzu notwendigen Daten wurden aufbauend auf den Arbeiten von (El Massaoudi et al. 2003) zum großen Teil in dieser Arbeit entwickelt. Zur Messung der isotopisch instationären Markierungsdaten müssen innerhalb kurzer Zeit nach Aufgabe der Markierung Proben aus dem Reaktor entnommen werden. Hierzu wurde eine schnelle Probenahmeinheit entwickelt und konstruiert (Kapitel 18). Zur Bedienung des gesamten Reaktorsystems wurde eine Steuer- und Regeleinheit entwickelt, die es erlaubt, die Markierungsexperimente weitgehend automatisiert ablaufen zu lassen und die Reproduzierbarkeit der Datengewinnung gewährleistet (Kapitel 20). Zudem können über verschiedene Schnittstellen die Daten eines Produktionsreaktors aufgenommen und ein Parallelbetrieb (Master/Slave) gesteuert werden. Damit das neu entwickelte Reaktorsystem transportabel ist und an verschiedene Produktionsreaktoren angeschlossen werden kann, wurde es als mobile Einheit gestaltet (Kapitel 19).

Zur Messung der Markierungsdaten und der intrazellulären Konzentrationen wurde eine am Institut für Biotechnologie entwickelte LC-MS/MS Methode eingesetzt (Luo et al. 2007). Die intrazellulären Metabolite müssen zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Hierzu wurden in Kapitel 21 verschiedene Extraktionsmethoden getestet und verglichen. Abschließend wurden mit den entwickelten Techniken und Methoden zwei isotopisch instationäre Markierungsexperimente durchgeführt und auf Basis der dort gewonnenen Daten die Stoffflüsse für einen *E. coli* K12 Wildtyp mittels ^{13}C -Stoffflussanalyse ermittelt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 22 dargestellt.

18 Entwicklung einer schnellen Probenahmeinheit

Zur Durchführung der isotopisch instationären Markierungsexperimente wurde eine Probenahmeinheit für bis zu 20 Proben entwickelt. Diese ermöglicht es, zu einem beliebigen Zeitpunkt schnell und automatisiert ein genau definiertes Volumen aus dem Reaktor zu entnehmen und den Zellstoffwechsel sofort nach der Probenahme zu stoppen. Zur automatisierten und sterilen Entnahme der Probe aus dem Reaktor wurde ein kommerziell erhältliches Probenahmeventil verwendet (18.2). Zur Positionierung der Probengefäße unter dem Ventil wurde ein mittels Elektromotor beweglicher Probenahmeteller konstruiert (18.3). Die Entwicklung des Probenahmetellers, der Reaktorhalterung und die Charakterisierung des Probenahmesystems erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit (Goevert 2004). In der folgenden Abbildung ist das neu entwickelte Probenahmesystem bestehend aus Ventil, Probenahmeteller und Halterung dargestellt.

Abbildung 18.1: Zeichnung und Foto des Reaktorsystems mit der schnellen Probenahmeinheit



18.1 Stopp des Zellstoffwechsels

Durch die geringen Konzentrationen der intrazellulären Metabolite und die hohen Substrataufnahmeraten sind die Stoffwechselprozesse von Bakterien sehr schnell (Kapitel 4.4). Mit Hilfe von Stimulationsexperimenten konnte bei verschiedenen Mikroorganismen gezeigt werden, dass nach der Zugabe von Glukose zu einer substratlimitierten Kultur, innerhalb weniger Millisekunden eine Antwort in den intrazellulären Metaboliten zu beobachten ist (Oldiges and Takors 2005; Visser et al. 2002; Weuster-Botz 1997). Zum Stopp des Zellstoffwechsels wurde bei diesen Experimenten 15 ml einer etwa -50°C kalten wässrigen Methanollösung (60% v/v) verwendet in die 3-5 ml der Fermentationsbrühe gegeben wurden. Bei einer Temperatur der Fermentationsbrühe von 37°C ergibt sich eine Mischtemperatur von -30 bis -20°C (Buchholz et al. 2002). Diese einfache Methode hat sich als geeignet erwiesen, um den Zellstoffwechsel sofort nach Vermischung der Fermentationsbrühe mit der Methanollösung zu stoppen (Chassagnole et al. 2002; Ostergaard et al. 2001; Schaefer et al. 1999; Theobald et al. 1993). Hierbei kommen mehrere Effekte zum Tragen:

1. **Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit:** Die Aktivierungsenergie von enzymatischen Reaktionen liegt zwischen 16 und 84 kJ/mol. Für die meisten Reaktionen liegt der Wert bei 46 kJ/mol (Flickinger and Drew 1999). Nach Arrhenius verringert sich beim Abkühlen von 37°C auf -20°C die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion bei dieser Aktivierungsenergie etwa um den Faktor 56.
2. **Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit:** Durch die Temperaturabsenkung reduziert sich die Diffusionsgeschwindigkeit der Metabolite und Enzyme, was zu einer verringerten Reaktionsgeschwindigkeit führt. Nach der Stokes-Einstein-Beziehung ist die Diffusion linear von der Temperatur abhängig und umgekehrt proportional zur Viskosität der Lösung. Die Viskosität von Methanol-Wasser-Gemischen ist auf Grund der Wasserstoffbrückenbindungen höher als die der Reinstoffe (Pancenkov 1946).
3. **Inaktivierung der Enzyme durch Methanol:** Kurzkettige Alkohole haben eine denaturierende Wirkung auf Proteine, da sich auf Grund der sich ausbildenden Wasserstoffbrückenbindungen die Struktur der Proteine verändert. Die Denaturierung der Enzyme führt zu einem vollständigen Stopp der Enzymreaktionen in der Zelle.

Auf Grund dieser Effekte kann man davon ausgehen, dass bei Lagerung der Zellen bei -20°C bis zur Extraktion der Metabolite innerhalb weniger Stunden keine weitere Veränderung des Stoffwechsels mehr stattfindet. Neben der Geschwindigkeit ist ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Methoden, die Möglichkeit vor der Extraktion die Zellen vom Medium zu trennen, da die Lösung bei der sich einstellenden Mischtemperatur von -20°C flüssig ist. Dadurch wird einerseits eine zu starke Verdünnung vermieden und andererseits können intra- und extrazelluläre Metabolite getrennt werden.

Diese etablierte Methode zum schnellen Stopp des Zellstoffwechsels wurde auch für die isotopisch instationären Markierungsexperimente in dieser Arbeit eingesetzt. Mit der zu entwickelnden Probenahmeeinheit sollte es möglich sein, zu einem beliebigen Zeitpunkt der Fermentation eine mengenmäßig genau definierte und repräsentative Probe aus dem Reaktor zu entnehmen und in Gefäße mit kalter Methanollösung zu überführen. Pro Sekunde müssen automatisiert etwa 2-3 Proben aus dem Reaktor entnommen werden.

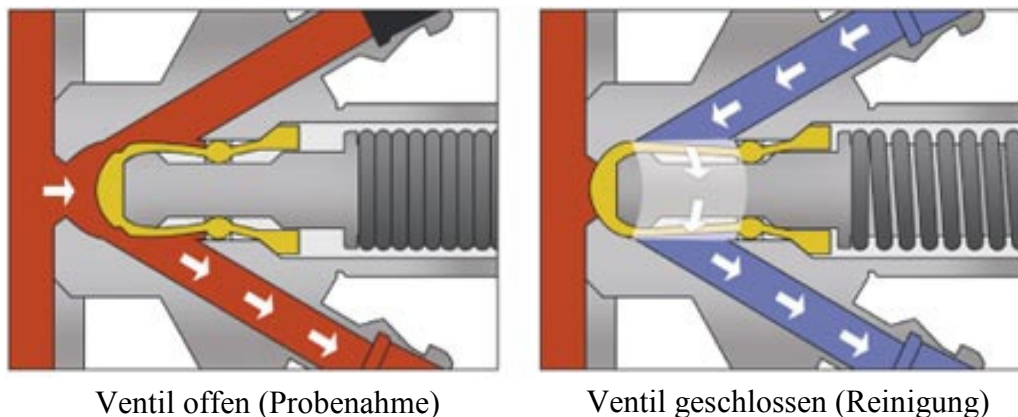
18.2 Probenahmeventil

Zur Entnahme einer repräsentativen und sterilen Probe aus dem Reaktor wurde ein Ventil gesucht, welches die folgenden Anforderungen erfüllt:

1. Entnahme der Probe direkt aus dem Reaktor ohne Probenverlust
2. Geringes Probenvolumen (etwa 2- 5 ml)
3. Möglichkeit zur Automatisierung der Probenahme
4. Einfacher Einbau des Ventils in den Reaktor
5. Keine Totzonen im Ventil (keine Vermischung mit „alter“ Probe)
6. Einfache Sterilisierbarkeit des Ventils

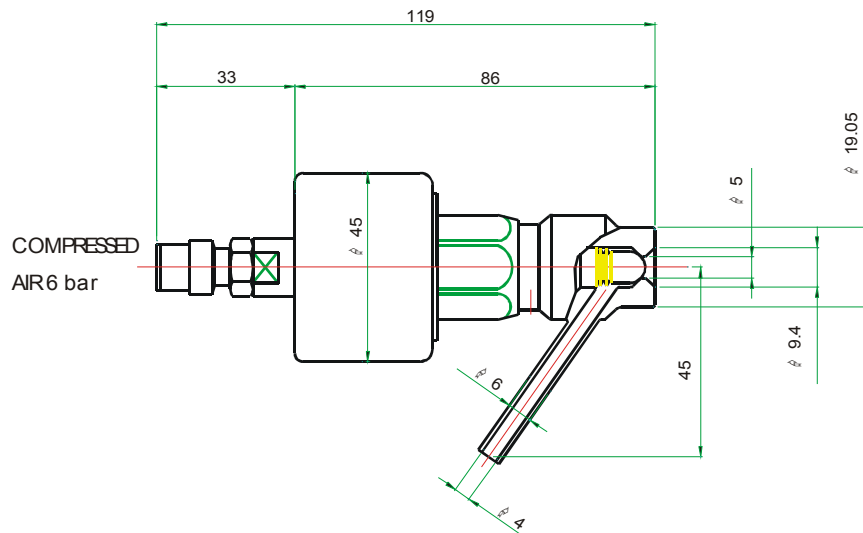
Das gewählte Edelstahl-Ventil (VPAK-PS-ESD/USD/VSD-G) der Firma Aerre Inox erfüllt alle diese Anforderungen. Die Dichtung des beweglichen Kolbens besteht aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und schließt direkt mit der Behälterwand ab, so dass das Totvolumen gering ist. Die minimale Öffnungszeit beträgt etwa 30 Millisekunden, so dass geringe Probemengen (ab 2 ml bei 1 bar Überdruck im Reaktor) aus dem Reaktor entnommen werden können. Das Ventil kann pneumatisch mit 6 bar bedient werden und ist dampfsterilisier- und autoklavierbar. Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau und die Funktionsweise eines vergleichbaren Ventils.

Abbildung 18.2: Funktionsweise des Ventils zur sterilen Probenahme (Keofitt, Dänemark)



Das Ventil wurde von der Mechanischen Werkstatt des Forschungszentrums Jülich in den Bioreaktor eingebaut. Die Maße des Probenahmeventils sind in der folgenden Abbildung 18.3 dargestellt.

Abbildung 18.3: Maße des Probenahmeventils in mm (Aerre Inox, Italien)



Zur automatisierten Ansteuerung des Ventils wurde ein Pilot-Minimagnetventil (Bürkert, Typ 6012P) im Druckluftweg des pneumatischen Antriebs installiert. Mit diesem kann über ein 24 V (DC)-Signal der Weg zum Ventil freigegeben und das Probenahmeventil geöffnet werden. Zum Freibleasen des Ventils mit 1 bar steriler Luft (0,2 µm Sterilfilter) nach der Probenahme wurde ein Schlauchquetschventil der Firma Biochem verwendet, welches ebenfalls durch ein 24 V-Signal angesteuert werden kann. Schlauchquetschventile haben den Vorteil, dass sich die verwendeten Schläuche leicht durch Autoklavieren sterilisieren lassen. Zur Steuerung der Ventile wurde ein digitales I/O-Modul der Firma B&R Industrie-Elektronik GmbH verwendet.

Abbildung 18.4: Mini-Magnetventil (Bürkert) und Schlauchquetschventil (Biochem)

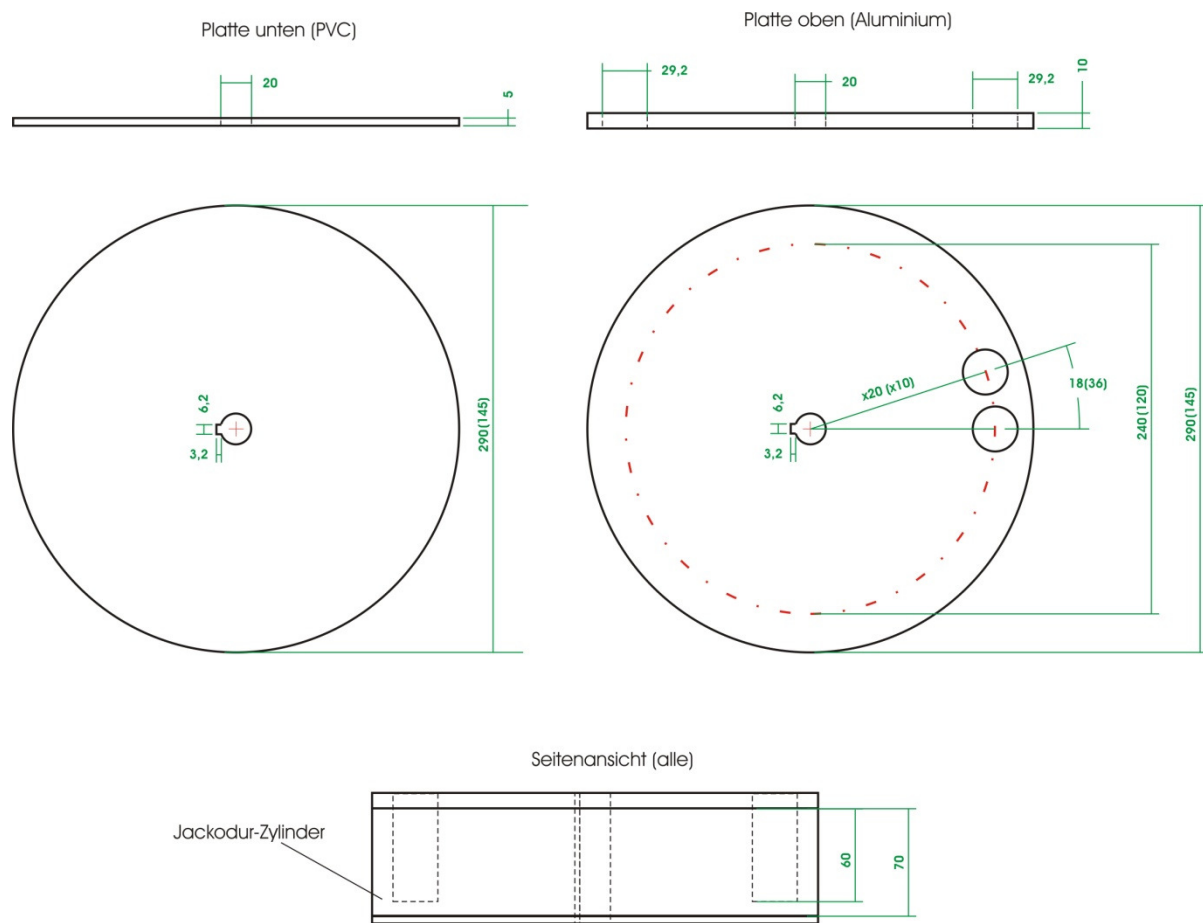


18.3 Probenahmeteller für Probengefäße

Die Probenahmegefäße mit der Methanollösung müssen automatisch unter der Öffnung des Ventils positioniert werden. Als Probenahmegefäße wurden 50 ml Zentrifugenröhrchen verwendet. Diese können auch direkt zur Abtrennung der Biomasse verwendet werden und es entsteht kein Verlust der Probe durch ein ansonsten notwendiges Umfüllen. Um die gesamte Einheit möglichst platzsparend zu gestalten, wurden 10 bzw. 20 Gefäße auf einem runden, drehbaren Teller angeordnet. Die 20 Proben stellen einen Kompromiss zwischen Aufwand und Informationsgehalt dar. In (Nöh et al. 2006) wurde gezeigt, dass mit steigender Anzahl an Proben der Informationsgehalt des Markierungsexperiments zunimmt. Der Zusammenhang kann durch eine logarithmische Funktion beschrieben werden. Eine Verdopplung der Probenanzahl von 10 auf 20 Proben bringt dabei eine Erhöhung des Informationsgehaltes von etwa 16%. Eine weitere Verdopplung der Probenanzahl von 20 auf 40 Proben führt nur noch zu einer weiteren Verbesserung von 14 Prozent. Der experimentelle und analytische Aufwand steigt gegenüber 10 Proben dabei jedoch um das 4-fache.

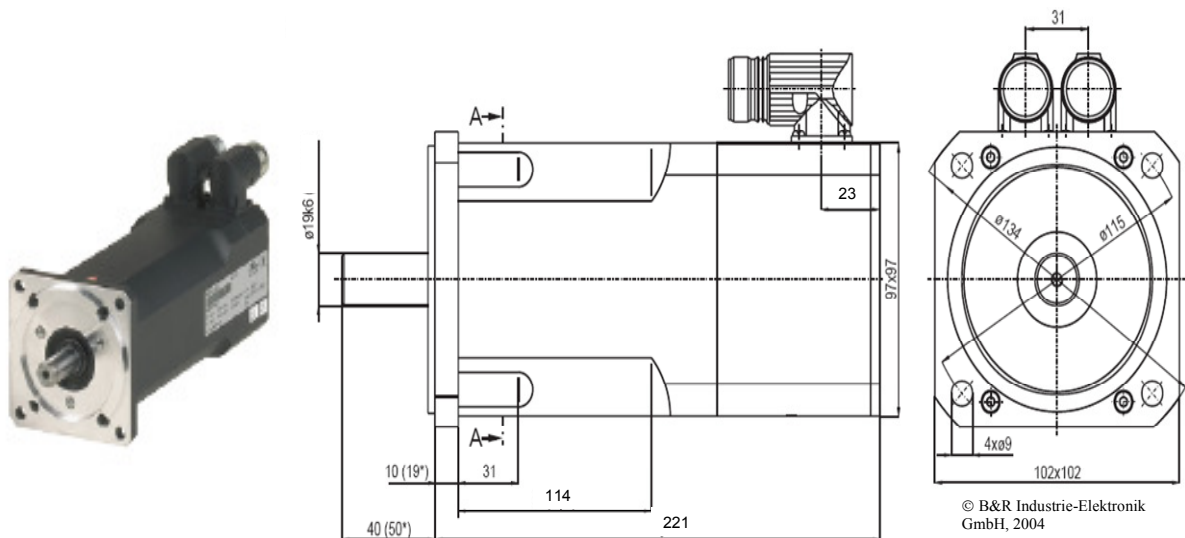
Der drehbare Teller besteht aus einer unteren Platte aus Aluminium bzw. PVC und einer oberen Platte aus Aluminium, in die 10 bzw. 20 Löcher in der Größe der Zentrifugenröhrchen gebohrt wurden. Zwischen den beiden Platten befindet sich eine Isolierung aus einem Polyurethan-Schaum (Jackodur) mit Bohrungen für die Gefäße. Zusätzlich wurde der Probenahmeteller mit einem 3 mm dicken Klebeband aus Acrylnitril-Butadien-Kautschuk (Armaflex) umwickelt. Um ein Herausspritzen von Flüssigkeit bei Vorlage von 15 ml Methanollösung und Drücken über 0,6 bar zu verhindern, wurden die Deckel der Zentrifugenröhrchen mit einem Loch in der Größe des Ventilrohres präpariert. Bei richtiger Positionierung der Probenahmeinheit unter dem Ventil kann somit ein Flüssigkeitsverlust vermieden werden. Die gesamte Einheit sitzt auf einer Welle aus Stahl und wird von einem Edelstahlzylinder fixiert. In der folgenden Abbildung sind die Maße der beiden Probenahmeteller gegeben.

Abbildung 18.5: Maße der Teller für 20 bzw. 10 (Wert in Klammern) Probengefäße



Der Probenahmeteller wird über einen Drehstrom-Synchronmotor 8MSA4M.E0-00 (B&R Industrie-Elektronik GmbH) angetrieben. Der selbstgekühlte Motor zeichnet sich bei hoher Nennleistung durch ein kleines Bauvolumen und ein geringes Gewicht aus. Das EnDat² Singleturn-Gebersystem des Typs E0 erlaubt eine hohe Genauigkeit der Positionierung von ± 60 Winkelsekunden.

² EnDat ist ein von der Johannes Heidenhain GmbH (www.heidenhain.de) entwickelter Standard, der die Vorteile von absoluter und inkrementeller Positionsmessung in sich vereint (<http://www.br-automation.com>).

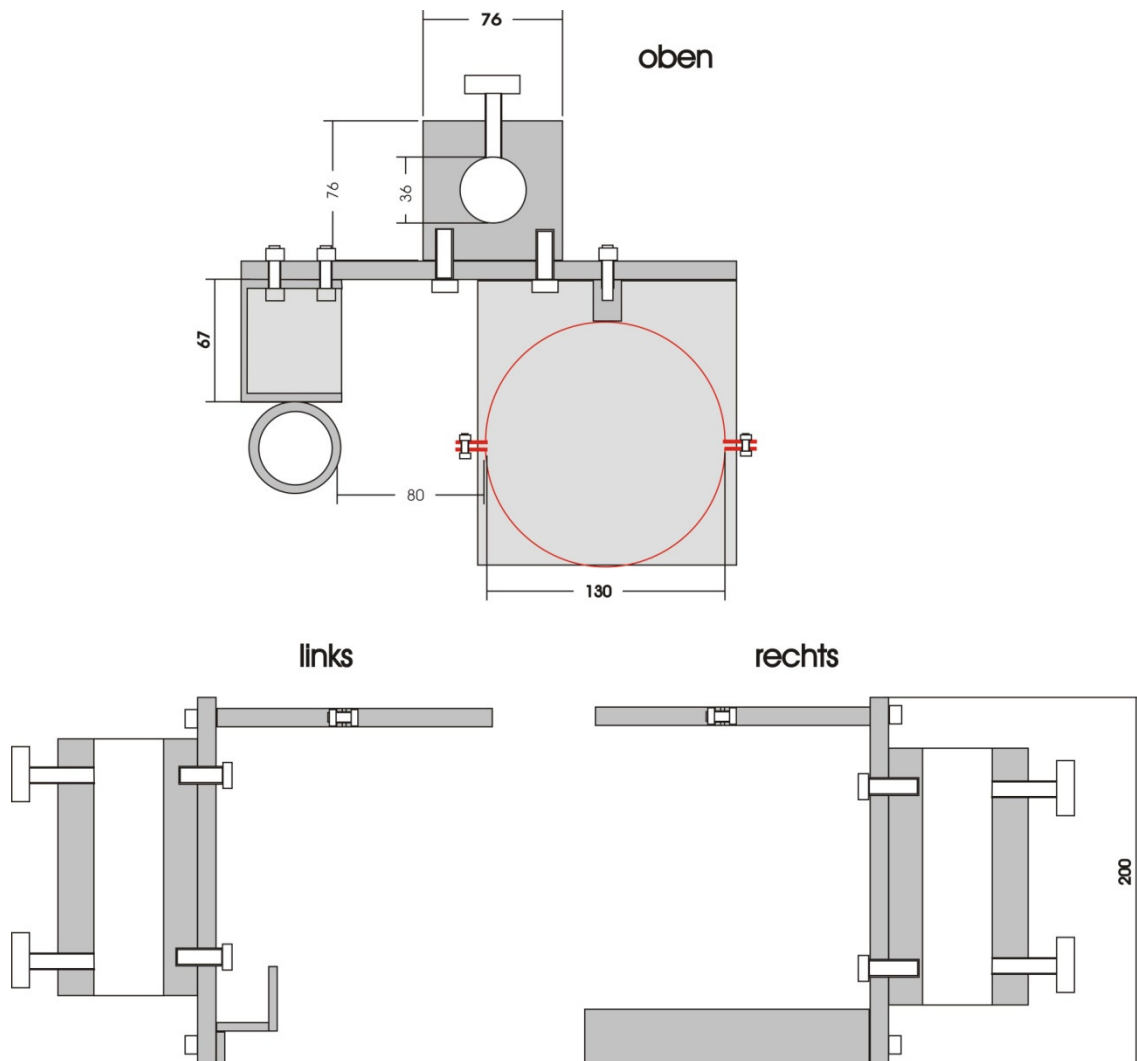
Abbildung 18.6: Foto und Maßzeichnung des B&R-Motors 8MSA4.E0-00

Tabelle 5: Technische Daten des eingesetzten Motors

Technische Daten	Motor 8MSA4.E0-00
Nennzahl n_N [min ⁻¹]	3000
Nennmoment M_N [Nm]	4,60
Nennleistung P_N [kW]	1,45
Nennstrom I_N [A]	3,55
Spitzenmoment M_{\max} [Nm]	21,2
Max. zulässige Axialkraft $F_{a,\max}$ [N]	92
Max. Winkelbeschleunigung [rad/s ²]	80000

Der Betrieb des Motors erfolgt über einen sogenannten ACOPOS-Servoverstärker. Dieser umfasst eine Reihe von Überwachungs- und Steuerungsfunktionen und wird über eine spezielle Software (ACP10) bedient. Der Servoverstärker ist über eine CAN-Schnittstelle mit einer Zentraleinheit (SPS der Serie 2005), verbunden, die über die Programmiersprache ANSI C programmiert werden kann. Die Programmierung erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit am IBT-2 (Behrendt 2005) auf einem Windows PC mit der Programmierumgebung B&R Automation Studio™ 2.4.0.9 (siehe 20.2). Das Programm mit den gewünschten Funktionen wurde anschließend auf die SPS übertragen.

Der Motor wurde an einer Edelstahlplatte befestigt, die über eine runde Aussparung für die Welle verfügt. An die Platte sind vier zylinderförmige Beine geschraubt, die über GummifüÙe verfügen, um ein Wegrutschen des Probenahmetellers während des Betriebs zu vermeiden. Für die Platzierung des Edelstahlbehälters über dem Probenahmeteller wurde eine Halterung konstruiert, welche den Reaktor und die Pulsaufgabeeinheit aufnehmen kann und mit zwei Flügelschrauben an einem Stahlrohrständer befestigt wird.

Abbildung 18.7: Maßzeichnung der Halterung für Reaktor und Markierungsaufgabeeinheit



18.4 Charakterisierung der Probenahmeeinheit

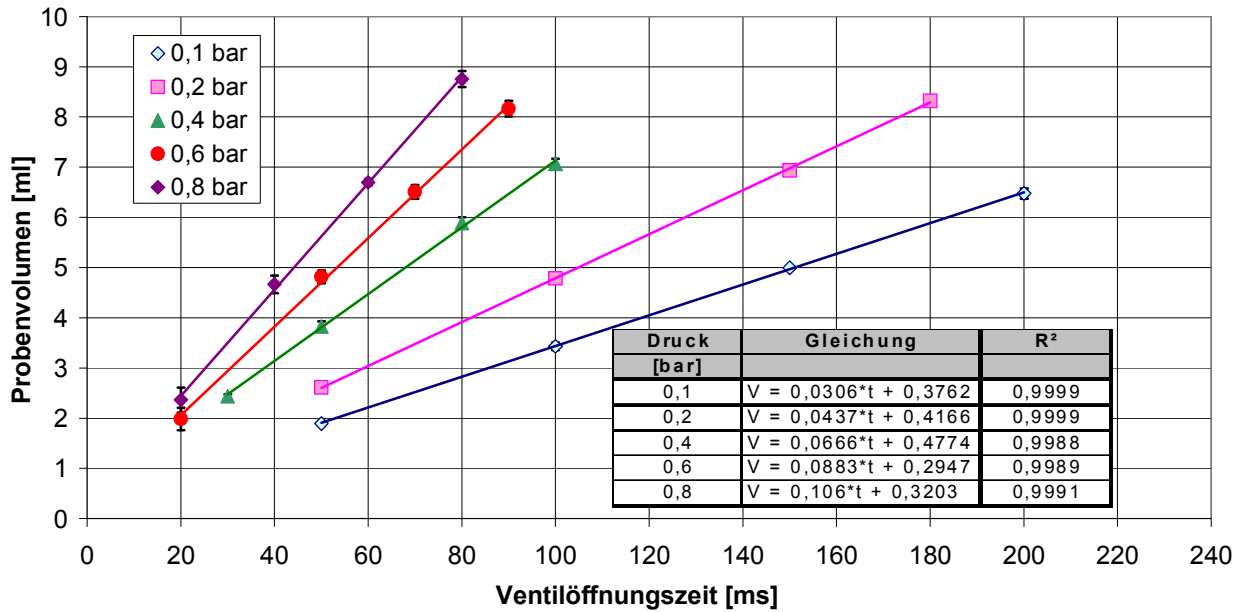
Vor der Durchführung der Experimente zur Charakterisierung der Probenahmeeinheit mit dem großen Probenahmeteller (20er) wurden die Motor- und Ventilparameter optimiert. Zur Gewährleistung einer zuverlässigen Probenahme sollte zwischen den Proben ein minimaler zeitlicher Abstand eingehalten werden. Das nach der Probenahme im Rohr des Probenahmeventils verbleibende Restvolumen von etwa 1 ml wurde durch einen Luftstoß von 1 bar und 100 ms Dauer (`luft_open_dauer`) zuverlässig entfernt. Zwischen Probenahme und dem Luftstoß wurde eine Wartezeit (`luft_open_time`) von 50-100 ms eingeplant, um ein vollständiges Schließen des Ventils sicherzustellen. Nach der Probenahme wird der Teller in die Position der nächsten Probe gedreht. Bis zum vollständigen Stillstand des Probenahmetellers wird eine Zeit von maximal 100 ms benötigt. Mit diesen Parametern ist es möglich, etwa alle 300 ms eine Probe zu nehmen, so dass sich je nach Druck im Reaktor eine Probenahmefrequenz von etwa 3 s^{-1} ergibt. Die Ventilöffnungszeit sollte dabei nicht kleiner als 30 ms sein.

18.4.1 Ermittlung des Probenvolumens

Das Volumen der Probe hängt maßgeblich vom Druck im Reaktor, der Dichte und Viskosität des Mediums, der Geometrie des Ventils und der Ventilöffnungszeit ab. Eine Abhängigkeit des Probenvolumens von der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate wurde nicht festgestellt. Für die bakterielle Fermentation kann angenommen werden, dass die Dichte und Viskosität der Fermentationsbrühe für die Dauer der Fermentation konstant sind. Da die Geometrie des Ventils ebenfalls konstant ist, bleiben als Parameter nur der Reaktordruck und die Ventilöffnungszeit. Bei den nachfolgenden mit Wasser (25°C) durchgeführten Versuchen wurden eine Rührerdrehzahl von 500 rpm und eine Begasungsrate von 1 l/min verwendet. Es wurden verschiedene Reaktordrücke eingestellt und für jede Ventilöffnungszeit 20 Proben im Abstand von je einer Sekunde genommen. Das Probenvolumen wurde gravimetrisch bestimmt.

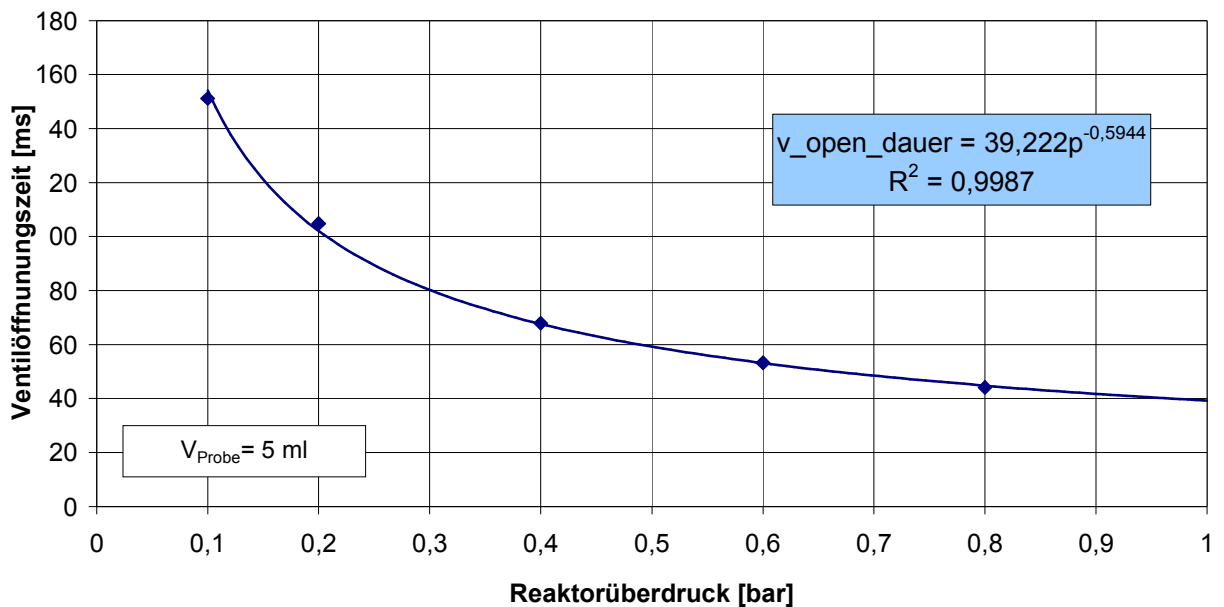
Wie die folgende Abbildung 18.8 zeigt, besteht eine lineare Abhängigkeit des Probenvolumens von der Ventilöffnungszeit. Die auf Basis der jeweils 20 entnommenen Proben bestimmte relative Standardabweichung des Probenvolumens für Ventilöffnungszeiten ≥ 30 ms ist kleiner als 3,75 %. Mit diesen Daten kann für ein Probenvolumen von 5 ml die Abhängigkeit der Ventilöffnungszeit vom Reaktordruck ermittelt werden.

Abbildung 18.8: Abhängigkeit des Probenvolumens vom Reaktordruck und der Öffnungszeit



Zwischen Ventilöffnungszeit und Druck besteht eine potenzielle Abhängigkeit, die durch die in der Abbildung 18.9 angegebene Gleichung beschrieben werden kann.

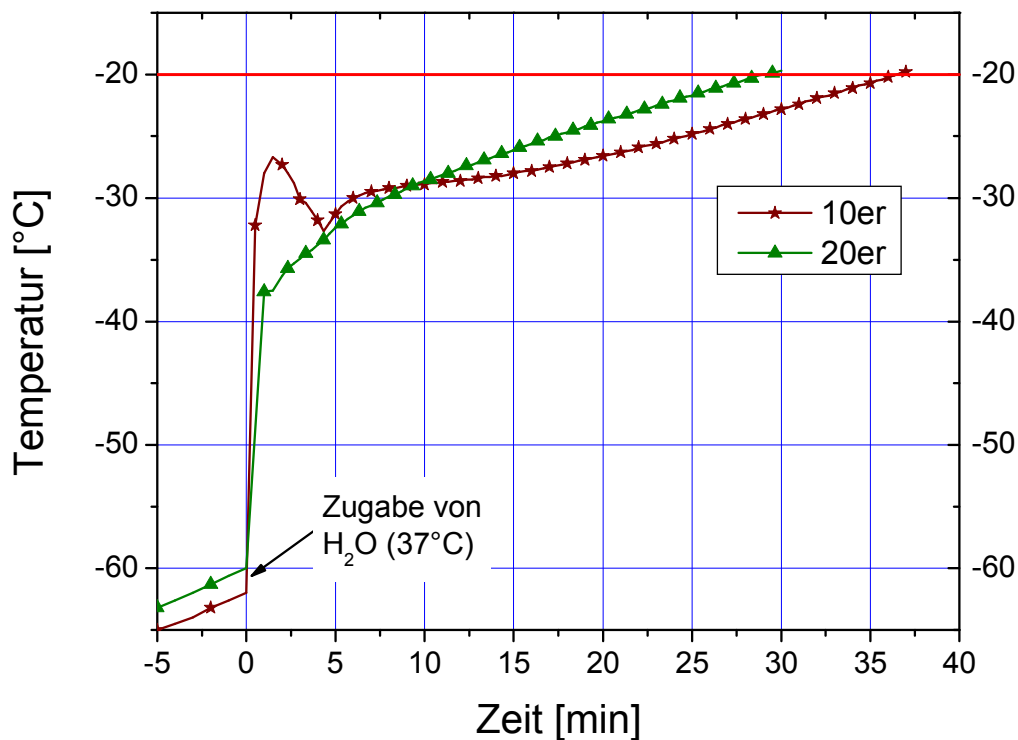
Abbildung 18.9: Abhängigkeit der Ventilöffnungszeit vom Druck für 5 ml Probenvolumen



18.4.2 Test der Isolierung des Probenahmetellers

Zum Test der Isolierung wurde geprüft, wie lange die Proben maximal bei Raumtemperatur (25°C) im Probenahmeteller verbleiben können bevor die Temperatur einen Wert von -20°C übersteigt. Hierzu wurde der Probenahmeteller für etwa eine Stunde bei -80°C im Eisschrank gekühlt. Anschließend wurde er entnommen und die ebenfalls bei -80°C gelagerten Probenröhrchen in die entsprechenden Vertiefungen gestellt. Nachdem die Methanollösung kurz nach dem Auftauen eine Temperatur von etwa -60°C erreicht hatte, wurden 3 ml Wasser mit einer Temperatur von 37°C dazugegeben und die Temperatur etwa alle 30 Sekunden mit einem elektronischen Thermometer (PT100) gemessen.

Tabelle 18-6: Temperaturverlauf der Methanollösung in den isolierten Zentrifugenröhrchen des 10er und 20er Probenahmetellers

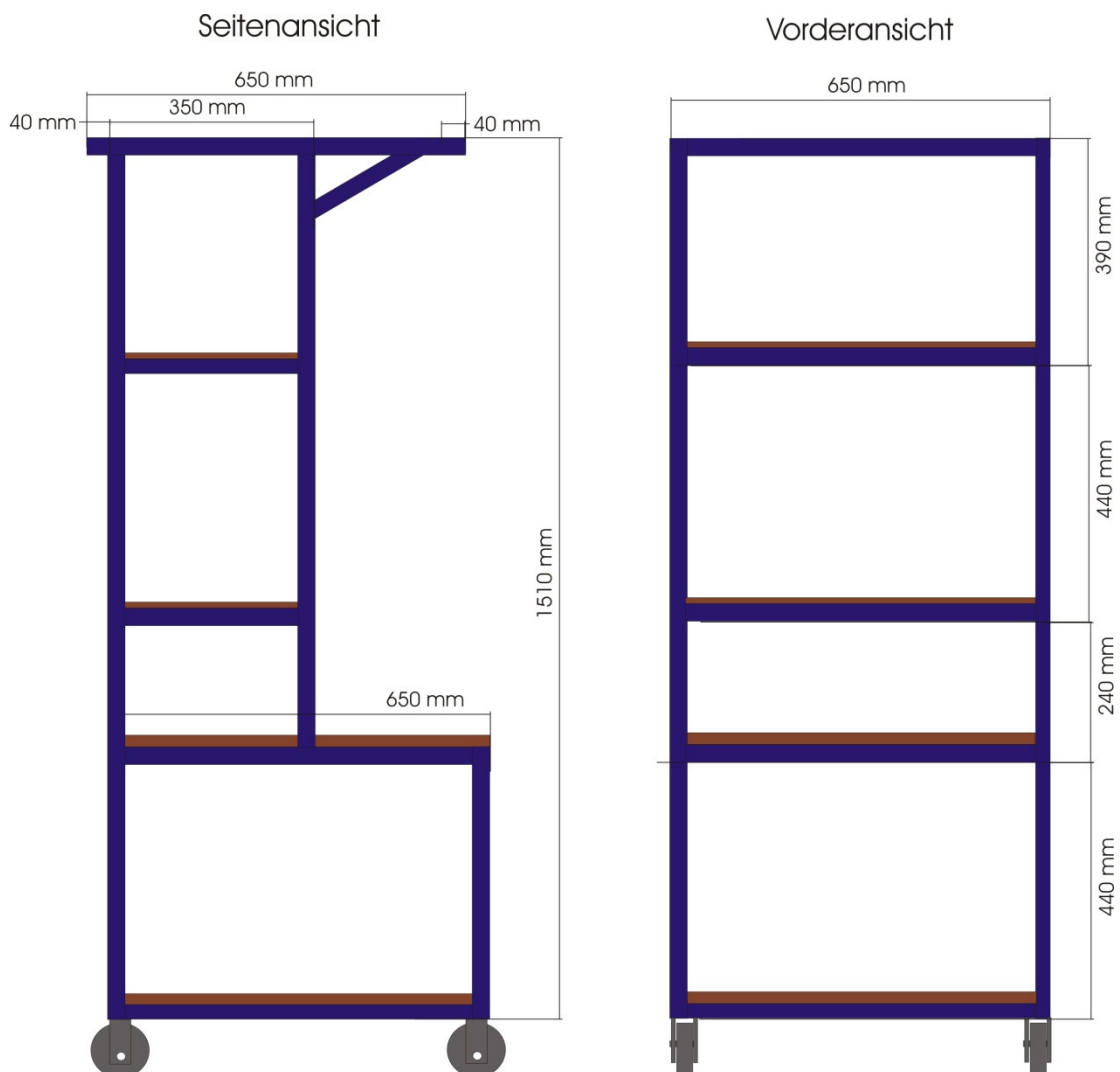


Es zeigt sich, dass mit Kühlung des Probenahmetellers und 3 ml Probe für etwa 30–35 Minuten die Temperatur unter -20°C bleibt. Diese Zeit ist für die meisten isotopisch instationären Markierungsexperimente ausreichend. Eine schnelle Probenahme ist insbesondere in den ersten Sekunden bis wenige Minuten nach der Markierungsaufgabe notwendig, da sich in dieser Zeit die Markierungsanreicherung in den intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels besonders schnell ändert (Noeh et al. 2006). Der unterschiedliche Temperaturverlauf bei den beiden Probenahmetellern ist vermutlich auf die geringere Wärmekapazität des 20er Tellers zurückzuführen, da hier die untere Platte aus Gewichtsgründen aus PVC und nicht wie beim 10er aus Aluminium besteht.

19 Entwicklung eines mobilen Systems

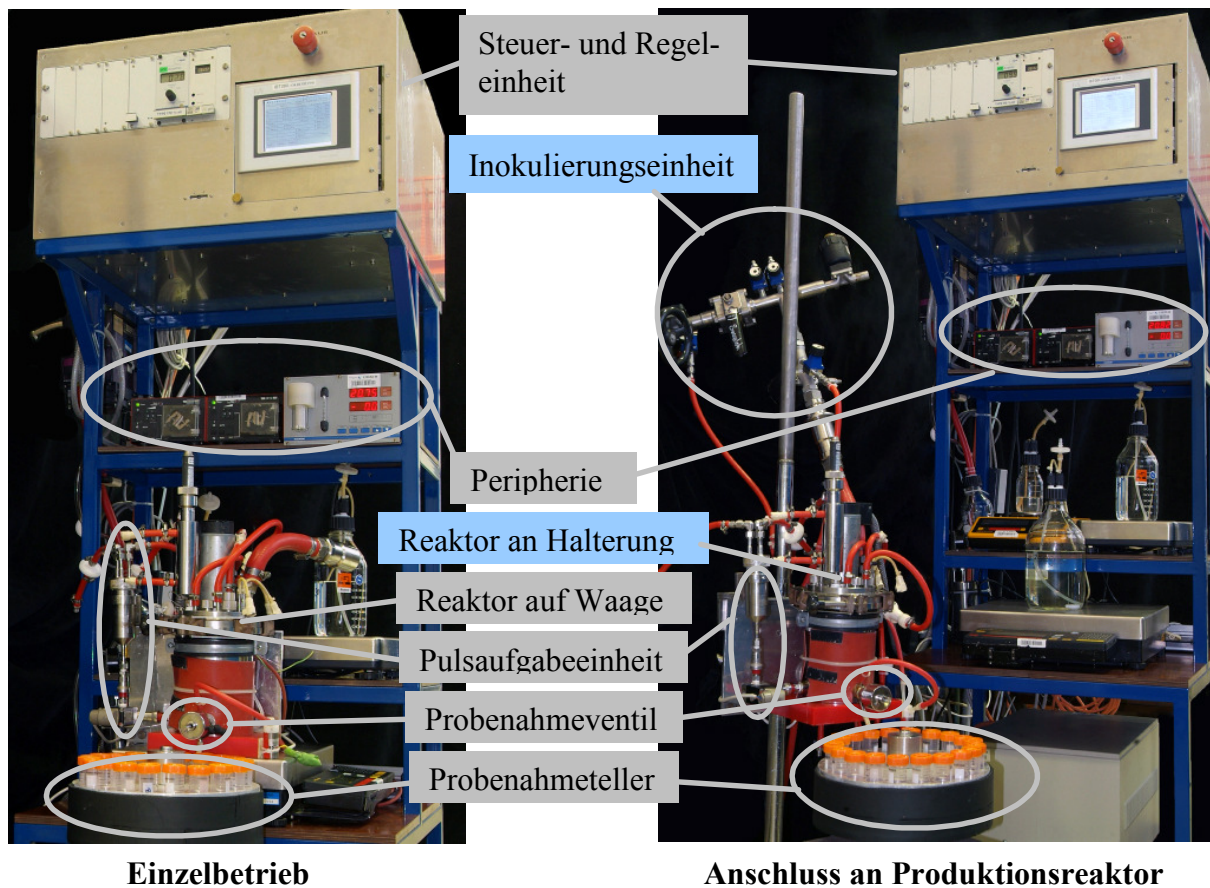
Das Reaktorsystem soll an verschiedene Produktionsreaktoren angeschlossen werden können. Hierzu wurde das gesamte System mobil gestaltet. Es wurde ein Gestell geplant und konstruiert, welches die für die Markierungsexperimente notwendigen Geräte aufnehmen kann. Das Gestell besteht aus einem Stahlgerüst aus Vierkanthohlprofilen. Auf verschiedenen Ebenen können die Peripheriegeräte (Pumpen, Waagen, Abgasanalyse etc.) platziert werden. Als Ablagen wurden Verbundplatten verwendet, die sehr stabil und resistent gegen Säuren und Laugen sind. Das gesamte Gestell ist durch fixierbare Räder fahrbar. Durch verschiedene Befestigungsmöglichkeiten können die Zubehörteile (Inokulierungseinheit, Reaktorständer, Markierungsaufgabe, Probenahme etc.) für den Transport gesichert werden. Die folgende Abbildung zeigt das Gestell in der Seiten- und Vorderansicht mit den Maßen.

Abbildung 19.1: Maßzeichnung des Stahlrohrgestells für das Reaktorsystem



Der Sensorreaktor kann als eigenständiger Bioreaktor oder parallel zu einem Produktionsreaktor betrieben werden. Beim eigenständigen Betrieb kann der Reaktor auf einer Waage, die auf der zweiten vorgezogenen Ebene steht, platziert werden. Dieser Waagenwert wird zusammen mit den Prozessdaten protokolliert, so dass die Volumenveränderung im Reaktor nachvollzogen werden kann. Zum Parallelbetrieb muss der Reaktor in der Nähe des Produktionsreaktors platziert werden, um ihn über die Inokulierungseinheit mit diesem zu verbinden. Hierzu kann die Reaktorhalterung (Kapitel 18.3) verwendet werden. In beiden Fällen kann die schnelle Probenahmeinheit optimal unter dem Ventil positioniert werden. Beide Funktionsweisen sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

Abbildung 19.2: Foto des mobilen Reaktorsystems im Einzel- und Parallelbetrieb



20 Steuerung und Regelung des Reaktorsystems

Der Kern des Reaktorsystems besteht aus dem Bioreaktor und der zugehörigen Peripherie mit den typischen Regelgrößen. Für die Durchführung der Parallelkultivierungen und der Markierungsexperimente sind weitere Aufgaben zu erfüllen, wie die Inokulierung, die Prozessdatenübertragung, die Markierungsaufgabe und die automatisierte Probenahme. Zur Steuerung und Regelung des gesamten Reaktorsystems wurde eine speicherprogrammierbare Steuer- und Regeleinheit (SPS) konzipiert mit dem Ziel einen sicheren Ablauf der Experimente zu gewährleisten und ein einfaches und einheitliches Bedienkonzept zu realisieren. In Zusammenarbeit mit den elektronischen und mechanischen Werkstätten des Instituts wurden diese anschließend konstruiert und gebaut. Die Programmierung erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit (Behrendt 2005). Mit der zu konzipierenden speicherprogrammierbaren Steuerung sollten die folgenden Steuer- und Regelaufgaben erledigt werden:

Tabelle 20-1: Steuer- und Regelaufgaben der konzipierten Steuer- und Regeleinheit

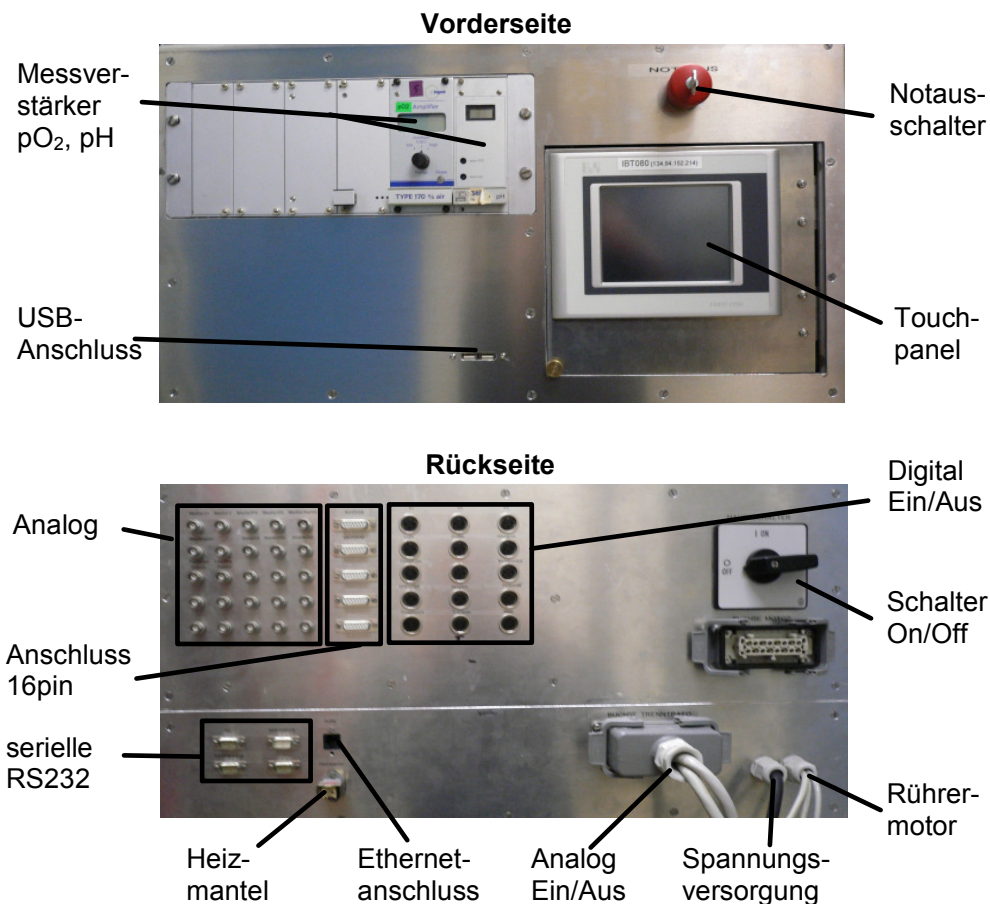
Bezeichnung	Geräte	Aufgabe / Stellgröße	Bemerkungen
Produktionsreaktor	Prozesskontrolle	Master/Slave-Betrieb	Parallelfertmentation
Inokulierungseinheit	3 Ventile (V1-V3)	auf/zu	
Markierungsaufgabe	Ventil (V6)	auf/zu	
Probenahme	2 Ventile (V4, V5) Motor	auf/zu Position	Softwareregelung
Feed 1	Pumpe	Leistung (Drehzahl)	
Feed 2	Pumpe	Leistung (Drehzahl)	
Gasanalyse	Sensor O ₂ , CO ₂	Istwerterfassung	
Zuluft	Gasstrom-Regler	Sollwert Strom [L/min] Istwerterfassung	Hardwareregelung
Rührer	Regler	Sollwert Drehzahl Datenaufzeichnung	Hardwareregelung
Temperatur	Sensor Ventil Kühlung Heizmantel	Istwerterfassung auf/zu an/aus	PID-Regelung
Druck	Sensor Proportionalventil	Istwerterfassung [%] Öffnung	PID-Regelung
pH-Wert	Sensor Pumpe	Istwerterfassung an/aus	PID-Regelung
pO ₂ -Wert	Sensor Rührer	Istwerterfassung Leistung	PID-Regelung

Die Sollwerte der Prozessparameter werden vom Master-Reaktor eingelesen oder manuell vorgegeben. Die Zufütterung erfolgt über Schlauchpumpen, deren Leistung über ein analoges Signal gesteuert werden kann. Die Regelung der Zuluft erfolgt über einen Gasstromregler der Firma Brooks. Der Rührer des Reaktors und der Motor der Probenahmeinheit besitzt eine eigene hardwareseitige Regelung mit analogen Schnittstellen für den Soll- und Istwert. Die Regelung von Temperatur, Druck, pH- und pO_2 -Wert soll über einen softwareseitigen PID-Regler erfolgen, bei dem die Regelparameter frei gewählt werden können.

20.1 Hardwarekomponenten

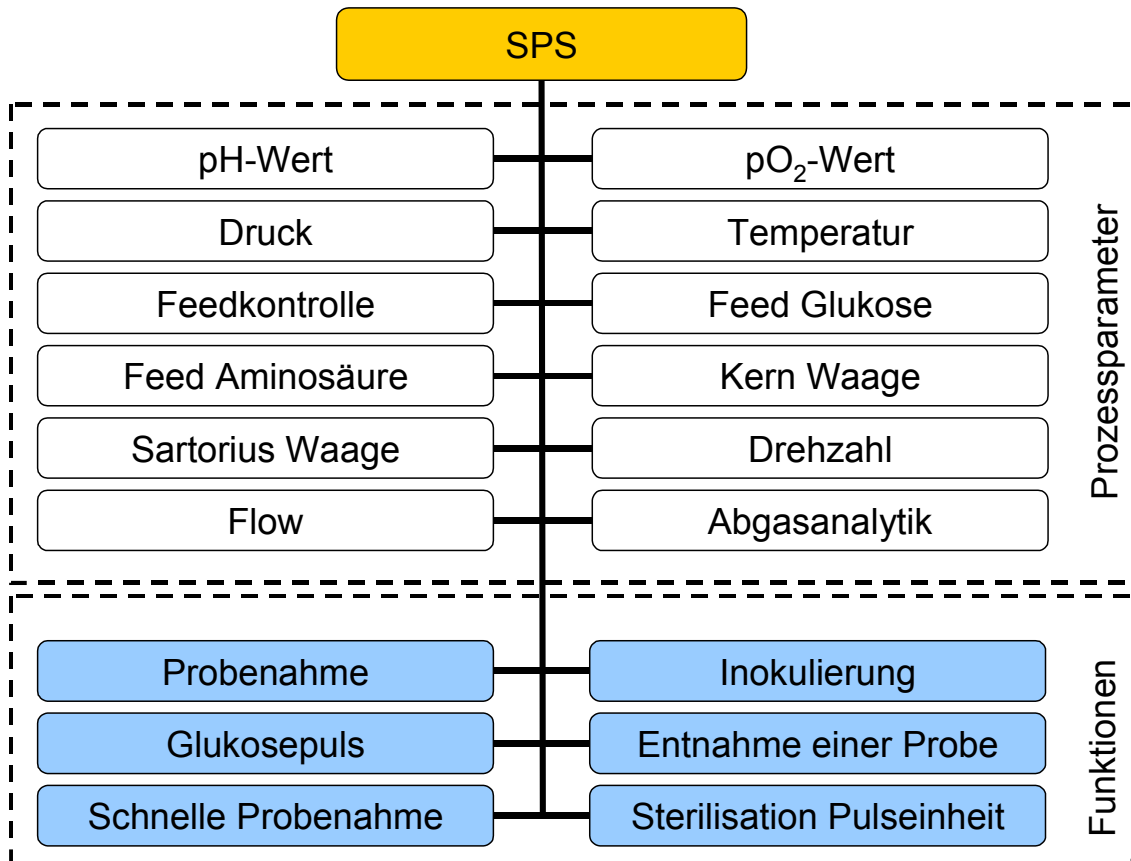
Die Hardwarekomponenten (siehe Tabelle A3) wurden zusammen mit der notwendigen Spannungsversorgung in ein dafür konstruiertes Aluminiumgehäuse eingebaut. Der für den Drehstrommotor benötigte Trenntrafo ist in einem zusätzlichen Gehäuse untergebracht. Die folgende Abbildung zeigt die Vorder- und Rückseite der Steuer- und Regeleinheit. Auf der Vorderseite sind das Touchpanel zur Bedienung des Systems, die Messverstärker für pH- und pO_2 -Wert und die USB-Schnittstellen für den Datentransfer zu sehen. Auf der Rückseite befinden sich alle notwendigen Anschlüsse für die Kommunikation mit dem Master-Reaktor und den Peripheriegeräten.

Abbildung 20.1: Vorder- und Rückansicht der entwickelten Steuer- und Regeleinheit für das Reaktorsystem zur Durchführung von ^{13}C -Markierungsexperimenten



Die Module sind zusammen mit den Hardwarekomponenten in einem sogenannten Projekt zusammengefasst. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die einzelnen Module. Diese wurden auf der SPS nach Prozessparametern (pH, pO_2 , etc.) und Funktionen (Inokulierung, Probenahme, Glukosepuls, etc.) unterteilt.

Abbildung 20.3 Übersicht über die Module auf der Zentraleinheit (SPS) zur Steuerung und Regelung des Reaktorsystems.



In den Modulen der Prozessparameter sind Programme zur Kalibrierung, Steuerung/ Regelung, Anzeige und Aufzeichnung der Parameter hinterlegt. Die Protokollierung aller Parameter erfolgt in einem frei wählbaren Zeitintervall in eine Textdatei auf einer Compact-Flash-Karte. Von dieser kann die Datei mittels USB auf ein anderes Speichermedium übertragen werden. Mit weiteren Modulen können die einzelnen Funktionen des Reaktorsystems parametrisiert und gestartet werden. Eine ausführliche Beschreibung der Module findet sich in der Diplomarbeit von (Behrendt 2005).

20.3 Funktionsumfang der Steuer- und Regeleinheit

Die in dieser Arbeit konzipierte speicherprogrammierbare Steuer- und Regeleinheit (SPS) erfüllt vielfältige Funktionen, die zur Durchführung von Markierungsexperimenten und Verfolgung der Dynamik der Markierungsanreicherung notwendig sind:

- 1) Realisierung des Master-Slave-Betriebs durch Übertragung der Prozessdaten (T, p, pH, pO₂, Feedraten) eines Produktionsreaktors auf den Sensorreaktor
- 2) Regelung des Sensorreaktors über programmierbare PID-Regler
- 3) Steuerung der Inokulierung (Zeitpunkt und Dauer der Ventilöffnungen)
- 4) Steuerung der Markierungsaufgabe (Zeitpunkt und Dauer der Aufgabe)
- 5) Steuerung der Probenahme (Start und Zeitpunkte der Probenahme, Größe des Probenvolumen, Freiblasen des Ventils der Probenahme)
- 6) Kommunikation mit unterschiedlichen Peripheriegeräten (Waagen, Pumpen, Analysegeräte etc.) zur Steuerung von Zufütterungsraten, Kalibrierung von Analysegeräten (pH, pO₂) und Datenaufzeichnung
- 7) Bedienung aller Funktionen und Konfiguration des Systems über eine einfache Menüstruktur mit Hilfe eines Touchpanels

Das System verfügt über unterschiedlichste Schnittstellen (analog, digital, seriell, Ethernet, USB) zur Kommunikation. Durch die Modulbauweise und die C-basierte Softwareumgebung kann die SPS leicht um zusätzliche Schnittstellenmodule oder zusätzliche Funktionen erweitert werden. Der Ablauf der Experimente wurde in großen Teilen automatisiert, so dass der manuelle Aufwand gegenüber dem ursprünglichen System wesentlich verringert wurde. Durch die kompakte Bauweise der Einheit und ein für das System konstruiertes Gestell ist ein Transport des Sensorreaktor-Systems ohne Probleme möglich.

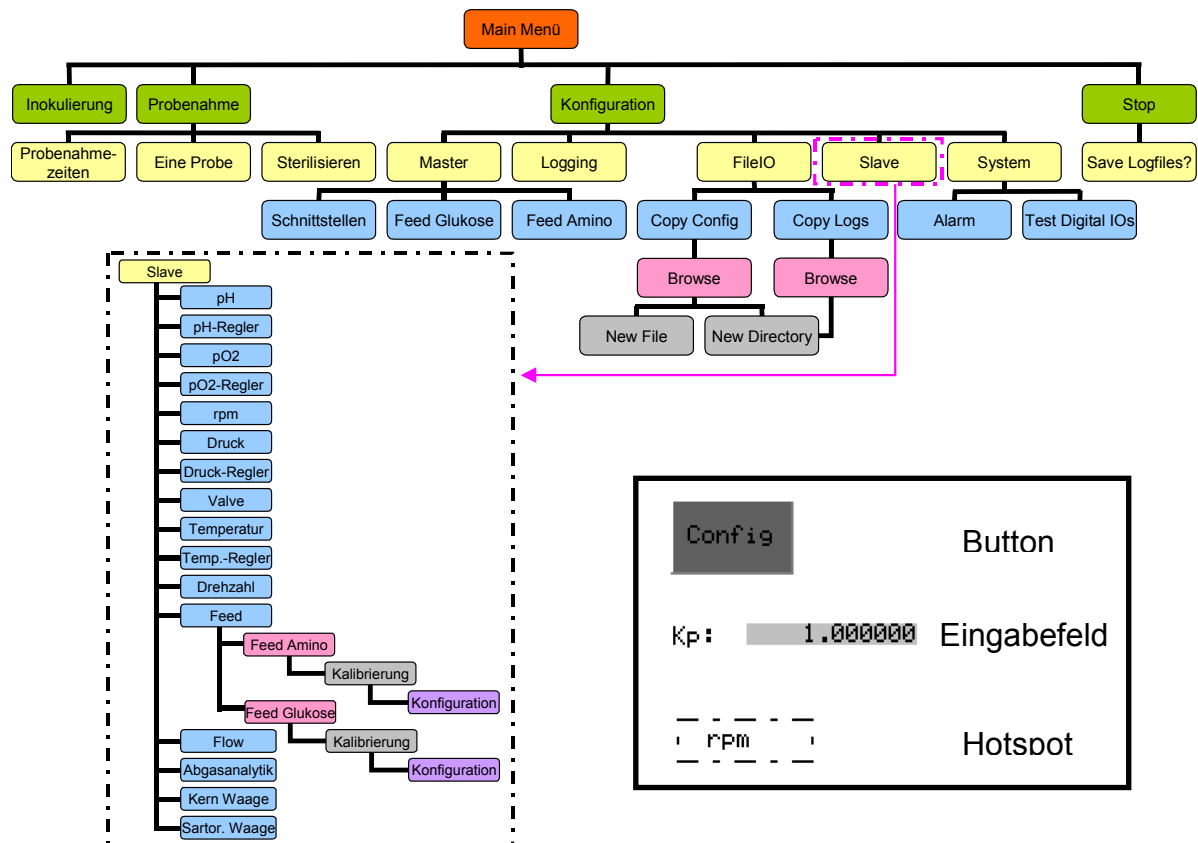
Die Funktionsfähigkeit der Steuer- und Regeleinheit wurde in verschiedenen Tests und im Rahmen einer Diplomarbeit (Hein 2005) unter realen Bedingungen bei einer Parallelfertmentation mit einem 300 Liter Produktionsreaktor gezeigt (Ergebnisse hier nicht dargestellt).

In den nachfolgend durchgeführten isotopisch instationären Markierungsexperimenten wurde das neu entwickelte Reaktorsystem eingesetzt.

20.3.1 Die Benutzeroberfläche

Die Bedienung des Reaktorsystems mit Inokulierung, Parallelferrmentation, Glukosepuls (Markierungsaufgabe) und schneller Probenahme erfolgt über Felder und Tasten, die auf dem Touchpanel in hierarchisch angeordneten Menüs dargestellt sind.

Abbildung 20.4: Hierarchische Anordnung der Menüs auf dem Touchpanel und Darstellung von Eingabefeldern, Buttons und Hotspots



Über **Buttons** (Tasten) kann man durch Berührung eine bestimmte Aktion auslösen bzw. sich in der Menüstruktur bewegen. Im normalen Zustand sind diese dunkelgrau mit schwarzer Schrift dargestellt. Gesperrte Tasten werden schraffiert dargestellt.

Zusätzlich können über sogenannte **Hotspots** Aktionen ausgelöst werden. Diese sind im normalen Betrieb nicht sichtbar und werden verwendet, um die Regler zu parametrisieren. In den nachfolgenden Bildern sind diese Hotspots durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

Eingabefelder sind hellgrau hervorgehoben. Bei Berührung des Feldes erscheint ein Pop-up-Fenster mit numerischer oder alphanumerischer Tastatur, über die Daten eingegeben werden können. Ist ein Eingabefeld gesperrt, wird es grau überdeckt.

Die Menübilder sind in vier Bereiche unterteilt. Am linken oberen Rand wird der Name des aktuellen Bilds angezeigt und ein durch einen Fehler ausgelöster Alarm durch einen blinkenden Schriftzug angezeigt. Oben rechts werden das Datum und die Uhrzeit, die Prozesszeit (hh:min:sec) und die aktuelle Zyklusnummer angezeigt. Am unteren Rand sind Buttons für die Navigation zwischen den Menüs und zum Laden (*Load*) und Speichern (*Save*) der aktuellen Konfiguration und Prozessdaten angeordnet. Der mittlere Bildbereich wird individuell zur Darstellung der aktuellen Inhalte des Bildes verwendet.

Beispielhaft ist in der folgenden Abbildung 20.5 das Hauptmenü dargestellt. Hier sind die aktuellen Istwerte vom Master- und Slave-Reaktor zusammen mit den Sollwerten des Sensorreaktors in Tabellenform dargestellt. Über Buttons können die Regelung der Parameter pH, pO₂, T und p und die Steuerung der Drehzahl und der Begasung (Air) an- oder ausgeschaltet werden. Bei aktiver Probenahme oder Inokulierung wird am linken oberen Bildrand ein P oder I eingeblendet. Über die Buttons *Inoc*, *Prob*, und *Config* kommt man zu weiteren Untermenüs. Mit *Stop* wird nach Bestätigung des erscheinenden Dialogs der aktuelle Prozesszyklus beendet und eine Aufforderung zur Speicherung der Prozess- und Konfigurationsdaten erscheint. Die Darstellung der anderen Menüs findet sich im Anhang B.3.

Abbildung 20.5: Darstellung des Hauptmenüs der Benutzeroberfläche der zentralen Steuer- und Regeleinheit (SPS)

Mainmenü		24.01.05 14:45:03	
FZJ Prozesssteuerung		ALARM	00:30:24 /Zyklus: 1
(I) (P)	Master	Slave	
	Istwert	Istwert	Sollwert Regler
pH	7.0 [-]	6.9 [-]	7.0 [-] aus
pO ₂	67.5 [%]	68.0 [%]	68.0 [%] aus
T	37.0 [C]	37.0 [C]	37.0 [C] aus
Druck	0.3 [bar]	0.3 [bar]	0.3 [bar] aus
Drehzahl		503 [rpm]	500 [rpm] aus
Feed Gluc.	500.0 [g/h]		84.00 [mg/h]
Feed Amino	206.4 [g/h]		3.85 [mg/h]
Air		1.64 [l/min]	1.65 [l/m] aus
O ₂		20.64 [%]	-----
CO ₂		86.60 [%]	Testumgebung
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> Inoc Prob Config Stop </div>			

21 Freisetzung der intrazellulären Metabolite

Für die isotopisch instationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse werden neben der Dynamik der Markierungsanreicherung auch die intrazellulären Konzentrationen der Metabolite benötigt. Um an die Konzentration der intrazellulären Metabolite zu kommen, sind die folgenden Prozessschritte notwendig: 1) Stopp des Zellstoffwechsels (Quenching), 2) Extraktion der Metabolite und 3) Messung der Konzentration (analytische Methode). In diesem Kapitel soll der zweite Prozessschritt näher betrachtet werden.

Für die Analyse des Markierungsmusters und der Konzentration müssen die sich im Cytosol der Zelle befindlichen Metabolite freigesetzt werden. Gleichzeitig ist eine Inaktivierung der Enzyme notwendig, um die bei Erwärmung der Proben einsetzenden Reaktionen zu verhindern. Für die Freisetzung der Metabolite und die Inaktivierung der Enzyme werden meist chemische Methoden eingesetzt, die im wesentlichen auf zwei Prinzipien bzw. einer Kombination dieser beruhen:

- 1) Zerstörung der Zellmembran durch eine starke Änderung des pH-Werts (z.B. durch Kalilauge (KOH, basisch) oder Perchlorsäure (PCA, sauer)
- 2) Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran und Extraktion der Metabolite in ein organisches Lösemittel (häufig Chloroform (CHL) oder Alkohole wie Methanol (MeOH) oder Ethanol (EtOH))

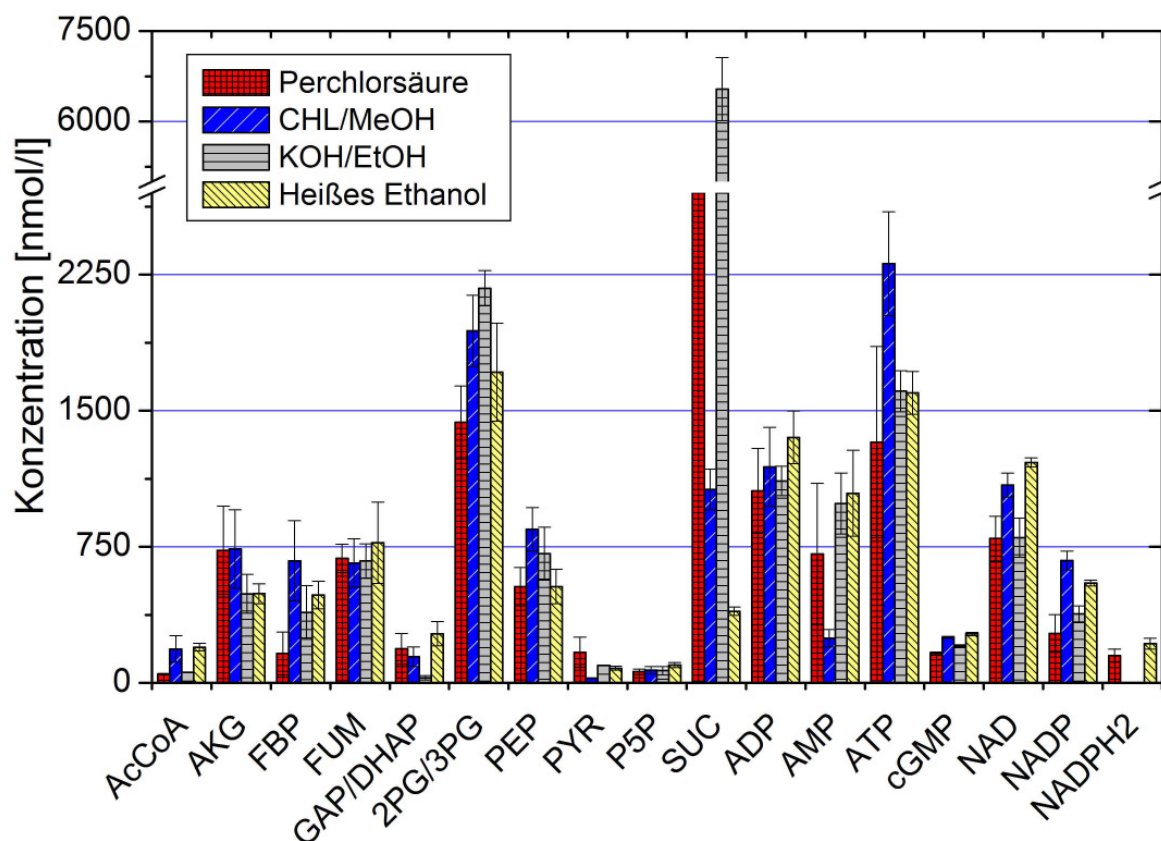
Teilweise wird die Inaktivierung der Enzyme und der Zellaufschluss durch eine Erhitzung der Proben unterstützt (z.B. heißes Ethanol).

Insbesondere für die exakte Bestimmung der intrazellulären Konzentration ist eine vollständige Freisetzung der Metabolite notwendig, ohne dass diese eine chemische Veränderung erfahren. Bei den Markierungsmustern sind die absoluten Werte der einzelnen Markierungen nicht entscheidend, sondern nur die Verhältnisse der Markierungen. Trotzdem ist auch hier eine möglichst vollständige Freisetzung erforderlich, da der Messfehler der Analytik mit abnehmender Konzentration stark ansteigt.

Das Thema „Messung intrazellulärer Metabolite“ hat mit der Entwicklung und Verbreitung der Methoden des *Metabolic Engineering* in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung erlangt. In der Literatur sind sehr viele Methoden zur Freisetzung der intrazellulären Metabolite und die Inaktivierung der Enzyme beschrieben. In dieser Arbeit wurden verschiedene chemische Verfahren mit einem *E. coli* Wildtyp getestet (de Koning and van Dam 1992; Gonzalez et al. 1997; Hajjaj et al. 1998).

Mit Ausnahme des Aufschlusses mit heißem Ethanol wurden alle Versuche bei -20°C durchgeführt. Die Analytik erfolgte mittels LC-MS/MS (Kapitel 12.5). Die Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse für verschiedene Metabolite des Zentralstoffwechsels und Co-Faktoren sind in der folgenden Abbildung 21.1 dargestellt. Die gezeigte Standardabweichung beruht auf den Messwerten von fünf gleich behandelten Proben.

Abbildung 21.1: Vergleich der mittels LC-MS/MS gemessenen Konzentrationen nach der Freisetzung der intrazellulären Metabolite (jeweils 5 Proben)



Die dargestellten Konzentrationswerte und Standardabweichungen zeigen keinen eindeutigen Vorteil für ein Verfahren. Bei einzelnen Metaboliten (z.B. AcCoA, FBP, GAP/DHAP, SUC) lassen sich große Unterschiede zwischen den Verfahren feststellen. Insbesondere für Succinat sind die Konzentrationen beim Einsatz von Perchlorsäure (PCA) und basischem Ethanol (KOH/EtOH) wesentlich größer. Vermutlich wird bei diesen beiden Verfahren an Enzyme oder andere Zellbestandteile (z.B. SuccCoA) gebundenes Succinat zusätzlich freigesetzt. Es lässt sich jedoch feststellen, dass der Zellaufschluss mit Perchlorsäure (PCA) die im Vergleich höchste Standardabweichung hat. Dies ist vermutlich auf die starke Schaumbildung durch das bei der Neutralisation gebildete CO_2 und den dadurch verursachten Probenverlust zurückzuführen.

Der Zellaufschluss mit heißem Ethanol (EtOH) hat in den meisten Fällen eine etwas geringere Standardabweichung als die anderen Methoden. Dies hängt vermutlich mit der höheren Konzentration der Metabolite auf Grund der Verdampfung des Ethanols vor der Messung zusammen. Allerdings ist dieses Verfahren schwieriger zu handhaben und der Zeitaufwand ist wesentlich höher als bei den anderen Methoden. Auch besteht die Gefahr, dass beim Aufheizen der Proben wieder Enzyme aktiv werden, wodurch sich die Konzentrationen und Markierungsmuster verändern können.

Eine zum heißen Ethanol vergleichbare Leistung zeigte die Extraktion mit dem zweiphasigen System Chloroform/Methanol. Der Vorteil der Extraktionsmethoden mit organischen Lösemitteln ist der im neutralen Bereich liegende pH-Wert, so dass auch die Metabolite erfasst werden können, die in saurer oder basischer Umgebung nicht stabil sind. Bei der Anwendung dieser Methode muss jedoch sichergestellt werden, dass die untersuchten Metabolite im Alkohol eine zu Wasser vergleichbare Löslichkeit besitzen. In der Chloroform-Phase dürfen sich keine Metabolite lösen, da diese Phase nicht analysiert wird.

Nur unwesentlich schlechter als die Extraktionsmethoden mit den organischen Lösemitteln ist der KOH-Aufschluss, der mit Ausnahme von SUC, AcCoA, GAP/DHAP und NADPH vergleichbare Konzentrationen und Standardabweichungen zeigte. Für Succinat ergab der KOH-Aufschluss eine bis zu 16-fach höhere Konzentration im Vergleich zu den anderen Verfahren. Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist, dass sie schnell und einfach durchzuführen und somit auch für eine große Anzahl an Proben geeignet ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es auf Grund der verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften der Metabolite kein universell für alle Metabolite einsetzbares Extraktionsverfahren gibt. Dieses Ergebnis wird auch durch die Untersuchungen von (Villas-Boas et al. 2005) bestätigt. Soll die intrazelluläre Konzentration von mehreren Metaboliten bestimmt werden, muss für jeden Metaboliten ein optimales Extraktionsverfahren gewählt werden. Der experimentelle und analytische Aufwand wird dadurch wesentlich erhöht. Bei den in Kapitel 22.1 beschriebenen isotopisch instationären Markierungsexperimenten wurde auf Grund der geringen Probemenge und der großen Anzahl an Proben nur die Zellaufschluss und die Extraktion mit basischem KOH angewandt. Diese zeigte für die meisten Metabolite des Zentralstoffwechsels gute Ergebnisse und ist schnell und einfach anzuwenden.

Für die Anwendung von Methoden zur Charakterisierung des metabolischen Zustands einer Zelle ist die Kenntnis der exakten intrazellulären Konzentration eine wesentliche Voraussetzung. Die Entwicklung von besser geeigneten Methoden zum Zellaufschluss/Extraktion ist daher ein Thema, welches mit Nachdruck verfolgt wird (Canelas et al. 2009; Rabinowitz and Kimball 2007; Schaub et al. 2008). Die Notwendigkeit hierzu zeigt auch die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 22.2.

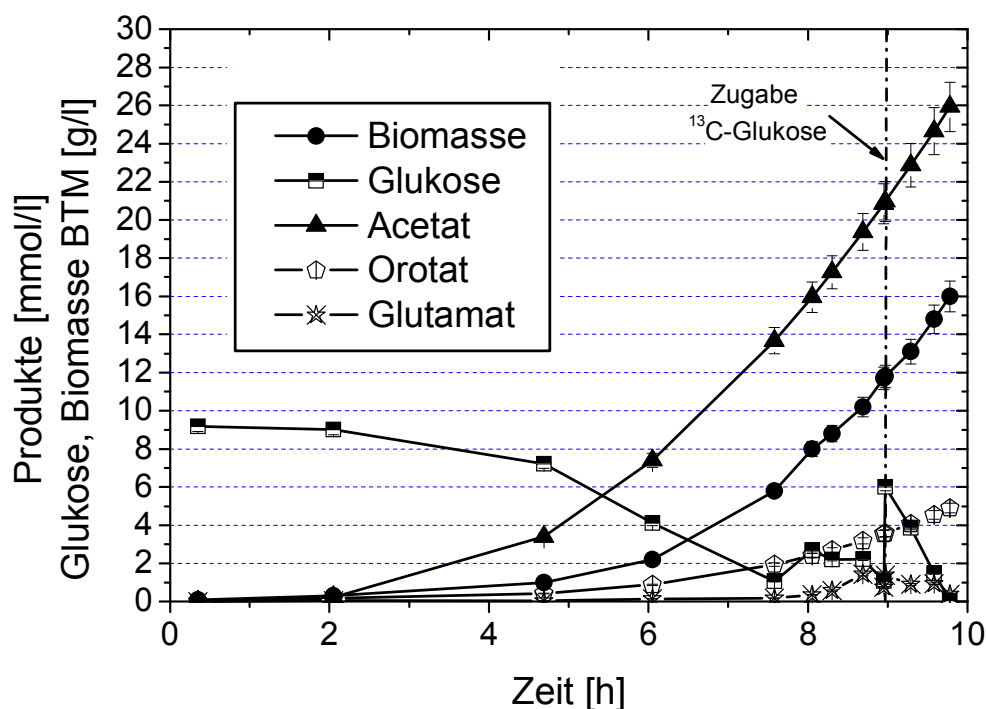
22 Markierungsexperiment und ^{13}C -Stoffflussanalyse

Mit dem neu entwickelten Reaktorsystem (Kapitel 18, 19 und 20) wurden zwei isotopisch instationäre Markierungsexperimente mit dem Wildtyp von *E. coli* K12 durchgeführt. Die intrazellulären Konzentrationen und die zeitliche Veränderung der Markierungsmuster der Metabolite im Zentralstoffwechsel wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Auf Basis dieser Daten wurden mit dem Programm 13CFLUX/INST die ^{13}C -Stoffflussanalysen durchgeführt. Hierzu wurde ein um zusätzliche Austauschpools erweitertes *E. coli*-Modell verwendet (13.8.2). Die Ergebnisse der Stoffflussanalyse aus beiden Experimenten wurden mit den Stoffflüssen der stationären Stoffflussanalyse (15.4) verglichen. Ein Teil der hier gezeigten Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit Katharina Nöh in (Nöh et al. 2007) veröffentlicht.

22.1 Markierungsexperiment

In der folgenden Abbildung sind die Konzentrationsverläufe einer der beiden Kultivierungen beispielhaft dargestellt. Im Vergleich zum stationären Experiment wurde der Reaktor mit einer höheren Zelldichte angeimpft, um zum Zeitpunkt der Probenahme ausreichend Zellen und damit markierte Metabolite in der Probe sicherzustellen. Die Konzentration der Biomasse und der Nebenprodukte war daher zum Zeitpunkt der Probenahme höher als beim stationären Experiment. Bis zum Zeitpunkt der Zugabe der Mischung der ^{13}C -markierten Glukose wurde unmarkierte Glukose in den Reaktor gefüttert.

Abbildung 22.1: Konzentrationsverläufe während eines der beiden isotopisch instationären Markierungsexperimente mit *E. coli* K12



In der folgenden Tabelle sind die spezifischen Raten der beiden isotopisch instationären Markierungsexperimente dargestellt. Diese sind vergleichbar mit dem stationären Experiment. Die Kohlenstoffbilanz konnte zu über 99 Prozent geschlossen werden.

Tabelle 22-1: Verbrauchs- und Produktionsraten sowie C-Anteil der beiden isotopisch instationären Markierungsexperimente und der Vergleich mit dem stationären Experiment

			Glukose [mmol/(g*h)]	Biomasse [1/h]	Acetat [mmol/(g*h)]	Orotat [mmol/(g*h)]	CER¹ [mmol/(g*h)]
Stat.	1	Spez. Rate	-5,90 (± 0,10)	0,56 (± 0,02)	0,67 (± 0,03)	0,06 (± 0,001)	8,70 (± 0,49)
		C-Anteil	-100 %	68 %	4 %	1 %	26 %
instationär	1	Spez. Rate	-5,90	0,56	0,75	0,06	9,1
		C-Anteil	-100 %	68%	5 %	1 %	26 %
	2	Spez. Rate	-6,00	0,58	0,70	0,06	9,0
		C-Anteil	-100 %	68 %	4 %	1 %	26 %

Das Markierungsexperiment wurde in der exponentiellen Wachstumsphase der Fermentation gestartet. Mit der Markierungsaufgabeneinheit wurde innerhalb von 500 Millisekunden eine vorher bestimmte Mischung aus 1-¹³C und vollmarkierter Glukose zu der im Reaktor verbliebenen unmarkierten Glukose gepulst. In Tabelle 22-2 sind die Glukosekonzentrationen vor und nach dem Puls, das Markierungsverhältnis und die Dauer der beiden Experimente wiedergegeben. Beim Experiment wurde auf eine durchgängige Sättigung des Phosphotransferase-System der *E. coli*-Zellen geachtet ($K_m = 4 \mu\text{M}$ (Ferenci 1996)). Die extrazellulären Raten blieben auch nach Zugabe des markierten Substrats konstant (Abbildung 22.1). Anschließend wurde keine weitere Glukose in den Reaktor gegeben, so dass das Markierungsverhältnis bis zum Ende des Markierungsexperiments konstant blieb.

Tabelle 22-2: Experimentelle Parameter der beiden isotopisch instationären Markierungsexperimente mit dem *E. coli* K12 Wildtyp

	1. Experiment	2. Experiment
Glukosekonzentration		
vor Puls [mmol/l]	8,5	8
nach Puls [mmol/l]	35	45
Biotrockenmasse		
Start [g/l]	13,3	10,1
Ende [g/l]	17,0	17,9
Markierungsverhältnis		
Unmarkiert [%]	33	18
1- ¹³ C markiert [%]	32	39
U- ¹³ C vollmarkiert [%]	35	43
Zeit Markierung		
Start [h]	8,22	8,98
Dauer [min]	25	48

Durch die unterschiedliche Menge an unmarkierter Glukose, die vor der Markierungsaufgabe noch im Reaktor vorhanden war und die größere Menge an markierter Glukose, die beim zweiten Markierungsexperiment in den Reaktor gegeben wurde, ergaben sich unterschiedliche Markierungsverhältnisse. Im zweiten Markierungsexperiment wurde durch eine Erhöhung der Glukosemenge nahezu das zuvor berechnete optimale Markierungsverhältnis erreicht. Durch die höhere Glukosemenge erhöhte sich auch die Dauer des Markierungsexperiments. Bei der Optimierung des Markierungssubstrats zeigte sich eine geringe Sensitivität gegenüber einer Änderung des Markierungsverhältnisses in der Nähe des berechneten Optimums (11.3.1). Es ist daher anzunehmen, dass das unterschiedliche Markierungsverhältnis nur geringen Einfluss auf das Ergebnis der Stoffflussanalyse hat.

Kurze Zeit vor der Markierungsaufgabe wurden 5 Proben (jeweils 5 ml) aus dem Reaktor zur Bestimmung der intrazellulären Metabolitkonzentration entnommen und in je 15 ml kalter Methanollösung gequenchet. Die Proben wurden vor und nach der Probenahme gewogen, um den durch ein unterschiedliches Volumen hervorgerufenen Fehler zu bestimmen. Die maximale relative Abweichung vom Mittelwert des Probevolumens lag bei 2,8 %. Die relative Standardabweichung der Biotrockenmasse in der Probe betrug 2,2 %.

Die Probenahme startete mit der Zugabe des Markierungssubstrats. Zu den vorher berechneten optimalen Zeitpunkten (11.3.1) wurden je 5 mL Probevolumen automatisiert entnommen. Die Probenahmezeitpunkte der ersten elf Proben, die für die isotopisch instationäre ^{13}C -Stoffflussanalyse verwendet wurden, unterschieden sich in beiden Markierungsexperimenten mit Ausnahme der letzten Probe nicht. Im zweiten Experiment wurden die Probenahmezeitpunkte 11 bis 19 leicht angepasst, um eine bessere Abbildung der Markierungsanreicherung zu erhalten. Nach Ende der automatisierten Probenahme (Probe 1 - 19) wurden weitere Proben bis zum Ende des Markierungsexperiments manuell entnommen. Die folgende Tabelle zeigt die Probenahmezeitpunkte der beiden Markierungsexperimente.

Tabelle 22-3: Probenahmezeitpunkte in Sekunden nach Zugabe der markierten Glukose der zwei Markierungsexperimente. Verwendung der Proben 1-11 für die isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalysen.

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Experiment 1 [s]	0,38	0,76	1,15	1,62	2,20	3,03	4,21	6,03	8	10	20	40
Experiment 2 [s]	0,38	0,77	1,16	1,62	2,20	3,03	4,21	6,03	8	10	16	28
Probe	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Experiment 1 [s]	65	100	140	200	270	360	480	785	905	1025	1145	1265
Experiment 2 [s]	52	100	160	220	280	340	400	951	1269	1387	1506	1629
Probe	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Experiment 1 [s]	1385	1505	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Experiment 2 [s]	1758	1877	1985	2125	2273	2377	2529	2680	2820	2892	--	--

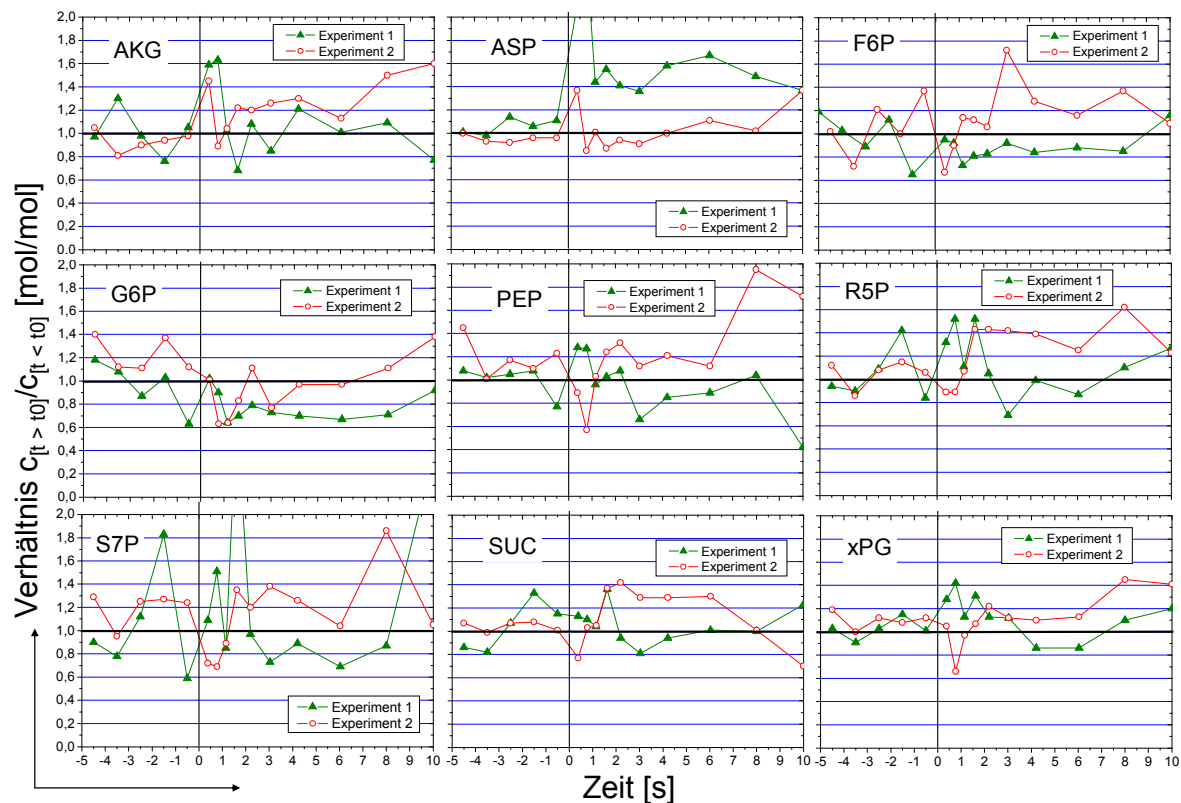
22.2 Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen

22.2.1 Überprüfung des metabolisch stationären Zustands

Zur Überprüfung des metabolisch stationären Zustands wurden die zeitlichen Verläufe der intrazellulären Metabolitkonzentrationen beider Experimente vor und nach Zugabe der markierten Glukose dargestellt. Die Konzentrationsverläufe wurden auf die Anfangskonzentration vor der Glukosezugabe normiert. Die Zugabe der ^{13}C -Glukose erfolgte zum Zeitpunkt Null.

Eine Anregung des Stoffwechsels durch die sprunghafte Erhöhung der Glukosekonzentration bei Zugabe der markierten Glukose lässt sich anhand der Konzentrationsverläufe nicht eindeutig feststellen aber auch nicht vollständig ausschließen. Die stärkeren Schwankungen der Werte nach der Markierungszugabe können vermutlich auf die größeren Messfehler zurückgeführt werden. Die Messwerte sind auf Grund der teilweise geringen Konzentration der Markierungszustände mit größeren Fehlern behaftet und die Gesamtkonzentration berechnet sich aus der Summe dieser Werte. Die Verläufe in beiden Experimenten unterscheiden sich wesentlich. Ein eindeutiger Trend der Metabolitkonzentrationen lässt sich nicht feststellen.

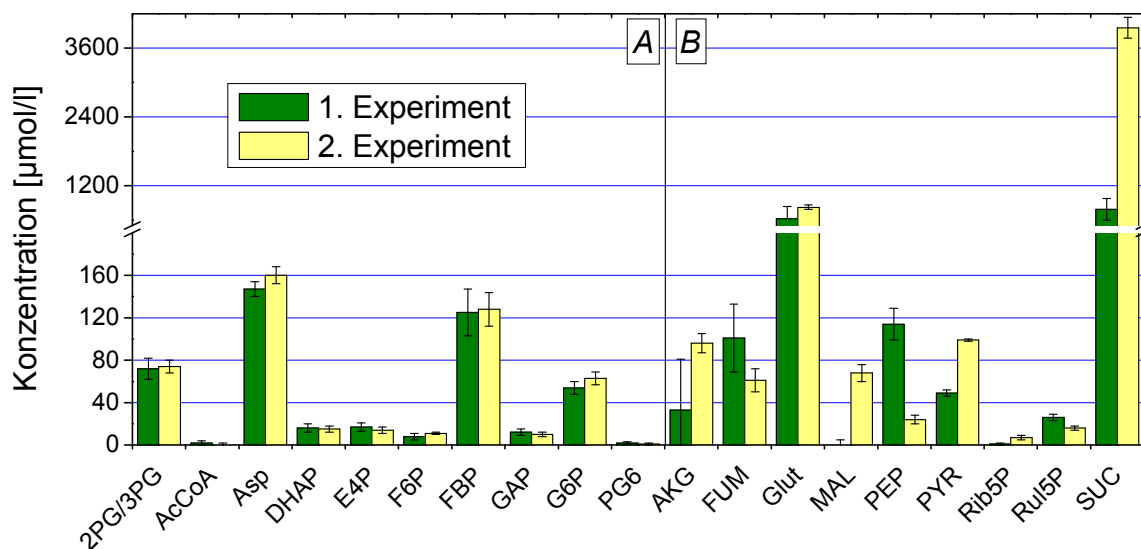
Abbildung 22.2: Zeitlicher Verlauf der relativen Konzentration verschiedener Metabolite des Zentralstoffwechsels vor und nach Aufgabe der markierten Glukose in zwei Experimenten mit dem *E.coli K12* Wildtyp. Der Wert 1 bezeichnet die aus 5 Proben gemittelte Konzentration vor der Markierungsaufgabe.



22.2.2 Vergleich der Metabolitkonzentrationen mit Literaturdaten

Von jeweils 5 vor dem Start des Markierungsexperiments in Methanol gequenchten Proben, wurden mittels LC-MS/MS die Metabolitkonzentrationen gemessen. Die folgende Abbildung zeigt die in beiden Experimenten gemessenen Werte mit der ermittelten Standardabweichung. In beiden Experimenten konnten 17 Metabolite des Zentralstoffwechsels und 2 Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) gemessen werden. Der Vergleich der beiden Experimente zeigt, dass bei über der Hälfte der Metabolite (Abschnitt [A]) die Konzentrationen nahezu gleich sind. In diesem Abschnitt sind vor allem die phosphorylierten Verbindungen der Glykolyse zu finden. In Abschnitt [B] sind größere Abweichungen zwischen den Konzentrationen festzustellen. Hier finden sich neben PEP und PYR die organischen Säuren aus dem Zitronensäurezyklus und die phosphorylierten Zucker aus dem Pentose-Phosphat-Weg.

Abbildung 22.3: Vergleich der gemessenen intrazellulären Metabolitkonzentrationen der zwei Experimente mit dem Wildtyp *E. coli* K12 (Standardabweichung basierend auf 5 Proben). [A] gute Übereinstimmung, [B] schlechte Übereinstimmung.



In der Literatur sind für *E. coli* eine Vielzahl an Metabolitkonzentrationen für unterschiedliche Fermentationsbedingungen beschrieben. Die Bandbreite an Konzentrationen für einen Metaboliten umfasst teilweise mehrere Zehnerpotenzen. Eine Übersicht über die in der Literatur für *E. coli* bei verschiedenen Fermentationsbedingungen berichteten minimalen und maximalen Konzentrationswerte gibt die Arbeit von (Kummel et al. 2006b). Die in Tabelle 22-4 dargestellten Literaturwerte sind mit einem *E. coli* K12 Wildtyp bei einer Wachstumsrate von $\mu > 0,4 \text{ h}^{-1}$ in Minimalmedium bestimmt worden. Mit Ausnahme von (Lowry et al. 1971; Yang et al. 2003) wurden die Zellen in kaltem Methanol gequenchet. Die Extraktion der Metabolite erfolgte in den meisten Arbeiten mit Perchlorsäure. In der Arbeit von (Yang et al. 2003) wurde kaltes Chloroform zur Extraktion eingesetzt. Die Metabolitkonzentrationen wurden in allen Arbeiten mittels Enzymtests bestimmt.

Die dargestellten Metabolitkonzentrationen zeigen, dass trotz gleicher Fermentationsbedingungen und teilweise gleicher Probenahme- und Extraktionsmethode sehr große Unterschiede existieren. Die Werte aus den Markierungsexperimenten liegen meist unterhalb der Literaturwerte. Die möglichen Gründe hierfür werden nachfolgend diskutiert.

Tabelle 22-4: Literaturwerte des *E. coli* K12 Wildtyps für exponentielles Wachstum (Lowry et al. 1971; Peng et al. 2004; Siddiquee et al. 2004; Yang et al. 2003). Literaturangaben in $\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$ wurden mit dem Faktor 0,00278 l/g_{BTM} umgerechnet

Metabolit	Werte 2. Exp. [$\mu\text{mol/l}$]	Literaturwert [$\mu\text{mol/l}$]
AKG	96	300 – 400
AcCoA	0	130 – 680
Asp	160	360 – 2280
DHAP	15	170
F6P	11	290 – 550
FBP	16	460 – 2370
GAP	10	160
G6P	63	670 – 1400
Glut	821	14420
MAL	68	70 – 1290
PEP	24	0 – 80
PG6	1	370 – 380
PYR	99	90 - 320
xPG	74	420

22.2.3 Einflussfaktoren auf die gemessenen Metabolitkonzentrationen

Für einen schnellen Stopp des Zellstoffwechsels, wie er bei dynamischen Untersuchungen benötigt wird, ist das schnelle Abkühlen in einer Methanollösung bisher alternativlos. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die *Art der Probenahme* einen entscheidenden Einfluss auf die gemessene Konzentration hat. Für das Bakterium *C. glutamicum* konnte (Wittmann et al. 2004) zeigen, dass nach dem Quenchen der Zellen in einer Methanollösung erhöhte Konzentrationen verschiedener Aminosäuren im Überstand nachgewiesen werden können. Bei der Abtrennung der Zellen bei Raumtemperatur durch Filtration wurde dieser große Verlust nicht nachgewiesen. Die Aminosäurelevels waren im Mittel um den Faktor 2-3 größer im Vergleich mit den Zellen, die mit kaltem Methanol gequencht wurden. Vergleichbare Ergebnisse konnten für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Villas-Boas et al. 2005) und Bakterien (Bolten et al. 2007; Wellerdiek et al. 2009) gezeigt werden. Durch Integritätstests und Messungen im methanolischen Überstand wurde in diesen Arbeiten gezeigt, dass die Zellmembran durch das Quenchen mit kalter Methanollösung durchlässig wird und verschiedene Metabolite aus der Zelle austreten.

Einen entscheidenden Einfluss hatte dabei die Zeit mit der die Zellen mit der Methanollösung in Kontakt waren. Jedoch zeigten die Untersuchungen von (Leder 1972; Ring 1965), dass der Metabolitverlust nicht ausschließlich auf die Methanolkonzentration zurückgeführt werden kann sondern die Temperatur und die Osmolarität der Quenchinglösung eine entscheidende Rolle für die Membranintegrität spielt. Die Autoren zeigten, dass eine schnelle Abkühlung der Zellen in einer Pufferlösung bzw. ein Waschen der Zellen mit eiskaltem Puffer zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembran führt. Eine Erhöhung der Osmolarität der Pufferlösung hatte dagegen einen schützenden Effekt auf die Zellintegrität (Holden et al. 1970). Dieser Effekt ist wohl auf eine Dehydratisierung der Zellmembran und ein damit einhergehendes Schrumpfen der Zelle zurückzuführen (Lovett 1965). Durch das Schrumpfen erhöht sich die Lipiddichte auf der Zelloberfläche, wodurch die Zellmembran weniger durchlässig wird. Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Zugabe von Glycerol zum Fermentationsmedium erreicht werden, das ebenfalls zu einer Erhöhung des Lipid-Anteils der Zellmembran führt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das zum Quenchen verwendete Methanol auf Grund seiner fettlösenden Wirkung den durch den Kälteschock hervorgerufenen Metabolitverlust zusätzlich erhöht.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten mit dem *E. coli* Wildtyp wurde durch eine nachträgliche Messung der Metabolitkonzentration im Fermentationsüberstand und in der Quenchinglösung festgestellt, dass auch hier für einige Metabolite ein Verlust beim Quenching auftritt. Eine genaue Quantifizierung war jedoch nicht möglich. Die Kontaktzeit mit der Methanollösung ist hier vermutlich entscheidend für die Größe des Verlusts. Da nach der Probenahme die Zeit bis zur Zentrifugation nicht immer gleich war, ist dies vermutlich auch der Grund für die gezeigten Konzentrationsunterschiede in beiden Experimenten. Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nicht mehr möglich, diesen Aspekt genauer zu untersuchen.

Bei der Bestimmung der Markierungsanreicherung kommt es nicht auf die absoluten Werte sondern nur auf die Markierungsverhältnisse an. Das Methanolquenching bleibt für diese Anwendung eine zuverlässige Methode, um einen schnellen Stopp des Zellstoffwechsels zu gewährleisten und eine Trennung von intra- und extrazellulären Metaboliten, die unterschiedliche Markierungsmuster aufweisen, zu realisieren. Für eine exakte Bestimmung der intrazellulären Konzentration muss aber in Zukunft eine alternative Methode zur Probenahme gefunden werden. Zu den Anforderungen an Probenahmesysteme siehe auch Kapitel 18.

Will man das bisherige Quenchingverfahren beibehalten, muss eine andere Flüssigkeit (bzw. ein Gemisch) gefunden werden, die auch bei tiefen Temperaturen noch flüssig ist und keine destabilisierende Wirkung auf die Zellmembran hat. Durch eine Erhöhung der Osmolarität der Quenchinglösung oder einen anderen stabilisierenden Zusatz kann der Metabolitverlust vermutlich ebenfalls verringert werden.

Da die Zeitkonstanten für einen vollständigen Austausch bei den Metaboliten des Zentralstoffwechsels im Bereich von unter einer bis zu wenigen Sekunden liegen (vgl. 4.4), muss die neue Methode ebenfalls einen Stopp des Zellstoffwechsels nach der Probenahme in wenigen Millisekunden gewährleisten. Daneben muss die neue Methode eine Trennung von intra- und extrazellulären Metaboliten erlauben, da viele Metabolite des Zentralstoffwechsels auch extrazellulär vorliegen. Dabei muss diese Trennung nicht zwangsläufig physisch vorgenommen werden, sondern kann auch rechnerisch geschehen, indem zusätzlich die extrazelluläre Konzentration gemessen und diese vom Gesamtpool (intra- und extrazellulär) abgezogen wird. Der Nachteil einer rechnerischen Trennung ist, dass sich der analytische Aufwand stark erhöht, da zusätzlich extrazellulär gemessen werden muss und sich die Probenmatrix der extrazellulären Proben von der der intrazellulären Proben unterscheidet. Ein weiteres Problem ist das sehr viel größere extrazelluläre Volumen, wodurch sich schon geringe Messfehler – insbesondere bei hohen extrazellulären Konzentrationen – stark auf die berechneten intrazellulären Konzentrationen auswirken. Für eine genaue Erfassung der intrazellulären Konzentration ist diese Methode daher nicht geeignet. Alternativ ist auch eine schnelle Erhöhung der Temperatur, z.B. durch einen Wärmetauscher, zum Stopp des Zellstoffwechsels denkbar (Schaub et al. 2006). Es muss jedoch beachtet werden, dass hohe Temperaturen ebenfalls zu einer Zerstörung der Zellmembran führen können. Dieser Effekt wird z.B. beim Zellaufschluss mit heißem Ethanol ausgenutzt. Somit können mit dieser Methode nur die Metabolite erfasst werden, die ausschließlich intrazellulär vorliegt, was den Einsatz der Methode sehr stark einschränkt. Für die alleinige Erfassung der intrazellulären Metabolite ist eine vorherige Abtrennung der Zellen von der Fermentationslösung nötig.

Zur Abtrennung der Zellen vom Fermentationsmedium sind Filtrationsverfahren, wie von (Wittmann et al. 2002) vorgeschlagen, weit verbreitet. Der Nachteil dieser Verfahren ist die hohe Zeitdauer für eine vollständige Trennung. Für einen schnellen Stopp des Zellstoffwechsels, wie er für die isotopisch instationäre Markierungsmessung benötigt wird, sind diese Verfahren daher nicht geeignet. Auf Grund des metabolisch stationären Zustands während des Experiments ist für die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen nur ein Einsatz denkbar, wenn gewährleistet ist, dass die Fermentationsbedingungen während des Filtrationsprozesses konstant sind, so dass keine Veränderung des Zellstoffwechsels und damit der intrazellulären Konzentrationen auftritt. Nach der Filtration muss der Stoffwechsel sofort gestoppt werden.

Neben dem Quenching ist die *Wahl des Extraktionsverfahrens* ein weiterer Einflussfaktor auf die Höhe der Metabolitkonzentration. Der Vergleich der verschiedenen chemischen Extraktionsverfahren (Kapitel 21) zeigte erhebliche Konzentrationsunterschiede, die vermutlich auf die unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Metabolite zurückzuführen sind. Die Extraktionsleistung wird vor allem von der Löslichkeit der Metabolite in der Extraktionslösung und der Stabilität der Metabolite unter den gegebenen Bedingungen (pH-Wert und Temperatur) beeinflusst. Keines der untersuchten Verfahren ist daher für jeden Metaboliten des Zentralstoffwechsels gleich gut geeignet. Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von (Maharjan and Ferenci 2003) bestätigt, die verschiedene Extraktionsverfahren für eine generelle Metabolomanalyse bei Bakterien verglichen haben – ohne jedoch eine genaue Identifizierung von Metaboliten vorzunehmen – und zum gleichen Ergebnis kamen. Vergleichbare Untersuchungen gibt es für Hefen (Villas-Boas et al. 2005) und filamentöse Pilze (Hajjaj et al. 1998). Dies lässt den Schluss zu, dass es nicht möglich ist mit einer einzigen Extraktionsmethode ein korrektes Abbild des gesamten Metaboloms einer Zelle zu bekommen. Für jede Stoffklasse und teilweise sogar für die Metabolite einer Stoffklasse muss daher das am besten geeignete Verfahren ausgewählt werden.

In der Arbeit von (Villas-Boas et al. 2005) wurde zudem gezeigt, dass die Aufkonzentrierung der Metabolite durch Gefriertrocknung oder Verdampfung des organischen Lösungsmittels bei Raumtemperatur ebenfalls einen großen Einfluss auf die Metabolitkonzentration hat. Dabei ist vor allem die Wiederaufnahme der getrockneten Probe in einem geringen Volumen eines Lösungsmittels kritisch in Bezug auf die gelöste Menge und die Reproduzierbarkeit. Anhand dieser Untersuchungen wird deutlich, dass bei der Wahl des Extraktionsverfahrens alle Schritte von der Probenahme bis zur Analyse der Probe einer kritischen Betrachtung unterzogen werden müssen und der Einfluss jedes einzelnen Schrittes auf die Metabolitkonzentration untersucht werden muss. Bei der Wahl des Extraktionsverfahrens sollten zukünftig auch mechanische Verfahren zum Zellaufschluss mit in Betracht gezogen werden. Der Vorteil der mechanischen Verfahren ist, dass zum Zellaufschluss keine Reagenzien benötigt werden, die zu einer Verdünnung der Probe, einer Zerstörung der Metabolite oder einer Störung der Analytik führen können. Es muss jedoch bei diesen Verfahren zusätzlich für eine Denaturierung (chemisch, thermisch) oder Entfernung (z.B. Ultrafiltration) der Enzyme gesorgt werden, damit keine weiteren Reaktionen auftreten, die zu einer Veränderung der Metabolitkonzentrationen führen. Die mechanischen Verfahren beruhen auf der Beanspruchung der Zellen durch hohe Druck- und Scherkräfte, die bei den kommerziell erhältlichen Geräten auf unterschiedliche Weise erzeugt werden. In den am IBT-2 durchgeführten Arbeiten von Hollwedel (2004) und Magnus (2007) wird von guten Erfahrungen mit einem Homogenisator (Kinematica, Polytron PT1600E) berichtet, der auch für geringe Probenvolumina und hohe Zelldichten geeignet ist.

Auch die Wahl der *analytischen Methode* kann einen großen Einfluss auf die gemessene Metabolitkonzentration haben. Für die quantitative Bestimmung der intrazellulären Metabolite sind heute enzymatische (Bergmeyer 1984) sowie massenspektrometrische Verfahren (GC-MS und LC-MS) im Einsatz. Einen Überblick über die aktuellen Entwicklungen in der Metabolomanalyse geben u.a. die Arbeiten von (Oldiges et al. 2007) und (Mashego et al. 2007). In der Arbeit von (Oldiges 2005) wurde gezeigt, dass die mit enzymatischen Tests gemessenen Konzentrationen teilweise um den Faktor 10 bis 15 über den Werten lagen, die mittels LC-MS/MS bestimmt wurden. Dies konnte auf eine Umsetzung der bei den Tests zugesetzten Kofaktoren durch im Extrakt vorhandene Enzyme bzw. Enzymfragmente zurückgeführt werden, die trotz der Extraktion mit Perchlorsäure weiterhin aktiv waren. Dieser Effekt muss beim Einsatz von Enzymtests beachtet werden, die auf der Messung des Umsatzes von NAD(H) oder NADP(H) beruhen.

Im Vergleich zu Enzymtests sind die heute meist eingesetzten massenspektrometrischen Analysemethoden wesentlich empfindlicher, so dass auch Konzentrationen im mikromolaren Bereich noch quantifiziert werden können. Jedoch sind nicht alle Metabolite bei den im Massenspektrometer herrschenden Bedingungen (hohe Temperaturen, hohe Spannungen) stabil, was die Einsatzmöglichkeit einschränkt. Auch bei diesen Verfahren hat die Probenmatrix einen hohen Einfluss auf die Messung, so können z.B. hohe Salzkonzentrationen, Proteinreste usw. die Ionisierung stören. Daher ist es in jedem Fall notwendig die Quantifizierung über eine Standardadditionsreihe durchzuführen. Bei der Kopplung des Massenspektrometers mit einem Chromatographieschritt (LC, GC) muss beachtet werden, dass die Metabolite kompatibel mit dem Laufmittel (Löslichkeit, Stabilität) und der Derivatisierung (Umsatz, Reproduzierbarkeit) sind. Alle diese Punkte wurden in dieser Arbeit bei der Quantifizierung beachtet, so dass der Einfluss der Analytik auf die gemessenen Metabolitkonzentrationen als gering betrachtet werden kann.

22.3 Markierungsmessung mittels LC-MS/MS

In den Proben der beiden Markierungsexperimente konnten die Markierungsmuster von dreizehn Metaboliten im ersten und zwölf im zweiten Experiment gemessen werden. Auf Grund der geringen Konzentration konnten nicht alle Massenisotopomere bestimmt werden.

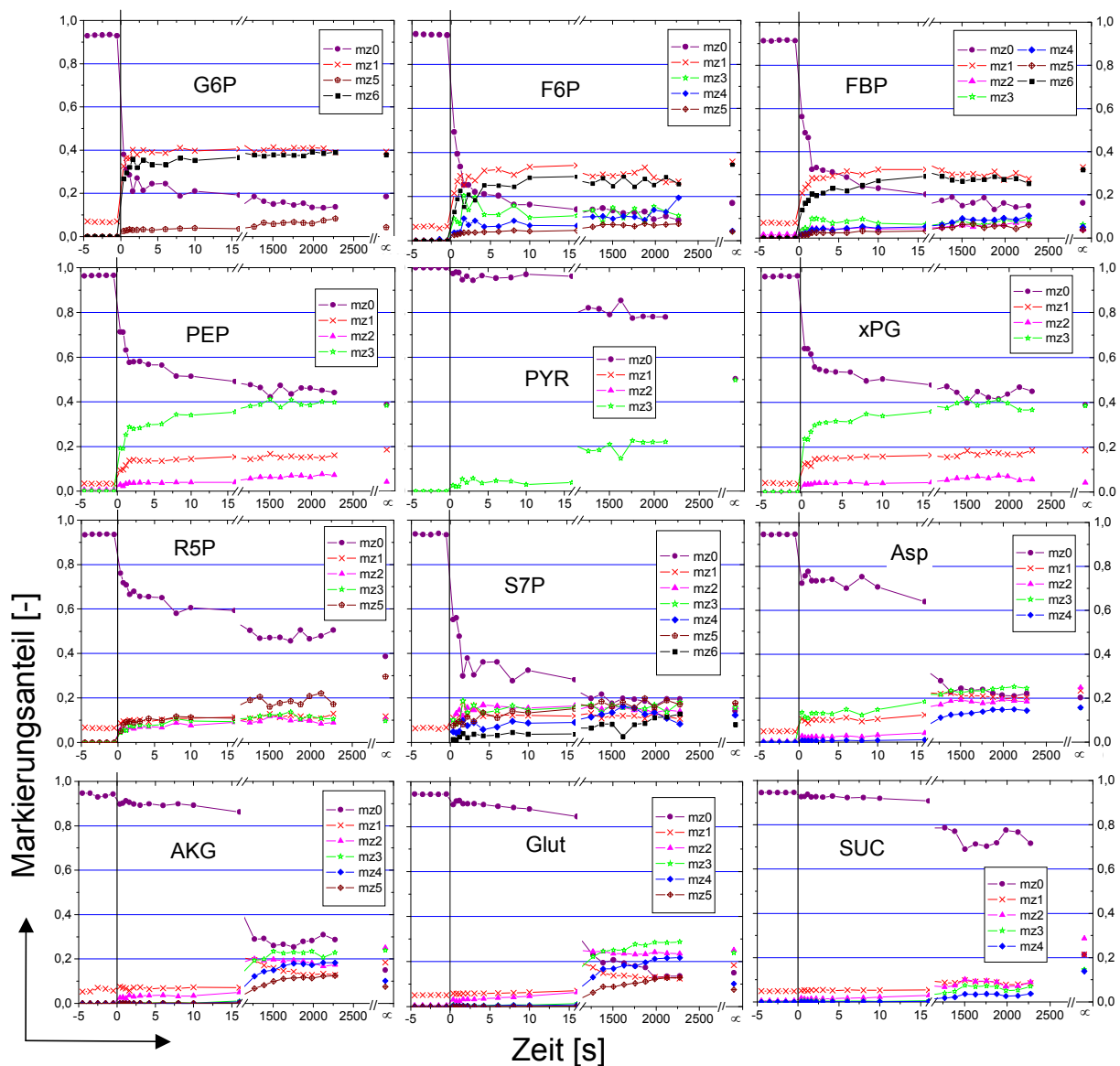
Tabelle 22-5: Mittels LC-MS/MS gemessene Massenisotopomere (MI) für die Metabolite des Zentralstoffwechsels ($0 = m/z+0$; $1 = m/z+1$; etc.) mit ermittelter relativer Standardabweichung (RSA).

	Experiment 1	Experiment 2	
Metabolit	Massenisotopomere	Massenisotopomere	RSA [%]
AKG	0, 1, 2, 3, 4, 5	0, 1, 2, 3, 4, 5	15,00
Asp	0, 1, 2, 3, 4	0, 1, 2, 4	6,00
F6P	0, 1, 6	0, 1, 3, 4, 5, 6	22,70
FBP	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6	17,80
FUM	0, 1, 2, 3, 4	--	11,43
G6P	0, 1, 3, 4, 5, 6	0, 1, 5, 6	15,60
Glut	0, 1, 2, 3, 4, 5	0, 1, 2, 3, 4, 5	14,00
P5P	0, 1, 2, 3, 5	0, 1, 2, 3, 5	16,00
PEP	0, 1, 2, 3	0, 1, 2, 3	9,00
PYR	0, 3	0, 3	13,90
S7P	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6	23,90
SUC	0, 1, 2, 3, 4	0, 1, 2, 3, 4	19,00
xPG	0, 1, 2, 3	0, 1, 2, 3	15,50
Anzahl MI	66	60	

Im ersten Experiment umfasste die Menge aller Massenisotopomere zu einem Zeitpunkt 66 und im zweiten Experiment 60 Datenpunkte. Für die Stoffflussanalyse wurde eine konstante relative Standardabweichung für alle Massenisotopomere und alle Zeitpunkte der Probenahme angenommen. Dieser Wert wurde aus den letzten drei Proben des zweiten Experiments, mit nahezu konstanten Markierungsanteilen, bestimmt. Die folgende Abbildung zeigt die zeitliche Veränderung der gemessenen Massenisotopomere für die Metabolite von Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Zitronensäurezyklus aus dem zweiten Experiment. Zum Zeitpunkt Null wurde die Markierung aufgegeben. Die Massenisotopomere vor der Markierungsaufgabe ($t < 0$) wurden in fünf Proben bestimmt, welche zur Bestimmung der Metabolitkonzentration vor der Markierungsaufgabe aus dem Reaktor entnommen wurden.

Zur Überprüfung nach welcher Zeit der isotopisch stationäre Zustand erreicht wird, wurden die stationären Werte bei $t \rightarrow \infty$ zusätzlich in die Diagramme eingetragen. Diese Werte wurden mit den Stoffflüssen aus der stationären Stoffflussanalyse (Kapitel 15) berechnet. Es wurde angenommen, dass dieser Markierungszustand dem isotopisch stationären Zustand entspricht. Die Ergebnisse des ersten isotopisch instationären Markierungsexperiments zeigen vergleichbare Verläufe, die im Anhang B.4 dargestellt sind.

Abbildung 22.4: Zeitliche Veränderung der Massenisotopomere der intrazellulären Metabolitpools von Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Zitronensäurezyklus



Wie erwartet ist die Dynamik der Markierungsanreicherung in den Metaboliten der *Glykolyse* (G6P, F6P, FBP, PEP, xPG) sehr schnell. Schon nach wenigen Sekunden wird ein annähernd stationärer Zustand erreicht (siehe Wert bei $t \rightarrow \infty$). Eine Ausnahme bildet Pyruvat, bei dem nahezu keine Veränderung in den ersten 16 Sekunden zu beobachten ist. Ein weiteres sehr wichtiges Ergebnis, welches sich hier zeigt, ist, dass das neu entwickelte Probenahmesystem (Kapitel 18) und das Quenching mit Methanol zum Stopp des Zellstoffwechsels ausreichend schnell ist, um die Dynamik in der Glykolyse wiederzugeben. Selbst die schnelle Veränderung der Markierungsanteile in den ersten ein bis zwei Sekunden nach der Zugabe der markierten Glukose lässt sich mit dieser Technik gut verfolgen.

Im Vergleich dazu ist die Markierungsanreicherung in den Metaboliten des *Zitronensäurezyklus* (AKG, SUC, FUM) und in den über die Transaminase-Reaktionen an AKG und OAA gekoppelten Aminosäuren (Glut, Asp) sehr viel langsamer. In den ersten 16 Sekunden ist nahezu keine Veränderung der Markierung zu beobachten. Auch am Ende des Experiments (nach 38 Minuten) ist, insbesondere bei Succinat, immer noch ein großer Unterschied zum berechneten stationären Zustand zu erkennen.

Die Zeitkonstanten des *Pentose-Phosphat-Wegs* liegen zwischen denen der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus. Die Markierungsanreicherung von S7P ist ebenfalls sehr schnell, und der stationäre Zustand wird innerhalb weniger Sekunden erreicht. Die Dynamik der Metabolite R5P und X5P ist im Vergleich dazu etwas langsamer. Nach einer relativ schnellen Änderung in den ersten zwei Sekunden nach der Markierungsaufgabe tritt eine weitere langsame Zunahme der Markierungsanteile ein. Auch hier ist am Ende des Markierungsexperiments ein Unterschied zum berechneten stationären Zustand ($t \rightarrow \infty$) zu erkennen.

22.4 Gründe für die langsame Dynamik der Anreicherung

Für die isotopisch instationäre Stoffflussanalyse wurden nur die gemessenen Markierungsdaten der ersten 16 Sekunden des Markierungsexperiments verwendet. Die Anpassung der Dynamik der Markierungsanreicherungen und Metabolitpools erfolgte durch Variation der Flüsse und Poolgrößen mit dem Programm 13CFLUX/INST an der Universität Siegen. Hierbei zeigte sich, dass bei Verwendung des in der stationären Stoffflussanalyse verwendeten Stoffwechselmodells (vgl. 13.7) die langsame Markierungsanreicherung im Pentose-Phosphat-Weg und Zitronensäurezyklus nicht wiedergegeben werden konnte. Mögliche Gründe hierfür sind die schon bei der stationären Stoffflussanalyse vermuteten Rückflüsse aus unmarkierten Pools außerhalb des betrachteten Stoffwechselnetzwerks. Es zeigt sich in Abbildung 22.4, dass insbesondere die Dynamik der Metabolite (PYR, AKG, OAA) verlangsamt ist, die über reversible Transaminase-Reaktionen im Austausch mit Aminosäurepools stehen.

Die *Aminotransferasen*, die auch als *Transaminasen* bezeichnet werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Wiederverwertung von Aminosäuren aus dem Proteinabbau. Die *Transaminasen* übertragen dabei α -Aminogruppen von verschiedenen Aminosäuren auf α -Ketosäuren:



So entsteht beispielsweise Pyruvat beim Abbau von Alanin, Serin und Tryptophan, Oxalacetat aus Aspartat und α -Ketoglutarat aus Glutamat (Alfoldi et al. 1968; Olsiewski et al. 1980)). Diese Reaktionen sind reversibel, so dass Aminogruppen zwischen verschiedenen Aminosäuren ausgetauscht werden können. Beim Aminosäureabbau von Glutamat und Threonin entstehen die Zentralstoffwechselmetabolite AcCoA, SuccCoA, Fumarat (Bell and Turner 1977; Kay 1972; Umbarger and Brown 1957).

Neben dem Zitronensäurezyklus spielt auch der Pentose-Phosphat-Weg eine wichtige Rolle bei der Synthese und Wiederverwertung von Metaboliten. Beispielsweise ist Ribose-5-phosphat (R5P) ein wesentlicher Vorläufer der Aminosäure Histidin und der Ribonucleotide AMP, GMP, UMP und CMP, die die Bausteine der RNA und DNA bilden (Keseler et al. 2005).

Bei den Ribonukleinsäuren unterscheidet man *messenger* (m), *transfer* (t) und *ribosomale* (r) RNA. Insbesondere von der mRNA, die als Matrize für die Proteinsynthese fungiert, ist bekannt, dass sie sehr kurzlebig ist. Die Halbwertszeit beträgt nur wenige Sekunden bis Minuten (Burton 1976). Nukleinsäuren und Nukleotide können hydrolytisch abgebaut werden, wobei die Purinbasen wieder frei werden. Diese können direkt wiederverwendet werden (*salvage pathway*), wobei sie mit einem aktivierten R5P-Molekül (PRPP) reagieren. Auch andere Metabolite des Pentose-Phosphat-Wegs sind wichtige Bausteine für die Biosynthese von z.B. Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und der Zellmembran.

Durch den Abbau von Proteinen und anderen Zellbestandteilen werden laufend unmarkierte Metabolite nachgeliefert, so dass vermutlich ein stetiger Zufluss in den Zentralstoffwechsel erfolgt. Je nach Größe und Stabilität des Proteins und den Umgebungsbedingungen kann der Austausch eines Proteinpools bis zu mehreren Stunden dauern (Goldberg and Dice 1974; Mandelstam 1958). Die Zeit bis zum Erreichen eines isotopisch stationären Zustands verlängert sich dadurch vermutlich wesentlich. Erst durch die Bildung von CO_2 oder anderen extrazellulären Metaboliten werden die unmarkierten C-Atome mit der Zeit aus der Zelle entfernt. Experimentell lässt sich die Zeit bis zu einem vollständigen Austausch bestimmen, indem man vollmarkierte Zellen in ein Medium mit unmarkierter C-Quelle (z.B. Glukose) gibt und den Markierungsabbau bei metabolisch konstanten Bedingungen über eine Analyse der intrazellulären Metabolite bzw. Proteine beobachtet.

Die zeitliche Verzögerung bis zum Erreichen eines isotopisch stationären Zustands erklärt die bei der stationären Stoffflussanalyse beobachteten Abweichungen bei der Anpassung der unmarkierten Anteile (Kapitel 16.5). Durch zusätzliche Austauschpools im *E. coli*-Netzwerkmodell konnte bei der stationären Stoffflussanalyse dieser Effekt gut abgebildet und die Güte der Parameteranpassung gegenüber dem für die stationäre Stoffflussanalyse verwendeten Modell wesentlich verbessert werden.

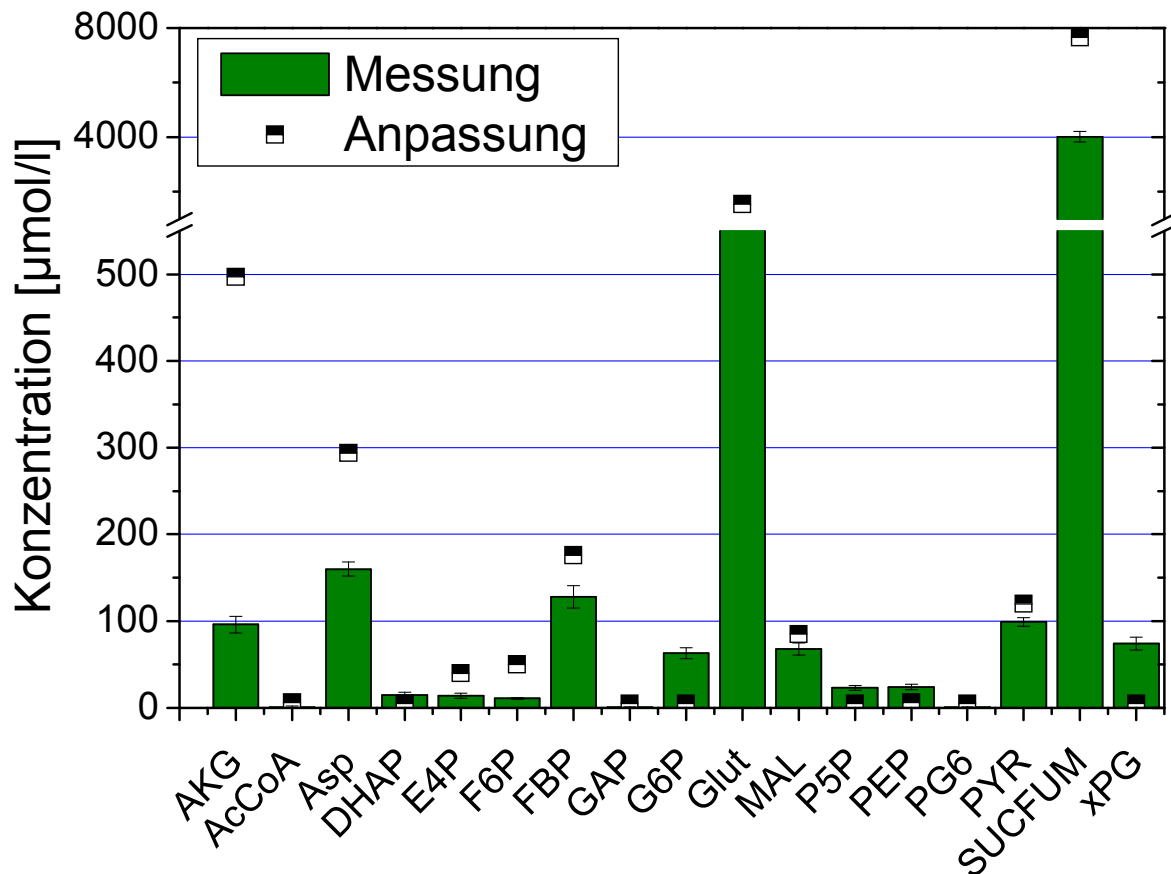
Ein ähnliches Vorgehen wurde für das isotopisch instationäre Netzwerkmodell gewählt. Zur Simulation des Rückflusses von unmarkierten Metaboliten in den Zentralstoffwechsel und der dadurch verursachten Verlangsamung der Dynamik im Zitronensäurezyklus und Pentose-Phosphat-Weg wurden zusätzliche Austauschpools definiert. Die zeitliche Verzögerung der Markierungsanreicherung im Zitronensäurezyklus wurde durch einen Austausch der Metabolite α -Ketoglutarat (AKG) und Oxalacetat (OAA) mit den Aminosäurepools Glutamat (Glu) und Aspartat (Asp) simuliert, da die reversiblen Transaminasereaktionen eine wichtige Rolle bei der Einschleusung von Aminosäuren in den Zentralstoffwechsel spielen. Im zweiten Experiment wurden die Poolgrößen dieser beiden Aminosäuren zusätzlich gemessen und für die Anpassung verwendet.

Um die Anpassung an die Markierungsanreicherung im Pentose-Phosphat-Weg zu verbessern und die sich auch hier zeigende zeitliche Verzögerung abzubilden, wurde ein zusätzlicher Austauschpool (P5P_xch) eingeführt. In der Stoffflussanalyse des zweiten Markierungsexperiments wurde die Flüsse *emp5* und *emp6* als unidirektional angenommen, da sich zeigte, dass dadurch die anderen Flüsse (insbesondere *ppc* und *mae*) wesentlich besser bestimmt werden können. Mit diesem Modell wurden die in den folgenden Kapiteln dargestellte Stoffflussanalysen basierend auf den gemessenen Metabolitkonzentrationen und den isotopisch instationären Markierungsdaten durchgeführt. Nachfolgend sind exemplarisch nur die Ergebnisse des zweiten Markierungsexperiments dargestellt. Die Ergebnisse des ersten Experiments ist im Anhang B.4 dargestellt. Das erweiterte Netzwerkmodell des *E. coli* Wildtyps für die isotopisch instationären Stoffflussanalysen ist im Anhang A.8 dargestellt.

22.5 Anpassung der Metabolitkonzentration

Die folgende Abbildung 22.5 und die Tabelle 22-6 zeigt die gemessenen und angepassten Werte der intrazellulären Konzentrationen des 2. Markierungsexperiments.

Abbildung 22.5: Gemessene intrazelluläre Konzentrationen und Anpassung für die Metabolite von Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Zitronensäurezyklus



Es zeigt sich, dass bei den Metaboliten der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs trotz der in 22.2 diskutierten Probleme bei der Konzentrationsmessung, überwiegend eine gute Anpassung erreicht wurde. Bei den auftretenden Abweichungen ist kein Trend zu höheren oder niedrigeren Werten zu erkennen. Bei den Metaboliten des Zitronensäurezyklus (AKG, SUCFUM) und den zusätzlichen Austauschpools (Asp, Glut) waren die angepassten Konzentrationen größer als die Messwerte. Dies ist vermutlich auf die langsame Dynamik im Zitronensäurezyklus zurückzuführen, wodurch trotz der zusätzlichen Austauschpools (Glut, Asp) größere Poolgrößen der Metabolite im Zitronensäurezyklus berechnet wurden.

Die in Kapitel 22.2.3 diskutierten Metabolitverluste haben keinen Einfluss auf die Messung der Markierungsdynamik, da hier nur Markierungsverhältnisse bestimmt werden. Ein systematischer Messfehler bei der Messung der Poolgrößen hat nur einen geringen Einfluss auf die Bestimmung der intrazellulären Flüsse, wie durch eine Erhöhung aller gemessenen Metabolitkonzentrationen um 20 % gezeigt werden konnte.

Die folgende Tabelle zeigt die Messwerte der intrazellulären Konzentrationen mit den ermittelten Standardabweichungen.

Tabelle 22-6: Gemessene Metabolitkonzentrationen mit der aus 5 Proben bestimmten Standardabweichung und Anpassung der Werte mit der aus der statistischen Auswertung ermittelten relativen Standardabweichung für das 2. Markierungsexperiment. Für die grau hinterlegten Metabolite lagen keine Messdaten vor.

Metabolit	Messung	Anpassung und Statistik	
	Konzentration [mmol/l]	Konzentration [mmol/l]	RSA [%]
AKG	0,096 ($\pm 0,010$)	0,497	9,99
AcCoA	0,001 ($\pm 0,001$)	0,006	99,99
Asp	0,160 ($\pm 0,008$)	0,294	5,00
CO ₂	--	0,078	1708,97
CitlCit	--	0,013	423,60
DHAP	0,015 ($\pm 0,003$)	0,005	19,99
E4P	0,014 ($\pm 0,003$)	0,040	19,11
F6P	0,011 ($\pm 0,001$)	0,050	9,59
FBP	0,128 ($\pm 0,016$)	0,176	6,20
GAP	0,010 ($\pm 0,002$)	0,005	19,99
G6P	0,063 ($\pm 0,006$)	0,005	9,99
Glut	0,821 ($\pm 0,040$)	1,554	4,98
GlyOx	--	0,322	166,85
MAL	0,068 ($\pm 0,008$)	0,084	10,00
OAA	--	2,485	14,29
P5P	0,023 ($\pm 0,003$)	0,005	12,50
PEP	0,024 ($\pm 0,003$)	0,006	12,49
PG6	0,001 ($\pm 0,001$)	0,005	19,97
Pyr	0,099 ($\pm 0,004$)	0,120	5,00
P5Pxch	--	4,868	16,90
S7P	--	0,068	16,81
SuccFUM	4,017 ($\pm 0,200$)	7,661	4,69
xPG	0,074 ($\pm 0,007$)	0,005	10,00

Mit Ausnahme der nicht gemessenen Metabolite konnten die Konzentrationswerte mit den vorliegenden Daten gut bestimmt werden. Die relative Standardabweichung ist mit Ausnahme von AcCoA kleiner als 20 Prozent. Über die gemessene Markierungsdynamik und die ermittelten intrazellulären Stoffflüsse bietet sich somit erstmals die Möglichkeit – über eine von der Konzentrationsmessung unabhängige Methode – die gemessenen Konzentrationswerte zu validieren und mögliche Messfehler zu entdecken. Die breite Streuung der in der Literatur veröffentlichten Daten zur intrazellulären Konzentration beim *E. coli* Wildtyp zeigen den großen Bedarf einer solchen Methode (Abbildung 22.3).

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist, dass zusätzlich auch einige nicht gemessene Metabolite (OAA, S7P) mit einer Genauigkeit kleiner $\pm 20\%$ bestimmt werden konnten. Konzentrationswerte, die auf Grund der geringen Stabilität oder eines fehlenden Standards des Metaboliten bisher nicht gemessen werden können, lassen sich nun erstmals indirekt über die Markierungsdynamik und die Konzentration assoziierter Metabolite bestimmen.

22.6 Anpassung der Markierungsverläufe

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die zeitlichen Verläufe der Markierungsanteile (Symbole mit Standardabweichung) und die durch die ^{13}C -Stoffflussanalyse ermittelte Anpassung (durchgezogene Linie) für die ersten 16 Sekunden des 2. Markierungsexperiments.

Abbildung 22.6: Anpassung an die Markierungsverläufe der ersten 16 Sekunden des 2. Markierungsexperiments für die Metabolite der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs. Die Symbole geben die Messwerte mit der Standardabweichung wieder, die durchgezogene Linie zeigt die berechnete Anpassung.

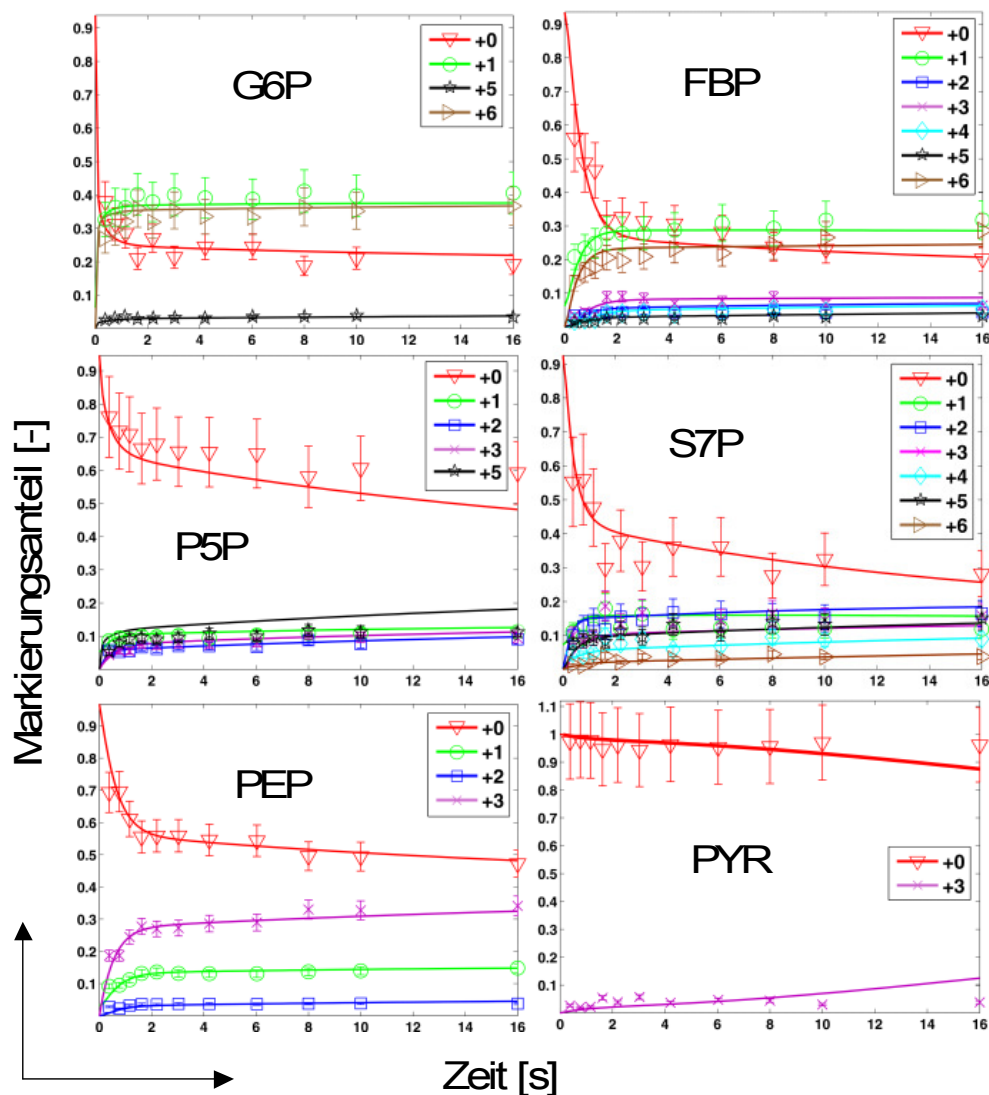
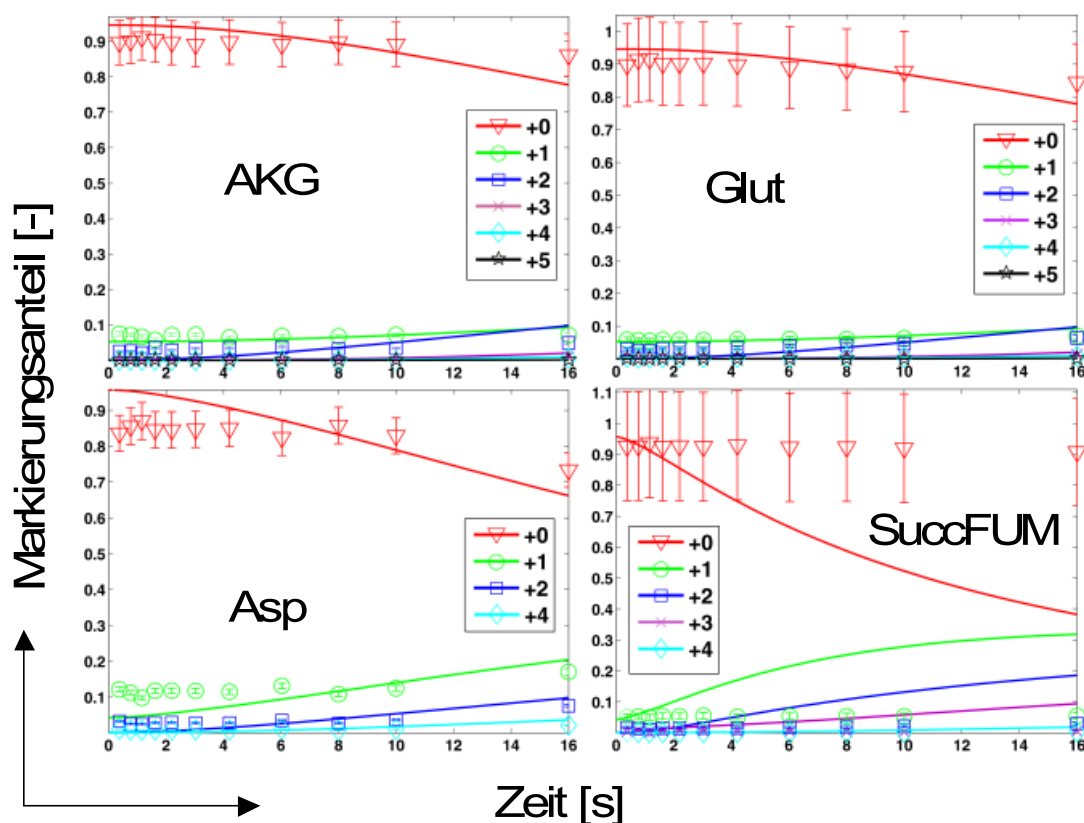


Abbildung 22.7: Anpassung an die Markierungsverläufe der ersten 16 Sekunden des Markierungsexperiments für die Metabolite des Zitronensäurezyklus. Die Symbole geben die Messwerte mit der Standardabweichung wieder, die durchgezogene Linie zeigt die berechnete Anpassung.



Es zeigt sich, dass mit dem erweiterten Modell für die Metabolite der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs eine gute Anpassung der Markierungsverläufe erreicht werden konnte. Auch die langsame Dynamik in den Metaboliten des Zitronensäurezyklus wurde mit Ausnahme des Pools SUCFUM gut wiedergegeben. Die Abweichungen zu Beginn des Markierungsexperiments beim Pool Asp sind vermutlich auf eine fehlerhafte Messung des Anteils $m/z+1$ zurückzuführen. Bei dieser Masse tritt anscheinend noch ein weiterer Metabolit auf, der fälschlicherweise dem Aspartat-Pool zugeordnet wurde.

Der Grund für die sehr langsame Dynamik der Markierungsanreicherung im Pool SuccFUM konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Trotz eines großen Werts der angepassten Metabolitkonzentration ist die berechnete Markierungsanreicherung wesentlich schneller als die Messung. Es zeigte sich, dass erst ab einer Poolgröße von ≥ 50 mmol/l die Dynamik des Pools richtig wiedergegeben wird. Untersuchungen mit verschiedenen Modellvarianten zeigten, dass die Dynamik des Pools SuccFUM wesentlich von den Modellannahmen abhängt.

Drei der untersuchten Modellvarianten sollen hier kurz vorgestellt werden:

- 1) Die Reaktion der *Malic enzymes* (*mae*) ist unidirektional.
- 2) Die Reaktion *mae* ist bidirektional (gezeigte Anpassung).
- 3) Der Reaktion *mae* ist bidirektional und zusätzlich wird ein Austauschfluss von Pyruvat mit Alanin (Alanin-Transaminase) angenommen.

Die als *Malic enzymes* bezeichneten Isoenzyme *MaeB* und *SfcA* spielen in *E. coli* eine wichtige Rolle bei der C4-Decarboxylierung (MAL → PYR) in der Glukoneogenese und der Bereitstellung von NADH bzw. NADPH. Die enzymatischen Reaktionen werden gemeinhin als reversibel betrachtet (Wood and Utter 1965), wobei jedoch die Reaktion von Malat zu Pyruvat bevorzugt wird und die Rückreaktion nur eine untergeordnete Rolle spielt (Sauer and Eikmanns 2005). Die positive/negative Regulation der *Malic enzymes* erfolgt allosterisch durch verschiedene Kofaktoren und Metabolite des Zentralstoffwechsels, aber auch auf transkriptionaler Ebene und ist vom energetischen und anabolischen Bedarf der Zelle abhängig. Die angenommene Bidirektionalität des Flusses von Malat zu Pyruvat ist daher noch in der Diskussion. Die Annahme eines unidirektionalen Flusses für *mae* im Modell führt dazu, dass die Dynamik der Markierungsanreicherung von Pyruvat der von Phosphoenolpyruvat entspricht. Die Markierungsmessung zeigte jedoch, dass dies nicht der Fall ist (Abbildung 22.4). Bei Annahme eines bidirektionalen Flusses wird die Dynamik der Markierungsanreicherung von Pyruvat richtig wiedergegeben. Jedoch entspricht die Anpassung des Pools SuccFUM dann nicht der gemessenen Markierungsanreicherung.

Im dritten Fall wurde zusätzlich zur Bidirektionalität des Flusses *mae* ein Pool angenommen, der im Austausch mit Pyruvat steht. Pyruvat steht über eine reversible Transaminase-Reaktion in direktem Austausch mit Alanin (siehe 22.4), so dass diese Annahme gerechtfertigt ist. Mit diesem zusätzlichen Austauschpool gelingt es sowohl für Pyruvat als auch für SuccFUM eine gute Anpassung zu erreichen. Die berechnete Konzentration dieses Pools ist jedoch mit über 21 mmol/l sehr viel größer als jeder andere Pool im Modell. Eine mögliche Erklärung für die langsame Markierungsanreicherung ist, dass das gebildete Succinat nicht ins Cytoplasma abgegeben wird, sondern direkt von der Succinyl-CoA-Synthetase an die Succinat-Dehydrogenase weitergereicht und zum Fumarat umgesetzt wird. Dieser Effekt, den man als Enzyme-Channeling bezeichnet, ist für Hefen und andere höhere Zellen zwischen den Metaboliten des TCA (Succinyl-CoA, Succinat und Fumarat) beschrieben (Malaisse et al. 1996; Sherry et al. 1994) und es ist wahrscheinlich, dass dies auch für bakterielle Enzyme der Fall ist. Das Channeling zwischen den drei Enzymen führt zu einer unsymmetrischen ¹³C-Markierung im Malat, da die symmetrischen Moleküle Succinat und Fumarat in einer festen Orientierung weiterreagieren. Dies könnte durch eine ¹³C-NMR-Analyse oder eine Fragmentierung des Moleküls im Massenspektrometer nachgewiesen werden.

22.7 Vergleich der Stoffflüsse von zwei Experimenten

Die im vorigen Kapitel dargestellten Metabolitkonzentrationen und Markierungsverläufe wurden durch die Variation der intrazellulären Flüsse angepasst. Die berechneten Netto- und Austauschflüsse für die beiden Markierungsexperimente sind zusammen mit der ermittelten relativen Standardabweichung (RSA) in den folgenden beiden Tabellen wiedergegeben.

Tabelle 22-7: Berechnete Netto-Flüsse und ermittelte relative Standardabweichung (RSA) der beiden isotopisch instationären Markierungsexperimente.

Fluss Name	Instationäre Stoffflussanalyse 1		Instationäre Stoffflussanalyse 2	
	Net [mmol/(gBTM*h)]	RSA [%]	Net [mmol/(gBTM*h)]	RSA [%]
emp1	2,48 ($\pm 0,150$)	6,03	2,51 ($\pm 0,229$)	9,12
emp2	4,20 ($\pm 0,061$)	1,46	4,14 ($\pm 0,077$)	1,85
emp3	4,20 ($\pm 0,061$)	1,46	4,14 ($\pm 0,077$)	1,85
emp4	4,13 ($\pm 0,061$)	1,48	4,07 ($\pm 0,077$)	1,88
emp5	9,11 ($\pm 0,100$)	1,10	8,94 ($\pm 0,078$)	0,87
emp6	8,21 ($\pm 0,100$)	1,22	8,01 ($\pm 0,078$)	0,97
emp7	6,43 ($\pm 11,485$)	178,62	5,77 ($\pm 0,353$)	6,12
ppp1/2	3,24 ($\pm 0,157$)	4,84	3,13 ($\pm 0,228$)	7,30
ppp3	0,78 ($\pm 0,052$)	6,72	0,73 ($\pm 0,076$)	10,43
ppp4	0,98 ($\pm 0,052$)	5,33	0,94 ($\pm 0,076$)	8,11
ppp5	0,98 ($\pm 0,052$)	5,33	0,94 ($\pm 0,076$)	8,11
tcc1	5,43 ($\pm 0,174$)	3,21	5,31 ($\pm 0,174$)	3,27
tcc2	2,36 ($\pm 0,100$)	4,23	2,07 ($\pm 0,078$)	3,77
tcc3	1,41 ($\pm 0,113$)	7,99	0,90 ($\pm 0,070$)	7,75
tcc4	0,50 ($\pm 0,114$)	22,73	0,15 ($\pm 0,068$)	45,09
tcc5a/b	0,72 ($\pm 0,050$)	6,90	0,66 ($\pm 0,039$)	5,90
tcc6	1,74 ($\pm 11,501$)	660,98	1,24 ($\pm 6,986$)	563,40
gs1/2	0,95 ($\pm 0,107$)	11,25	1,17 ($\pm 0,107$)	9,17
ppc	1,35 ($\pm 11,508$)	852,44	1,78 ($\pm 0,357$)	20,05
mae	0,67 ($\pm 11,583$)	1728,81	1,25 ($\pm 0,393$)	31,45
bs_akg	0,91 ^a	--	0,75 ^a	--
bs_oaa	0,72 ^a	--	0,95 ^a	--
bs_p5p	0,50 ^a	--	0,52 ^a	--
prod_CO2	9,90 ($\pm 0,307$)	3,10	7,76 ($\pm 0,050$)	0,64

^aAbfluss in die Biomasse (= *constraint*)

Tabelle 22-8: Berechnete Austauschflüsse und ermittelte relative Standardabweichung (RSA) der beiden isotopisch instationären Markierungsexperimente

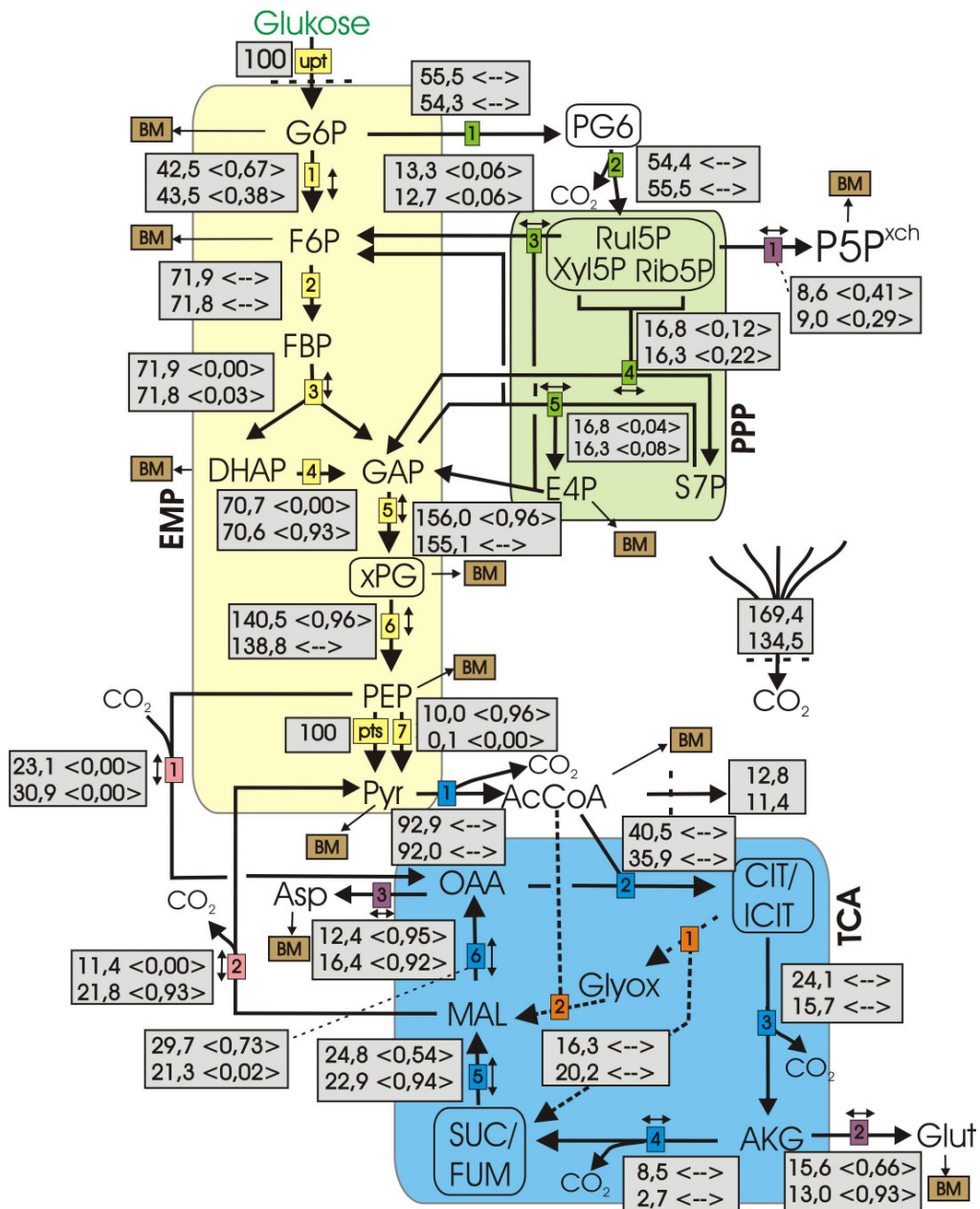
Fluss Name	Instationäre Stoffflussanalyse 1		Instationäre Stoffflussanalyse 2	
	Xch[0,1] [-]	RSA [%]	Xch[0,1] [-]	RSA [%]
emp1	0,669 (±0,054)	8,06	0,377 (±0,064)	16,90
emp2	-- ^a		--	
emp3	0,000 (±0,000)	4,68E+07	0,025 (±0,010)	39,97
emp4	0,003 (±0,702)	2,34E+04	0,930 (±1,835)	197,28
emp5	0,957 (±0,382)	39,87	--	
emp6	0,959 (±0,536)	55,92	--	
emp7	0,960 (±1,117)	116,40	0,000 (±0,000)	3,00E+05
ppp1a/2	--		--	
ppp3	0,062 (±0,005)	8,06	0,058 (±0,012)	20,63
ppp4	0,120 (±0,011)	9,14	0,215 (±0,018)	8,48
ppp5	0,043 (±0,006)	13,70	0,076 (±0,011)	14,52
tcc1	--		--	
tcc2	--		--	
tcc3	--		--	
tcc4	--		--	
tcc5a/b	0,539 (±0,066)	12,24	0,944 (±0,630)	66,70
tcc6	0,727 (±0,470)	64,63	0,015 (±0,051)	338,58
gs1/2	--		--	
ppc	0,000 (±0,000)	1,74E+07	0,000 (±0,000)	2,49E+05
mae	0,001 (±0,197)	1,97E+04	0,930 (±0,308)	33,09
bs_akg	0,664 (±0,024)	3,60	0,930 (±0,149)	16,00
bs_oaa	0,949 (±0,692)	72,95	0,921 (±0,540)	58,58
bs_p5pa	0,414 (±0,018)	4,23	0,289 (±0,020)	6,97
prod_CO2	--		--	

^a Fluss wurde unidirektional angenommen

Ein Vergleich der berechneten Nettoflüsse aus dem 1. und 2. Markierungsexperiment zeigt eine gute Übereinstimmung bei den Flüssen der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs. Bei den Flüssen im Zitronensäurezyklus sind größere Unterschiede festzustellen. Dies ist vor allem auf die anaplerotischen Flüsse (*ppc*, *mae*) zurückzuführen, die in der ersten Stoffflussanalyse schlecht bestimmbar sind. Durch eine Änderungen des Modells in der zweiten Stoffflussanalyse (*emp5*, *emp6* unidirektional) konnte die Bestimmtheit der anaplerotischen Nettoflüsse wesentlich verbessert werden. Auf Grund der starken Verknüpfung dieser beiden Flüsse mit den anderen Flüssen des Netzwerks konnten somit auch weitere Nettoflüsse (*emp7*, *tcc6*) besser bestimmt werden.

Bei den berechneten Austauschflüssen sind Unterschiede zwischen beiden Stoffflussanalysen festzustellen. Mit Ausnahme der schlecht bestimmten Austauschflüsse *emp3*, *emp4*, *emp7*, *tcc6*, *ppc* und *mae* sind jedoch die Tendenzen zu großen bzw. kleinen Austauschflüssen in beiden Experimenten vergleichbar. Die Bestimmtheit der Austauschflüsse ist schlechter als die der Nettoflüsse. In der folgenden Abbildung sind die Flüsse aus beiden isotopisch instationären Stoffflussanalysen graphisch dargestellt. Die Flüsse wurden auf die Glukoseaufnahme normiert.

Abbildung 22.8: Normierte Stoffflüsse der isotopisch instationären Stoffflussanalysen des 1. und 2. Markierungsexperiments. Im 2. Experiment wurden die Flüsse der Glykolyse *emp5* und *emp6* als unidirektional angenommen. In den Klammer < > sind die Austauschflüsse angegeben.



Im Vergleich mit den Ergebnissen aus der stationären Stoffflussanalyse lassen sich drei wesentliche Unterschiede feststellen. Dies ist erstens der Fluss von G6P in den Pentose-Phosphat-Weg, der im Vergleich zum stationären Experiment etwa doppelt so groß ist. Von den Autoren (Schmidt et al. 1997) sowie (Zhao and Shimizu 2003) wurden ähnlich hohe Werte auf Basis einer stationären Stoffflussanalyse mit einem *E. coli* Wildtyp ermittelt. Es finden sich jedoch auch niedrigere Werte, die den Ergebnissen aus der stationären Stoffflussanalyse entsprechen. Der zweite Unterschied zeigt sich bei den Flüssen *ppc* und *mae*. Diese konnten jedoch bei der stationären Stoffflussanalyse nicht zuverlässig bestimmt werden, so dass diese Unterschiede erklärbar sind. Als dritter Unterschied lässt sich bei den isotopisch instationären Stoffflussanalysen ein höherer Glyoxylat-Fluss feststellen. In den meisten in der Literatur gezeigten stationären Stoffflussanalysen für *E. coli* wird dieser Fluss vernachlässigt, da angenommen wird, dass dieser Stoffwechselweg beim Wachstum auf Glukose nicht aktiv ist. Die Autoren (Phue et al. 2005) konnten jedoch zeigen, dass dies nicht immer der Fall ist, was von den Ergebnissen der isotopisch instationären Stoffflussanalyse bestätigt wird.

Zusammenfassend kann für die isotopisch instationäre Stoffflussanalyse festgestellt werden, dass der Umfang und die Güte der Konzentrations- und Markierungsmessungen ausreichend ist, um die meisten Flüsse mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Der Datenumfang ist durch die große Anzahl an Proben viel größer als bei der stationären Stoffflussanalyse, bei der die Markierung nur am Ende des Experiments in einer Probe analysiert wird. Die berechneten Nettoflüsse können daher bei der isotopisch instationären Stoffflussanalyse – bei einer wesentlich kürzeren Markierungsdauer – besser bestimmt werden. Dies zeigen auch die ermittelten Standardabweichungen der Flüsse, die geringer sind als bei der stationären Stoffflussanalyse (15.3). Zusätzlich war es beim 2. Experiment, unter der Annahme, dass die Flüsse *emp5* und *emp6* unidirektional sind, möglich, auch die Flüsse *ppc*^{net} und *mae*^{net} zu bestimmen. Die Größe dieser Flüsse kann bei der stationären Stoffflussanalyse mit *E. coli* beim Wachstum auf Glukose nicht zuverlässig ermittelt werden. Auch die Standardabweichung der Austauschflüsse ist besser als beim stationären Markierungsexperiment.

23 Zusammenfassung und Ausblick

23.1 Zusammenfassung

Die Ergebnisse im ersten Teil der Arbeit haben gezeigt, dass die Dauer der Markierungsexperimente nur verkürzt werden kann, wenn man zukünftig isotopisch instationäre Markierungsdaten für die ^{13}C -Stoffflussanalyse nutzt. Zur Gewinnung der benötigten Daten musste der von El Massaoudi (2003) entwickelte Sensorreaktor erweitert und eine experimentelle Methode entwickelt werden. Im zweiten Teil der Arbeit sind im Kapitel 18 bis 20 die technische Weiterentwicklung zur Durchführung von isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalysen dargestellt. Es wurde eine schnelle Probenahmeinheit entwickelt mit der zu beliebigen Zeitpunkten bis zu drei Proben pro Sekunde mit einem definierten Volumen automatisiert aus dem Reaktor entnommen werden können. Die Proben werden direkt nach der Probenahme in -50°C kaltem Methanol gequenchet, um den Stoffwechsel zu stoppen. Zur Regelung und Steuerung des gesamten Reaktorsystems bestehend aus Bioreaktor, Inokulierungs- und Markierungsaufgabeeinheit wurde eine speicherprogrammierbare Steuerung (SPS) entwickelt, die durch den modularen Aufbau und die Möglichkeit zur freien Programmierung beliebig erweitert werden kann. Über Schnittstellen können die Daten von einem Produktionsreaktor aufgenommen werden, so dass ein Betrieb im Master/Slave-Modus möglich ist. Die Inokulierung, der Fermentationsbetrieb und die Durchführung der Markierungsexperimente verlaufen im wesentlichen automatisiert. Das gesamte Reaktorsystem wurde als mobile Einheit gestaltet, so dass es transportabel ist und extern eingesetzt werden kann.

Zur Extraktion der Metabolite aus den Zellen vor der Analyse der Konzentration und der Markierungsmuster mittels LC-MS/MS wurden vier verschiedene chemische Methoden untersucht (Kapitel 21). Dabei zeigte sich, dass keine der untersuchten Methoden für die Extraktion aller Metabolite des Zentralstoffwechsels gleich gut geeignet ist. Die bisher in der Literatur am häufigsten beschriebene Methode – der Zellaufschluss mit Perchlorsäure – zeigte dabei die schlechteste Extraktionsleistung und die größte Standardabweichung. Die Extraktionen mit Chloroform/Methanol, heißem Ethanol und basischem Ethanol zeigten eine vergleichbare Güte der Extraktionsleistung, wobei aber für einzelne Metabolite große Unterschiede beobachtet werden konnten. Diese lassen sich vermutlich auf die unterschiedlichen Bedingungen (pH-Werte, Temperatur, Löslichkeit, Metabolitverluste etc.) bei der Extraktion zurückführen.

Mit dem weiterentwickelten Reaktorsystem wurden mit einem *E. coli* K12 Wildtyp zwei isotopisch instationäre Markierungsexperimente in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt (Kapitel 22). Die Konzentrationen und die Markierungsmuster von 19 intrazellulären Metaboliten wurden nach der Extraktion mittels LC-MS/MS in über 30 Proben analysiert, die in einem Zeitraum von der Zugabe der markierten Glukose bis 25 bzw. 48 Minuten danach aus dem Reaktor entnommen wurden. Beim Vergleich der Konzentrationswerte wurden innerhalb eines Experiments nur geringe Standardabweichungen festgestellt. Im Vergleich beider Experimente zeigten sich jedoch – trotz vergleichbarer Fermentationsbedingungen – für einige Metabolite große Differenzen. Auch in der Literatur werden für den *E. coli* Wildtyp sehr unterschiedliche Werte berichtet. Mehrere Autoren (Villas-Boas et al. 2005; Wittmann et al. 2004) haben die diversen Einflussfaktoren auf die Bestimmung der Metabolitkonzentration untersucht und konnten zeigen, dass neben den Fermentationsbedingungen (Nährstoffangebot, Temperatur, pH-Wert, Limitierungen etc.) auch viele andere Faktoren, wie Quenching, Extraktion, Konzentrierung und das Analyseverfahren eine große Rolle spielen. Eine Analyse des Quenchingüberstands zeigte, dass insbesondere beim Quenching größere Verluste auftreten, die trotz einheitlichem Vorgehen nicht konstant sind und somit die beobachteten Unterschiede erklären. Die gemessenen zeitlichen Verläufe der Markierung in den einzelnen Metaboliten zeigten, dass die Markierungsanreicherung mit Ausnahme von Pyruvat in den Metaboliten der Glykolyse wie erwartet sehr schnell verläuft. Bei den Metaboliten des Zitronensäurezyklus kommt es dagegen zu einer starken Verzögerung der Anreicherung. Dies ist wahrscheinlich auf Rückflüsse von unmarkierten Metaboliten zurückzuführen, wobei die Transaminase-Reaktionen vermutlich eine sehr große Rolle spielen.

Auf Basis der Daten aus den beiden Markierungsexperimenten wurden isotopisch instationäre ^{13}C -Stoffflussanalysen durchgeführt. Dabei wurden nur die ersten 16 bzw. 20 Sekunden der gemessenen Markierungsverläufe genutzt. Mit Blick auf die geringen Konzentrationen der intrazellulären Metabolite und die hohe Komplexität der Methode – bestehend aus Experiment, Analytik und ^{13}C -Stoffflussanalyse – sind die in Kapitel 22.4 gezeigten Anpassungen der Konzentrationswerte und der Markierungsdynamik überraschend gut. Mit Ausnahme von Succinat wurde eine gute Anpassung an die Dynamik der Markierungsanreicherung erzielt. Um die Abweichungen beim Succinat zu erklären, wurden verschiedene Modellvarianten untersucht. Diese zeigten, dass eine gute Anpassung erreicht werden kann, wenn man annimmt, dass die anaplerotischen Reaktionen bidirektional sind und zusätzlich ein Austausch mit einem Alanin-Pool stattfindet. Allerdings war die ermittelte Größe dieses Pools sehr groß, so dass vermutet werden kann, dass hier noch andere Einflüsse, wie z.B. Channeling-Effekte, eine Rolle spielen.

Bei der Anpassung der gemessenen intrazellulären Konzentrationen zeigten sich größere Abweichungen, die jedoch auf Grund fehlender Messwerte einiger nicht messbarer Metabolite und der festgestellten Quenchingverluste erklärbar sind. Ein interessantes Ergebnis ist, dass sich mit Hilfe der Parameteranpassung die Konzentrationen einiger nicht messbarer Metabolite über die Anpassung der Messwerte anderer Metabolite bestimmen lässt. Dies gelingt insbesondere in einem linearen Reaktionsweg, wenn der Stofffluss z.B. durch eine extrazelluläre Messung bekannt ist oder eine starke Verknüpfung mit messbaren Metaboliten vorhanden ist (siehe OAA, S7P). Die isotopisch instationäre Stoffflussanalyse kann daher dazu genutzt werden, Metabolite, die auf Grund einer zu geringen Konzentration, fehlender Standards oder Instabilitäten nicht messbar sind, auf indirektem Wege zu bestimmen. Zusätzlich bietet diese neue Methode nun erstmals die Möglichkeit die Messung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen durch eine unabhängige Methode zu überprüfen. Eine starke Verlangsamung der Markierungsdynamik in einem linearen Reaktionsweg ohne zusätzlichen Zufluss deutet auf eine hohe Metabolitkonzentration hin. Bei bekanntem Stofffluss können somit die gemessenen Metabolitkonzentrationen über die Markierungsdynamik überprüft werden.

Auf Basis der vorhandenen Daten konnten die meisten Stoffflüsse gut bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die ermittelte Standardabweichung der Flüsse im allgemeinen geringer ist als bei der stationären Stoffflussanalyse. Die Größe und Bestimmtheit der Flüsse hängt jedoch – wie auch bei der stationären ^{13}C -SFA – stark von den Modellannahmen ab, wie der Vergleich der Ergebnisse der statistischen Auswertung der beiden instationären Stoffflussanalysen zeigte. Die Netto- und Austauschflüsse der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs waren trotz der unterschiedlich gemessenen Konzentrationswerte bei beiden Experimenten gleich. Abweichungen gab es nur bei den Flüssen des Zitronensäurezyklus. Diese konnten auf die in der ersten Stoffflussanalyse auf Grund bestimmter Modellannahmen schlechter bestimmbaren anaplerotischen Flüsse zurückgeführt werden. Der Vergleich mit den Stoffflüssen aus der stationären Stoffflussanalyse zeigte Unterschiede beim Nettofluss in den Pentose-Phosphat-Weg, den anaplerotischen Flüssen und dem Glyoxylat-Fluss.

23.2 Folgerungen und Ausblick

Als Fazit aus den Ergebnissen des zweiten Teils dieser Arbeit lässt sich folgender Schluss ziehen: Mit der isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalyse kann die Markierungszeit zukünftiger Experimente drastisch verkürzt werden. Daher kann nun jede beliebige Phase einer Fedbatch-Fermentation untersucht werden, da bei der benötigten Zeit von nur wenigen Sekunden für ein Markierungsexperiment in der Regel von einem metabolisch stationären Zustand ausgegangen werden kann. Allerdings ist bei Zugabe der markierten Glukose als Puls in den Reaktor zu überprüfen, ob es nicht zu einer Anregung des Stoffwechsels durch die erhöhte Glukosekonzentration kommt. Die in Kapitel 22 dargestellten Ergebnisse haben das große Potenzial der isotopisch instationären Markierungsexperimente und der darauf basierenden ^{13}C -Stoffflussanalyse gezeigt. Die Messung der Markierungsdynamik und der intrazellulären Metabolitkonzentrationen erlauben einen tiefen Einblick in die Stoffwechselfvorgänge einer Zelle bei Fermentationsprozessen. Die Menge an Informationen, die aus einem solchen Markierungsexperiment gewonnen werden kann ist wesentlich größer als bei einer isotopisch stationären ^{13}C -Stoffflussanalyse, so dass es gelingt die Flüsse mit geringerer Standardabweichung zu bestimmen. Die Güte der Stoffflussanalysen steigt zusätzlich durch die vorhandene Redundanz der gemessenen Daten. Viele Informationen über den Stoffwechsel der untersuchten Organismen gewinnt man allein aus den gemessenen Metabolitkonzentrationen und Markierungsverläufen, wenn auch die Interpretation der Daten nicht immer einfach ist. So sind Aussagen über die Aktivität von bestimmten Stoffwechselwegen möglich und man erhält Hinweise auf Channeling-Effekte von Enzymen. Diese Erkenntnisse können dann in die Verbesserung der für die Stoffflussanalyse vorhandenen Stoffwechselmodelle fließen.

Die neu entwickelte Technik und Methode ermöglicht es – durch mehrere in kurzen zeitlichen Abständen durchgeführte ^{13}C -Stoffflussanalysen – den metabolischen Zustand zu verschiedenen Zeiten einer Fermentation und bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen zu untersuchen. Diese Erkenntnisse können zur Optimierung von Fermentationsprozessen und eine gezielte genetische Modifikation der untersuchten Zellen eingesetzt werden. Jedoch ist dies erst der Anfang einer Entwicklung, die zu einem besseren Verständnis biotechnologischer Produktionsprozesse verhilft. Auf dem Weg zu einer standardmäßig eingesetzten Methode, sind noch einige Hürden zu meistern und der experimentelle und methodische Ansatz ist weiter zu entwickeln:

Etablierung einer einheitlichen Methode zur Bestimmung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen

Bei der Bestimmung der intrazellulären Metabolitkonzentration sind in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt worden. Das Quenching in kaltem Methanol hat sich als Standard zum Stopp des Zellstoffwechsels etabliert. Verschiedene Methoden zum Zellaufschluss und zur Extraktion der Metabolite wurden entwickelt. Insbesondere die rasante Entwicklung auf dem Gebiet der LC-MS/MS-Analytik macht es heute möglich, immer geringere Metabolitkonzentrationen zu erfassen. Die Ergebnisse der intrazellulären Konzentrationsbestimmung (Kapitel 21 und 22.2) haben jedoch gezeigt, dass bei diesem Thema noch Entwicklungsbedarf besteht. Die in der Literatur beschriebenen Konzentrationswerte zeigen eine sehr große Schwankungsbreite. Der Einfluss der Extraktionsmethode auf die Größe der gemessenen Metabolitkonzentration muss daher näher untersucht werden. Zudem müssen die Verluste durch das Quenching in kaltem Methanol verringert oder alternative Methoden zum Stopp des Zellstoffwechsels entwickelt werden. Zum besseren Vergleich der gemessenen Metabolitkonzentrationen muss für jeden Metaboliten bzw. Stoffklasse eine Standardmethode entwickelt werden, die sich idealerweise international durchsetzt. Durch den Aufbau einer Metabolitdatenbank, vergleichbar mit der Datenbank BRENDA für Enzyme (Schomburg et al. 2002), wäre es einfacher möglich, einen Vergleich der gemessenen intrazellulären Konzentrationen verschiedener Organismen anzustellen und auf dieser Grundlage den Einfluss der zahlreichen Faktoren (Organismus, C-Quelle, Temperatur, pH-Wert, Quenching, Extraktionsmethode etc.) besser zu verstehen.

Entwicklung eines besseren Verständnisses zum Einfluss von verschiedenen Modellvarianten auf die Ergebnisse der Stoffflussanalyse

Die bei Stoffflussanalysen verwendeten metabolischen Netzwerke sind in der Literatur in ständiger Diskussion. Bei der Durchführung der ^{13}C -Stoffflussanalysen – isotopisch stationär und instationär – zeigte sich, dass die Gestaltung des metabolischen Modells, z.B. die Annahmen zur Direktionalität von Flüssen, der Aktivität bestimmter Stoffwechselwege oder zusätzlichen Austauschpools einen großen Einfluss auf das Ergebnis hat. Aus diesem Grund muss in zukünftigen Arbeiten der Einfluss von verschiedenen Modellvarianten auf die Größe der ermittelten Stoffflüsse näher untersucht werden. Diese Untersuchungen – insbesondere auf Basis der isotopisch instationären Stoffflussanalysen – werden zu einem besseren Verständnis der Einflussfaktoren führen und evtl. zusätzliche Erkenntnisse über den Stoffwechsel von Bakterien liefern. Zur Durchführung der Untersuchungen und zukünftiger ^{13}C -Stoffflussanalysen auf Basis von isotopisch instationären Markierungsdaten ist es erforderlich, die Geschwindigkeit der Berechnungen zu erhöhen, um nach der Durchführung der Experimente zeitnah zu Ergebnissen zu kommen und in einem überschaubaren Zeitraum verschiedene Modellvarianten untersuchen zu können.

Erweiterung der experimentellen Basis für den Einsatz bei unterschiedlichen großtechnischen Produktionsprozessen

Der Vergleich verschiedener Stämme und Organismen auf Basis der isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalyse wird zu einem tieferen Verständnis der Methode führen und wichtige Erkenntnisse über mögliche Stoffwechselunterschiede der untersuchten Stämme liefern. Durch den Parallelbetrieb zu einem Produktionsreaktor (Kapitel 16) können verschiedene Phasen einer Fermentation untersucht werden, was wichtige Informationen über Stoffwechselveränderungen liefert. Viele Produktionsprozesse werden glukoselimitiert durchgeführt. Mit dem Reaktorsystem sind auch unter diesen Prozessbedingungen Markierungsexperimente möglich. Die Markierungsaufgabe würde dabei jedoch nicht durch eine Pulsaufgabe sondern kontinuierlich über eine Pumpe erfolgen, wobei von einer unmarkierten Substratzugabe auf ein markiertes Substrat umgeschaltet wird. Durch die Zugabe eines Farbindikators könnte die Umschaltung in den Proben angezeigt werden.

Gewinnung zusätzlicher Informationen durch Erweiterung der Methode der isotopisch instationären Markierungsexperimente

Interessant ist auch die Kombination von metabolisch und isotopisch instationären Experimenten. Wie bei den *Puls-Response*-Experimenten (Buchholz et al. 2002; Visser et al. 2002; Weuster-Botz 1997) gibt man dabei zu einer substratlimitierten Kultur eine größere Substratmenge, so dass es zu einer Auslenkung des Stoffwechsels kommt. Im Gegensatz zu früheren Experimenten würde man jedoch vollmarkiertes Substrat einsetzen und nur die Verteilung dieses Anteils im Organismus verfolgen. Dies hätte den Vorteil, dass das Ergebnis nicht durch Rückflüsse unmarkierter Metabolite aus anderen Pools verfälscht würde. Auch für diese Art von Experimenten kann das entwickelte Reaktorsystem eingesetzt werden. Bei der isotopisch instationären ^{13}C -Stoffflussanalyse erhält man als Ergebnis eine Kombination aus Stoffflüssen, Metabolitkonzentrationen und einem zugehörigen Stoffwechselmodell. Diese Daten können direkt genutzt werden, um eine thermodynamische Untersuchung des metabolischen Zustands der Zelle anzustellen (Grönke et al. 2006; Kummel et al. 2006b). Diese liefert als Ergebnis eine Aussage, ob die Richtung eines ermittelten Flusses thermodynamisch möglich ist und kann zur Konsistenzprüfung der Stoffflussanalyse genutzt werden. Zusätzlich lassen sich Konzentrationsbereiche von Metaboliten angeben, die notwendig sind, damit das Reaktionssystem thermodynamisch möglich ist. Reaktionen, die sehr weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt sind, bieten sich als mögliche Zielpunkte für eine genetische Veränderung an, um den Fluss des Stoffwechselwegs zu erhöhen.

Literaturverzeichnis

- Aboka F.O., Heijnen J.J., van Winden W.A.: 'Dynamic ^{13}C -tracer study of storage carbohydrate pools in aerobic glucose-limited *Saccharomyces cerevisiae* confirms a rapid steady-state turnover and fast mobilization during a modest stepup in the glucose uptake rate'; *FEMS Yeast Res*; 9 (2); 191-201.; 2009
- Alfoldi L., Rasko I., Kerekes E.: 'L-Serine Deaminase of *Escherichia coli*'; *J. Bacteriol.*; 96 (5); 1512-1518; 1968
- Antoniewicz M.R., Kraynie D.F., Laffend L.A., Gonzalez-Lergier J., Kelleher J.K., Stephanopoulos G.: 'Metabolic flux analysis in a nonstationary system: fed-batch fermentation of a high yielding strain of *E. coli* producing 1,3-propanediol'; *Metab Eng*; 9 (3); 277-92; 2007
- Arauzo-Bravo M.J., Shimizu K.: 'Estimation of bidirectional metabolic fluxes from MS and NMR data using positional representations'; *Genome Inform*; 12 63-72.; 2001
- Atkinson D.E.: 'Cellular Energy Metabolism and Its Regulation'; Academic Press Inc., U.S.; New York 1977
- Bader M.: 'A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis'; *J. Chem. Educ.*; 57 (703); 1980
- Beard D.A., Babson E., Curtis E., Qian H.: 'Thermodynamic constraints for biochemical networks'; *J Theor Biol*; 228 (3); 327-33.; 2004
- Behrendt C.: 'Entwicklung, Programmierung und Test einer SPS-gestützten Steuerung für einen Fermenter im Projekt Sensorreaktor'; Diplomarbeit; FH Aachen; Jülich 2005
- Bell S.C., Turner J.M.: 'Bacterial catabolism of threonine. Threonine degradation initiated by L-threonine acetaldehyde-lyase (aldolase) in species of *Pseudomonas*'; *Biochem J*; 166 (2); 209-16.; 1977
- Bergmeyer H.U.: 'Methods of enzymatic analysis'; Verlag Chemie, Academic press Inc.; Weinheim, New York and London 1984
- Bizouarn T., Fjellstrom O., Mueller J., Axelsson M., Bergkvist A., Johansson C., Karlsson B.G., Rydstrom J.: 'Proton translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase from *E. coli*. Mechanism of action deduced from its structural and catalytic properties'; *Biochim Biophys Acta*; 1457 (3); 211-28.; 2000
- Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F. and others: 'The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12'; *Science*; 277 (5331); 1453-74.; 1997
- Bolten C.J., Kiefer P., Letisse F., Portais J.C., Wittmann C.: 'Sampling for metabolome analysis of microorganisms'; *Anal Chem*; 79 (10); 3843-9. Epub 2007 Apr 6.; 2007
- Bovey F.A., Jelinski L., Mirau P.A.: 'Nuclear magnetic resonance spectroscopy'; Academic Press San Diego 1988
- Buchholz A.: 'Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken zur Untersuchung mikrobieller Netzwerke'; Dissertation; Universität Bonn; Bonn 2002
- Buchholz A., Hurlebaus J., Wandrey C., Takors R.: 'Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics'; *Biomol Eng*; 19 (1); 5-15.; 2002
- Buchholz A., Takors R., Wandrey C.: 'Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques'; *Anal Biochem.*; 295 (2); 129-37.; 2001
- Bujnicki R.: 'Bioprozessentwicklung und in-situ Produktgewinnung von trans-Cyclohexadien-Derivaten'; Dissertation; Forschungszentrum Jülich; Jülich 2007

- Burton K.: 'Analysis of RNA turnover in bacteria using histidine as a radioactivity trap for (2-H) adenine nucleotides'; *J Mol Biol*; 102 (2); 333-48.; 1976
- Canelas A.B., ten Pierick A., Ras C., Seifar R.M., van Dam J.C., van Gulik W.M., Heijnen J.J.: 'Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics'; *Anal Chem*; 81 (17); 7379-89.; 2009
- Chandran S.S., Yi J., Draths K.M., Daeniken R.v., Weber W., Frost J.W.: 'Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid'; *Biotechnol Prog*; 19 (3); 808-14.; 2003
- Chassagnole C., Noisommit-Rizzi N., Schmid J.W., Mauch K., Reuss M.: 'Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*'; *Biotechnol Bioeng*; 79 (1); 53-73.; 2002
- Chmiel H.: 'Bioprozesstechnik'; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg 2005
- Christensen B., Nielsen J.: 'Metabolic network analysis. A powerful tool in metabolic engineering'; *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 66 209-31.; 2000
- Chulavatnatol M., Atkinson D.E.: 'Phosphoenolpyruvate synthetase from *Escherichia coli*. Effects of adenylate energy charge and modifier concentrations'; *J Biol Chem*; 248 (8); 2712-5.; 1973
- Clarke D.M., Bragg P.D.: 'Purification and properties of reconstitutively active nicotinamide nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli*'; *Eur J Biochem*; 149 (3); 517-23.; 1985
- Cooper R.A., Kornberg H.L.: 'Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase'; Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., editors; 631-649 Elsevier/ Academic Press Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York 1974
- Dauner M.: 'Intracellular Carbon Flux Analysis by ¹³C-Tracer Experiments'; Dissertation; ETH Zürich; 2000
- de Graaf A.A. Use of ¹³C labelling and NMR spectroscopy in metabolic flux analysis. NMR in biotechnology: Theory and applications. Norwich: Horizon Scientific Press. 2000.
- de Koning W., van Dam K.: 'A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH'; *Anal Biochem.*; 204 (1); 118-23.; 1992
- Dimitrova M.N., Peterkofsky A., Ginsburg A.: 'Opposing effects of phosphoenolpyruvate and pyruvate with Mg(2+) on the conformational stability and dimerization of phosphotransferase enzyme I from *Escherichia coli*'; *Protein Sci*; 12 (9); 2047-56.; 2003
- Drysch A., Takors R., de Graaf A.A., El Massaoudi M., Mack C., Sahm H.: 'Production process monitoring by serial mapping of microbial carbon flux distributions using a novel Sensor Reactor approach: II--(¹³C)-labeling-based metabolic flux analysis and L-lysine production.' *Metab Eng*; 5 (2); 96-107; 2003
- Edwards J.S., Ibarra R.U., Palsson B.O.: 'In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data'; *Nat Biotechnol*; 19 (2); 125-30.; 2001
- El Massaoudi M.: 'Entwicklung eines Sensor-Reaktor-Systems für metabolische Stoffflussanalysen in instationären Fermentationen'; Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; Bonn 2004
- El Massaoudi M., Spelthahn J., Drysch A., de Graaf A., Takors R.: 'Production process monitoring by serial mapping of microbial carbon flux distributions using a novel sensor reactor approach: I--Sensor reactor system'; *Metabolic Engineering*; 5 (2); 86-95; 2003
- Ely B., Pittard J.: 'Aromatic amino acid biosynthesis: regulation of shikimate kinase in *Escherichia coli* K-12'; *J Bacteriol*; 138 (3); 933-43.; 1979

- Emmerling M., Dauner M., Ponti A., Fiaux J., Hochuli M., Szyperski T., Wuthrich K., Bailey J.E., Sauer U.: 'Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*'; *J Bacteriol.*; 184 (1); 152-64.; 2002
- Escherich T.: 'The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant.' *Rev Infect Dis*; 11 (2); 352-6.; 1885
- Ferenci T.: 'Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP'; *FEMS Microbiol Rev*; 18 (4); 301-17.; 1996
- Fischer E., Sauer U.: 'Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS'; *Eur J Biochem.*; 270 (5); 880-91.; 2003
- Fischer E., Zamboni N., Sauer U.: 'High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived ¹³C constraints'; *Anal Biochem.*; 325 (2); 308-16.; 2004
- Flickinger M.C., Drew S.W.: 'Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation'; John Wiley & Sons.; 1999
- Frost J.W., Draths K.M.: 'Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds'; *Annu Rev Microbiol*; 49 557-79.; 1995
- Gerigk M., Bujnicki R., Ganpo-Nkwenkwa E., Bongaerts J., Sprenger G., Takors R.: 'Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains'; *Biotechnol Bioeng*; 80 (7); 746-54.; 2002
- Goevert D.: 'Funktionelle Erweiterung und Inbetriebnahme einer schnellen Probennahme-einheit für ¹³C-Markierungsexperimente unter instationären Prozessbedingungen (Batch und Fed-Batch)'; Diplomarbeit; FH Aachen; Jülich 2004
- Goldberg A.L., Dice J.F.: 'Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells'; *Annu Rev Biochem.*; 43 (0); 835-69.; 1974
- Gonzalez B., Francois J., Renaud M.: 'A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol'; *Yeast*; 13 (14); 1347-55.; 1997
- Gosset G., Yong-Xiao J., Berry A.: 'A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*'; *J Ind Microbiol*; 17 (1); 47-52.; 1996
- Grönke K., Luo B., Nöh K., Wiechert W., Oldiges M. Isotopisch instationäre ¹³C-Stoffflussanalysen als Beitrag für biothermodynamische Untersuchungen; 1st International Symposium on Biothermodynamics, Frankfurt 2006
- Hajjaj H., Blanc P.J., Goma G., Francois J.: 'Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi'; *FEMS Microbiology Letters*; 164 (1); 195-200; 1998
- Haslam E., Haworth R.D., Knowles P.F.: 'The Preparation and Identification of 5-Dehydroquinic and 5-Dehydroshikimic Acids'; *Methods in Enzymology* 6498-504; 1968
- Heijden R.T.v.d., Heijnen J.J., Hellinga C., Romein B., Luyben K.C.: 'Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates'; *Biotechnol Bioeng*; 43 (1); 3-10.; 1994
- Hein M.: 'Reaktionstechnische Charakterisierung von L-lysinauxotrophen *Corynebacterium glutamicum*-Stämmen zur Produktion von L-Isoleucin im Fed-Batch Verfahren'; Diplomarbeit; FH Oldenburg; Oldenburg 2005
- Heinzle E., Yuan Y., Kumar S., Wittmann C., Gehre M., Richnow H.H., Wehrung P., Adam P., Albrecht P.: 'Analysis of ¹³C labeling enrichment in microbial culture applying metabolic tracer experiments using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry'; *Anal Biochem*; 380 (2); 202-10. Epub 2008 Jun 17.; 2008
- Holden J.T., Hild O., Wong-Leung Y.L., Rouser G.: 'Reduced lipid content as the basis for defective amino acid accumulation capacity in pantothenate- and biotin-deficient *Lactobacillus plantarum*'; *Biochem Biophys Res Commun*; 40 (1); 123-8.; 1970

- Hollwedel D.: "Analytical quantification of intracellular metabolites in *Corynebacterium glutamicum*"; Diplomarbeit; Technische Universität Bergakademie Freiberg; Freiberg 2004
- Holms H.: 'Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*'; FEMS Microbiology Reviews; 19 (2); 85-116; 1996
- Jeffrey F.M., Rajagopal A., Malloy C.R., Sherry A.D.: '¹³C-NMR: a simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism'; Trends Biochem Sci; 16 (1); 5-10.; 1991
- Jensen N.B., Jokumsen K.V., Villadsen J.: 'Determination of the phosphorylated sugars of the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway in *Lactococcus lactis* using a fast sampling technique and solid phase extraction'; Biotechnol Bioeng.; 63 (3); 356-62.; 1999
- Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita K.F., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M.: 'From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG'; Nucleic Acids Res.; 34 (Database issue); D354-7.; 2006
- Kauffman K.J., Prakash P., Edwards J.S.: 'Advances in flux balance analysis'; Curr Opin Biotechnol; 14 (5); 491-6.; 2003
- Kay W.W.: 'Genetic control of the metabolism of propionate by *Escherichia coli* K12'; Biochim Biophys Acta; 264 (3); 508-21.; 1972
- Keeler J.: 'Understanding NMR Spectroscopy'; 476; John Wiley & Sons Ltd; Chichester 2005
- Kell D.B.: 'Metabolomics and systems biology: making sense of the soup'; Curr Opin Microbiol; 7 (3); 296-307.; 2004
- Keseler I.M., Collado-Vides J., Gama-Castro S., Ingraham J., Paley S., Paulsen I.T., Peralta-Gil M., Karp P.D.: 'EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*'; Nucleic Acids Res.; 33 (Database issue); D334-7.; 2005
- Klamt S., Stelling J.: 'Two approaches for metabolic pathway analysis?' Trends Biotechnol; 21 (2); 64-9.; 2003
- Klapa M.I., Stephanopoulos G. Metabolic flux analysis. In: Bellgardt K. S. a. K. H., editor. Bioreaction Engineering, Modeling and Control. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. p 106-122.2000.
- Knaggs A.R.: 'The biosynthesis of shikimate metabolites'; Nat Prod Rep; 20 (1); 119-36.; 2003
- Kummel A., Panke S., Heinemann M.: 'Putative regulatory sites unraveled by network-embedded thermodynamic analysis of metabolome data'; Mol Syst Biol; 2 2006a
- Kummel A., Panke S., Heinemann M.: 'Systematic assignment of thermodynamic constraints in metabolic network models'; BMC Bioinformatics; 7 512.; 2006b
- Leder I.: 'Interrelated effects of cold shock and osmotic pressure on the permeability of the *Escherichia coli* membrane to permease accumulated substrates'; J Bacteriol; 111 (1); 211-9.; 1972
- Li K., Mikola M.R., Draths K.M., Worden R.M., Frost J.W.: 'Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*'; Biotechnol Bioeng; 64 (1); 61-73.; 1999
- Lindner H.A., Nadeau G., Matte A., Michel G., Menard R., Cygler M.: 'Site-directed mutagenesis of the active site region in the quinate/shikimate 5-dehydrogenase YdiB of *Escherichia coli*'; J Biol Chem; 280 (8); 7162-9. Epub 2004 Dec 13.; 2005
- Liu J.Q., Dairi T., Itoh N., Kataoka M., Shimizu S., Yamada H.: 'Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*'; Eur J Biochem; 255 (1); 220-6.; 1998
- Lovett S.: 'Rapid changes in bacteria following introduction into hypertonic media'; Proc Soc Exp Biol Med; 120 (2); 565-9.; 1965

- Lowry O.H., Carter J., Ward J.B., Glaser L.: 'The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*'; *J Biol Chem.*; 246 (21); 6511-21.; 1971
- Luo B., Grönke K., Takors R., Wandrey C., Oldiges M.: 'Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry'; *J Chromatogr A*; 1147 (2); 153-64. Epub 2007 Feb 16.; 2007
- Magnus J.B.: 'Metabolic Engineering of the Valine Pathway in *Corynebacterium glutamicum* - Analysis and Modelling'; Dissertation; Universität Stuttgart; Stuttgart 2007
- Mahadevan R., Schilling C.H.: 'The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models'; *Metab Eng*; 5 (4); 264-76.; 2003
- Maharjan R.P., Ferenci T.: 'Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*'; *Anal Biochem*; 313 (1); 145-54.; 2003
- Maier K., Hofmann U., Bauer A., Niebel A., Vacun G., Reuss M., Mauch K.: 'Quantification of statin effects on hepatic cholesterol synthesis by transient (13)C-flux analysis'; *Metab Eng*; 11 (4-5); 292-309. Epub 2009 Jun 23.; 2009
- Malaisse W.J., Ladriere L., Zhang T.M., Verbruggen I., Willem R.: 'Enzyme-to-enzyme channelling of symmetric Krebs cycle intermediates in pancreatic islet cells'; *Diabetologia*; 39 (8); 990-2.; 1996
- Mandelstam J.: 'Turnover of protein in growing and non-growing populations of *Escherichia coli*'; *Biochem J.*; 69 (1); 110-9.; 1958
- Mashego M.R., Rumbold K., Mey M.D., Vandamme E., Soetaert W., Heijnen J.J.: 'Microbial metabolomics: past, present and future methodologies'; *Biotechnol Lett*; 29 (1); 1-16. Epub 2006 Nov 8.; 2007
- Möllney M., Wiechert W., Kownatzki D., de Graaf A.A.: 'Bidirectional reaction steps in metabolic networks. Part IV: Optimal experimental design of isotopomer labeling experiments'; *Biotechnol Bioeng*; 66 86-103; 1999
- Mosteller R.D., Goldstein R.V., Nishimoto K.R.: 'Metabolism of individual proteins in exponentially growing *Escherichia coli*'; *J Biol Chem.*; 255 (6); 2524-32.; 1980
- Nath K., Koch A.L.: 'Protein Degradation in *Escherichia coli*. I. MEASUREMENT OF RAPIDLY AND SLOWLY DECAYING COMPONENTS'; *J. Biol. Chem.*; 245 (11); 2889-2900; 1970
- Neidhardt F.C.E.i.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E.e.: '*Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology'; 13-16; American Society for Microbiology; 1996
- Nielsen J., Nikolajsen K., Villadsen J.: 'Structured modeling of a microbial system: I. A theoretical study of lactic acid fermentation'; *Biotechnol Bioeng*; 38 (1); 1-10.; 1991
- Nielsen J., Villadsen J.: '*Bioreaction Engineering Principles*'; 540; Kluwer Academic/Plenum Press; New York 2002
- Nöh K.: 'Isotopically Non-stationary 13C Labeling Experiments under Metabolic Steady State Conditions: Mathematical Modeling, Simulation, Statistical Evaluation and Experimental Design'; Dissertation; Universität Siegen; Siegen 2006
- Nöh K., Grönke K., Luo B., Takors R., Oldiges M., Wiechert W.: 'Metabolic flux analysis at ultra short time scale: isotopically non-stationary 13C labeling experiments'; *J Biotechnol*; 129 (2); 249-67. Epub 2006 Dec 1.; 2007
- Nöh K., Wahl A., Wiechert W.: 'Computational tools for isotopically instationary 13C labeling experiments under metabolic steady state conditions'; *Metabolic Engineering*; 8 (6); 554-577; 2006

- Nöh K., Wiechert W. Simulation of instationary ^{13}C -labeling experiments. In: Hohmann R., editor; 2003; Magdeburg. SCS European Publishing House. p 427-432.
- Nöh K., Wiechert W. Parallel Solution of Cascaded ODE Systems Applied to ^{13}C -Labeling Experiments. In: M. Bubak G. D. v. A., P.M.A. Soot, J.J. Dongarra, editor. Lecture Notes in Computer Science; 2004 2004; Kraków. Springer. p 594-597.
- Nöh K., Wiechert W.: 'Experimental design principles for isotopically instationary ^{13}C labeling experiments'; *Biotechnol Bioeng*; 94 (2); 234-51.; 2006
- Oldiges M.: 'Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli*'; Dissertation; Forschungszentrum Jülich; Jülich 2005
- Oldiges M., Lutz S., Pflug S., Schroer K., Stein N., Wiendahl C.: 'Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools'; *Appl Microbiol Biotechnol*; 76 (3); 495-511. Epub 2007 Jul 31.; 2007
- Oldiges M., Takors R.: 'Applying metabolic profiling techniques for stimulus-response experiments: chances and pitfalls'; *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 92 173-96.; 2005
- Oliver S.G.: 'From genomes to systems: the path with yeast'; *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 361 (1467); 477-82.; 2006
- Olsiewski P.J., Kaczorowski G.J., Walsh C.: 'Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B'; *J. Biol. Chem.*; 255 (10); 4487-4494; 1980
- Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J.: 'In vivo dynamics of galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: metabolic fluxes and metabolite levels'; *Biotechnol Bioeng*; 73 (5); 412-25.; 2001
- Pancenkov G.M.: 'Viskosität flüssiger Gemische (dt. Übersetzung)'; *Zurnal fiziceskoj chimii*; 49 (9); 1011 - 1020; 1946
- Patnaik R., Spitzer R.G., Liao J.C.: 'Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities'; *Biotechnol Bioeng*; 46 (4); 361-70.; 1995
- Peng L., Arauzo-Bravo M.J., Shimizu K.: 'Metabolic flux analysis for a ppc mutant *Escherichia coli* based on ^{13}C -labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements'; *FEMS Microbiol Lett*; 235 (1); 17-23; 2004
- Petersen S., de Graaf A.A., Eggeling L., Mollney M., Wiechert W., Sahl H.: 'In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*'; *J Biol Chem*; 275 (46); 35932-41.; 2000
- Pfeiffer T., Sanchez-Valdenebro I., Nuno J.C., Montero F., Schuster S.: 'METATOOL: for studying metabolic networks'; *Bioinformatics*; 15 (3); 251-7.; 1999
- Phue J.N., Noronha S.B., Hattacharyya R., Wolfe A.J., Shiloach J.: 'Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses'; *Biotechnol Bioeng*; 90 (7); 805-20.; 2005
- Pittard A.J.: 'Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids'; Neidhardt; F. C., Ingraham; J. L., Magasanik; B., Low; K. B., Schaechter; M., Umberger H. E., editors; Am. Soc. Microbiol press; Washington D.C. 1996
- Pramanik J., Keasling J.D.: 'Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: Incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements'; *Biotechnol Bioeng*; 56 (4); 398-421.; 1997
- Rabinowitz J.D., Kimball E.: 'Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*'; *Anal Chem*; 79 (16); 6167-73. Epub 2007 Jul 14.; 2007
- Ring K.: 'The effect of low temperatures of permeability in *Streptomyces hydrogenans*'; *Biochem Biophys Res Commun*; 19 (5); 576-81.; 1965

- Rizzi M., Theobald U., Querfurth E., Rohrhirsch T., Baltes M., Reuss M.: 'In vivo investigations of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*'; *Biotechnol Bioeng*; 49 (3); 316-27.; 1996
- Sauer U., Eikmanns B.J.: 'The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria.' *FEMS Microbiol Rev*; 29 (4); 765--794; 2005
- Schaefer U., Boos W., Takors R., Weuster-Botz D.: 'Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics'; *Anal Biochem.*; 270 (1); 88-96.; 1999
- Schaub J., Mauch K., Reuss M.: 'Metabolic flux analysis in *Escherichia coli* by integrating isotopic dynamic and isotopic stationary ¹³C labeling data'; *Biotechnol Bioeng*; 99 (5); 1170-85.; 2008
- Schaub J., Schiesling C., Reuss M., Dauner M.: 'Integrated sampling procedure for metabolome analysis'; *Biotechnol Prog*; 22 (5); 1434-42.; 2006
- Schilling C.H., Edwards J.S., Palsson B.O.: 'Toward metabolic phenomics: analysis of genomic data using flux balances'; *Biotechnol Prog*; 15 (3); 288-95.; 1999a
- Schilling C.H., Schuster S., Palsson B.O., Heinrich R.: 'Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era'; *Biotechnol Prog*; 15 (3); 296-303.; 1999b
- Schlegel H.-G.: 'Allgemeine Mikrobiologie'; Fuchs G., editor Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York 2007
- Schmidt K., Carlsen M., Nielsen J., Villadsen J.: 'Modelling Isotopomer Distribution in Biochemical Networks Using Isotopomer Mapping Matrices'; *Biotechnology and Bioengineering*; 55 (6); 831-840; 1997
- Schmidt K., Marx A., de Graaf A.A., Wiechert W., Sahm H., Nielsen J., Villadsen J.: '¹³C tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two approaches'; *Biotechnol Bioeng*; 58 (2-3); 254-7.; 1998
- Schomburg D., Schomburg I.: 'Handbook of Enzymes'; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York 2001
- Schomburg I., Chang A., Hofmann O., Ebeling C., Ehrentreich F., Schomburg D.: 'BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information'; *Trends Biochem Sci.*; 27 (1); 54-6.; 2002
- Schuegerl K.: 'Bioreaktionstechnik: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen'; Birkhäuser Verlag AG; Basel 1997
- Schuster S., Dandekar T., Fell D.A.: 'Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering'; *Trends Biotechnol*; 17 (2); 53-60.; 1999
- Schuster S., Hilgetag C.: 'What Information about the Conserved-Moiety Structure of Chemical Reaction Systems Can be Derived from Their Stoichiometry?' *The Journal of Physical Chemistry*; 99 (20); 8017-8023; 1994
- Schuster S., Hilgetag C., Woods J.H., Fell D.A.: 'Reaction routes in biochemical reaction systems: algebraic properties, validated calculation procedure and example from nucleotide metabolism'; *J Math Biol*; 45 (2); 153-81.; 2002
- Seelig G.F., Colman R.F.: 'Characterization of the physicochemical and catalytic properties of human heart NADP-dependent isocitrate dehydrogenase'; *Arch Biochem Biophys*; 188 (2); 394-409.; 1978
- Sherry A.D., Sumegi B., Miller B., Cottam G.L., Gavva S., Jones J.G., Malloy C.R.: 'Orientation-conserved transfer of symmetric Krebs cycle intermediates in mammalian tissue'; *Biochemistry*; 33 (20); 6268-75.; 1994
- Siddiquee K.A., Arauzo-Bravo M.J., Shimizu K.: 'Effect of a pyruvate kinase (pykF-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*'; *FEMS Microbiol Lett*; 235 (1); 25-33.; 2004

- Siuzdak G.: 'Mass Spectrometry for Biotechnology'; Academic Press; London, San Diego 1996
- Stephanopoulos G.: 'Metabolic engineering'; *Biotechnol Bioeng*; 58 (2-3); 119-20.; 1998
- Stephanopoulos G.: 'Metabolic fluxes and metabolic engineering'; *Metab Eng*; 1 (1); 1-11.; 1999
- Striegel B.: 'Entwurf und Implementierung von Regelungskonzepten für biotechnische Prozesse'; Dissertation; RWTH Aachen; Aachen 1993
- Szyperski T.: '¹³C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research'; *Quart Rev Biophys*; 31 41-106; 1998
- Theobald U., Mailinger W., Reuss M., Rizzi M.: 'In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique'; *Anal Biochem*; 214 (1); 31-7.; 1993
- Toya Y., Ishii N., Hirasawa T., Naba M., Hirai K., Sugawara K., Igarashi S., Shimizu K., Tomita M., Soga T.: 'Direct measurement of isotopomer of intracellular metabolites using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for efficient metabolic flux analysis'; *J Chromatogr A*; 1159 (1-2); 134-41. Epub 2007 Apr 13.; 2007
- Tribe D.E., Camakaris H., Pittard J.: 'Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: regulation of enzyme synthesis at different growth rates'; *J Bacteriol*; 127 (3); 1085-97.; 1976
- Umbarger H.E., Brown B.: 'Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for two L-threonine deaminases'; *J Bacteriol*; 73 (1); 105-12.; 1957
- van Winden W.: '¹³C Labeling Technique for Metabolic Network and Flux Analysis'; Dissertation; TU Delft; 2002
- van Winden W., Schipper D., Verheijen P., Heijnen J.: 'Innovations in generation and analysis of 2D [(13)C,(1)H] COSY NMR spectra for metabolic flux analysis purposes'; *Metab Eng*; 3 (4); 322-43.; 2001
- Varma A., Palsson B.O.: 'Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110'; *Appl Environ Microbiol*; 60 (10); 3724-31.; 1994
- Vemuri G.N., Aristidou A.A.: 'Metabolic engineering in the -omics era: elucidating and modulating regulatory networks'; *Microbiol Mol Biol Rev*; 69 (2); 197-216.; 2005
- Villas-Boas S.G., Hojer-Pedersen J., Akesson M., Smedsgaard J., Nielsen J.: 'Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods'; *Yeast*; 22 (14); 1155-69.; 2005
- Visser D., van Zuylen G.A., van Dam J.C., Oudshoorn A., Eman M.R., Ras C., van Gulik W.M., Frank J., van Dedem G.W., Heijnen J.J.: 'Rapid sampling for analysis of in vivo kinetics using the BioScope: a system for continuous-pulse experiments'; *Biotechnol Bioeng*; 79 (6); 674-81.; 2002
- Wahl A.: 'Methoden zu integrierter Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen'; Dissertation; Universität Siegen; Jülich 2007
- Wahl A., Wiechert W., Takors R., El Massaoudi M., Schipper D.: 'Serial ¹³C-based flux analysis of an L-phenylalanine-producing *E. coli* strain using the sensor reactor.' *Biotechnol Prog*; 20 (3); 706-14; 2004
- Wellerdiek M., Winterhoff D., Reule W., Brandner J., Oldiges M.: 'Metabolic quenching of *Corynebacterium glutamicum*: efficiency of methods and impact of cold shock'; *Bio-process and Biosystems Engineering*; 32 (5); 581-592; 2009
- Weuster-Botz D.: 'Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics'; *Anal Biochem*; 246 (2); 225-33.; 1997
- Wiechert W.: 'Metabolische Kohlenstoff-Markierungssysteme'; Habilitationsschrift; Forschungszentrum Jülich GmbH; Jülich 1996

- Wiechert W.: '¹³C metabolic flux analysis'; *Metabolic Engineering*; 3 195-206; 2001
- Wiechert W., de Graaf A.A.: 'In vivo stationary flux analysis by ¹³C labeling experiments'; *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 54 109-54.; 1996
- Wiechert W., de Graaf A.A.: 'Bidirectional reaction steps in metabolic networks. Part I: Modelling and simulation of carbon isotope labelling experiments'; *Biotechnol Bioeng*; 55 101-117; 1997
- Wiechert W., Möllney M., Petersen S., de Graaf A.A.: 'A Universal Framework for ¹³C Metabolic Flux Analysis'; *Metab Eng*; 3 (3); 265-283; 2001
- Wiechert W., Nöh K.: 'From stationary to instationary metabolic flux analysis'; *Adv Biochem Eng Biotechnol.*; 92 145-72.; 2005
- Wiechert W., Wurzel M.: 'Metabolic Isotopomer Labeling Systems. Part I: Global Dynamic Behavior'; *Math Biosciences*; 169 173-205; 2001
- Williams K.P., Leadlay P.F., Lowe P.N.: 'Inhibition of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Trichomonas vaginalis* by pyruvate and its analogues. Comparison with the pyruvate decarboxylase component of the pyruvate dehydrogenase complex'; *Biochem J*; 268 (1); 69-75.; 1990
- Williamson J.R.: 'Glycolytic control mechanisms. I. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated perfused rat heart'; *J Biol Chem*; 240 2308-21.; 1965
- Wittmann C., Hans M., Heinzle E.: 'In vivo analysis of intracellular amino acid labelings by GC/MS'; *Anal Biochem.*; 307 (2); 379-382; 2002
- Wittmann C., Kromer J.O., Kiefer P., Binz T., Heinzle E.: 'Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria'; *Anal Biochem.*; 327 (1); 135-9.; 2004
- Wood H.G., Utter M.F.: 'The role of CO₂ fixation in metabolism'; *Essays Biochem*; 1 1-27.; 1965
- Yang C., Hua Q., Baba T., Mori H., Shimizu K.: 'Analysis of *Escherichia coli* anaerobic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout'; *Biotechnol Bioeng*; 84 (2); 129-44; 2003
- Yi J., Li K., Draths K.M., Frost J.W.: 'Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in *E. coli*'; *Biotechnol Prog*; 18 (6); 1141-8.; 2002
- Zeppenfeld T., Larisch C., Lengeler J.W., Jahreis K.: 'Glucose transporter mutants of *Escherichia coli* K-12 with changes in substrate recognition of IICB(Glc) and induction behavior of the ptsG gene'; *J Bacteriol*; 182 (16); 4443-52.; 2000
- Zhao J., Shimizu K.: 'Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method'; *J Biotechnol.*; 101 (2); 101-17.; 2003
- Zhao Z., Kuijvenhoven K., Ras C., van Gulik W.M., Heijnen J.J., Verheijen P.J., van Winden W.A.: 'Isotopic non-stationary ¹³C gluconate tracer method for accurate determination of the pentose phosphate pathway split-ratio in *Penicillium chrysogenum*'; *Metab Eng*; 10 (3-4); 178-86. Epub 2008 May 4.; 2008
- Zollner H.: 'Handbook of Enzyme Inhibitors'; Willey-VCH; Weinheim, Basel, Cambridge, New York 1999

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich. In dieser Zeit habe ich von vielen Seiten fachliche Unterstützung und moralischen Rückhalt erfahren. Dem ehemaligen Leiter des Instituts Prof. Wandrey und meinem Doktorvater Prof. Wiechert, den mich betreuenden Gruppenleitern Prof. Takors und Dr. Oldiges, den Kollegen in den Laboren und Werkstätten, den mich begleitenden Doktorandenkollegen, meinen Freunden und meiner Familie möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank ausdrücken.

*„Es sind die Begegnungen mit Menschen,
die das Leben lebenswert machen.*

Guy de Maupassant

Anhang

A. MATERIALIEN UND METHODEN

A.1 Reaktoren und Geräte zur Kultivierung

Tabelle A-1: Ausstattung des Sensor-Reaktors

Gerätebezeichnung	Typ /Eigenschaften	Firma / Land
Abgasanalytik	Binos 100 2M	Fischer- Rosemount / USA
Begasungsring	(12 Bohrungen, \varnothing 1,0 mm)	Infors AG / CH
Dosiergerät	Dosimat 665	Metrohm AG
Dosierpumpe	U101	Watson- Marlow / USA
Drucksensor	Typ PR-24	Infors AG / CH
Edelstahlbehälter	Sonderanfertigung (V = 2 L)	Infors AG / CH
Steuereinheit	Labfors	Infors AG / CH
Magnetventile	Typ 0330 2/2 und 3/2-Wege	Bürkert / D
Pilotventile	Typ 6012-C-1	Bürkert / D
Membranventile	Typ 2031A	Bürkert / D
pH- Elektroden	Typ 405 DPAS-SC	Mettler Toledo / D
pO ₂ - Elektroden	PN52200121	Mettler Toledo / D
Proportionalventil	Typ 2822	Bürkert / D
Prozesskontrollsoftware	LabVIEW™ Automation Studio	National Instruments / USA B&R Automation / D
Scheibenrührer	Typ Rushton \varnothing	Infors AG / CH
Schnellverschlusskupplung	Typ 6-DB	Gather Industries / D
Waage 1	Sartorius Excellence	Sartorius / D
Waage 2	Sartorius Excellence	Sartorius / D
Zuluftdosierung	5851 E	Brooks Instruments B.V. / GB

Tabelle A-2: Ausstattung des 42 Liter-Reaktors

Gerätebezeichnung	Typ /Eigenschaften	Firma / Land
Bioreaktor	42 L	Bioengineering / CH
Abgasanalytik	Binos 100 2M	Fischer- Rosemount / USA
Dosierstrecke	YFC 02Z	Sartorius / D
Waagen	Sartorius Excellence	Sartorius / D
Dosierpumpe	U101 und U501	Watson- Marlow / USA
pH- Elektroden	F-615-B130-DH	Broadley James / USA
pO ₂ - Elektroden	12 mm OxyProbe	Broadley James / USA
Prozesssoftware	LabVIEW™	National Instruments / USA

Tabelle A-3: Verwendete Hardwarekomponenten der Firma *Bernecker + Rainer Industrie-Elektronik GmbH* (B&R) für die neu entwickelte Steuerung (SPS)

Bezeichnung	Typ	^^Eigenschaften
Zentraleinheit (SPS) der Serie 2005	3IF260.60-1	850 kB SDRAM, 1,5 MB FlashPROM Einschubsteckplatz für Schnittstellenmodul Echtzeituhr, serielle Schnittstelle (RS232)
Touchpanel PP120	4PP120.0571-01	Display 5,7" 320x240, 8 Graustufen 64 MB SDRAM (2 MB shared Memory Graphic) 2 MB Flash Speicher (erweiterbar) 1 Ethernet (10/100 Mbit/s), 1 RS232, 2 USB
Netzteilmodul	3PS465.9	24 VDC-Ausgang
Analogmodul	3AI350.6	8 Eingänge ± 10 V
Analogmodul	3AM050.6	4 Eingänge 0-10 V, 4 Ausgänge ± 10 V
Analogmodul	3AM374.6	4 Eingänge + 4 Ausgänge 0-10 V oder 0-20 mA
Digitalmodul	3DM486.6	16 Eingänge, 16 Ausgänge 24 VDC
Adaptermodul	3IF060.6	Einschubsteckplatz für ein Schnittstellenmodul
Schnittstellenmodul	3IF613.9	3 RS232 Schnittstellen 115,2 kBaud
Schnittstellenmodul	3IF672.9	2 RS232, 2 CAN Schnittstellen
ACOPOS	8V.1090.00	Servomotorverstärker, CAN-Schnittstelle

Tabelle A-4: Regelgrößen und verwendete Geräte mit den Schnittstellen zwischen Master und der Steuerung (SPS) des Slave-Reaktors

	Bezeichnung Regelgröße	Komponente/ Gerätetyp	Analog Ein(E)/Aus(A)	Digital I/O	Sonst. Schnitts.
Master	pH-Wert		0-10 V (E)		
	pO ₂ -Wert	Prozess kontrollsystem (Produktionsreaktor)	0-10 V (E)		alternativ
	Druck		0-10 V (E)		Daten über
	Temperatur		0-10 V (E)		FTP-Server
	Feed 1	Sartorius Dosier- regler YFC 02Z	0-10 V (E)		(Ethernet)
	Feed 2	Sartorius Dosier- regler YFC 02Z	0-10 V (E)		
Slave	Inokuliertventile	Bürkert Typ 2031		24VDC (A)	
	Probenahmeventil	Bürkert 6012P		24VDC (A)	
	Pulsventil	Bürkert EPDM 0130		24VDC (A)	
	pH-Pumpe	Wat.-Marl. 101U		24VDC (A)	
	Heizmantel			24VDC (A)	
	Wasserkühlung (Ventil)	Bürkert EPDM 0130		24VDC (A)	
	Sicherheitsschalter			24VDC (E)	
	pH-Wert	Endress+Hauser Messverstärker	0-20 mA (E)		
	pO ₂ -Wert	Endress+Hauser Messverstärker	0-20 mA (E)		
	Drucktransmitter	Keller PR-25HT8931A	0-10 VDC (E)		
	Proportionalventil (Druckregelung)	Bürkert 1094	0-20 mA (A)		
	Temperatur		PT100		
	Rührer (Drehzahl)	Dunkerm. BG40 mit BGE 3007	0-10 V (E) 0-10 V (A)		
	Flow 1/2/3 (Luft/O ₂ /Mix)	Brooks Mass Flow Controller 5850E	0-5 V (E) 0-5 V (A)		
	Abgasanalytik (O ₂ /CO ₂)	Rosemount BINOS 100/2M	0-20 mA (E)		
	Waage 1/2	Kern/Sartorius			RS232
	Feedpumpe 1/2	Wat.-Marl. 101U			RS232
	Motor Probenahme	ACOPOS			CAN

A.2 Kultivierungsmedien

Tabelle A-5: Basal Medium

Komponente	Konzentration [g/l]	Bemerkung
NaCl	2,5	Glukose getrennt autoklavieren und steril hinzufügen.
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,25	
Peptone	10	
Hefeextrakt	10	
Glukose*1 H ₂ O	5	

Tabelle A-6: Vorkulturmedium I

Komponente	Konzentration [g/l]	Bemerkung
<i>Siehe Kultivierungsmedium I</i>		

Tabelle A-7: Kultivierungsmedium I

Bestandteil	Komponente	Konzentration [g/l]	Bemerkung
A	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	
	KH ₂ PO ₄	3	
	K ₂ HPO ₄	3	
	MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,3	
	NaCl	1	
B	Glukose*1 H ₂ O	6	über Glukosefeed zugeben
C	FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,1125	
	Thiamin	0,075	über Sterilfilter (0,2 µm) zugeben
	Spurenelemente I	1 ml/l	
	CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,015	

Tabelle A-8: Vorkulturmedium II

Bestandteil	Komponente	Konzentration [g/l]	Bemerkung
A	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	
	KH ₂ PO ₄	3	
	K ₂ HPO ₄	12	
	MgSO ₄ *7 H ₂ O	0,3	
	CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,015	
	NaCl	0,1	
	Spurenelemente II	1,5 ml/l	
	Tyrosine	0,08	
	L-Phenylalanine	0,08	
B	FeSO ₄ *7 H ₂ O in NaCitrat*2 H ₂ O Lsg.	0,1125 1,5	Bestandteile B und C getrennt auto- klavieren und steril hinzufügen
	C	Glukose*1 H ₂ O	
D	Thiamin (Vit. B1)	0,075	über Sterilfilter (0,2 µm) zugeben
	Ampicillin	0,1	

Tabelle A-9: Kultivierungsmedium II

Bestandteil	Komponente	Konzentration [g/l]	Bemerkung
A	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	
	KH ₂ PO ₄	3,0	
	MgSO ₄ *7 H ₂ O	3,0	
	CaCl ₂ *2 H ₂ O	0,015	
	NaCl	1,0	
	Spurenelemente	2 ml/l	
	L-Tyrosine	0,3	
	L-Phenylalanine	0,5	
B	FeSO ₄ *7 H ₂ O in NaCitrat*2 H ₂ O Lsg.	0,1125 1,5	getrennt autoklavieren und steril hinzufügen
	C	Glukose*1 H ₂ O	
D	Thiamin (Vit. B1)	0,075	über Sterilfilter (0,2 µm) zugeben
	Ampicillin	0,1	

Tabelle A-10: Spurenelemente I

Komponente	Konzentration [g/l]	Bemerkung
Al ₂ Cl ₃ *6 H ₂ O	0,75	In 50 ml HCl (32%) und 100 ml H ₂ O bidest. lösen und auf einen Liter auffüllen
CoCl ₂ *6 H ₂ O	0,6	
CuSO ₄ *5 H ₂ O	2,5	
H ₃ BO ₃	0,5	
MnSO ₄ *1 H ₂ O	17,1	
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	3	
NiCl ₂ *6 H ₂ O	1,7	
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	15	

Tabelle A-11: Spurenelemente II

Komponente	Konzentration [g/l]	Bemerkung
Al ₂ (SO ₄) ₃ *18 H ₂ O	2	Zum Lösen der Salze pH-Wert mit HCl auf 1-2 einstellen und Lösung leicht erhitzen
CoSO ₄ *7 H ₂ O	0,75	
CuSO ₄ *5 H ₂ O	2,5	
H ₃ BO ₃	0,5	
MnSO ₄ *1 H ₂ O	24	
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	3	
NiSO ₄ *6 H ₂ O	2,5	
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	15	

Tabelle A-12: Glukose-Feed

Komponente	Konzentration [g/L]	Bemerkung
Glukose*1 H ₂ O	770	löst sich erst beim Autoklavieren

Tabelle A-13: Aminosäure-Feed

Komponente	Konzentration [g/L]	Bemerkung
L-Tyrosine	12,5	Aminosäuren in 0,5 l NH ₃ (25%) und 0,5 l H ₂ O bidest
L-Phenylalanine	11,4	

A.3 Analyse der Glukosekonzentration

Tabelle A-14: Verwendete Geräte für die enzymatische Glukosebestimmung

Bezeichnung	Typ /Eigenschaft	Hersteller/Vertrieb
Glukosemessung	Accutrend Sensor®	Roche Diagnostics
Photometer	UV 160	Shimadzu
Zentrifuge	Diverse	Beckmann; Haereus
Schüttelkolbeninkubator	3033	GLF
Mikrotiterplatten	96 Wells	Beckman Instruments
Mikrotiterplattenphotometer	Thermomax	Molecular Devices

Tabelle A-15: Reagenzien für die enzymatische Glukosebestimmung

Reagenzien / Geräte	Reagenzien / Typ	Parameter
Tris-Maleat-Puffer (50 mM)	Tris-hydroxymethyl-aminomethan Maleinsäure pH-Wert mit NaOH auf 6,8 einstellen	12,1 g/l 11,6 g/l
MgCl ₂ -Lösung (100 mM)	MgCl ₂ * 6H ₂ O Tris-Maleat-Puffer	1,0 g/l 50 mL
NAD / ATP-Mix	NAD ATP MgCl ₂ -Lösung Tris-Maleat-Puffer	95,4 mg 73,5 mg 5 ml 120 ml
G6P-Dehydrogenase	1000 U/ml	1:40 in H ₂ O
Hexokinase	3000 U/ml	1:40 in H ₂ O
Glucose-Standards	0,05; 0,1; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35;0,4; 0,5	g/l

Für diese Glukosemessungen werden die einzelnen Reagenzien wie folgt zugegeben:

	<u>Standards</u>	<u>Proben</u>
• NAD/ATP-Mix	220 µl	220 µl
• Glukosestandard	40 µl	-
• Probe	-	40 µl
• G6P-Dehydrogenaselösung (25 U/ml)	20 µl	20 µl
• Hexokinaselösung (75 U/ml)	20 µl	20 µl

A.4 HPLC-Analytik der extrazellulären Konzentration

Tabelle A-16: HPLC-Methodenparameter zur Analyse extrazellulärer organischer Säuren

Bezeichnung	Typ /Eigenschaft
HPLC-Säule	Aminex HPX-87H, Bio-Rad, 300x7,8 mm
Temperatur	40°C
Flussrate	0,5 ml/min
Injektionsvolumen	100 µl
Elution	0,1 M H ₂ SO ₄
Detektion	215 nm

Tabelle A-17: HPLC Methodenparameter zur Analyse extrazellulärer Aminosäuren

Bezeichnung	Typ /Eigenschaft
HPLC-Säule	LiChrospher 100 RP 18-5EC, 125x4.0, Merck
Temperatur	40°C
Flussrate	0,9 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Detektion	Fluoreszenz 450 nm (Anregung bei 330 nm)
Eluent A	10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,5 % Tetrahydrofuran
Eluent B	50 % Eluent A ohne THF+ 35 % Methanol + 15 % Acetonitril
Gradient	0 min 90 % B; 7 min 90 % B; 8,5 min 100 % B; 13 min 100 % B, 14 min 75 % B

A.5 LC-MS/MS-Analytik der intrazellulären Metaboliten

Das verwendete System bestand aus einem Agilent 1100 (Agilent Technologies) HPLC-System und einem API 4000 Q TRAP® Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex) mit einem Triple Quadrupol Massenfiter und einer Elektronenspray-Quelle (API-ES) als Interface. Die Injektion der Probe erfolgte mit einem programmierbaren Autosampler. Die Steuerung des MS-Systems, die Datenaufzeichnung und die Auswertung der Daten erfolgt mit der Software Analyst 1.4 (Applied Biosystems/MDS Sciex). Detektiert wurden jeweils die intensivsten Fragment-Signale. In den folgenden Tabellen sind die Parameter der verwendeten Methode wiedergegeben.

Tabelle A-18: HPLC-Methodenparameter der Metabolite des Zentralstoffwechsels

Bezeichnung	Typ /Eigenschaft
HPLC-Säule	Phenomenex Synergi Fusion-RP 150x2,1 mm, 4 µm 80 Å
Temperatur	40°C
Flussrate	200 µl/min
Injektionsvolumen	10 µl
Eluent A	10 mM Tributylamine mit 15 mM Essigsäure (pH 5)
Eluent B	Methanol (LC-MS-Qualität)
Gradient	15 min 0 % B; 20 min 20 % B; 55 min 20 % B; 60 min 35 % B; 65 min 35 % B; 70 min 60% B, 75 min 75 % B, 75,1 min 90 % B; 80 min 90 % B

Tabelle A-19: Methodenparameter der MS für die Metabolite des Zentralstoffwechsels

Bezeichnung	Typ /Eigenschaft
Flussrate	200 µl/min
Ionenquelle	API-ES
Hilfsgas (auxiliary gas)	Luft (60 psi)
Zerstäubergas (nebulizer gas)	Luft (60 psi)
Ionspray Spannung	4,5 kV
Kapillartemperatur	550 °C
MS Scan Modus	SRM (Selective Reaction Monitoring)
Polarität	negativ (-)
Gegenstrom (curtain gas)	Stickstoff (30 psi)
Fragmentierung (collision gas)	Stickstoff (5 psi)

Tabelle A-20: Detektierte Molekül- und Fragment-Ionen der mittels LC-MS/MS analysierten intrazellulären Metabolite des Zentralstoffwechsels

Metabolit	Molekül-Ion (m/z)	Fragment-Ion (m/z)
2PG/3PG	185,05	78,9
6PG	275,13	97,0
Acetyl-CoA	808,57	78,8
cGMP	344,2	149,9
CIT	191,12	87,0
E4P	199,08	96,8
F6P	259,13	97,0
FBP	339,11	96,8
FUM	115,06	71,0
G6P	259,13	97,0
GAP/DHAP	169,05	96,6
Iso-CIT	191,12	73,0
MAL	133,08	114,8
OAA	131,06	86,9
PEP	167,03	78,9
PYR	87,05	43,2
Rib5P	229,1	96,8
SUCC	117,08	73,0

A.6 Berechnung der intrazellulären Konzentrationen

Zur Berechnung der intrazellulären Konzentrationen musste neben der Verdünnung durch die Extraktion auch das nach dem Dekantieren des Überstands zwischen den Zellen verbleibende Volumen (interzelluläres Volumen) beachtet werden. Das interzelluläre Volumen für *E. coli* bei Wachstum auf Glukose wurde in der Arbeit von (Buchholz 2002) bestimmt. Im Unterschied dazu ist das intrazelluläre Volumen das von der Zellmembran umgebene Volumen aller Zellen (Volumen des Zytosols).

$$\text{Verdünnung} = \frac{V_I + V_E + V_N + V_X}{V_I} \quad 23.1$$

$$V_I = c_{BTM} \cdot V_S \cdot K_E \quad 23.2$$

V_I	intrazelluläres Volumen
V_E	Volumen KOH (2000 μ l)
V_N	Volumen Neutralisation (30 μ l)
V_X	interzelluläres Volumen (326 μ l)
c_{BTM}	Konzentration Biotrockenmasse [g/l]
V_S	Probenvolumen [μ l]
K_E	spezifisches Zellvolumen (2,78 μ l/mg)

Es ist zu beachten, dass das Zellvolumen stark von den Kultivierungsbedingungen (Wachstumsphase, Zusammensetzung und Osmolarität des Mediums, Rührergeometrie und -drehzahl, Begasung, etc.) abhängt. Auch innerhalb einer Kultur gibt es eine breite Zellvolumenverteilung, so dass der angegebene Werte nur das Volumen einer Durchschnittszelle wiedergibt.

A.7 Stöchiometrisches Netzwerkmodell für die Flux-Balance-Analyse

Tabelle A-21: Stöchiometrisches Modell für die Ermittlung der optimalen Stoffflusslage zur Produktion von 3,4-CHD mit dem Stamm *E. coli* F82pC22. Reversible Reaktionen sind in der Tabelle durch Doppelpfeile dargestellt.

Name	Reaktion		
pts	GlcEX + PEP + ATP	→	GlcIN + PYR + ADP
grow	GlcIN + a2 F6P + a3 Rib5P + a4 GAP + a5 PG + a6 PEP + a7 Pyr + a8 AcCoA + a9 aKG + a10 OAA + a11 Chor + a12 ATP + a13 NAD	→	(1-a1) G6P + a12 ADP + a13 NADH + a14 CO2
emp1	G6P	↔	F6P
emp2	F6P + ATP	→	FBP + ADP
emp3	FBP	↔	GAP + DHAP
tri	DHAP	↔	GAP
emp4	GAP + NAD	↔	BPG + NADH
emp5	BPG + ADP	↔	PG + ATP
emp6	PG	↔	PEP
emp7	PEP + ADP	→	PYR + ATP
pps	PYR + ATP	→	PEP + AMP
ppp0	G6P + NADP	→	PG6 + NADPH
edp	PG6	→	GAP + PYR
ppp1	PG6 + NADP	→	RuI5P + NADPH + CO2
ppp2	RuI5P	↔	Xyl5P
ppp3	RuI5P	↔	Rib5P
ppp4	Xyl5P + E4P	↔	GAP + F6P
ppp5	Xyl5P + Rib5P	↔	S7P + GAP
ppp6	GAP + S7P	↔	E4P + F6P
pdh	PYR + NAD	→	AcCoA + NADH + CO2
tca1	AcCoA + OAA + NADP	→	aKG + CO2 + NADPH
tca2	aKG + 2 NAD + ADP	→	OAA + CO2 + 2 NADH + ATP
pcka	OAA + ATP	→	PEP + CO2 + ADP
ppc	PEP + CO2	→	OAA
mae	OAA + NAD	→	PYR + NADH + CO2
chd1	E4P + 2 PEP + NADPH + ATP	→	Chor + NADP + ADP
chd2	Chor + NAD	→	CHD + PYR + NADH
chdEX	CHD	→	CHDEX
e1	ATP + AMP	→	2 ADP
thy	NADH + NADP	→	NADPH + NAD
resp	NADH + 1,8 ADP	→	NAD + 1,8 ATP
ctr	CO2	→	CO2EX

In der folgenden Tabelle sind die Faktoren a_1 bis a_{14} für alle drei Experimente angegeben.

Tabelle A-22: Zum Wachstum benötigte Metabolite / Co-Faktoren bezogen auf 1 mol Glukose

Metabolit	Faktor	Phase 1	Phase 2	Phase 3
		($\mu = 0,310 \text{ h}^{-1}$)	($\mu = 0,047 \text{ h}^{-1}$)	($\mu = 0,031 \text{ h}^{-1}$)
		[mol/mol]	[mol/mol]	[mol/mol]
G6P	(1-a1)	0,988	0,995	0,998
F6P	a2	0,004	0,001	0,001
Rib5P	a3	0,051	0,021	0,009
GAP	a4	0,007	0,003	0,001
PG	a5	0,092	0,038	0,0155
PEP	a6	0,003	0,001	0,0005
PYR	a7	0,170	0,070	0,028
AcCoA	a8	0,139	0,058	0,023
aKG	a9	0,074	0,031	0,012
OAA	a10	0,093	0,039	0,016
Chor	a11	0,003	0,001	0,0005
ATP	a12	0,002	0,001	0,0004
NAD	a13	0,207	0,086	0,035
CO2	a14	-0,120	-0,050	-0,020

A.8 Netzwerkmodell für die isotopisch instationäre ¹³C-Stoffflussanalysen
Tabelle A-23: Netzwerk- und Isotopomerenmodell für die isotopisch instationäre Stoffflussanalyse mit dem *E. coli* K12 Wildtyp.

Flussbezeichnung	Reaktion	C-Atom Umlagerung
upt	Glc → G6P	#ABCDEF → #ABCDEF
emp1	G6P → F6P	#ABCDEF → #ABCDEF
emp2	F6P → FBP	#ABCDEF → #ABCDEF
emp3	FBP → DHAP + GAP	#ABCDEF → #ABC + #DEF
emp4	DHAP → GAP	#ABC → #CBA
emp5	GAP → PGA	#ABC → #ABC
emp6	XPG → PEP	#ABC → #ABC
emp7	PEP → Pyr	#ABC → #ABC
ppp1	G6P → PG6	#ABCDEF → #ABCDEF
ppp2	PG6 → P5P + CO ₂	#ABCDEF → #BCDEF + #A
ppp3	P5P + E4P → GAP + F6P	#ABCDE + #abcd → #CDE + #ABabcd
ppp4	P5P + P5P → S7P + GAP	#ABCDE + #abcde → #Ababcde + #CDE
ppp5	GAP + S7P → E4P + F6P	#ABC + #abcdefg → #defg + #abcABC
tcc1	Pyr → AcCoA + CO ₂	#ABC → #BC + #A
tcc2	OAA + AcCoA → Cit Cit	#ABCD + #ab → #DCBAba
tcc3	Cit Cit → AKG + CO ₂	#ABCDEF → #ABCEF + #D
tcc4	AKG → SuccFUM + CO ₂	#ABCDEF → BCDE + #A
tcc5a	SuccFUM → MAL	#ABCD → #ABCD
tcc5b	SuccFUM → MAL	#ABCD → #DCBA
tcc6	MAL → OAA	#ABCD → #ABCD
gs1	Cit Cit → GlyOx + SuccFUM	#ABCDEF → #AB + #DCEF
gs2	GlyOx + AcCoA → MAL	#AB + #ab → ABba
ppc	PEP + CO ₂ → OAA	#ABC + #a → #ABCa
mae	MAL → Pyr + CO ₂	#ABCD → #ABC + #D
Modellerweiterungen:		
xch_1	P5P → P5Pxch	#ABCDE → #ABCDE
xch_2	AKG → Glut	#ABCDE → #ABCDE
xch_3	OAA → Asp	#ABCD → #ABCD

B. ERGEBNISSE

B.1 Markierungsexperiment mit dem *E. coli* K12 Wildtyp

Tabelle B-1: Experimentell ermittelte spezifische Raten des *E. coli* K12 Wildtyps (Glukoseaufnahme, Wachstum, Acetat- und CO₂-Bildung) zur Berechnung der Standardabweichung.

Nummer	Glukose σ_{Glc} [$\mu\text{mol}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h})$]	Biomasse μ [h^{-1}]	Acetat π_{Ac} [$\mu\text{mol}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h})$]	CO ₂ π_{CO_2} [$\mu\text{mol}/(\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{h})$]
1	-5,84	0,539	0,715	8,55
2	-5,97	0,524	0,771	9,35
3	-5,78	0,504	0,711	8,41
Mittelwert	-5,86	0,522	0,732	8,77
StdAbw.	0,10	0,018	0,034	0,49

Tabelle B-2: Mittels LC-MS/MS gemessene relative Peakfläche (Massenisotopomere) der Metabolite des Zentralstoffwechsels (0 = m/z+0; 1 = m/z+1; etc.) mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stabw.) und der Abweichung der Anpassung und dem Beitrag zur Fehlerquadratsumme (FQS)

Messung			Anpassung		
Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (\pm Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS	
Markierungsmessungen	AKG	m/z+0	0,003 (\pm 0,001)	--	--
		m/z+1	0,289 (\pm 0,056)	--	--
		m/z+2	0,260 (\pm 0,022)	0,021	0,477
		m/z+3	0,239 (\pm 0,044)	-0,015	0,059
		m/z+4	0,130 (\pm 0,022)	-0,014	0,206
		m/z+5	0,080 (\pm 0,017)	-0,037	2,443
	DHAP	m/z+0	0,455 (\pm 0,235)	-0,219	0,869
		m/z+1	0,205 (\pm 0,124)	0,076	0,376
		m/z+2	0,035 (\pm 0,020)	0,000	0,000
		m/z+3	0,305 (\pm 0,161)	-0,045	0,078
	F6P	m/z+0	0,289 (\pm 0,035)	-0,018	0,264
		m/z+1	0,372 (\pm 0,053)	-0,022	0,177
		m/z+2	0,001 (\pm 0,016)	--	--
		m/z+3	0,026 (\pm 0,010)	0,004	0,140
		m/z+4	0,013 (\pm 0,012)	0,009	0,544
		m/z+5	0,030 (\pm 0,009)	0,001	0,005
	FBP	m/z+6	0,271 (\pm 0,055)	0,040	0,531
		m/z+0	0,242 (\pm 0,052)	0,006	0,014
		m/z+1	0,334 (\pm 0,074)	-0,011	0,021
		m/z+2	0,035 (\pm 0,008)	-0,002	0,061
		m/z+3	0,050 (\pm 0,011)	0,009	0,670
		m/z+4	0,042 (\pm 0,005)	-0,002	0,258
		m/z+5	0,029 (\pm 0,006)	0,000	0,000
	m/z+6	0,268 (\pm 0,061)	0,010	0,026	

Fortsetzung Tabelle B-2:

		Messung		Anpassung		
		Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (\pm Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS
Markierungsmessungen	FUM	m/z+0	0,200 (\pm 0,126)	-0,017	0,019	
		m/z+1	0,258 (\pm 0,037)	-0,031	0,697	
		m/z+2	0,318 (\pm 0,091)	-0,034	0,144	
		m/z+3	0,130 (\pm 0,066)	0,034	0,266	
		m/z+4	0,094 (\pm 0,007)	0,002	0,132	
	G6P	m/z+0	0,271 (\pm 0,052)	-0,005	0,009	
		m/z+1	0,365 (\pm 0,069)	-0,023	0,111	
		m/z+2	0,036 (\pm 0,009)	-0,011	1,542	
		m/z+3	0,028 (\pm 0,002)	0,000	0,078	
		m/z+4	0,021 (\pm 0,003)	-0,002	0,239	
		m/z+5	0,025 (\pm 0,005)	0,004	0,700	
		m/z+6	0,255 (\pm 0,046)	0,052	1,251	
	PEP	m/z+0	0,485 (\pm 0,099)	-0,028	0,078	
		m/z+1	0,135 (\pm 0,026)	0,027	1,128	
		m/z+2	0,030 (\pm 0,006)	-0,005	0,807	
		m/z+3	0,350 (\pm 0,068)	-0,022	0,108	
	PYR	m/z+0	0,452 (\pm 0,066)	0,007	0,012	
		m/z+1	0,171 (\pm 0,020)	-0,009	0,184	
		m/z+2	0,023 (\pm 0,003)	0,002	0,792	
		m/z+3	0,354 (\pm 0,040)	-0,025	0,409	
	Rib5P	m/z+0	0,353 (\pm 0,076)	-0,016	0,044	
		m/z+1	0,142 (\pm 0,040)	-0,014	0,125	
		m/z+2	0,118 (\pm 0,049)	0,008	0,024	
		m/z+3	0,149 (\pm 0,049)	-0,006	0,015	
		m/z+4	0,041 (\pm 0,028)	--	--	
		m/z+5	0,197 (\pm 0,046)	0,025	0,832	
	SUC	m/z+0	0,146 (\pm 0,014)	0,025	3,169	
		m/z+1	0,255 (\pm 0,020)	-0,042	4,180	
m/z+2		0,334 (\pm 0,029)	-0,067	5,252		
m/z+3		0,191 (\pm 0,016)	-0,037	5,363		
m/z+4		0,074 (\pm 0,006)	0,017	8,149		
xPG	m/z+0	0,495 (\pm 0,094)	-0,066	0,492		
	m/z+1	0,127 (\pm 0,024)	0,025	1,082		
	m/z+2	0,025 (\pm 0,008)	-0,002	0,051		
	m/z+3	0,353 (\pm 0,073)	-0,046	0,387		
Xyl5P	m/z+0	0,358 (\pm 0,099)	0,020	0,040		
	m/z+1	0,129 (\pm 0,051)	0,013	0,061		
	m/z+2	0,164 (\pm 0,031)	-0,020	0,425		
	m/z+3	0,138 (\pm 0,052)	0,022	0,178		
	m/z+4	0,028 (\pm 0,010)	--	--		
	m/z+5	0,184 (\pm 0,054)	0,002	0,001		

Fortsetzung Tabelle B-2 (Aminosäuren, Flussmessungen):

		Messung		Anpassung		
		Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (±Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS
Markierungsmessungen	Ala	m/z+0		0,536 (±0,091)	-0,103	1,269
		m/z+1		0,144 (±0,071)	0,010	0,020
		m/z+2		0,016 (±0,006)	0,008	1,632
		m/z+3		0,304 (±0,082)	0,006	0,006
	Asn	m/z+0		0,240 (±0,066)	-0,022	0,105
		m/z+1		0,264 (±0,126)	-0,008	0,004
		m/z+2		0,216 (±0,102)	0,008	0,007
		m/z+3		0,188 (±0,090)	-0,005	0,003
		m/z+4		0,092 (±0,048)	0,023	0,221
	Asp	m/z+0		0,256 (±0,031)	-0,044	1,949
		m/z+1		0,251 (±0,031)	-0,003	0,008
		m/z+2		0,221 (±0,024)	-0,002	0,011
		m/z+3		0,172 (±0,019)	0,006	0,086
		m/z+4		0,102 (±0,011)	0,010	0,750
	Glut	m/z+0		0,129 (±0,007)	-0,001	0,038
		m/z+1		0,188 (±0,008)	0,008	0,896
		m/z+2		0,268 (±0,012)	0,010	0,718
		m/z+3		0,234 (±0,010)	-0,003	0,108
		m/z+4		0,122 (±0,006)	0,001	0,021
		m/z+5		0,060 (±0,003)	-0,005	3,476
	Pro	m/z+0		0,228 (±0,037)	-0,114	9,445
		m/z+1		0,177 (±0,011)	-0,002	0,034
		m/z+2		0,225 (±0,015)	0,023	2,437
		m/z+3		0,200 (±0,014)	0,006	0,222
		m/z+4		0,110 (±0,007)	-0,001	0,008
		m/z+5		0,059 (±0,005)	-0,010	4,208
	Thr	m/z+0		0,303 (±0,074)	-0,106	2,047
		m/z+1		0,228 (±0,024)	0,003	0,014
m/z+2			0,190 (±0,015)	0,012	0,671	
m/z+3			0,176 (±0,016)	-0,011	0,440	
m/z+4			0,105 (±0,008)	-0,001	0,018	

B.2 Markierungsexperiment mit *E. coli* F82pC22

Tabelle B-3a: Mittels LC-MS/MS gemessene relative Peakflächen (Massenisotopomere) der Metabolite des Zentralstoffwechsels (0 = m/z+0; 1 = m/z+1; etc.) mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stabw.) und der Abweichung der Anpassung und dem Beitrag zur Fehlerquadratsumme (FQS) für die *Phase I* der Fermentation mit *E. coli* F82pC22

		Messung		Anpassung	
	Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (±Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS
Markierungsmessungen	AKG	m/z+0	0,547 (±0,115)	0,050	0,186
		m/z+1	0,181 (±0,020)	0,009	0,186
		m/z+2	0,147 (±0,041)	-0,008	0,040
		m/z+3	0,088 (±0,032)	-0,043	1,747
		m/z+4	0,030 (±0,011)	-0,021	3,535
		m/z+5	0,007 (±0,002)	-0,005	3,786
	DHAP	m/z+0	0,699 (±0,070)	0,030	0,152
		m/z+1	0,130 (±0,023)	-0,019	0,543
		m/z+2	0,073 (±0,033)	-0,046	1,633
		m/z+3	0,098 (±0,031)	0,007	0,045
	F6P	m/z+0	0,463 (±0,153)	-0,006	0,110
		m/z+1	0,255 (±0,084)	-0,004	0,223
		m/z+2	0,091 (±0,028)	-0,003	0,663
		m/z+3	0,143 (±0,063)	0,000	0,000
		m/z+4	0,025 (±0,013)	0,001	0,500
		m/z+5	0,010 (±0,005)	0,000	0,265
		m/z+6	0,012 (±0,006)	0,001	0,971
	FBP	m/z+0	0,677 (±0,115)	-0,038	5,748
		m/z+1	0,152 (±0,049)	-0,001	0,040
		m/z+2	0,051 (±0,007)	0,000	0,182
		m/z+3	0,071 (±0,026)	0,007	4,425
		m/z+4	0,016 (±0,006)	0,001	0,851
		m/z+5	0,005 (±0,002)	0,000	0,207
		m/z+6	0,028 (±0,009)	-0,002	4,487
	FUM	m/z+0	0,666 (±0,067)	0,058	0,086
		m/z+1	0,185 (±0,026)	0,017	0,051
		m/z+2	0,073 (±0,015)	-0,006	0,016
		m/z+3	0,068 (±0,011)	-0,039	1,493
m/z+4		0,008 (±0,004)	0,009	0,558	
G6P	m/z+0	0,643 (±0,090)	-0,097	11,933	
	m/z+1	0,177 (±0,019)	-0,001	0,058	
	m/z+2	0,009 (±0,004)	0,003	6,235	
	m/z+3	0,076 (±0,017)	-0,012	4,634	
	m/z+4	0,030 (±0,007)	-0,007	9,196	
	m/z+5	0,005 (±0,002)	0,001	3,000	
	m/z+6	0,060 (±0,030)	0,011	1,381	

Fortsetzung Tabelle B-3a:

		Messung		Anpassung	
	Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (\pm Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS
Markierungsmessungen	MAL	m/z+0	0,701	-1,379	0,657
		m/z+1	(\pm 0,056)	0,313	0,209
		m/z+2	0,174	0,095	0,101
		m/z+3	(\pm 0,023)	-0,047	0,027
		m/z+4	0,062	0,077	1,102
	PEP	m/z+0	0,753	-0,018	0,189
		m/z+1	(\pm 0,045)	0,010	0,870
		m/z+2	0,106	0,000	0,000
		m/z+3	(\pm 0,012)	-0,007	0,185
	PYR	m/z+0	0,692	0,075	0,798
		m/z+1	(\pm 0,076)	0,002	0,004
		m/z+2	0,131	-0,028	2,615
		m/z+3	(\pm 0,028)	-0,031	1,675
	Ru15P	m/z+0	0,654	0,019	0,173
		m/z+1	(\pm 0,131)	0,000	0,002
		m/z+2	0,120	0,002	0,134
		m/z+3	(\pm 0,010)	-0,010	1,840
		m/z+4	0,049	-0,023	2,822
		m/z+5	(\pm 0,018)	0,000	0,034
	Rib5P	m/z+0	0,664	0,012	0,184
		m/z+1	(\pm 0,106)	0,000	0,028
		m/z+2	0,119	-0,011	1,157
		m/z+3	(\pm 0,010)	-0,006	0,942
		m/z+4	0,097	-0,004	1,654
		m/z+5	(\pm 0,039)	0,000	0,005
	SUC	m/z+0	0,651 (\pm 0,072)	2,857	0,638
		m/z+1	0,215 (\pm 0,017)	-0,886	1,068
		m/z+2	0,064 (\pm 0,015)	0,569	0,607
m/z+3		0,060 (\pm 0,017)	-0,194	0,054	
m/z+4		0,011	0,023	0,030	
xPG	m/z+0	0,756 (\pm 0,038)	-0,034	0,084	
	m/z+1	0,109 (\pm 0,011)	0,025	0,552	
	m/z+2	0,034 (\pm 0,003)	-0,004	0,117	
	m/z+3	0,101	0,009	0,030	

Tabelle B-3b: Mittels LC-MS/MS gemessene relative Peakflächen (Massenisotopomere) der Metabolite des Zentralstoffwechsels (0 = m/z+0; 1 = m/z+1; etc.) mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stabw.) und der Abweichung der Anpassung und dem Beitrag zur Fehlerquadratsumme (FQS) für die *Phase 2* der Fermentation mit *E. coli* F82pC22

		Messung		Anpassung	
	Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (±Stabw.)	Abweichung	Anteil
				zum Messwert	FQS
Markierungsmessungen	AKG	m/z+0	0,486 (±0,102)	0,066	0,416
		m/z+1	0,187 (±0,0205)	0,009	0,176
		m/z+2	0,179 (±0,050)	-0,024	0,222
		m/z+3	0,108 (±0,040)	-0,050	1,531
		m/z+4	0,032 (±0,012)	-0,018	2,243
		m/z+5	0,009 (±0,003)	-0,004	1,820
	DHAP	m/z+0	0,702 (±0,035)	0,035	0,313
		m/z+1	0,125 (±0,0125)	-0,030	1,109
		m/z+2	0,037 (±0,004)	-0,037	1,299
		m/z+3	0,137 (±0,023)	0,001	0,000
	FBP	m/z+0	0,537 (±0,177)	-0,209	1,389
		m/z+1	0,175 (±0,058)	0,025	0,182
		m/z+2	0,070 (±0,022)	-0,010	0,199
		m/z+3	0,141 (±0,062)	-0,002	0,001
		m/z+4	0,030 (±0,015)	0,010	0,475
		m/z+5	0,011 (±0,006)	-0,001	0,028
	FUM	m/z+6	0,036 (±0,018)	0,004	0,045
		m/z+0	0,591 (±0,065)	0,032	0,296
		m/z+1	0,234 (±0,019)	-0,001	0,003
		m/z+2	0,084 (±0,019)	0,001	0,002
		m/z+3	0,075 (±0,021)	-0,024	2,626
	G6P	m/z+4	0,016 (±0,004)	0,004	0,483
		m/z+0	0,501 (±0,070)	-0,123	3,050
		m/z+1	0,217 (±0,024)	0,005	0,040
		m/z+2	0,066 (±0,029)	-0,016	0,318
		m/z+3	0,106 (±0,024)	0,007	0,083
		m/z+4	0,032 (±0,007)	0,002	0,056
	MAL	m/z+5	0,008 (±0,003)	0,004	1,624
m/z+6		0,071 (±0,035)	0,013	0,128	
m/z+0		0,642 (±0,051)	-0,051	0,979	
m/z+1		0,196 (±0,025)	0,004	0,023	
m/z+2		0,075 (±0,012)	0,018	2,245	
PEP	m/z+3	0,073 (±0,0125)	-0,008	0,408	
	m/z+4	0,013 (±0,004)	0,002	0,254	
	m/z+0	0,692 (±0,042)	-0,011	0,071	
	m/z+1	0,130 (±0,014)	0,002	0,013	
		m/z+2	0,035 (±0,004)	0,002	0,196
		m/z+3	0,142 (±0,024)	-0,001	0,002

Fortsetzung Tabelle B-3b:

		Messung		Anpassung		
		Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (\pm Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS
Markierungsmessungen	PYR	m/z+0	0,628 (\pm 0,069)	0,028	0,163	
		m/z+1	0,135 (\pm 0,028)	0,009	0,106	
		m/z+2	0,051 (\pm 0,011)	0,002	0,020	
		m/z+3	0,186 (\pm 0,037)	-0,084	5,082	
	Ru5P	m/z+0	0,603 (\pm 0,121)	0,031	0,066	
		m/z+1	0,136 (\pm 0,011)	-0,001	0,002	
		m/z+2	0,092 (\pm 0,035)	-0,006	0,029	
		m/z+3	0,094 (\pm 0,029)	-0,031	1,166	
		m/z+4	0,051 (\pm 0,026)	-0,032	1,572	
		m/z+5	0,023 (\pm 0,005)	0,002	0,281	
	Rib5P	m/z+0	0,608 (\pm 0,097)	0,011	0,014	
		m/z+1	0,128 (\pm 0,010)	0,004	0,186	
		m/z+2	0,109 (\pm 0,043)	-0,024	0,306	
		m/z+3	0,087 (\pm 0,033)	-0,026	0,612	
		m/z+4	0,041 (\pm 0,017)	-0,022	1,739	
	SUC	m/z+0	0,588 (\pm 0,059)	0,048	0,542	
		m/z+1	0,210 (\pm 0,029)	-0,019	1,013	
		m/z+2	0,098 (\pm 0,020)	0,019	0,916	
		m/z+3	0,091 (\pm 0,015)	-0,006	0,071	
		m/z+4	0,012 (\pm 0,006)	0,000	0,001	
xPG	m/z+0	0,631 (\pm 0,063)	-0,014	0,162		
	m/z+1	0,158 (\pm 0,028)	0,008	0,379		
	m/z+2	0,071 (\pm 0,032)	0,000	0,003		
	m/z+3	0,140 (\pm 0,045)	0,007	0,093		

Tabelle B-3c: Mittels LC-MS/MS gemessene relative Peakflächen (Massenisotopomere) der Metabolite des Zentralstoffwechsels (0 = m/z+0; 1 = m/z+1; etc.) mit den zugehörigen Standardabweichungen (Stabw.) und der Abweichung der Anpassung und dem Beitrag zur Fehlerquadratsumme (FQS) für die *Phase 3* der Fermentation mit *E. coli* F82pC22

Messung			Anpassung		
Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (±Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS	
Markierungsmessungen	AKG	m/z+0	0,367 (±0,077)	0,070	0,827
		m/z+1	0,227 (±0,025)	0,007	0,078
		m/z+2	0,219 (±0,061)	-0,036	0,353
		m/z+3	0,131 (±0,048)	-0,051	1,108
		m/z+4	0,042 (±0,015)	-0,021	1,858
		m/z+5	0,014 (±0,004)	-0,007	2,365
	DHAP	m/z+0	0,612 (±0,061)	0,014	0,055
		m/z+1	0,163 (±0,029)	-0,010	0,126
		m/z+2	0,084 (±0,038)	-0,038	1,006
		m/z+3	0,141 (±0,045)	0,009	0,040
	FBP	m/z+0	0,524 (±0,173)	-0,340	3,880
		m/z+1	0,193 (±0,064)	-0,056	0,776
		m/z+2	0,071 (±0,022)	-0,023	1,097
		m/z+3	0,127 (±0,056)	-0,024	0,177
		m/z+4	0,039 (±0,019)	-0,004	0,039
		m/z+5	0,004 (±0,002)	0,004	4,258
		m/z+6	0,043 (±0,0215)	-0,019	0,781
	FUM	m/z+0	0,528 (±0,053)	0,014	0,070
		m/z+1	0,242 (±0,034)	0,001	0,001
		m/z+2	0,109 (±0,022)	0,010	0,218
		m/z+3	0,104 (±0,017)	-0,024	2,051
		m/z+4	0,017 (±0,008)	0,005	0,299
	G6P	m/z+0	0,484 (±0,068)	-0,136	4,009
		m/z+1	0,221 (±0,024)	0,012	0,244
m/z+2		0,059 (±0,026)	-0,014	0,286	
m/z+3		0,114 (±0,026)	-0,016	0,351	
m/z+4		0,028 (±0,006)	0,005	0,546	
m/z+5		0,010 (±0,0035)	0,003	0,835	
m/z+6		0,083 (±0,041)	0,024	0,342	

Fortsetzung Tabelle B-3c:

Messung			Anpassung		
Metabolit	Verhältnis	rel. Peakfläche (\pm Stabw.)	Abweichung zum Messwert	Anteil FQS	
Markierungsmessungen	MAL	m/z+0	0,572 (\pm 0,046)	-0,044	0,935
		m/z+1	0,228 (\pm 0,030)	0,009	0,100
		m/z+2	0,094 (\pm 0,015)	0,020	1,821
		m/z+3	0,086 (\pm 0,015)	-0,007	0,223
		m/z+4	0,020 (\pm 0,006)	0,002	0,066
	PEP	m/z+0	0,659 (\pm 0,0395)	-0,019	0,235
		m/z+1	0,142 (\pm 0,016)	0,015	0,878
		m/z+2	0,051 (\pm 0,007)	-0,002	0,075
		m/z+3	0,148 (\pm 0,025)	0,002	0,006
	PYR	m/z+0	0,572 (\pm 0,063)	0,052	0,685
		m/z+1	0,179 (\pm 0,038)	0,006	0,023
		m/z+2	0,107 (\pm 0,0235)	-0,032	1,809
		m/z+3	0,142 (\pm 0,030)	-0,041	1,892
	Ru5P	m/z+0	0,481 (\pm 0,096)	0,070	0,533
		m/z+1	0,151 (\pm 0,012)	0,000	0,000
		m/z+2	0,101 (\pm 0,039)	0,008	0,045
		m/z+3	0,103 (\pm 0,036)	-0,027	0,724
		m/z+4	0,122 (\pm 0,061)	-0,096	2,482
		m/z+5	0,043 (\pm 0,009)	-0,004	0,256
	Rib5P	m/z+0	0,525 (\pm 0,084)	0,003	0,001
m/z+1		0,143 (\pm 0,011)	0,002	0,020	
m/z+2		0,134 (\pm 0,054)	-0,029	0,298	
m/z+3		0,118 (\pm 0,045)	-0,045	1,028	
m/z+4		0,046 (\pm 0,019)	-0,022	1,286	
m/z+5		0,035 (\pm 0,006)	0,002	0,139	
SUC	m/z+0	0,515 (\pm 0,057)	0,043	0,571	
	m/z+1	0,268 (\pm 0,0215)	-0,018	0,684	
	m/z+2	0,113 (\pm 0,026)	0,010	0,153	
	m/z+3	0,082 (\pm 0,023)	0,000	0,000	
	m/z+4	0,022 (\pm 0,0055)	0,001	0,009	
xPG	m/z+0	0,669 (\pm 0,033)	-0,024	0,523	
	m/z+1	0,139 (\pm 0,014)	0,018	1,671	
	m/z+2	0,050 (\pm 0,005)	-0,002	0,131	
	m/z+3	0,142 (\pm 0,024)	0,011	0,200	

Tabelle B-4: 2D-NMR Messung der Multipletts (s= singulett, d= doublett, dd =double-doublett) der proteinogenen Aminosäuren (Phase 1) und der Produkte 3,4-CHD und Shikimat (Phase 2 und 3) mit der ermittelten relativen Standardabweichung. Die Indizes (α , β , γ , δ , ϵ) bezeichnen die Position der C-Atome zum C-Atom der Carboxylgruppe.³

	AS	Pos.	Isotopomere [-] (Standardabweichung [-])				
			s	d1	d2	d1+d2	dd
Phase 1	Ala	C $_{\alpha}$	0,076 (\pm 0,002)	0,030 (\pm 0,003)	0,072 (\pm 0,004)		0,822 (\pm 0,005)
		C $_{\beta}$	0,355 (\pm 0,003)	0,645 (\pm 0,003)			
	Arg	C $_{\chi}$	0,291 (\pm 0,002)			0,561 (\pm 0,178)	0,148 (\pm 0,007)
		C $_{\delta}$	0,118 (\pm 0,009)	0,882 (\pm 0,042)			
	Asp	C $_{\alpha}$	0,289 (\pm 0,002)	0,269 (\pm 0,002)	0,164 (\pm 0,002)		0,278 (\pm 0,003)
		C $_{\beta}$	0,311 (\pm 0,002)	0,273 (\pm 0,002)	0,220 (\pm 0,002)		0,196 (\pm 0,003)
	Glu	C $_{\alpha}$	0,297 (\pm 0,003)	0,269 (\pm 0,003)	0,235 (\pm 0,005)		0,200 (\pm 0,005)
		C $_{\beta}$	0,435 (\pm 0,004)	0,190 (\pm 0,107)	0,271 (\pm 0,107)		0,104 (\pm 0,005)
		C $_{\chi}$	0,271 (\pm 0,0015)	0,454 (\pm 0,002)	0,096 (\pm 0,002)		0,179 (\pm 0,002)
	Gly	C $_{\alpha}$	0,253 (\pm 0,003)	0,747 (\pm 0,003)			
	His	C $_{\alpha}$	0,066 (\pm 0,003)	0,019 (\pm 0,005)			0,915 (\pm 0,0075)
		C $_{\beta}$	0,130 (\pm 0,058)	0,010 (\pm 0,013)	0,530 (\pm 0,158)		0,330 (\pm 0,404)
	Ile	C $_{\alpha}$	0,331 (\pm 0,003)	0,433 (\pm 0,0035)	0,104 (\pm 0,005)		0,132 (\pm 0,006)
		C $_{\beta}$	0,080 (\pm 0,012)			0,660 (\pm 0,054)	0,260 (\pm 0,092)
		C $_{\chi 1}$	0,367 (\pm 0,003)	0,633 (\pm 0,003)			
		C $_{\delta}$	0,418 (\pm 0,003)	0,582 (\pm 0,003)			
	Leu	C $_{\alpha}$	0,274 (\pm 0,002)	0,505 (\pm 0,003)	0,079 (\pm 0,005)		0,142 (\pm 0,006)
		C $_{\beta}$	0,610 (\pm 0,012)			0,390 (\pm 0,098)	
		C $_{\chi 2}$	0,369 (\pm 0,006)	0,632 (\pm 0,006)			
	Lys	C $_{\alpha}$	0,123 (\pm 0,003)	0,189 (\pm 0,004)	0,088 (\pm 0,006)		0,600 (\pm 0,006)
		C $_{\beta}$	0,299 (\pm 0,006)			0,566 (\pm 0,080)	0,145 (\pm 0,007)
		C $_{\chi}$	0,328 (\pm 0,007)			0,522 (\pm 0,263)	0,150 (\pm 0,0095)
		C $_{\delta}$	0,307 (\pm 0,008)			0,558 (\pm 0,114)	0,135 (\pm 0,011)
		C $_{\epsilon}$	0,341 (\pm 0,039)	0,659 (\pm 0,077)			
Met	C $_{\alpha}$	0,328 (\pm 0,007)	0,251 (\pm 0,007)	0,179 (\pm 0,010)		0,242 (\pm 0,012)	
Pro	C $_{\alpha}$	0,339 (\pm 0,003)	0,236 (\pm 0,003)	0,258 (\pm 0,005)		0,167 (\pm 0,006)	
	C $_{\beta}$	0,404 (\pm 0,057)			0,468 (\pm 0,257)	0,128 (\pm 0,070)	
	C $_{\chi}$	0,274 (\pm 0,019)			0,543 (\pm 0,188)	0,183 (\pm 0,175)	
	C $_{\delta}$	0,112 (\pm 0,004)	0,888 (\pm 0,004)				
Ser	C $_{\alpha}$	0,105 (\pm 0,003)	0,335 (\pm 0,004)	0,059 (\pm 0,004)		0,501 (\pm 0,004)	
	C $_{\beta}$	0,561 (\pm 0,008)	0,439 (\pm 0,008)				
Thr	C $_{\alpha}$	0,326 (\pm 0,017)	0,258 (\pm 0,018)	0,176 (\pm 0,020)		0,240 (\pm 0,025)	
	C $_{\beta}$	0,293 (\pm 0,0035)	0,302 (\pm 0,027)	0,206 (\pm 0,027)		0,199 (\pm 0,0045)	
	C $_{\chi}$	0,420 (\pm 0,002)	0,580 (\pm 0,002)				
Val	C $_{\alpha}$	0,119 (\pm 0,002)	0,658 (\pm 0,004)	0,025 (\pm 0,004)		0,199 (\pm 0,005)	
	C $_{\chi 1}$	0,366 (\pm 0,004)	0,634 (\pm 0,004)				
	C $_{\chi 2}$	0,755 (\pm 0,005)	0,245 (\pm 0,005)				

³ C $_{\alpha}$ bezeichnet beispielsweise das C-Atom in direkter Nachbarschaft zur Carboxylgruppe. Zur Nomenklatur der Aminosäuren siehe z.B. (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/AA1n2.html>).

Fortsetzung Tabelle B-4:

	Met.	Pos.	Isotopomere [-] (Standardabweichung [-])				
			s	d1	d2	d1+d2	dd
Phase 2	CHD	C2	0,290 (± 0,008)	0,469 (± 0,098)	0,081 (± 0,025)		0,161 (± 0,106)
		C5	0,115 (± 0,115)	0,094 (± 0,286)	0,030 (± 0,497)		0,760 (± 0,134)
		C6	0,224 (± 0,025)	0,542 (± 0,026)	0,057 (± 0,142)		0,176 (± 0,276)
	Shik.	C2	0,254 (± 0,470)	0,457 (± 1,027)	0,101 (± 0,629)		0,188 (± 0,237)
		C3	0,339 (± 0,092)	0,301 (± 0,338)	0,180 (± 0,190)		0,180 (± 0,025)
		C4	0,139 (± 0,011)			0,436 (± 0,062)	0,425 (± 0,023)
		C5	0,139 (± 0,014)	0,060 (± 0,060)	0,012 (± 0,036)		0,790 (± 0,072)
		C6	0,236 (± 0,075)	0,047 (± 0,205)	0,552 (± 0,166)		0,166 (± 0,433)
Phase 3	CHD	C2	0,353 (± 0,005)	0,461 (± 0,016)	0,068 (± 0,008)		0,118 (± 0,056)
		C5	0,160 (± 0,035)	0,138 (± 0,054)	0,030 (± 0,067)		0,673 (± 0,057)
		C6	0,311 (± 0,017)	0,490 (± 0,0245)	0,055 (± 0,062)		0,144 (± 0,110)
	Shik.	C2	0,344 (± 0,279)	0,441 (± 0,316)	0,065 (± 0,322)		0,151 (± 0,0241)
		C3	0,483 (± 0,274)	0,256 (± 0,385)	0,138 (± 0,642)		0,123 (± 0,032)
		C4	0,244 (± 0,003)	0,006 (± 0,010)	0,383 (± 0,010)		0,367 (± 0,0035)
		C5	0,230 (± 0,025)	0,045 (± 0,045)	0,020 (± 0,058)		0,705 (± 0,046)
		C6	0,309 (± 0,015)	0,036 (± 0,017)	0,523 (± 0,046)		0,132 (± 0,366)

Abbildung B-1.a: Ergebnisse der Parameteranpassung auf Basis der LC-MS/MS-Daten für die drei Phasen der Fermentation mit dem Stamm *E. coli* F82pC22

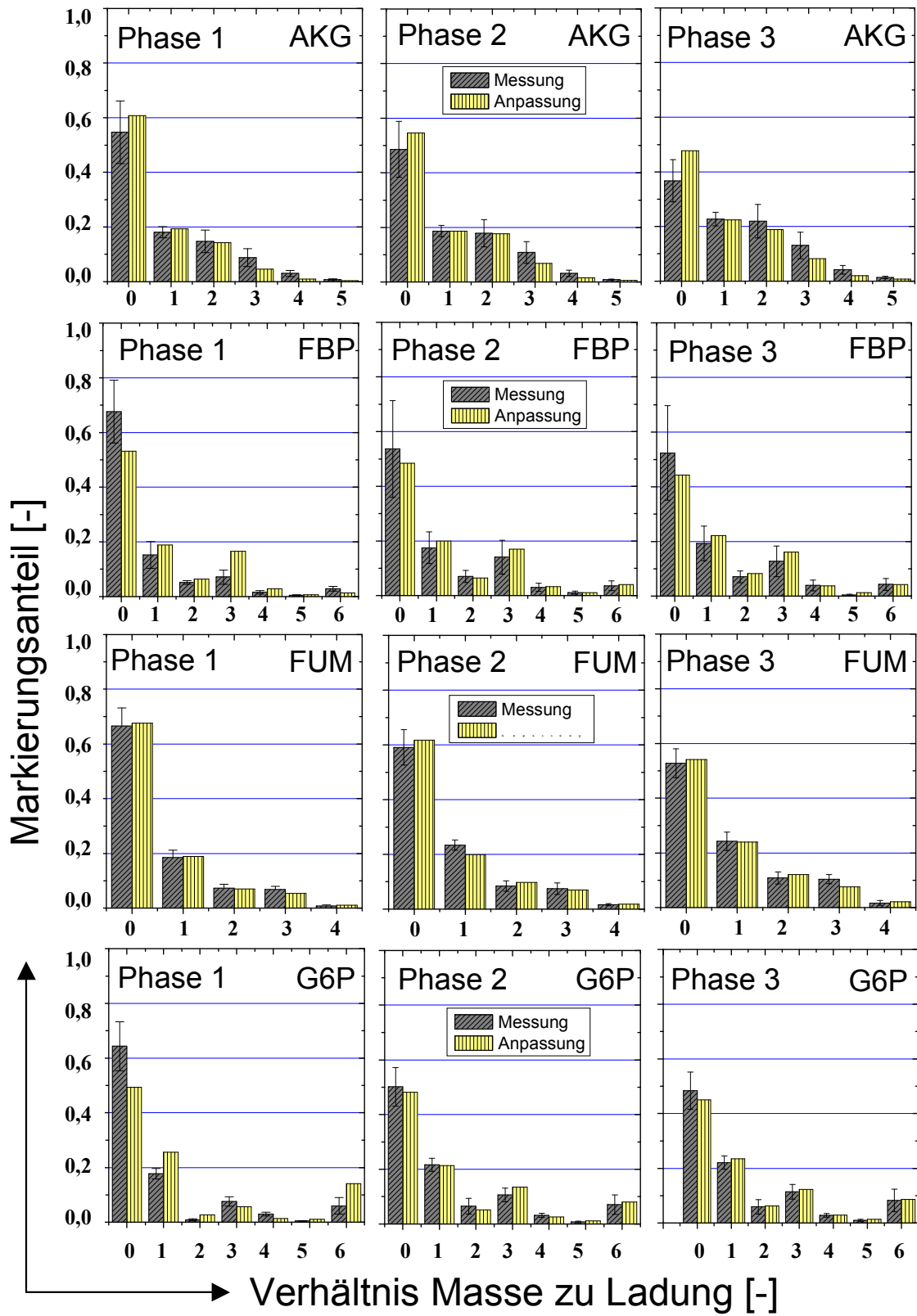


Abbildung B-1.b: Weitere Ergebnisse der Parameteranpassung auf Basis der LC-MS/MS-Daten für die drei Phasen der Fermentation mit dem Stamm *E. coli* F82pC22

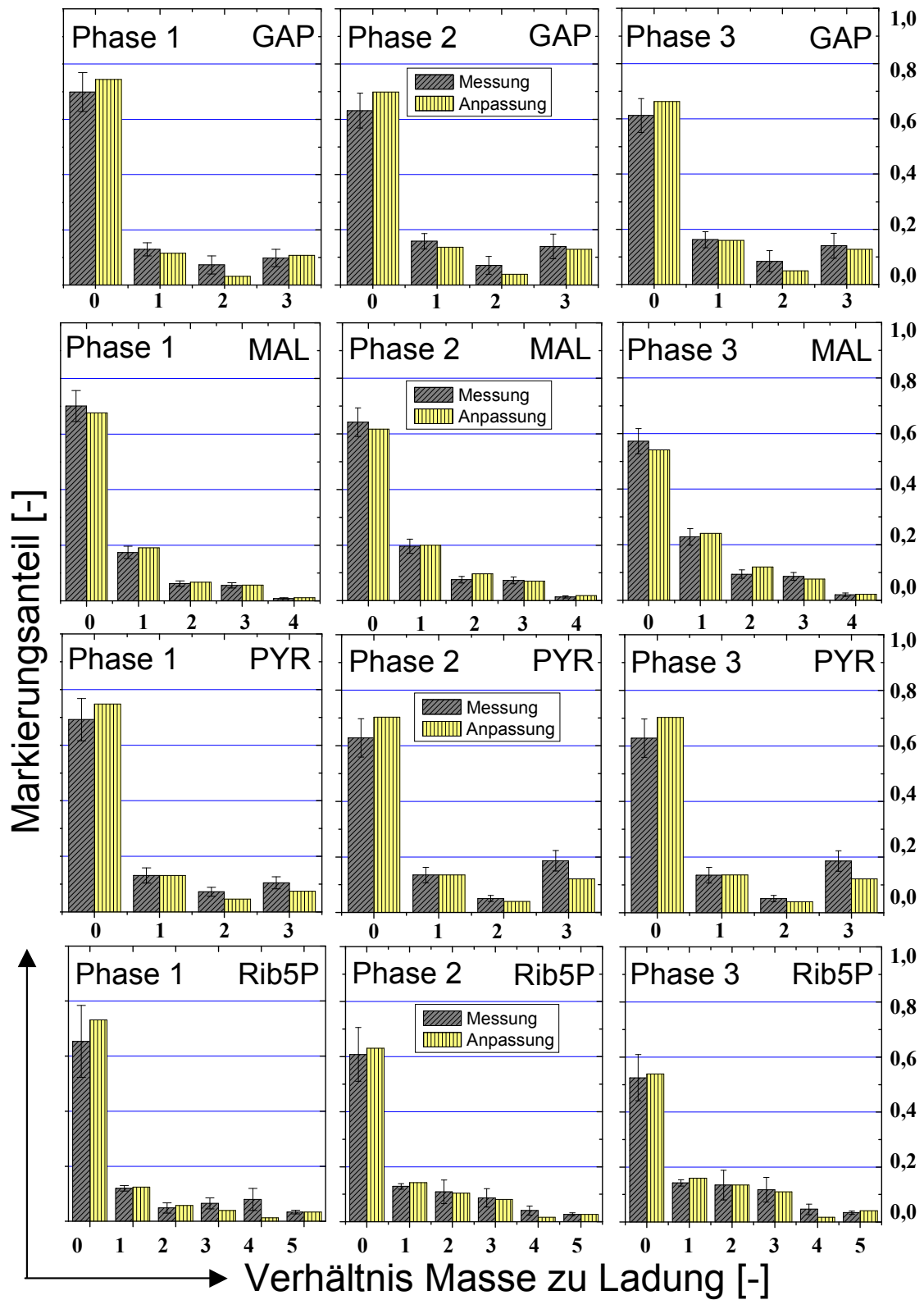


Tabelle B-5: Auf Basis der MS-Markierungsdaten ermittelte Austauschflüsse $x_{ch}[0;1]$ und zugehörige Standardabweichung (RSD [%]) für alle drei Markierungsexperimente von *E. coli* F82pC22

Fluss	Phase 1		Phase 2		Phase 3	
	Xch [0;1]	RSD [%]	Xch [0;1]	RSD [%]	Xch [0;1]	RSD [%]
upt	--		--		--	
pyr_in	--		--		--	
akg_in	--		--		--	
oaa_in	--		--		--	
p5p_in	--		--		--	
emp1	0,75 ($\pm 0,06$)	7,6	0,85 ($\pm 0,10$)	11,3	0,66 ($\pm 0,13$)	20,1
emp2	--		--		--	
emp3	0,92 ($\pm 0,19$)	21,1	0,62 ($\pm 0,09$)	13,8	0,20 ($\pm 0,03$)	12,9
emp4	0,99 ($\pm 0,05$)	5,1	0,99 ($\pm 0,23$)	23,0	0,99 ($\pm 0,24$)	23,9
emp5	0,99 ($\pm 0,03$)	3,5	0,99 ($\pm 0,09$)	9,0	0,99 ($\pm 0,11$)	11,1
emp6	0,75 ($\pm 1,62$)	215,7	0,61 ($\pm 2,05$)	336,4	0,00 ($\pm 4,89$)	4,89E+14
edp	--		--		--	
ppp1	--		--		--	
ppp2	0,61 ($\pm 0,32$)	52,0	0,39 ($\pm 0,27$)	69,9	0,24 ($\pm 0,23$)	94,2
ppp3	0,52 ($\pm 0,33$)	62,6	0,07 ($\pm 0,29$)	390,0	0,03 ($\pm 0,17$)	625,0
ppp4	0,99 ($\pm 0,01$)	1,1	0,92 ($\pm 0,07$)	7,3	0,93 ($\pm 0,14$)	14,7
tcc1	--		--		--	
tcc2	--		--		--	
tcc3	--		--		--	
tcc4	--		--		--	
tcc5a/b	0,99 ($\pm 0,10$)	10,3	0,99 ($\pm 0,31$)	31,5	0,99 ($\pm 0,39$)	39,5
tcc6	0,99 ($\pm 0,19$)	19,0	0,99 ($\pm 0,62$)	62,2	0,99 ($\pm 1,04$)	104,7
tcc7	0,99 ($\pm 0,30$)	30,6	0,99 ($\pm 1,51$)	152,4	0,99 ($\pm 1,53$)	154,8
gs1/2	--		--		--	
ppc	0,85 ($\pm 0,35$)	41,5	0,45 ($\pm 1,67$)	373,8	0,57 ($\pm 0,60$)	104,0
mae	0,88 ($\pm 0,45$)	50,6	0,72 ($\pm 0,95$)	133,1	0,60 ($\pm 1,62$)	269,3

Bei vielen Austauschflüssen der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus – vor allem in der ersten Phase – zeigte sich, dass diese sehr hohe Werte annehmen. Die Größe der Austauschflüsse im PPP und der Anaplerosis (*mae*, *ppc*) sowie *emp1* nimmt zusammen mit der Stoffwechselaktivität im Laufe der Fermentation ab. Wie schon im Experiment mit dem *E. coli* Wildtyp festgestellt ist die ermittelte relative Standardabweichung für die meisten Austauschflüsse größer als bei den Nettoflüssen.

Tabelle B-6: Erweiterung des *E. coli*-Modells mit zusätzlichen unmarkierten Flüssen in die gemessenen Aminosäurepools. Für jeden gemessenen Pool wurde ein unmarkierter Zufluss definiert, der die „Verdünnung“ des Messsignals darstellt.

Name	Reaktion	C-Atom-Verteilung
akg_in	AKG_xch → AKG	#ABCDE → #ABCDE
his_in	His_xch → His	#ABCDE → #ABCDE
ile_in	Ile_xch → Ile	#ABCDEF → # ABCDEF
leu_in	Leu_xch → Leu	#ABCDEF → #ABCDEF
lys_in	Lys_xch → Lys	#ABCDEF → # ABCDEF
oaa_in	OAA_xch → OAA	#ABCD → #ABCD
pyr_in	PYR_xch → PYR	#ABC → #ABC
trp_in	Trp_xch → Trp	#ABCDEFGHIJK → # ABCDEFGHIJK
val_in	Val_xch → Val	#ABCDE → # ABCDE

Abbildung B-2: Anpassung der Markierungsmessungen der proteinogenen Aminosäuren auf Basis der NMR-Daten für die Phase 1 der Fermentation mit *E. coli* F82pC22

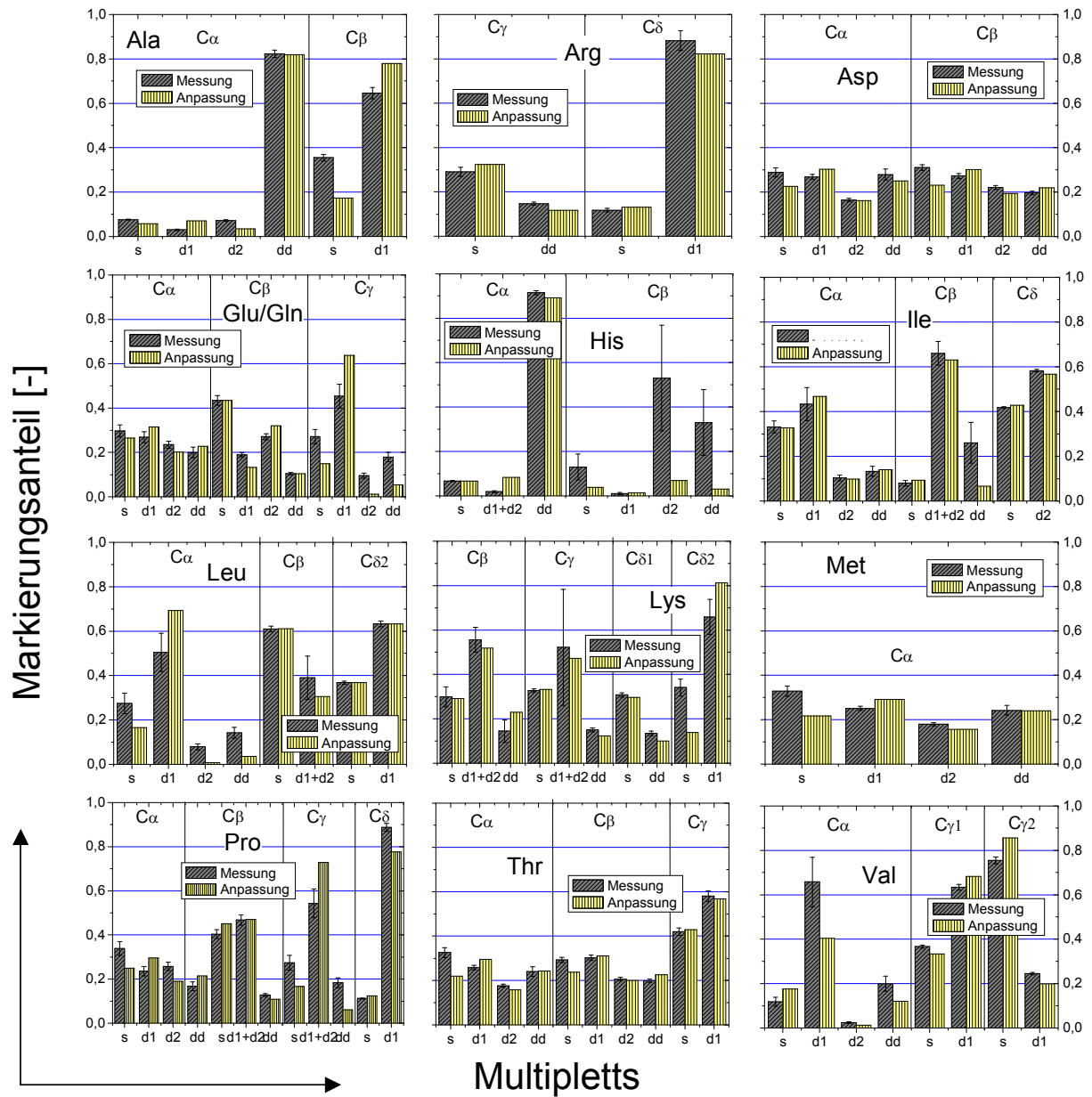


Abbildung B-3: Auf die Glukoseaufnahme (=100) normierte Stoffflüsse basierend auf den NMR-Daten der proteinogenen Aminosäuren für die Phase 1 der Fermentation

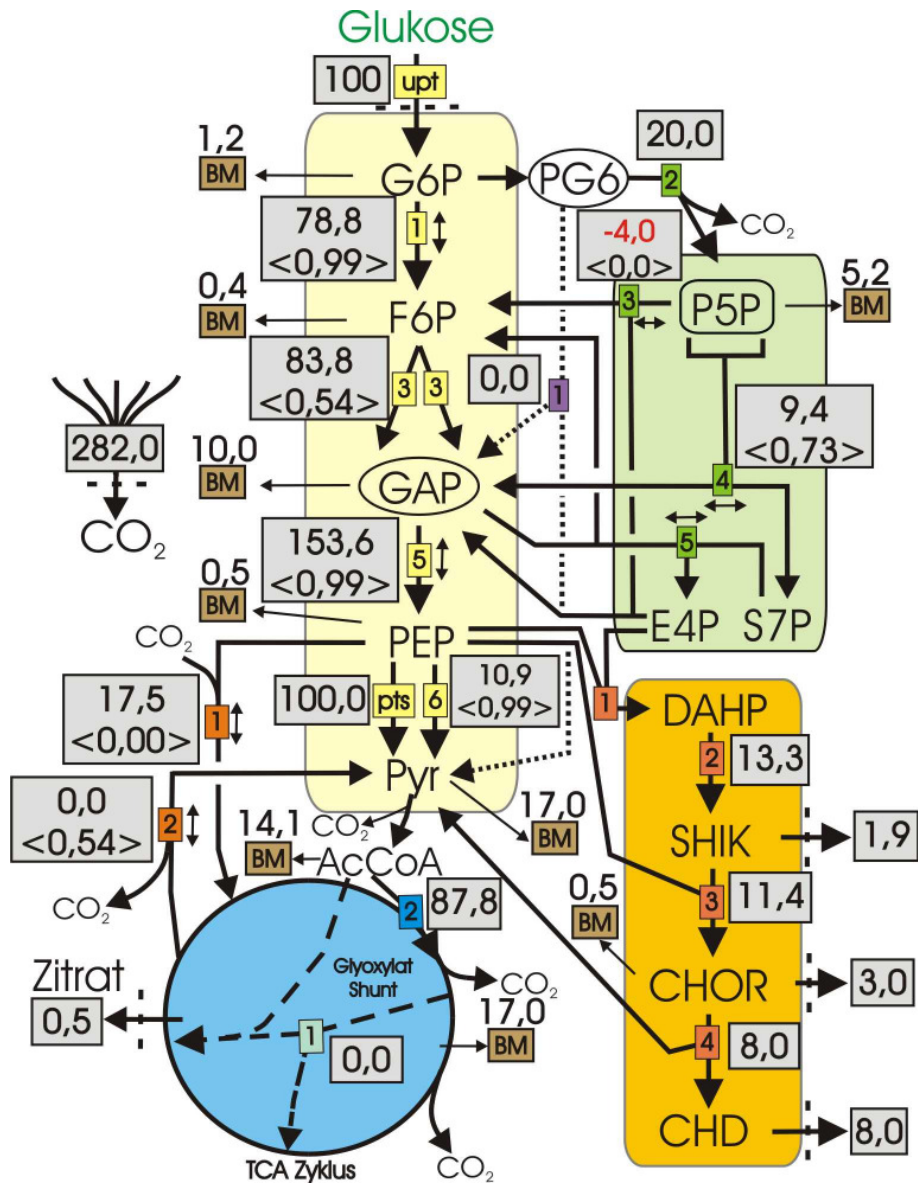


Tabelle B-7: Auf Basis der NMR-Markierungsdaten ermittelte Netto- und Austauschflüsse $X_{ch}[0\ 1]$ mit den zugehörigen Standardabweichungen (RSD [%]) für die **Phase 1** des Experiments mit *E. coli* F82pC22. Die grau hinterlegten Flüsse wurden als freie Flüsse gewählt. Die unmarkierten Zuflüsse und die Austauschflüsse *emp3*, *tcc5a/b* und *tcc6* sind auf Basis der NMR-Daten nicht bestimmbar.

Name des Flusses	Nettoflüsse		Austauschflüsse	
	Net [mmol/(g _{BTM} *h)]	relative Standard- abweichung [%]	Xch[01] [-]	relative Standard- abweichung [%]
upt	5,29 (±0,34)	6,4	--	--
akg_in	1,58	--	--	--
his_in	0,01	--	--	--
ile_in	0,00	--	--	--
leu_in	0,03	--	--	--
lys_in	0,07	--	--	--
oaa_in	6,67	--	--	--
pyr_in	0,00	--	--	--
trp_in	0,16	--	--	--
val_in	1,39	--	--	--
emp1	4,17 (±24,28)	582,5	0,99 (±1,20)	121,5
emp2	4,43 (±24,80)	559,6	--	--
emp3	4,43 (±24,80)	559,6	0,54	--
emp4	8,61 (±24,80)	287,9	0,00 (±60,05)	--
emp5	8,11 (±24,80)	305,7	0,99 (±92,5)	9347
emp6	5,86 (±2715)	46363	--	--
edp	0,00 (±25,09)	--	--	--
ppp1	1,06 (±24,28)	2290	--	--
ppp2	1,06 (±2,46)	231,6	--	--
ppp3	-0,21 (±0,82)	388,4	0,00 (±4,49)	--
ppp4	0,50 (±0,82)	165,0	0,73 (±31,8)	4369
ppp5	0,50 (±0,82)	165,0	0,83 (±39,1)	4723
tcc1	5,38 (±0,84)	15,67	--	--
tcc2	4,63 (±0,82)	17,69	--	--
tcc3	4,61 (±0,81)	17,65	--	--
tcc4	4,21 (±0,81)	19,32	--	--
tcc5a/b	2,10 (±0,41)	19,45	0,99	--
tcc6	4,21 (±0,82)	19,45	0,99	--
tcc7	4,21 (±2722)	64700	0,99 (±4,11)	415,3
gs1/2	0,00 (±0,13)	--	--	--
ppc	0,93 (±2723)	294156	0,00 (±464,6)	--
mae	0,00 (±2723)	--	0,54 (±576,6)	107251

B.3 Die Menüs der Benutzeroberfläche der Zentraleinheit (SPS)

Inokulierung (Inoc)

Vom Mainmenü kommt man mit dem Button *Inoc* zum Menü Inoculation. Hier kann die Öffnungszeit und –dauer der drei Inokulierungsventile vorgegeben werden. Über den Startbutton wird die Inokulierung und gleichzeitig ein neuer Prozesszyklus gestartet. Mit dem Button *Testlauf* kann zu Testzwecken eine Inokulierung ohne Start des Prozesszyklus gestartet werden.

Mit dem Button *Zurück* gelangt man wieder zum Mainmenü.

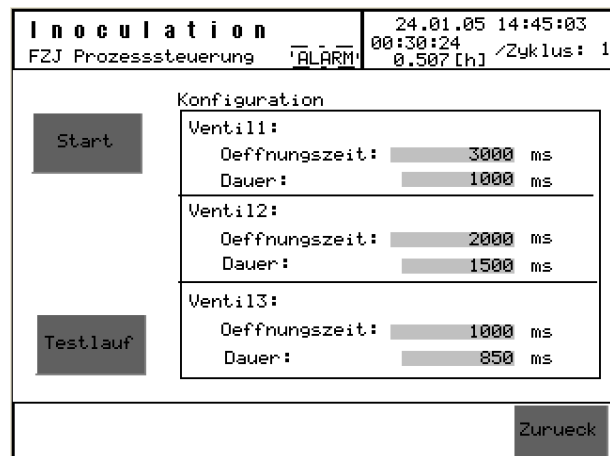
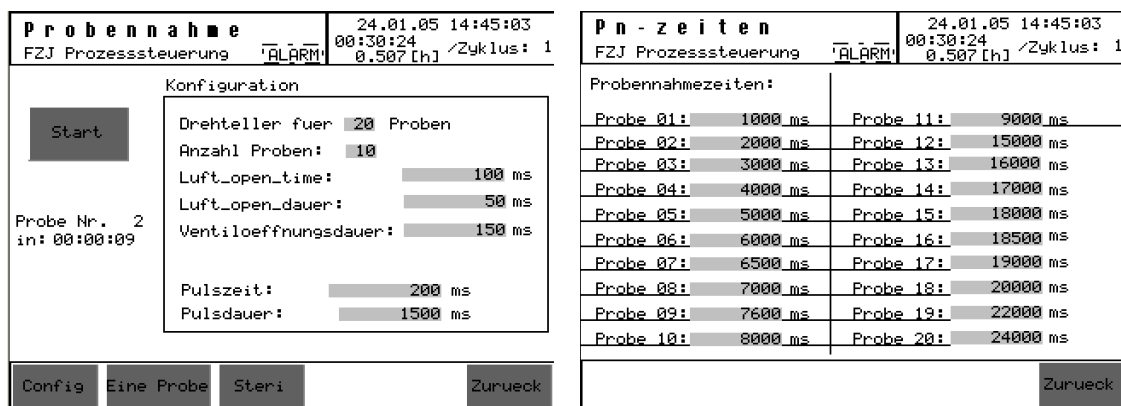


Abbildung B-2: Inokulierung

Markierungsaufgabe / Probenahme

Vom Mainmenü gelangt man mit dem Button *Prob* zum Untermenü Probenahme.

Abbildung B-3: Menü Probenahme und Probenahmezeiten



Hier können die folgenden Parameter konfiguriert werden:

- (1) Größe des Drehtellers (z. Zt. 10 bzw. 20),
- (2) Anzahl der Proben (1-10 bzw. 1-20),
- (3) Wartezeit bis zum Freiblasen des Probenahmeventils (*Luft_open_time*),
- (4) Länge des Luftstoßes (*Luft_open_dauer*),
- (5) Ventilöffnungsdauer des Probenahmeventils,
- (6) Startzeit der Markierungsaufgabe (*Pulszeit*),
- (7) Öffnungsdauer des Ventils zur Markierungsaufgabe (*Pulsdauer*).

Mit dem Button *Config* gelangt man zum Untermenü zur Eingabe der Probenahmezeiten. Hier können die Öffnungszeiten von bis zu 20 Proben nach dem Start der Probenahme eingegeben werden. Eine einzelne Probe kann mit dem Button *Eine Probe* genommen werden. Über *Steri* gelangt man zu einem Untermenü zur Sterilisation des Magnetventils für die Markierungsaufgabe mit Natronlauge. Mit Start wird die Probenahme gestartet und die Daten der Probenahme in der Datei *probennahme_log_xx.txt* gespeichert.

Konfiguration

Über *Config* gelangt man vom Mainmenü zum Konfigurationsmenü. In Untermenüs kann man hier Einstellungen zur Datenaufzeichnung (*Logging*), zum *System* (Warmstart, Zeitabgleich, Alarm) und zum *FileIO* (Kopieren, Speichern und Einlesen von Dateien) vornehmen.

Weitere Einstellungen für die beiden Reaktoren erreicht man mit den Buttons *Master* und *Slave*. Zur Berechnung der Feedrate aus den Daten des Master-Reaktors kann hier das Volumen der beiden Reaktoren eingegeben werden.

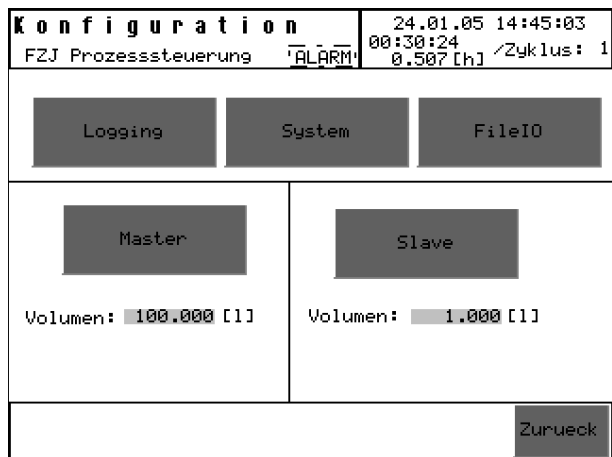


Abbildung B-4: Konfiguration

Konfiguration Master

Im Konfigurationsmenü für den Master können die Schnittstellen für die Übermittlung der Istwerte an die SPS ausgewählt werden. Die aktuellen Istwerte werden als Sollwerte für den Slave-Reaktor übernommen.

Über *Feed Gluc.* und *Feed Amino* können die Konzentrationen der dem Master zugeführten Lösungen angegeben werden. Diese Daten werden für die Berechnung der Feed-Rate für den Slave-Reaktor benötigt.

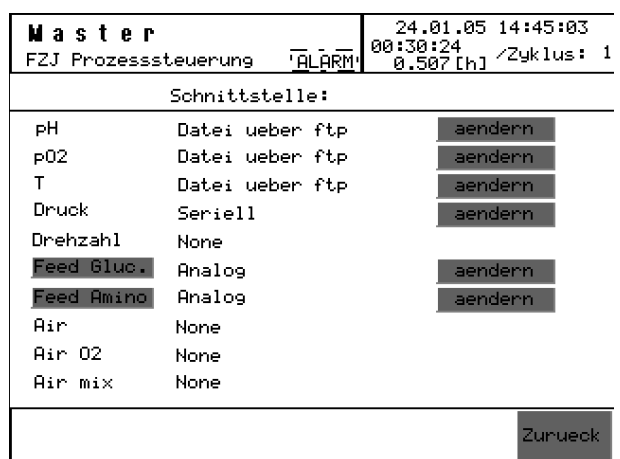


Abbildung B-5: Konfiguration Master

Konfiguration Slave

Nachfolgend werden die einzelnen Untermenüs des Konfigurationsmenüs für den Slave vorgestellt. Die Waagen (Kern und Sartorius) müssen nicht konfiguriert werden, weshalb auf diese Untermenüs nicht näher eingegangen wird. Bei Drücken eines Buttons der Waagen wird der aktuelle Waagenwert angezeigt und ein „Tara“ kann durchgeführt werden.

In diesem Übersichtsmenü kommt man über Buttons zur Kalibrierung/ Konfiguration der Prozessparameter und Peripheriegeräte.

Für die vier zu regelnden Parameter pH, pO₂, Druck und Temperatur erreicht man über Hotspots am Pfeil *Regler* Untermenüs zur Konfiguration der PID-Regler. Dort können die Regelparameter K_p , T_n , T_v , T_f und *deadband* geändert werden.

Für die Regelung von pO₂ und Druck können über die Hotspots bei *rpm* und *Valve* die Wertebereiche von Drehzahl [min⁻¹] und Ventilöffnung [%] eingeschränkt werden.

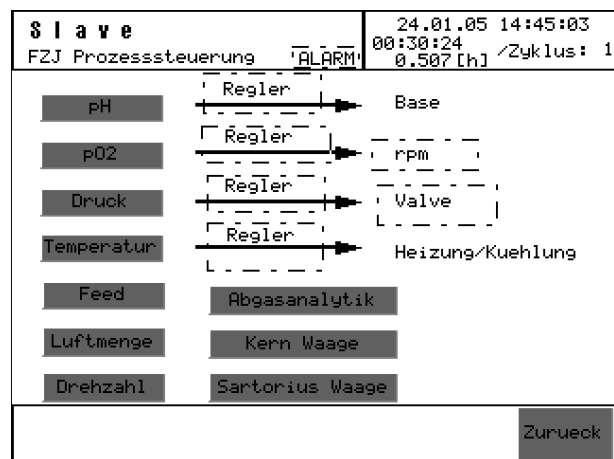


Abbildung B-6: Konfiguration Slave

pH-Wert

Über den Button *pH* gelangt man zu einem Untermenü in dem der aktuelle Istwert angezeigt wird und die pH-Sonde kalibriert werden kann. Mit *New* kann die Kalibrierung gestartet werden. Hierzu wird der aktuelle pH-Wert der Kalibrierlösung zur Nullpunktbestimmung (pH 7) eingegeben und nach Einstellung eines konstanten Werts mit *Set* bestätigt. Mit einer zweiten Kalibrierlösung (z.B. pH 4) wird die Steigung bestimmt.

Nach erneutem Drücken von *Set* wird die Kalibriergerade berechnet und angezeigt. Diese gibt die Abhängigkeit des pH-Werts vom analogen Eingangssignal wieder. Unter *Gerätekonfiguration* kann der analoge Eingangsbereich des Messwertverstärkers geändert werden.

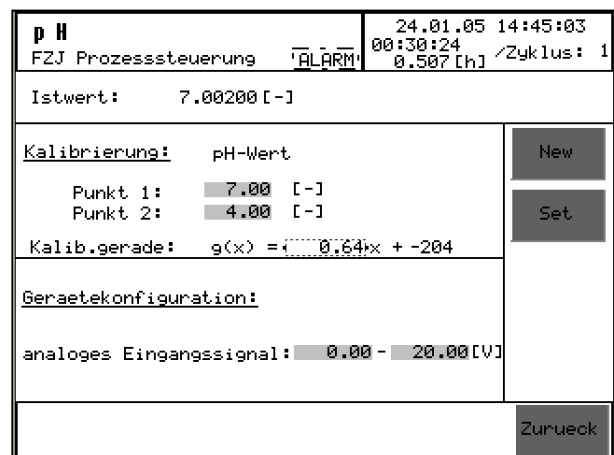


Abbildung B-7: pH-Wert

pH-Regler

Im Untermenü *pH-Regler* kann über einen Ein/Aus-Button der Regler an- oder ausgeschaltet werden. Über den zweiten Button kann zwischen manuell oder automatisch gewechselt werden. Im Modus *manuell* kann über das Eingabefeld im linken unteren Bereich ein Sollwert vorgegeben werden. Bei *automatisch* wird als Sollwert der aktuelle Istwert des Masters übernommen. Istwert, Sollwert und das vom Regler gelieferte Stellglied werden links in der Mitte angezeigt. Im rechten Bildbereich können die Reglerparameter des PID-Reglers verändert werden. Über den Button *save* wird der aktuelle Parametersatz in die User-Datei gespeichert. Mit *load user* werden die gespeicherten Daten geladen und mit *load default* werden die Werte auf die Standardeinstellungen zurückgesetzt.

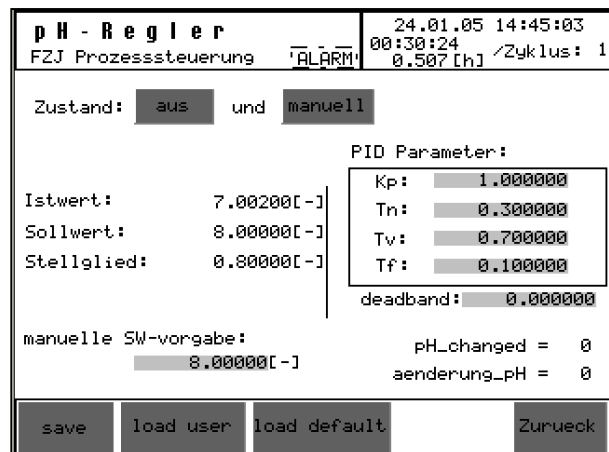


Abbildung B-8: pH-Regler

Für die Regelgrößen pO_2 , Druck und Temperatur ist der oben gezeigte Bildaufbau vergleichbar und wird daher hier nicht weiter beschrieben.

pO_2 -Regelung über die Drehzahl

Für die Kalibrierung und Konfiguration des pO_2 -Wertes und des Reglers sind die Menüs vergleichbar mit den für den pH-Wert gezeigten. Über den Hotspot *rpm* im Menü *Slave* erreicht man ein Menü, in dem der Drehzahlbereich (*erforderlich min/max*) des Rührers eingeschränkt werden kann. Wird der Regler ausgeschaltet, dreht der Rührer mit dem unter *Setpoint* angegeben Wert. Unter *Drehzahlgrenzwerte* ist der maximale Drehzahlbereich des Rührers angegeben.

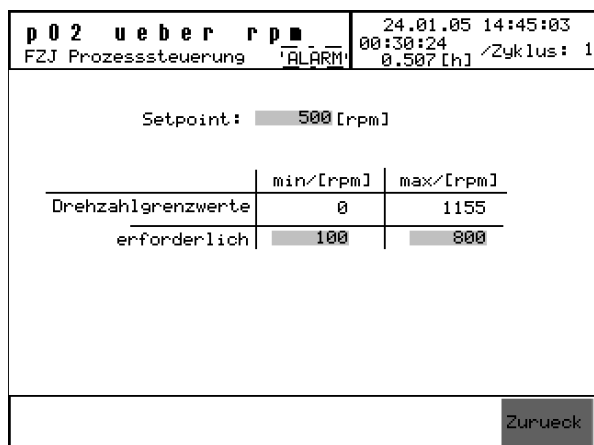


Abbildung B-9: pO_2 -Regelung über rpm

Druck

Dieses Menü erreicht man über den Button *Druck* im Menü *Slave*. Hier können der Drucktransmitter (Sensor) und das Proportionalventil (Aktor) konfiguriert werden.

Für beide Geräte kann der analoge und physikalische Signalbereich verändert werden. Zusätzlich kann eine manuelle Öffnung des Proportionalventils angegeben werden, die eingestellt wird, wenn der Regler nicht aktiviert ist. Ist die manuelle Öffnung ausgeschaltet, wird bei deaktiviertem Regler das Proportionalventil zu 100% geöffnet

Druck		24.01.05 14:45:03	
FZJ Prozesssteuerung		ALARM	00:30:24 / Zyklus: 1
Istwert:	0.52000 [bar]		
Sollwert:	0.50000 [bar]		
Gerätekonfiguration:			
Drucktransmitter	analog Signal/[V]	Druck/[bar]	
min	0.00	0.000	
max	10.00	2.000	
Proportionalventil	analog Signal/[mA]	Öffnung/[%]	
min	0.00	0	
max	20.00	100	
manuelle Öffnung:		50.000[%]	aus
			Zurueck

Abbildung B-10: Druck

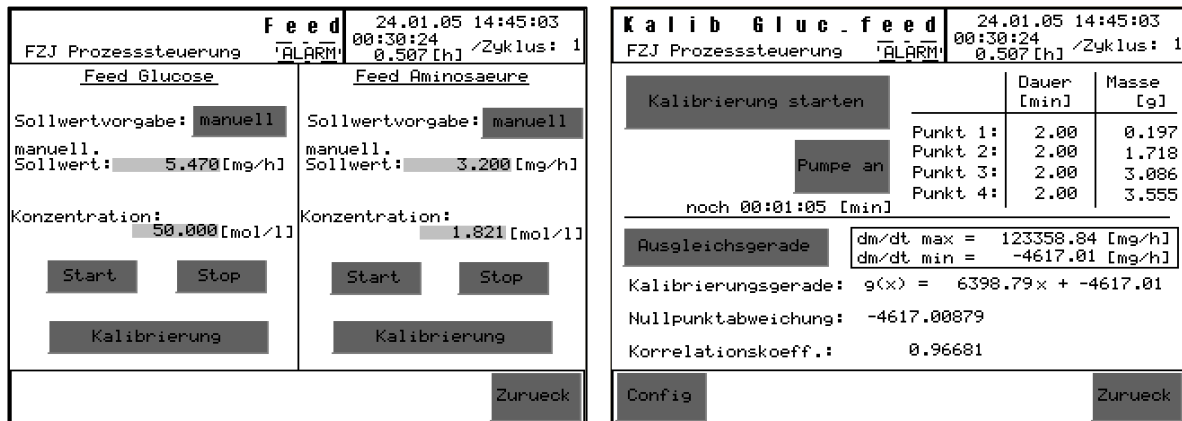
Steuerung und Kalibrierung Feed

Die Zufuhr von einem Substrat (z.B. Glukose) und einer weiteren Lösung (z.B. Aminosäure) kann über Schlauchpumpen erfolgen. Die Sollwertvorgabe kann manuell oder über den Istwert des Master-Reaktors erfolgen. Zwischen diesen beiden Modi kann jeweils mit einem *Toggle*-Button gewechselt werden. Der manuelle Sollwert [mg/h] kann über ein Eingabefeld verändert werden. Zur Berechnung des Sollwerts für den Slave aus dem Istwert des Masters muss die Konzentration der verwendeten Lösung eingegeben werden. Mit den Buttons *Start* und *Stop* kann der Feed an- und abgeschaltet werden. Mit *Kalibrierung* gelangt man zu einem Untermenü, in dem die Schlauchpumpe kalibriert werden kann.

In diesem Untermenü kann mit *Kalibrierung starten* eine 4-Punkt-Kalibrierung durchgeführt werden. Für jeden Punkt muss die Pumpdauer [min] eingegeben werden. Mit dem Button *Pumpe an* wird die Pumpe gestartet. Die Restzeit bis zum Stopp der Pumpe wird angezeigt. Die pro Kalibrierpunkt gemessene Masse [g] kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt eingegeben werden. Nach Eingabe der Masse für jeden Punkt kann mit dem Button *Ausgleichsgerade* die Regressionsgerade berechnet werden, die die Abhängigkeit der pro Stunde geförderten Menge vom analogen Ausgangssignal wiedergibt. Angezeigt werden der minimale und maximale Massestrom [mg/h], die Nullpunktabweichung und der Korrelationskoeffizient. Mit diesen Werten kann die Güte der durchgeführten Kalibrierung beurteilt werden.

Über den Button *Config* können die analogen Ausgangswerte konfiguriert werden. Zusätzlich kann hier für jeden Punkt der Kalibrierung der Ausgangswert in [%] angegeben werden.

Abbildung B-11: Menüs für die Steuerung und Kalibrierung der Glukose- und der Aminosäure-zufütterung



Flow (Luft, O₂, Mischung)

Im Untermenü Flow, welches über den Schalter *Luftmenge* erreicht wird, kann manuell der Sollwert für technische Luft, Sauerstoff und eine Mischung aus beiden angegeben werden. Diese können über an/aus-Buttons einzeln aktiviert werden.

Zusätzlich kann hier der analoge und physikalische Signalbereich der Sensoren (Eingang) und Aktoren (Ausgang) konfiguriert werden.

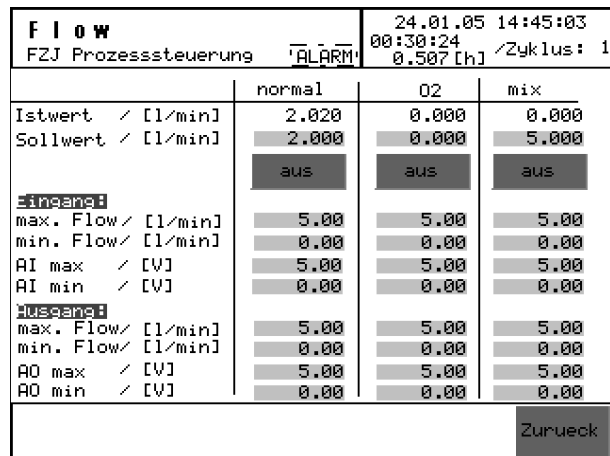


Abbildung B-12: Flow

Abgasanalytik

In diesem Menü können die analogen und physikalischen Bereiche der Sensoren für Sauerstoff und Kohlendioxid konfiguriert werden. Zusätzlich wird hier der aktuelle Istwert in [%] angezeigt.

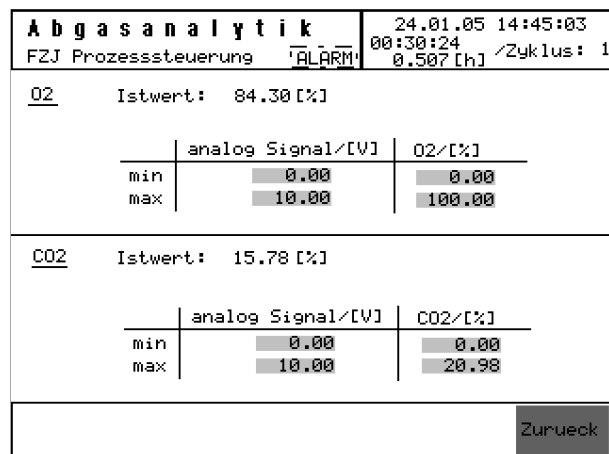


Abbildung B-13: Abgasanalytik

B.4 Ergebnisse der isotopisch instationären ¹³C-Stoffflussanalysen

Nachfolgend sind die Ergebnisse des 1. Markierungsexperiments dargestellt.

Abbildung B-14: Zeitliche Veränderung der Massenisotopomere der intrazellulären Metabolit-pools des 1. Markierungsexperiments

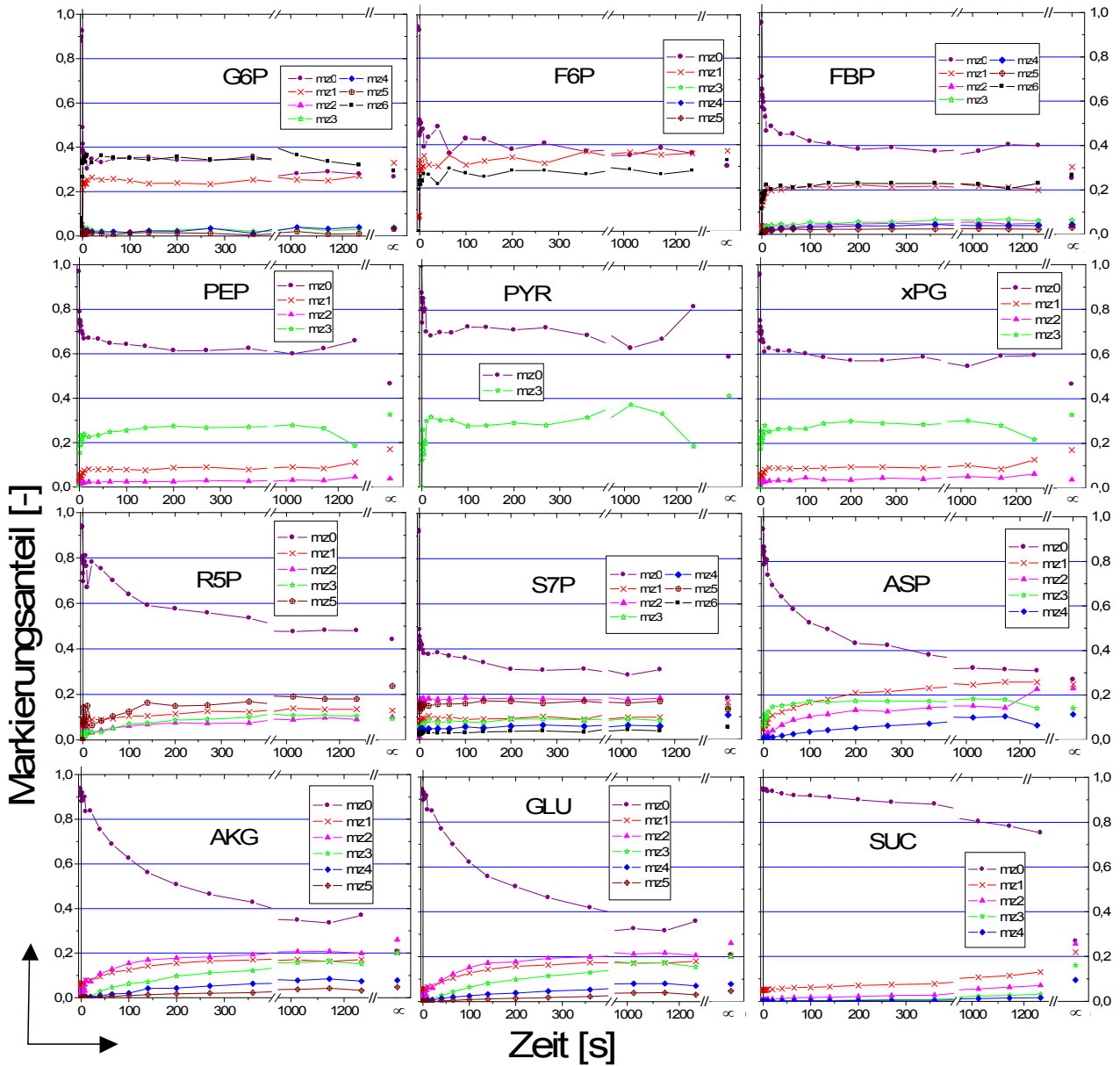


Abbildung B-15: Gemessene intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite von Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Zitronensäurezyklus und Anpassung der Daten für das 1. Markierungsexperiment

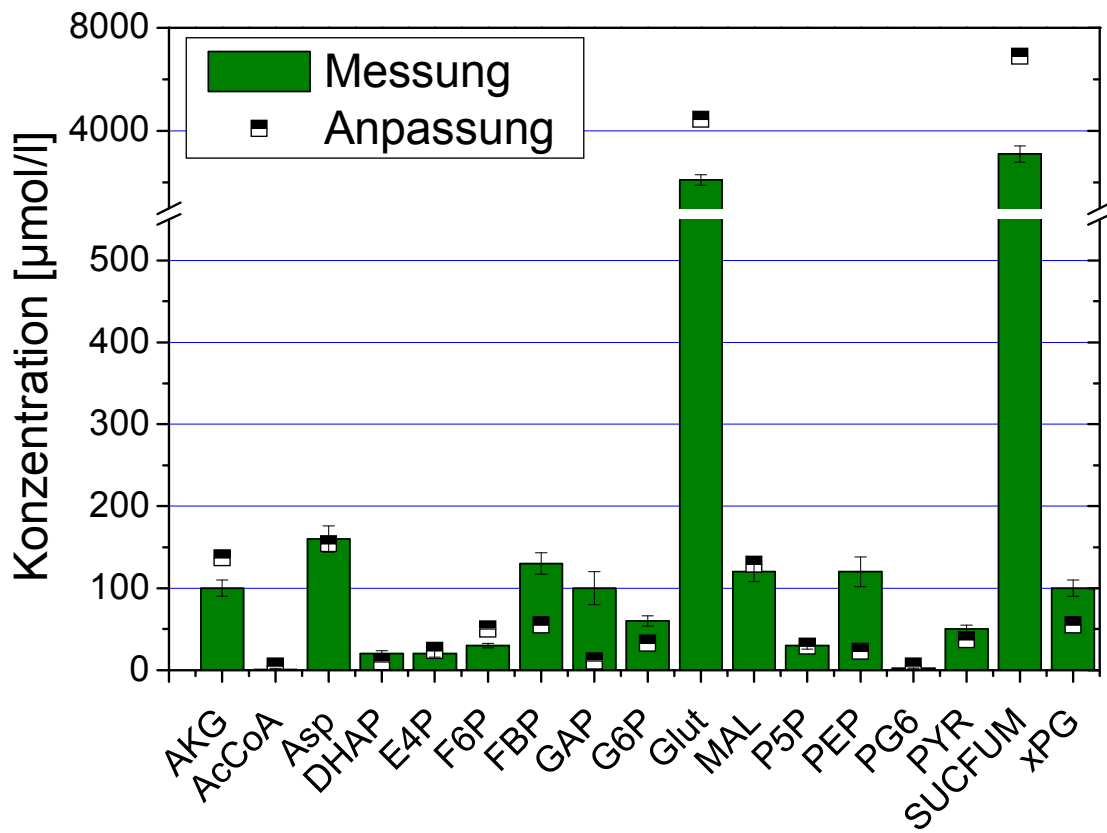


Tabelle B-8: Gemessene intrazelluläre Konzentrationen und Anpassung der Daten mit der relativen Standardabweichung (RSA) für das 1. Markierungsexperiment

Metabolit	Messung	Anpassung und Statistik	
	Konzentration [mmol/l]	Konzentration [mmol/l]	RSA [%]
AKG	0,100	0,137	10,00
AcCoA	0,001	0,005	99,67
Asp	0,160	0,154	10,00
CO ₂	0,030 ^a	0,058	153,46
CitlCit	0,200 ^a	0,012	109,18
DHAP	0,020	0,010	19,95
E4P	0,020	0,024	18,58
F6P	0,030	0,050	8,40
FBP	0,130	0,055	8,28
GAP	0,100	0,011	19,96
G6P	0,060	0,033	9,55
Glut	2,100	4,452	8,01
GlyOx	0,100 ^a	8,854	733,35
MAL	0,120	0,129	10,00
OAA	0,100 ^a	0,015	758,70
P5P	0,030	0,029	14,94
PEP	0,120	0,023	14,93
PG6	0,002	0,005	19,98
Pyr	0,050	0,037	9,95
P5Pxch	10,000 ^a	4,967	10,50
S7P	0,100 ^a	0,056	21,12
SuccFUM	3,100	6,895	8,09
xPG	0,100	0,055	9,88

^a Startwert für die Parameteranpassung

Abbildung B-16a: Anpassung der zeitlichen Markierungsverläufe der ersten 20 Sekunden des ersten Markierungsexperiments für die Metabolite der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs

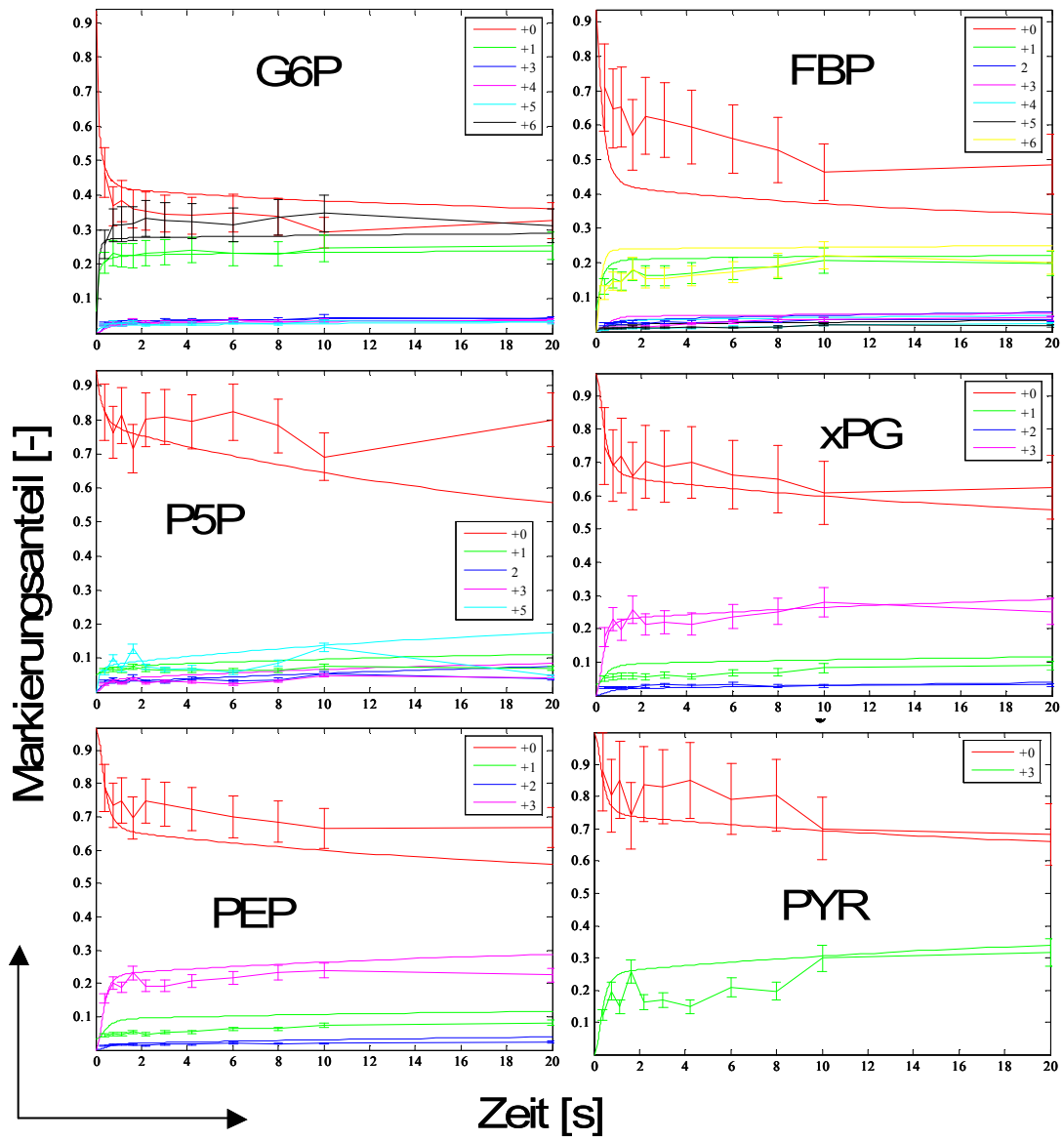


Abbildung B-16b: Anpassung der zeitlichen Markierungsverläufe der ersten 20 Sekunden des 1. Markierungsexperiments für die Metabolite des Zitronensäurezyklus

