

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Metabolische Analyse des Zentralstoffwechsels von  
*Escherichia coli***

Julia Hiller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

Doktor-Ingenieurs  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Johann Stichlmair

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Tim C. Lüth

Die Dissertation wurde am 27.04.2006 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am  
27.06.2006 angenommen.



## **Danke!**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die in der einen oder anderen Weise zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz, der mir unter anderem durch Teilzeit- und Heimarbeit die Möglichkeit gegeben hat, trotz Schwangerschaft und Kinderbetreuung an seinem Lehrstuhl ein interessantes Thema zu bearbeiten und zu promovieren. Für das entgegengebrachte Vertrauen ganz vielen Dank!

Bei meinem Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr.-Ing. Johann Stichlmair und meinem Zweitprüfer Herrn Prof. Dr. Tim Lüth für die sehr zügige Übernahme Ihrer Aufgaben.

Bei meinen (ehemaligen) ZimmerkollegInnen Hendrik Balk, Vera Reimann und Markus Amann für das prima Klima, besonders nach diversen Unifeiern.

Bei Irma Einsle für ihre Hilfe und die schöne Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Bei Norbert Werth und Karl-Heinz Zacher für die unermüdliche und immer schnelle Herstellung von Probensonden und -gefäßen und für die Unterstützung bei allen technischen Problemen.

Bei Georg Kojro für alle schnellen Supertricks.

Bei Dr. Ezequiel Franco-Lara und Hannes Link für alle Diskussionen und Anregungen zu MCA, MFA und Matlab.

Bei der ersten Truppe Maya Amidjojo und Robert Puskeiler für die freundliche Aufnahme an „ihrem“ Lehrstuhl.

Bei Helge Engelking für die nachmittäglichen Kaffeepausen.

Bei Holger Pfründer für die fruchtbaren Diskussionen.

Bei Andi Kusterer für die kreativen Gespräche.

Bei Armin Tiemeyer für seinen unermüdlichen Kampf gegen den Untergang im Labor.

Bei allen anderen (ehemaligen) Kollegen für das angenehme Arbeitsklima.

Bei allen Studenten Selina Biehl, Elisabeth Eckers, Cornelius Faber, Sarah Fendt, Michael Finke, Peter Haider, Nils Janzen, Petra Kleiner, Andreas Kusterer, Liana Marin, Vasileios Papaioannou, Bernd Schwaiger, Michael Sogl für ihren tatkräftigen Einsatz und ihre Unterstützung.

Bei meinen Eltern Irmhild und Ralf Kern, bei meinen Brüdern Fabian und Christoph Kern und bei meinen Schwiegereltern Achim und Helga Hiller für ihren Rückhalt.

Bei meiner Freundin Barbara, die mir gezeigt hat, dass man auch im achten Monat noch promovieren kann.

Bei meiner Familie, Marc und Katja, für alles.

---

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	3
3	Theoretische Grundlagen	5
3.1	Kultivierung von Mikroorganismen	5
3.2	Biologische Grundlagen	15
3.3	Metabolomics	27
3.4	Stationäre Flussanalyse	32
3.5	Metabolische Kontrollanalyse	34
4	Material und Methoden	37
4.1	Biologisches Testsystem	37
4.2	Medien	37
4.3	Apparativer Aufbau	40
4.4	Durchführung der Kultivierungen	42
4.5	Zellaufschluss mit Standardaddition	46
4.6	Analytische Methoden	49
4.7	Stationäre Flussanalyse	57
5	Ergebnisse und Diskussion	59
5.1	Probenentnahme	59
5.2	Zellaufschluss	72
5.3	Untersuchungen im Fließgleichgewichtszustand	78
5.4	Untersuchungen im „quasi-stationären“ Zustand	116
5.5	Metabolische Kontrollanalyse	142
5.6	Vor- und Nachteile der vorgestellten Methodik	149
6	Zusammenfassung und Ausblick	151
7	Literaturverzeichnis	155
8	Abkürzungsverzeichnis	163

9	Anhang	i
9.1	Geräte und Chemikalien	i
9.2	Analytische Methoden	vi
9.3	Konstruktionszeichnungen Probenentnahmesystem	xii
9.4	Untersuchungen im Fließgleichgewicht	xvi
9.5	Untersuchungen der quasi-stationären Zustände	xviii
9.6	Metabolische Kontrollanalyse	xxii

## 1 Einleitung

Mikroorganismen können aus Sicht der Ingenieurwissenschaften als selbstproduzierende Fabriken im Nanoliter-Maßstab verstanden werden. Die meisten Bakterien sind, im Gegensatz zu Mensch und Tier, in der Lage, alle zelleigenen Bestandteile selbst zu synthetisieren. In einem hochkomplexen Reaktionsnetzwerk werden die aus der Umgebung aufgenommenen Nährstoffe zunächst in Grundbausteine zerlegt und anschließend zu zelleigenen Makromolekülen aufgebaut. Viele Zwischenprodukte des intrazellulären Zellstoffwechsels sind begehrte Feinchemikalien.

Für das Jahr 2010 wird erwartet, dass der Anteil an biotechnologisch hergestellten Feinchemikalien von 8 % im Jahre 2001 auf 60% des Gesamtumsatzes chemischer Produkte ansteigt (Festel et al., 2004). Der Gesamtanteil an biotechnologisch hergestellten Chemieprodukten soll dann bei etwa 20% liegen, was einem Umsatz von 310 Milliarden US Dollar entspricht.

Natürliche Organismen regulieren ihren Stoffwechsel weitestgehend so, dass alle intrazellulären Stoffe in genau den für die jeweilige Funktion benötigten Mengen synthetisiert werden. Unter natürlichen Bedingungen ist die Überproduktion von Stoffwechselintermediaten evolutorisch von Nachteil. Das sogenannte *Metabolic Engineering* hat die systematische Analyse und gezielte Veränderung des Zellstoffwechsels von Organismen zum Ziel. *Metabolic Engineering* ist die Optimierung von Zellaktivitäten durch Manipulation von enzymatischen, Transport- und regulatorischen Funktionen der Zelle durch Nutzung der rekombinanten Gentechnologie (Bailey, 1991). Etwas spezifischer wird *Metabolic Engineering* von Stephanopoulos (1999) als die *zielgerichtete* Optimierung von Produktivität oder Zelleigenschaften durch Modifikation von *spezifischen* biochemischen Reaktionen oder durch Einbringung von neuen Reaktionen mittels rekombinanter Gentechnologie definiert.

Durch gentechnische Manipulationen können gezielt kontrollierende Enzymkonzentrationen eines biotechnologisch relevanten Stoffwechselweges überexprimiert werden. Dabei ist die traditionelle Herangehensweise, durch Überexprimierung eines einzelnen geschwindigkeitskontrollierenden Enzyms die Produktivität eines Stoffwechselweges zu steigern, inzwischen überholt. Theoretische Überlegungen und praktische Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Aktivitätssteigerung aller Enzyme eines Stoffwechselweges der Fluss durch diesen Weg erhöht werden kann. Zum Beispiel zeigten Niederberger et al. (1992), dass die simultane Überexprimierung aller fünf Enzyme des Stoffwechselweges von Chorismat zu Tryptophan in Hefe eine deutliche Steigerung der Tryptophanproduktion bewirkte, wohingegen die Überexprimierung eines einzelnen Enzyms nur eine geringe Steigerung hervorrief. Die Herausforderung liegt nun darin, einen Kompromiss zu finden zwischen der möglicherweise erfolgreichen, aber bei langen Stoffwechselwegen nicht oder nur schwer durchführbaren Veränderung aller Enzyme eines Syntheseweges und der einfachen, aber möglicherweise erfolglosen Veränderung eines einzelnen Enzyms (Schuster, 1999). Ziel ist es, einige wenige Enzyme eines Stoffwechselweges zu identifizieren, deren Überexprimierung hinsichtlich einer Produktivitätssteigerung vielversprechend erscheint. Laut Stephanopoulos (1999) ist somit der signifikanteste Beitrag des *Metabolic Engineering* darin zu sehen, dass die Bedeutung metabolischer Stoffflüsse und deren Kontrolle unter *in-vivo* Bedingungen hervorgehoben wird.



## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Zur zielgerichteten Bioprozessoptimierung, sei es durch eine optimierte Prozessführung oder durch *Metabolic Engineering*, ist die Kenntnis von Kontrollmechanismen metabolischer Stoffflüsse unter *in-vivo* Bedingungen essenziell. Im idealsten Fall wird ein ganzes Stoffwechselnetzwerk anhand von kinetischen Modellen der beteiligten Enzyme und Metabolite beschrieben, so dass eine prädiktive Modellierung der biochemischen Reaktionen erfolgen kann. Allerdings ist die Prozessentwicklung durch die Komplexität des Stoffwechsels noch weit von der „Silicon cell“, der berechenbaren Zellfabrik, entfernt (Westerhoff, 2001).

Eine Methode zur Analyse des kontrollierenden Einflusses einzelner Enzyme auf einen bestimmten Stoffwechselweg, zum Beispiel einen interessierenden Syntheseweg, bietet die metabolische Kontrollanalyse (*Metabolic Control Analysis*, MCA). Sogenannte Flusskontrollkoeffizienten quantifizieren den relativen Einfluss eines Enzyms auf den betrachteten Syntheseweg. Auf diese Weise können vielversprechende Enzyme für ein zielgerichtetes *Metabolic Engineering* identifiziert werden. Eine indirekte Methode solche Kontrollkoeffizienten zu berechnen basiert auf der Kenntnis der Substratkonzentrationen und der kinetischen Parameter der beteiligten Enzyme eines Stoffwechselweges.

Ein Problem bei der Nutzung von Enzymkinetiken zur Modellierung von Stoffwechselnetzwerken oder zur metabolischen Kontrollanalyse liegt in der Ermittlung der kinetischen Modellparameter: Die Bestimmung von kinetischen Enzymparametern erfolgt normalerweise unter definierten Bedingungen *in-vitro*. Inwieweit die so ermittelten Parameter auf die intrazellulär vorliegenden Bedingungen übertragbar sind, ist unbekannt.

Daher ist das wesentliche Ziel dieser Arbeit die Bestimmung der kinetischen *in-vivo* Parameter von zellinternen Enzymen des Zentralstoffwechsels am Beispiel von *Escherichia coli*. Zur Ermittlung der *in-vivo* Enzymkinetiken sollen

Reaktionsgeschwindigkeiten und Metabolitkonzentrationen des Zentralstoffwechsels in unterschiedlichen stationären metabolischen Zuständen gemessen werden. Unterschiede zu publizierten, *in-vitro* bestimmten Parametern sollen ermittelt werden. Die Nutzung von nicht-stationären Zuständen zur schnelleren Bestimmung von *in-vivo* Enzymkinetiken soll evaluiert werden.

Folgende Arbeitsschritte werden zum Erreichen der Zielsetzung verfolgt:

- Entwicklung eines Verfahrens zur repräsentativen Konzentrationsbestimmung von intrazellulären Metaboliten.
- Durchführung von kontinuierlichen Kultivierungen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen bei verschiedenen Wachstumsraten zur Induzierung unterschiedlicher stationärer, metabolischer Zustände.
- Durchführung von stationären Stoffflussanalysen in verschiedenen metabolischen Zuständen zur Abschätzung von intrazellulären Reaktionsgeschwindigkeiten.
- Bestimmung von intrazellulären Konzentrationen der Metabolite des Zentralstoffwechsels von *Escherichia coli* in verschiedenen metabolischen Zuständen.
- Kombination der stationären Stoffflussanalysen und der intrazellulären Metabolitkonzentrationen zur Bestimmung von *in-vivo* Kinetiken von Enzymen des Zentralstoffwechsels von *Escherichia coli*.
- Durchführung von kontinuierlichen Kultivierungen mit sich stetig ändernder Durchflussrate zur Induzierung von „quasi-stationären“<sup>1</sup> Zuständen. Korrelation von „quasi-stationären“ Stoffflussanalysen und Metabolitkonzentrationen zur Bestimmung von *in-vivo* Kinetiken.

---

<sup>1</sup> Zeitliche Änderungen in Stofffluss und Metabolitkonzentration sind vernachlässigbar klein.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Kultivierung von Mikroorganismen

#### 3.1.1 Wachstum und Formalkinetik

Heterotrophe Mikroorganismen benötigen für ihr Wachstum organische Kohlenstoffverbindungen, organische oder anorganische Stickstoffverbindungen sowie Mineralsalze und eventuell Vitamine. Somit enthalten definierte Nährmedien (Minimalmedien) eine Kohlenstoffquelle (zum Beispiel Glucose), eine Stickstoffquelle (zum Beispiel Ammonium) und eine Reihe von Salzen und Vitaminen. Damit sind reproduzierbare Kultivierungen und einfache Elementenbilanzen möglich. Komplexmedien enthalten Bestandteile wie zum Beispiel Hefeextrakt, Pepton, Melasse oder Maisquellwasser, die aus einer Vielzahl von Zuckern, Aminosäuren, Mineralsalzen und Vitaminen bestehen. Komplexmedien werden bei der Kultivierung anspruchsvoller Mikroorganismen verwendet oder wenn die Bestandteile als Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie günstig zur Verfügung stehen.

Bioprozesse lassen sich durch mathematische Modelle beschreiben. Die Modelle basieren stets auf der Kombination von Massenbilanzen und formalkinetischen Ansätzen.

#### **Formalkinetik**

Die formalkinetische Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgt in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen und gegebenenfalls Produktkonzentrationen.

Die formalkinetischen Modelle unterliegen den folgenden Annahmen: Das Zellsystem ist unsegregiert, das heißt, die Zelleigenschaften können als Mittelwert betrachtet werden. Das zelluläre System ist nicht strukturiert, was bedeutet, dass es als eine Komponente betrachtet werden kann. Es liegt balanciertes Zellwachstum vor, das

heißt, die mittlere Zellzusammensetzung hängt nicht von der Entwicklung der Population ab. Unter diesen Annahmen kann die Zelle als eine „black-box“ mit spezifischen Aufnahme- oder Bildungsrate einer Komponente  $i$  betrachtet werden (Gleichung 3.1).

**Gleichung 3.1:** 
$$q_i = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_i}{dt}$$

mit  $q_i$  spezifische Aufnahme- oder Bildungsrate der Komponente  $i$ ,  $g \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$

$c_X$  Biotrockenmassekonzentration,  $g \text{ L}^{-1}$

$c_i$  Konzentration der Komponente  $i$ ,  $g_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$

Im Spezialfall der Biomassebildung wird die spezifische Bildungsrate zur spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  (Gleichung 3.2).

**Gleichung 3.2:** 
$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt}$$

mit  $\mu$  spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$

Wird eine Komponente des Mediums limitierend, während die restlichen Mediumsbestandteile im nicht inhibierenden Überschuss vorliegen, so kann die spezifische Wachstumsrate anhand des Monod-Modells in Abhängigkeit von der limitierenden Substratkonzentration nach Gleichung 3.3 formal kinetisch formuliert werden.

**Gleichung 3.3:** 
$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S}$$

mit  $\mu_{\max}$  spezifische Wachstumsrate unter nicht limitierten Bedingungen,  $\text{h}^{-1}$

$c_S$  Konzentration des limitierenden Substrats,  $g \text{ L}^{-1}$

$K_S$  Sättigungskonstante des limitierenden Substrats,  $g \text{ L}^{-1}$

Die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  kann als Summe der Substrataufnahme für Wachstum  $q_{S,\mu}$ , für den Erhaltungsstoffwechsel  $q_{S,m}$  und für die Produktbildung  $q_{S,P}$  formuliert werden (Gleichung 3.4).

**Gleichung 3.4:** 
$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,m} + q_{S,P}$$

Durch Ausbeutekoeffizienten oder Ertragskoeffizienten („yield“)  $Y_{ij}$  können die unterschiedlichen spezifischen Aufnahme- oder Bildungsraten miteinander verknüpft werden (Gleichung 3.5). In integraler Form beschreibt zum Beispiel der Ertragskoeffizient  $Y_{X/S}$  das Verhältnis von gebildeter Biomasse zu verbrauchtem Substrat.

**Gleichung 3.5:** 
$$Y_{i/j} = \frac{q_i}{q_j} = \frac{dc_i}{dc_j}$$

mit  $Y_{i/j}$  Ertragskoeffizient der Komponente i bezogen auf Komponente j,  $g \cdot g^{-1}$

### Massenbilanz

Unter der Annahme der Betrachtung eines „idealen Rührkesselreaktors“, das heißt unter isotropen Bedingungen, bei denen alle Konzentrationen, physikalischen Eigenschaften des Reaktionsmediums und Reaktionsgeschwindigkeiten räumlich konstant sind, kann die Stoffbilanz einer Komponente i in der Flüssigphase allgemein nach Gleichung 3.6 formuliert werden.

**Gleichung 3.6:** 
$$\frac{d(c_i \cdot V_R)}{dt} = \dot{V}_{\text{ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} - \dot{V}_{\text{aus}} \cdot c_{i,\text{aus}} + q_i \cdot c_X \cdot V_R$$

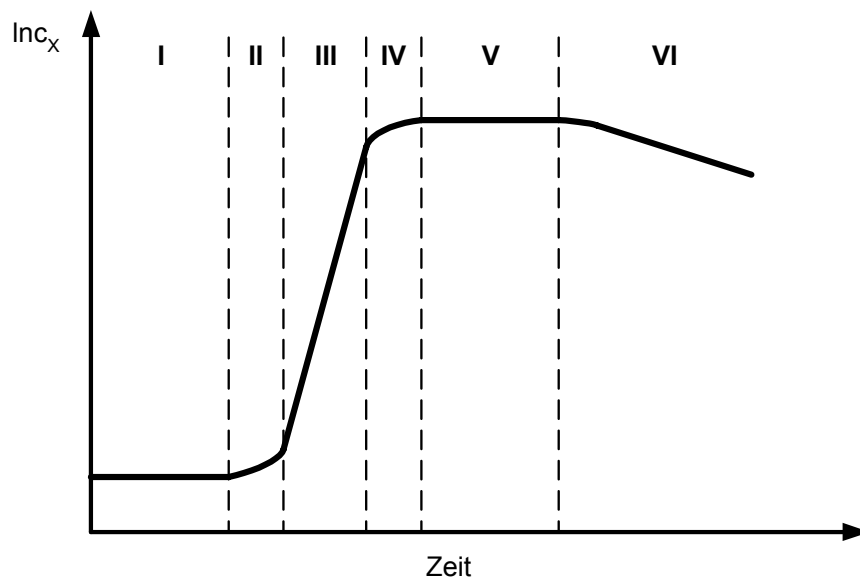
mit  $V_R$  Reaktionsvolumen, L

$\dot{V}_{\text{ein}}, \dot{V}_{\text{aus}}$  Flüssigkeitsstrom in den bzw. aus dem Reaktor,  $L \cdot h^{-1}$

$c_{i,\text{ein}}, c_{i,\text{aus}}$  Konzentration der Komponente i im Zulauf / Ablauf,  $g \cdot L^{-1}$

### 3.1.2 Kultivierung im Satzverfahren

Im Satzverfahren werden die Zellen in ein Medium übertragen, das alle zum Wachstum nötigen Nährstoffe enthält. Während der Kultivierung ist nur noch die Zugabe von Sauerstoff und eventuell Titrationsmittel notwendig. Wachsen die Organismen unter solchen zunächst nicht limitierenden, aber begrenzten Nährstoffbedingungen, so ergibt sich eine typische Wachstumskurve (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Wachstumsphasen einer typischen Kultivierung von Mikroorganismen im Satzverfahren. I: Adaptionsphase, II: Übergangsphase, III: exponentielle Phase, IV: Übergangsphase, V: stationäre Phase, VI: Absterbephase.**

In der Adaptionsphase (I) passen sich die Zellen den Kultivierungsbedingungen an. Dabei ist noch kein Wachstum erkennbar. Einer Übergangsphase (II), in der sich alle Zellen nach und nach an die Bedingungen adaptiert haben, schließt sich das exponentielle Wachstum an, für das eine konstante Wachstumsrate  $\mu_{max}$  erreicht wird (III). In der anschließenden Substratlimitierungsphase liegen ein oder mehrere Substrate in limitierender Konzentration vor (IV). Nach der Substratlimitierungsphase wird die stationäre Phase erreicht (V), in der sich die Wachstums- und die Absterberate ausgleichen, bis letztere schließlich in der Absterbephase (VI) überwiegt.

### Mathematische Beschreibung des Satzverfahrens

Da im Satzverfahren nichts zu- und abfließt und das Reaktionsvolumen konstant ist, vereinfacht sich im idealen Rührkesselreaktor die Massenbilanz zu:

**Gleichung 3.7:** 
$$\frac{dc_i}{dt} = q_i \cdot c_x$$

Die Kopplung von Stoffbilanz und Formalkinetik liefert die Modellgleichungen zur Beschreibung der Zeitverläufe für die Reaktionskomponenten Zellkonzentration (Gleichung 3.8) und (limitierende) Substratkonzentration (Gleichung 3.9) im Satzverfahren:

**Gleichung 3.8:** 
$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X$$

**Gleichung 3.9:** 
$$\frac{dc_S}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + q_{S,m}\right) \cdot c_X$$

In der exponentiellen Wachstumsphase ergibt sich durch Integration von Gleichung 3.8 mit einer konstanten Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  die Beschreibung des Zellwachstums.

**Gleichung 3.10:** 
$$c_X(t) = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t}$$

mit  $c_{X,0}$  Biotrockenmassekonzentration zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase,  $g_{BTM} L^{-1}$

Unter Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels erhält man durch Integration von Gleichung 3.9 den zeitlichen Verlauf der Substratkonzentration:

**Gleichung 3.11:** 
$$c_S(t) = c_{S,0} - \frac{c_{X,0}}{Y_{X/S}} \cdot (e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1)$$

### Massenbilanz für Sauerstoff

In aeroben Prozessen wird Sauerstoff als Substrat auch im Satzverfahren kontinuierlich nachgeliefert. Die Massenbilanz für Sauerstoff in der Flüssigphase (bei konstantem Reaktionsvolumen und idealer Rückvermischung im Reaktor) ergibt sich zu:

**Gleichung 3.12:** 
$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - \frac{\mu}{Y_{XO}} \cdot c_X$$

mit OTR Sauerstoffübertragungsrate (oxygen transfer rate),  $g L^{-1} h^{-1}$ ,  $mol L^{-1} h^{-1}$

OUR Sauerstoffaufnahme (oxygen uptake rate),  $g L^{-1} h^{-1}$ ,  $mol L^{-1} h^{-1}$

$k_L a$  volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff,  $s^{-1}$

$c_{O_2}$  Sauerstoffkonzentration im Medium,  $g L^{-1}$

$c_{O_2}^*$  Sättigungskonzentration von Sauerstoff im Medium,  $g L^{-1}$

$Y_{XO}$  Ertragskoeffizient Biotrockenmasse aus Sauerstoff,  $g_{BTM} g^{-1}$

Unter der Annahme, dass der alleinige Sauerstoffverbrauch durch den Stoffwechsel der Mikroorganismen verursacht wird (keine chemische Sauerstoffzehrung) gilt bei konstanter Sauerstoffkonzentration im Medium, dass die Sauerstoffaufnahme der eingetragenen Menge entspricht (OUR = OTR).

Somit kann die Sauerstoffaufnahme aus den Messwerten der Abgasanalytik errechnet werden. Grundlage ist zunächst die Massenerhaltung des Inertgasanteils der zur Begasung eingesetzten Luft:

**Gleichung 3.13:**  $\dot{V}_{\text{Gas,ein}} \cdot x_{\text{inert}}^{\text{ein}} = \dot{V}_{\text{Gas,aus}} \cdot x_{\text{inert}}^{\text{aus}}$

mit  $\dot{V}_{\text{Gas,ein}}$  Luftstrom in den Reaktor, L h<sup>-1</sup>

$\dot{V}_{\text{Gas,aus}}$  Abgasstrom aus dem Reaktor, L h<sup>-1</sup>

$x_{\text{inert}}^{\text{ein}}$  Molenbruch Inertgas bei Eintritt, -

$x_{\text{inert}}^{\text{aus}}$  Molenbruch Inertgas bei Austritt, -

Für die Summe der Molenbrüche gilt:

**Gleichung 3.14:**  $x_{\text{inert}} + x_{\text{CO}_2} + x_{\text{O}_2} = 1$

mit  $x_i$  Molenbruch der Komponente i, -

Damit lässt sich Gleichung 3.13 wie folgt umformen:

**Gleichung 3.15:**  $\dot{V}_{\text{Gas,ein}} \cdot K = \dot{V}_{\text{Gas,aus}}$

mit  $K = \frac{1 - x_{\text{O}_2}^{\text{ein}} - x_{\text{CO}_2}^{\text{ein}}}{1 - x_{\text{O}_2}^{\text{aus}} - x_{\text{CO}_2}^{\text{aus}}}$

Über die Massenbilanz für Sauerstoff in der Gasphase (Gleichung 3.16) kann nun die Sauerstoffaufnahme (OUR) unter der Annahme, dass OUR = OTR berechnet werden.

**Gleichung 3.16:**  $\text{OTR} = (\dot{V}_{\text{Gas,ein}} \cdot c_{\text{O}_2}^{\text{ein}} - \dot{V}_{\text{Gas,aus}} \cdot c_{\text{O}_2}^{\text{aus}}) \cdot \frac{1}{V_R}$

**Gleichung 3.17:**  $\text{OUR} = \dot{V}_{\text{Gas,ein}} \cdot (x_{\text{O}_2}^{\text{ein}} - K \cdot x_{\text{O}_2}^{\text{aus}}) \cdot \frac{1}{V_R \cdot V_{\text{mol}}}$

mit  $V_{\text{mol}}$  Molvolumen idealer Gase (22,414 L mol<sup>-1</sup>)

$V_R$  Reaktionsvolumen, L



Die Kohlendioxidentstehungsrate (carbon evolution rate, CER) kann analog berechnet werden:

**Gleichung 3.18:** 
$$\text{CER} = \dot{V}_{\text{Gas,ein}} \cdot (K \cdot x_{\text{CO}_2}^{\text{aus}} - x_{\text{CO}_2}^{\text{ein}}) \cdot \frac{1}{V_{\text{R}} \cdot V_{\text{mol}}}$$

### 3.1.3 Kultivierung im Zulaufverfahren

Im Zulaufverfahren wird den Zellen während der Kultivierung Substrat zugegeben, wodurch die Substratkonzentration niedrig gehalten werden kann. Dies wird im Falle von Substratinhibierung oder Überschussmetabolismus (zum Beispiel die aerobe Acetatproduktion bei *Escherichia coli* bei hohen Substrataufnahmeraten) genutzt, um geeignete Wachstumsraten ( $\mu < \mu_{\text{max}}$ ) über eine lange Zeit aufrecht zu erhalten. Die Formalkinetiken können weiterhin angewandt werden, allerdings muss bei den Bilanzen der Substratzulauf und die Volumenzunahme berücksichtigt werden. Dadurch ergibt sich für die Massenbilanz im idealen Zulaufreaktor folgende Beziehung:

**Gleichung 3.19:** 
$$\frac{d(c_i V_{\text{R}})}{dt} = \dot{V}_{\text{S,ein}} \cdot c_{i,\text{ein}} + q_i \cdot c_X \cdot V_{\text{R}}$$

mit  $\dot{V}_{\text{S,ein}}$  Zulaufvolumenstrom,  $\text{L h}^{-1}$

welche zu Gleichung 3.20 umgeformt werden kann.

**Gleichung 3.20:** 
$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{\dot{V}_{\text{S,ein}}}{V_{\text{R}}} \cdot (c_{i,\text{ein}} - c_i) + q_i \cdot c_X$$

Ausgehend von sterilem Zulaufmedium wird damit die Stoffbilanz für Zellen (Gleichung 3.21) und Substrat (Gleichung 3.22) zu:

**Gleichung 3.21:** 
$$\frac{dc_X}{dt} = -\frac{\dot{V}_{\text{S,ein}}}{V_{\text{R}}} \cdot c_X + \mu \cdot c_X$$

**Gleichung 3.22:** 
$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{\dot{V}_{\text{S,ein}}}{V_{\text{R}}} \cdot (c_{\text{S,ein}} - c_S) + q_S \cdot c_X$$

Der Zulaufvolumenstrom kann unter den vereinfachenden Annahmen, dass sowohl die Substratkonzentration im Reaktor im Vergleich zum Zulaufmedium als auch die Volumenzunahme vernachlässigbar ist, wie folgt eingestellt werden, um eine konstante Wachstumsrate aufrecht zu erhalten:

**Gleichung 3.23:** 
$$\dot{V}_{S,\text{ein}} = V_R \cdot \frac{\mu \cdot c_{X,0}}{Y_{X/S} \cdot c_{S,0}} \cdot e^{\mu = \text{const.} \cdot (t-t_0)}$$

mit  $c_{X,0}$ ;  $c_{S,0}$  Biotrockenmasse-, Substratkonzentration zum Zeitpunkt  $t=0$ , g L<sup>-1</sup>

Dieser Zustand kann aber nur beibehalten werden, solange weder eine andere Substratkomponente noch Sauerstoff limitierend wirken, oder eine Produktinhibierung eintritt. Da der Sauerstoffeintrag bei aerober Kultivierung oft begrenzt ist, wird in der Praxis meist ein lineares oder gar konstantes Zulaufprofil angelegt, obwohl dadurch die Wachstumsrate im Verlauf der Kultivierung kontinuierlich sinkt. Zur Berechnung der Sauerstoffaufnahme kann Gleichung 3.17 eingesetzt werden.

### 3.1.4 Kontinuierliche Kultivierung

Im kontinuierlichen Kultivierungsverfahren wird dem Reaktor kontinuierlich Substrat zugegeben und bei konstantem Reaktionsvolumen kontinuierlich Medium entnommen. Die Formalkinetiken bleiben bestehen, allerdings muss bei den Bilanzen der Zu- und Ablauf berücksichtigt werden. Es ergibt sich folgende Bilanz:

**Gleichung 3.24:** 
$$\frac{dc_i}{dt} \cdot V_R = \dot{V} \cdot c_{i,\text{ein}} - \dot{V} \cdot c_{i,\text{aus}} + q_i \cdot c_X \cdot V_R$$

wobei bei konstantem Reaktionsvolumen  $\dot{V} = \dot{V}_{S,\text{ein}} = \dot{V}_{\text{aus}}$  ist.

Damit wird die Stoffbilanz für Zellen (Gleichung 3.25) und Substrat (Gleichung 3.26) zu:

**Gleichung 3.25:** 
$$\frac{dc_X}{dt} = -\frac{\dot{V}}{V_R} \cdot c_X + \mu \cdot c_X$$

**Gleichung 3.26:** 
$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{\dot{V}}{V_R} \cdot (c_{S,\text{ein}} - c_{S,\text{aus}}) + q_S \cdot c_X$$

Die Durchflussrate ist definiert als:

**Gleichung 3.27:** 
$$D = \frac{\dot{V}}{V_R}$$

mit  $D$  Durchflussrate, h<sup>-1</sup>

Die hydraulische Verweilzeit im kontinuierlichen Betrieb ist definiert als:

**Gleichung 3.28:**  $\tau = D^{-1}$

mit  $\tau$  hydraulische Verweilzeit, h

Nach einer theoretischen Verweilzeit von  $5 \tau$  kann im kontinuierlichen Betrieb eines idealen Rührkesselreaktors von einem stationären Zustand (Fließgleichgewicht) ausgegangen werden, so dass gilt:  $\frac{dc_x}{dt} = 0$ . Hieraus ergibt sich für den stationären

Betrieb für Biomasse:

**Gleichung 3.29:**  $D = \mu$

Dies bedeutet, dass im kontinuierlichen Verfahren die Wachstumsrate der Mikroorganismen über die Durchflussrate eingestellt werden kann.

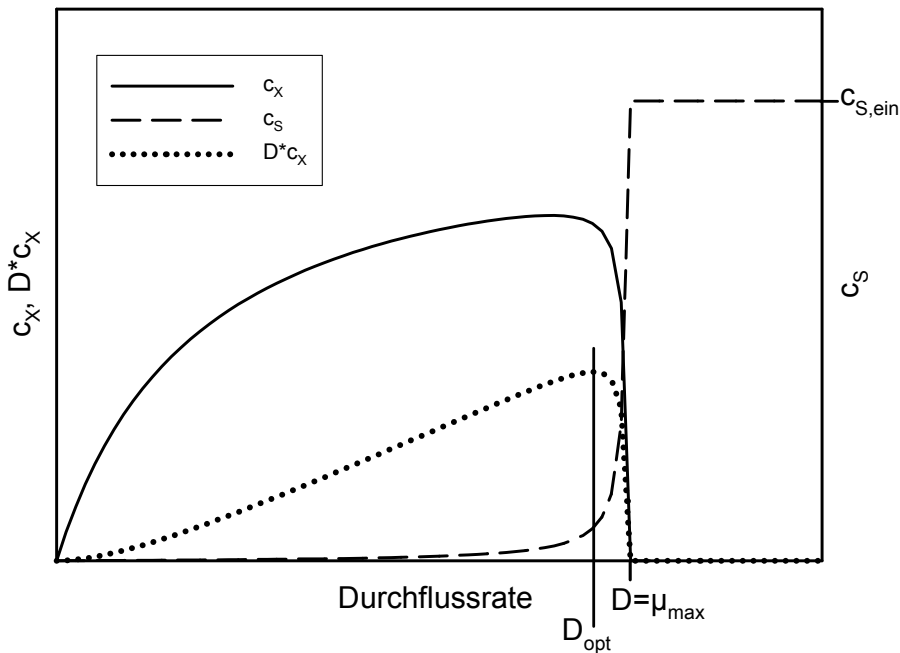
Für die Substrataufnahmerate ergibt sich im stationären Zustand:

**Gleichung 3.30:**  $q_s = D \cdot \frac{c_{S,\text{ein}} - c_{S,\text{aus}}}{c_x}$

Die Sauerstoffaufnahmerate (OUR) und die Kohlendioxidentstehungsrate (CER) sind mittels Gleichung 3.17 und Gleichung 3.18 über die Abgasanalytik zugänglich.

Nähert sich die Durchflussrate der maximalen Wachstumsrate, so sinkt die Biomassekonzentration im Reaktor, da die Mikroorganismen aus dem Reaktor „ausgewaschen“ werden, die Substratkonzentration im Reaktor steigt auf die Zulaufkonzentration,  $c_{S,\text{ein}}$ . (siehe Abbildung 3.2). Die Produktivität ( $c_x \cdot D$ ) durchläuft bei  $D_{\text{opt}}$  ein Optimum.

Wird die Substrataufnahme für Erhaltungsstoffwechsel einbezogen, so ergibt sich bei geringen Durchfluss- und damit geringen Wachstumsraten eine Abnahme der Biotrockenmasse, da bei kleinen Wachstumsraten der Anteil der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel stärker ins Gewicht fällt (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2:** X-D-Diagramm unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels. Aufgetragen sind die Biotrockenmassekonzentration, die Substratkonzentration und die Produktivität ( $D \cdot c_X$ ).

### Kohlenstoffbilanz

Wird die biochemische Umsetzung im Bioreaktor als „black box“ betrachtet, so muss auch für dieses System die Massenerhaltung gelten, das heißt, Elemente, die dem System zugeführt werden, müssen den Elementen entsprechen, die das System verlassen. Das bedeutet, dass der Kohlenstoff der Substrate (zum Beispiel Glucose) sich bei der Umsetzung durch Mikroorganismen in der Biomasse, dem entstehenden Kohlendioxid und den Nebenprodukten (zum Beispiel Acetat) wiederfinden muss.

Die Formulierung der Kohlenstoffbilanz erfolgt über die spezifischen Aufnahme- und Bildungsraten von  $M$  Produkten und  $N$  Substraten:

**Gleichung 3.31:**

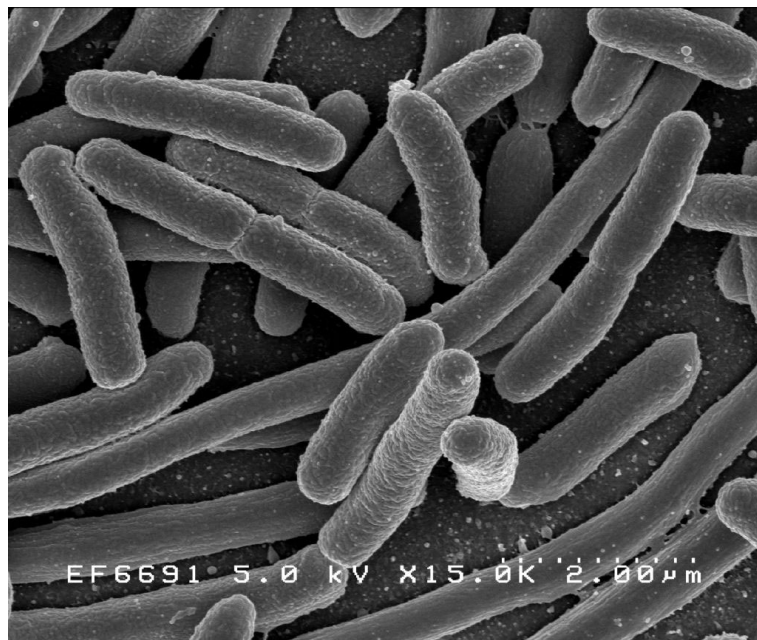
$$\mu + \sum_{i=1}^M h_{P,i} \cdot q_{P,i} - \sum_{i=1}^N h_{S,i} \cdot q_{S,i} = 0$$

Mit  $h_{P,i}, h_{S,i}$  Kohlenstoffgehalt von Produkt  $i$ , Substrat  $i$ ,  $\text{mol}_C \text{ mol}^{-1}$

## 3.2 Biologische Grundlagen

### 3.2.1 Modellorganismus *Escherichia coli*

Bei *Escherichia coli* (*E. coli*) handelt es sich um ein gram-negatives, nicht sporenbildendes, fakultativ anaerobes Bakterium der Familie Enterobacteriaceae. Normalerweise ist *E. coli* ein harmloser Keim der Darmflora von Warmblütern, er kann aber auch außerhalb des Darms einige Zeit überleben und dient daher als Indikator für fäkale Verunreinigungen im Trinkwasser. *E. coli* wurde erstmalig im Jahre 1885 vom deutschen Kinderarzt Theodor Escherich (1857-1911) entdeckt. Diese Bakterien sind gut bewegliche, peritrich begeißelte gerade Stäbchen mit einer Länge von ca. 1 – 2  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* (niaid, 2006).**

*Escherichia coli* wächst auf einfachen synthetischen Nährlösungen. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen bei Temperaturen um 37°C (mesophil) und einem pH zwischen 6,5 und 7,3. In komplexen Medien kann unter diesen Bedingungen die Verdopplungszeit bei 20 Minuten liegen. Der Stoffwechsel (Metabolismus) ist fakultativ anaerob, das heißt sowohl durch Atmung als auch durch Gärung unter Ausscheiden von organischen Säuren (Ethanol, Succinat, Lactat, Acetat, Formiat) wird Energie gewonnen. *E. coli* ist der sowohl molekularbiologisch als auch genetisch am besten untersuchte Organismus. Die einfache Kultivierung und gentechnische

Manipulierbarkeit von *E. coli* prädestinierten diesen Organismus zu seiner prominenten Rolle in der Biotechnologie.

### 3.2.2 Stoffwechsel

Sowohl während des Wachstums als auch während der Ruhe sind vegetative Zellen auf dauernde Energiezufuhr angewiesen. Die lebende Zelle stellt einen im höchsten Maße geordneten Zustand der Materie dar. Nicht nur um diesen Ordnungszustand aufzubauen, muss Energie aufgewendet werden, sondern auch, um ihn zu erhalten. Diese zur Erhaltung des Lebendzustandes sowie zur Neusynthese von Zellbestandteilen notwendige Energie gewinnt der Organismus im Stoffwechsel (Metabolismus), das heißt durch eine gesteuerte Umsetzung von Stoffen innerhalb der Zelle. Die in chemischen Verbindungen gespeicherte Energie wird aus der Umgebung aufgenommen. In der Zelle werden sie durch eine Reihe hintereinandergeschalteter Enzymreaktionen, über spezifische Stoffwechselwege, umgesetzt. Die Stoffwechselwege erfüllen zwei wesentliche Funktionen: Sie stellen Vorstufen für die Zellbestandteile zur Verfügung und machen Energie für Synthesen und andere energieaufwändige Prozesse verfügbar.

Der Zentralstoffwechsel von *E. coli* kann in mehrere Stoffwechselwege aufgeteilt werden (Abbildung 3.4).

#### **Glycolyse**

Die Glycolyse, auch bekannt als Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP-Weg) ist der wichtigste Abbauweg von Glucose zu Pyruvat (Pyr). In den ersten beiden Reaktionen wird Glucose-6-phosphat (G6P) durch das Enzym Phosphoglucoseisomerase (pgi) zu Fructose-6-phosphat (F6P) isomerisiert und anschließend durch 6-Phosphofruktokinase (pfk) mit ATP in 1-Stellung phosphoryliert. Das entstandene Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) wird durch Fructosebisphosphat-Aldolase (aldo) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) gespalten. Beide Triosephosphate stehen miteinander im Gleichgewicht; die Gleichgewichtseinstellung wird durch Triosephosphat-Isomerase (tim) katalysiert. Dihydroxyacetonphosphat kann zu Glycerinphosphat reduziert und unter Bildung von Glycerin und Orthophosphat hydrolysiert werden. Normalerweise wird jedoch auch

das zunächst bei der Aldolase-Reaktion gebildete Dihydroxyacetonphosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat überführt und oxidiert.

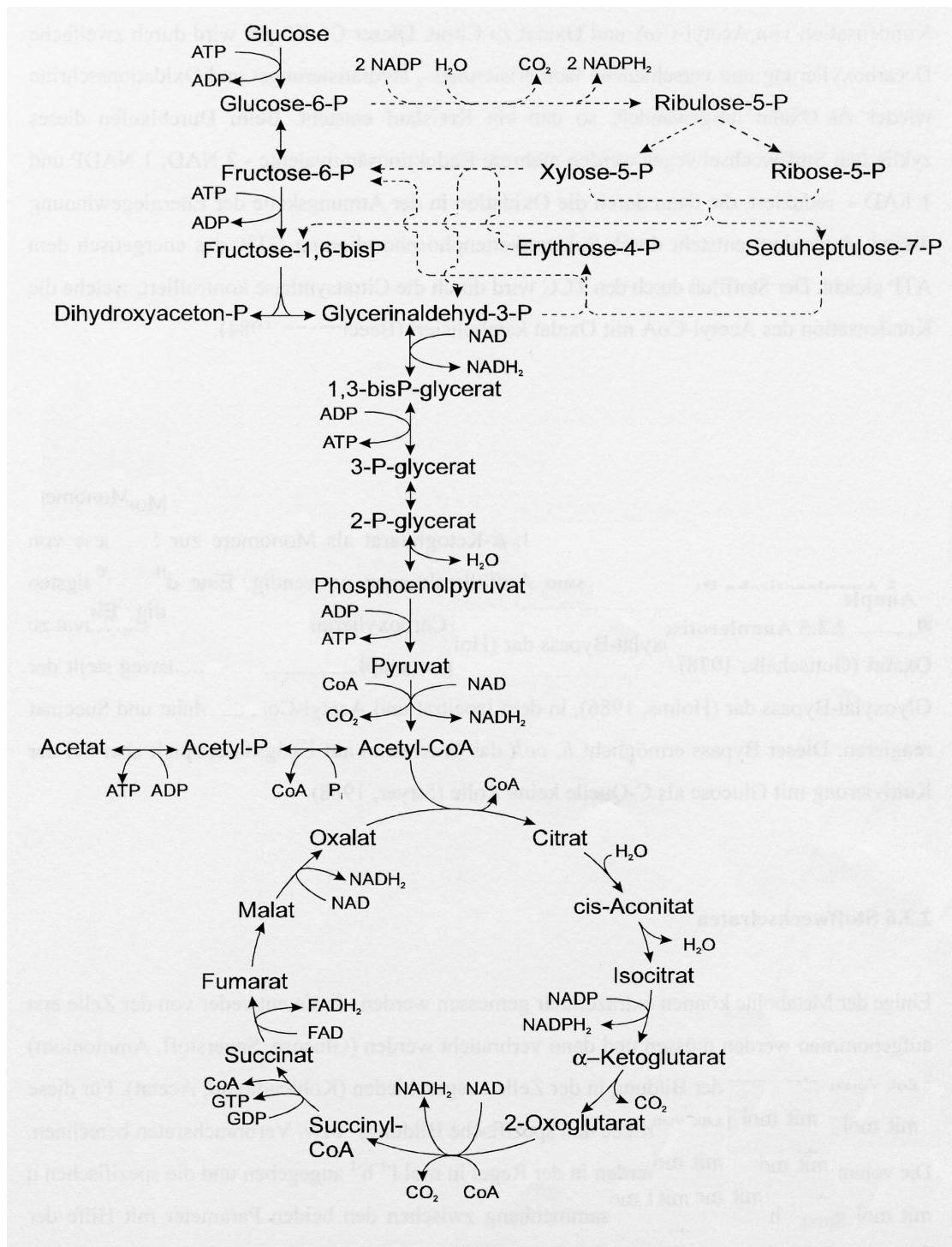


Abbildung 3.4: Schema des Zentralstoffwechsels von *E. coli*. Durchgezogene Linie: Glycolyse und TCA-Cyclus; gestrichelte Linie Pentosephosphat-Weg (modifiziert nach Kayser, 1999).

Die nun folgende Dehydrogenierung ist unter dem Aspekt der Energiegewinnung der wichtigste Schritt dieses Abbauweges. Ein Teil der bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 3-Phosphoglycerat (3PG) frei werdenden Energie wird in Form einer energiereichen Phosphatbindung konserviert. Zunächst wird die Aldehydgruppe an eine SH-Gruppe der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (gap-dh) gebunden, dann wird der Wasserstoff abgespalten und auf NAD übertragen. Die entstandene Acyl-S-Enzym-Verbindung ist als Thioester energiereich. Durch Phosphorolyse, einen Austausch der S-Enzym-Gruppe gegen Orthophosphat, bleibt diese Energie im Glycerat-1,3-bisphosphat erhalten. Durch Phosphoglycerat-Kinase wird diese energiereiche Phosphatgruppe auf ADP übertragen, und es entstehen 3-Phosphoglycerat und ATP. Da diese Phosphorylierung am Substrat erfolgt, bezeichnet man sie als Substratphosphorylierung. Die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat ist vom Vorhandensein sowohl der Enzymproteine als auch des Orthophosphats und des Adenosindiphosphats abhängig. Bei deren Abwesenheit kommt der Glucose-Abbau hier zum Stillstand (Pasteur-Effekt). Durch Phosphoglyceromutase wird 3-Phosphoglycerat in 2-Phosphoglycerat (2PG) umgewandelt, woraus unter Wasserabspaltung durch Enolase (eno) Phosphoenolpyruvat (PEP) entsteht. Dabei handelt es sich wiederum um einen Enolester, dessen energiereiche Phosphatgruppe durch Pyruvatkinase (pk) auf ADP übertragen wird und somit erhalten bleiben kann. Das entstandene Pyruvat ist die Vorstufe weiterer Abbau-, Umwandlungs- und Syntheseprozesse. Wird das gesamte durch die Fructose-1,6-bisphosphat-Spaltung gebildete Triosephosphat zu Pyruvat umgesetzt, so ist die Bilanz des Glucoseabbaus über die Glycolyse die Bildung von 2 Pyruvat, 2 ATP und 2 NADH.

Die Gluconeogenese ist die enzymgesteuerte Neubildung (anaplerotische Reaktionen) von Kohlenhydraten durch Umkehr der Glycolyse, zum Beispiel bei Wachstum auf Acetat, Lactat und Glycerin. Die Synthese von Zuckern erfolgt über dieselben Zwischenverbindungen, die an der Glycolyse beteiligt sind. Die praktisch irreversible Pyruvatkinase-Reaktion wird durch Phosphoenolpyruvat-Synthetase, die Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat phosphoryliert, umgangen. Die Reaktion von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat wird durch das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase katalysiert, und umgeht somit die irreversible 6-Phosphofruktokinase-Reaktion.



### **Pentosephosphatweg**

Im Pentosephosphatweg wird Glucose-6-phosphat durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (g6p-dh) dehydrogeniert, wobei der Wasserstoff auf NADP übertragen und 6-Phosphogluconolacton gebildet wird, welches spontan oder katalysiert (Gluconolactonase) zu 6-Phosphogluconat hydrolysiert. Letzteres wird durch 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu 3-Keto-6-phosphogluconat dehydrogeniert und zu Ribulose-5-phosphat decarboxyliert. Damit ist der eigentliche Oxidationsprozess abgeschlossen. Die folgenden Reaktionen sind lediglich Umwandlungsprozesse von Pentosephosphaten in Hexosephosphate und umgekehrt. Durch Transketolase (tk) und Transaldolase lassen sich die Pentosephosphate in zwei Fructose-1,6-bisphosphate und ein Glycerinaldehyd-3-phosphat umwandeln. Durch Isomerisierung von Fructose-6-phosphat zu Glucose-6-phosphat und Kondensation von zwei Triosephosphaten zu einem Hexosephosphat lassen sich die genannten Reaktionen zu einem Cyclus schließen, bei dessen einmaligem Umlauf aus drei Molekülen Glucose-6-phosphat zwei Moleküle Fructose-6-phosphat, ein Molekül Glycerinaldehyd-3-phosphat, drei CO<sub>2</sub> und dreimal zwei NADPH entstehen. Die Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Phosphogluconat-Dehydrogenase vieler, wenn nicht sogar der meisten Bakterien übertragen den Wasserstoff von ihren Substraten nicht nur auf NADP, sondern auch auf NAD. Der geschilderte Cyclus ist ein Nebenweg, dessen Bedeutung in der Bereitstellung von wichtigen Ausgangssubstanzen und Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H) für Syntheseprozesse zu sehen ist. *E. coli* verstoffwechselt bis zu 28 % der Glucose je nach Stoffwechselzustand über den Pentosephosphat-Weg und 72 % und mehr über die Glycolyse (Schlegel, 1992).

### **Tricarbonsäure-Cyclus**

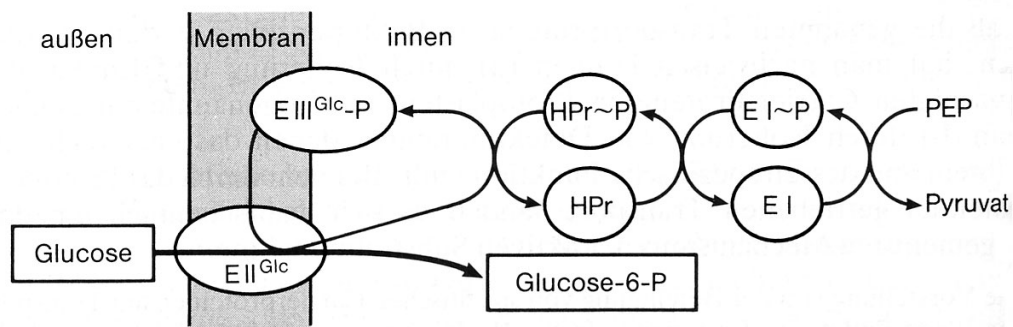
Der Tricarbonsäure-Cyclus (TCA-Cyclus, Zitronensäure-Cyclus, Krebs-Cyclus) stellt das intermediäre Stoffwechsel-Schema des oxidativen Endabbaus von Substraten (z.B. Glucose) dar und dient der Oxidation des C<sub>2</sub>-Körpers Acetat zu Kohlendioxid unter Abspaltung des Wasserstoffs.

An der Citrat-Synthase (cs) wird Acetyl-CoA zunächst an Oxalacetat (OAA) zu Citrat addiert, wobei Coenzym A abgespalten wird. Citrat wird asymmetrisch abgebaut. Aconitat-Hydratase katalysiert die reversible Umwandlung der drei Tricarbonsäuren ineinander. Isocitrat-Dehydrogenase (ict-dh) katalysiert die Reaktionen, die von Isocitrat zu 2-Oxoglutarat führen. Die Oxidation von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA

wird durch einen Enzymkomplex (2-Oxoglutarat-Dehydrogenase) katalysiert. An dieser Umsetzung sind außer dem Enzym auch noch Thiaminpyrophosphat, Liponat, Coenzym A, NADP und  $Mg^{2+}$  beteiligt. Im nächsten Schritt wird die energiereiche Thioesterbindung durch Succinat-Thiokinase von Succinyl-CoA auf ADP übertragen (Substratphosphorylierung), und es entstehen ATP und Succinat. Succinat-Dehydrogenase oxidiert Succinat zu Fumarat. Fumarase lagert Wasser an Fumarat an. Diese Hydratation ist stereospezifisch und führt zu 2-Malat. An Malat-Dehydrogenase wird dieses zu Oxalacetat dehydrogeniert und der Acetat-Acceptor damit regeneriert. Bis auf die Citrat- und die Succinyl-CoA-Bildung sind alle Reaktionen reversibel. Bilanzmäßig führt der Acetat-Abbau im Tricarbonsäure-Cyclus zu 2  $CO_2$  und 8 [H]. Davon stehen 6 [H] auf der Stufe der Pyridinnucleotide, 2 [H] auf der Stufe der Flavoproteine zur Verfügung. Ferner wird eine energiereiche Bindung erzeugt.

### **Phosphotransferase-System**

Fructose, Glucose Mannit und andere Kohlenhydrate werden durch das phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System (pts) aufgenommen. An der Gruppentranslokation, bei der ein Zucker als solcher aufgenommen und als Zuckerphosphat in das Innere der Zelle entlassen wird, sind vier Proteine beteiligt (Abbildung 3.5). Das Enzym II ist ein integrales Membranprotein, es bildet den Kanal und katalysiert die Phosphorylierung des Zuckers. Die Phosphatgruppe wird von PEP nicht direkt übertragen, sondern zunächst über ein Enzym I auf ein kleines, hitzestabiles Protein HPr. Dessen phosphorylierte Form, HPr~P, reagiert mit dem Enzym II, einem peripheren Membranprotein, von dem das Kanalprotein II die Phosphatgruppe auf den Zucker überträgt. Die Enzyme II und III sind für jeden Zucker spezifisch, während Enzym I und HPr am Transport aller Zucker beteiligt sind, die durch das pts transloziert werden. Die Komplexität des pts deutet darauf hin, dass das System nicht nur dem Transport dient, sondern auch regulatorische Funktionen hat. Beispielsweise hemmen Zucker, die durch das pts aufgenommen werden, den Transport und die Verwertung gleichzeitig vorhandener anderer Zucker.



**Abbildung 3.5:** Transport von Glucose durch das Phosphoenolpyruvat:Glucose Phosphotransferase-System (PTS). (Quelle: Schlegel, 1992).

### 3.2.3 Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymen

#### Ein-Substrat-Reaktion

Die im Stoffwechsel stattfindenden Reaktionen werden durch Enzyme katalysiert. Zur Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wird im einfachsten Fall von einer irreversiblen Ein-Substrat Ein-Produkt-Reaktion ausgegangen:



mit	E	Enzymkonzentration, mol L <sup>-1</sup>
	ES	Enzym-Substrat-Komplexkonzentration, mol L <sup>-1</sup>
	P	Produktkonzentration, mol L <sup>-1</sup>
	k <sub>i</sub>	Geschwindigkeitskonstante der Reaktion i, s <sup>-1</sup>

Das Enzym reagiert mit dem Substrat unter Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes, der in freies Enzym und unverändertes Substrat dissoziieren kann oder in freies Enzym und Produkt. Als Umsatzgeschwindigkeit  $v$  wird die Produktbildung definiert.

Die zu Gleichung 3.32 gehörigen Massenbilanzen lauten:

**Gleichung 3.33:** 
$$\frac{dS}{dt} = -k_1 \cdot E \cdot S + k_{-1} \cdot ES$$

**Gleichung 3.34:** 
$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot ES = v$$

**Gleichung 3.35:** 
$$\frac{dE}{dt} = -k_1 \cdot S \cdot E + (k_{-1} + k_2) \cdot ES$$

**Gleichung 3.36:** 
$$\frac{dES}{dt} = k_1 \cdot S \cdot E - (k_{-1} + k_2) \cdot ES$$

Unter Annahme eines stationären Zustands zwischen Bildung und Spaltung des Enzymkomplex ändern sich nach einer im Vergleich zur gesamten Reaktionsdauer kurzen Anlaufzeit die Konzentrationen der Reaktions-Zwischenprodukte nicht mehr wesentlich:  $\frac{dES}{dt} = 0$  und da die Summe von freiem Enzym und Enzymsubstratkomplex konstant der Ausgangsenzymmenge  $E_0$  ist (Gleichung 3.37) gilt auch  $\frac{dE}{dt} = 0$ .

**Gleichung 3.37:** 
$$E + ES = E_0$$

Aus Gleichung 3.35 und Gleichung 3.36 folgt daher:

**Gleichung 3.38:** 
$$k_1 \cdot S \cdot E = (k_{-1} + k_2) \cdot ES$$

Mit Gleichung 3.37 ergibt sich daraus:

**Gleichung 3.39:** 
$$ES = \frac{k_1 \cdot S \cdot E_0}{k_1 \cdot S + k_{-1} + k_2}$$

Eingesetzt in Gleichung 3.34 ergibt sich damit für die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$ :

**Gleichung 3.40:** 
$$v = k_2 \cdot \frac{k_1 \cdot S \cdot E_0}{k_1 \cdot S + k_{-1} + k_2}$$

Durch Zusammenfassung der Konstanten wird hieraus die als Michaelis-Menten-Kinetik bekannte Geschwindigkeitsgleichung (siehe auch Abbildung 3.6):

**Gleichung 3.41:** 
$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S}$$

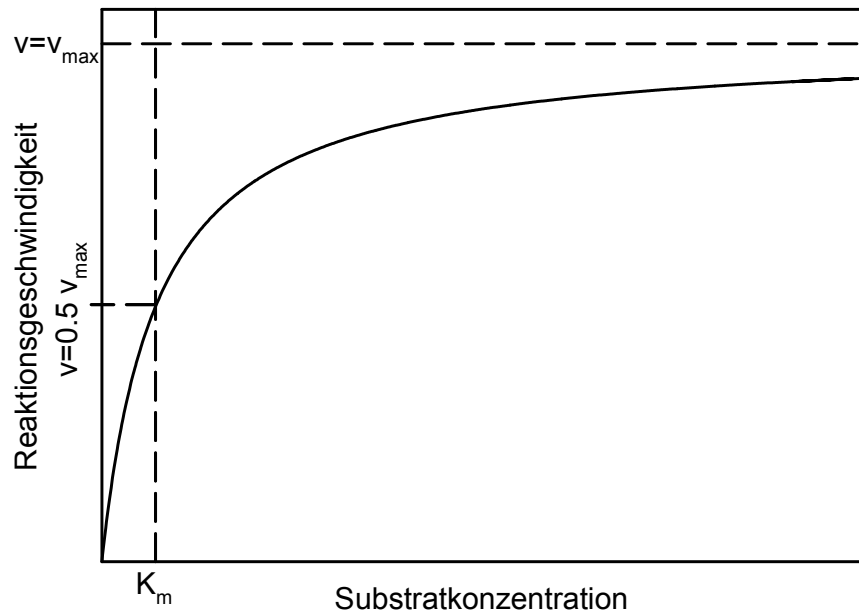
mit  $v$  Reaktionsgeschwindigkeit, mol L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>

$S$  Substratkonzentration, mol L<sup>-1</sup>

$K_m$  Michaelis-Menten-Konstante, mol L<sup>-1</sup>

wobei 
$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_{+2})}{k_1}$$

$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$
wobei	$v_{\max} = k_2 \cdot E_0$
mit $E_0$	gesamte Enzymkonzentration, $\text{mol L}^{-1}$



**Abbildung 3.6:** Reaktionsgeschwindigkeit nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $K_m$  und  $v_{\max}$ .

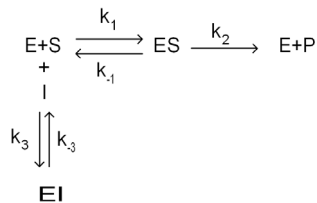
### Effektoren

Enzyme treten häufig mit Substanzen in Wechselwirkung, die die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen. Diese Substanzen – Effektoren – sind meist niedermolekulare Verbindungen. Aktivatoren erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit, während Inhibitoren sie erniedrigen. Bei den durch Inhibitoren hervorgerufenen reversiblen Aktivitätsänderungen werden im Wesentlichen vier Typen unterschieden, die in Tabelle 3.1 zusammengefasst sind. Die folgenden Gleichungen sind für die einfache Michaelis-Menten-Gleichung abgeleitet, die nur für Anfangsgeschwindigkeitsbedingungen gültig ist und die Rückreaktion vernachlässigt.

**Tabelle 3.1: Zusammenstellung unterschiedlicher Effektoren und deren Reaktionsgleichungen.**

### Kompetitive Hemmung

Substrat und Inhibitor konkurrieren miteinander um das aktive Zentrum des Enzyms. Sie werden meist bei Substanzen ähnlicher Struktur beobachtet.

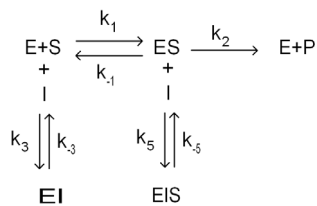


**Gleichung 3.42:**

$$v = v_{\max} \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_3}\right) + S} \quad K_3 = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

### Nicht-kompetitive Hemmung

Hemmstoff bindet sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substratkomplex.

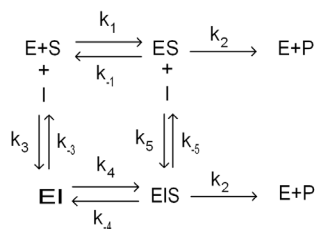


**Gleichung 3.43:**

$$v = v_{\max} \frac{S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_3}\right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_5}\right)} \quad K_3 = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad K_5 = \frac{k_{-5}}{k_5}$$

### Partiell-kompetitive Hemmung

Der Hemmstoff bindet an freies Enzym und Enzym-Substrat-Komplex, der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex ist aber katalytisch aktiv und spaltet Produkt ab. Ist  $K_3 > K_5$  so tritt eine **Aktivierung** auf.



**Gleichung 3.44:**

$$v = v_{\max} \frac{S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_5}\right)}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_3}\right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_5}\right)} \quad K_3 = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad K_5 = \frac{k_{-5}}{k_5}$$



Hill-Kinetik:

**Gleichung 3.49:** 
$$v = \frac{v_{\max} \cdot c_S^h}{K_m + c_S^h}$$

mit  $h$  Hill-Koeffizient

### Umfassende kinetische Modelle

Um die komplexen Einflüsse mehrerer Substrate und Effektoren auf die Reaktionsgeschwindigkeiten von Enzymen zu erfassen, wurden umfangreiche Gleichungen entwickelt.

Eine Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit von Phosphoglucoseisomerase ( $r_{PGI}$ ) in Abhängigkeit der Konzentrationen an G6P, F6P und 6PG kann beispielsweise nach Gleichung 3.1 erfolgen (Takama und Nosoh, 1980):

**Gleichung 3.50:** 
$$r_{PGI} = \frac{r_{PGI}^{\max} \cdot (c_{G6P} - \frac{c_{F6P}}{K_{PGI,eq}})}{K_{PGI,G6P} \cdot (1 + \frac{c_{F6P}}{K_{PGI,F6P}} + \frac{c_{6PG}}{K_{PGI,G6P,6PGinh}}) + c_{G6P}}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit von 6-Phosphofruktionkinase ( $r_{PFK}$ ) kann nach Gleichung 3.51 in Abhängigkeit der Konzentrationen an F6P, PEP, AMP, ADP und ATP dargestellt werden (Deville-Bonne et al., 1991).

**Gleichung 3.51:**

$$r_{PFK} = \frac{r_{PFK}^{\max} \cdot c_{ATP} \cdot c_{F6P}}{(c_{ATP} + K_{PFK,ATP,S} \cdot (1 + \frac{c_{ADP}}{K_{PFK,ADP,c}})) \cdot (c_{F6P} + K_{PFK,F6P,S} \cdot \frac{A}{B}) \cdot (1 + \frac{L_{PFK}}{(1 + c_{F6P} \cdot \frac{B}{K_{PFK,F6P,S} \cdot A})^{n_{PFK}}})}$$

$$A = 1 + \frac{c_{PEP}}{K_{PFK,PEP}} + \frac{c_{ADP}}{K_{PFK,ADP,b}} + \frac{c_{AMP}}{K_{PFK,AMP,b}}$$

$$B = 1 + \frac{c_{ADP}}{K_{PFK,ADP,a}} + \frac{c_{AMP}}{K_{PFK,AMP,a}}$$



### Bestimmung von kinetischen Parametern

Zur Bestimmung von enzymkinetischen Parametern wird üblicherweise die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen an Substrat (und Produkt) aufgezeichnet. Die Parameter können dann über nicht lineare Regression ermittelt werden. Ob die so *in-vitro* ermittelten Parameter, die unter definierten Bedingungen in verdünnten Lösungen ermittelt wurden, mit den intrazellulär unter physiologischen Bedingungen tatsächlich vorliegenden Eigenschaften der Enzyme übereinstimmen ist unbekannt.

Zur Bestimmung von *in-vivo* Enzymkinetiken werden üblicherweise dynamische Pulsexperimente durchgeführt. Hierzu wird ein im stationären Betrieb befindlicher Reaktor durch einen Substratpuls dynamisch angeregt. Die intrazellulär vorliegenden Substrat- und Produktkonzentrationen werden verfolgt, und über eine Modellierung des Stoffwechsels werden die kinetischen Parameter der beteiligten Enzyme bestimmt (Schäfer et al., 1999 , Chassagnole et al., 2002, Schmitz et al., 2002).

## 3.3 Metabolomics

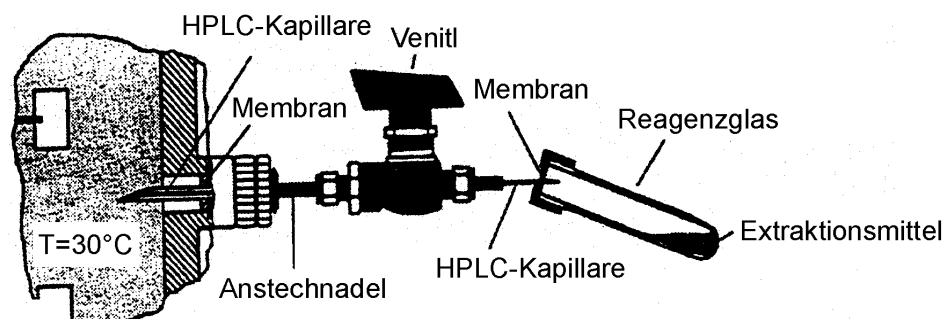
Unter Metabolomics versteht man die Untersuchung der in einer Zelle vorhandenen niedermolekularen Bestandteile (Metabolite) in unterschiedlichen Wachstumsphasen und unter variierenden Bedingungen (Tweeddale et al., 1998). Hierbei kann es sich um Momentaufnahmen des gesamten Metabolitspektrums oder um die zeitlichen Verläufe einzelner Metabolite handeln.

Zur Analyse von intrazellulären Metabolitkonzentrationen der im Bioreaktor kultivierten Mikroorganismen müssen folgende Schritte durchgeführt werden: Eine repräsentative Probenentnahme aus dem Reaktor, Inaktivierung des Stoffwechsels, Bestimmung des Zellvolumens, Extraktion der Metabolite, Abtrennung der Enzyme und Analyse der Metabolite (Weuster-Botz und de Graaf, 1996).

### 3.3.1 Probenentnahme und Inaktivierung

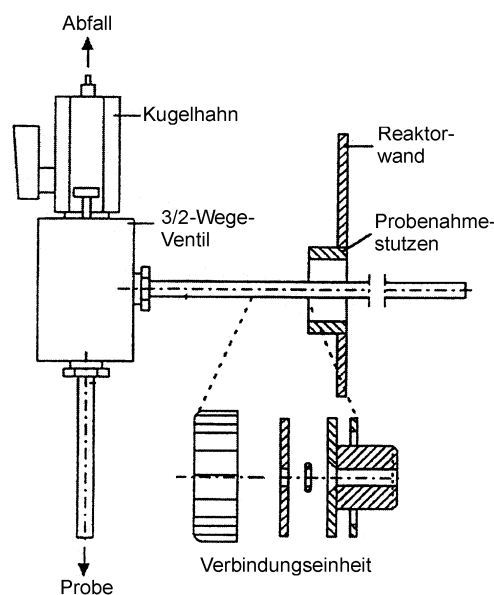
Eine schnelle Probenentnahme und Inaktivierung ist entscheidend für eine realistische Bestimmung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen, da den hohen intrazellulären Umsatzraten (im Bereich von  $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) geringe Metabolitkonzentrationen (im Bereich von  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) gegenüberstehen. Üblicherweise erfolgt das Abstoppen des Zellstoffwechsels durch eine rapide

Änderung der Temperatur, wobei die Probe mit einer geeigneten Inaktivierungsflüssigkeit gemischt wird. Beispiele hierfür sind kaltes Methanol (de Koning und van Dam, 1992, Schäfer et al., 1999, Lange et al., 2001) oder flüssiger Stickstoff (Hajjaj et al. 1998, Chassagnole et al., 2002). Durch Trennung der Zellen vom Medium kann die Zellkonzentration und damit die Metabolitkonzentration erhöht werden, was die Analyse der in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden Stoffe erleichtert. Zudem bietet der separate Inaktivierungsschritt vor der Extraktion den Vorteil einer Trennung von intra- und extrazellulär vorliegenden Metaboliten. Durch direkte Injektion der Zellsuspension in Perchlorsäure wird der Stoffwechsel gleichzeitig mit der Extraktion abgestoppt (Theobald et al., 1993, Larsson und Törnkvist, 1996, Weuster-Botz, 1997). Um bei der Probenentnahme eine schnelle Durchmischung der Probe mit der Inaktivierungsflüssigkeit oder dem Extraktionsmedium zu erreichen, werden unterschiedliche Systeme und Verfahren eingesetzt. Theobald et al. (1993) entwickelten ein Probenentnahmesystem unter Verwendung eines Miniaturventils. Eine Kapillare ist über das manuelle Miniaturventil und eine Anstechnadel an einen Bioreaktor gekoppelt (siehe Abbildung 3.7). Zur Probenentnahme wird ein mit Perchlorsäure befülltes Reagenzglas mit einer Membran verschlossen, evakuiert und gekühlt. Um eine Probe aus dem Reaktor zu entnehmen wird die Membran mit der Kapillare durchstoßen und das Ventil manuell geöffnet. Durch einen Überdruck im Reaktor und den Unterdruck im Reagenzglas wird eine Probe aus dem Reaktor in die Inaktivierungsflüssigkeit überführt. Durch die Verwendung von Perchlorsäure in ausreichend hoher Konzentration wird hierbei gleichzeitig ein Zellaufschluss erreicht.



**Abbildung 3.7:** Manuelle Probenentnahme mit einem Probenentnahmeventil nach Theobald et al. (1993).

Von Larsson und Törnkvist (1996) wird eine Variante der schnellen Probenentnahme mit Hilfe eines ansteuerbaren 3/2-Wege-Ventils beschrieben. Hierbei wird in einen Standardstutzen eines Bioreaktors ein 3/2-Wege-Magnetventil montiert (siehe Abbildung 3.8). Um bei der Probenentnahme Zellyse zu vermeiden, wird ein Reagenzglas mit Perchlorsäure niedriger Konzentration befüllt, und gekühlt. Soll eine Probe entnommen werden, so wird das Reagenzglas unter den einen Ausgang des 2/3-Wege-Ventils platziert. Zur Probenentnahme wird das Ventil zunächst so geschaltet, dass der Weg zum Abfall geöffnet ist und die Innenvolumina der Probenentnahmeeinheit mit Zellsuspension durchgespült werden. Anschließend wird das Ventil umgeschaltet, so dass die Zellprobe in das Reagenzglas gesprüht und durch die kalte Perchlorsäure inaktiviert wird. Anwendungsgebiet ist in diesem Fall die Bestimmung von extrazellulären Metaboliten, die in so geringer Konzentration vorliegen, dass während der Probenentnahme stattfindende Umsetzungen schon sehr große Fehler bewirken.



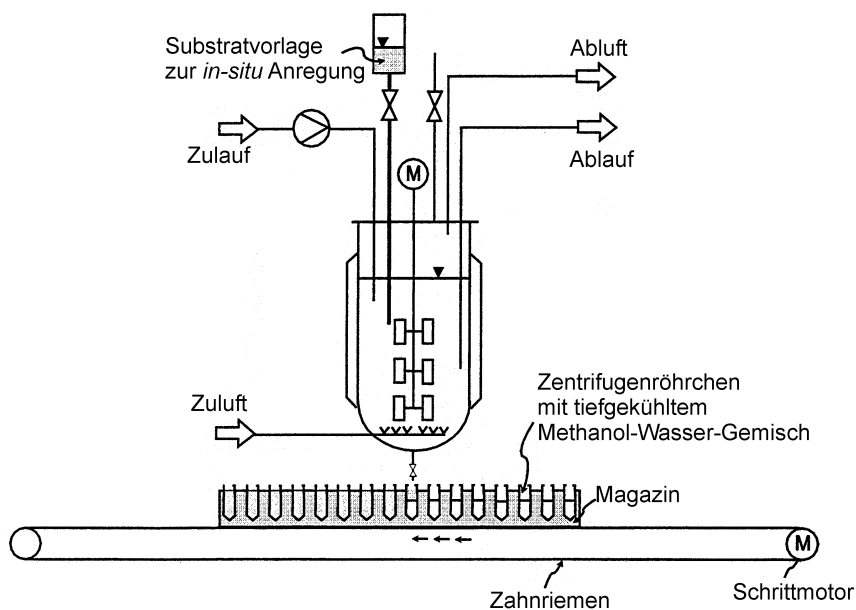
**Abbildung 3.8: Teilautomatisierte Probenentnahme nach Larsson und Törnkvist (1996).**

Die Zielsetzung der Probenentnahme ist in vielen Fällen hauptsächlich in der Analyse von intrazellulären Metabolitdynamiken zu sehen.

Weuster-Botz entwickelte ein Probenentnahmerohr (1997) zur simultanen Inaktivierung und Extraktion. Hierzu wird eine Probe aus dem Reaktor in das Probenentnahmerohr überführt, am Einlass des Rohres mit Perchlorsäure gemischt

und anschließend eingefroren. Zur folgenden Bestimmung der Metabolitkonzentrationen wird das gefrorene Probenentnahmerohr in kleine Abschnitte zersägt und die einzelnen Abschnitte der Analytik zugeführt. Hierdurch ist eine Probenentnahme aus dem Reaktor mit beliebig hoher Probenentnahmerate möglich, in Abhängigkeit von der Stückzahl der Abschnitte. Das Probenentnahmerohr kann somit zur Verfolgung von dynamischen Änderungen der Metabolitkonzentrationen im Reaktor eingesetzt werden.

Eine weitere Vorrichtung zur Bestimmung von intrazellulären Metabolitdynamiken wird von Schäfer et al. (1999) beschrieben. Am Boden eines Reaktors ist ein ansteuerbares Probenentnahmeventil mit minimalem Totvolumen befestigt. Unterhalb des Probenentnahmeventils wird ein Magazin mit Probengefäßen platziert, die alle mit einem tiefgekühlten Gemisch aus Methanol und Wasser befüllt sind. Zur schnell aufeinanderfolgenden Probenentnahme wird das Probenentnahmeventil geöffnet, so dass ein kontinuierlicher Probenstrom aus dem Reaktor entsteht. Das Magazin wird so positioniert, dass sich ein Probengefäß direkt unterhalb des Probenentnahmeventils befindet. Das Gefäß wird mit Probe befüllt und anschließend das Magazin um ein Probenahmegefäß weitertransportiert, so dass in schneller Abfolge die nächste Probe entnommen werden kann (siehe Abbildung 3.9). Mithilfe dieser Probenentnahmevorrichtung können sehr schnelle Änderungen der intrazellulären Metabolitkonzentrationen erfasst werden.



**Abbildung 3.9: Automatisierte Probenentnahme zur Bestimmung von intrazellulären Metabolitdynamiken nach Schäfer et al. (1999).**

Ein weiteres Konzept zur Probenentnahme für die Analyse von Pulsexperimenten wird von Visser et al. (2002) beschrieben. Beim sogenannte „Bioscope“ erfolgt die Störung des stationären Zustands nicht im Bioreaktor (wie zum Beispiel bei Aufgabe eines Glucosepulses), sondern am Einlass des Probenentnahmesystems. Das Probenentnahmesystem besteht aus einem Rohr, über dessen Länge Probenentnahmeventile vorgesehen sind, über die eine Probe in ein Reagenzglas, befüllt mit kalter Methanollösung, überführt wird. Abhängig vom Abstand eines Probenentnahmeventils zum Einlass des Rohres können so unterschiedliche Verweilzeiten nach der Störung des Systems untersucht werden.

Das gleiche Konzept wird von Buziol et al. (2002) in einer anderen Ausführung beschrieben. Die Inaktivierung des Zellstoffwechsels erfolgt hier durch flüssigen Stickstoff.

Da eine Grundvoraussetzung für die schnelle Probeninaktivierung eine kurze Verweilzeit der Probe von der Entnahmestelle bis zur Inaktivierungsposition ist, können alle hier beschriebenen Probenentnahmesysteme nur realisiert werden, wenn am Bioreaktor ein Zugang am Boden oder in der Reaktorwand vorhanden ist. Nur so kann ein kurzer Weg (und damit eine kurze Verweilzeit) von der Reaktionsflüssigkeit bis zur Entnahme und Inaktivierungsposition erreicht werden.

### 3.3.2 Extraktion

Der Zellaufschluss von *E. coli* zur Bestimmung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen erfolgt häufig unter Verwendung von Perchlorsäure (Lowry et al., 1971, Babul et al., 1993, Schäfer et al., 1999, Emmerling et al., 1999, Buchholz et al., 2001, Chassagnole et al., 2002, Peng et al., 2004, Kayser et al., 2005).

Der Einsatz von heißem Wasser wird auch in der Literatur berichtet (Thompson und Torchia, 1984, Bhattacharya et al., 1995, Fuhrman et al., 1998) allerdings ohne die Methode genau zu definieren.

Die meisten Untersuchungen zur Metabolitextraktion werden von Hefen berichtet, wo häufig siedendes, gepuffertes Ethanol bei neutralem pH zum Einsatz kommt (Gancedo und Gancedo, 1973, Gonzalez et al., 1997, Lange et al., 2001).

### 3.4 Stationäre Flussanalyse

Die Quantifizierung intrazellulärer Stoffflüsse ist ein wichtiger Aspekt der Untersuchung von metabolischen Reaktionsnetzwerken. Eine gängige Methode stellt die Quantifizierung der intrazellulären Stoffflüsse durch die Bilanzierung einzelner Metabolite dar (Valino und Stephanopoulos, 1990). Die Basis dafür liefert ein stöchiometrisches Modell, das die Biochemie der Zellen beschreibt. Die intrazellulären Flüsse werden aus den extrazellulären Flüssen berechnet, indem für jeden Metabolit eine Massenbilanz erstellt wird. Dabei wird von Pseudo-Fließgleichgewichten in der Zelle ausgegangen, so dass die einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten den Stoffflüssen entsprechen.

Unter der Annahme von konstanten Flüssen und konstanten intrazellulären Metabolitkonzentrationen ergibt die Stöchiometrie des metabolischen Netzwerkes einen Satz linearer Beziehungen zwischen den metabolischen Flüssen, der folgendermaßen ausgedrückt werden kann:

**Gleichung 3.52:**  $N^T \cdot j = 0$   
 mit  $N$  stöchiometrische Matrix  
 $j$  Vektor aller metabolischen Stoffflüsse

Über die Aufteilung in gemessene Stoffflüsse  $j_m$  und unbekannte Stoffflüsse  $j_c$  können sowohl beobachtbare als auch überbestimmte nicht singuläre Gleichungssysteme für  $j_c$  gelöst werden.

**Gleichung 3.53:**  $N^T \cdot j = N_c^T \cdot j_c + N_m^T \cdot j_m = 0$

Für ein beobachtbares Gleichungssystem ( $N_c$  quadratisch) können die unbekanntes Stoffflüsse  $j_c$  berechnet werden:

**Gleichung 3.54:**  $j_c = -(N_c^T)^{-1} \cdot N_m^T \cdot j_m$

Zur Bestimmung von Messfehlern bei der Stoffflussanalyse können Elementenbilanzen (siehe auch Kapitel 3.1.4) herangezogen werden:

Die Elementarmatrix  $E$ , bestehend aus den Elementbilanzen multipliziert mit den Reaktionsvektoren  $j$ , ist per Definition Null. Eine Aufteilung des Reaktionsvektors und

der Elementarmatrix erlaubt wie in Gleichung 3.53 die Berechnung der unbekanntenen Reaktionsraten  $j_c$  aus den gemessenen Reaktionsraten  $j_m$ , wobei für den Fall eines überbestimmten nicht singulären Gleichungssystems gilt:

**Gleichung 3.55** 
$$j_c = -E_c^\# \cdot E_m \cdot j_m$$

mit 
$$E_c^\# = (E_c^T \cdot E_c)^{-1} \cdot E_c^T$$

In einem überbestimmten System können unbenutzte Bilanzen von gemessenen Reaktionsraten zur Gesamtkonsistenzüberprüfung der gemessenen und berechneten Reaktionsraten herangezogen werden.

Hierzu wird die so genannte Redundanzmatrix definiert:

**Gleichung 3.56:** 
$$R = E_m - E_c \cdot (E_c \cdot E_c^T)^{-1} \cdot E_c^T \cdot E_m$$

Wobei gilt: 
$$R \cdot j_m = 0$$

Der Rang der Matrix  $R$  spezifiziert die Anzahl unabhängiger Gleichungen. Über Matrixumformungen werden die abhängigen Reihen entfernt und man erhält die reduzierte Form  $R_r$  der Redundanzmatrix:

**Gleichung 3.57:** 
$$R_r \cdot j_m = 0$$

Experimentelle Daten sind mit Fehlern behaftet, deswegen wird der gemessene Ratenvektor  $\hat{j}_m$  über den tatsächlichen Ratenvektor  $j_m$  und seinen generellen Messfehler dargestellt:

**Gleichung 3.58:** 
$$\hat{j}_m = j_m + \delta$$

mit  $\hat{j}_m$  Vektor der gemessenen Raten

$\delta$  Messfehler der Raten

Kombination von Gleichung 3.57 mit Gleichung 3.58 liefert den Vektor der Abweichungen  $\varepsilon$ .

**Gleichung 3.59:** 
$$\varepsilon = R_r \cdot \delta$$

Für den idealen Fall der Modelltreue und dem Ausbleiben von systematischen oder zufälligen Fehlern gilt  $\delta = 0$ . Experimentell ermittelte Datensätze sind mit einem gewissen Messfehler behaftet. Unter der Annahme, der Fehler sei normalverteilt mit einem Mittelwert von Null und einer Varianz-Covarianz-Matrix  $F$

**Gleichung 3.60:**  $E(\delta) = 0$

**Gleichung 3.61:**  $F \equiv E\left[(\hat{j}_m - j_m)(\hat{j}_m - j_m)^T\right] = E(\delta\delta^T)$

mit  $E$  Erwartungswertoperator,

dann sind auch die Abweichungen normalverteilt mit einem Mittelwert von Null.

**Gleichung 3.62:**  $E(\varepsilon) = R_r E(\delta) = 0$

mit einer Varianz-Covarianz-Matrix:

**Gleichung 3.63:**  $P = E(\varepsilon\varepsilon^T)R_r^T = R_rFR_r^T$

Das Minimum des Fehlervektors  $\delta$  wird durch Minimierung der Summe der Fehlerquadrate erreicht, wobei die Lösung durch Gleichung 3.64 gegeben ist.

**Gleichung 3.64:**  $\delta_{\text{opt}} = FR_r^TP^{-1}\varepsilon = FR_r^TP^{-1}R_rj_m$

Hieraus können die „besten Schätzungen“, die optimierten Raten  $j_{\text{opt},m}$  ermittelt werden:

**Gleichung 3.65**  $j_{\text{opt},m} = \hat{j}_m - \delta = \left(I - F \cdot R_r^T \cdot P^{-1} \cdot R_r\right) \cdot \hat{j}_m$

mit  $j_{\text{opt},m}$  optimierte Raten

$I$  Einheitsmatrix

### 3.5 Metabolische Kontrollanalyse

Die metabolische Kontrollanalyse dient zur Identifikation der flusskontrollierenden Reaktionsschritte in einem metabolischen Netzwerk (Heinrich und Schuster, 1996). Zur Quantifizierung der Kontrolle eines einzelnen Enzyms auf den Gesamtstoffwechselweg werden Flusskontrollkoeffizienten definiert:

**Gleichung 3.66:**  $C_E^J = \frac{\partial J}{\partial E} \cdot \frac{E}{J}$

mit  $C_E^J$  Kontrollkoeffizient des Enzyms E auf einen bestimmten Fluss J, -

$E$  Konzentration des Enzyms E, g L<sup>-1</sup>

$J$  Stofffluss, mol s<sup>-1</sup>

Die direkte Bestimmung von Kontrollkoeffizienten erfordert also eine infinitesimale Änderung der Enzymkonzentration (wobei der restliche Stoffwechsel nicht beeinflusst



wird) und die Messung der resultierenden Änderung im Stofffluss. Solche Experimente sind sehr aufwändig, weshalb bisher nur wenige experimentelle Kontrollanalysen mit einer direkten Koeffizientenbestimmung durchgeführt wurden.

Das Summationstheorem besagt, dass sich alle Kontrollkoeffizienten für einen bestimmten Fluss J eines betrachteten Stoffwechselwegs zu 1 ergänzen:

**Gleichung 3.67:** 
$$\sum_{i=1}^n C_i^J = 1$$

Dies bedeutet, dass die in einem Stofffluss beteiligten Enzyme diesen Stofffluss *gemeinsam* regulieren, im Gegensatz zum Konzept des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes eines einzelnen Enzyms.

Die indirekte Bestimmung von Flusskontrollkoeffizienten kann über die Bestimmung von Elastizitäten erfolgen. Elastizitäten sind Eigenschaften der individuellen Enzyme und beschreiben die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit einer Umsetzung bei einer Änderung der Substratkonzentration:

**Gleichung 3.68:** 
$$\varepsilon_S^E = \frac{\partial v_E}{\partial S} \cdot \frac{S}{v_E}$$

mit  $\varepsilon_S^E$  Elastizität des Enzyms E bezüglich des Substrats S, -  
 $v_E$  Geschwindigkeit der durch Enzym E katalysierten Reaktion, mol s<sup>-1</sup>  
 S Substratkonzentration, mol L<sup>-1</sup>

Bei Kenntnis aller Elastizitäten eines Stoffwechselweges kann über das Konnektivitätstheorem (Gleichung 3.69) eine indirekte Bestimmung von Flusskontrollkoeffizienten erfolgen:

**Gleichung 3.69:** 
$$\sum_{i=1}^n C_i^J \cdot \varepsilon_S^i = 0$$



## 4 Material und Methoden

Eine Zusammenstellung aller eingesetzten Chemikalien und Geräte findet sich in Anhang 9.1.

### 4.1 Biologisches Testsystem

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Kultivierungen wurden mit *Escherichia coli* K12 DSM 498 (DSMZ Stammhaltung, Deutschland) durchgeführt. Zur Stammhaltung wurde ein von der DSMZ erworbenes Lyophilisat nach Herstellerangaben rehydratisiert und in 100 mL Komplexmedium mit  $6 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im 1000 mL Schüttelkolben ohne Schikanen bei  $37^\circ\text{C}$  und  $250 \text{ U min}^{-1}$  bis zu einer optischen Dichte von 4 inkubiert. Diese Zellsuspension wurde mit steriler Glycerinlösung auf eine Konzentration von 20 % v/v Glycerin verdünnt und in sterilen 2 mL Gefäßen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.2 Medien

#### 4.2.1 Komplexmedium

Zur Herstellung der Stammhaltung wurde ein Komplexmedium (LB-Medium) wie in Tabelle 4.1 dargestellt verwendet:

**Tabelle 4.1: Zusammensetzung Komplexmedium.**

Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	$5 \text{ g L}^{-1}$
NaCl	$5 \text{ g L}^{-1}$
Hefeextrakt	$10 \text{ g L}^{-1}$
Glucose	$6 \text{ g L}^{-1}$

Glucose wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von  $550 \text{ g L}^{-1}$  Glucosemonohydrat (entsprechend  $500 \text{ g L}^{-1}$  Glucose) hergestellt und bei  $121 \text{ °C}$  für 20 min autoklaviert. Die Komplexbestandteile wurden mit 2 molarer NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt, separat autoklaviert und anschließend steril mit der Glucoselösung versetzt.

#### 4.2.2 Minimalmedium

Zur Anzucht der Vorkulturen sowie zur Durchführung der Kultivierungen wurde ein synthetisches Mineralsalzmedium (Schäfer et al., 1999) verwendet.

##### **Medium für die Vorkultur**

Zur Herstellung des Mediums für die Vorkultur wurden die in Tabelle 4.2 dargestellte Salzlösung hergestellt, mit 2 molarer NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt und bei  $121 \text{ °C}$  für 20 min bereits im Schüttelkolben autoklaviert. Anschließend wurde über einen Sterilfilter  $2 \text{ mL L}^{-1}$  der Spurenelementlösung (Tabelle 4.3) sowie  $2 \text{ mL L}^{-1}$  der  $\text{MgSO}_4$ -Lösung (Tabelle 4.4) zugegeben. Eine Glucosestammlösung mit einer Konzentration von  $500 \text{ g L}^{-1}$  Glucose wurde separat autoklaviert und steril mit der Salzlösung vereinigt.

##### **Medium für die Satzkultur**

Das Medium für die Satzkultur wurde in gleicher Weise hergestellt wie das Medium für die Vorkultur, mit dem Unterschied, dass die Salzlösung bereits im Reaktor für 30 min bei  $121 \text{ °C}$  autoklaviert wurde. Die Glucosekonzentration im Satzverfahren betrug  $30 \text{ g L}^{-1}$ , entsprechend einer Zugabe von  $60 \text{ mL L}^{-1}$  der sterilen Stammlösung.

##### **Zulaufmedium für die kontinuierliche Kultur**

Zur Herstellung des Zulaufmediums für die kontinuierlichen Kulturen wurde die Salzlösung mit 10 molarer NaOH auf einen pH von 6,5 eingestellt und in 50 L Vorlagegefäßen für 30 min bei  $121 \text{ °C}$  autoklaviert. Anschließend wurden  $2 \text{ mL L}^{-1}$  der Spurenelementlösung zugegeben und die sterile Substratlösung in den Behälter gefördert. Bei Untersuchungen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wurde

jeweils eine Gesamtsubstratkonzentration von  $30 \text{ g L}^{-1}$  im Zulaufmedium eingestellt. Um Fällungsreaktionen zu vermeiden wurde die  $\text{MgSO}_4$ -Lösung (Tabelle 4.4) während der Kultivierung über eine separate Pumpe in einem Verhältnis von  $20 \text{ mL L}_{\text{Zulauf}}^{-1}$  dem Reaktor zugeführt.

**Tabelle 4.2: Zusammensetzung Salzlösung.**

Komponente	Konzentration
$\text{NH}_4\text{Cl}$	$0,2 \text{ g L}^{-1}$
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	$2 \text{ g L}^{-1}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$3,25 \text{ g L}^{-1}$
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$1,5 \text{ g L}^{-1}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1,5 \text{ g L}^{-1}$

**Tabelle 4.3: Zusammensetzung Spurenelementlösung.**

Komponente	Konzentration
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$5 \text{ g L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,25 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,125 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1,25 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0,875 \text{ g L}^{-1}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$0,0625 \text{ g L}^{-1}$
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,25 \text{ g L}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,25 \text{ g L}^{-1}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$9,15 \text{ g L}^{-1}$

**Tabelle 4.4: Magnesiumsulfatlösung.**

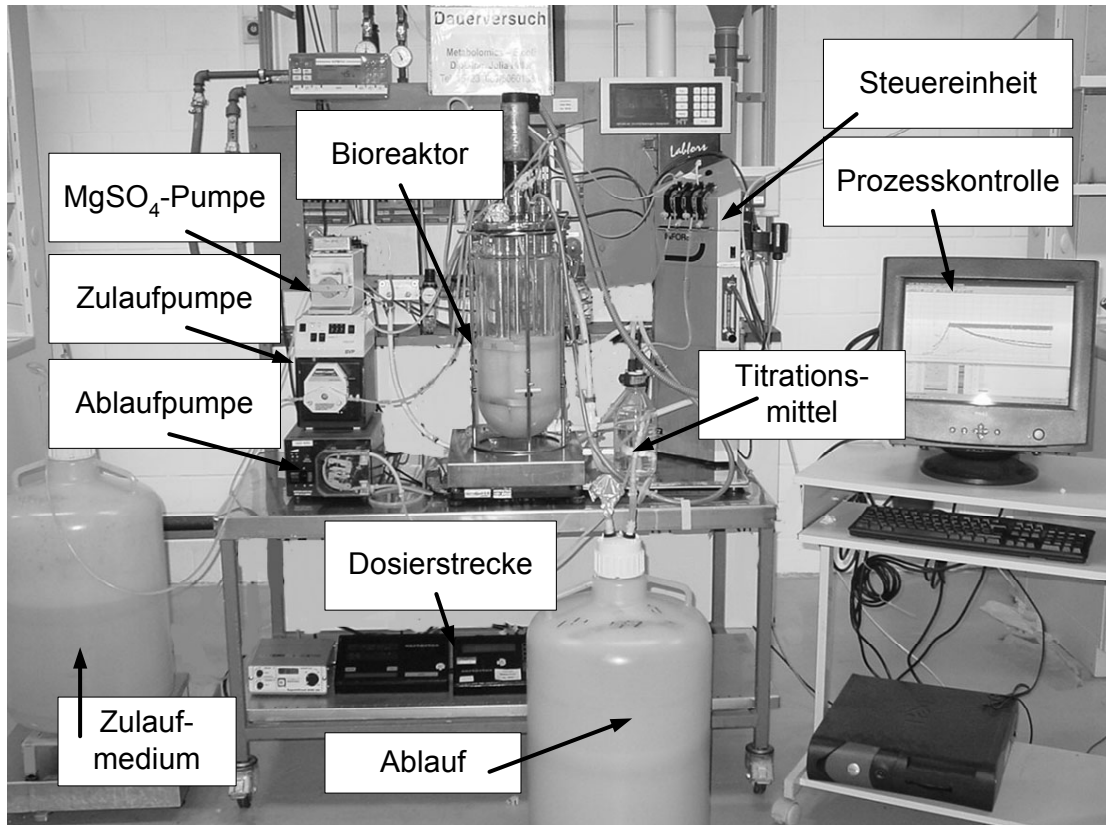
<b>Medium</b>	<b>Konzentration Stammlösung</b>	<b>Zugabe</b>
Vorkultur	250 g L <sup>-1</sup>	2 mL L <sup>-1</sup>
Satzkultur	250 g L <sup>-1</sup>	2 mL L <sup>-1</sup>
Zulauf kontinuierliche Kultur	25 g L <sup>-1</sup>	20 mL L <sup>-1</sup>

**Tabelle 4.5: Substratkonzentration.**

<b>Medium</b>	<b>Konzentration</b>
Vorkultur	6 g L <sup>-1</sup> Glucose
Satzkultur	30 g L <sup>-1</sup> Glucose
Zulauf kontinuierliche Kultur	30 g L <sup>-1</sup> Gesamtsubstrat

### 4.3 Apparativer Aufbau

Alle Kultivierungen wurden mit dem in Abbildung 4.1 gezeigten System Labfors<sup>®</sup> der Firma INFORS durchgeführt. Herstellerangaben der einzelnen Bauteile und Messgeräte finden sich im Anhang 9.1.1.



**Abbildung 4.1: Versuchsstand Kontinuierliche Kultivierung.**

Das 7,5 L Klein-Fermenter-System der Firma Infors besteht aus einem doppelwandigen Glas-Bioreaktionskessel mit Wassertemperierung, einer Labfors<sup>®</sup> Steuereinheit zur geregelten Begasung über einen Massendurchflussmesser und vier Schlauchpumpen für die Zugabe von Zusätzen und einer Prozesssteuerung. Der Leistungseintrag in den Kessel erfolgt über drei Sechsblasscheibenrührer. Die Homogenisierung im Bioreaktor wird von einem Schikanenkorb mit vier Strömungsbrechern unterstützt. Der Sauerstoffeintrag wird über eine Begasungsdusche über den Deckel erreicht. Im Edelstahldeckel des Reaktors sind weitere Stutzen für verschiedene Anschlüsse und Messsonden angebracht.

Der pH im Reaktor wird über eine pH-Elektrode erfasst und über die Steuereinheit des Fermentersystems mit Base geregelt. Der Sauerstoffpartialdruck im Medium wird mit einem pO<sub>2</sub>-Sensor bestimmt, aber nicht geregelt. Die Konzentrationen von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> im Abgas werden mit einem Gasanalysator gemessen.

Zur Einstellung des kontinuierlichen Betriebs wird der Zulauf über das Gewicht des Vorlagenbehälters und eine peristaltische Pumpe mithilfe eines Dosiersystems geregelt. Die Flussrate kann über die Prozesssteuerung vorgegeben werden, so dass

auch zeitlich veränderliche Flussraten realisiert werden können. Der Ablaufvolumenstrom wird über das Gewicht des Reaktors und eine peristaltische Pumpe mit der Prozesssteuerung geregelt. Der Zulauf an Magnesiumsulfat wird über eine peristaltische Pumpe konstant mithilfe der vorher aufgezeichneten Pumpenkennlinie eingestellt.

Alle Messdaten und Regelparameter werden in der Steuereinheit zusammengefasst und über die Prozesssteuerung aufgezeichnet.

## 4.4 Durchführung der Kultivierungen

### 4.4.1 Vorkulturherstellung

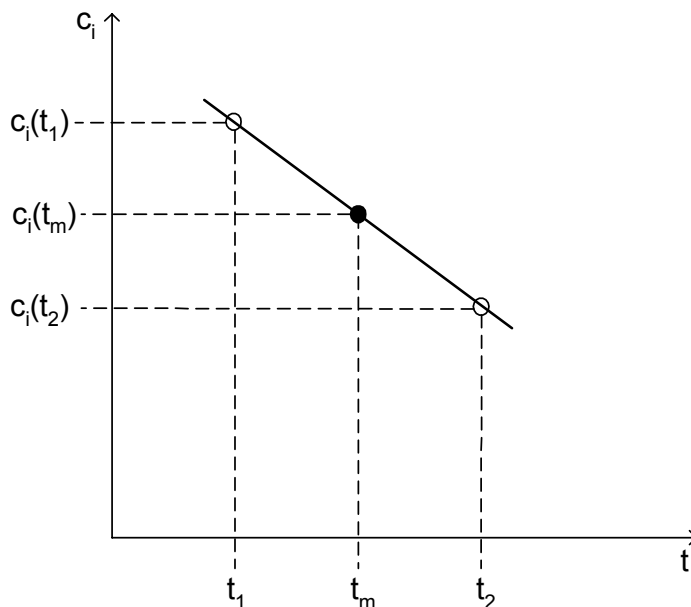
Die Vorkultur der Kultivierung wurde in Schüttelkolben ohne Schikanen mit einem Fassungsvermögen von 1000 mL hergestellt. Hierzu wurde eine Glycerinkultur aus der Stammhaltung aufgetaut und drei Schüttelkolben mit je 100 mL sterilem Minimalmedium wurden mit  $2,5 \text{ mL L}^{-1}$  der Glycerinkultur inokuliert. Die Schüttelkolben wurden bei  $37^\circ\text{C}$  und  $250 \text{ U min}^{-1}$  für 15 h bis zu einer  $\text{OD}_{660}$  von etwa 3 inkubiert. Die Vorkulturen wurden unter dem Mikroskop untersucht, um sicherzustellen, dass es sich um Reinkulturen handelte.

### 4.4.2 Kontinuierliche Kultivierung

Zur Vorbereitung des Bioreaktors und seiner Peripherie für eine Kultivierung wurde zunächst die pH-Elektrode mit zwei Pufferlösungen (pH 7 und pH 4) kalibriert, die Elektrolytlösung der  $\text{pO}_2$ -Sonde getauscht und das Glycerin der Gleitringdichtung an der Rührwelle erneuert. Der Reaktor wurde mit allen Sonden und Anschlüssen versehen, mit 3 L Salzlösung (Tabelle 4.2) befüllt und für 30 min bei  $121^\circ\text{C}$  autoklaviert. Anschließend wurden die restlichen Medienbestandteile über Sterilfilter oder über sterile Verbindungen zugeführt. Nachdem die  $\text{pO}_2$ -Sonde für mindestens sechs Stunden polarisiert worden war, wurde bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  und einer Rührerdrehzahl von  $1100 \text{ min}^{-1}$  mit Stickstoffbegasung (2 vvm) als Nullpunkt und Luftbegasung (2 vvm) für 100 % Sättigung eine Zweipunktkalibrierung durchgeführt. Zur Inokulation der Satzkultur wurden 300 mL der Vorkultur in den Reaktor überführt. Der pH wurde mit 25 % v/v  $\text{NH}_4\text{OH}$  auf 7,0 geregelt. Bis zum Erreichen einer Sauerstoffsättigungskonzentration von 30% wurde der Reaktor ohne



Begasung betrieben, anschließend wurde mit einer Begasungsrate von 2 vvm entsprechend einem Volumenstrom von  $6 \text{ L min}^{-1}$  mit Luft begast. Bei Erreichen einer  $\text{OD}_{660}$  von 15 wurde der kontinuierliche Betrieb gestartet, indem die Zu- und Ablaufpumpe, sowie die Magnesiumsulfatpumpe eingeschaltet wurden. Für die stationären Untersuchungen wurde die Zulaufpumpe über ein angesteuertes Dosiersystem auf einen konstanten Wert geregelt. Volumenkonstanz wurde über das Reaktorgewicht durch Regelung der Ablaufpumpe erreicht. Für quasi-stationäre Untersuchungen wurde der Zulaufstrom in einem linearen Profil innerhalb von drei Stunden von einer Durchflussrate auf die nächste geändert. In diesem Bereich wurden die spezifischen, extrazellulären Substrataufnahme- und Produktbildungsraten zwischen den Zeitpunkten der Probenentnahme linearisiert (siehe Abbildung 4.2) und für die einzelnen Prozessgrößen eine Bilanz erstellt.



**Abbildung 4.2: Linearisierung zwischen zwei Messpunkten.**

Für die Übergangsbereiche gelten somit folgende Gleichungen:

**Gleichung 4.1:** 
$$t_m = \frac{t_1 + t_2}{2}$$

mit	$t_m$	gemittelte Messzeit, h
	$t_1$	Zeitpunkt 1 der Probenentnahme, h
	$t_2$	Zeitpunkt 2 der Probenentnahme, h

**Gleichung 4.2:** 
$$c_i(t_m) = \frac{c_i(t_1) + c_i(t_2)}{2}$$

mit  $c_i(t)$  Konzentration der Komponente i zum Zeitpunkt t, g L<sup>-1</sup>

**Gleichung 4.3:** 
$$\dot{V}_{\text{ein}}(t_m) = \frac{\dot{V}_{\text{ein}}(t_1) + \dot{V}_{\text{ein}}(t_2)}{2}$$

mit  $\dot{V}_{\text{ein}}(t)$  Zulaufstrom zum Zeitpunkt t, L h<sup>-1</sup>

Für die Stoffbilanz um den Reaktor ergibt sich damit für die Übergangszustände:

**Gleichung 4.4:** 
$$c_{i,0} \cdot \dot{V}_{\text{ein}}(t_m) + q_i \cdot c_X(t_m) \cdot V_R - c_i(t_m) \cdot \dot{V}_{\text{ein}}(t_m) = 0$$

Umgeformt zu

**Gleichung 4.5:** 
$$q_i = \frac{\dot{V}_{\text{ein}}(t_m) \cdot (c_i(t_m) - c_{i,0})}{V_R \cdot c_X(t_m)} = D_m \cdot \frac{c_i(t_m) - c_{i,0}}{c_X(t_m)}$$

mit  $c_{i,0}$  Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L<sup>-1</sup>

$q_i$  spezifische Aufnahme­rate für die Komponente i, g g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

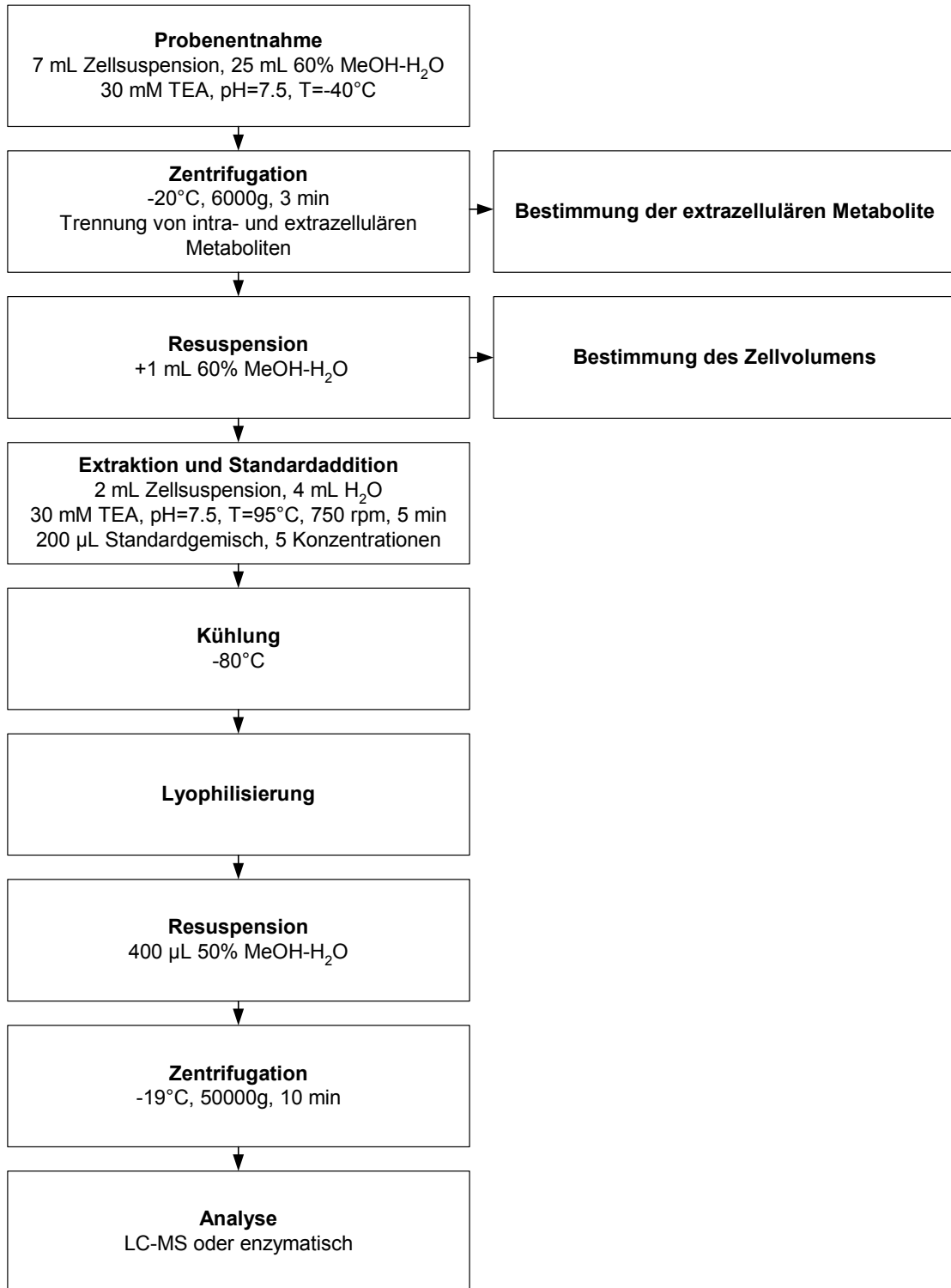
$c_X(t)$  Biotrocken­masse­konzentration zum Zeitpunkt t, g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>

$V_R$  Reaktions­volumen, L

$D_m$  gemittelte Durch­fluss­rate, h<sup>-1</sup>

#### 4.4.3 Probenentnahme und Probenaufbereitung

Die Probenentnahme und Aufbereitung erfolgte nach folgendem Schema. Die einzelnen Schritte sowie weitere, bei Voruntersuchungen eingesetzte Extraktionsmethoden, sind im folgenden Kapitel detailliert dargestellt.



**Abbildung 4.3: Schema der Probenentnahme und –aufbereitung.**

Nach mindestens fünf Verweilzeiten im kontinuierlichen Betrieb wurde davon ausgegangen, dass ein stationärer Zustand erreicht war und es wurden Proben aus dem Reaktor entnommen.

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse und der optischen Dichte wurden Proben folgendermaßen aus dem Reaktor entnommen: Ein verschlossenes Probengefäß (siehe Kapitel 5.1.1) wurde auf etwa 500 mbar evakuiert und kurzzeitig zur Probenentnahme in die Probensonde eingeführt. Die Probe wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis gelagert.

Zur Vorbereitung der Probenentnahme zur Bestimmung von intrazellulären Metaboliten wurden die Ventile von fünf Probengefäßen zunächst mit Ethanol gespült, um Vereisungen bei der Probenentnahme zu verhindern. Anschließend wurden sie jeweils mit 25 mL einer auf  $-30^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Methanollösung (60% v/v Methanol, 30 mmol  $\text{L}^{-1}$  TEA,  $\text{pH}=7,5$ ) befüllt. Die Probengefäße wurden verschlossen, mit einer Wasserstrahlvakuumpumpe auf 180 mbar evakuiert und für mindestens 45 min im Ethanol-Wasserbad auf  $-40^{\circ}\text{C}$  abgekühlt.

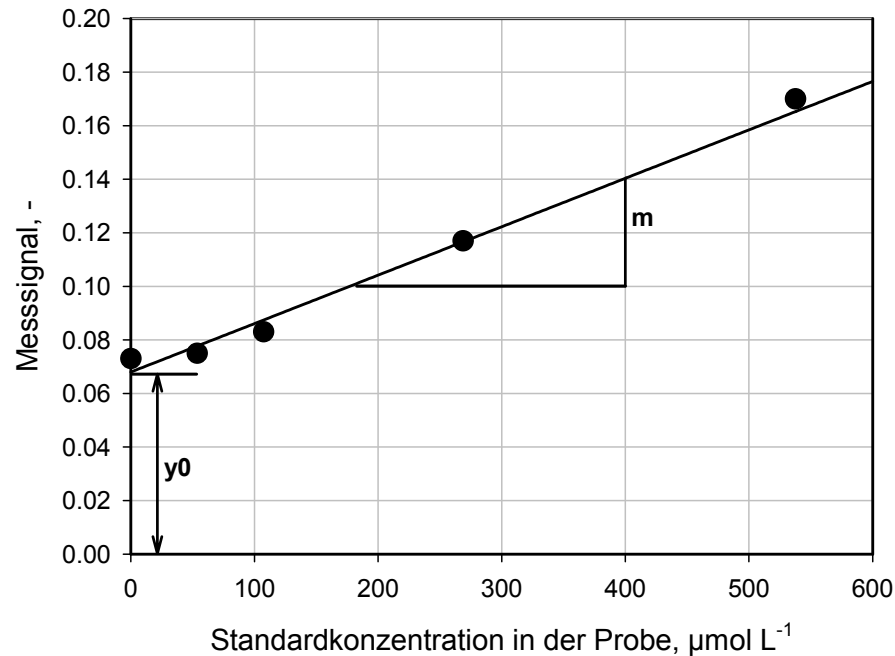
Zur Probenentnahme wurden die gekühlten Probengefäße für wenige Sekunden in die Probensonde eingeführt, so dass etwa 7 mL Zellsuspension mit der Kühlflüssigkeit homogenisiert wurden und der Zellstoffwechsel zum Erliegen kam.

Jede Probe wurde sofort in ein Zentrifugenröhrchen überführt und im Ethanol-Eis-Bad bei  $-15^{\circ}\text{C}$  transportiert. Zur Trennung von extra- und intrazellulären Metaboliten wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und 6000 g für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 mL bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, der restliche Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1 mL einer auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlten 60% v/v Methanollösung resuspendiert und die einzelnen Proben wurden für den Zellaufschluss vereinigt.

## 4.5 Zellaufschluss mit Standardaddition

Um Einflüsse der Extraktionsmethode auf die einzelnen Metaboliten in die Kalibrierung einzubeziehen, wurde die Methode der „Standardaddition vor der Extraktion“ eingeführt. Hierzu wurde die Zellsuspension in fünf gleiche Volumina geteilt und der Zellaufschluss jeweils fünffach parallel durchgeführt, wobei zu jeder Zellprobe ein bestimmtes Volumen eines Standardgemisches in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurde. So konnte bei der Analyse der fünf Proben über die Kalibrierung mittels Standardaddition (DIN 32633) der Einfluss der Extraktion einbezogen werden. In Abbildung 4.4 ist beispielhaft die Konzentrationsbestimmung mittels Standardaddition dargestellt. Auf der x-Achse des Diagramms wird die

Konzentration des Standards in der zu analysierende Probe aufgetragen. Auf der y-Achse werden die Messwerte der Analyse dargestellt.



**Abbildung 4.4:** Kalibrierung mittels Standardaddition. Symbole sind Messpunkte der Analyse, die durchgezogene Linie stellt die lineare Regression dar.

Der Beitrag der unbekanntes Konzentration in der zu analysierenden Probe findet sich hierbei im Achsenabschnitt  $y_0$  wieder, so dass die Konzentration nach Gleichung 4.6 bestimmt werden kann.

**Gleichung 4.6:** 
$$c_i = \frac{y_{0i}}{m_i}$$

mit

- $c_i$  unbekannte Konzentration der Komponente  $i$ ,  $\mu\text{mol L}^{-1}$
- $y_{0i}$  Achsenabschnitt der linearen Regression für Komponente  $i$ , -
- $m_i$  Steigung der linearen Regression für Komponente  $i$ ,  $\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$

#### 4.5.1 Herstellung des Standardgemisches

Zur Herstellung des Standardgemisches für die Extraktion mit Standardaddition wurden die einzelnen Metabolite als Stammlösung in einer Konzentration von etwa  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  in 50% v/v Methanollösung vorgelegt (siehe Anhang 9.1.2, Tabelle 9.3). Die einzelnen Stammlösungen wurden so vereinigt, dass jeder Metabolit mit einer

Konzentration von  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$  im Gemisch vorlag. Zur Durchführung der Standardaddition wurde dieses Gemisch dann mit 50 % v/v Methanollösung auf Konzentrationen von  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  und  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  verdünnt.

#### 4.5.2 Aufschluss mit Perchlorsäure

Zum Zellaufschluss mit Perchlorsäure wurden jeweils 1 mL der resuspendierten Zellsuspension und 100  $\mu\text{L}$  eines Standardgemisches mit 2 mL bei  $-20^\circ\text{C}$  vorgekühlter Perchlorsäure (43% m/v) vereinigt und homogenisiert. Die Proben wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und nach einem Frier-Tau-Zyklus auf Eis mit 1,2 mL einer 5 molaren KOH-Lösung neutralisiert. Kaliumperchlorate und Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation (10.000 g, 30 min,  $0^\circ\text{C}$ ) entfernt und der Überstand bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.5.3 Aufschluss mit siedendem Ethanol

Zum Zellaufschluss mit siedendem Ethanol wurden 10 mL Ethanollösung (75% v/v, 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  HEPES, pH=7,5) mit einigen Siedesteinchen in Zentrifugenröhrchen vorgelegt und in einem Wasserbad bei  $80^\circ\text{C}$  zum Sieden gebracht. Jeweils 2 mL der resuspendierten Zellsuspension und 200  $\mu\text{L}$  eines Standardgemisches wurden mit der Ethanollösung vereinigt. Nach 5 min wurden die Zentrifugenröhrchen für 3 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  und  $4500 \text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt, bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und im gefrorenen Zustand lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Kurz vor der Analyse wurde das Lyophilisat mit 500  $\mu\text{L}$  50% v/v Methanollösung resuspendiert, und bei  $-20^\circ\text{C}$  und  $23000 \text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Analyse herangezogen.

#### 4.5.4 Aufschluss mit heißem Wasser ( $95^\circ\text{C}$ )

Zum Zellaufschluss mit heißem Wasser wurden 4 mL entionisiertes Wasser in Zentrifugenröhrchen vorgelegt und in einem Thermomixer auf  $95^\circ\text{C}$  aufgeheizt. Jeweils 2 mL der resuspendierten Zellsuspension und 200  $\mu\text{L}$  eines Standardgemisches wurden mit dem heißen Wasser vereinigt und für 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  und  $750 \text{ min}^{-1}$  homogenisiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden für 3 min auf Eis

abgekühlt und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $4500\text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert. 5 mL des Überstandes wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend im gefrorenen Zustand lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Kurz vor der Analyse wurde das Lyophilisat mit  $500\text{ }\mu\text{L}$  50% v/v Methanollösung resuspendiert, und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $23000\text{ min}^{-1}$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Analyse herangezogen.

#### 4.5.5 Aufschluss mit heißem Wasser ( $95^{\circ}\text{C}$ ) und Puffer

Der Zellaufschluss mit gepuffertem Wasser wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings wurde das Wasser mit  $30\text{ mmol L}^{-1}$  Triethanylamin-Puffer (TEA) auf einen pH von 7,5 gepuffert. Zur Resuspendierung des Lyophilisats wurden anstelle von  $500\text{ }\mu\text{L}$  nur  $400\text{ }\mu\text{L}$  50% v/v Methanollösung verwendet. Diese Zellaufschlussmethode wurde im Verlauf der Arbeit entwickelt und für alle beschriebenen Ergebnisse eingesetzt.

## 4.6 Analytische Methoden

### 4.6.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte gravimetrisch im fünffach Ansatz. Hierzu wurde 1 mL der Zellsuspension in getrockneten und gewogenen Eppendorfgefäßen bei Raumtemperatur für 5 min bei  $13000\text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und bei  $80^{\circ}\text{C}$  für mindestens 24 h getrocknet. Die Biotrockenmassekonzentration errechnete sich nach Gleichung 4.7.

**Gleichung 4.7:** 
$$c_x = \frac{m_2 - m_1}{V}$$

mit	$m_2$	Masse des Eppendorfgefäßes mit Zellen, g
	$m_1$	Masse des leeren Eppendorfgefäßes, g
	V	Volumen der Zellsuspension, L

#### 4.6.2 Bestimmung der optischen Dichte

Zur schnelleren Verfolgung des Zellwachstums wurde die optische Dichte (OD) der Zellsuspension bei 660 nm mit einem Einstrahlphotometer gemessen. Die optische Dichte kann nach experimenteller Ermittlung eines Korrelationsfaktors nach Gleichung 4.8 in die Biotrockenmassekonzentration umgerechnet werden. Für *E. coli* wurde ein Korrelationsfaktor von  $0.397 \text{ g L}^{-1}$  ermittelt.

**Gleichung 4.8:** 
$$c_x = a \cdot OD_{660}$$

mit  $a$  experimentell ermittelter Korrelationsfaktor,  $\text{g L}^{-1}$

$OD_{660}$  optische Dichte bei 660 nm, -

#### 4.6.3 Zellvolumenbestimmung

Zur Berechnung der intrazellulären Konzentrationen wurde das Zellvolumen der untersuchten Zellsuspension bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Zellzahlanalysator nach dem Coulter-Prinzip (siehe Abbildung 4.5): Eine Zellprobe wird in ein Probengefäß gegeben, das mit einer leitenden Flüssigkeit befüllt ist. Zwischen zwei Elektroden, die durch eine Kapillare voneinander getrennt sind, wird eine Spannung angelegt und der Strom wird gemessen. Ein definiertes Volumen Elektrolytlösung wird durch die Kapillare gesaugt. Wird hierbei eine Zelle durch die Kapillare befördert, verdrängt sie die Elektrolytlösung aus der Kapillare, so dass sich der Widerstand zwischen beiden Elektroden ändert. Hierdurch kann nach Gleichung 4.9 über die Änderung des Widerstandes das Zellvolumen, und über die Anzahl der Impulse die Zellzahl bestimmt werden.

**Gleichung 4.9:** 
$$\Delta R = \varphi \cdot \frac{V_P}{A}$$

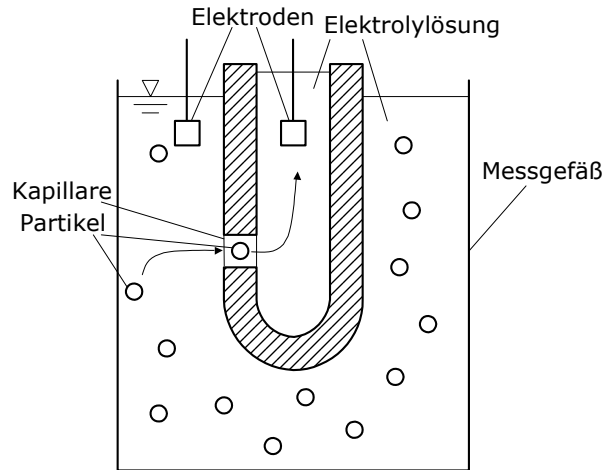
mit  $\Delta R$  Änderung des Widerstandes zwischen den Elektroden,  $\Omega$

$\varphi$  spezifischer Widerstand der Elektrolytlösung,  $\Omega \text{ m}^{-1}$

$V_P$  Volumen des vermessenen Partikels,  $\text{m}^3$

$A$  Querschnittsfläche der Kapillare,  $\text{m}^2$





**Abbildung 4.5: Messverfahren nach dem Coulter-Prinzip.**

Als Elektrolyt wurde Isoton II mit  $20 \text{ g L}^{-1}$  NaCl eingesetzt. Der Durchmesser der verwendeten Kapillare betrug  $30 \text{ }\mu\text{m}$ . Je nach Zellkonzentration wurden 10 bis  $20 \text{ }\mu\text{L}$  einer mit Elektrolytlösung vorverdünnten Zellsuspension mit  $10 \text{ mL}$  Elektrolytlösung im Messgefäß vereinigt, so dass im Messgefäß eine Zellkonzentration von etwa  $10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  vorlag.

#### 4.6.4 Membranintegritätstest (Viabilitätstest)

Als Membranintegritätstest für Bakterien wurde die differentielle Aufnahme der Farbstoffe SYTO<sup>®</sup>9 ( $3,34 \text{ mmol L}^{-1}$  in DMSO) und Propidiumiodid ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$  in DMSO) aus dem LIVE/DEAD BacLight<sup>™</sup> Viabilitätstest von Molecular Probes bestimmt. Beide Farbstoffe binden spezifisch an Nukleinsäuren. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren spektralen Eigenschaften und in ihrer Fähigkeit, intakte bakterielle Zellmembranen zu überqueren. Für SYTO<sup>®</sup>9 stellt die Zellmembran keine Barriere dar. Somit werden alle Zellen, sowohl solche mit intakter als auch solche mit beschädigter Zellmembran, grün fluoreszierend angefärbt. Propidiumiodid dringt dagegen nur in beschädigte Zellen ein, konkurriert dort mit SYTO<sup>®</sup>9 und färbt diese rot fluoreszierend an.

Zur Durchführung des Tests wurden je  $3 \text{ }\mu\text{L}$  der Farbstoff-Stammlösungen des Tests gemeinsam zu  $1 \text{ mL}$  VE-Wasser gegeben. Die zu untersuchende Zellsuspension wurde mit  $0,9 \text{ \% w/v}$  NaCl-Lösung auf  $\text{OD}_{660} = 0,05$  verdünnt. Je  $100 \text{ }\mu\text{L}$  der Farbstofflösung und der Zellsuspension wurden in die Vertiefung einer Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben und  $15 \text{ min}$  im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Platte im Fluoreszenzphotometer bei 485 nm Anregungswellenlänge und 520 nm (Verstärkungswert 28) und 620 nm (Verstärkungswert 56) Auslesewellenlänge gemessen. Das Verhältnis der beiden Lichtintensitäten diente als Merkmal für die Membranintegrität. Die Kalibrierung erfolgte durch verschiedenen Mischungen frischer Zellen und mit 70 % v/v Isopropanol geschädigter Zellen.

#### 4.6.5 Glucosebestimmung mit dem Blutzuckermessgerät

Zur schnellen Bestimmung der Glucosekonzentration wurde das Blutzuckermessgerät Accu-Chek eingesetzt. Nach Verdünnung auf einen Wert innerhalb des Messbereichs (0,1 bis 6,0 g L<sup>-1</sup>) wurde die Glucosekonzentration bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte bereits durch den Hersteller.

#### 4.6.6 Enzymatischer Nachweis von Glucose und Fructose

Zur Bestimmung von Glucosekonzentrationen unterhalb von 100 mg L<sup>-1</sup>, sowie zum Nachweis von Fructose wurde der enzymatische BioAnalysis<sup>®</sup> Test Nr. 10139106035 der Fa. R-Biopharm eingesetzt.

Der Test wurde für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert und wie in Tabelle 4.6 dargestellt durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte über die Vermessung von Standards bekannter Konzentration. Die Herstellung der Lösungen wird in Anhang 9.2.1 erläutert.

**Tabelle 4.6: Pipettierschema Glucose- und Fructosenachweis.**

<b>Lösung</b>	<b>Volumen, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Messung (340 nm)</b>
Lösung 1 (TEA, NADP, ATP, $\text{MgSO}_4$ )	60	
Leerwert / Standard / Probe	90	Nach ca. 3 min E0
Suspension 2 (HK, G6P-DH)	10	Nach ca. 15 min E1: Bestimmung der Glucosekonzentration.
Suspension 3 (PGI)	10	Nach ca. 15 min E2: Bestimmung der Fructosekonzentration.

#### 4.6.7 Enzymatischer Nachweis von Acetat

Acetat wurde mit dem enzymatischen BioAnalysis<sup>®</sup> Test Nr. 10148261035 der Fa. R-Biopharm durchgeführt.

Der Test wurde für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert und wie in Tabelle 4.7 dargestellt durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte über die Vermessung von Standards bekannter Konzentration. Die Herstellung der einzelnen Lösungen findet sich in Anhang 9.2.2.

**Tabelle 4.7: Pipettierschema Acetatnachweis.**

<b>Lösung</b>	<b>Volumen, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Messung (340 nm)</b>
Lösung 1 (TEA, L-Apfelsäure, $\text{MgCl}$ )	50	
Lösung 2 (ADP, CoA, NAD)	10	
Leerwert / Standard / Probe	50	Nach ca. 3 min E0
Suspension 3 (L-Malat-DH, Citrat-Synthase)	25	Nach ca. 3 min E1.
Suspension 4 (AcCoA-Synthase)	25	Nach ca. 15 min E2: Bestimmung der Acetatkonzentration.

#### 4.6.8 Enzymatischer Nachweis von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat

Der Nachweis von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat erfolgte nach einem Protokoll gemäß Bergmeyer (1985) das für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert wurde.

Die Durchführung des Tests ist in Tabelle 4.8 dargestellt, die eingesetzten Lösungen sind in Anhang 9.2.3 aufgeführt.

**Tabelle 4.8: Pipettierschema G6P- und F6P-Nachweis.**

Lösung	Volumen, $\mu\text{L}$	Messung (340 nm)
Lösung 1 (TEA, EDTA, NADP, MgCl)	80	
Leerwert / Standard / Probe	200	Nach ca. 3 min E0
Suspension 2 (G6P-DH)	10	Nach ca. 15 min E1: Bestimmung der G6P-Konzentration.
Suspension 3 (PGI)	10	Nach ca. 15 min E2: Bestimmung der F6P-Konzentration.

#### 4.6.9 Enzymatischer Nachweis von Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehydphosphat, Fructose-1,6-bisphosphat

Der Nachweis von DHAP, GAP und FBP erfolgte nach einem Protokoll gemäß Bergmeyer (1985), das für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert wurde.

Die Durchführung des Tests ist in Tabelle 4.9 dargestellt, die eingesetzten Lösungen sind in Anhang 9.2.4 aufgeführt.

**Tabelle 4.9: Pipettierschema DHAP-, GAP- und FBP-Nachweis.**

Lösung	Volumen, $\mu\text{L}$	Messung (340 nm)
Lösung 1 (TEA, EDTA, NADH)	80	
Leerwert / Standard / Probe	200	Nach ca. 3 min E0
Suspension 2 (GDH)	10	Nach ca. 15 min E1: Bestimmung der DHAP- Konzentration.
Suspension 3 (TIM)	10	Nach ca. 15 min E2: Bestimmung der GAP- Konzentration.
Suspension 3 (Aldolase)	10	Nach ca. 15 min E3: Bestimmung der FBP- Konzentration.

#### 4.6.10 Enzymatischer Nachweis von Pyruvat und Phosphoenolpyruvat

Der Nachweis von Pyruvat und PEP erfolgte nach einem Protokoll gemäß Bergmeyer (1985), das für den Einsatz in einer Mikrotiterplatte modifiziert wurde.

Die Durchführung des Tests ist in Tabelle 4.10 dargestellt, die eingesetzten Lösungen sind in Anhang 9.2.5 aufgeführt.

**Tabelle 4.10: Pipettierschema Pyruvat- und PEP-Nachweis.**

Lösung	Volumen, $\mu\text{L}$	Messung (340 nm)
Lösung 1 (TEA, EDTA, NADH, ADP, Salze)	160	
Leerwert / Standard / Probe	125	Nach ca. 3 min E0
Suspension 2 (L-LDH)	8,5	Nach ca. 15 min E1: Bestimmung der Pyruvatkonzentration.
Suspension 3 (PK)	10	Nach ca. 15 min E2: Bestimmung der PEP- Konzentration.

#### 4.6.11 Flüssigchromatographische Nachweismethode mit Massenspektrometer

Die Bestimmung von Acetyl-CoA, der Adenosinphosphate AMP, ADP, ATP und cAMP, der Reduktionsäquivalente NAD und NADP, sowie FAD erfolgte über eine flüssigchromatographische Nachweismethode mit Massenspektrometer (HPLC-MS) mit einem HPLC-System der Firma Thermo Spectronic und einem Ionenfallenmassenspektrometer des Typs LCQ-Advantage von Thermo Finnigan. Genaue Spezifikationen und Herstellerangaben finden sich in Anhang 9.2.6.

Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer Trennsäule des Typs Aquasil der Firma Thermo Hypersil. Für die HPLC wurden nach einer Vorlaufzeit von 10 min die Laufmittel A (12 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Ac) und Laufmittel B (80% Laufmittel A, 20 % MeOH) bei einer Flussrate von 0,3 mL min<sup>-1</sup> nach folgendem Gradientenprotokoll eingesetzt (Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11: Gradientenprofil der HPLC-Analytik.**

Zeit, min	Laufmittel A, %	Laufmittel B, %
0	98	2
5	98	2
30	0	100
40	0	100

Das Injektionsvolumen betrug 10 µL, die Proben wurden bei 4°C gekühlt und die Temperatur im Säulenofen wurde auf 35°C geregelt.

Der Fluss wurde direkt der Ionenquelle zugeführt. Die Ionisierungsbedingungen der Elektrosprayionisationsquelle (ESI-Quelle) sind in Tabelle 4.12 dargestellt. Die Parameter des Ionendetektionssystems sind in Anhang 9.2.6 aufgeführt.

**Tabelle 4.12: Ionisierungsbedingungen der ESI-Quelle.**

Parameter	Eingestellter Wert
Kapillartemperatur	350 °C
Quellenspannung	2,5 kV
Schutzgas (Stickstoff)	60
Hilfsgas (Stickstoff)	20

Zur Detektion der negativen Ionen mit dem Ionenfallenmassenspektrometer wurde das Masse-zu-Ladungsverhältnis in einem Bereich von 50 bis 850 abgetastet und mithilfe der Software Xcalibur 1.2 aufgezeichnet und ausgewertet.

## 4.7 Stationäre Flussanalyse

Mit einer ersten, am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik verfügbaren Software, wurden die gemessenen extrazellulären Stoffflüsse unter Angabe der geschätzten Fehler nach Stephanopoulos et al. (1998) anhand der Kohlenstoffbilanz optimiert (siehe Kapitel 3.4).

Stationäre Flussanalysen wurden mithilfe einer am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelten Software durchgeführt. Das auf Matlab- und Excel basierende Programm „Matrix-Analysis“ sieht folgende Vorgehensweise zur Durchführung einer Flussanalyse vor: In einer Excel-Datei werden die stöchiometrische Matrix, sowie die Reaktionsnamen und Quellen oder Kommentare eingegeben. Die stöchiometrische Matrix kann dann von „Matrix-Analysis“ eingelesen, analysiert und bearbeitet werden. Das Programm sieht auch eine Kontrollroutine für etwaige Tippfehler beim Eingeben der stöchiometrischen Matrix vor, indem die eingelesene Matrix in Form von Reaktionsgleichungen ausgegeben wird. Die Software überprüft, ob die eingelesene Matrix exakt, über- oder unterbestimmt ist. Ist das System genau bestimmbar, müssen zur Durchführung der Flussanalysen die bekannten extrazellulären Flüsse eingegeben werden, womit dann die unbekanntes intrazellulären Flüsse nach Gleichung 3.54 berechnet werden können.





## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Probenentnahme

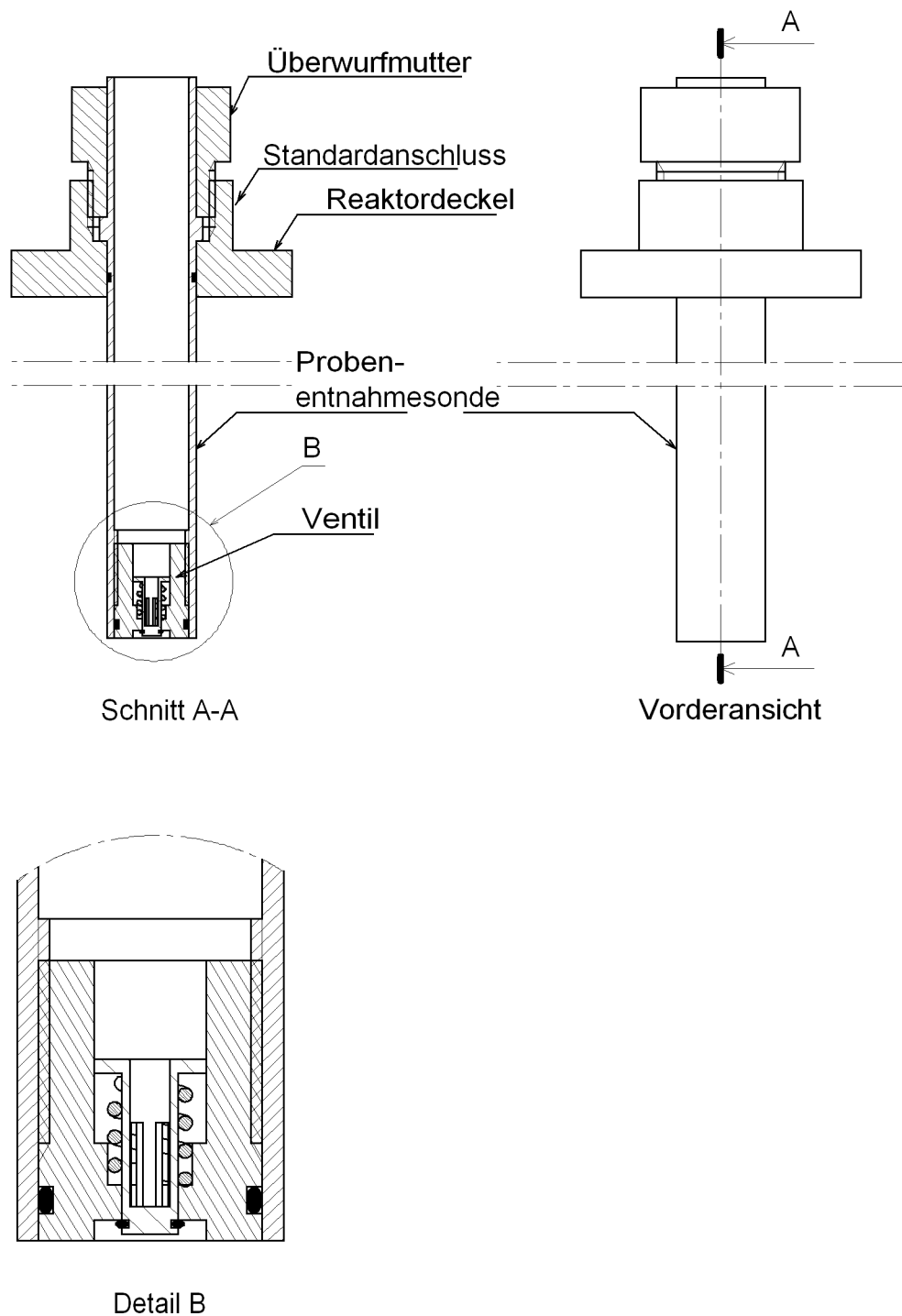
Zur realistischen Bestimmung der Konzentrationen von intrazellulären Stoffwechselprodukten in Mikroorganismen, die in Bioreaktoren kultiviert werden, ist es essenziell notwendig, dass unmittelbar bei der Probenentnahme aus dem Reaktor der Stoffwechsel abgestoppt wird. Nur so kann sichergestellt werden, dass die intrazellulär ermittelten Konzentrationen ein realistisches Abbild der im Reaktor vorliegenden Situation ergeben. Gleichzeitig muss die Probenentnahme repräsentativ, rückwirkungsfrei und reproduzierbar erfolgen.

Da für die Experimente ein Laborglasreaktor zur Verfügung stand (siehe Kapitel 4.3), der nur über einen Edelstahldeckel zugänglich ist, musste ein Probenentnahmesystem konstruiert werden, das den oben formulierten Anforderungen gerecht wird (Patentanmeldung DE 103 14 512.5).

#### 5.1.1 Konstruktion

Um eine schnelle Probeninaktivierung zu verwirklichen, muss sich die Probenentnahmeposition und die Position der Probeninaktivierung inmitten der Flüssigkeit befinden. Würde die Probe über ein Rohr oder eine Kapillare aus dem Reaktor entnommen werden, wäre die Verweilzeit bis zur Inaktivierung zu lang, um sicherstellen zu können, dass während der Probenentnahme keine Umsetzungen erfolgen (vgl. Kapitel 3.3.1).

Das entwickelte Probenentnahmesystem besteht aus zwei Teilen. Der Probenentnahmesonde und dem Probengefäß. Die Probenentnahmesonde ist ein nach außen offenes Edelstahlrohr, das in einen Standardstutzen eines Bioreaktors passt. Am unteren Ende des Rohres, unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche befindet sich ein Probenentnahmeventil (siehe Abbildung 5.1).

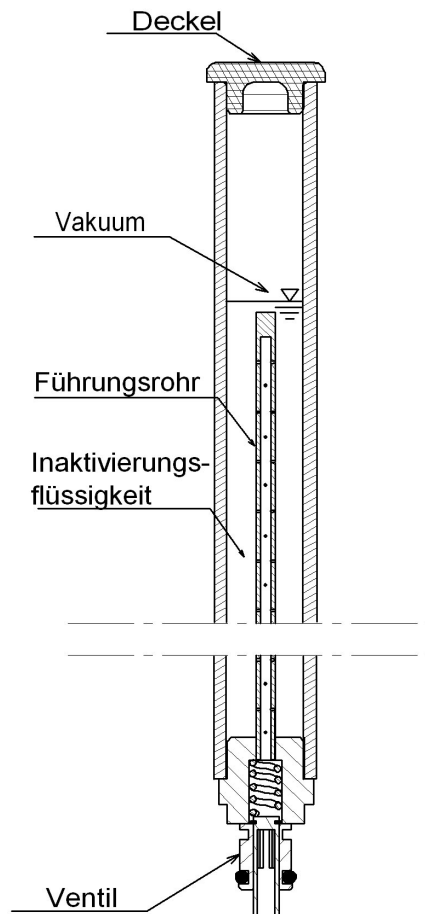


**Abbildung 5.1: Probenentnahmesonde.**

Die bemaßten Konstruktionszeichnungen des Probenentnahmesystems finden sich im Anhang 9.3 (Abbildungen 9.1 bis 9.3).

Das Probengefäß besteht aus einem Kunststoffrohr, das am unteren Ende durch ein Ventil und am oberen Ende durch einen Deckel verschlossen ist und genau in die

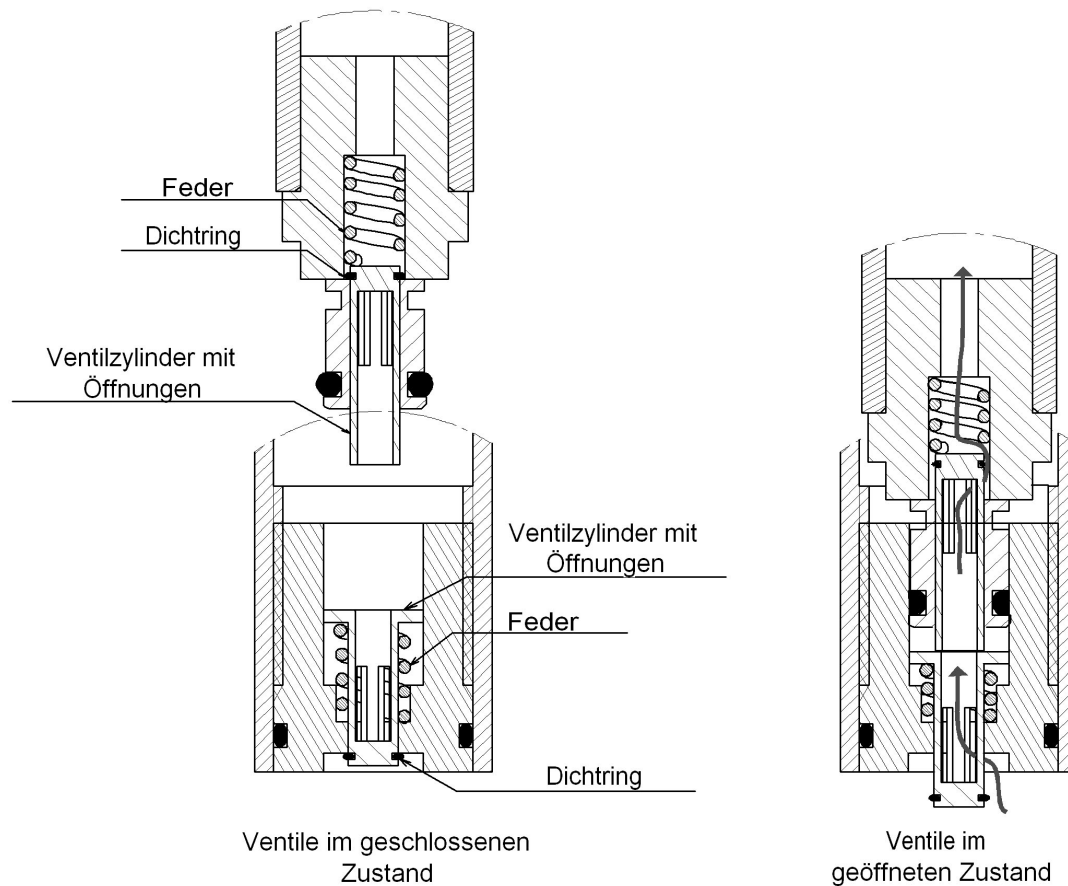
Probenentnahmesonde passt (siehe Abbildung 5.2). Zur Strömungsführung im Probengefäß ist ein Innenrohr mit Bohrungen zur gleichmäßigen Verteilung der Probe in einer Inaktivierungsflüssigkeit integriert.



**Abbildung 5.2: Probengefäß.**

Soll eine Probe aus dem Bioreaktor entnommen werden, so wird das Probengefäß teilweise mit der Inaktivierungsflüssigkeit, z.B. einem Gemisch aus Methanol und Wasser befüllt. Anschließend wird die im Probengefäß befindliche Luft über das Ventil evakuiert. Das Gefäß und die Flüssigkeit werden auf tiefe Temperaturen (beispielsweise  $-50^{\circ}\text{C}$ ) gekühlt. Zur Probenentnahme wird dann das tiefgekühlte Probengefäß in die Probenentnahmesonde eingeführt, bis sich beide Ventile zeitgleich öffnen. Die Funktionsweise der beiden Ventile ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Beide Ventile sind mit einem Dichtring und einem Ventilylinder versehen. Im geschlossenen Zustand sind beide Federn entspannt und die Dichtringe dichten

die Ventile ab. Werden die beiden Ventile zusammengeführt, dann stoßen die beiden Ventilzylinder passgenau aufeinander und beide Federn werden komprimiert. Beide Dichtringe werden von ihren Dichtsitzten entfernt und die Öffnungen in den Ventilzylindern freigegeben. Im geöffneten Zustand kann dann die Probe wie im rechten Teil von Abbildung 5.3 durch die grauen Pfeile dargestellt durch die Öffnungen in den Ventilzylindern strömen.



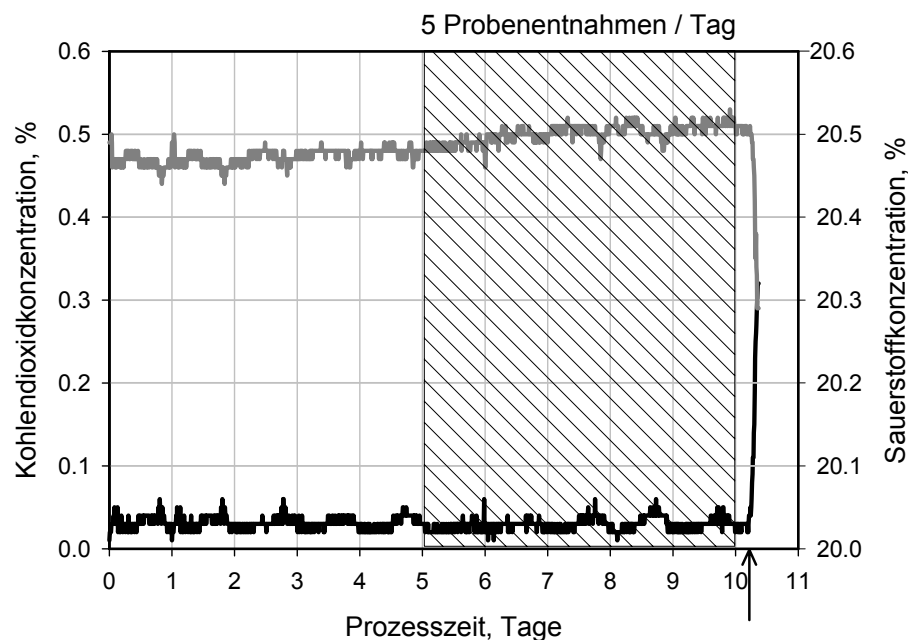
**Abbildung 5.3: Funktionsweise der Ventile.**

Durch den Druckunterschied zwischen Probengefäß und Reaktorinhalt wird die Zellsuspension aus dem Bioreaktor bis zum Druckausgleich in das Probengefäß gefördert, wo sie sich innerhalb von wenigen Millisekunden mit der tiefgekühlten Inaktivierungsflüssigkeit vermischt. Dadurch wird der Zellstoffwechsel abgestoppt. Anschließend wird das Probengefäß manuell aus der Probenentnahmesonde entnommen, wobei sich beide Ventile wieder schließen. Die inaktivierte Probe wird dann entweder sofort aus dem Probengefäß entnommen und weiter aufbereitet, oder bis zur weiteren Probenbehandlung tiefgekühlt. Sollen intrazelluläre Metabolite untersucht werden, so werden die Zellen (beispielsweise bei  $-20\text{ °C}$ ) abzentrifugiert

und das Zellpellet wird extrahiert. Danach werden die intrazellulären Metabolite im Zellextrakt analysiert.

### 5.1.2 Steriltest

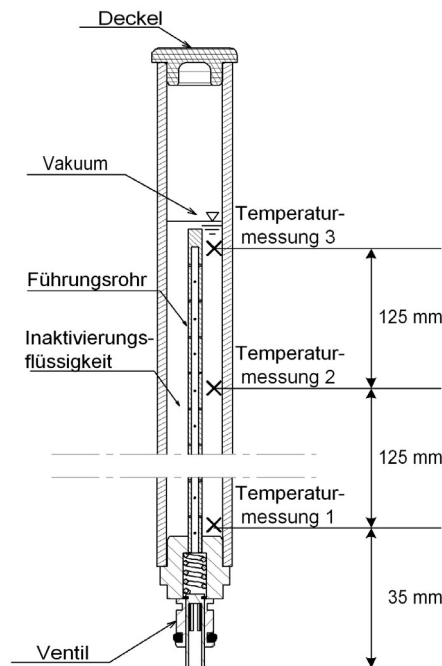
Um das oben beschriebene Probenentnahmesystem zur Probenentnahme aus Bioreaktoren einsetzen zu können, muss sichergestellt sein, dass der Reaktorinhalt durch die Probenentnahme nicht kontaminiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde ein Steriltest durchgeführt. Die Probenentnahmesonde wurde in den für die späteren Kultivierungen einzusetzenden Bioreaktor eingebaut, der Reaktor mit 3 L komplexem Medium (siehe Kapitel 4.2.1) befüllt und sterilisiert. Der Reaktor wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen bei 37°C, einem pH von 7,0 einer Luft-Begasungsrate von 2 L min<sup>-1</sup> und einer Rührerdrehzahl von 1100 min<sup>-1</sup> betrieben, aber nicht inokuliert. Ab dem sechsten Tag wurden fünf Proben pro Tag mit dem Probengefäß in der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Weise aus dem Reaktor entnommen. Für die positive Gegenprobe wurde nach weiteren fünf Tagen der Reaktor mit *Escherichia coli* angeimpft. Die Sterilität des Reaktors bis zur positiven Gegenprobe und das danach erfolgte Wachstum der Mikroorganismen ist in Abbildung 5.4 deutlich an der Abgasanalytik zu erkennen, da erst durch die Zellatmung Kohlendioxid entsteht und Sauerstoff verbraucht wird.



**Abbildung 5.4:** Steriltest: Kohlendioxidkonzentration (schwarz) und Sauerstoffkonzentration (grau) im Abgas des Bioreaktors. Der Zeitpunkt der Inokulation zur positiven Gegenprobe ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

### 5.1.3 Kontrolle der Inaktivierungstemperatur

Zur direkten Bestimmung der Proben­temperatur wurden in einem Proben­nahmegefäß Thermo­elemente mit einer Ansprechzeit von etwa 80 ms angebracht und der Temperaturverlauf während einer Proben­entnahme aufgezeichnet. Die Positionen der Temperaturfühler sind in Abbildung 5.5 dargestellt.



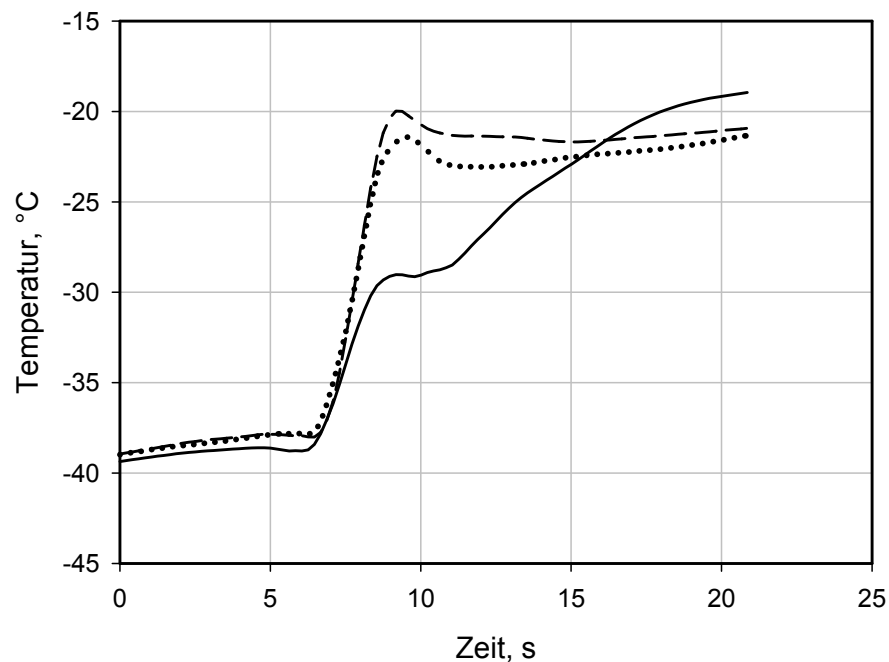
**Abbildung 5.5: Positionen der Temperaturmessung im Proben­gefäß.**

Zur Messung des Temperaturverlaufes wurde das Proben­gefäß mit Inaktivierungs­flüssigkeit befüllt, evakuiert und auf Ausgangstemperatur abgekühlt. Unmittelbar vor der Proben­entnahme wurde die Temp­eraturaufzeichnung gestartet.

Abbildung 5.6 zeigt den Temperaturverlauf unter folgenden Bedingungen: Das Proben­gefäß wurde mit 25 mL 60 % v/v Methanollösung, gepuffert mit 30 mmol L<sup>-1</sup> TEA auf einen pH von 7,5, befüllt, auf 200 mbar evakuiert und auf -40°C gekühlt. Aus dem Reaktor wurden 6 mL Zellsuspension mit einer Biotrockenmassekonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> bei einer Temperatur von 37°C entnommen.

## Diskussion

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Temperatur im Probengefäß zu keinem Zeitpunkt über  $-15^{\circ}\text{C}$  ansteigt, im Zeitrahmen einer realen Probenentnahme ( $< 10\text{ s}$ ) sogar nicht über  $-20^{\circ}\text{C}$ . Damit ist die zum Abstoppen des Zellstoffwechsel notwendige Temperaturgrenze unterschritten und somit gewährleistet, dass der Zellstoffwechsel unmittelbar beim Eintritt in das Probengefäß abgestoppt wird.



**Abbildung 5.6:** Temperaturverlauf während einer realen Probenentnahme. Durchgezogene Linie: Temperaturmessung an Position 1, gepunktete Linie: Temperaturmessung an Position 2, gestrichelte Linie: Temperaturmessung an Position 3.

Der abweichende Temperaturverlauf an Position 1 gegenüber Position 2 und 3 ist durch eine unvollständige Durchmischung im unteren Bereich des Probengefäßes zu erklären. Dies wurde auch bei qualitativen Färbeversuchen zur Durchmischung im Probengefäß festgestellt. Hierzu wurde ein von den Abmessungen her identisches Probengefäß aus Plexiglas angefertigt. Zur optischen Beobachtung der Durchmischung im Probengefäß wurde anstelle von Inaktivierungsflüssigkeit Lauge ( $\text{NaOH}$ ,  $50\text{ mmol L}^{-1}$ ) verwendet, die durch Indikator (Bromthymolblau) blau eingefärbt war. Als „Probe“ wurde Säure ( $\text{HCl}$ ,  $300\text{ mmol L}^{-1}$ ) eingesetzt, so dass anhand des Farbumschlags im Probengefäß die Durchmischung verfolgt werden

konnte. Auch bei diesem einfachen Experiment konnte festgestellt werden, dass am Einlass des Probengefäßes nur ein schwacher Farbumschlag zu beobachten war.

Sowohl die Temperaturmessungen als auch die Beobachtungen mittels Farbumschlag deuten darauf hin, dass am Einlass des Probengefäßes (etwa bis zu einer Höhe von 2 cm) weniger Probe im Verhältnis zur Inaktivierungsflüssigkeit einströmt als über der restlichen Höhe des Probengefäßes. Da dadurch das Temperaturniveau in diesem Bereich noch tiefer liegt als bei den Messpunkten zwei und drei, wurde die nicht vollständige Durchmischung als unbedenklich eingestuft.

#### 5.1.4 Betriebsparameter des Probenentnahmesystems

In experimentellen Untersuchungen wurden die Betriebsparameter Füllvolumen, Unterdruck im Probengefäß, Überdruck im Reaktor und Pufferkonzentration der Inaktivierungsflüssigkeit untersucht. Als optimale Betriebsparameter wurden die in Tabelle 5.1 dargestellten Parameter identifiziert.

**Tabelle 5.1: Optimale Betriebsparameter des Probenentnahmesystems.**

Parameter	Optimaler Betriebspunkt
Füllvolumen	25 mL
Evakuierungsdruck im Probengefäß	200 mbar
Überdruck im Reaktor	200 mbar
Pufferkonzentration	30 mmol L <sup>-1</sup>

#### 5.1.5 Überprüfung der Integrität von *Escherichia coli*

Der Einfluss der Inaktivierungsflüssigkeit auf die Integrität der Mikroorganismen wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurde mit dem in Kapitel 4.6.4 beschriebenen Viabilitätstest die Permeabilisierung der Mikroorganismen nach der Probenentnahme mit 60 % v/v Methanollösung, gepuffert mit 30 mmol L<sup>-1</sup> TEA auf pH = 7,5 und einer Temperatur von -40°C untersucht. Nach dem Inaktivierungsschritt zeigten noch 99,1 % ± 0,8 % der *E. coli*-Zellen Viabilität. Auch Zellvolumen und Zellgröße wurden

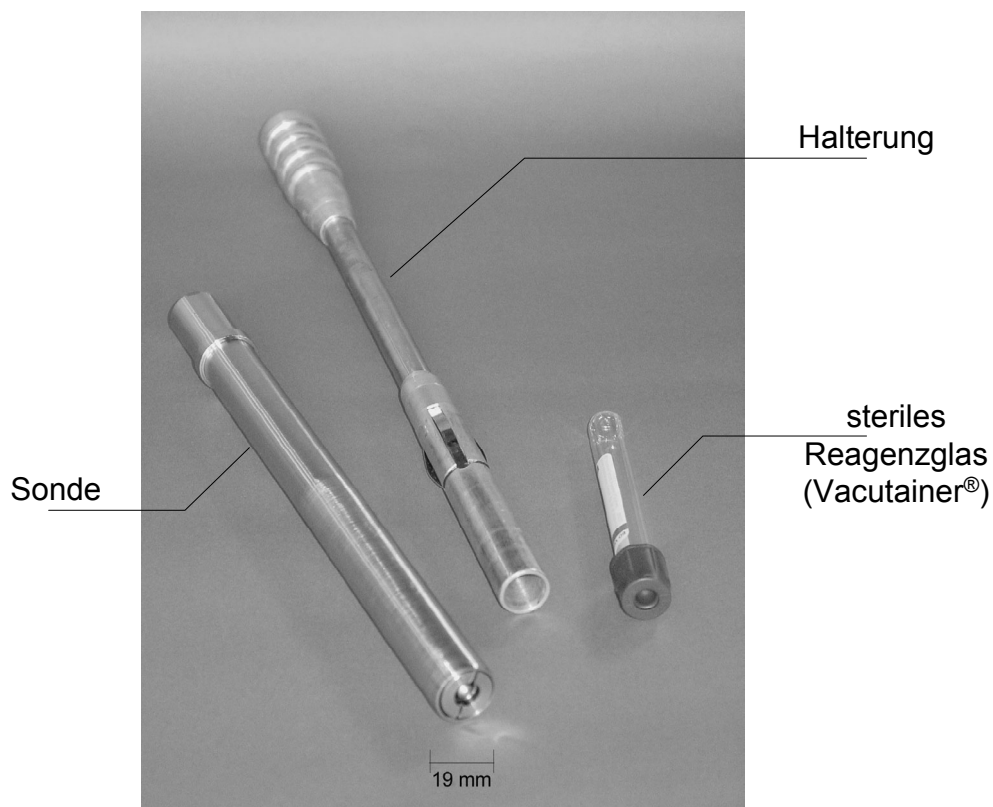


durch die Probeninaktivierung nicht signifikant verändert. Intrazelluläre Metabolite konnten in der Inaktivierungsflüssigkeit nicht nachgewiesen werden.

Die intrazelluläre Konzentration mehrerer Metabolite wurde über einen Zeitraum von 45 min wiederholt analysiert, während die Zellen bei  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  in der Inaktivierungsflüssigkeit gelagert wurden. In diesem Zeitraum konnten keine signifikanten Veränderungen der Metabolitkonzentrationen festgestellt werden.

### 5.1.6 Weiterentwicklung des Probenentnahmesystems

Um das in Kapitel 5.1.1 beschriebene Probenentnahmesystem auch für allgemeine Fragestellungen im „alltäglichen“ Laborgebrauch zugänglich zumachen, wurde das System für die Nutzung von Einmalgefäßen als Probengefäße weiterentwickelt (Patentanmeldung DE 102 005 049 226.6, Hiller und Weuster-Botz, 2005). Das System besteht ähnlich wie das Probenentnahmesystem zum simultanen Abstoppen des Zellstoffwechsels aus drei Komponenten: Einer Probensonde, einem Probengefäß und einer Halterung, mit der das Probengefäß in die Probensonde eingeführt werden kann (siehe Abbildung 5.7).

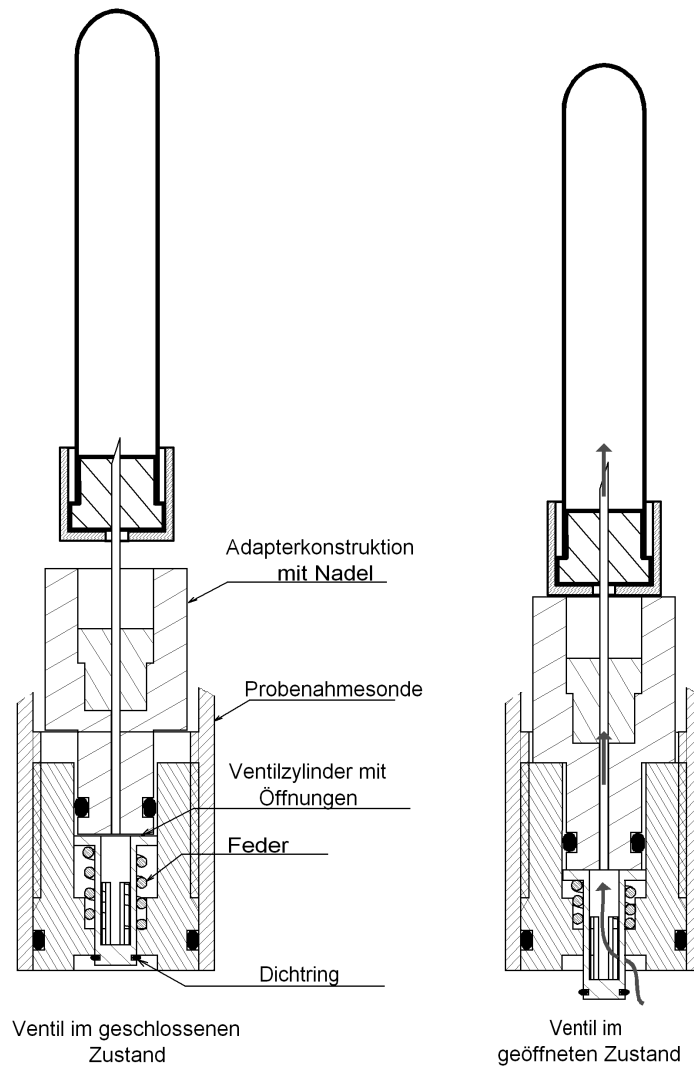


**Abbildung 5.7:** Probenentnahmesystem zur Nutzung von Einmalprobengefäßen.

Das Ventil in der Probensonde wurde so modifiziert, dass kommerziell erhältliche sterile und evakuierte Reagenzgläser, die mit einem Silikonseptum verschlossen sind, als Probengefäße zur Probenentnahme verwendet werden können (siehe Abbildung 5.8 und Abbildung 9.4 in Anhang 9.3). Diese sterilen Reagenzgläser sind mit unterschiedlichen Volumina und gegebenenfalls auch mit unterschiedlichen Reagenzien befüllt verfügbar (beispielsweise Vacutainer® „Z (Serum)“, BD GmbH, Heidelberg, Deutschland).

Bei einer Probenentnahme wird das Probengefäß mithilfe der Halterung in die Probensonde eingeführt. Dabei wird zunächst das Septum des Probengefäßes mit der Anstechnadel durchstoßen und anschließend das Ventil der Probensonde geöffnet (siehe Abbildung 5.8). Durch den Druckunterschied zwischen Reaktorinnenraum und evakuiertem Probengefäß wird nun eine definierte Menge Probe in das Probengefäß gefördert. Nach dem Druckausgleich wird die Halterung mit dem Probengefäß wieder aus der Sonde herausgezogen, wobei sich Ventil und Septum wieder verschließen. Das Probengefäß wird anschließend manuell aus der Halterung entfernt und in der Regel direkt zur weiteren Probenaufbereitung genutzt (beispielsweise Zentrifugation der Biomasse).

Das definierte Probenvolumen liegt unterhalb von 10 mL und ist sowohl von der Größe und der Vorbefüllung des Probengefäßes abhängig, als auch vom Druckunterschied zwischen Probengefäß und Bioreaktor. Nach jeder Probenentnahme verbleibt ein Totvolumen von 85 µL Probe in Ventil und Anstechnadel. Dieses Totvolumen wird bei der nächsten Probenentnahme mit in das Probengefäß transportiert. Bei einem Probenvolumen von 10 mL bedeutet dies einen Volumenanteil von 0,85%.



**Abbildung 5.8: Modifiziertes Ventil zur Nutzung von Einmalprobengefäßen.**

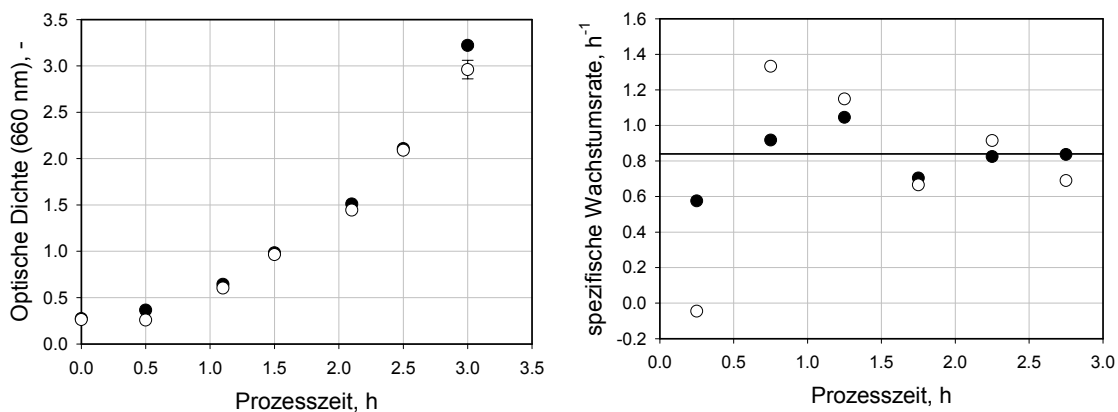
### Beispielanwendung

Ein Steriltest wurde wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben durchgeführt. Es wurde keine Kontamination im Reaktor festgestellt. Auch die aus dem Reaktor entnommene Probe im Probengefäß konnte über mindestens 20 Tage steril im Probengefäß aufbewahrt werden.

Manuelle Probenentnahmen wurden vergleichend mit dem neuen Probenentnahmesystem und einem Tauchrohr während der Kultivierung von *Escherichia coli* im Rührkesselreaktor durchgeführt. Zur Satzkultivierung von *Escherichia coli* wurden 1,5 L Komplexmedium (siehe Kapitel 4.2.1) eingewogen, auf pH 6,8 eingestellt und im Bioreaktor (KLF2000, Bioengineering, Wald, Schweiz) sterilisiert. Die Vorkulturherstellung erfolgte mit derselben

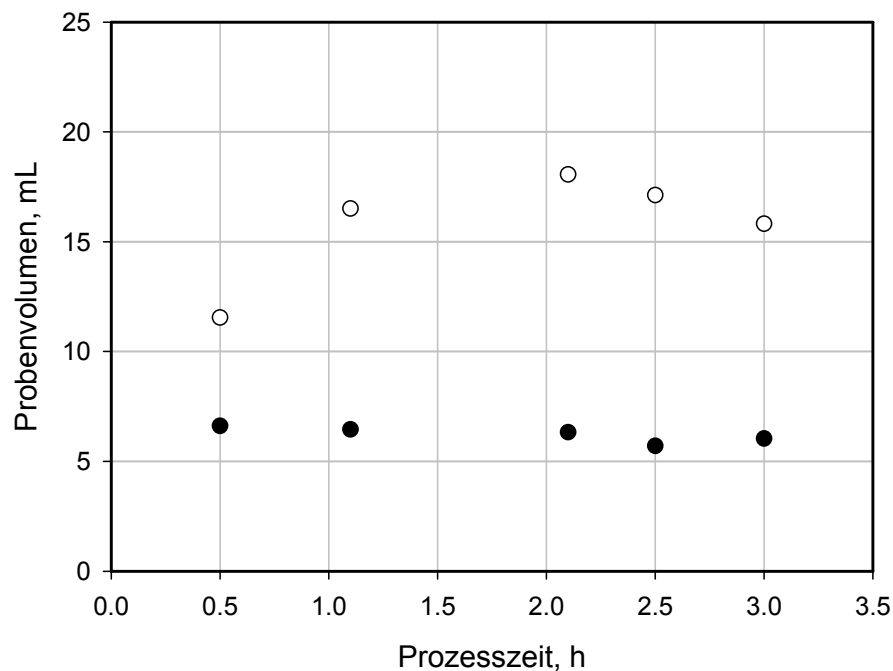
Mediumszusammensetzung (100 mL Medium im 1000 mL Schüttelkolben bei 37°C und 250 min<sup>-1</sup>). Nach 15 Stunden erfolgte bei einer optischen Dichte von 3,6 (660 nm) die Inokulation des Rührkesselreaktors. Der Bioreaktor wurde nachfolgend mit einer Temperatur von 37°C, einem Druck von 1 bar, einer Begasungsrate von 1 vvm und einer Rührdrehzahl von 1500 min<sup>-1</sup> (drei Sechsstabtrührer) betrieben.

Zur Analyse des Wachstums von *Escherichia coli* im Rührkesselreaktor wurden in einem Beobachtungszeitraum von drei Stunden im Abstand von einer halben Stunde Proben aus dem Reaktor entnommen und die optische Dichte bei 660 nm analysiert. Für die Probenentnahme mit dem Tauchrohr wurden zunächst einige Milliliter Probe entnommen und verworfen (Vorlauf aufgrund des hohen Totvolumens von 10 mL), anschließend wurden etwa fünf Milliliter Probe in ein Probengefäß überführt und vor der weiteren Probenaufbereitung bei 0°C gelagert. Für die Probenentnahme mit dem neuen Probenentnahmesystem wurde ohne weitere Vorbereitungen ein kommerziell erhältliches, evakuiertes und steriles Probengefäß (Vacutainer „Z (Serum)“, BD GmbH, Heidelberg, Deutschland) in die Halterung gesteckt, wie oben beschrieben mit einem Handgriff 6,1 +/- 0,3 mL Probe entnommen und das Probengefäß vor der weiteren Probenaufbereitung ebenfalls bei 0°C zwischen gelagert.



**Abbildung 5.9: Satzaktivierung von *E. coli*:** Links: Optische Dichte als Funktion der Prozesszeit ermittelt mit klassischer Probenentnahme über ein Tauchrohr (○) und mit Hilfe des *in-situ* Probenentnahmesystems (●). Rechts: Nach dem einfachen Differenzenverfahren abgeschätzte Wachstumsraten. Die über die exponentielle Wachstumsphase gemittelte spezifische Wachstumsrate von 0,84 h<sup>-1</sup> ist durch die horizontale Linie gekennzeichnet.

Die Messdaten beider Probenentnahmen sind in Abbildung 5.9 als Funktion der Prozesszeit aufgetragen. Beide Probenentnahmearten führen im Rahmen der Beobachtungsgenauigkeit zu vergleichbaren Messergebnissen. Die Abschätzung der Wachstumsrate nach dem einfachen Differenzverfahren zeigt jedoch eindeutig, dass die manuelle Probenentnahme mit dem neuen Probenentnahmesystem zuverlässigere Messdaten liefert.



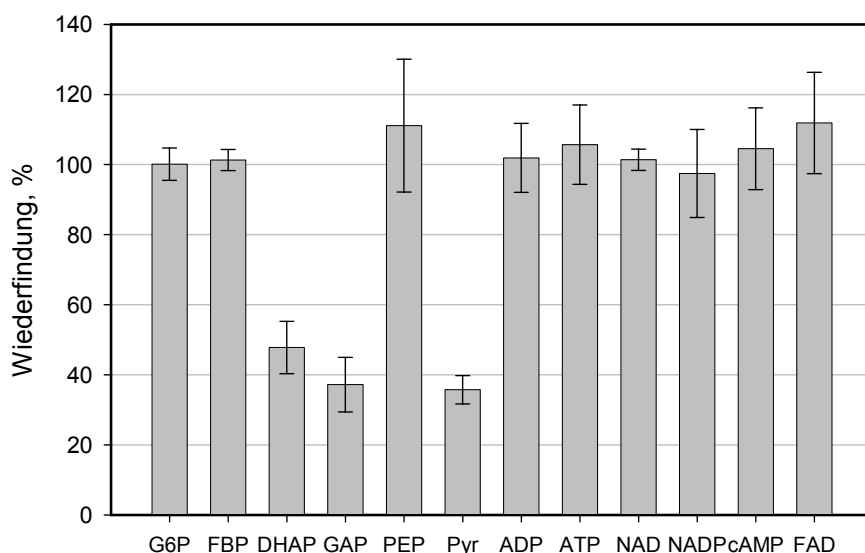
**Abbildung 5.10: Satzkultivierung von *E. coli*: Probenvolumina als Funktion der Prozesszeit mit klassischer Probenentnahme über ein Tauchrohr (○) und mit Hilfe des *in-situ* Probenentnahmesystems (●).**

In Abbildung 5.10 sind die nach der Probenentnahme ermittelten Probenvolumina für beide Probeentnahmearten getrennt aufgetragen. Hierbei wurde der „Vorlauf“ bei der Probenentnahme mit dem Tauchrohr zum Probenvolumen hinzu addiert. Erst bei einem Vorlauf von ca. 10 mL, entsprechend einem Gesamtvolumen von mehr als 15 mL wurden Werte der optischen Dichte erreicht, die den mit dem neuen System ermittelten Werten entsprechen.

## 5.2 Zellaufschluss

### 5.2.1 Gefriertrocknung zur Aufkonzentrierung

Da die zu analysierenden intrazellulären Metabolitkonzentrationen generell sehr gering sind (intrazellulär im Bereich von etwa  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  und darunter), wurde die Nutzung einer Gefriertrocknung zur Aufkonzentrierung untersucht. Hierfür wurde ein Gemisch mit Standards aller Metabolite in einer Konzentration von  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  in 50 % v/v Methanollösung angesetzt, lyophilisiert, im Ausgangsvolumen mit 50 % v/v Methanollösung resuspendiert und anschließend analysiert. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 5.11 dargestellt.



**Abbildung 5.11: Wiederfindung einiger Metabolite nach einer Gefriertrocknung.**

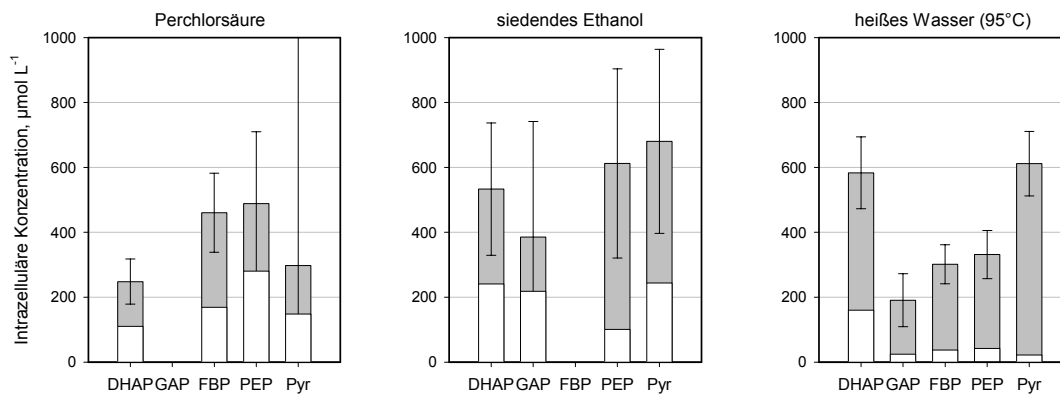
Es zeigt sich, dass alle Komponenten bis auf Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehydphosphat und Pyruvat nach dem Gefriertrocknen im Rahmen der Messgenauigkeit zu 100% wiedergefunden werden.

### 5.2.2 Kalibrierung mittels Standardaddition vor der Extraktion

Um Effekte der Gefriertrocknung auf DHAP, GAP und Pyruvat – und andere Einflüsse der Probenaufbereitung bei der Extraktion, sowie der Analytik zu berücksichtigen, wurde die Methode der Standardaddition *vor der Extraktion* eingesetzt. Hierbei wird jede Extraktion vier oder fünffach durchgeführt, wobei zu jedem Extraktionsansatz ein Gemisch mit Standards aller analysierten Metabolite in vier oder fünf unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben wird. Eine Kalibrierung erfolgt dann über die Standards, die der gleichen Prozedur unterzogen wurden, wie die zu analysierenden Metabolite. Die Berechnungsmethode ist in Kapitel 4.5 erläutert.

### 5.2.3 Wahl der Extraktionsmethode

Zur Auswahl eines geeigneten Extraktionsverfahrens zum Zellaufschluss wurden drei in der Literatur beschriebene Methoden ausgewählt und miteinander verglichen. Die Extraktion wurde wie in Kapitel 4.5 beschrieben mit Perchlorsäure, siedendem Ethanol oder heißem Wasser (95°C) durchgeführt. Hierzu wurde *Escherichia coli* K12 im stationären Rührreaktor bei einem Reaktionsvolumen von 3 L, einer Durchflussrate von 0,125 h<sup>-1</sup> mit 30 g L<sup>-1</sup> Glucose als Substrat im Zulauf bei einer Temperatur von 37°C, einem pH von 7,0, einer Rührerdrehzahl von 1100 min<sup>-1</sup> und einer Luft-Begasungsrate von 6 L min<sup>-1</sup> kultiviert. Nach Erreichen des stationären Zustands wurden 600 mL Zellsuspension in 2,5 L Inaktivierungsflüssigkeit mit einer Temperatur von -40°C überführt, bei -20°C für 5 min mit 4500 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und in 60 mL 60 % v/v Methanollösung resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei -15 °C gelagert und als Ausgangslösung für alle Extraktionen verwendet. Jede Extraktion wurde vierfach mit Standardadditionen vor der Extraktion durchgeführt. Da sowohl die Extraktion mit Perchlorsäure, als auch die mit HEPES gepufferte Extraktion mit siedendem Ethanol mit der LC-MS-Analytik interferiert, wurden nur die Metabolite verglichen, die über einen enzymatischen Nachweis zugänglich sind. Der Vergleich der Extraktionsmethoden, die Standardabweichung der Vierfachbestimmung, sowie die untere Nachweisgrenze (ermittelt über die dreifache Standardabweichung der Kalibrierung) sind in Abbildung 5.12 dargestellt.



**Abbildung 5.12: Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen im stationären Zustand ( $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$ ,  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im Zulauf), ermittelt mit unterschiedlichen Extraktionsmethoden. Untere Nachweisgrenze der einzelnen Metabolite und Extraktionsmethoden sind durch die weißen Balken gekennzeichnet.**

## Diskussion

Die Konzentration an Glucose-6-phosphat lag sowohl bei der Extraktion mit Perchlorsäure, als auch bei der Extraktion mit siedendem Ethanol unterhalb der Nachweisgrenze. Mit heißem Wasser konnte G6P nachgewiesen werden, allerdings mit schlechter Reproduzierbarkeit (siehe auch Abbildung 5.14). Für Fructose-6-phosphat konnte nur bei der Extraktion mit siedendem Ethanol eine Kalibrierung mittels Standardaddition erstellt werden, die ermittelte F6P-Konzentration lag im Bereich der Nachweisgrenze (siehe auch Abbildung 5.13). DHAP konnte mit allen Extraktionsmethoden nachgewiesen werden. GAP konnte durch die Perchlorsäureextraktion nicht bestimmt werden. Die durch Ethanolextraktion ermittelte Konzentration an FBP lag unter der Nachweisgrenze. PEP und Pyruvat konnten mit allen drei Extraktionsmethoden bestimmt werden, die höchste Reproduzierbarkeit und geringsten Nachweisgrenzen wurden bei der Extraktion mit heißem Wasser erzielt.

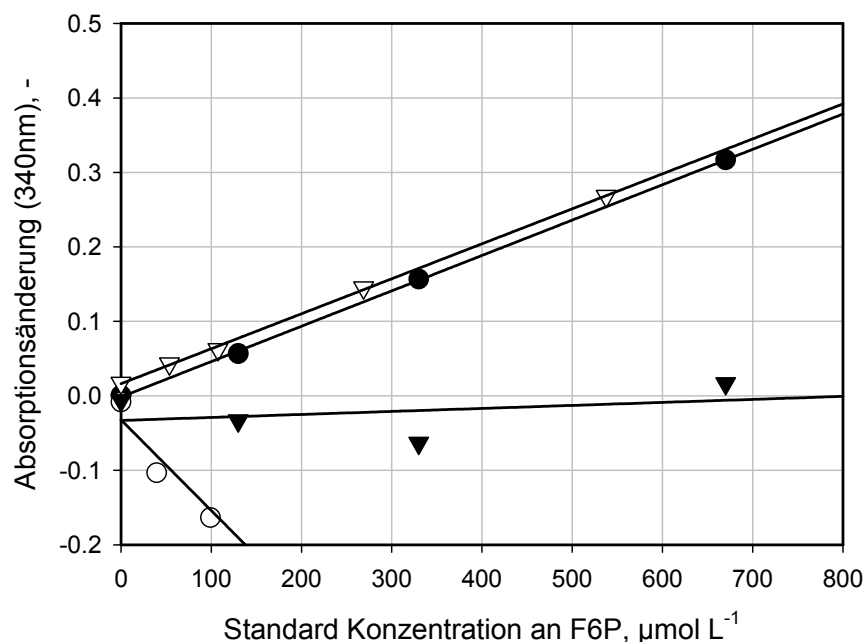
Anhand dieses Vergleichs wird deutlich, dass die Extraktion mit heißem Wasser die besten Ergebnisse bezüglich Reproduzierbarkeit und damit auch die kleinste untere Nachweisgrenze liefert. Eine Ausnahme findet sich bei der Extraktion von F6P, das nur über die Extraktion mit siedendem Ethanol nachgewiesen werden kann.



#### 5.2.4 Optimierung der Extraktion mit heißem Wasser (95°C)

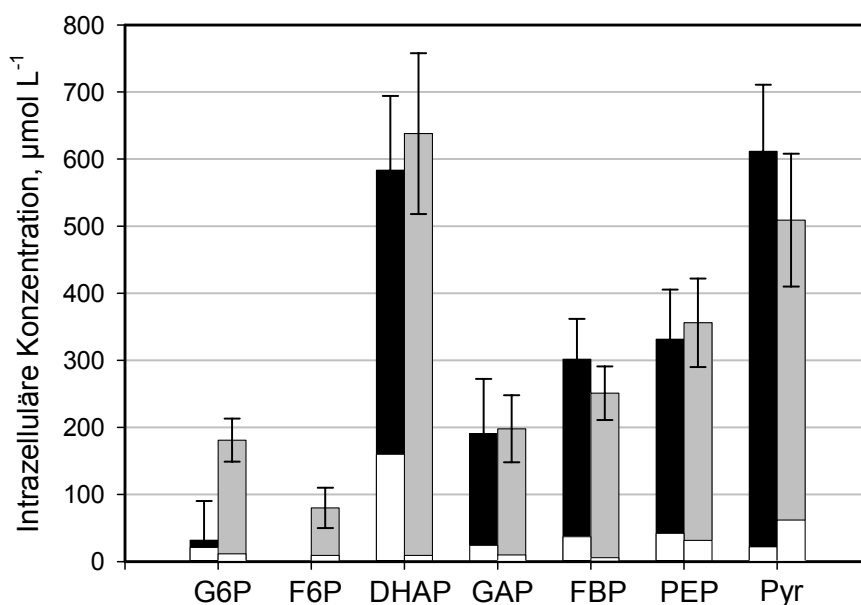
Die Extraktion mit heißem Wasser zeigt gegenüber den Extraktionsmethoden mit Perchlorsäure und siedendem Ethanol zwei Vorteile: Zum einen können die mit Wasser extrahierten Zellproben mittels LC-MS analysiert werden. Zum anderen liefert die Extraktion mit heißem Wasser eine höhere Reproduzierbarkeit und eine geringere untere Nachweisgrenze im Vergleich zu den Extraktionen mit Perchlorsäure und siedendem Ethanol. Die Methodik sollte daher dahingehend optimiert werden, dass auch F6P analysiert werden konnte.

Bei der Extraktion mit siedendem Ethanol wird im Vergleich zu den anderen Extraktionsmethoden ein Puffer (70 mmol L<sup>-1</sup> 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES)) eingesetzt. Daher war es naheliegend auch die Extraktion mit heißem Wasser unter Verwendung eines Puffers zu untersuchen. Es wurden Extraktionen mit heißem Wasser bei pH 7,5 mit den Puffern HEPES, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und Triethanolamin (TEA) in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die beste lineare Regression für eine Pufferkonzentration von 30 mmol L<sup>-1</sup> TEA erreicht werden konnte. Exemplarisch wird die Standardaddition für F6P für die Extraktionsmethoden mit Perchlorsäure, siedendem Ethanol, heißem Wasser, und gepuffertem heißem Wasser in Abbildung 5.13 gezeigt.



**Abbildung 5.13: Enzymatische Bestimmung und Kalibrierung mit Standardaddition von F6P, Extraktion mit siedendem Ethanol (●), Perchlorsäure (○), heißem Wasser (▼) und heißem Wasser, gepuffert (▽).**

Es ist deutlich zu sehen, dass die Kalibrierung bei einer Extraktion mit gepuffertem heißem Wasser mit der Kalibrierung bei einer Extraktion mit siedendem Ethanol zu vergleichen ist. Auch für die anderen Metabolite konnte durch den Einsatz von 30 mmol L<sup>-1</sup> TEA bei der Extraktion die Reproduzierbarkeit und damit auch die Nachweisgrenze optimiert werden (siehe Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14:** Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen im stationären Zustand ( $D = 0,125 \text{ h}^{-1}$ ;  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im Zulauf) bei Extraktion mit heißem Wasser (schwarz) und mit heißem Wasser, gepuffert (grau). Untere Nachweisgrenzen der einzelnen Metabolite und Extraktionsmethoden sind durch die weißen Balken gekennzeichnet.

Bis auf die Extraktion von Pyruvat konnte durch den Einsatz eines Puffers bei der Extraktion mit heißem Wasser durch eine größere Linearität bei der Kalibrierung die untere Nachweisgrenze (ermittelt aus der dreifachen Standardabweichung der Kalibrierung) verringert werden. Auch gegenüber publizierten Daten (Buchholz et al., 2002), die unter gleichen Kultivierungsbedingungen mittels Perchlorsäureextraktion ermittelt wurden, konnten die intrazellulären Nachweisgrenzen der meisten Metabolite um den Faktor 10 verringert werden. Somit wurde die Extraktion mit heißem Wasser, gepuffert mit 30 mmol L<sup>-1</sup> TEA, als Zellaufschlussmethode für die Untersuchungen ausgewählt.

Zusammenfassend wird das entwickelte Probenentnahme und -aufbereitungsschema in Abbildung 5.15 noch einmal dargestellt. Dabei ist die Aufkonzentrierung der intrazellulären Metabolite während der einzelnen Schritte gegenüber der Konzentration im Bioreaktor aufgezeigt.



**Abbildung 5.15: Probenentnahme und –aufbereitung mit Aufkonzentrierungsfaktoren gegenüber der Konzentration im Bioreaktor. Grau hinterlegt sind die Schritte mit intakten Zellen.**

Eine intrazelluläre Konzentration von  $1000 \mu\text{mol L}_{\text{Zellen}}^{-1}$  bedeutet hierbei bei einer Biotrockenmassekonzentration von  $10 \text{ g L}^{-1}$  und einem spezifischen Zellvolumen von

2  $\mu\text{l mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  eine Konzentration im Bioreaktor von 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . In diesem Beispiel würde sich in der zu analysierenden Probe eine Konzentration von 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$  oder 35  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (DHAP, GAP, FBP, PEP, Pyruvat) ergeben.

### 5.3 Untersuchungen im Fließgleichgewichtszustand

Zur Induzierung unterschiedlicher, definierter, metabolischer Zustände wurden im substratlimitierten Chemostaten Fließgleichgewichtszustände bei verschiedenen Verweilzeiten unter Zudosierung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen eingestellt. Alle Untersuchungen wurden unter identischen Bedingungen bezüglich Medium, Begasungsrate, Rührerdrehzahl, pH und Temperatur durchgeführt. In Tabelle 5.2 sind alle Kultivierungsparameter zusammengestellt.

**Tabelle 5.2: Konstante Parameter aller Kultivierungen.**

Parameter	Eingestellte Größe
Medium	Mineralsalzmedium
Temperatur	37°C
pH	7,0 mit 25 % $\text{NH}_4\text{OH}$
Gesamtsubstratkonzentration im Zulauf	30 $\text{g L}^{-1}$
Reaktionsvolumen	3 L
Begasungsrate	2 $\text{L min}^{-1}$ (2 vvm)
Rührerdrehzahl	1100 $\text{min}^{-1}$

Variiert wurde die Durchflussrate, sowie das Zulaufmedium, das immer mit einer Gesamtsubstratkonzentration von 30  $\text{g L}^{-1}$  versetzt war, bestehend aus Glucose, Mischungen aus Glucose und Fructose und Mischungen aus Glucose und Acetat. Die eingestellten Fließgleichgewichtszustände sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

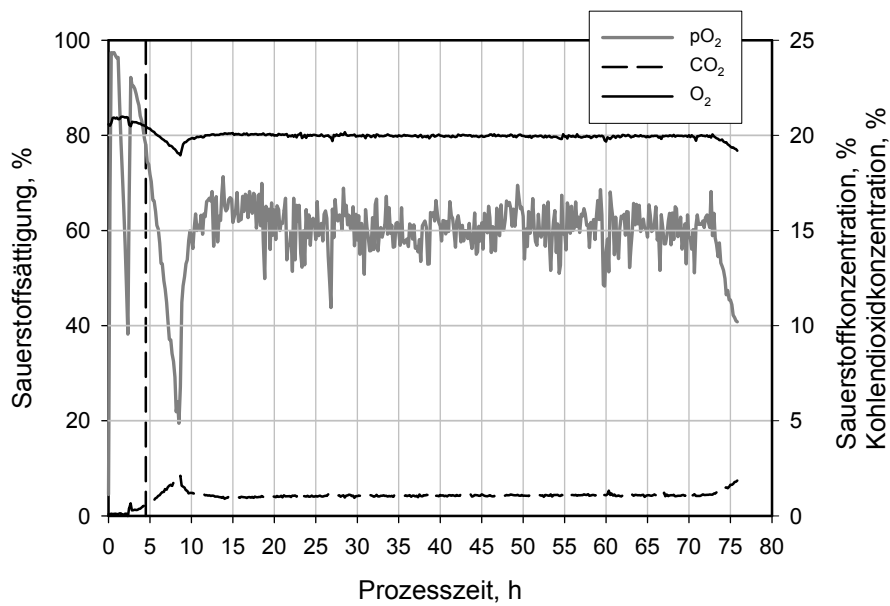
**Tabelle 5.3: Untersuchte Fließgleichgewichtszustände.**

Experiment Nr.	$\mu, \text{h}^{-1}$	C-Quellen im Zulauf
1	0,125	100 % Glucose
2	0,25	100 % Glucose
3	0,4	100 % Glucose
4	0,125	90 % Glucose, 10 % Fructose
5	0,25	90 % Glucose, 10 % Fructose
6	0,125	10 % Glucose, 90 % Fructose
7	0,25	10 % Glucose, 90 % Fructose
8	0,125	90 % Glucose, 10 % Acetat
9	0,25	90 % Glucose, 10 % Acetat
10	0,3	90 % Glucose, 10 % Acetat

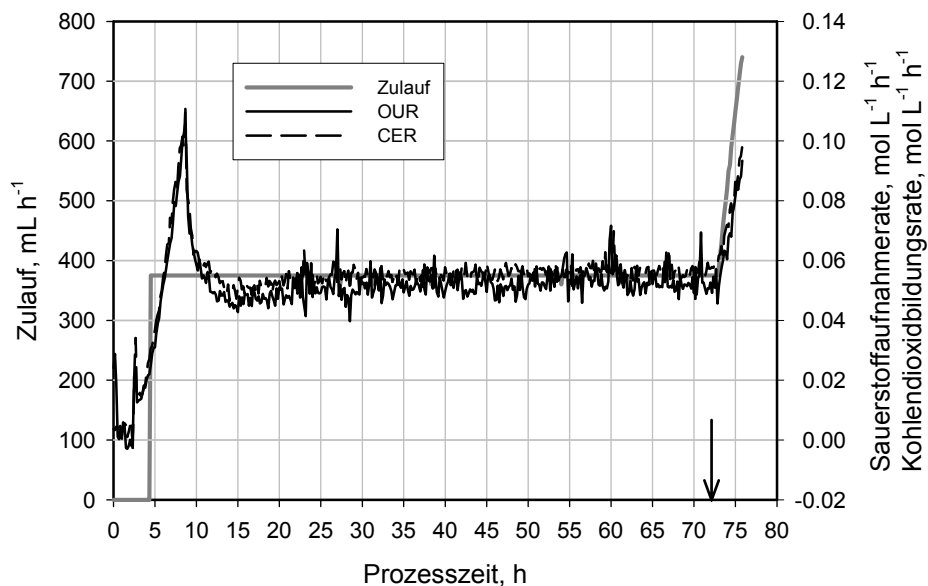
### 5.3.1 Prozessgrößen im Fließgleichgewichtszustand

Während der einzelnen Kultivierungen wurden sowohl externe Prozessgrößen erfasst, wie z.B. Sauerstoffsättigungskonzentration, Sauerstoffaufnahme, Biotrockenmassekonzentration als auch intrazelluläre Metabolitkonzentrationen analysiert.

Der Verlauf einer kontinuierlichen Kultivierung ist exemplarisch für die Untersuchungen mit Glucose als Substrat bei einer Wachstumsrate von  $0,125 \text{ h}^{-1}$  in Abbildung 5.16 und Abbildung 5.17 graphisch dargestellt.



**Abbildung 5.16:** Sauerstoffsättigungskonzentration, Sauerstoffkonzentration- und Kohlendioxidkonzentration in der Abluft bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* bei  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  mit  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im Zulauf und einem Reaktionsvolumen von 3 L. Der Beginn des kontinuierlichen Betriebs ist durch die vertikale Linie gekennzeichnet.



**Abbildung 5.17:** Zulaufrate, Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsrate bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* bei  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  mit  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im Zulauf und einem Reaktionsvolumen von 3 L. Der Zeitpunkt der Probenentnahme ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Qualitativ sehen die zeitlichen Verläufe der Prozessgrößen bei den weiteren Kultivierungen identisch aus, allerdings befinden sich die einzelnen Prozessgrößen abhängig von den eingesetzten Substraten und eingestellten Wachstumsraten auf unterschiedlichen Niveaus. Eine Zusammenfassung der einzelnen Prozessgrößen für alle stationären Zustände ist in Tabelle 5.4 gegeben.

Tabelle 5.4: Externe Prozessgrößen der stationären Untersuchungen.

Experiment	Zulauf	BTM	C <sub>Glucose</sub>	C <sub>Acetat</sub>	C <sub>Fructose</sub>	pO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
	mL h <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	%	%	%
100 % Glucose								
1	375	10,3 ± 0,5	20,6 ± 12,1	44,8 ± 12,0	-	57,3	19,9	1,1
2	750	12,3 ± 0,1	3,2 ± 1,3	50,3 ± 12,4	-	32,7	19,2	1,9
3	1200	5,0 ± 0,3	20000 ± 1322	495,7 ± 54,4	-	65,5	19,9	1,0
90 % Glucose / 10 % Fructose								
4	375	10,9 ± 0,4	16,7 ± 6,2	6,4 ± 8,6	1,7 ± 1,2	53,1	19,8	1,1
5	750	10,1 ± 0,2	8,7 ± 1,2	7,4 ± 0,4	2,6 ± 0,3	31,6	19,0	2,0
10 % Glucose / 90 % Fructose								
6	375	9,7 ± 0,4	24,3 ± 1,0	29,5 ± 2,4	23,5 ± 2,9	83,5	20,1	1,0
7	750	5,9 ± 0,4	41,2 ± 4,3	438,4 ± 32,1	973,0 ± 41,7	74,0	20,1	1,0
90 % Glucose / 10 % Acetat								
8	375	9,0 ± 0,4	9,7 ± 1,5	n.d.	-	60,3	19,9	1,1
9	750	9,6 ± 0,4	13,3 ± 1,7	2,1 ± 2,9	-	34,5	19,3	2,0
10	900	11,4 ± 0,5	8,4 ± 5,1	5,3 ± 2,5	-	29,6	18,8	2,3

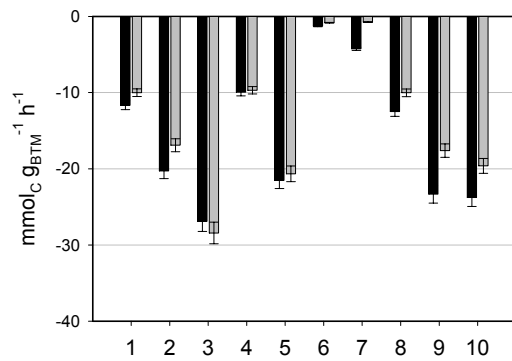


Ausgehend von den oben zusammengestellten Prozessgrößen wurden die spezifischen, extrazellulären Substrataufnahme- und Produktbildungsraten berechnet (siehe Kapitel 3.1.4).

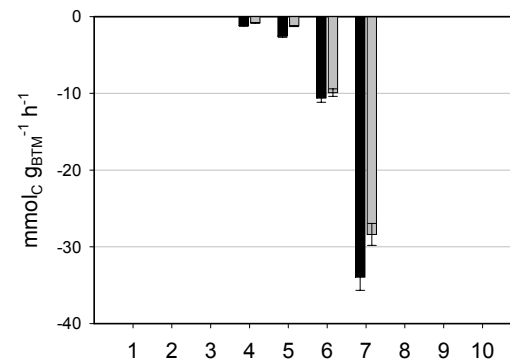
Um die Kohlenstoffbilanz vollständig zu schließen, wurden die errechneten Raten im Rahmen der zu erwartenden Fehler optimiert. Die zu erwartende Fehler wurden für die Bestimmung von Glucose und Fructose zu 5 %, für die Messung von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> zu 15 %, für die Acetatmessung zu 15 % und für die Biotrockenmassebestimmung zu 5 % abgeschätzt. Ein Vergleich der gemessenen und der anschließend für die metabolische Flussanalyse herangezogenen optimierten Aufnahme- und Bildungsrate ist in Abbildung 5.18 dargestellt.

Bei Experiment 7 (10 % Glucose und 90 % Fructose im Zulauf bei einer Durchflussrate von 0,25 h<sup>-1</sup>) mussten Sauerstoffaufnahme-, Kohlendioxidbildungsrate und Biomassebildungsrate deutlich verändert werden, um die Kohlenstoffbilanz zu schließen. Aufgrund dieser Tatsache, sowie der ungewöhnlich niedrigen Biotrockenmassekonzentration von nur 5,9 g L<sup>-1</sup> (siehe Tabelle 5.4) wird dieses Experiment im Folgenden als fehlerhaft betrachtet und durch einen Stern gekennzeichnet.

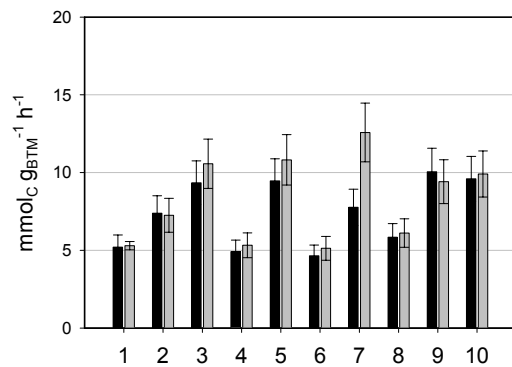
A: Glucoseaufnahme



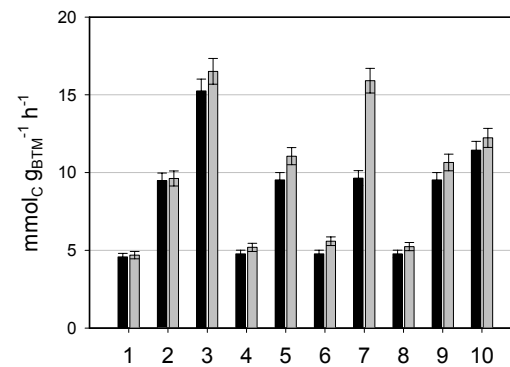
B: Fructoseaufnahme



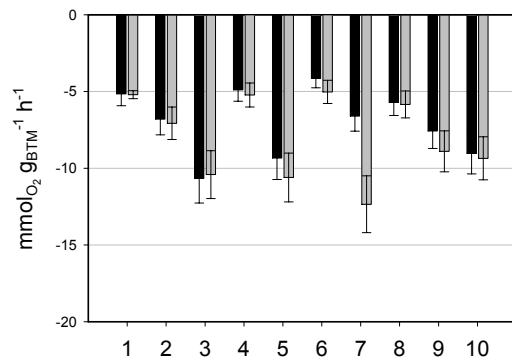
C: Kohlendioxidbildung



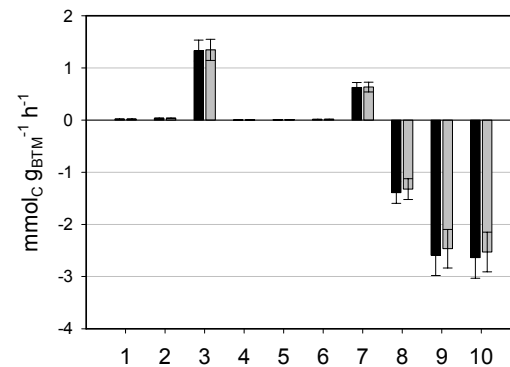
D: Biomassebildung



E: Sauerstoffaufnahme



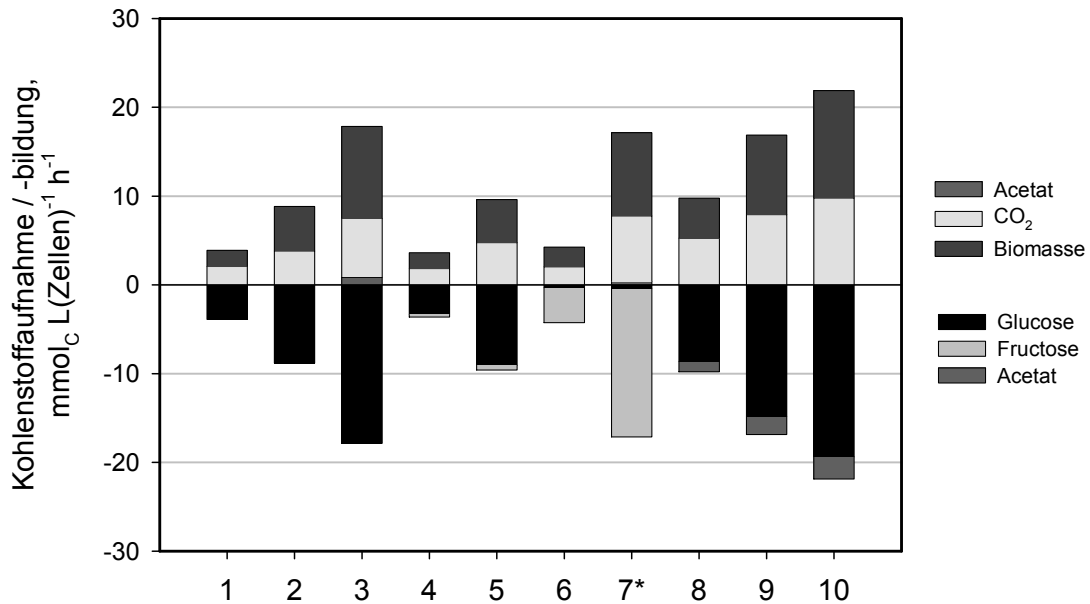
F: Acetataufnahme / -bildung



**Abbildung 5.18: Vergleich der gemessenen (schwarz) und der optimierten Raten (grau) der eingestellten stationären Zustände. A: Glucoseaufnahme, B: Fructoseaufnahme, C: Kohlendioxidbildung, D: Biomassebildung, E: Sauerstoffaufnahme, F: Acetataufnahme bzw. -bildung. Fehlerbalken zeigen die geschätzten Fehler. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.**

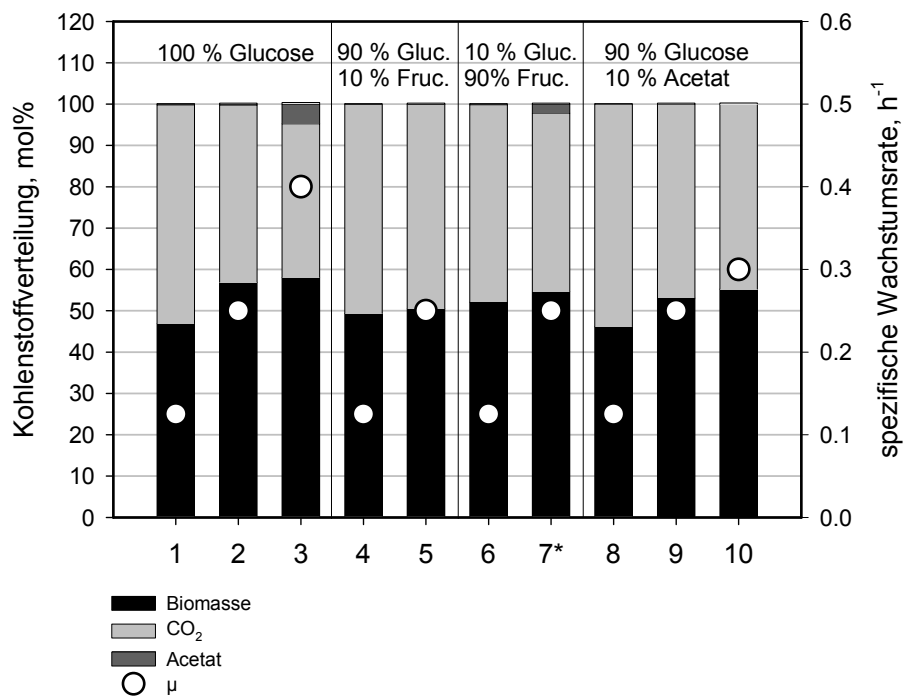
### 5.3.2 Kohlenstoffbilanz

Die Verteilung der extrazellulären Substrataufnahme- und Produktbildungsraten aller stationärer Untersuchungen ist in Abbildung 5.19 dargestellt.



**Abbildung 5.19: Aufteilung des Kohlenstoffs bei unterschiedlichen stationären Zuständen. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.**

Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Zustände zu ermöglichen, ist in Abbildung 5.20 die prozentuale Verteilung der entstehenden Produkte Biomasse, Kohlendioxid und Acetat dargestellt.



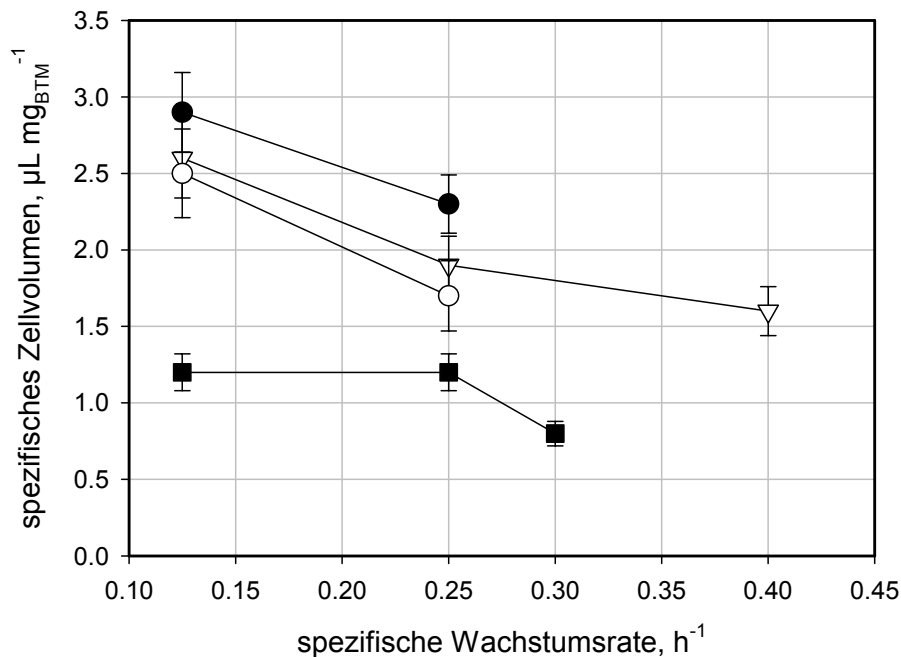
**Abbildung 5.20:** Kohlenstoffverteilung bei unterschiedlichen stationären Zuständen. Die weißen Punkte kennzeichnen die eingestellte Wachstumsrate. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.

## Diskussion

Der aufgenommene Kohlenstoff wird zu etwa 50 % in Biotrockenmasse gebunden, wobei ein Anstieg des relativen Biomasseanteils bei steigender Durchflussrate zu erkennen ist. Dass bei geringeren Wachstumsraten anteilig weniger Kohlenstoff in Biomasse gebunden wird ist dadurch zu erklären, dass bei kleineren Wachstumsraten die in erster Näherung konstante Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel (siehe Kapitel 3.1.4) ein größere Rolle spielt. Das heißt, ein Teil des Substrats wird nicht zum Wachstum verstoffwechselt, sondern als Energiequelle umgesetzt, um Zellfunktionen wie zum Beispiel die Eigenbewegung der Zellen, Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten oder die Reparatur von geschädigter DNS zu ermöglichen. Die Kohlenstoffbilanz liefert also realistische Werte, so dass für die einzelnen Untersuchungen von stationären Zuständen ausgegangen werden kann.

### 5.3.3 Bestimmung des spezifischen Zellvolumens

Für alle Kultivierungen wurde neben der Biotrockenmassekonzentration auch das spezifische Zellvolumen analysiert. Ein Vergleich der Messdaten findet sich in Abbildung 5.21.



**Abbildung 5.21: Spezifisches Zellvolumen in Abhängigkeit von Wachstumsrate und Zulaufkomposition (▽ - 100 % Glucose, ● - 90 % Glucose / 10 % Fructose, ○ - 10 % Glucose / 90 % Fructose, ■ - 90 % Glucose / 10 % Acetat).**

### Diskussion

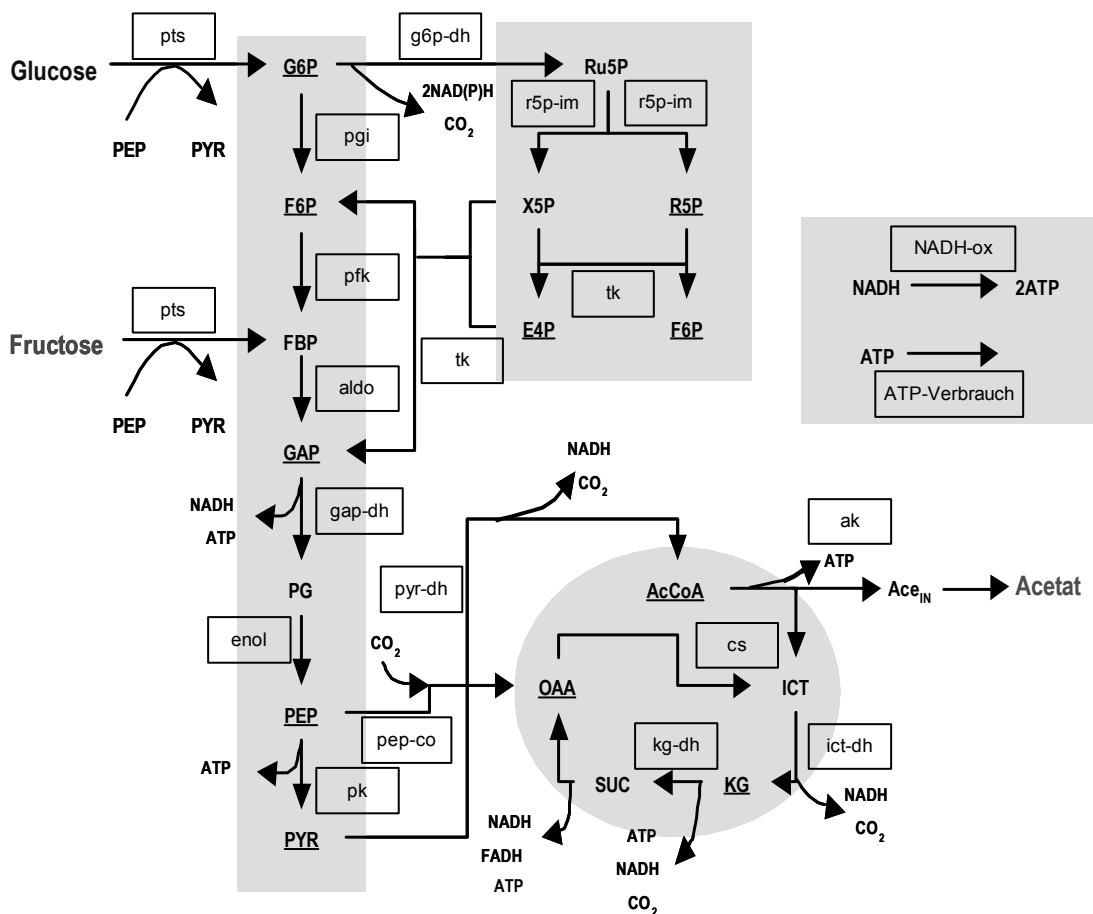
Das spezifische Zellvolumen nimmt wie erwartet (vgl. Pramanik und Keasling, 1997) mit steigender Wachstumsrate ab und ist stark abhängig von der Zusammensetzung der Kohlenstoffquellen im Zulauf. Für die Bestimmung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen ist es aus diesem Grund nicht ratsam, mit einem mittleren intrazellulären Volumen zu rechnen, wie oft in der Literatur zitiert (beispielsweise Yang et al., 2000, Peng et al., 2004, Weber et al., 2005).

Häufig werden intrazelluläre Stoffflüsse bezogen auf die Biotrockenmasse dargestellt (beispielsweise Peng et al., 2004, Zhao et al., 2004, Kayser et al., 2005). Für die vorliegenden Untersuchungen, bei denen intrazelluläre Stoffflüsse und intrazelluläre Metabolitkonzentrationen korreliert werden, würde diese häufig verwendete

Darstellungsform zu starken Verzerrungen führen, da das spezifische Zellvolumen bei den durchgeführten Experimenten um den Faktor 3,6 schwankt.

### 5.3.4 Stationäre Flussanalysen

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das in Abbildung 5.22 dargestellte Stoffwechselschema des Fructose / Glucose Metabolismus von *Escherichia coli* in Anlehnung an Hoque et al. (2004), Chassagnole et al. (2002) und Holms (2001) als Basis für die stationäre Flussanalyse verwendet. Die Pfeile deuten die Richtung der angenommenen Nettoflüsse an.



**Abbildung 5.22: Modifiziertes Schema des Glukose/Fruktose/Acetat Zentralstoffwechsels in *E. coli* in Anlehnung an Hoque et al. (2004), Chassagnole et al. (2002) und Holms (2001); eingerahmt ist die Glykolyse, der Pentosephosphat-Weg, der TCA-Cyclus und die Cofaktor/Energie Bildung; unterstrichen sind zur Biomassebildung benötigte Zwischenprodukte (Precursor).**

Das zugehörige Reaktionsnetzwerk des Zentralstoffwechsels von *E. coli* ist in Tabelle 5.5 dargestellt.

**Tabelle 5.5: Stöchiometrie des Zentralstoffwechsels von *E. coli* als Basis für stationäre Stoffflussanalysen.**

<b>Glycolyse</b>	
Phosphotransferase-System I	$\text{Glucose}_{\text{EX}} + \text{PEP} \rightarrow \text{G6P} + \text{PYR}$
Phosphotransferase-System II	$\text{Fructose}_{\text{EX}} + \text{PEP} \rightarrow \text{FDP} + \text{PYR}$
Phosphoglucoseisomerase	$\text{G6P} \leftrightarrow \text{F6P}$
Phosphofruktokinase	$\text{F6P} \leftrightarrow \text{FDP}$
Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	$\text{FDP} + \text{ATP} \rightarrow 2 \text{ GAP}$
GAP-Dehydrogenase	$\text{GAP} \rightarrow \text{PG} + \text{NADH} + \text{ATP}$
Enolase	$\text{PG} \rightarrow \text{PEP}$
Pyruvatkinase	$\text{PEP} \rightarrow \text{PYR} + \text{ATP}$
Pyruvatdehydrogenase	$\text{PYR} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{NADH} + \text{ATP} + \text{CO}_{2,\text{IN}}$
<b>Krebs-Zyklus</b>	
Acetatkinase	$\text{AcCoA} \rightarrow \text{Acetat}_{\text{IN}} + \text{ATP}$
Citrat-Synthase	$\text{AcCoA} + \text{OAA} \rightarrow \text{ICT}$
Isocitrat-Dehydrogenase	$\text{ICT} \rightarrow \text{KG} + \text{NAD(P)H} + \text{CO}_{2,\text{IN}}$
2-Ketoglutarat-Dehydrogenase	$\text{KG} \rightarrow \text{SUC} + \text{NADH} + \text{ATP} + \text{CO}_{2,\text{IN}}$
Malat-Dehydrogenase	$\text{SUC} \rightarrow \text{OAA} + \text{NADH} + \text{ATP}$
PEP-Carboxylase	$\text{PEP} + \text{CO}_{2,\text{IN}} \rightarrow \text{OAA}$
<b>Pentosephosphat-Weg</b>	
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	$\text{G6P} \rightarrow \text{Ru5P} + 2 \text{ NADPH} + \text{CO}_{2,\text{IN}}$
Ribose-5-phosphat-Isomerase	$\text{Ru5P} \leftrightarrow \text{R5P}$
Ribose-5-phosphat-Isomerase	$\text{Ru5P} \leftrightarrow \text{X5P}$
Transketolase	$\text{R5P} + \text{X5P} \leftrightarrow \text{GAP} + \text{S7P}$
Transketolase	$\text{GAP} + \text{S7P} \leftrightarrow \text{F6P} + \text{E4P}$
<b>Cofaktor/Energie</b>	
ATP-Verbrauch	$\text{ATP} \rightarrow$
NADH-Oxidation	$\text{NADH} \rightarrow 2 \text{ ATP}$
<b>Biomassebildung</b> in Anlehnung an Hoque et al. (2004)	
$0,106 \text{ AcCoA} + 0,485 \text{ ATP} + 0,009 \text{ E4P} + 0,002 \text{ F6P} + 0,005 \text{ G6P} + 0,043 \text{ GAP} + 0,028 \text{ KG} + 0,385 \text{ NAD(P)H} + 0,047 \text{ OAA} + 0,013 \text{ PEP} + 0,074 \text{ PYR} + 0,024 \text{ R5P} \leftrightarrow 0,010 \text{ Acetat}_{\text{IN}} + 0,047 \text{ CO}_{2,\text{IN}} + 1 \text{ Biomasse}$	
<b>Transport</b>	
CO <sub>2</sub>	$\text{CO}_{2,\text{IN}} \rightarrow \text{CO}_{2,\text{EX}}$
Acetat	$\text{Acetat}_{\text{IN}} \rightarrow \text{Acetat}_{\text{EX}}$

Auf Basis der optimierten extrazellulären Substrataufnahme- und Produktbildungsraten wurden hiermit metabolische Stoffflussanalysen durchgeführt. Um die Stoffflüsse der Experimente mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

unterschiedlicher Molmassen vergleichen zu können, wurden die berechneten Stoffflüsse auf die molare aufgenommene Kohlenstoffmenge normiert. Die kohlenstoffnormierten externen Verbrauchs- und Bildungsraten sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

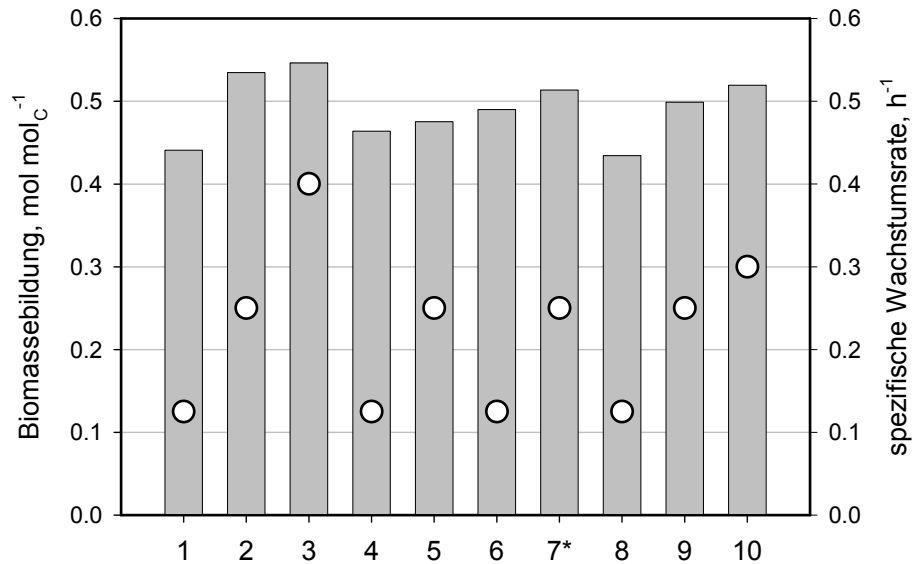
**Tabelle 5.6: Kohlenstoffnormierte Verbrauchs- und Bildungsraten bei den einzelnen stationären Zuständen.**

Experiment	$\mu, \text{h}^{-1}$	$q_G$	$q_F$	$q_{\text{Ace}}$	$q_{\text{CO}_2}$
		$\text{mol mol}_C^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mol mol}_C^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mol mol}_C^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mol mol}_C^{-1} \text{h}^{-1}$
100 % Glucose					
1	0,125	-0,167	0,000	0,001	0,529
2	0,250	-0,167	0,000	0,001	0,429
3	0,400	-0,167	0,000	0,024	0,372
90 % Glucose / 10 % Fructose					
4	0,125	-0,154	-0,013	0,000	0,506
5	0,250	-0,157	-0,009	0,000	0,494
10 % Glucose / 90 % Fructose					
6	0,125	-0,013	-0,154	0,001	0,478
7*	0,250	-0,004	-0,162	0,011	0,432
90 % Glucose / 10 % Acetat					
8	0,125	-0,147	0,000	-0,058	0,538
9	0,250	-0,146	0,000	-0,061	0,469
10	0,300	-0,148	0,000	-0,057	0,448

Für alle Untersuchungen wurde von einer einheitlichen Stöchiometrie zur Biomassebildung ausgegangen (siehe Tabelle 5.5). Die vorliegende Stöchiometrie basiert auf der Verstoffwechslung von Glucose als Substrat. Aufgrund der Unsicherheit, ob die obige Annahme einer einheitlichen Stöchiometrie auch für die Substrate Fructose und Acetat gerechtfertigt ist, wurde die Biomassebildung für die stationären Flussanalysen nicht als Eingangsgröße, sondern als Ausgangsgröße angenommen und zur Validierung des Modells herangezogen. Die anhand der stationären Flussanalysen berechnete kohlenstoffnormierte Biomassebildung ist in



Abbildung 5.23 dargestellt. Die nach dem Modell berechnete Biomassebildung entspricht zu etwa 95% der gemessenen Biomassebildung, so dass von der Eignung des Modells ausgegangen werden kann.



**Abbildung 5.23: Berechnete Biomassebildung über die stationäre Flussanalyse für unterschiedliche stationäre Zustände. Die spezifische Wachstumsrate ist durch die weißen Symbole gekennzeichnet. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.**

Eine Zusammenstellung der relativen Veränderungen bei den Untersuchungen mit einer Wachstumsrate von  $0,125 \text{ h}^{-1}$  und den Zulaufkompositionen 100 % Glucose, 10 % Glucose / 90 % Fructose und 90 % Glucose / 10 % Acetat ist in Abbildung 5.24, Abbildung 5.25 und Abbildung 5.26 dargestellt. Eine Aufstellung aller Reaktionsraten in tabellarischer Form findet sich in Anhang 9.4.

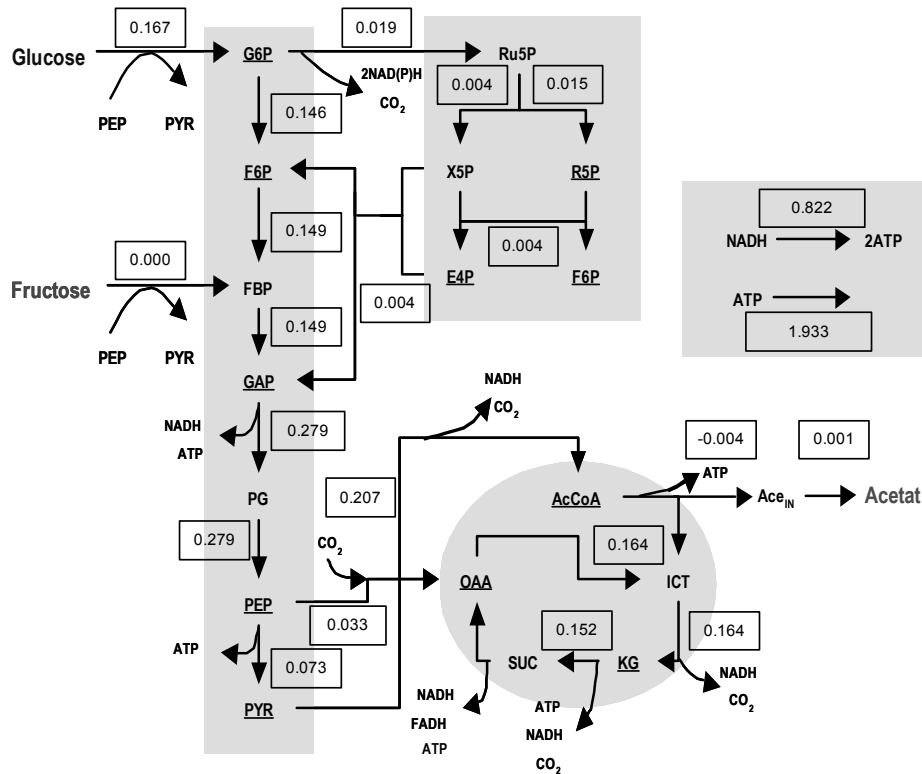


Abbildung 5.24: Kohlenstoffnormierte Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in mol mol<sub>c</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* mit  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  und 100 % Glucose im Zulauf (Experiment 1).

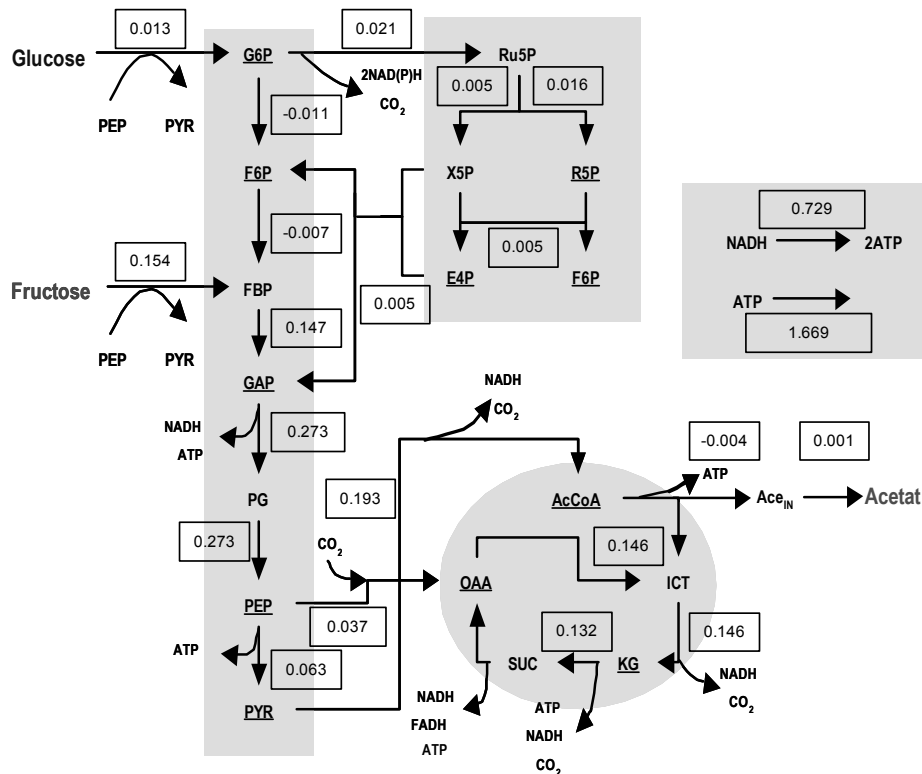


Abbildung 5.25: Kohlenstoffnormierte Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in mol mol<sub>c</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* mit  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  und 10 % Glucose / 90 % Fructose im Zulauf (Experiment 6).

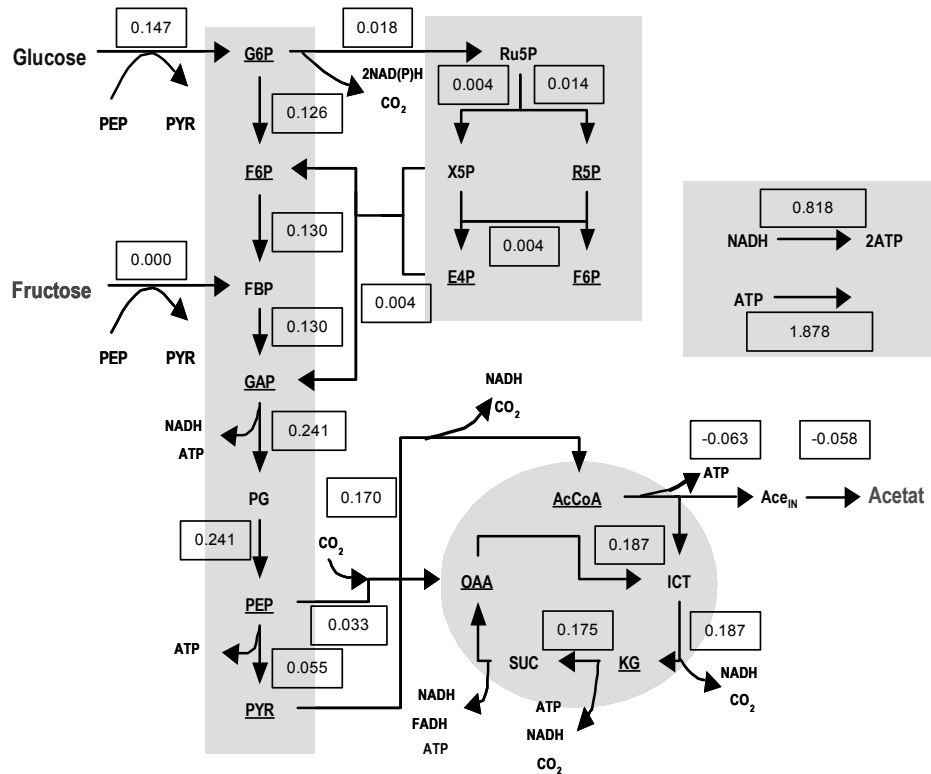
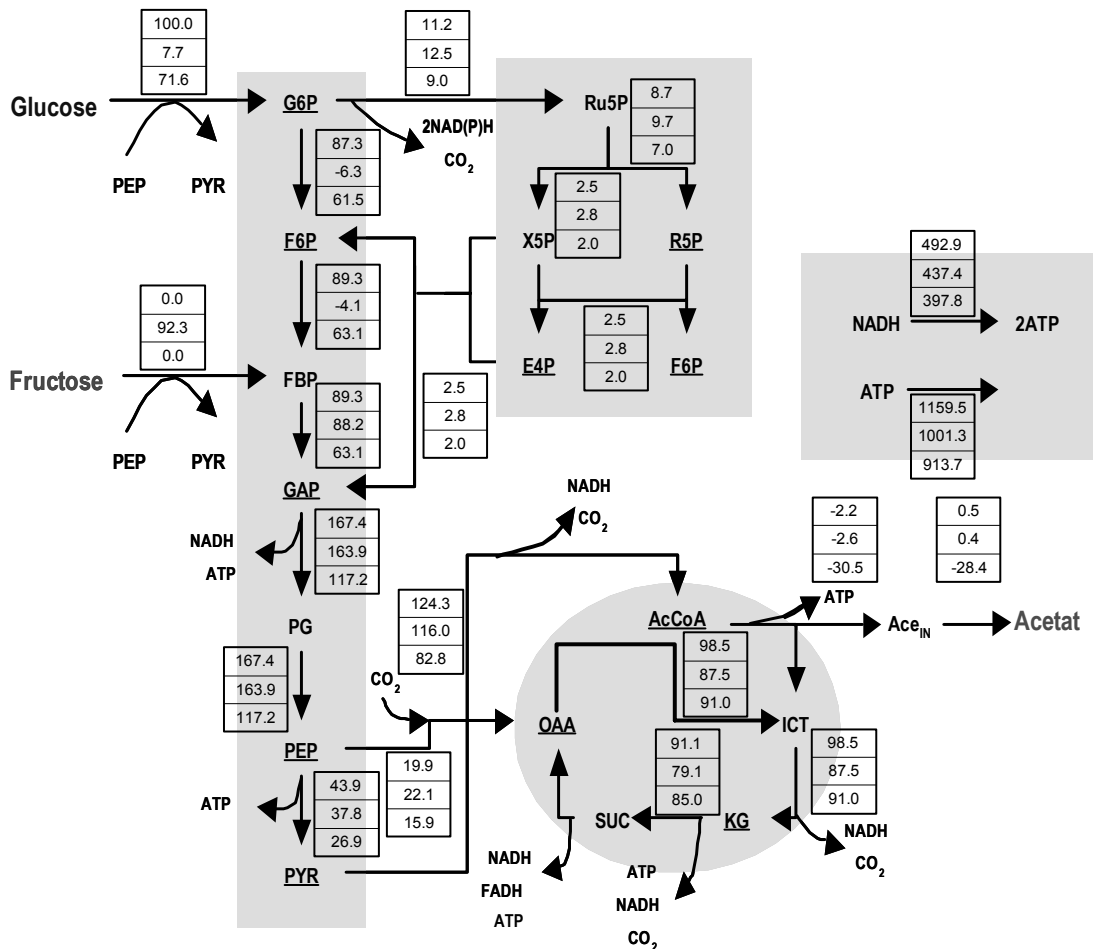


Abbildung 5.26: Kohlenstoffnormierte Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in  $\text{mol mol}_c^{-1} \text{h}^{-1}$  bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* mit  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  und 90 % Glucose / 10 % Acetat im Zulauf (Experiment 8).

### Diskussion

Um einen Vergleich der intrazellulären Stoffflüsse bei den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen zu vereinfachen, sind in Abbildung 5.27 alle kohlenstoffnormierten Stoffflüsse bezogen auf den aufgenommenen Kohlenstoff prozentual dargestellt.



**Abbildung 5.27:** Prozentuale Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse bei kontinuierlichen Kultivierungen von *Escherichia coli* mit  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  bei unterschiedlichen C-Quellen im Zulauf bezogen auf die molare Kohlenstoffaufnahme in  $\text{mol}\% \text{ mol}_C^{-1}$ . Obere Zahlenwerte: 100 % Glucose, mittlere Zahlenwerte: 10 % Glucose / 90 % Fructose, untere Zahlenwerte: 90 % Glucose / 10 % Acetat. Anmerkung: Ein negatives Vorzeichen deutet an, dass der Fluss entgegen der eingezeichneten Pfeilrichtung verläuft.

Ein Vergleich der intrazellulären Stoffflüsse, wie sie bei den Experimenten mit Fructose und Glucose abgeschätzt werden, mit denen, die bei den stationären Kultivierungen nur mit Glucose als Substrat abgeschätzt werden, zeigt, dass die größten Änderungen, sowohl in Quantität als auch in der Richtung bei den Reaktionsschritten, die durch die Enzyme Phosphoglucoseisomerase und Phosphofruktokinase katalysiert werden, zu finden sind (siehe Abbildung 5.28 und Abbildung 5.29). Wird zusätzlich zu Glucose Acetat als zweites Substrat zugesetzt, so ändern sich die von Phosphoglucoseisomerase und Phosphofruktokinase katalysierten intrazellulären Flüsse nur geringfügig.

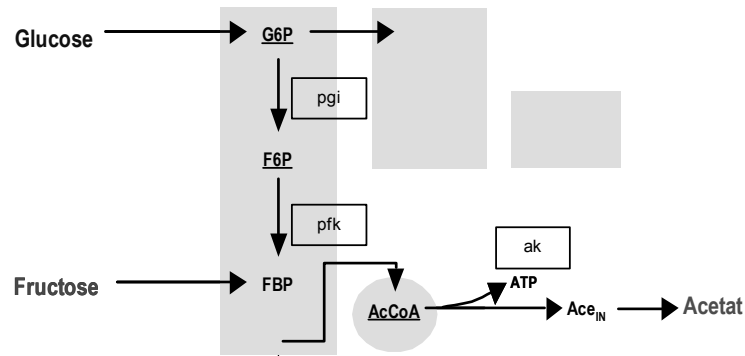


Abbildung 5.28: Phosphoglucoseisomerase (pgi), Phosphofruktokinase (pfk) und Acetatkinase (am) im Zentralstoffwechsel von *E. coli*.

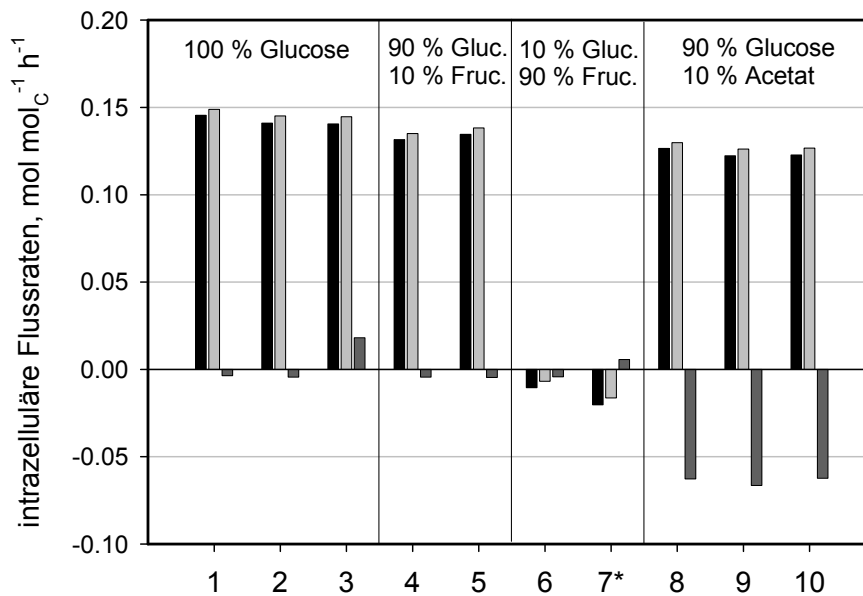
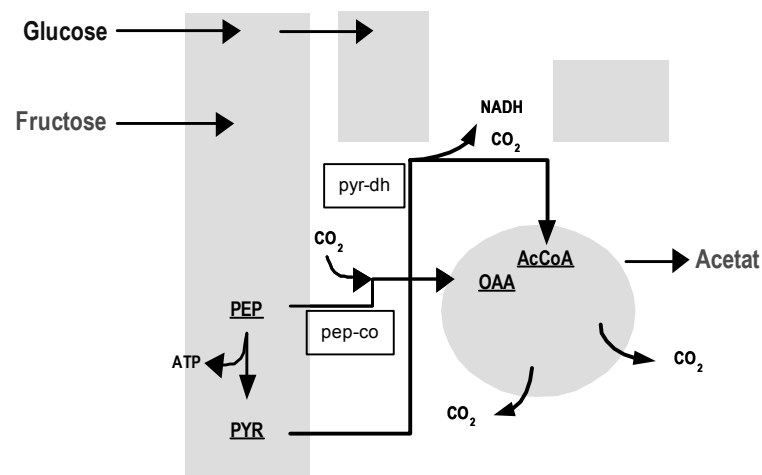


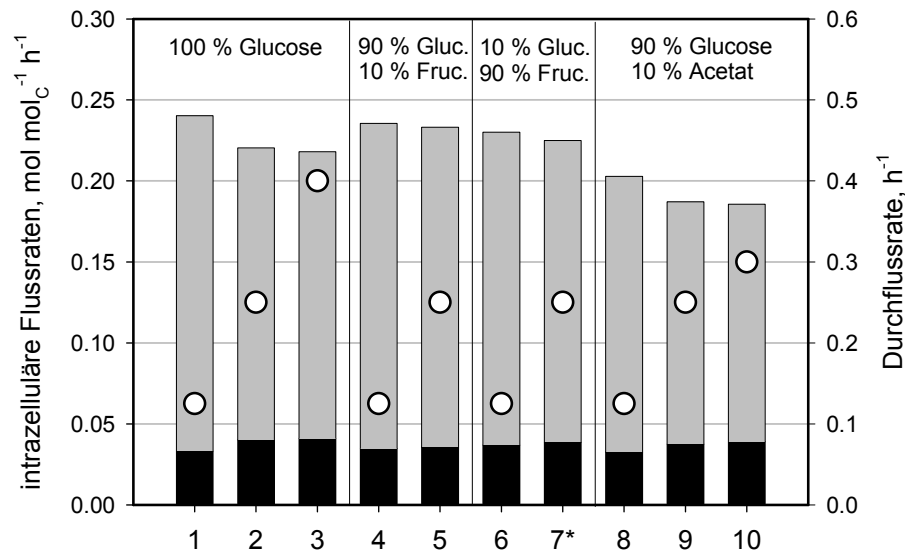
Abbildung 5.29: Kohlenstoffnormierte intrazelluläre Flussraten bei unterschiedlichen stationären Zuständen. Schwarz: Phosphoglucoseisomerase (pgi), hellgrau: Phosphofruktokinase (pfk), dunkelgrau: Acetatkinase (ak). Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.

Wird Acetat als zweite Kohlenstoffquelle eingesetzt, ist offensichtlich, dass in diesem Fall das Enzym Acetatkinase die größten Änderungen in Betrag und Richtung der kohlenstoffnormierten intrazellulären Flüsse erfährt (siehe Abbildung 5.29).



**Abbildung 5.30: Pyruvatdehydrogenase (pyr-dh) und PEP-Carboxylase (pep-co) im Zentralstoffwechsel von *E. coli*.**

Werden die Reaktionsschritte betrachtet, bei denen Kohlendioxid gebildet oder verbraucht wird, so zeigt sich, dass die Ursache für eine geringere Kohlendioxidbildung pro aufgenommenem Kohlenstoff bei steigender Wachstumsrate vermutlich durch den Einfluss von Pyruvatdehydrogenase und PEP-Carboxylase verursacht wird. Die kohlenstoffnormierte Reaktionsrate der Pyruvatdehydrogenase, bei deren Reaktionsschritt Kohlendioxid entsteht, nimmt bei steigender Wachstumsrate ab, wohingegen die kohlenstoffnormierte Rate der von PEP-Carboxylase katalysierten Reaktion, bei der Kohlendioxid verbraucht wird mit steigender Wachstumsrate zunimmt (siehe Abbildung 5.30 und Abbildung 5.31). Außerdem nimmt die Summe dieser beiden Reaktionen mit zunehmender Wachstumsrate ab, so dass bei einer höheren Wachstumsrate anteilig weniger Kohlenstoff in den Kohlendioxid-bildenden Zitronensäurezyklus eingespeist wird.



**Abbildung 5.31: Kohlenstoffnormierte intrazelluläre Flussraten bei unterschiedlichen stationären Zuständen. Schwarz: PEP-Carboxylase, grau: Pyruvatdehydrogenase, die eingestellte Durchflussrate ist durch weiße Punkte gekennzeichnet. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.**

Auch dieser Sachverhalt kann auf den größeren Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels bei kleineren Wachstumsraten zurückgeführt werden. Bei geringeren Wachstumsraten wird anteilig weniger Kohlenstoff in Biomasse gebunden, sondern für den Erhaltungsstoffwechsel (unter Kohlendioxidbildung) verbraucht.

Zur Flussverteilung von *Escherichia coli* im glucoselimitierten Chemostaten wurden bereits einige Untersuchungen durchgeführt. Um die eigenen Messdaten in die bereits publizierten Daten einzuordnen, sind in Tabelle 5.7 zitierte Literaturdaten zusammengestellt, und den eigenen Untersuchungen mit Glucose als Substrat gegenübergestellt. Da sowohl unterschiedliche Stämme, unterschiedliche Medien, unterschiedliche Wachstumsraten und unterschiedliche Methoden zur stationären Flussanalyse verwendet wurden, kann der Vergleich nur eine qualitative Einordnung der Daten liefern.





Qualitativ kann aber eindeutig festgehalten werden, dass die eigenen Untersuchungen mit den bisher publizierten Daten vergleichbare Werte liefern. Es wird aber auch deutlich, dass an Knotenpunkten auch in der Literatur die größten Schwankungen bezüglich der Flussverteilung zu finden sind. So werden zum Beispiel ausgehend von G6P für die Aufteilung des Flusses in Richtung des Pentosephosphatwegs (g6p-dh) Werte von 6 % bis 67 % zitiert. Holms (2001) vernachlässigt den Stofffluss in Richtung Pentosephosphatweg gänzlich. Auch die Verteilung der Stoffflüsse ausgehend vom Phosphoenolpyruvat (pk und pep-co) unterliegen einer großen Bandbreite der publizierten Daten. Für pk werden relative Stoffflüsse von -2 % bis 71 % zitiert, für pep-co schwanken die publizierten Daten zwischen 9 % und 33 %. Diese großen Unterschiede werden vermutlich nicht allein durch „echte“ physiologische Unterschiede, wie zum Beispiel die deutlich variierende Acetatbildung, verursacht, sondern auch durch die Wahl des stöchiometrischen Modells und die Methodik der stationären Flussanalyse. Nur eine geringe Bandbreite der publizierten Daten findet sich dagegen für den unverzweigten Stoffwechselweg der Glycolyse, zum Beispiel werden für den relativen Fluss über Aldolase Werte von 70 % bis 95 % zitiert. Für diesen Bereich scheint unabhängig von Stamm, Kultivierungsbedingungen und Analysenmethode ein sehr stabiler Zustand zu existieren.

Dies trifft auch für die Untersuchungen mit Glucose und Fructose und für die Untersuchungen mit Glucose und Acetat zu. Wird der durch Aldolase katalysierte Fluss, bezogen auf die *Glucose*aufnahme betrachtet, so ergibt sich bei einer spezifischen Wachstumsrate von  $0,125 \text{ h}^{-1}$  für Glucose 89,3 %, für 90 % Glucose und 10 % Fructose 88,8 %, für 10 % Glucose und 90 % Fructose 88,2 % und für 90 % Glucose und 10 % Acetat 88,1 %.

Wird der Fluss des TCA-Cyclus, bezogen auf die *Kohlenstoff*aufnahme betrachtet, so zeigt sich, dass bei allen Untersuchungen, bei denen zusätzlich zu Glucose ein zweites Substrat zugesetzt wurde, bei einer spezifischen Wachstumsrate von  $0,125 \text{ h}^{-1}$  etwa 90 mol %  $\text{mol}_C^{-1}$  in den TCA-Cyclus geleitet werden. Bei einer spezifischen Wachstumsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  liegt der Wert bei etwa 75 % für alle Zulaufzusammensetzungen. Bei den untersuchten Substratzusammensetzungen wird diese Flussverteilung also hauptsächlich durch die Wachstumsrate beeinflusst.

### 5.3.5 Metabolomics

Neben der Bestimmung von intrazellulären Stoffflüssen ist die Analyse von intrazellulären Metabolitkonzentrationen (Metabolomics) die zweite Voraussetzung zur Bestimmung von *in-vivo* Enzymkinetiken. Für die in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen stationären Zustände wurden jeweils die intrazellulären Konzentrationen von G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, PEP, Pyruvat, AcCoA, ATP, ADP, AMP, cAMP, NAD, NADP und FAD bestimmt. Ein Vergleich der intrazellulären Konzentrationen im Fließgleichgewicht für die substratlimitierten chemostatischen Kultivierungen, sowie die jeweilige untere Nachweisgrenze für die einzelnen Metaboliten („limit of detection“ – LOD) befindet sich in Tabelle 5.8.

#### Diskussion

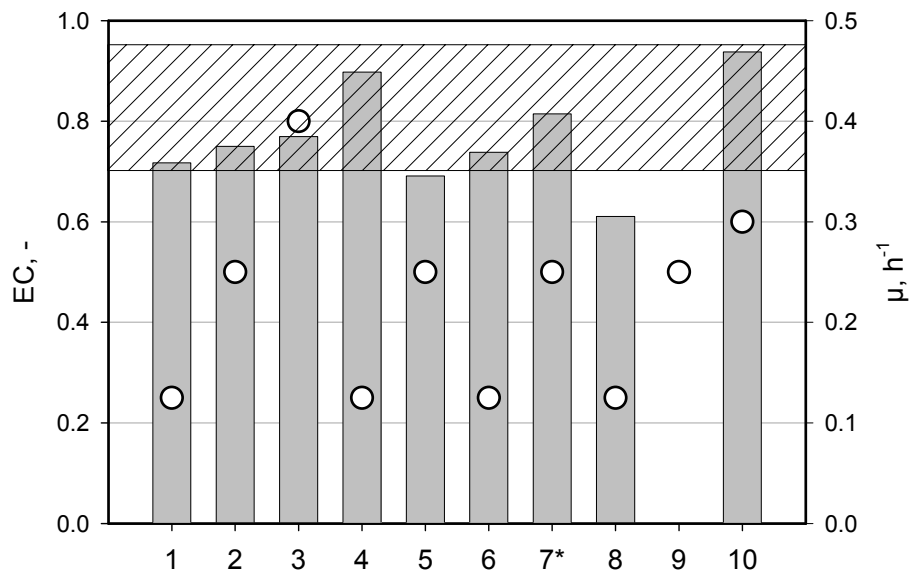
Zur Beurteilung der Ergebnisse wird zunächst der sogenannte Energieladungszustand oder „Energy Charge“ (EC) betrachtet. Dieser beschreibt das Verhältnis der Adenosinphosphate nach Gleichung 5.1.

**Gleichung 5.1:** 
$$EC = \frac{c_{ATP} + \frac{1}{2}c_{ADP}}{c_{ATP} + c_{ADP} + c_{AMP}}$$

mit	$c_{ATP}$	intrazelluläre Konzentration an ATP, mmol L <sup>-1</sup>
	$c_{ADP}$	intrazelluläre Konzentration an ADP, mmol L <sup>-1</sup>
	$c_{AMP}$	intrazelluläre Konzentration an AMP, mmol L <sup>-1</sup>

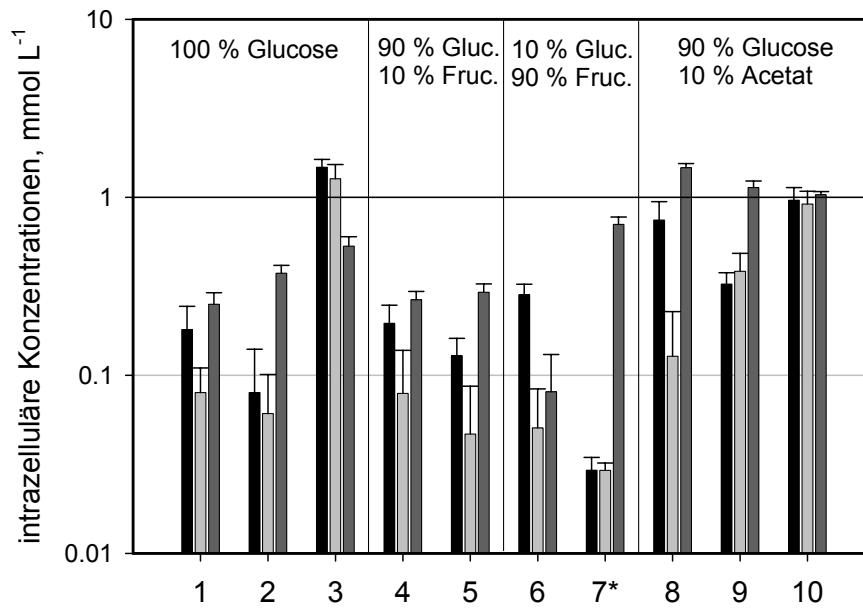
**Tabelle 5.8: Intrazelluläre Metabolitkonzentrationen in unterschiedlichen stationären Zuständen. Konzentrationen und Abweichungen in mmol L<sup>-1</sup>. Zusätzlich ist die intrazelluläre Nachweisgrenze (LOD) in mmol L<sup>-1</sup> dargestellt. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3, n.a.: nicht analysiert; n.d.: nicht detektiert.**

Experiment	1	2	3	4	5	6	7*	8	9	10	LOD
G6P	0,18	0,08	1,48	0,20	0,13	0,28	0,03	0,74	0,33	0,96	0,01
±	0,06	0,06	0,16	0,05	0,03	0,04	0,01	0,20	0,05	0,17	
F6P	0,08	0,06	1,27	0,08	0,05	0,05	0,03	0,13	0,38	0,92	0,01
±	0,03	0,04	0,26	0,06	0,04	0,03	0,00	0,10	0,10	0,16	
FBP	0,25	0,37	0,53	0,27	0,29	0,08	0,71	1,47	1,13	1,03	0,01
±	0,07	0,04	0,12	0,00	0,03	0,05	0,07	0,08	0,22	0,04	
DHAP	0,64	0,52	1,92	0,28	0,35	0,11	0,09	8,66	3,98	1,77	0,01
±	0,17	0,1	0,35	0,00	0,05	0,02	0,01	0,4	0,31	0,14	
GAP	n.a.	0,80	n.a.	0,34	0,54	0,31	n.a.	0,98	n.a.	1,31	0,01
±		0,12		0,00	0,09	0,11		0,04		0,09	
PEP	0,36	1,26	0,25	0,64	1,41	0,73	0,76	1,70	0,88	0,71	0,03
±	0,12	0,06	0,06	0,10	0,35	0,04	0,20	0,03	0,10	0,04	
Pyruvat	0,51	2,04	n.d.	0,69	1,45	0,65	0,85	7,05	n.a.	1,18	0,06
±	0,10	0,11		0,07	0,32	0,03	0,03	0,53		0,04	
AcCoA	0,17	0,30	0,69	0,12	0,26	0,05	0,18	n.d.	0,14	n.d.	0,05
±	0,08	0,02	0,10	0,06	0,11	0,04	0,05		0,12		
AMP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,50	n.d.	n.d.	0,17
±								0,48			
ADP	0,13	0,20	0,26	0,08	0,53	0,11	0,17		n.a.	0,60	0,06
±	0,08	0,02	0,25	0,01	0,12	0,06	0,02			0,16	
ATP	0,30	0,20	0,13	0,30	0,33	0,10	0,29	0,78	n.a.	4,23	0,02
±	0,03	0,18	0,08	0,01	0,03	0,08	0,03	0,67		0,48	
NAD	0,08	n.a.	0,20	0,19	0,26	0,09	n.a.	0,61	1,45	1,45	0,06
±	0,06		0,01	0,06	0,07	0,02		0,47	0,35	0,67	
NADP	0,10	0,16	0,06	0,23	0,21	0,04	0,12	0,52	n.a.	0,07	0,04
±	0,08	0,10	0,05	0,05	0,02	0,01	0,01	0,23		0,05	
cAMP	n.d.	n.d.	0,06	0,14	0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.d.	0,03
±			0,05	0,08	0,01						
FAD	0,05	0,28	0,08	0,08	0,09	0,07	0,05	0,21	0,06	n.d.	0,02
±	0,02	0,15	0,01	0,04	0,02	0,02	0,00	0,15	0,05		

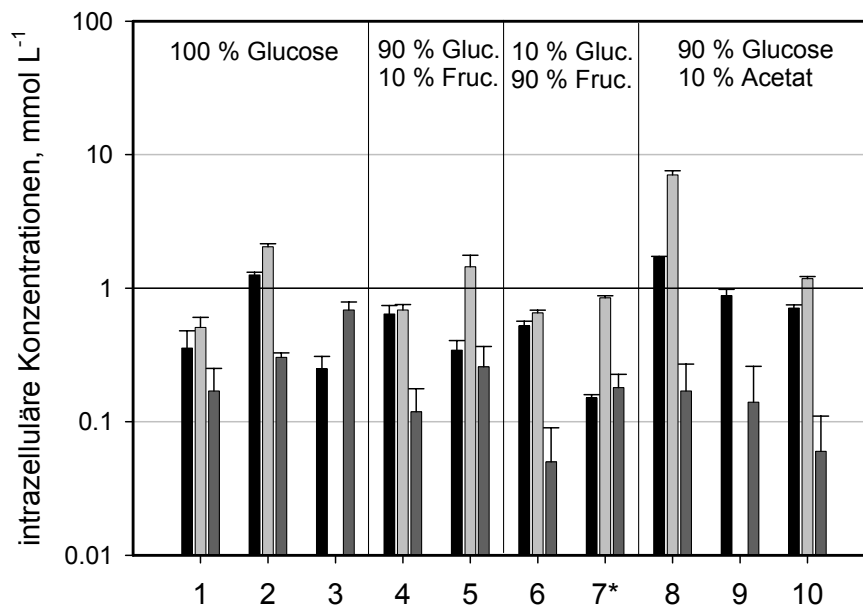


**Abbildung 5.32: Energy Charge (EC) von *E. coli* bei unterschiedlichen stationären Zuständen. Die eingestellte Wachstumsrate  $\mu$  ist durch die weißen Punkte gekennzeichnet. Schraffiert dargestellt ist der nach Literaturangaben zu erwartende EC. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.**

Nach Nielsen und Villadsen (1994) liegt der EC für Bakterien im Bereich von 0,7 bis 0,95. Für die hier vorliegenden stationären Untersuchungen wurden EC von 0,61 (Zustand 8,  $D=0,125 \text{ h}^{-1}$ , 90% Glucose, 10 % Acetat) bis 0,94 (Zustand 10,  $D=0,3 \text{ h}^{-1}$ , 90% Glucose, 10 % Acetat) bestimmt. Der deutlich geringere Wert für Zustand 8 ist vermutlich durch Messfehler verursacht, da bei der gleichen Messreihe (Experiment 9) ADP und ATP aufgrund einer zu schlechten Kalibrierung über die Standardaddition nicht analysiert werden konnten.



**Abbildung 5.33:** Intrazelluläre Konzentrationen von Glucose-6-phosphat (schwarz), Fructose-6-phosphat (hellgrau) und Fructose-1,6-bisphosphat (dunkelgrau) in *E. coli* bei unterschiedlichen stationären Zuständen. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.



**Abbildung 5.34:** Intrazelluläre Konzentrationen von Phosphoenolpyruvat (schwarz), Pyruvat (hellgrau) und Acetyl-CoA (dunkelgrau) in *E. coli* bei unterschiedlichen stationären Zuständen. Experimentnummern wie in Tabelle 5.3.

Beim Vergleich der einzelnen stationären Zustände wird deutlich, dass die eingestellten metabolischen Zustände zu signifikanten Unterschieden in den intrazellulären Metabolitkonzentrationen führen.

Hervorzuheben ist die Kultivierung mit Glucose als Substrat, bei einer Durchflussrate von  $0,4 \text{ h}^{-1}$ , bei der extrazellulär Glucose in einer Konzentration von  $20 \text{ g L}^{-1}$  vorliegt. Die intrazellulären Konzentrationen an G6P, F6P und DHAP weichen deutlich von den ermittelten Konzentrationen bei Durchflussraten von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  oder  $0,125 \text{ h}^{-1}$  ab. G6P und F6P liegen bei den geringen Durchflussraten im Bereich von  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  vor, bei einer Durchflussrate von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  in Konzentrationen von  $1,48$  respektive  $1,27 \text{ mmol L}^{-1}$ . Diese Verhältnisse entsprechen den von Schäfer et al. (1999) berichteten Konzentrationen dieser Metabolite als dynamische Antwort auf einen Glucosepuls. Im stationären Zustand ( $D = 0,125 \text{ h}^{-1}$ ) lag in diesem Experiment die Konzentration von G6P unterhalb der Nachweisgrenze und stieg dann sprunghaft auf Konzentrationen im Bereich von  $1$  bis  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  an. Die intrazelluläre Konzentration von PEP fiel nach dem Glucosepuls sprunghaft auf einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze. Auch dies kann durch die eigenen stationären Untersuchungen bestätigt werden, da die ermittelte PEP-Konzentration für eine Wachstumsrate von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  mit  $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$  den geringsten Wert aller Untersuchungen aufweist.

Eine weitere Interpretation der Ergebnisse ist aber ohne eine Betrachtung der zugehörigen metabolischen Stoffflüsse schwierig. Im folgenden Kapitel werden daher die Ergebnisse der metabolischen Stoffflussanalyse und der intrazellulären Metabolitkonzentrationen in Zusammenhang gebracht.

### 5.3.6 *In-vivo* Enzymkinetiken

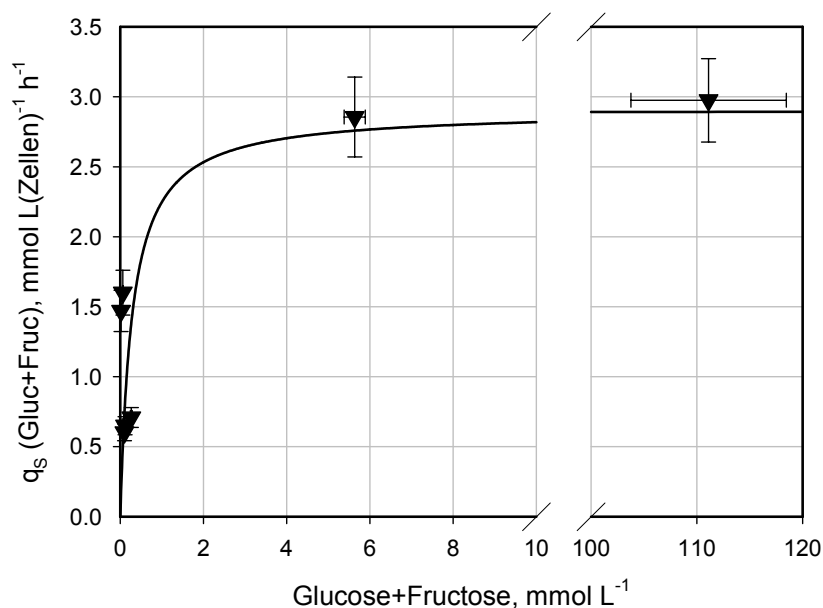
Durch die Kombination von intrazellulären Metabolitkonzentrationen und stationären Stoffflussanalysen können *in-vivo* Enzymkinetiken abgeschätzt werden. Da die vielfältigen, teilweise auch unbekannt, Einflüsse einzelner Metabolite auf bestimmte Enzyme aufgrund der hohen Parameterzahl kaum abgeschätzt werden können, werden zur Beschreibung ausschließlich einfache Michaelis-Menten-Kinetiken mit (Gleichung 3.45) oder ohne (Gleichung 3.41) Inhibierung als Modell verwendet. Für alle beschriebenen Enzymkinetiken gilt die Annahme, **dass die Enzymkonzentration für alle untersuchten metabolischen Zustände annähernd konstant ist**, so dass die Substratkonzentrationen und Stoffflüsse der

unterschiedlichen Experimente zu einer Enzymkinetik zusammengefasst werden können.

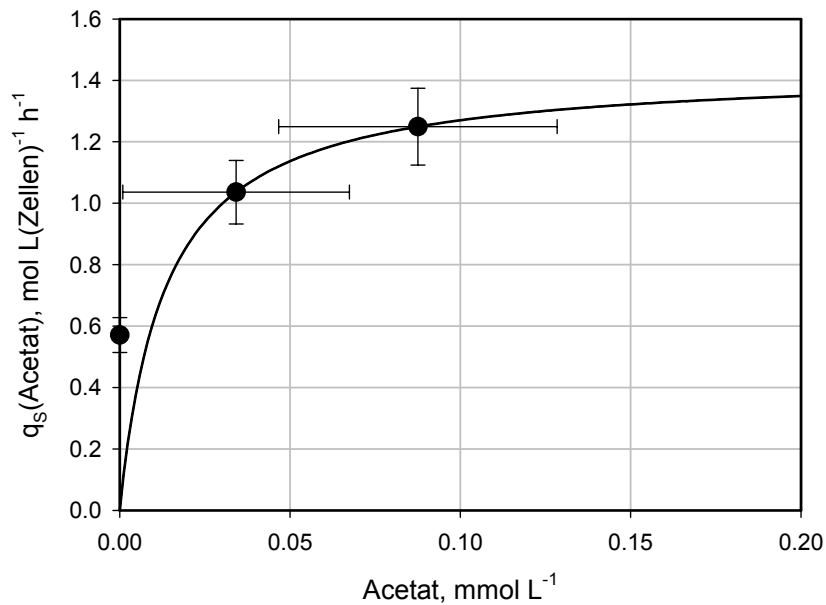
### Substrataufnahme

In den durchgeführten Untersuchungen werden als Substrate Glucose und Fructose, die über ein Phosphotransferase-System (pts) aufgenommen werden, sowie Acetat, eingesetzt. Um eine generelle Überprüfung der Vorgehensweise zur Bestimmung der Enzymkinetiken zu überprüfen, werden zunächst die Kinetiken der Substrataufnahme bestimmt und mit Literaturwerten verglichen.

Da sowohl Glucose und Fructose über ein PTS aufgenommen werden, werden Konzentrationen und Aufnahmeraten für Glucose und Fructose addiert. In Abbildung 5.35 werden die im stationären Zustand ermittelten Substrataufnahmeraten für Glucose und Fructose in Abhängigkeit von der Substratkonzentration im Reaktor dargestellt. Durch nichtlineare Regression werden die kinetischen Parameter der Substrataufnahme zu  $K_m = 0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $v_{\max} = 2,9 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  abgeschätzt. Die ermittelte Sättigungskonzentration befindet sich dabei im Bereich der Literaturdaten, die zwischen  $K_m = 0,22 \text{ mmol L}^{-1}$  (Garcia-Alles et al., 2002) und  $K_m = 0,28 \text{ mmol L}^{-1}$  (Postma und Roseman, 1976) liegen.



**Abbildung 5.35: Substrataufnahmerate in Abhängigkeit von der extrazellulären Substratkonzentration. Die durchgezogene Linie stellt die Substrataufnahmerate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 2,9 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,29 \text{ mmol L}^{-1}$  dar.**



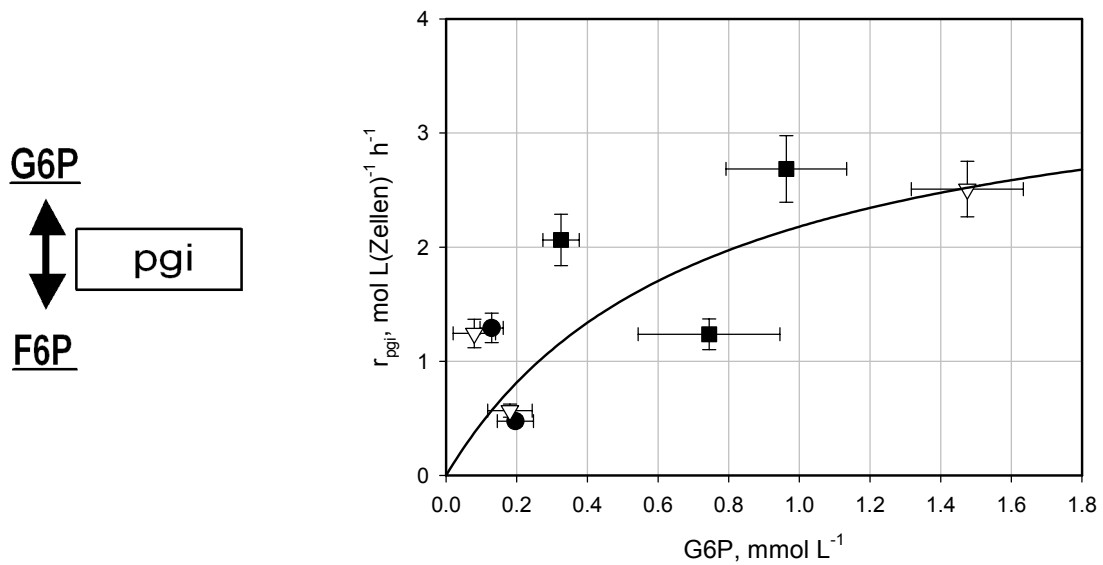
**Abbildung 5.36: Acetataufnahmerate in Abhängigkeit von der extrazellulären Acetatkonzentration.** Die durchgezogene Linie stellt die Acetataufnahmerate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 1,4 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$  dar.

In Abbildung 5.36 ist die Abhängigkeit der Acetataufnahme von der Acetatkonzentration im Medium dargestellt. Durch nichtlineare Regression wurden die kinetischen Parameter der Acetataufnahme zu  $K_m = 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $v_{\max} = 1,4 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Im Vergleich zu Literaturwerten ist die ermittelte Sättigungskonzentration sehr gering. Paalme et al. (1997) publizierten beispielsweise  $K_m = 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$  für die Acetataufnahme.

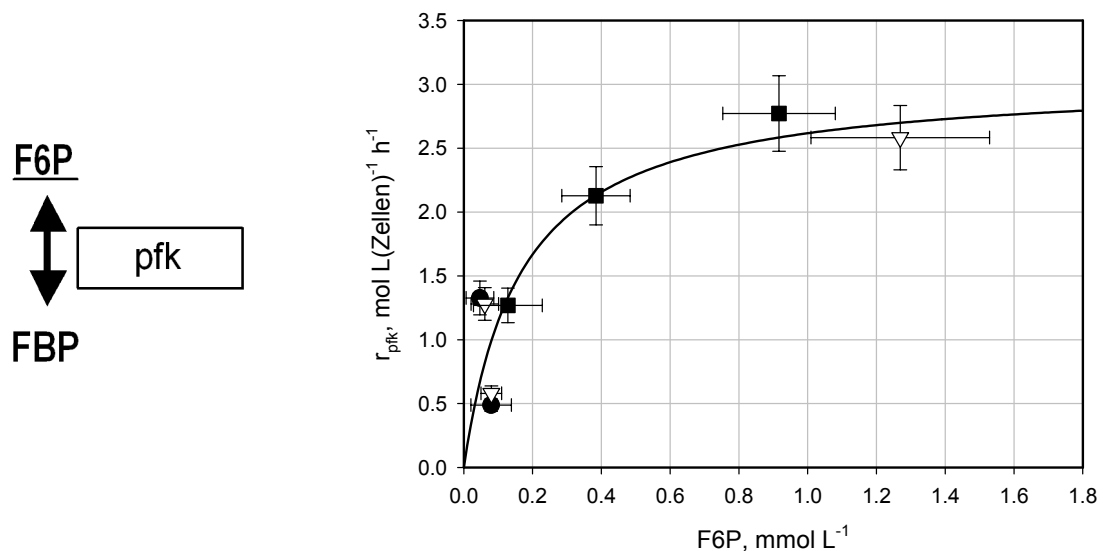
### Intrazelluläre Flussraten

In den folgenden Abbildung 5.37 bis Abbildung 5.46 sind die stationären Flussraten (Reaktionsgeschwindigkeiten) einiger Enzyme des Zentralstoffwechsels von *Escherichia coli* in Abhängigkeit von ihren Substraten dargestellt.





**Abbildung 5.37: Phosphoglucoseisomerase.** Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Phosphoglucoseisomerase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Glucose-6-phosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 3,8 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,72 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat). Anmerkung: nur positive Flussraten werden betrachtet.



**Abbildung 5.38: Phosphofruktokinase.** Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Phosphofruktokinase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Fructose-6-phosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 3,1 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,17 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

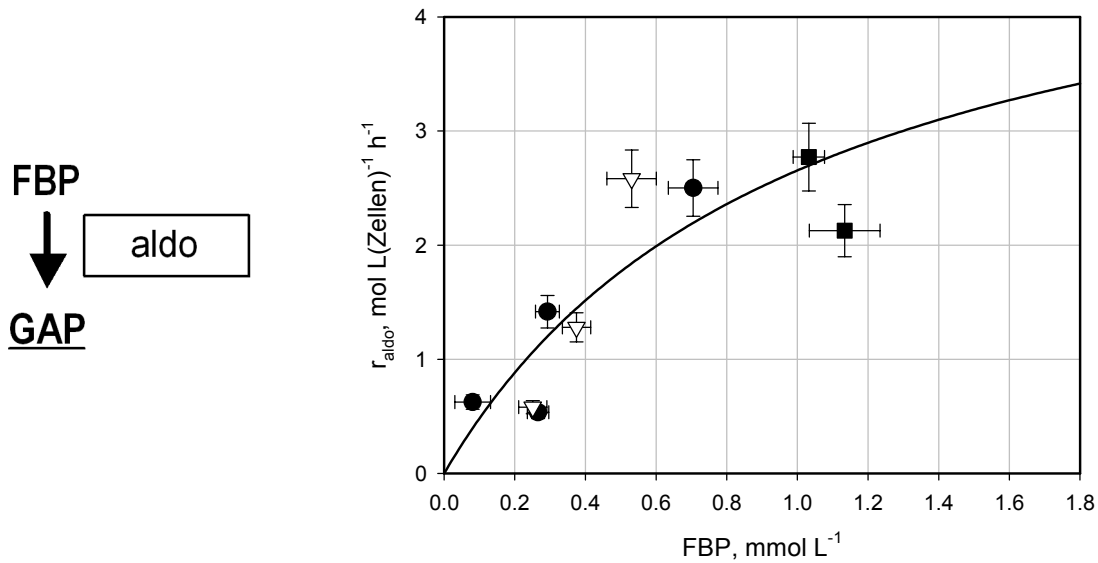


Abbildung 5.39: FBP Aldolase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch FBP-Aldolase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Fructose-1,6-bisphosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\text{max}} = 5,3 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

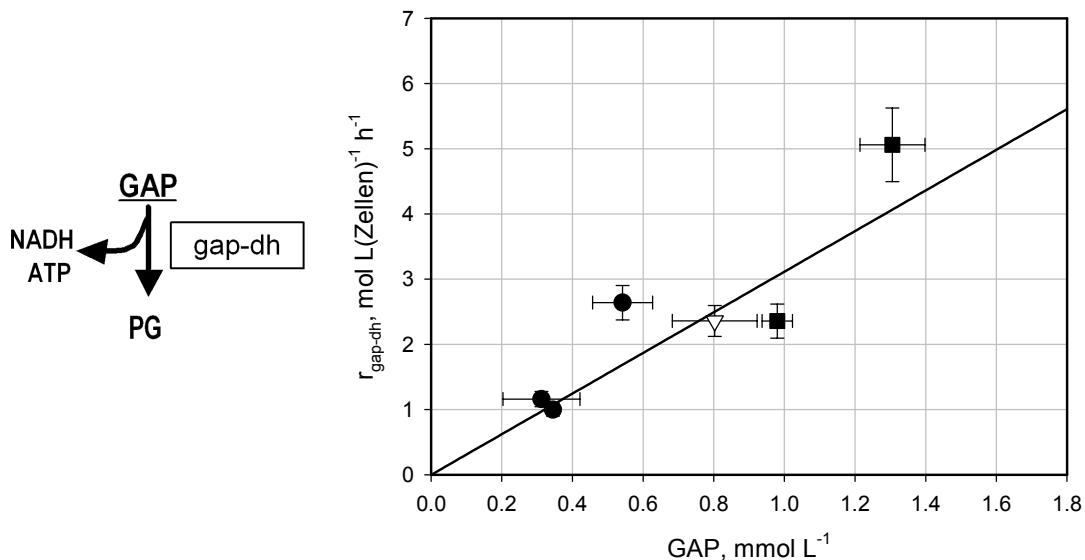
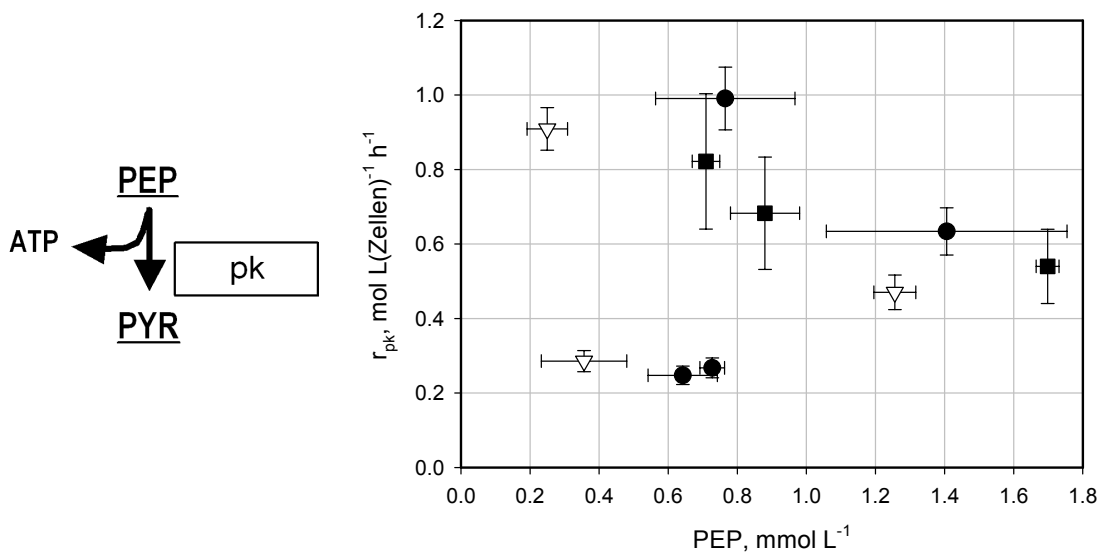
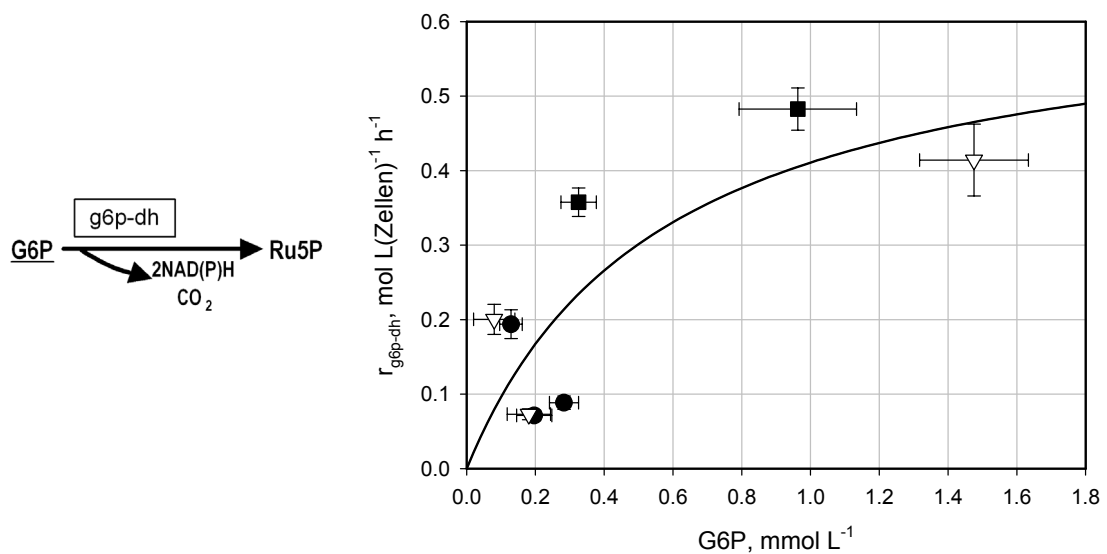


Abbildung 5.40: GAP-Dehydrogenase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch GAP-Dehydrogenase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Glycerinaldehydphosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik im linearen Bereich mit dem Parameter  $v_{\text{max}}/K_m = 3100 \text{ h}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



**Abbildung 5.41: Pyruvatkinase.** Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Pyruvatkinase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Phosphoenolpyruvat. Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



**Abbildung 5.42: G6P-Dehydrogenase.** Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch G6P-Dehydrogenase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Glucose-6-phosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{max} = 0,65 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{h}^{-1}$  und  $K_m = 0,57 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

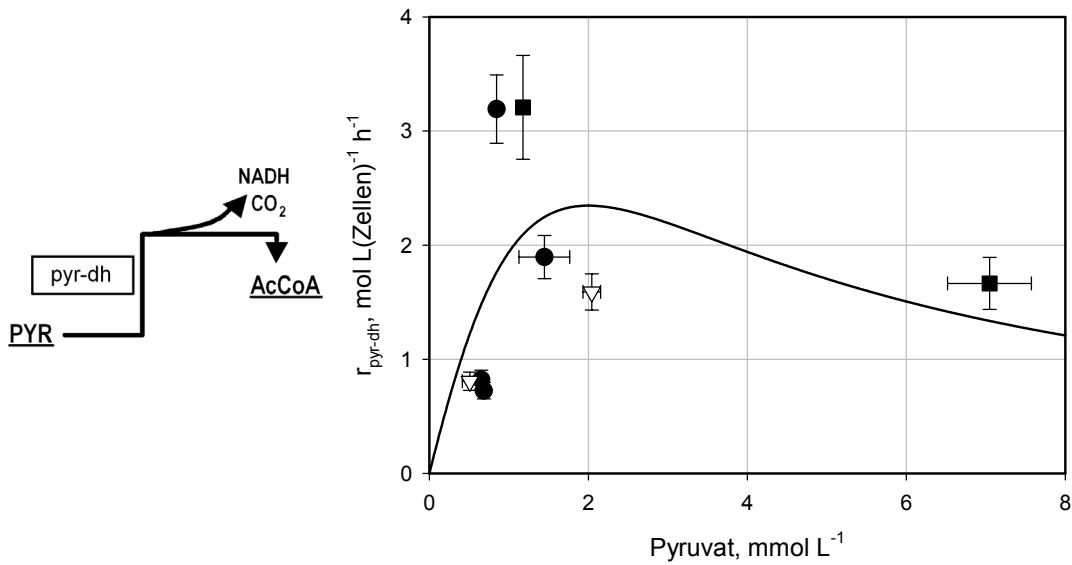


Abbildung 5.43: Pyruvatdehydrogenase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Pyruvatdehydrogenase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Pyruvat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Substratinhibition mit den Parametern  $v_{\text{max}} = 14,5 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_m = 5,2 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $K_i = 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

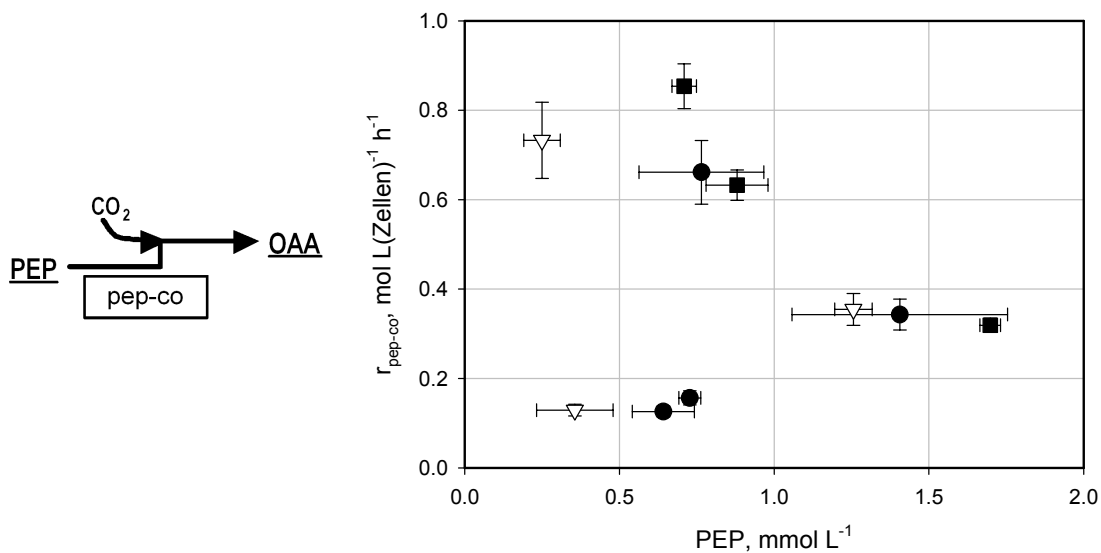


Abbildung 5.44: PEP-Carboxylase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch PEP-Carboxylase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Phosphoenolpyruvat. Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

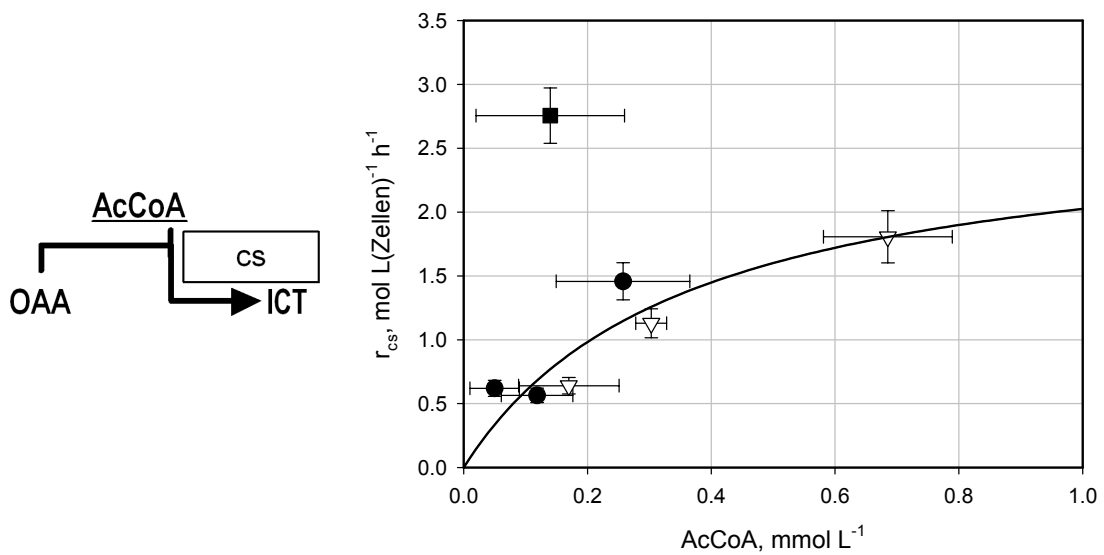


Abbildung 5.45: Citratsynthese. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Citratsynthase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Acetyl CoA. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 2,8 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{h}^{-1}$  und  $K_m = 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Untersuchungen mit Acetat wurden für die Regression ausgeschlossen; Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

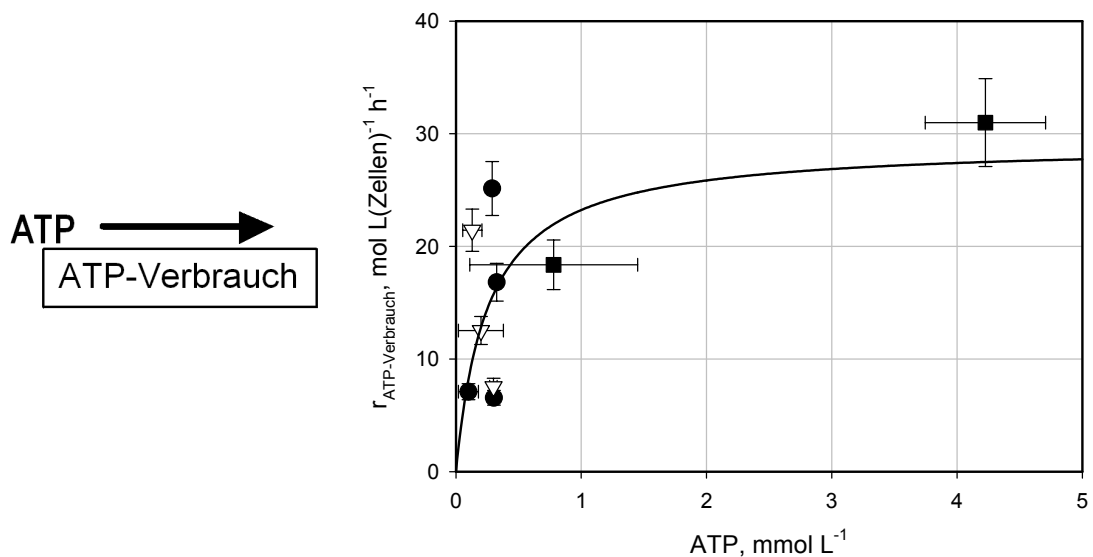
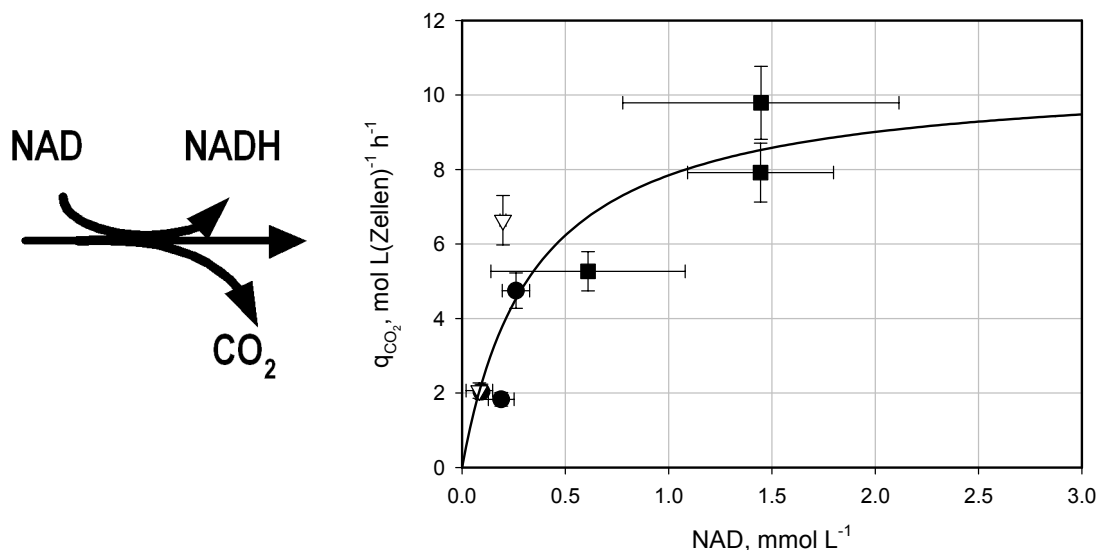


Abbildung 5.46: ATP-Verbrauch. Intrazelluläre Flussrate des ATP-Verbrauchs in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an ATP. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 29,2 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{h}^{-1}$  und  $K_m = 0,26 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



**Abbildung 5.47: CO<sub>2</sub>-Bildung: Intrazelluläre Flussrate der CO<sub>2</sub>-Bildung in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an NAD.** Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsrate nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{max} = 10,5 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,35 \text{ mmol L}^{-1}$  dar, Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

## Diskussion

Zunächst sollen einzelne Enzymkinetiken genauer betrachtet werden, bei denen die Korrelation nach einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik nicht zufriedenstellend oder nicht möglich ist. Eine Ursache könnte darin liegen, dass die Annahme einer konstanten Enzymmenge für alle stationären Untersuchungen nicht gegeben ist. Weitere spezifische Ursachen werden im Folgenden erläutert.

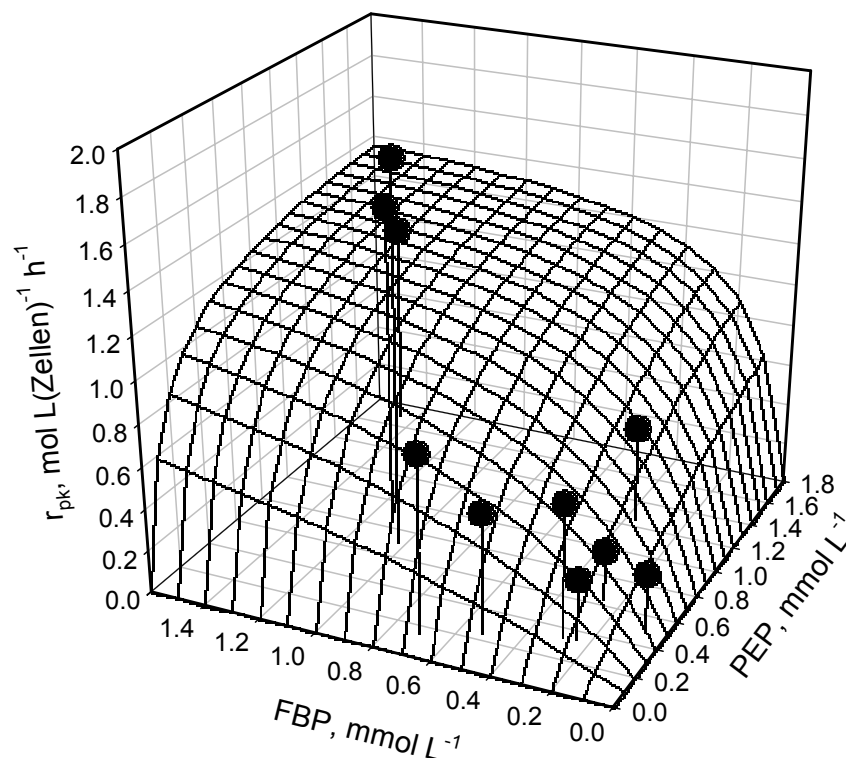
## Phosphoglucoseisomerase und G6P-Dehydrogenase

Die durch pgi katalysierte Reaktion von G6P nach F6P ist eine reversible Reaktion. Daher wurde untersucht, ob die Berechnung der kinetischen Parameter für pgi in Abhängigkeit von F6P und G6P nach Gleichung 3.48 eine bessere Übereinstimmung von Messdaten und Modell liefert. Die ermittelten Parameter deuten aber darauf hin, dass die Rückreaktion unter den hier untersuchten Bedingungen nahezu vernachlässigbar ist ( $K_P \gg K_m$ ). Daher wird pgi weiterhin durch die einfache Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben. Eine Ursache für die große Streuung der

Messdaten könnte in einer Unsicherheit der Flussverteilung zwischen pgi und g6p-dh zu finden sein. Wie in Kapitel 5.3.4 erläutert, finden sich auch unter den publizierten Daten sehr große Schwankungen hinsichtlich der Aufteilung der intrazellulären Flüsse auf g6p-dh und pgi. Diese Unsicherheit könnte somit auch Ursache für die relativ große Abweichung der Messdaten von der Regression für die Bestimmung der kinetischen Parameter für G6P-Dehydrogenase sein.

### Pyruvatkinase

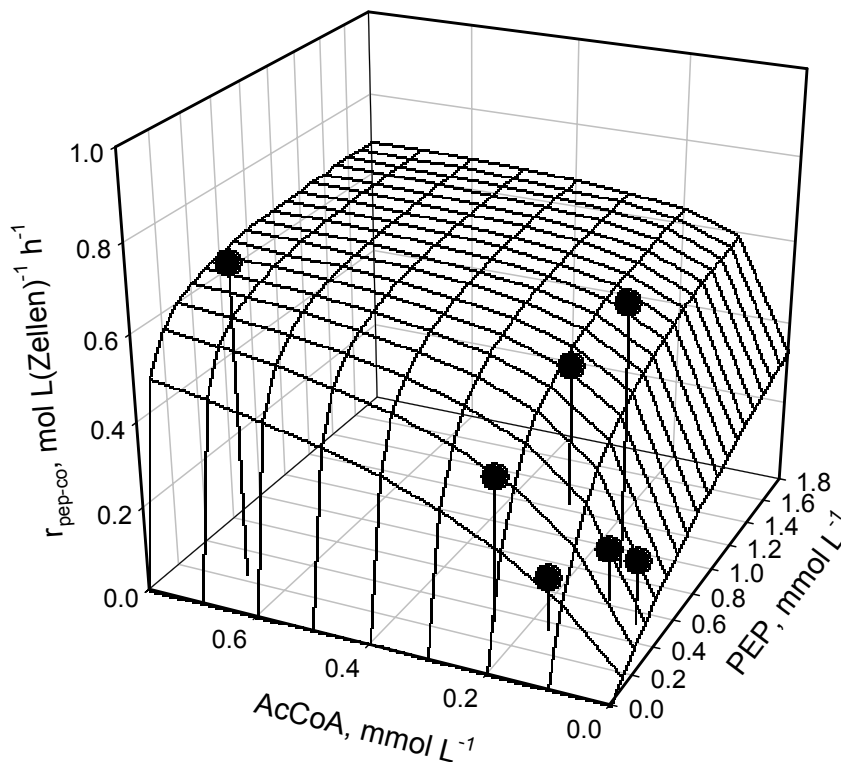
Pyruvatkinase wird durch FBP aktiviert (Schlegel, 1992). Daher wird der intrazelluläre Fluss, katalysiert durch pk in Abhängigkeit von PEP und FBP nach Gleichung 3.44 angepasst (Abbildung 5.48). Aufgrund der geringen Anzahl an Messdaten kann auch damit nur eine ungenaue Parameteranpassung erfolgen. Es wird aber deutlich, dass die starke Streuung in Abbildung 5.41 vermutlich durch die fehlende Berücksichtigung von Fructose-1,6-bisphosphat verursacht wird.



**Abbildung 5.48:** Pyruvatkinase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Pyruvatkinase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Phosphoenolpyruvat. Die Fläche stellt die Regression nach Gleichung 3.44 mit den Parametern  $v_{\max} = 1,5 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_m = 2415 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $K_3 = 184968 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $K_5 = 0,0001 \text{ mmol L}^{-1}$  dar.

### PEP-Carboxylase

PEP-Carboxylase wird von AcCoA aktiviert (Schlegel, 1992). Möglicherweise ist die Ursache für die starke Streuung in Abbildung 5.44 auf die Vernachlässigung des Einflusses durch AcCoA zurückzuführen. Daher wurde pep-co in Abhängigkeit von PEP und AcCoA dargestellt und nach Gleichung 3.44 angepasst. Aufgrund der sehr geringen Anzahl an Messdaten (AcCoA konnte in mehreren Untersuchungen nicht analysiert werden) ist eine sinnvolle Anpassung der Parameter aber kaum möglich (siehe Abbildung 5.49).



**Abbildung 5.49: PEP-Carboxylase.** Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch PEP-Carboxylase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Phosphoenolpyruvat. Die Fläche stellt die Regression nach Gleichung 3.44 mit den Parametern  $v_{\max} = 1,7 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_m = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $K_3 = 3864 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $K_5 = 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  dar.

### Citratsynthase

Für Citratsynthase wurden die Untersuchungen mit Acetat für die Anpassung der Enzymparameter nicht in Betracht gezogen. In diesem Fall wird wahrscheinlich unter Kultivierungsbedingungen mit Acetat im Medium eine andere Enzymmenge an Citratsynthase exprimiert als unter Bedingungen ohne Acetat.



### Vergleich der ermittelten kinetischen Parameter mit Literaturdaten

Da in den hier ermittelten kinetischen Parametern der Einfluss aller intrazellulär vorliegenden Metabolite, die auf die Reaktionsrate eines Enzyms Einfluss nehmen können, in zwei bzw. drei kinetischen Parametern zusammengefasst wird, ist ein Vergleich der vorliegenden Daten mit *in-vitro* ermittelten Literaturdaten schwierig. *In-vitro* ermittelte Enzymparameter werden üblicherweise in Experimenten mit nur einem Substrat oder mit gezielt ausgewählten inhibierenden Stoffen ermittelt, so dass durch die *in-vitro* ermittelten Parameter nur der Einfluss des entsprechenden Substrats und gegebenenfalls eines ausgewählten Inhibitors beschrieben wird. Außerdem sind die hier ermittelten Parameter aufgrund der geringen Messpunkte (maximal 10) mit einem großen Fehler behaftet.

**Tabelle 5.9: Vergleich der ermittelten kinetischen Parameter mit Literaturdaten.**

Enzym	$K_m$ , <i>in-vivo</i> , mmol L <sup>-1</sup>	$K_m$ , <i>in-vitro</i> , mmol L <sup>-1</sup>	Quelle
pts	0,29 ± 0,23	0,22	Garcia-Alles et al., 2002
		0,28	Postma und Roseman, 1976
Acetataufnahme	0,01 ± 0,01	0,8	Paalme et al., 1997
pgi	0,72 ± 0,78	2,46	Takama und Nosoh, 1980
pfk	0,17 ± 0,07	0,14	Deville-Bonne et al., 1991
		0,16	Zheng et al., 1995
aldo	0,82 ± 0,64	0,13	Babul et al., 1993
		0,17	Zgiby et al., 2000
		0,19	Plater et al., 1999
gap-dh	-	0,89	Eyschen et al., 1999
g6p-dh	0,57 ± 0,46	0,07	Sanwal, 1970
cs	0,36 ± 0,23	0,12	Pereira et al., 1994
		0,7	Molgat et al., 1992

Dennoch werden die hier ermittelten Sättigungskonzentrationen mit Sättigungskonzentrationen aus der Literatur verglichen, um einen Anhaltspunkt zu erlangen.

Der Vergleich der *in-vitro* ermittelten Daten mit vorhandenen Literaturdaten macht folgendes deutlich: Zum einen liegen die ermittelten Daten durchaus in realistischen Größenordnungen, so dass die Methode der stationären Flussanalysen in Kombination mit intrazellulären Metabolitkonzentrationen als ein adäquates Mittel angesehen werden kann. Zum anderen wird deutlich, dass die Nutzung von aus der Literatur ermittelten *In-vitro*-Parametern einige Schwierigkeiten mit sich bringt: Es ist genau zu prüfen, inwieweit die charakterisierten Enzyme dem untersuchten Organismus und dem untersuchten Zustand des Organismus entsprechen. Aber auch wenn nur Enzyme aus *Escherichia coli*, die laut Literaturangaben in einem ähnlichen pH- und Temperaturbereich charakterisiert wurden verglichen werden, so schwanken schon die aus der Literatur entnommenen Daten teilweise in großen Bereichen (zum Beispiel liegt die Sättigungskonzentration für Citratsynthase zwischen 0,12 und 0,7 mmol L<sup>-1</sup>).

#### 5.4 Untersuchungen im „quasi-stationären“ Zustand

Neben den in Kapitel 5.3 erläuterten Fließgleichgewichtszuständen, wurden Untersuchungen während des Überganges von einer Durchflussrate auf die nächste durchgeführt. Hierbei wurde jeweils die Zulauftrate in einem Zeitraum von drei Stunden in einem linearen Profil von einem Wert auf den nächsten geändert. Während dieses Übergangsbereichs wurden im Abstand von einer Stunde Proben aus dem Reaktor entnommen und die extra- und intrazellulären Metabolite analysiert.

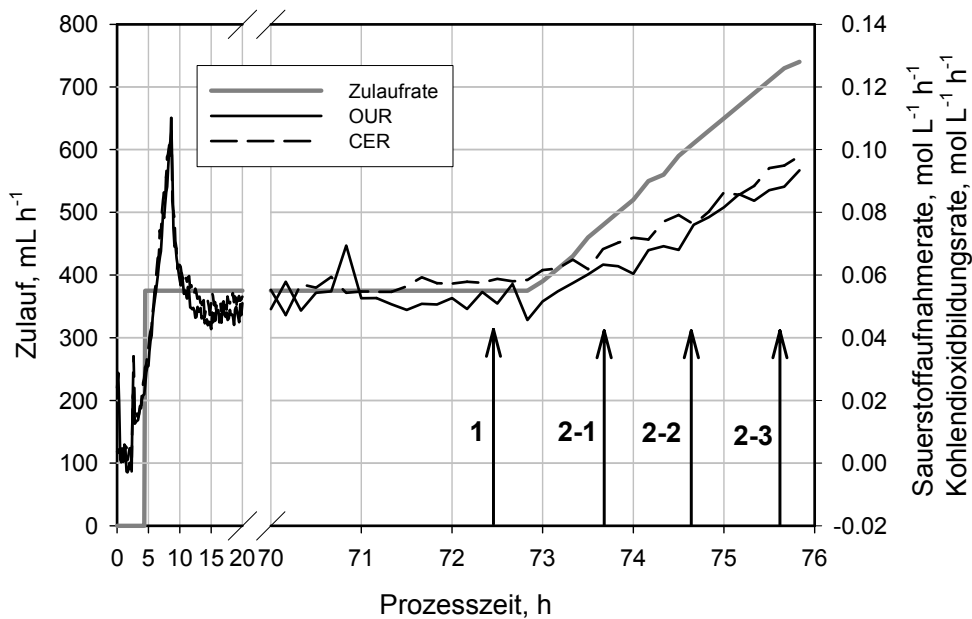
In Tabelle 5.10 sind die untersuchten Zustände zusammengefasst.

**Tabelle 5.10: Untersuchte Übergangszustände zwischen den einzelnen stationären Zuständen.**

Zustand	Zulauftrate, mL h <sup>-1</sup>	C-Quellen im Zulauf
Übergang von $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$ auf $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$		
1-1	891	100 % Glucose
1-2	612	100 % Glucose
1-3	375	100 % Glucose
Übergang von $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$ auf $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$		
2-1	507	100 % Glucose
2-2	625	100 % Glucose
2-3	744	100 % Glucose
Übergang von $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$ auf $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$		
3-1	405	90 % Glucose, 10 % Fructose
3-2	618	90 % Glucose, 10 % Fructose
3-3	740	90 % Glucose, 10 % Fructose
Übergang von $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$ auf $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$		
4-1	489	10 % Glucose, 90 % Fructose
4-2	621	10 % Glucose, 90 % Fructose
4-3	741	10 % Glucose, 90 % Fructose
Übergang von $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$ auf $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$		
5-1	510	90 % Glucose, 10 % Acetat
5-2	630	90 % Glucose, 10 % Acetat
5-3	750	90 % Glucose, 10 % Acetat
Übergang von $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ auf $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$		
6-1	840	90 % Glucose, 10 % Acetat
6-2	780	90 % Glucose, 10 % Acetat
6-3	750	90 % Glucose, 10 % Acetat

### 5.4.1 Prozessgrößen im quasi-stationären Zustand

Der Verlauf des Überganges von  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$  ist exemplarisch für die Untersuchungen mit Glucose als Substrat in Abbildung 5.50 (Ausschnitt aus Abbildung 5.17) graphisch dargestellt.



**Abbildung 5.50:** Übergang von  $D = 0,125 \text{ h}^{-1}$  auf  $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$  bei einer kontinuierlichen Kultivierung von *Escherichia coli* mit  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im Zulaufmedium. Die Positionen der Probenentnahmen sind durch Pfeile gekennzeichnet: 1 – Experiment 1 im Fließgleichgewicht, 2-1, 2-2, 2-3 – Experimente im Übergangsbereich.

Qualitativ sehen die zeitlichen Abhängigkeiten der weiteren Kultivierungen ähnlich aus, allerdings befinden sich die einzelnen Prozessgrößen abhängig von den eingesetzten Substraten und eingestellten Durchflussraten auf unterschiedlichen Niveaus. Eine Zusammenfassung der einzelnen Prozessgrößen für alle Übergangszustände ist in Tabelle 5.11 gegeben.

Tabelle 5.11: Prozessgrößen der Übergangszustände.

Experiment	Zulauf mL h <sup>-1</sup>	BTM g L <sup>-1</sup>	C <sub>Glucose</sub> mg L <sup>-1</sup>	C <sub>Acetat</sub> mg L <sup>-1</sup>	C <sub>Fructose</sub> mg L <sup>-1</sup>	pO <sub>2</sub> %	O <sub>2</sub> %	CO <sub>2</sub> %
100 % Glucose								
1-1	891	5,3 ± 0,5	21664 ± 1065	490,7 ± 38,4	-	58,8	20,0	1,0
1-2	612	5,7 ± 0,4	4403 ± 279	453,8 ± 92,9	-	50,7	19,8	1,1
1-3	375	6,5 ± 0,3	4815 ± 114	465,9 ± 101,7	-	44,6	19,7	1,2
2-1	507	10,6 ± 0,3	20,6 ± 12,2	80,8 ± 28,4	-	62,9	19,7	1,2
2-2	625	11,2 ± 0,2	116,5 ± 27,4	97,9 ± 10,8	-	44,2	19,7	1,5
2-3	744	11,4 ± 0,4	8,9 ± 4,3	112,4 ± 77,8	-	28,2	19,1	1,9
90 % Glucose / 10 % Fructose								
3-1	405	11,2 ± 0,1	12,3 ± 5,8	1,5 ± 1,4	n.d.	53,6	19,8	1,4
3-2	618	11,1 ± 0,3	9,4 ± 1,9	2,4 ± 2,1	1,2 ± 0,7	21,0	19,3	1,4
3-3	740	10,9 ± 0,4	9,2 ± 2,8	16,5 ± 0,4	1,3 ± 0,6	15,0	19,1	1,7
10 % Glucose / 90 % Fructose								
4-1	489	9,6 ± 0,4	25,1 ± 3,5	35,4 ± 4,1	26,6 ± 3,5	76,4	19,9	1,2
4-2	621	10,1 ± 0,3	29,4 ± 7,4	50,1 ± 5,3	30,4 ± 3,3	68,6	19,6	1,4
4-3	741	10,8 ± 0,3	38,0 ± 18,6	10,8 ± 14,3	286,8 ± 371,7	65,0	19,4	1,7
90 % Glucose / 10 % Acetat								
5-1	510	9,2 ± 0,4	15,0 ± 9,5	n.d.	-	53,2	19,8	1,3
5-2	630	9,1 ± 0,5	7,9 ± 1,8	7,0 ± 4,4	-	47,6	19,4	1,6
5-3	750	9,5 ± 0,3	7,8 ± 1,5	14,3 ± 2,4	-	40,8	19,2	1,9
6-1	840	10,9 ± 0,7	11,8 ± 2,3	4,7 ± 1,4	-	35,2	18,9	2,3
6-2	780	11,3 ± 0,1	11,7 ± 1,6	n.d.	-	17,8	19,1	2,1
6-3	750	11,1 ± 0,6	9,2 ± 5,8	n.d.	-	31,6	19,1	2,0

**Tabelle 5.12: Linearisierte spezifische Substrataufnahme- und Produktbildungsraten während der Übergangszustände.**

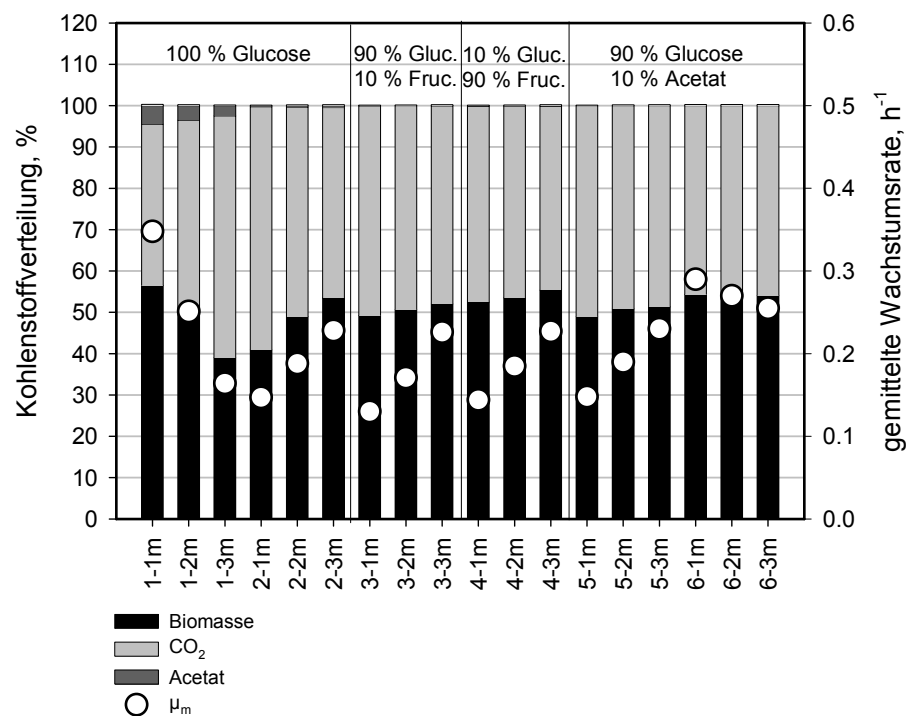
Experiment	$\mu_m$	$q_G$	$q_F$	$q_{Ace}$	$q_{CO_2}$	$q_{BTM}$
	$h^{-1}$	$mol\ g_{BTM}^{-1}\ h^{-1}$	$mol\ g_{BTM}^{-1}\ h^{-1}$	$mol\ g_{BTM}^{-1}\ h^{-1}$	$mol\ g_{BTM}^{-1}\ h^{-1}$	$mol\ g_{BTM}^{-1}\ h^{-1}$
100 % Glucose – $\mu = 0,4\ h^{-1}$ auf $\mu = 0,125\ h^{-1}$						
1-1 <sub>m</sub>	0,348	-25,14	0,00	1,1228	9,81	14,21
1-2 <sub>m</sub>	0,251	-20,36	0,00	0,7203	9,47	10,17
1-3 <sub>m</sub>	0,164	-16,15	0,00	0,4004	9,44	6,31
100 % Glucose – $\mu = 0,125\ h^{-1}$ auf $\mu = 0,25\ h^{-1}$						
2-1 <sub>m</sub>	0,147	-11,18	0,00	0,0247	6,58	4,58
2-2 <sub>m</sub>	0,188	-11,39	0,00	0,0400	5,78	5,57
2-3 <sub>m</sub>	0,228	-15,08	0,00	0,0655	6,94	8,07
90 % Glucose / 10 % Fructose – $\mu = 0,125\ h^{-1}$ auf $\mu = 0,25\ h^{-1}$						
3-1 <sub>m</sub>	0,130	-9,99	-0,86	0,0021	5,50	5,35
3-2 <sub>m</sub>	0,171	-12,94	-1,04	0,0019	6,89	7,08
3-3 <sub>m</sub>	0,226	-17,25	-1,20	0,0080	8,84	9,60
10 % Glucose / 90 % Fructose – $\mu = 0,125\ h^{-1}$ auf $\mu = 0,25\ h^{-1}$						
4-1 <sub>m</sub>	0,144	-0,95	-11,36	0,0176	5,84	6,46
4-2 <sub>m</sub>	0,185	-1,18	-14,28	0,0286	7,16	8,28
4-3 <sub>m</sub>	0,227	-1,43	-16,55	0,0240	8,00	9,95
90 % Glucose / 10 % Acetat – $\mu = 0,125\ h^{-1}$ auf $\mu = 0,25\ h^{-1}$						
5-1 <sub>m</sub>	0,148	-11,27	0,00	-1,5385	6,53	6,27
5-2 <sub>m</sub>	0,190	-14,06	0,00	-1,9546	7,87	8,15
5-3 <sub>m</sub>	0,230	-16,82	0,00	-2,3234	9,32	9,83
90 % Glucose / 10 % Acetat – $\mu = 0,3\ h^{-1}$ auf $\mu = 0,25\ h^{-1}$						
6-1 <sub>m</sub>	0,290	-19,32	0,00	-2,4986	9,96	11,86
6-2 <sub>m</sub>	0,270	-18,15	0,00	-2,3438	9,46	11,04
6-3 <sub>m</sub>	0,255	-17,05	0,00	-2,1997	8,84	10,41

Zur Berechnung der spezifischen, extrazellulären Substrataufnahme- und Produktbildungsraten wurden die Bereiche zwischen den Zeitpunkten der

Probenentnahme linear approximiert (siehe Kapitel 4.4.2). Ausgehend von diesen Linearisierungen und durch Optimierung der Raten ergeben sich für die untersuchten Übergangszustände die in Tabelle 5.12 dargestellten spezifischen Substrataufnahme- und Produktbildungsraten.

#### 5.4.2 Kohlenstoffbilanz

Die prozentuale Kohlenstoffverteilung der entstehenden Produkte Biomasse, Kohlendioxid und Acetat der quasi-stationären Untersuchungen ist in Abbildung 5.1 dargestellt.



**Abbildung 5.51: Kohlenstoffverteilung bei unterschiedlichen quasi-stationären Zuständen. Die weißen Punkte kennzeichnen die eingestellte gemittelte Wachstumsrate. Experimentnummern wie in Tabelle 5.12.**

#### Diskussion

Wie in den stationären Experimenten, wird der aufgenommene Kohlenstoff zu etwa 50 % in Biotrockenmasse fixiert, wobei ein Anstieg des relativen Biomasseanteils bei steigender Durchflussrate, bzw. ein Rückgang des Anteils bei sinkender

Durchflussrate zu erkennen ist, was vermutlich auf den Einfluss des Erhaltungsstoffwechsel zurückzuführen ist.

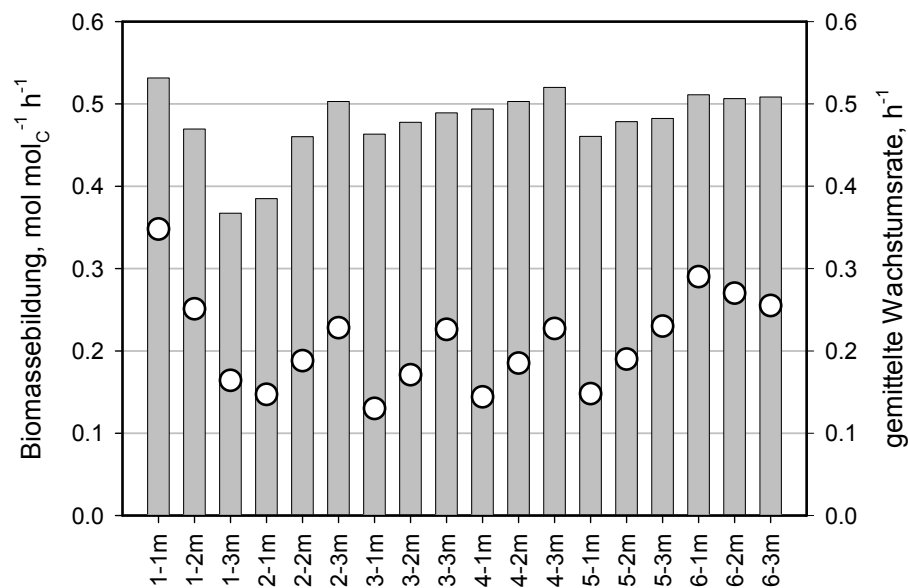
Die Tatsache, dass bei Übergang 6, von  $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$  bei einer Zulaufkomposition von 90% Glucose und 10% Acetat der Trend der Biomassebildung in Abhängigkeit von der Wachstumsrate nicht zu sehen ist, liegt vermutlich an der insgesamt sehr kleinen Änderung der Wachstumsrate.



### 5.4.3 Quasi-stationäre Flussanalysen

Auf Basis der optimierten extrazellulären Substrataufnahme- und Produktbildungsraten wurden metabolische Stoffflussanalysen durchgeführt. Um die Stoffflüsse der Experimente mit verschiedenen Kohlenstoffquellen unterschiedlicher Molmassen vergleichen zu können, wurden auch hier die berechneten Stoffflüsse auf die molare aufgenommene Kohlenstoffmenge normiert. Die kohlenstoffnormierten externen Verbrauchs- und Bildungsraten sind in Tabelle 5.13 dargestellt.

Zur Validierung des Modells der stationären Flussanalyse wurde auch hier die kohlenstoffnormierte Biomassebildung betrachtet (siehe Abbildung 5.52). Die bei der Kohlenstoffbilanz festgestellte Tatsache, dass bei steigender Wachstumsrate der aufgenommene Kohlenstoff zu einem größeren Anteil in Biomasse fixiert wird, kann auch bei den quasi-stationären Zuständen während der Übergangsphasen durch das Modell bestätigt werden.



**Abbildung 5.52:** Berechnete Biomassebildung über die Flussanalyse für unterschiedliche quasi-stationäre Zustände. Die weißen Punkte kennzeichnen die gemittelte Wachstumsrate. Experimentnummern wie in Tabelle 5.12.

**Tabelle 5.13: Kohlenstoffnormierte Verbrauchs- und Bildungsraten der quasi-stationären Übergangszustände.**

Experiment	$\mu_m, h^{-1}$	$q_G$ mol mol <sub>c</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$q_F$ mol mol <sub>c</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$q_{Ace}$ mol mol <sub>c</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$q_{CO_2}$ mol mol <sub>c</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
100 % Glucose – $\mu = 0,4 h^{-1}$ auf $\mu = 0,125 h^{-1}$					
1-1 <sub>m</sub>	0,348	-0,167	0,000	0,022	0,390
1-2 <sub>m</sub>	0,251	-0,167	0,000	0,018	0,465
1-3 <sub>m</sub>	0,164	-0,167	0,000	0,012	0,585
100 % Glucose – $\mu = 0,125 h^{-1}$ auf $\mu = 0,25 h^{-1}$					
2-1 <sub>m</sub>	0,147	-0,167	0,000	0,001	0,588
2-2 <sub>m</sub>	0,188	-0,167	0,000	0,002	0,507
2-3 <sub>m</sub>	0,228	-0,167	0,000	0,002	0,461
90 % Glucose / 10 % Fructose – $\mu = 0,125 h^{-1}$ auf $\mu = 0,25 h^{-1}$					
3-1 <sub>m</sub>	0,130	-0,154	-0,013	0,000	0,507
3-2 <sub>m</sub>	0,171	-0,154	-0,012	0,000	0,493
3-3 <sub>m</sub>	0,226	-0,156	-0,011	0,000	0,479
10 % Glucose / 90 % Fructose – $\mu = 0,125 h^{-1}$ auf $\mu = 0,25 h^{-1}$					
4-1 <sub>m</sub>	0,144	-0,013	-0,154	0,001	0,474
4-2 <sub>m</sub>	0,185	-0,013	-0,154	0,001	0,463
4-3 <sub>m</sub>	0,227	-0,013	-0,153	0,001	0,445
90 % Glucose / 10 % Acetat – $\mu = 0,125 h^{-1}$ auf $\mu = 0,25 h^{-1}$					
5-1 <sub>m</sub>	0,148	-0,147	0,000	-0,060	0,510
5-2 <sub>m</sub>	0,190	-0,146	0,000	-0,061	0,491
5-3 <sub>m</sub>	0,230	-0,146	0,000	-0,061	0,487
90 % Glucose / 10 % Acetat – $\mu = 0,3 h^{-1}$ auf $\mu = 0,25 h^{-1}$					
6-1 <sub>m</sub>	0,290	-0,148	0,000	-0,057	0,456
6-2 <sub>m</sub>	0,270	-0,148	0,000	-0,057	0,461
6-3 <sub>m</sub>	0,255	-0,148	0,000	-0,057	0,459

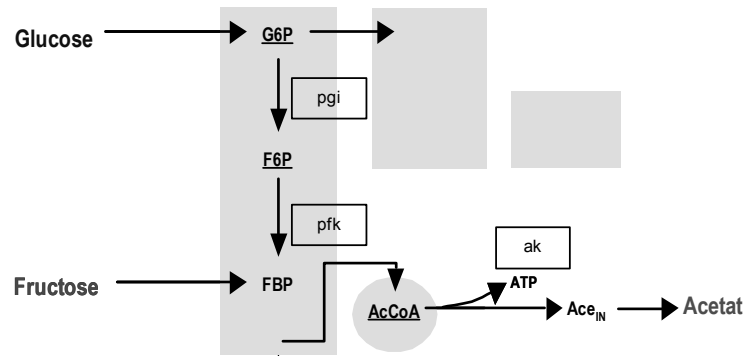


Abbildung 5.53: Phosphoglucoseisomerase (pgi), Phosphofructokinase (pfk) und Acetatkinase (ak) im Zentralstoffwechsel von *E. coli*.

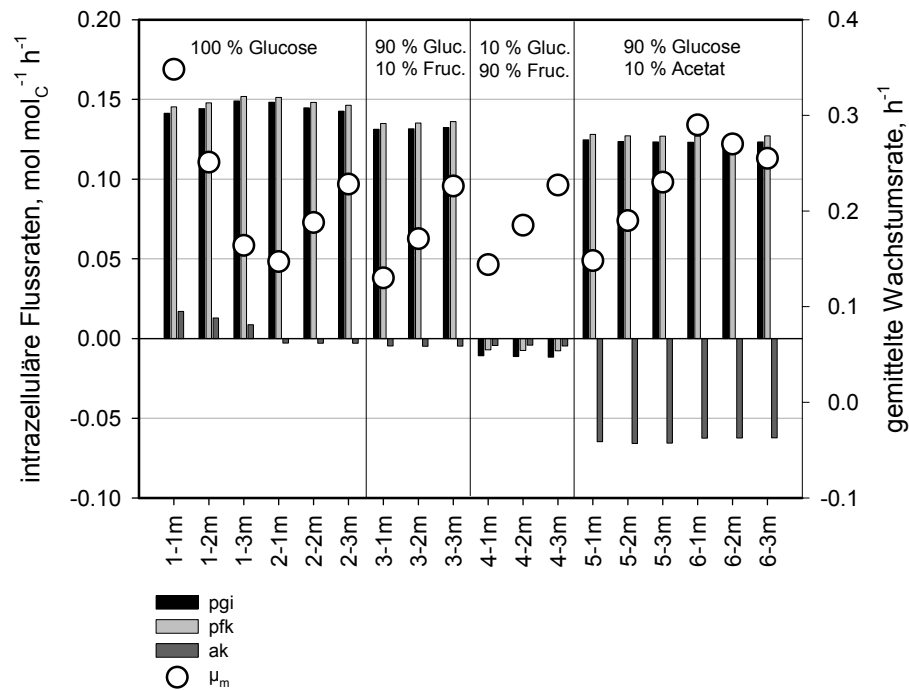
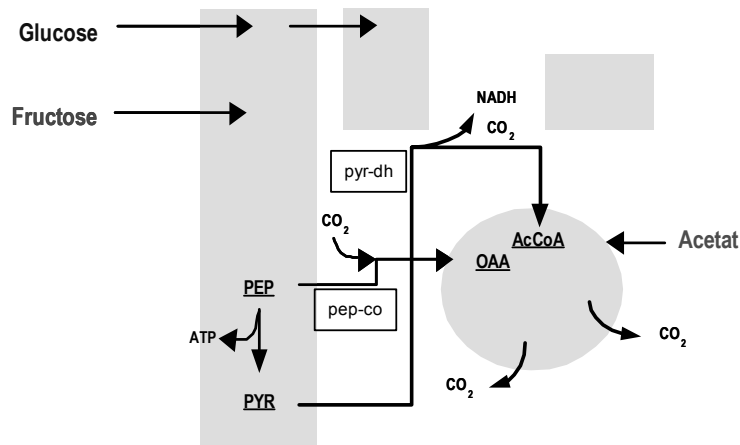


Abbildung 5.54: Kohlenstoffnormierte intrazelluläre Flussraten von Phosphoglucoseisomerase (pgi), Phosphofructokinase (pfk) und Acetatkinase (ak) bei unterschiedlichen quasi-stationären Zuständen. Die weißen Punkte kennzeichnen die gemittelte Wachstumsrate. Experimentnummern wie in Tabelle 5.12.

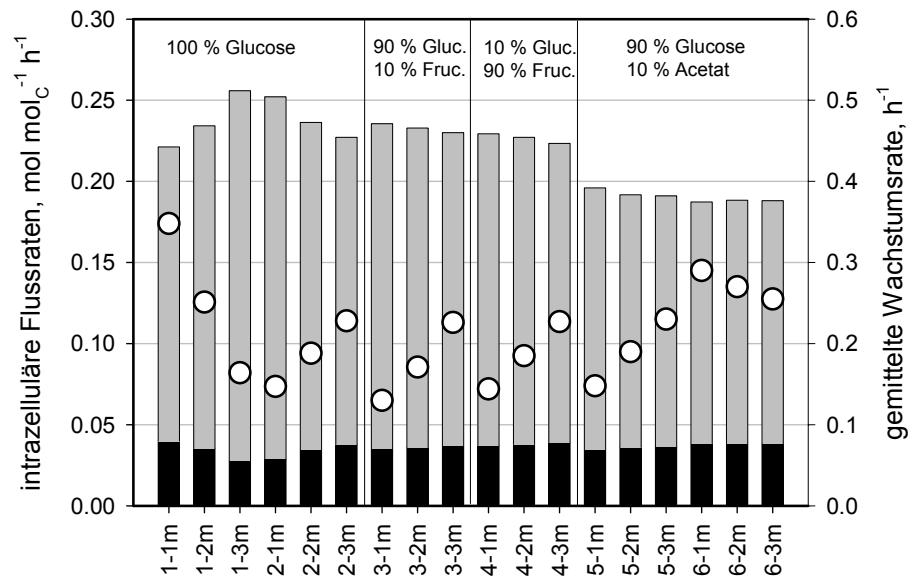
## Diskussion

Werden die kohlenstoffnormierten Stoffflüsse, katalysiert durch die Enzyme Phosphoglucoseisomerase, Phosphofruktokinase und Acetatkinase betrachtet, so ist nur für den Übergang von  $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  (Experimente 1-1 bis 1-3) mit Glucose als Substrat eine Verschiebung des Kohlenstoffflusses während der Übergänge zu beobachten (siehe Abbildung 5.53 und Abbildung 5.54).

Eine deutliche Verschiebung der kohlenstoffnormierten Stoffflüsse zeigt sich bei diesem Übergang auch für die Reaktionsschritte, bei denen Kohlendioxid gebildet oder verbraucht wird. So kann auch hier gezeigt werden, dass die Ursache für eine geringere Kohlendioxidbildung pro aufgenommenem Kohlenstoff bei steigender Wachstumsrate vermutlich durch den Einfluss von Pyruvatdehydrogenase und PEP-Carboxylase verursacht wird. Die kohlenstoffnormierte Reaktionsrate der Pyruvatdehydrogenase, bei deren Reaktionsschritt Kohlendioxid entsteht, nimmt bei steigender Durchflussrate ab, wohingegen die kohlenstoffnormierte Rate der von PEP-Carboxylase katalysierten Reaktion, bei der Kohlendioxid verbraucht wird mit steigender Durchflussrate zunimmt (siehe Abbildung 5.55 und Abbildung 5.56).



**Abbildung 5.55:** Pyruvatdehydrogenase (pyr-dh) und PEP-Carboxylase (pep-co) im Zentralstoffwechsel von *E. coli*.



**Abbildung 5.56: Kohlenstoffnormierte intrazelluläre Flussraten von PEP-Carboxylase (schwarz) und Pyruvatdehydrogenase (grau) bei unterschiedlichen quasi-stationären Zuständen. Die weißen Punkte kennzeichnen die gemittelte Durchflussrate. Experimentnummern wie in Tabelle 5.12.**

Die Summe dieser beiden Reaktionen nimmt mit zunehmender Wachstumsrate ab, so dass bei einer höheren Wachstumsrate anteilig weniger Kohlenstoff in den Kohlendioxid-bildenden Zitronensäurezyklus eingespeist wird. Die Änderung ist allerdings auch hier am deutlichsten für den Übergang von  $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$  mit Glucose als Substrat zu erkennen. Für diesen Übergang ist in Abbildung 5.57 bis Abbildung 5.59 eine Übersicht aller kohlenstoffnormierter intrazellulärer Stoffflüsse dargestellt. Während der übrigen Übergangszustände bleibt die Verteilung der Stoffflüsse nahezu konstant. Eine Zusammenstellung aller Übergangszustände findet sich in Anhang 9.5.

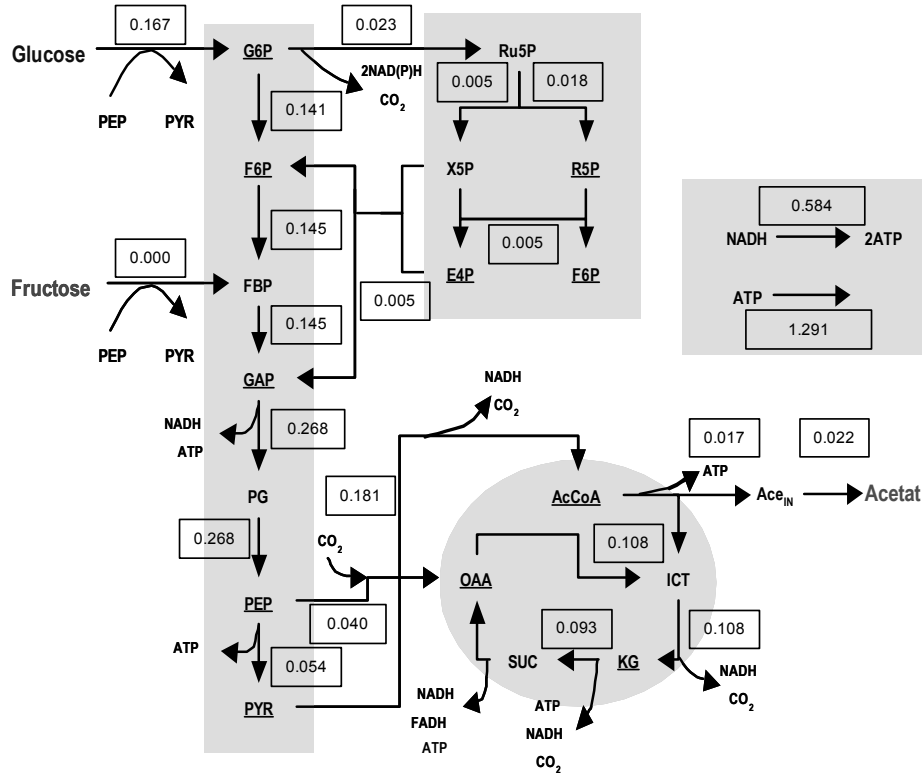


Abbildung 5.57: Kohlenstoffnormierte Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in  $\text{mol mol}_c^{-1} \text{h}^{-1}$  bei einer gemittelten Durchflussrate von  $D = 0,348 \text{ h}^{-1}$  (Experiment 1-1<sub>m</sub>).

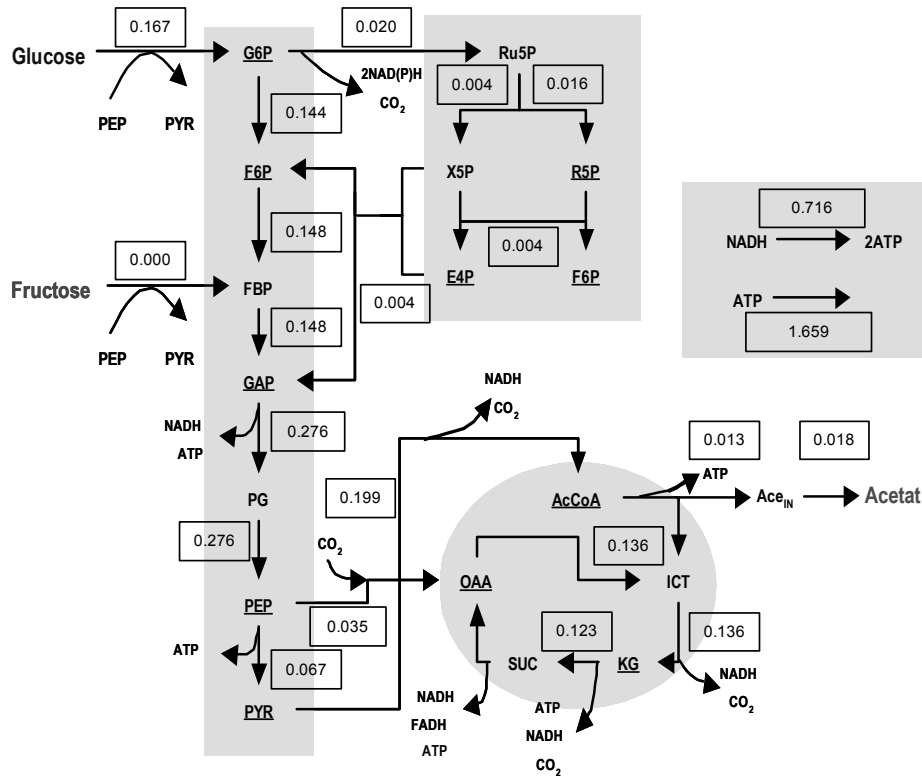
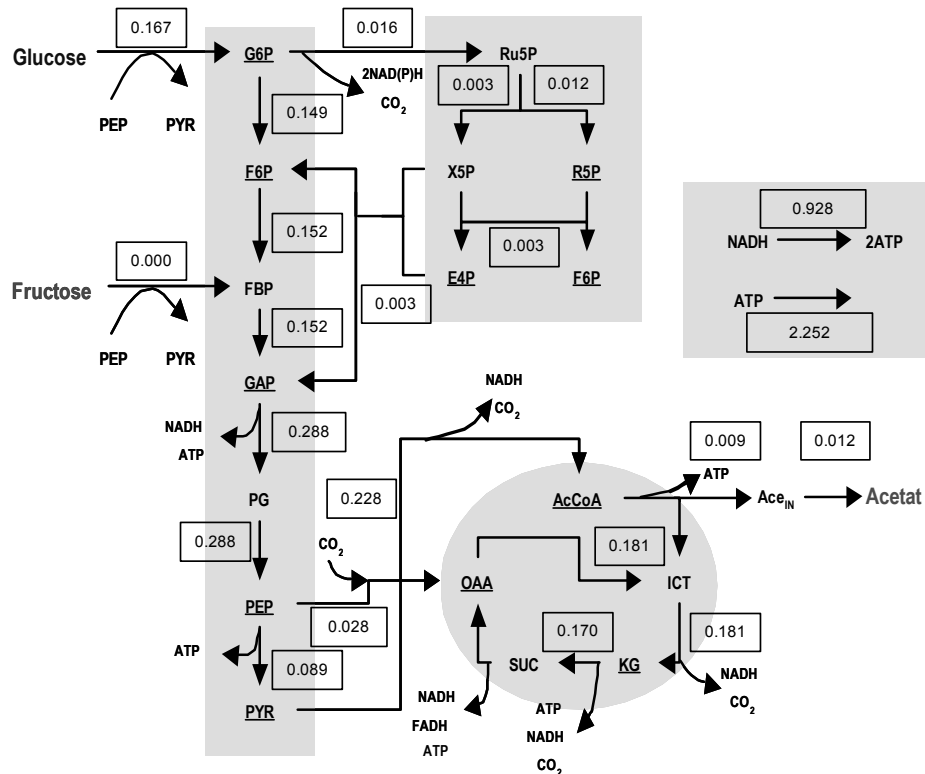


Abbildung 5.58: Kohlenstoffnormierte Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in  $\text{mol mol}_c^{-1} \text{h}^{-1}$  bei einer gemittelten Durchflussrate von  $D = 0,251 \text{ h}^{-1}$  (Experiment 1-2<sub>m</sub>).



**Abbildung 5.59:** Kohlenstoffnormierte Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in  $\text{mol mol}_c^{-1} \text{h}^{-1}$  bei einer gemittelten Durchflussrate von  $D = 0,164 \text{ h}^{-1}$  (Experiment 1-3<sub>m</sub>).

Die starke Verschiebung der Stoffflüsse ist wahrscheinlich auf die große Änderung der Durchflussrate von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,125 \text{ h}^{-1}$  zurückzuführen. Ab einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$  (Meyer et al., 1984), korrespondierend zu einer kritischen Substrataufnahmerate, produziert *Escherichia coli* trotz ausreichender Sauerstoffkonzentration Acetat („Überschussmetabolismus“). Trotz Erreichen einer gemittelten Wachstumsrate von  $0,25 \text{ h}^{-1}$  (Experiment 1-2<sub>m</sub>) unterhalb der kritischen Wachstumsrate wird Acetat noch in erhöhtem Maße produziert: Im quasi-stationären Zustand werden  $0,018 \text{ mol mol}_c^{-1} \text{ h}^{-1}$  Acetat gebildet, im stationären Zustand beträgt die Acetatbildungsrate  $0,001 \text{ mol mol}_c^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Experiment 2). In diesem Übergang kann also nicht von quasi-stationären Zuständen ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu kann bei den restlichen Übergangszuständen von quasi-stationären Zuständen ausgegangen werden (keine Verschiebung der Stoffflüsse im Vergleich zu den stationären Zuständen). Allerdings bleibt die Frage noch offen, in wieweit die Kombination von intrazellulären Metaboliten und intrazellulären Flüssen eine realistische *in-vivo* Enzymkinetik liefert.

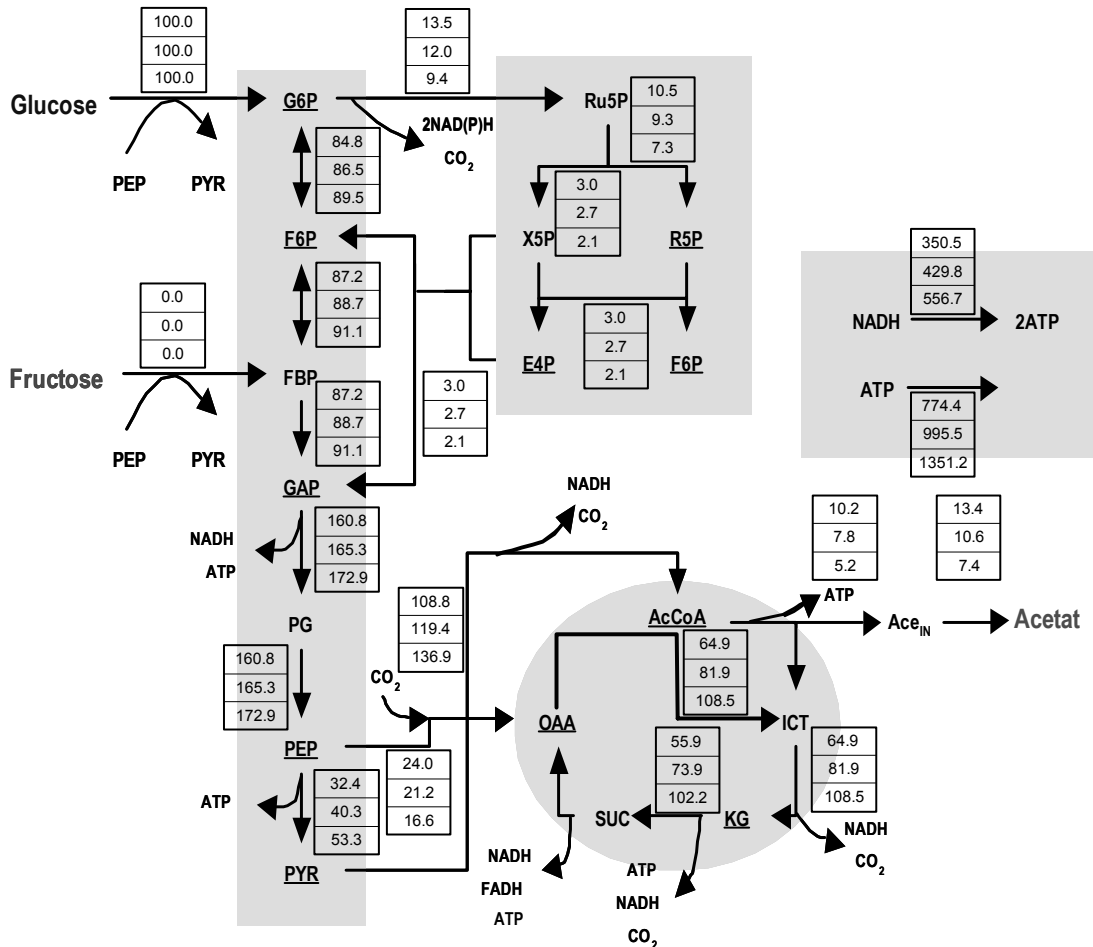


Abbildung 5.60: Vergleich der intrazellulären Stoffflüsse beim Übergang von  $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu = 125 \text{ h}^{-1}$  innerhalb von 3 h. In den Kästen sind die Stoffflüsse bezogen auf die Glucoseaufnahme dargestellt in  $\text{mol}\% \text{ mol}_c^{-1}$ . Oben: Experiment 1-1<sub>m</sub>, Mitte: Experiment 1-2<sub>m</sub>, unten: Experiment 1-3<sub>m</sub>.

#### 5.4.4 Metabolomics der quasi-stationären Übergangszustände

Für die in Abschnitt 5.3 beschriebenen quasi-stationären Übergangszustände wurden jeweils die intrazellulären Konzentrationen von G6P, F6P, FBP, DHAP, GAP, PEP, Pyruvat, AcCoA, ATP, ADP, AMP, cAMP, NAD, NADP und FAD bestimmt. Ein Vergleich der intrazellulären Konzentrationen im quasi-stationären Fließgleichgewicht für die substratlimitierten chemostatischen Kultivierungen befindet sich in Tabelle 5.14.



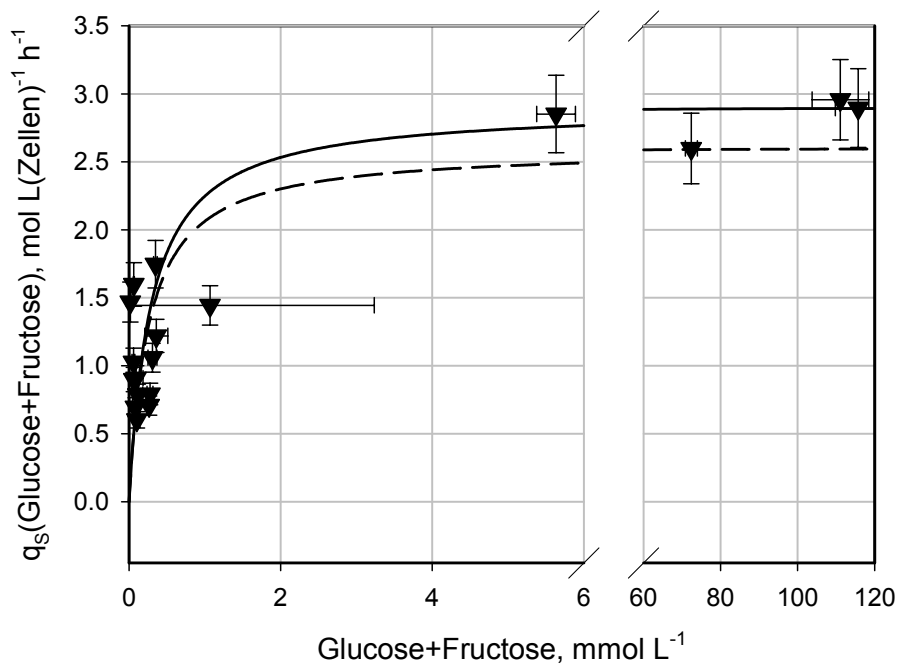
**Tabelle 5.14: Intrazelluläre Konzentrationen während unterschiedlicher quasi-stationärer Übergangszustände. Experimentnummern wie in Tabelle 5.10. n.a.: nicht analysiert; n.d.: nicht detektiert.**

Experiment	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
	100% Glucose			100 % Glucose			90 % Gluc. / 10 % Fruc.		
$\mu_m, h^{-1}$	0,384	0,251	0,164	0,147	0,188	0,228	0,130	0,171	0,226
G6P	3,78	0,76	0,78	0,08	0,75	0,37	0,14	0,15	0,22
±	0,36	0,10	0,05	0,09	0,05	0,08	0,02	0,03	0,04
F6P	0,94	0,98	0,46	0,00	0,75	0,00	0,06	0,10	0,19
±	0,05	0,20	0,11	0,08	0,25	0,07	0,01	0,03	0,06
FBP	1,06	0,77	0,62	n.a.	0,47	1,16	0,32	0,59	0,39
±	0,13	0,07	0,13		0,11	0,20	0,03	0,06	0,09
DHAP	1,04	0,60	0,30	n.a.	2,95	2,02	0,49	0,34	0,50
±	0,57	0,14	0,17		0,5	0,4	0,11	0,02	0,03
GAP	n.a.	1,16	n.a.	n.a.	n.a.	1,62	0,36	0,26	0,31
±		0,07				0,16	0,01	0,04	0,06
PEP	0,27	n.a.	n.a.	0,77	1,62	0,59	0,53	0,33	0,37
±	0,12			0,24	0,38	0,14	0,06	0,01	0,04
Pyruvat	n.a.	n.a.	n.a.	0,83	0,61	2,68	0,50	0,57	0,39
±				0,29	0,16	0,98	0,04	0,04	0,01
AcCoA	1,07	0,93	0,79	0,13	0,82	1,63	0,05	0,07	0,08
±	0,09	0,10	0,02	0,08	0,10	0,40	0,03	0,01	0,05
AMP	n.a.	0,18	0,14	0,08	n.a.	n.a.	0,07	n.a.	n.a.
±		0,06	0,05	0,11			0,06		
ADP	0,87	0,23	0,19	0,20	0,33	n.a.	0,04	n.a.	n.a.
±	0,30	0,01	0,03	0,13	0,18		0,07		
ATP	0,76	0,51	0,43	0,04	1,82	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
±	0,17	0,04	0,06	0,10	0,54				
NAD	0,36	0,15	0,35	0,06	0,55	1,30	n.a.	n.a.	n.a.
±	0,02	0,11	0,11	0,09	0,20	0,26			
NADP	0,19	0,05	0,04	0,38	0,34	0,57	n.a.	n.a.	n.a.
±	0,12	0,03	0,03	0,08	0,22	0,48			
cAMP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,43	0,03	0,03	0,05
±	0,02	0,02	0,03	0,05	0,07	0,13	0,03	0,03	0,01
FAD	0,12	0,09	0,07	0,05	n.a.	0,24	0,04	0,03	0,06
±	0,00	0,00	0,00	0,02		0,03	0,01	0,01	0,01

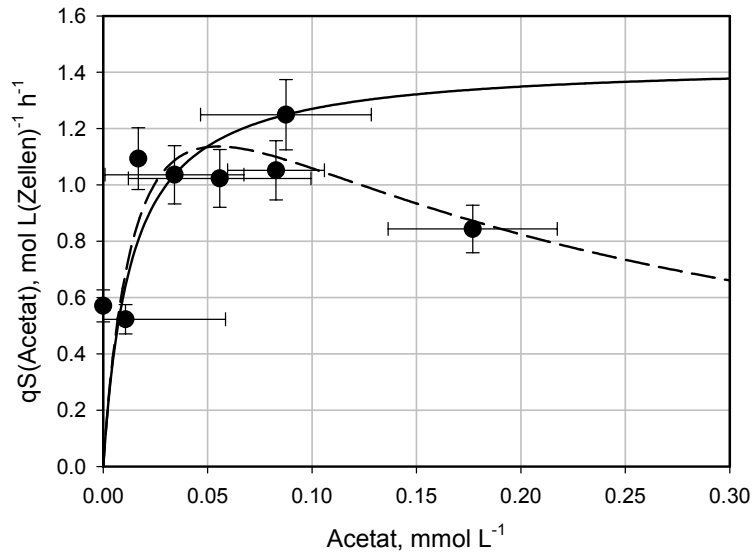
Experiment	4-1	4-2	4-3	5-1	5-2	5-3	6-1	6-2	6-3
	10 % Gluc. / 90 % Fruc.			90 % Gluc. / 10 % Ace.			90 % Gluc. / 10 % Ace.		
$\mu_m, h^{-1}$	0,144	0,185	0,227	0,148	0,190	0,230	0,290	0,270	0,255
G6P	0,47	0,45	0,26	0,49	0,96	0,88	1,37	0,43	0,36
±	0,05	0,06	0,01	0,13	0,04	0,28	0,23	0,09	0,18
F6P	0,38	0,77	0,73	0,62	0,55	1,48	0,85	1,26	1,12
±	0,08	0,08	0,05	0,07	0,10	0,25	0,18	0,14	0,32
FBP	0,30	0,33	0,15	0,90	1,78	1,24	0,98	1,31	1,06
±	0,01	0,05	0,01	0,21	0,09	0,20	0,04	0,08	0,20
DHAP	0,12	0,45	0,13	2,98	10,27	2,19	1,47	1,56	2,72
±	0,03	0,07	0,02	0,2	0,6	0,05	0,07	0,07	0,13
GAP	n.a.	n.a.	n.a.	3,03	1,97	n.a.	1,33	2,53	2,07
±				0,24	0,15	0,00	0,07	0,26	0,23
PEP	0,50	0,81	0,28	1,36	1,50	1,46	0,72	0,88	0,95
±	0,11	0,09	0,01	0,20	0,07	0,32	0,02	0,07	0,10
Pyruvat	0,56	0,33	0,32	3,65	4,16	5,41	1,27	1,63	2,66
±	0,06	0,06	0,00	0,18	0,42	0,68	0,05	0,09	0,37
AcCoA	0,13	0,09	0,07	0,00	0,00	n.a.	0,08	0,43	0,46
±	0,06	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,05
AMP	0,10	0,09	0,04	0,08	n.a.	n.a.	0,19	0,11	n.a.
±	0,09	0,06	0,01	0,15			0,15	0,14	0,00
ADP	1,35	1,46	n.a.	0,35	n.a.	n.a.	0,80	0,30	1,41
±	0,13	0,05		0,78			0,24	0,17	0,88
ATP	0,53	0,41	0,27	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,07	0,06
±	0,05	0,06	0,03					0,14	0,14
NAD	0,05	0,15	0,00	0,05	0,21	n.a.	0,01	n.a.	n.a.
±	0,03	0,01	0,03	0,60	0,64		0,01		
NADP	0,21	0,18	0,11	0,04	0,32	n.a.	0,04	0,02	0,24
±	0,01	0,02	0,01	0,11	0,08		0,03	0,04	0,11
cAMP	0,04	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
±	0,02								
FAD	0,05	0,04	0,03	0,01	0,10	n.a.	0,21	0,05	0,04
±	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02		0,21	0,02	0,02

5.4.5 *In-vivo* Enzymkinetiken der quasi-stationären Übergangszustände

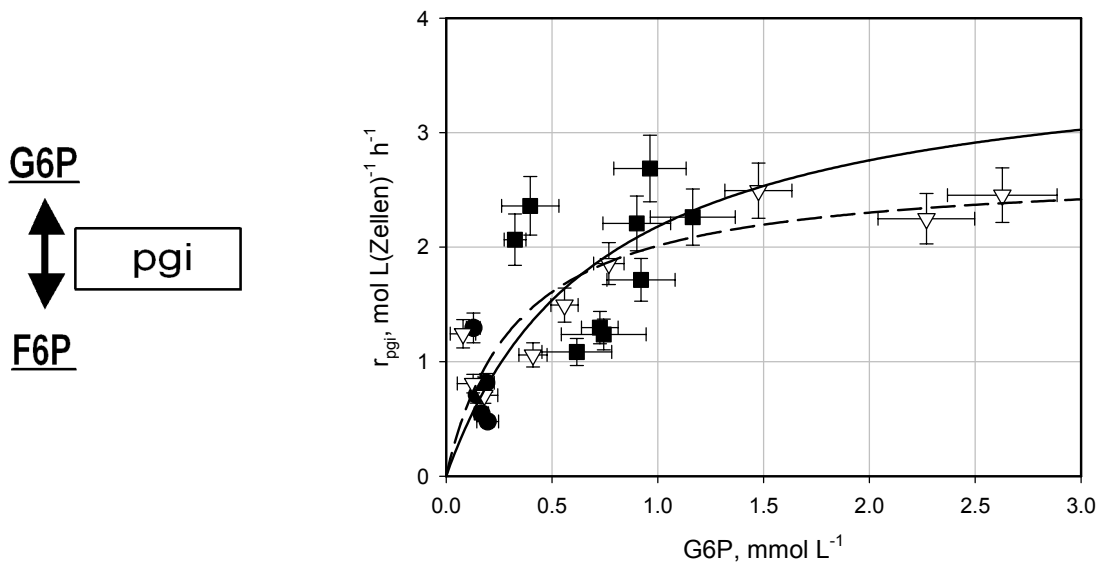
In Abbildung 5.61 bis Abbildung 5.74 werden die Ergebnisse der quasi-stationären Flussanalysen und die Ergebnisse der stationären Untersuchungen im Rahmen der Bestimmung von *in-vivo* Enzymkinetiken gegenübergestellt.



**Abbildung 5.61:** Substrataufnahmerate in Abhängigkeit von der extrazellulären Substratkonzentration. Die durchgezogene Linie stellt die Substrataufnahmerate der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 2,6 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,26 \text{ mmol L}^{-1}$ .



**Abbildung 5.62: Acetataufnahmerate in Abhängigkeit von der extrazellulären Acetatkonzentration. Die durchgezogene Linie stellt die Substrataufnahmerate der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Substratinhibierung mit den Parametern  $v_{\max} = 1,9 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_m = 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $K_i = 0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ .**



**Abbildung 5.63: Phosphoglucoseisomerase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Phosphoglucoseisomerase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Glucose-6-phosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 2,7 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,34 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).**

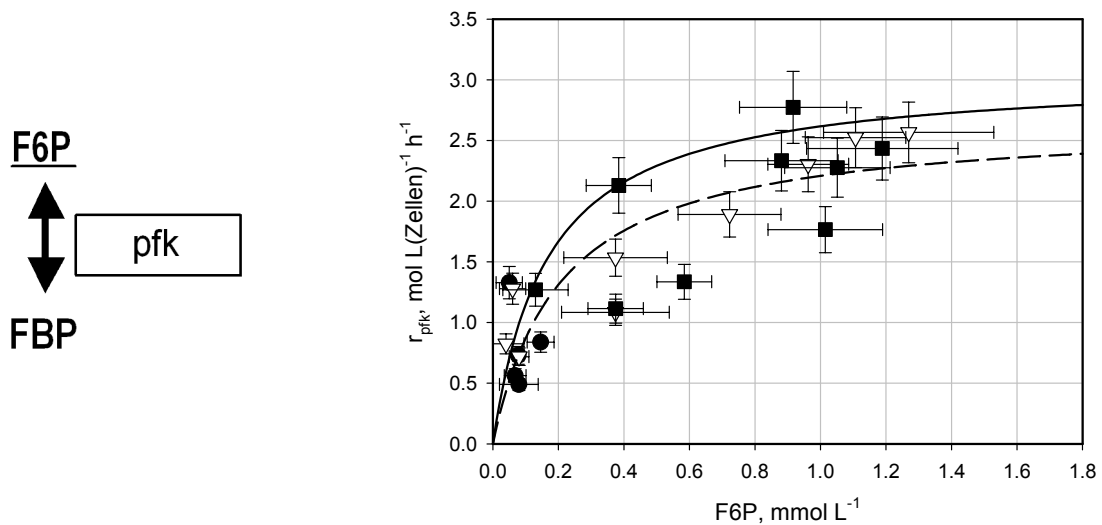


Abbildung 5.64: Phosphofruktokinase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Phosphofruktokinase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Fructose-6-phosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 2,7 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,21 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken (▽ - Untersuchungen mit Glucose als Substrat, ● - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat, ■ - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

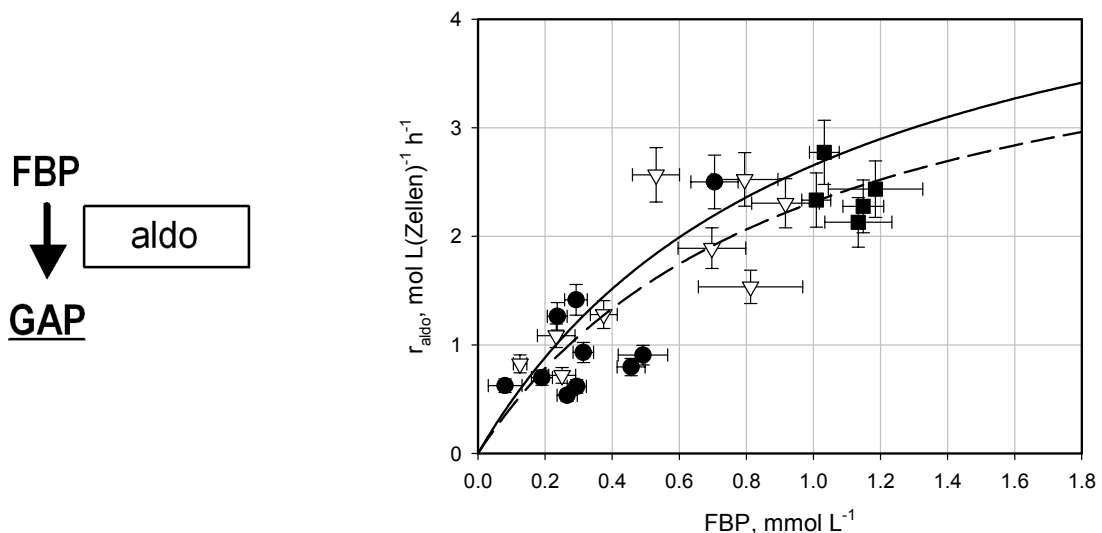
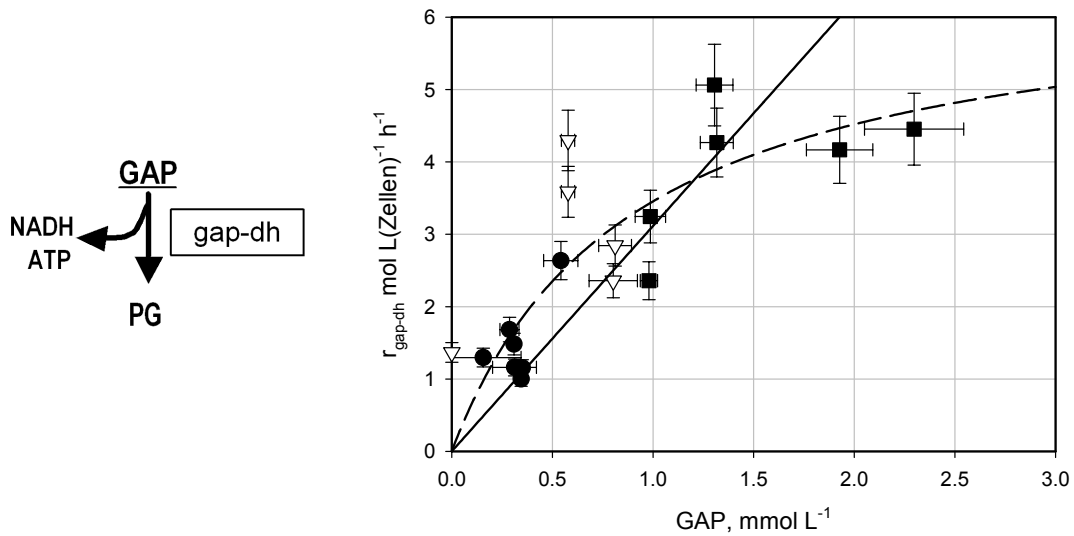
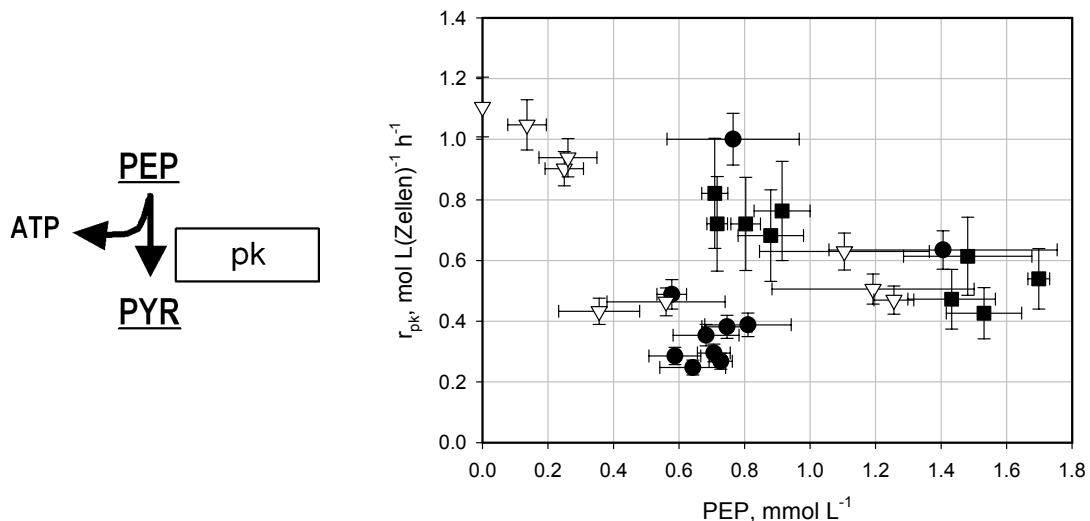


Abbildung 5.65: FBP-Aldolase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch FBP-Aldolase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Fructose-1,6-bisphosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 4,5 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,96 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken (▽ - Untersuchungen mit Glucose als Substrat, ● - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat, ■ - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



**Abbildung 5.66: GAP-Dehydrogenase.** Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch GAP-Dehydrogenase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Glycerinaldehydphosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 6,5 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,89 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



**Abbildung 5.67: Pyruvatkinase.** Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Pyruvatkinase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Phosphoenolpyruvat. Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

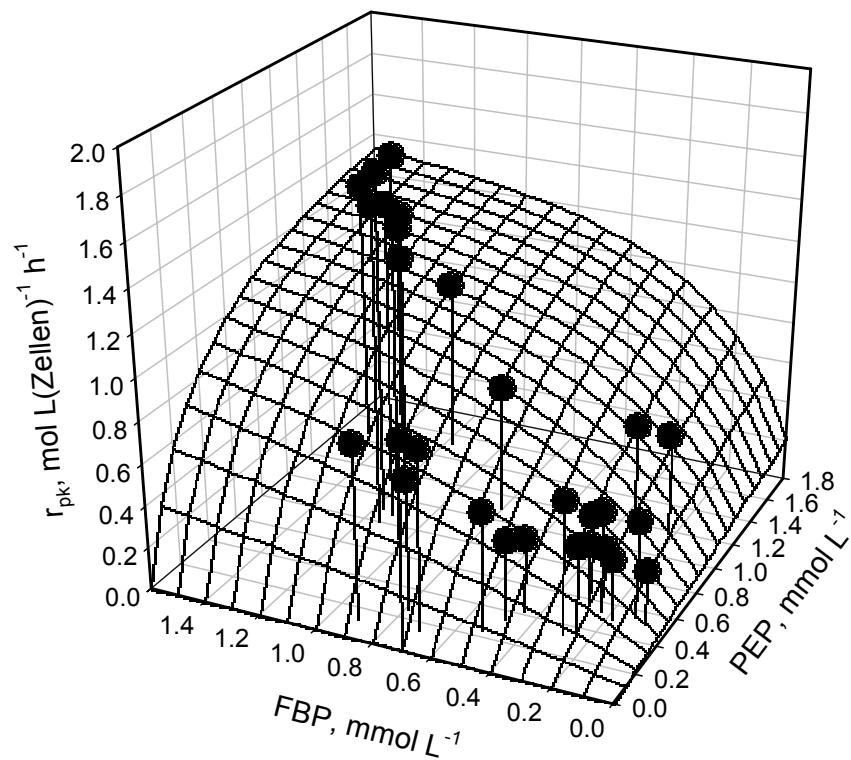


Abbildung 5.68: Reaktionsgeschwindigkeit, katalysiert durch Pyruvatkinase in Abhängigkeit der Konzentrationen an PEP und FBP. Die Fläche stellt die Regression nach Gleichung 3.44 mit den Parametern  $v_{\max} = 1,6 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_m = 12,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $K_3 = 60000 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $K_5 = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  dar.

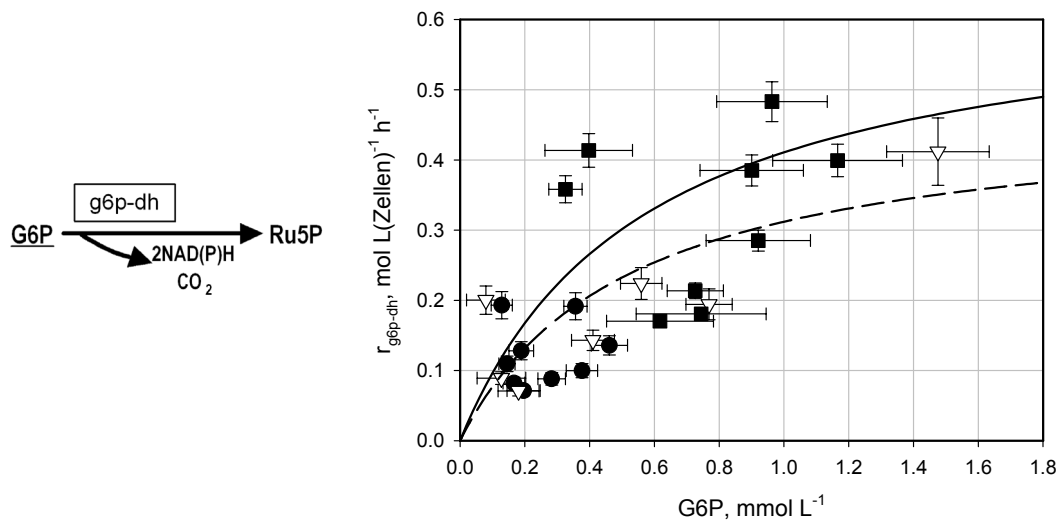


Abbildung 5.69: G6P-Dehydrogenase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch G6P-Dehydrogenase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Glucose-6-phosphat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 0,47 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,52 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken (▽ - Untersuchungen mit Glucose als Substrat, ● - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat, ■ - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

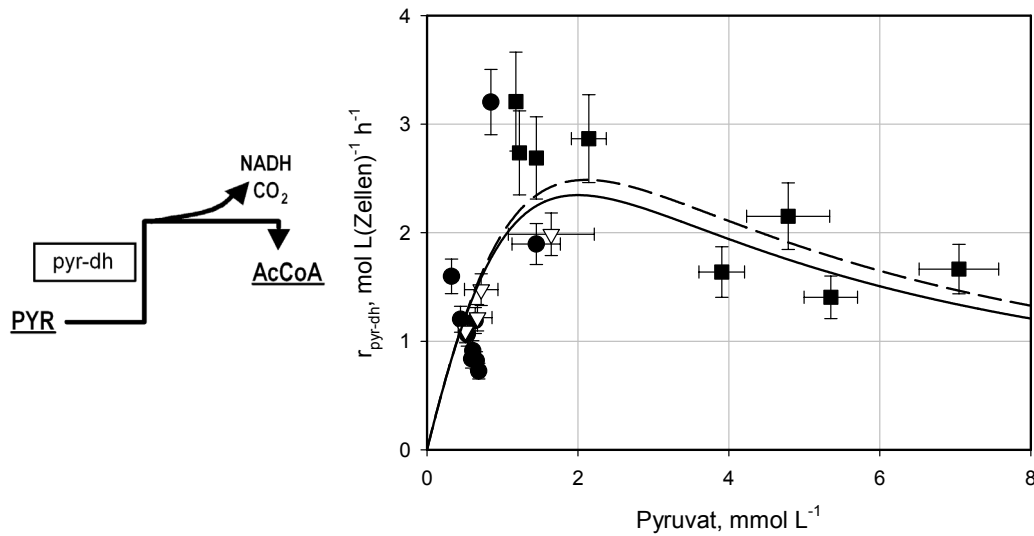


Abbildung 5.70: Pyruvatdehydrogenase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Pyruvatdehydrogenase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Pyruvat. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit Inhibition mit den Parametern  $v_{\text{max}} = 16,6 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_m = 6,0 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $K_i = 0,74 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

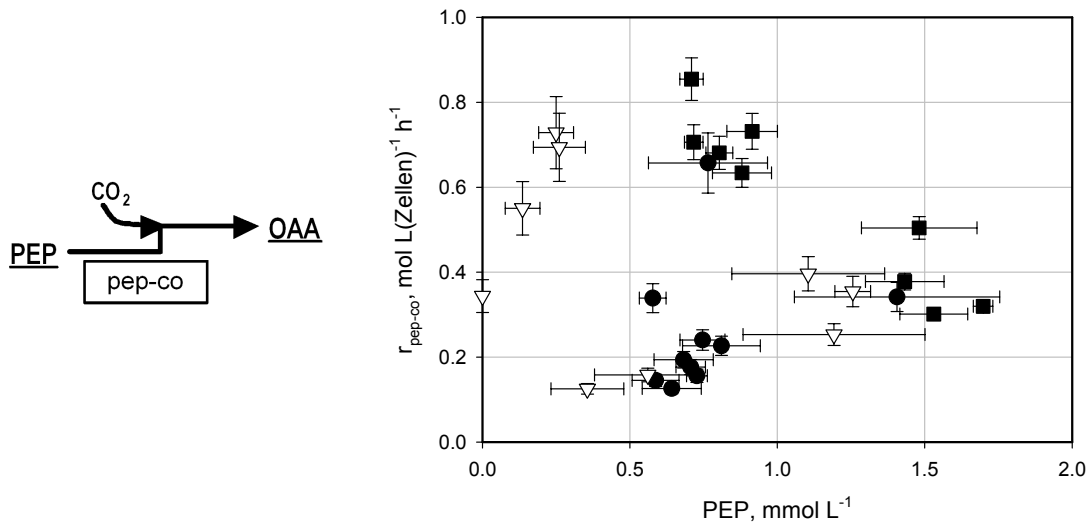


Abbildung 5.71: PEP-Carboxylase. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch PEP-Carboxylase, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Phosphoenolpyruvat. Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



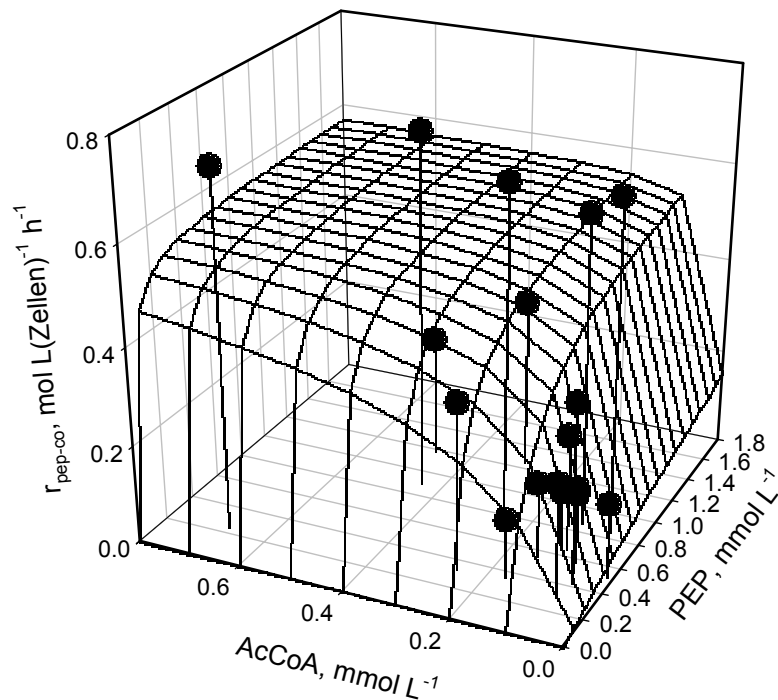


Abbildung 5.72: Reaktionsgeschwindigkeit, katalysiert durch PEP-Carboxylase in Abhängigkeit der Konzentrationen an PEP und AcCoA. Die Fläche stellt die Regression nach Gleichung 3.44 mit den Parametern  $v_{\max} = 0,6 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $K_m = 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $K_3 = 14,9 \text{ mmol L}^{-1}$  und  $K_5 = 0,004 \text{ mmol L}^{-1}$  dar.

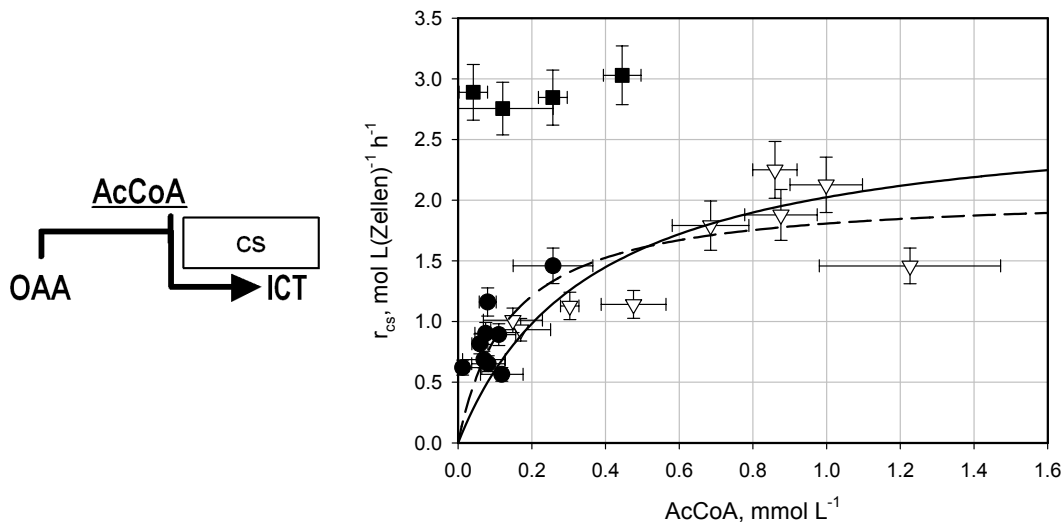
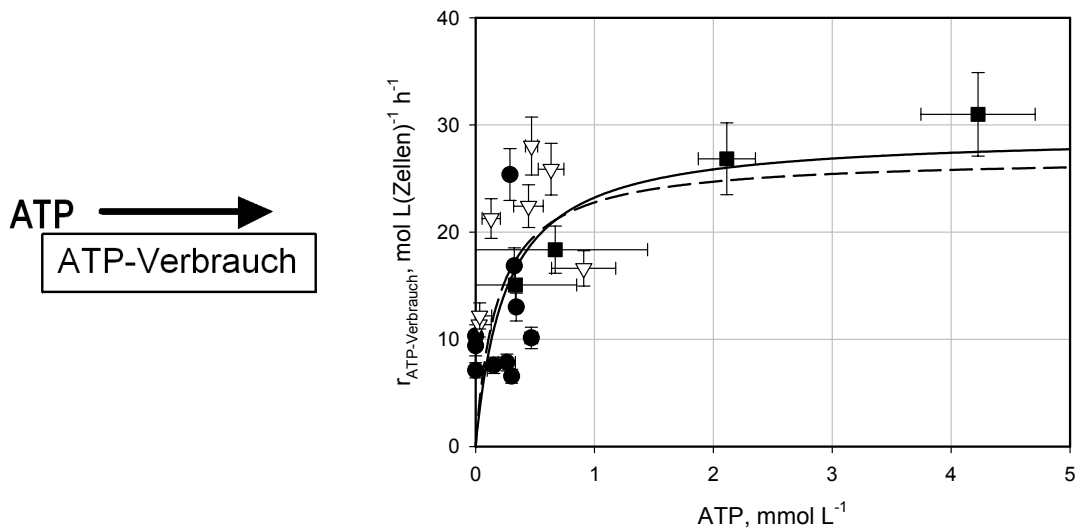
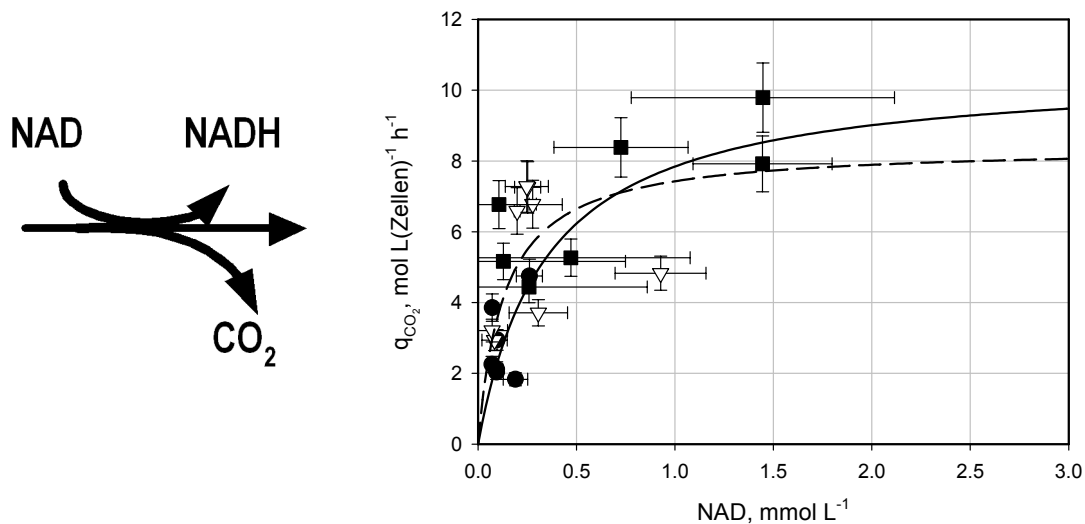


Abbildung 5.73: Citratsynthese. Intrazelluläre Flussrate, katalysiert durch Citratsynthese, in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an Acetyl CoA. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 2,1 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (Untersuchungen mit Acetat sind von der Regression ausgenommen). Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



**Abbildung 5.74: ATP-Verbrauch.** Intrazelluläre Flussrate des ATP-Verbrauchs in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an ATP. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 27,0 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,19 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).



**Abbildung 5.75: CO<sub>2</sub>-Bildung.** Intrazelluläre Flussrate der CO<sub>2</sub>-Bildung in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration an NAD. Die durchgezogene Linie stellt die Reaktionsgeschwindigkeit der nicht linearen Regression anhand der stationären Experimente dar, die gestrichelte Linie die nicht lineare Regression der quasi-stationären Übergangszustände nach einer Michaelis-Menten-Kinetik mit den Parametern  $v_{\max} = 8,4 \text{ mol L(Zellen)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $K_m = 0,13 \text{ mmol L}^{-1}$ , Symbole sind Messdaten mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

#### 5.4.6 Diskussion der quasi-stationären *in-vivo* Enzymkinetiken

Um zu beurteilen, ob auch die Untersuchung der quasi-stationären Übergangszustände zur Bestimmung von realistischen *in-vivo* Enzymkinetiken verwendet werden kann, werden in Tabelle 5.15 die durch nicht lineare Regression ermittelten kinetischen Parameter der einzelnen Enzyme gegenübergestellt. Aus der Gegenüberstellung der ermittelten kinetischen Parameter anhand der stationären Experimente und der quasi-stationären Zustände wird deutlich, dass die quasi-stationären Experimente im Rahmen der Messgenauigkeit bis auf gap-dh die gleichen Werte liefern. Die möglicherweise größere Streuung der Messdaten bei den quasi-stationären Untersuchungen wird durch eine höhere Datenmenge ausgeglichen, so dass insgesamt die Parameterbestimmung über die quasi-stationären Zustände mit kleinerem Messfehler erfolgt. Eine Gegenüberstellung der Enzyme pk, pyr-dh und pep-co erfolgt nicht, da die Parameterbestimmung sowohl bei den stationären Untersuchungen als auch bei den quasi-stationären Untersuchungen sehr hohe Standardabweichungen von bis zu 1000 % lieferten, und damit eine sinnvolle Vergleichsbasis fehlt.

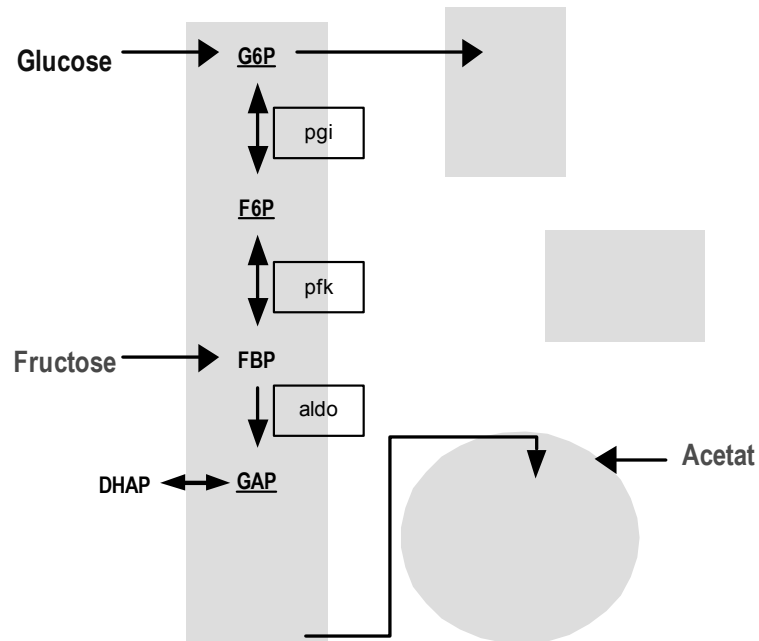
**Tabelle 5.15: Kinetische *in-vivo* Parameter der untersuchten Enzyme.**

Enzym	$V_{\max}$	$K_m$	$K_i$
	$\text{mol L}_{\text{Zellen}}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mmol L}^{-1}$	$\text{mmol L}^{-1}$
pts (Gluc. + Fruc.) (stationär)	$2,9 \pm 0,6$	$0,29 \pm 0,23$	
pts (Gluc. + Fruc.) (quasi- stationär)	$2,6 \pm 0,3$	$0,26 \pm 0,09$	
Acetataufnahme (stationär)	$1,4 \pm 1,4$	$0,01 \pm 0,01$	
Acetataufnahme (quasi- stationär)	$1,9 \pm 1,5$	$0,02 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,33$
pgi (stationär)	$3,8 \pm 2,0$	$0,72 \pm 0,78$	
pgi (quasi-stationär)	$2,7 \pm 0,4$	$0,34 \pm 0,13$	
pfk (stationär)	$3,1 \pm 0,5$	$0,17 \pm 0,07$	
pfk (quasi-stationär)	$2,7 \pm 0,3$	$0,21 \pm 0,07$	
aldo (stationär)	$4,6 \pm 2,0$	$0,82 \pm 0,64$	
aldo (quasi-stationär)	$4,5 \pm 1,2$	$0,96 \pm 0,45$	
gap-dh (stationär)	-	-	
gap-dh (quasi-stationär)	$6,5 \pm 1,5$	$0,89 \pm 0,42$	
g6p-dh (stationär)	$0,7 \pm 0,2$	$0,57 \pm 0,46$	
g6p-dh (quasi-stationär)	$0,5 \pm 0,1$	$0,52 \pm 0,24$	
cs (stationär)	$2,7 \pm 0,9$	$0,36 \pm 0,23$	
cs (quasi-stationär)	$2,1 \pm 0,2$	$0,14 \pm 0,04$	
ATP-Verbrauch (stationär)	$29,2 \pm 8,2$	$0,26 \pm 0,19$	
ATP-Verbrauch (quasi- stationär)	$27,0 \pm 5,4$	$0,19 \pm 0,13$	
CO <sub>2</sub> -Bildung (stationär)	$10,6 \pm 2,2$	$0,35 \pm 0,19$	
CO <sub>2</sub> -Bildung (quasi- stationär)	$8,4 \pm 1,6$	$0,13 \pm 0,08$	

## 5.5 Metabolische Kontrollanalyse

Um in einem metabolischen Netzwerk die regulierenden Schritte zu ermitteln, kann die metabolische Kontrollanalyse eingesetzt werden. Hierbei wird der relative Einfluss eines einzelnen Enzyms auf das Gesamtsystem ermittelt. Um den gesamten Zentralstoffwechsel mittels MCA auszuwerten, ist allerdings ein sehr komplexes System zu betrachten, da im Prinzip der infinitesimale Einfluss jeden Enzyms auf die Stoffflussverteilung des Gesamtsystems betrachtet werden muss. Um die prinzipielle Nutzung der hier ermittelten Enzymkinetiken für die metabolische Kontrollanalyse zu evaluieren, soll daher nur ein leicht zu beschreibender linearer Stoffwechselweg ohne

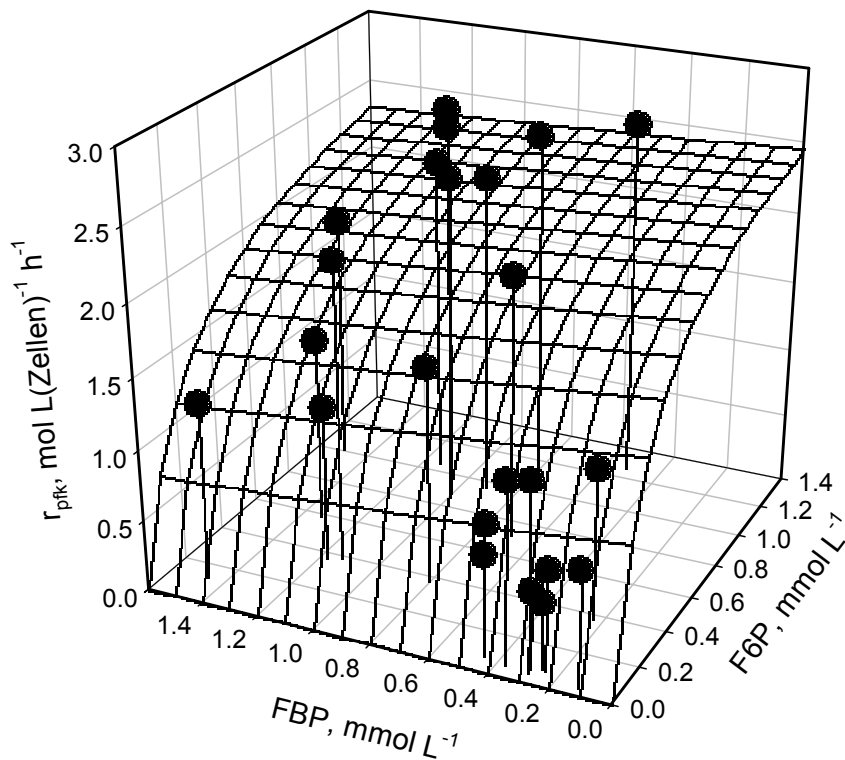
Verzweigungen beispielhaft analysiert werden. Hierzu wird die Reaktion von Glucose-6-Phosphat nach Glycerinaldehydphosphat / Dihydroxyacetonphosphat ausgewählt und die Flusskontrollkoeffizienten der Enzyme Phosphoglucoseisomerase, Phosphofruktokinase und Aldolase auf diesen Fluss ermittelt (siehe Abbildung 5.76).



**Abbildung 5.76:** Linearer Stoffwechselweg von G6P nach GAP / DHAP innerhalb der Glycolyse.

Für eine realistische metabolische Kontrollanalyse ist es von entscheidender Bedeutung, dass auch ein geringer inhibierender Einfluss der an einer Reaktion beteiligten Produkte in die Betrachtung einfließt. Eine geringe inhibierende Wirkung zieht einen kleinen Elastizitätskoeffizienten nach sich. In vielen Fällen korrespondiert eine kleine Elastizität mit einem großen Kontrollkoeffizienten (Fell, 1997). Daher wurden für die beteiligten Enzyme Parameteranpassungen durchgeführt, bei denen eine Produktinhibierung angenommen wurde. Die Parameteranpassung erfolgte nach Gleichung 3.42.

Die nichtlineare Regression zur Parameteranpassung ist am Beispiel der Phosphofruktokinase in Abbildung 5.77 dargestellt.



**Abbildung 5.77:** Reaktionsgeschwindigkeit, katalysiert durch Phosphofruktokinase, in Abhängigkeit von den intrazellulären Konzentrationen an F6P und FBP. Das Gitternetz stellt die nicht lineare Regression zur Parameteranpassung dar, FBP wird als inhibierendes Produkt angenommen, Parameter im Text.

Auf die gleiche Weise wurden die Parameter für die Enzyme Phosphoglucoseisomerase und Aldolase ermittelt. Da DHAP auf die Reaktion der Aldolase inhibierend wirkt, wurde hierbei für Aldolase DHAP als inhibierendes Produkt angenommen. Die für die drei Enzyme ermittelten Parameter sind in Tabelle 5.16 zusammengefasst.

**Tabelle 5.16: Enzymkinetische Parameter unter Berücksichtigung einer möglichen Produktinhibierung.**

Parameter	Ermittelter Wert
	mmol L <sup>-1</sup>
pgi: $K_{m,G6P}$	0,34
pgi: $K_{i,F6P}$	10
pfk: $K_{m,F6P}$	0,19
pfk: $K_{i,FBP}$	2,9
aldo: $K_{m,FBP}$	0,79
aldo: $K_{i,DHAP}$	8,9

Durch partielle Differenzierung können hieraus nach Gleichung 5.2 und Gleichung 5.3 die jeweiligen Elastizitäten der Enzyme berechnet werden.

**Gleichung 5.2:**

$$\varepsilon_S^E = \frac{\partial v}{\partial c_S} \cdot \frac{c_S}{v} = \frac{K_{m,S} \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right)}{K_{m,S} \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right) + c_S}$$

**Gleichung 5.3:**

$$\varepsilon_P^E = \frac{\partial v}{\partial c_P} \cdot \frac{c_P}{v} = \frac{-\frac{K_{m,S}}{K_{i,P}} \cdot c_P}{K_{m,S} \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right) + c_S}$$

Werden die intrazellulär vorliegenden Konzentrationen an G6P, F6P, FBP und DHAP, wie sie bei den unterschiedlichen stationären Zuständen vorliegen, den Berechnungen für die Elastizitäten zugrunde gelegt, so ergeben sich für die in Kapitel 5.3 beschriebenen Zustände die in Tabelle 5.17 dargestellten Elastizitäten. Die Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat werden für diese Betrachtung ausgenommen, da in diesem Fall die Flussraten über Phosphoglucoseisomerase, Phosphofruktokinase und Aldolase nicht identisch sind.

**Tabelle 5.17: Elastizitäten für Phosphoglucoseisomerase, Phosphofructokinase und Aldolase abhängig von Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat.**

Experiment	$\mu, \text{h}^{-1}$	$\varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{pgi}}, -$	$\varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{pfk}}, -$	$\varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{aldo}}, -$	$\varepsilon_{\text{FBP}}^{\text{pgi}}, -$	$\varepsilon_{\text{FBP}}^{\text{pfk}}, -$	$\varepsilon_{\text{FBP}}^{\text{aldo}}, -$
100 % Glucose							
1	0,125	-0,0052	0,7205	0,0000	0,0000	-0,0566	0,7714
2	0,250	-0,0049	0,7782	0,0000	0,0000	-0,0880	0,6904
3	0,400	-0,0232	0,1502	0,0000	0,0000	-0,0230	0,6441
90 % Glucose / 10 % Acetat							
8	0,125	-0,0040	0,6899	0,0000	0,0000	-0,2297	0,5150
9	0,250	-0,0193	0,4065	0,0000	0,0000	-0,1131	0,5022
10	0,300	-0,0234	0,2188	0,0000	0,0000	-0,0569	0,4784

Das Summationstheorem und das Konnektivitätstheorem ergeben für den Beispielstoffwechselweg das in Gleichung 5.4 dargestellte Gleichungssystem.

**Gleichung 5.4:**

$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{pgi}} & \varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{pfk}} & \varepsilon_{\text{F6P}}^{\text{aldo}} \\ \varepsilon_{\text{FBP}}^{\text{pgi}} & \varepsilon_{\text{FBP}}^{\text{pfk}} & \varepsilon_{\text{FBP}}^{\text{aldo}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_{\text{pgi}}^{\text{J}} \\ C_{\text{pfk}}^{\text{J}} \\ C_{\text{aldo}}^{\text{J}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Somit können für dieses einfach gewählte Beispiel die Flusskontrollkoeffizienten explizit durch Lösung des Gleichungssystems berechnet werden. Die sich hieraus ergebenden Kontrollkoeffizienten sind in Tabelle 5.18 zusammengefasst.



**Tabelle 5.18: Flusskontrollkoeffizienten der Enzyme Phosphoglucoseisomerase, Phosphofruktokinase und Aldolase.**

Experiment	$\mu, \text{h}^{-1}$	$C_{\text{pgi}}^J$	$C_{\text{pfk}}^J$	$C_{\text{aldo}}^J$
100 % Glucose				
1	0,125	99,23%	0,72%	0,05%
2	0,250	99,29%	0,63%	0,08%
3	0,400	86,20%	13,33%	0,48%
90 % Glucose / 10 % Acetat				
8	0,125	99,17%	0,57%	0,26%
9	0,250	94,51%	4,48%	1,01%
10	0,300	89,33%	9,54%	1,13%

Zur Beurteilung der berechneten Kontrollkoeffizienten soll zunächst geprüft werden, inwieweit die sehr einfache Beschreibung der im Beispielstoffwechsel vorliegenden Enzymkinetiken die Berechnung der Kontrollkoeffizienten beeinflusst. Hierfür sollen die aus den vereinfachten Enzymkinetiken ermittelten Kontrollkoeffizienten mit den aus einem komplexeren Modell zur Beschreibung der vorhandenen Kinetiken ermittelten Werten verglichen werden. Zum Vergleich werden anhand der von Chassagnole et al. (2002) beschriebenen Enzymkinetiken durch partielle Ableitung die jeweiligen Elastizitäten und daraus wie oben beschrieben die Flusskontrollkoeffizienten von Phosphoglucoseisomerase, Phosphofruktokinase und Aldolase berechnet. Die zugrundeliegenden Reaktionsraten für pgi und pfk finden sich in Kapitel 3.2.3, Aldolase wurde nach einer „ordered Uni-Bi-Kinetik“ (Gleichung 3.47) angepasst. Die ermittelten Elastizitäten finden sich in Anhang 9.6.

Die zur Berechnung benötigten Parameter, sowie die intrazellulären Konzentrationen werden für  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$  und  $20 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im Zulauf für eine Kultivierung von *Escherichia coli* K12 von Chassagnole et al. (2002) übernommen. Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 5.19 zusammengefasst. Zum Vergleich werden die Kontrollkoeffizienten der eigenen Kultivierung bei  $D = 0,125 \text{ h}^{-1}$  mit  $30 \text{ g L}^{-1}$  Glucose im Zulauf und die Kontrollkoeffizienten der eigenen Kultivierung mit eigener Parameteranpassung dargestellt.

**Tabelle 5.19: Vergleich von Kontrollkoeffizienten mit Literaturdaten.**

	$C_{pgi}^J$	$C_{pfk}^J$	$C_{aldo}^J$
Intrazelluläre Konzentrationen und kinetische Parameter aus Chassagnole et al., 2002	99,92%	0,08%	0,00%
Intrazelluläre Konzentrationen: eigene Messung, kinetische Parameter aus Chassagnole et al., 2002	99,64%	0,36%	0,00%
Intrazelluläre Konzentrationen und kinetische Parameter aus eigener Messung	99,23%	0,72%	0,05%

Durch den Vergleich wird deutlich, dass auch das in dieser Arbeit verwendete, stark vereinfachte kinetische Modell zur Ermittlung der Kontrollkoeffizienten geeignet ist, die Einflüsse der einzelnen Enzyme auf den Gesamtfluss zu beschreiben.

Für den linearen Beispielstoffwechsel hat das Enzym pgi den größten Einfluss auf den Stofffluss, die Enzyme pfk und Aldolase haben fast keinen Einfluss. Ein größerer Einfluss der Phosphofruktokinase ist nur bei höheren Durchflussraten ( $D = 0,4 \text{ h}^{-1}$ , 100 % Glucose und  $D = 0,3 \text{ h}^{-1}$ , 90 % Glucose / 10 % Acetat) festzustellen. Der Einfluss der Phosphofruktokinase steigt in diesen beiden Zuständen auf 13 % bzw. 10 % an.

Chassagnole et al. (2002) ermittelten zum Beispiel die Flusskontrollkoeffizienten der Enzyme des Zentralstoffwechsels von *Escherichia coli* auf die Substrataufnahme. In Bezug auf die Substrataufnahme sind die Kontrollkoeffizienten von pgi und aldo im Vergleich zu pfk gering. Ein Vergleich der hier ermittelten Kontrollkoeffizienten mit diesen Literaturdaten ist allerdings kaum möglich, da die hier ermittelten Flusskontrollkoeffizienten nur die Verhältnisse der drei betrachteten Enzyme untereinander auf einen „Ausschnitt“ der Glycolyse beschreiben. Wang und Hatzimanikatis (2006) zeigten für *Saccharomyces cerevisiae* dass im chemostatischen Betrieb der Einfluss von pgi, pfk und aldo auf den Fluss von pgi, pfk und aldo (im Vergleich zu allen anderen Kontrollkoeffizienten des Zentralstoffwechsels) sehr gering sind. Die prozentuale Verteilung der drei Enzyme zueinander ist aus der in der Veröffentlichung gewählten Darstellung nicht möglich.

Dass für pfk ein sehr geringer Kontrollkoeffizient in Bezug auf die Glycolyse ermittelt wurde, bestätigt experimentelle Untersuchungen, bei denen festgestellt wurde, dass

eine Überexprimierung von *pfk* in transgenen Kartoffelpflanzen keine signifikante Änderung des Flusses durch die Glycolyse hervorrief (Thomas et al., 1997).

## 5.6 Vor- und Nachteile der vorgestellten Methodik

Vorgestellt wurde eine Methode zur Ermittlung von *in-vivo* kinetischen Parametern von Enzymen durch Korrelation von intrazellulären Metabolitkonzentrationen und Stoffflüssen auf Basis von stationären und quasi-stationären Untersuchungen. Bei der dynamischen Methode zur Bestimmung von *in-vivo* Kinetiken wird der Stoffwechsel durch ein Pulsexperiment angeregt und die intrazellulären Konzentrationsverläufe verfolgt (beispielsweise Schmitz et al., 2002, Chassagnole et al., 2002). Durch Modellierung des Gesamtnetzwerks und der Konzentrationsverläufe werden die enzymkinetischen Parameter *aller* beteiligten Enzyme abgeschätzt. Gegenüber dieser dynamischen Methode weist die hier vorgestellte Methode einige Vorteile auf. Durch stationäre Untersuchungen können sehr definierte und damit gut reproduzierbare Zustände erreicht werden. Durch Korrelation der Substrate und Reaktionsgeschwindigkeiten können durch sehr einfache Modelle die kinetischen Parameter *einzelner* Enzyme ermittelt werden. Allerdings müssen bei der hier vorgestellten Methode viele zeitaufwändige Experimente durchgeführt werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass durch die Durchführung von quasi-stationären Experimenten, bei denen ausgehend von einem stationären Zustand die Durchflussrate kontinuierlich geändert wurde, vergleichbare Ergebnisse wie mit den stationären Experimenten erzielt werden können. Hiermit kann die Versuchszeit enorm verkürzt werden. Dies ist besonders für Reaktionen von Bedeutung, bei denen eine zweidimensionale Betrachtung zu keiner zufriedenstellenden Korrelation führt (beispielsweise die Enzyme *pk* und *pep-co*). Um für eine Modellierung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von mehreren Substraten und Effektoren zu einer zufriedenstellenden Parameteranpassung zu gelangen, ist ein ungleich größerer Messdatensatz erforderlich.

Ein weiterer Nachteil könnte darin zu sehen sein, dass die einfache Modellierung der Enzymkinetiken alle die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussenden Parameter in nur wenigen Parametern wie der Sättigungskonzentration zusammenfasst. Sollen die ermittelten Enzymkinetiken für die Berechnung von Elastizitäten als Basis für eine metabolische Kontrollanalyse herangezogen werden, so stellt dieser Sachverhalt allerdings keine Beeinträchtigung dar. Laut Fell (1997) ist es nämlich für die sinnvolle

Bestimmung von Elastizitäten nur wichtig, dass das zugrunde liegende Modell die Abhängigkeit eines Enzyms von den Metaboliten in physiologischen Konzentrationen beschreibt. Das heißt, es ist für die Bestimmung von Elastizitäten ausreichend, die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms in Abhängigkeit von einem Metabolit in einem globalen Parameter zu erfassen.

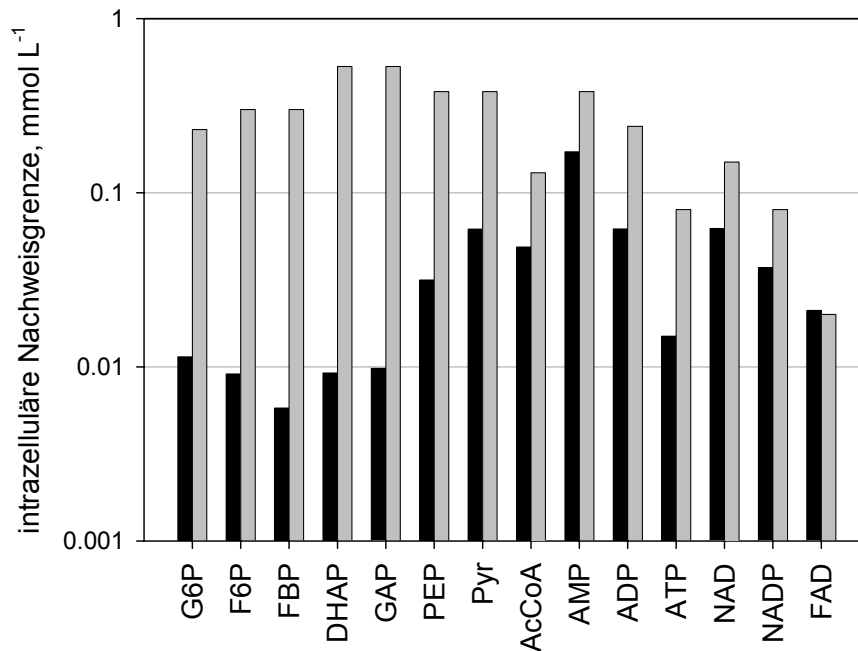
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorgestellte Methodik für die Bestimmung von *in-vivo* Enzymkinetiken durch einfache kinetische Modelle als Basis für eine datengetriebene metabolische Kontrollanalyse anhand von Elastizitäten gut eingesetzt werden kann. Allerdings muss für eine Analyse des gesamten Zentralstoffwechsels die analytische Methode auf weitere Metabolite ausgedehnt werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die *in-vivo* Bestimmung der kinetischen Parameter von Enzymen des Zentralstoffwechsels von *Escherichia coli*.

Zum Erreichen dieses Zieles wurde zunächst ein Probenentnahmesystem zur *in-situ* Probeninaktivierung konstruiert (Patentanmeldung DE 103 14 512.5). Mithilfe dieses Systems war es möglich, Proben aus einem Bioreaktor für die intrazelluläre Metabolitanalytik zugänglich zu machen. Durch direkte Temperaturmessungen im Probengefäß konnte gezeigt werden, dass die Probentemperatur unmittelbar beim Eintritt in das Probengefäß auf unter  $-20^{\circ}\text{C}$  herabgesenkt wird und damit eine Inaktivierung des Zellstoffwechsels sichergestellt werden kann.

Aus den in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden wurde die Extraktion mit heißem Wasser ( $95^{\circ}\text{C}$ ) ausgewählt und das Verfahren durch Einsatz eines geeigneten Puffers optimiert. Die Reproduzierbarkeit konnte durch diese Optimierung erhöht und damit die Nachweisgrenzen für die zellinternen Metaboliten herabgesetzt werden. Durch die optimierte Wasserextraktion konnten die intrazellulären Nachweisgrenzen der meisten Metabolite im Vergleich zu publizierten Daten (Buchholz et al., 2002), die unter gleichen Kultivierungsbedingungen mittels Perchlorsäureextraktion ermittelt wurden, um den Faktor 10 verringert werden (Abbildung 6.1).



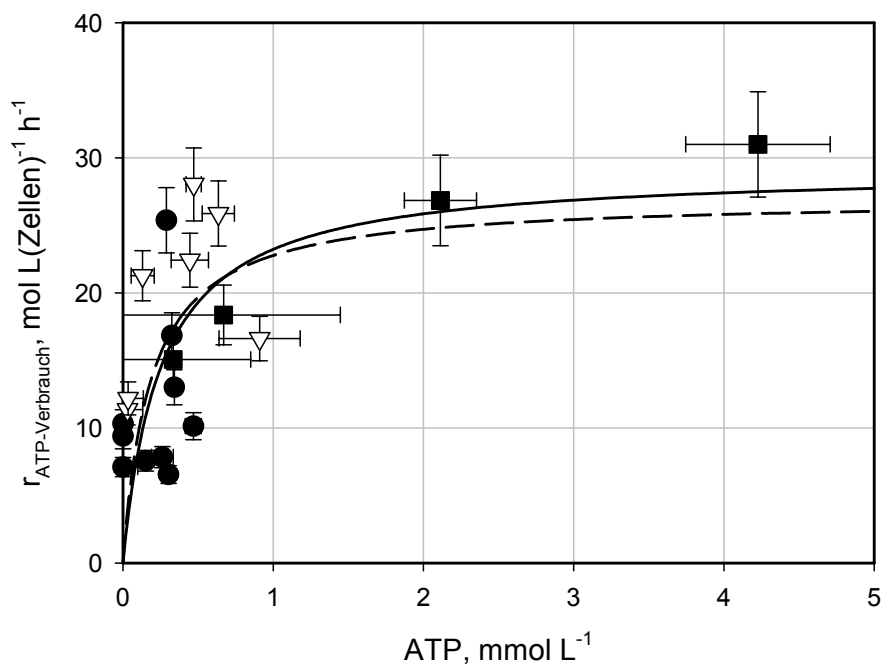
**Abbildung 6.1:** Intrazelluläre Nachweisgrenzen mit eigener Extraktionsmethode (schwarz) im Vergleich zu publizierten Daten (grau, Buchholz et al., 2002). Bestimmt wurden die Nachweisgrenzen für Zellextrakte von *E. coli* K12 aus glucoselimitierten kontinuierlichen Kultivierungen bei Biotrockenmassekonzentrationen von etwa 10 g L<sup>-1</sup>.

In kontinuierlichen Kultivierungen von *Escherichia coli* wurden für zehn unterschiedliche stationäre Zustände mit verschiedenen Wachstumsraten und unterschiedlichen Kohlenstoffquellen metabolische Analysen und stationäre Stoffflussanalysen durchgeführt. Durch Kombination der so ermittelten intrazellulären Stoffkonzentrationen und Flussraten konnten die kinetischen Parameter für neun Reaktionsschritte des Zentralstoffwechsels *in-vivo* charakterisiert werden. Zusätzlich wurden „quasi-stationäre“<sup>2</sup> Zustände induziert, indem die Durchflussrate der kontinuierlichen Kultivierung in einem linearen Profil zeitlich verändert wurde. Auch für diese Zustände wurden durch Korrelation von intrazellulären Metabolitkonzentrationen und Stoffflüssen Enzymkinetiken bestimmt, und die Nutzung dieser schnelleren Methode zur Bestimmung von *in-vivo* Enzymkinetiken evaluiert. Die metabolische Analyse der stationären Zustände und der quasi-stationären Zustände führte im Rahmen der Messgenauigkeit zu identischen enzymkinetischen Parametern. Für die Enzyme des Phosphotransferase-Systems,

<sup>2</sup> Zeitliche Änderungen von Konzentration und Stofffluss sind vernachlässigbar klein.

Phosphofruktokinase, GAP-Dehydrogenase und Citratsynthase konnte eine Übereinstimmung mit publizierten *in-vitro* Daten festgestellt werden, für die Enzyme Phosphoglucoseisomerase, FBP-Aldolase und G6P-Dehydrogenase waren die Unterschiede zu publizierten *in-vitro* Daten gravierend.

Sogar die schwer zugängliche Beschreibung des ATP-Verbrauchs (Fell, 1997) konnte modelliert werden (Abbildung 6.2).



**Abbildung 6.2:** ATP-Verbrauch in Abhängigkeit von der intrazellulären ATP-Konzentration. Durchgezogene Linie: nichtlineare Regression anhand der stationären Untersuchungen, gestrichelte Linie: nichtlineare Regression anhand der quasi-stationären Untersuchungen. Symbole sind Messwerte mit Fehlerbalken ( $\nabla$  - Untersuchungen mit Glucose als Substrat,  $\bullet$  - Untersuchungen mit Fructose und Glucose als Substrat,  $\blacksquare$  - Untersuchungen mit Acetat und Glucose als Substrat).

Anhand eines linearen Stoffwechselweges des Zentralstoffwechsels konnte die prinzipielle Nutzung der ermittelten Enzymkinetiken zur metabolischen Kontrollanalyse demonstriert werden. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Methodik kann somit als Basis für eine datengetriebene metabolische Kontrollanalyse genutzt werden.

**Ausblick**

In weitergehenden Untersuchungen sollten die vorgestellten Messdaten für eine metabolische Kontrollanalyse des gesamten Zentralstoffwechsels genutzt werden.

In weiteren Untersuchungen könnte die Annahme der konstanten Enzymmenge, die Basis für die Bestimmung der *in-vivo* Enzymkinetiken war, anhand von Messungen der einzelnen Enzymkonzentrationen geprüft werden.

Die metabolische Analyse könnte auf andere Metabolite des Zentralstoffwechsels, zum Beispiel auf Stoffwechselprodukte des TCA-Cyclus erweitert werden, so dass für weitere Enzyme *in-vivo* kinetische Parameter ermittelt werden können.

Zur Analyse von reversiblen Reaktionen könnte die metabolische Flussanalyse durch die Nutzung von  $^{13}\text{C}$  markierten Kohlenstoffquellen und Ermittlung der Isotopenverteilung der intrazellulären Metabolite erweitert werden.



## 7 Literaturverzeichnis

**Babul J**, Clifton D, Kretschmer M, Fraenkel DG (1993): Glucose Metabolism in *Escherichia coli* and the Effect of Increased Amount of Aldolase. *Biochemistry* 32, 4685-4692.

**Bailey JE** (1991): Toward a Science of Metabolic Engineering. *Science* 252, 1668-1675.

**Bakker BM**, Michels PAM, Opperdoes FR, Westerhoff HV (1997): Glycolysis in bloodstream from *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 3207-3215.

**Bergmeyer H.** (1985): Methods of Enzymatic Analysis. Third Edition, Verlag Chemie, Weinheim.

**Bhattacharya M**, Furman L, Ingram A, Kenneth WN, Conway T (1995): Single-Run Separation and Detection of Multiple Metabolic Intermediates by Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography and Application to Cell Pool Extracts Prepared from *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 232, 98-106.

**Bisswanger H** (1994): Enzymkinetik. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

**Boiteux A**, Markus M, Plesser T, Hess B, Malcovati M (1983): Analysis of progress curves. Interaction of pyruvate kinase from *Escherichia coli* with fructose 1,6-bisphosphate and calcium ions. *Biochemical Journal*, 211, 631-640.

**Buchholz A**, Takors R, Wandrey C (2001): Quantification of Intracellular Metabolites in *Escherichia coli* K12 Using Liquid Chromatographic-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Techniques. *Analytical Biochemistry* 295, 129-137.

**Buziol S**, Bashir K, Baumeister A, Claaßen W, Noisommit-Rizzi N, Mailinger W, Reuss M (2002): New Bioreactor-Coupled Rapid Stopped-Flow Sampling Technique for Measurements of Metabolite Dynamics on a Subsecond Time Scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(6), 632-636.

**Chassagnole C**, Noisommit-Rizzi N, Schmid JW, Mauch K, Reuss M (2002): Dynamic Modeling of the Central Carbon Metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 79(1), 53-73.

**Chmiel H** (2006): Bioprozesstechnik. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München.

**De Koning W** und van Dam K (1992): A Method for the Determination of Changes of Glycolytic Metabolites in Yeast on a Subsecond Time Scale Using Extraction at Neutral pH. *Analytical Biochemistry* 204, 118-123.

**Deville-Bonne D**, Laine R, Garcel JR (1991): Substrate antagonism in the kinetic mechanism of *Escherichia coli* phosphofruktokinase-1. *FEBS Letters* 290, 173-176.

**DIN 32633** (1998): Verfahren der Standardaddition. Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.

**Emmerling M**, Bailey JE, Sauer U (1999): Glucose Catabolism of *Escherichia coli* strains with Increased Activity and Altered Regulation of Key Glycolytic Enzymes. *Metabolic Engineering* 1, 117-127.

**Emmerling M**, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K, Bailey JE, Sauer U (2002): Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 184 (1), 152-164.

**Eyschen J**, Vitoux B, Marraud M, Cung MT, Branlant G (1999): Engineered glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds the anti conformation of NAD<sup>+</sup> nicotinamide but does not experience A-specific hydride transfer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 364, 219-227.

**Fell D** (1997): Understanding the Control of Metabolism, Portland Press, London and Miami.

**Festel G**, Knöll J, Götz H, Zinke H (2004): Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Chemie Ingenieur Technik* 76, 307-312.

**Fuhrman LK**, Wanken A, Nickerson KW, Conway T (1998): Rapid accumulation of intracellular 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate in an Entner-Doudoroff aldolase mutant results in bacteriostasis. *FEMS Microbiology Letters* 159, 261-266.

**Gancedo JM** und Gancedo C (1973): Concentrations of intermediary metabolites in yeast. *Biochemie* 55, 205-211.

**Garcia-Alles LF**, Zahn A, Erni B (2002): Sugar recognition by the glucose and mannose permeases of *Escherichia coli*. Steady-state kinetics and inhibition studies. *Biochemistry* 41, 10077-10086.

**Gonzales B**, Francois J, Renaud M (1997): A Rapid and Reliable Method for Metabolite Extraction in Yeast using Boiling Buffered Ethanol. *Yeast* 13, 1347-1356.

**Hajjaj H**, Blanc PJ, Goma G, François J (1998): Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters* 164, 195-200.

**Heinrich R**, Schuster S (1996): The Regulation of Cellular Systems, Chapman & Hall, New York.

**Hiller J** und Weuster-Botz D (2005): Schnelle *in-situ* Probenahme aus Bioreaktoren „mit einem Handgriff“. *Bioforum* 11/2005, 32-34.

**Hiller J**, Schwaiger B, Weuster-Botz D (2003): Probenahmesystem für fluide Proben. Patentanmeldung DE 103 14 512.5.

**Holms H** (2001): Flux Analysis: A Basic Tool of Microbial Physiology. *Advances in Microbial Physiology* 45, 271-340.

**Hoque MDA**, Siddiquee KAZ, Shimizu K (2004): Metabolic control analysis of gene-knockout *Escherichia coli* based on the inverse flux analysis with experimental verification. *Biochemical Engineering Journal* 19, 53-59.

**Kayser A** (1999): Stoffflüsse in *Escherichia coli* TG1 unter aeroben glucoselimitierten Bedingungen. *Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig*.

**Kayser A**, Weber J, Hecht V, Rinas U (2005): Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology* 151, 693-706.

- Lange HC**, Eman M, van Zuijlen G, Visser D, van Dam JC, Frank J, Teixeira de Mattos MJ, Heijnen J (2001): Improved Rapid Sampling for *in-vivo* Kinetics of Intracellular Metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 75(4), 406-415.
- Larsson G**, Törnkvist M (1996): Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation. *Journal of Biotechnology* 49, 69-82.
- Lee J**, Goel A, Ataa MM, Domach MM (2002): Flux Regulation Patterns and Energy Audit of *E. coli* B/r and K-12. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 258-267.
- Lowry OH**, Carter J, Ward JB, Glaser L (1971): The Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Level of Metabolic Intermediates in *Escherichia Coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 246(21), 6511-6521.
- Meyer H**, Leist C, Fiechter A (1984): Acetate Formation in Continuous Culture of *Escherichia coli* K12 D1 on Defined and Complex Media. *Journal of Biotechnology* 1, 355-358.
- Molgat GF**, Donald LJ, Duckworth HW (1992): Chimeric allosteric citrate synthases: construction and properties of citrate synthases containing domains from two different enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298, 238-246.
- Monod J** (1949): The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews of Microbiology* 3, 371-378.
- niaid** (2006): <http://www3.niaid.nih.gov/biodefense/public/images.htm>
- Niederberger P**, Prasad, R, Miozzari G, Kacser, H (1992): A strategy for increasing an *in vivo* flux by genetic manipulations. The tryptophan system of yeast. *Biochemical Journal* 287, 473-479.
- Nielsen J**, Villadsen J (1994): Bioreaction Engineering Principles. *Plenum Press, New York*, S.55-57.
- Paalme T**, Elken R, Kahru A, Vilu V, Vilu R (1997): The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 217-230.

- Peng L**, Arauzo-Bravo MJ, Shimizu K (2004): Metabolic flux analysis for a ppc mutant *Escherichia coli* based on <sup>13</sup>C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements. *FEMS Microbiology Letters* 235, 17-23.
- Pereira DS**, Donald LJ, Hesfield DJ, Duckworth HW (1994): Active site mutants of *Escherichia coli* citrate synthase. Effects of mutations on catalytic and allosteric properties. *Journal of Biological Chemistry* 269, 412-417.
- Plater AR**, Zgiby, SM, Thomson GJ, Qamar S, Wharton CW, Berry A (1999): Conserved residues in the mechanism of the *E. coli* Class II FBP-aldolase. *Journal of Molecular Biology* 285, 843-855.
- Postma PW**, Roseman S (1976): Bacterial Phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system. *Biochimica et Biophysica Acta* 457 (3-4), 213-257.
- Pramanik J**, Keasling JD (1997): Stoichiometric model of *E. coli* Metabolism: Incorporation of Growth-Rate Dependent Biomass Composition and Mechanistic Energy Requirements. *Biotechnology and Bioengineering* 56, 398-421.
- Sanwal BD** (1970): Regulatory Mechanisms Involving Nicotinamide Adenine Nucleotides As Allosteric Effectors. *Journal of Biological Chemistry* 245 (7), 1626-1631.
- Schuster S** (1999): Use and Limitations of Modular Metabolic Control Analysis in Medicine and Biotechnology. *Metabolic Engineering* 1, 232-242.
- Schäfer U**, Takors R, Weuster-Botz D (1999): Automated Sampling Device for Monitoring Intracellular Metabolite Dynamics. *Analytical Biochemistry* 270, 88-96.
- Schlegel HG** (1992): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart und New York.
- Schmitz M**, Hirsch E, Bongaerts J, Takors, R (2002): Pulse experiments as a prerequisite for the quantification of *in vivo* enzyme kinetics in aromatic amino acid pathway of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 18 (5), 935-941.
- Stephanopoulos G** (1999): Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering. *Metabolic Engineering* 1, 1-11.
- Stephanopoulos G**, Aristidou AA, Nielsen J (1998): Metabolic Engineering. Principles and Methodologies. Academic Press, San Diego.

- Takama M**, Nosoh Y (1980): Purification and some properties of 6-Phosphoglucose Isomerase from *Bacillus-Caldotenax*. *Journal of Biochemistry* 87 (6), 1821-1827.
- Theobald U**, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M (1993): *In Vivo* Analysis of Glucose-Induced Fast Changes in Yeast Adenine Nucleotide Pool Applying a Rapid Sampling Technique. *Analytical Biochemistry* 214, 31-37.
- Thomas S**, Mooney PJF, Burrell MM, Fell DA (1997): Metabolic Control Analysis of glycolysis in tuber tissue of potato (*Solanum tuberosum*): explanation for the low control coefficient of phosphofructokinase over respiratory flux. *Biochemical Journal* 322, 119-127.
- Thompson J**, Torchia DA (1984): Use of  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and  $^{14}\text{C}$  fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 158, 791-800.
- Tweeddale H**, Notley-McRobb L, Ferenci T (1998): Effect of Slow Growth on Metabolism of *Escherichia coli*, as Revealed by Global Metabolite Pool ("Metabolome") Analysis. *Journal of Bacteriology* 180 (19), 5109-5116.
- Valino JJ**, Stephanopoulos G (1990): Metabolic Flux Distributions in *Corynebacterium glutanicum* during Growth and Lysine Overproduction. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 633-646.
- Visser D**, van Zuylen GA, van Dam JC (2002): Rapid sampling for analysis of *in vivo* kinetics using the BioScope: A system for continuous-pulse experiments. *Biotechnology and Bioengineering* 79 (6), 674-681.
- Wang L**, Hatzimanikatis V (2006): Metabolic engineering under uncertainty-II: Analysis of yeast metabolism. *Metabolic Engineering* 8, 142-159.
- Weber J**, Kayser A, Rinas U (2005): Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. II. Dynamic response to famine and feast, activations of the methylglyoxal pathway and oscillatory behaviour. *Microbiology* 151, 707-716
- Westerhoff HV** (2001): The silicon cell, not dead but live! *Metabolic Engineering* 3 (3), 207-210.
- Weuster-Botz D**, de Graaf AA (1996): Reaction engineering methods to study intracellular metabolite concentrations. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 54, 75-108.

**Weuster-Botz D** (1997): Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Analytical Biochemistry* 246, 225-233.

**Yang YT**, Bennett GN, San KY (2001): The Effects of Feed and Intracellular Pyruvate Levels on the Redistribution of Metabolic Fluxes in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 3, 115-123.

**Yi J**, Nemeria N, McNally A, Jordan F (1996): Effect of Substitutions in the Tiamine Diphosphate-Magnesium Fold on the Activation of the Pyruvate Dehydrogenase Complex from *Escherichia coli* by Cofactors and Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 271 (52), 33192-33200.

**Zgiby SM**, Thomson GJ, Qamar S, Berry A (2000): Exploring substrate binding and discrimination in fructose 1,6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases. *European Journal of Biochemistry*, 267, 1858-1869.

**Zhao J**, Baba T, Mori H, Shimizu K (2004): Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. *Metabolic Engineering* 6, 164-174.

**Zheng RL**, Kemp RG (1995): Phosphofructo-1-kinase: role of charge neutralization in the active site. *Biochemical Biophysical Research Communications* 214, 765-770.





## 8 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 8.1: Enzyme.**

---

ak	Acetatkinase
aldo	Fructosebisphosphat-Aldolase
cs	Citrat-Synthase
eno	Enolase
g6p-dh	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
gap-dh	Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase
hk	Hexokinase
ict-dh	Isocitrat-Dehydrogenase
l-ldh	L-Lactat-Dehydrogenase
l-malat-dh	L-Malat-Dehydrogenase
pep-co	PEP-Carboxylase
pfk	6-Phosphofruktokinase
pgi	Phosphoglucoseisomerase
pk	Pyruvatkinase
pts	Phosphotransferase-System
pyr-dh	Pyruvatdehydrogenase
r5p-im	Ribose-5-phosphat-Isomerase
tim	Triosephosphat-Isomerase
tk	Transketolase

---

**Tabelle 8.2: Metabolite.**

---

2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
AcCoA	Acetyl-CoenzymA
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
FAD	Flavinadeninucleotid
FADH	Reduzierte Form des FAD
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
ICT	Isocitrat
NAD	Nicotinamadeninucleotid
NADP	Nicotinamadeninucleotid-Phosphat
OAA	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pyr	Pyruvat
SUC	Succinat
Succinyl-CoA	Succinyl-CoenzymA
R5P	Ribose-5-phosphat
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
X5P	Xylose-5-phosphat

---

**Tabelle 8.3: Symbole.**

---

BTM	Biotrockenmasse
C	Kontrollkoeffizient
c	Konzentration
CER	Kohlendioxidbildungsrate
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
C-Quellen	Kohlenstoffquellen
D	Durchflussrate
DIN	Deutsche Industrienorm
D <sub>m</sub>	gemittelte Durchflussrate
DSMZ	Deutsche Stammhaltung
E	Enzymkonzentration
EC	Energy Charge
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Elektrosprayionisation
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
I	Einheitsmatrix
j	Vektor der Stoffflüsse
J	Stofffluss
k	Geschwindigkeitskonstante
K <sub>i</sub>	Hemmkonstante
k <sub>L</sub> a	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante

L	Liter
LC	Flüssigchromatographie
LOD	„limit of detection“ (Nachweisgrenze)
m	Masse
mbar	Millibar
MCA	Metabolische Kontrollanalyse
MFA	Metabolische Flussanalyse
min	Minute
mL	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
N	stöchiometrische Matrix
n.a.	nicht analysiert
n.d.	nicht detektiert
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OD <sub>660</sub>	optische Dichte bei 660 nm
OTR	Sauerstoffübertragungsrate (oxygen transfer rate)
OUR	Sauerstoffaufnahme rate (oxygen uptake rate)
p	Partialdruck
P	Produktkonzentration
pO <sub>2</sub>	Sättigungskonzentration an O <sub>2</sub>
q	Spezifische Aufnahme rate

---

r	Reaktionsgeschwindigkeit
S	Substratkonzentration
TCA-Cyclus	Tricarbonsäure-Cyclus
TEA	Triethanolamin
v	Geschwindigkeit
V	Volumen
v/v	Volumen per Volumen
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
V <sub>P</sub>	Volumen des vermessenen Partikels
vvm	Volumen per Volumen und Minute
w/v	Gewicht per Volumen
Y	Ertragskoeffizient
$\hat{j}_m$	Vektor der tatsächlichen Raten
$\dot{V}$	Volumenstrom
$\theta$	Erwartungswertoperator
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate
$\mu_{\max}$	Maximale spezifische Wachstumsrate
$\tau$	Hydraulische Verweilzeit
$\varphi$	Spezifischer Widerstand
$\delta$	Messfehler der Raten

---

**Tabelle 8.4: Indizes.**

0	Zum Zeitpunkt t=0
aus	Am Ausgang
crit	kritisch
E	Enzym
i	Komponente i
I	Inhibitor
in	Am Eingang
J	Fluss
m	Maintenance
min	Minimal
opt	Optimum
P	Produkt
S	Substrat
t	Zum Zeitpunkt t
X	Biomasse

**Tabelle 8.5: Besonderheiten der verwendeten Einheiten.**

Einheit	Besonderheit
g, mg	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Masse üblicherweise die Einheit Gramm oder Milligramm verwendet.
h	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit in den Einheiten OUR, OTR, $\mu$ , q üblicherweise die Einheit Stunde anstelle von Sekunde verwendet.
L	In der biotechnologischen Fachliteratur wird die Einheit Liter mit großem L geschrieben, um Verwechslungen mit der Zahl 1 in manchen Schrifttypen zu vermeiden. Entsprechend Milliliter (mL), Mikroliter ( $\mu$ L). Die Angabe von Konzentrationen und Volumina erfolgt üblicherweise in Litern anstelle von Kubikmetern.
min	In der biotechnologischen Fachliteratur wird für die Bezeichnung einer Zeit gleichwertig die Einheit Minute oder Sekunde verwendet.

## 9 Anhang

### 9.1 Geräte und Chemikalien

#### 9.1.1 Geräte

##### **Labfors 7,5 L Klein-Fermenter-System, Infors, Einsbach**

5 L maximales Reaktionsvolumen, Wassertemperierung über Glasdoppelmantel, drei Sechsblasscheibenrührer, mechanische Gleitringdichtung, Obenantrieb, Schikanenkorb mit 4 Strömungsbrechern, Begasungsrohr mit 11 Löchern (0,4 mm Durchmesser) geregelte Begasung über Massendurchflussmesser, Reaktorgewicht über Waage erfassbar.

**Tabelle 9.1: Zubehör Klein-Fermenter-System Labfors.**

Software Iris-NT Pro Version 4.11	Infors, Einsbach
pH-Elektrode HA405-DPA-SC-S8	Mettler-Toledo, Giessen
pO <sub>2</sub> -Sensor InPro 6000	Mettler-Toledo, Giessen
Abgasanalytik EasyLine (O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> )	ABB-Frankfurt
Peristaltische Zulaufpumpe BVP Standard mit Pumpenkopf Masterflex Easy-Load MF 0313/738	Ismatec Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld
Peristaltische Magnesiumsulfat-Pumpe Reglo Analog MS-4/12 mit 2 Kanälen	Ismatec Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld
Peristaltische Ablaufpumpe 501 U	Watson-Marlow, Rommerskirchen
Zulauf-Waage GC35EDE-S	Sartorius, Göttingen
Dosiereinheit YFC 02 Z	Sartorius, Göttingen

**Tabelle 9.2: Allgemeine Laborgeräte.**


---

Analytische Waage	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer 10 mg-210 g	Ohaus, Gießen
Blutzuckermessgerät Accu-Chek	Roche Diagnostics, Mannheim
Einstrahlphotometer Spectronic Genesys 20	Thermo Electron, Dreieich
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenphotometer Fluostar Galaxy	BMG Labtechnologies, Offenburg
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD	Martin Christ GmbH, Osterode / Harz
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Kendro-Heraeus, Langenselbold
Mikrotiterplattenphotometer EL808	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott, Mainz
pH-Meter CG 843	Schott, Mainz
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Einsbach
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Zellzahlanalysator Multisizer II mit einer Glaskapillare mit 30 µm Durchmesser	Beckman Coulter

---



## 9.1.2 Chemikalien

**Tabelle 9.3: Chemikalien für die Standardaddition (Reinheit >99%).**

<b>Name</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
AcCoA	A2056	Sigma-Aldrich
ADP	A-2754	Sigma-Aldrich
AMP	A 1752	Sigma-Aldrich
ATP	A 2,620-9	Sigma-Aldrich
cAMP	01895	Fluka
DHAP	37440	Fluka
F6P	F 3627	Sigma-Aldrich
FAD	F-6625	Sigma-Aldrich
FBP	752-1	Sigma-Aldrich
G6P	G7879	Sigma-Aldrich
GAP	G5251	Sigma-Aldrich
NAD	127965	Roche-Diagnostics
NADH	107 735	Roche-Diagnostics
NADP	1.24541.0001	Roche-Diagnostics
PEP	P7252	Sigma-Aldrich
Pyr	P2256	Sigma-Aldrich

**Tabelle 9.4: Sonstige Chemikalien (wenn nicht anders vermerkt, Reinheit „per analysis“).**

<b>Name</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminiumchlorid-Hexahydrat	1010849029	Merck
Ammoniak in wässriger Lsg. (25%)	6774.2	Roth
Ammoniumacetat (99.999%)	372331	Sigma
Ammoniumchlorid	101143	Merck
Ammoniumsulfat	101217	Merck
Borsäure	100165	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	P741.1	Roth
Clerol FBA	-	Cognis
Cobaltchlorid-Hexahydrat	109986	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	P749.2	Roth
EDTA	E 5513	Sigma
Eisensulfat-Hexahydrat	103965	Merck
Ethanol	100983	Merck
Fructose	4981.2	Roth
Glucose-Monohydrat	108342	Merck
Glycerin	104091	Merck
Hefeextrakt	111926	Merck
Helium 6.0	2L	Linde
HEPES	117839	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	3907	Roth
Kaliumhydroxid	814353	Merck
Kupferchlorid-Dihydrat	102790	Merck
Magnesiumchlorid	814733	Merck
Magnesiumsulfat	105886	Merck
Mangansulfat-Monohydrat	105941	Merck
Methanol	106008	Merck
Methanol (HPLC grade)	7342.1	Roth
NADH	10128015001	Roche
NADP	10128040001	Roche
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	106370	Merck
Natriumacetat	116100	Merck

---

Natriumchlorid	P029	Roth
Natriumhydroxid	106482	Merck
Natriummolybdat-Dihydrat	105621	Merck
Pepton aus Casein	102239	Merck
Perchlorsäure (70%)	244252	Sigma
Triethanolamin	T1377	Sigma
Tris-HCl	9090	Roth
Zinksulfat-Heptahydrat	108883	Merck

---

## 9.2 Analytische Methoden

### 9.2.1 Enzymatischer Nachweis von Glucose und Fructose

D-Glucose/D-Fructose: Modifiziertes Protokoll 1:20 basierend auf Boehringer Mannheim/R-Biopharm Best. Nr. 10139106035.

Herstellung der Lösungen:

- Flasche 1 mit 27 mL bidest. Wasser lösen → Lösung 1 (L1)
- Flasche 2: Suspension 2 1:10 verdünnen → Suspension 2\*
- Flasche 3: Suspension 3 1:10 verdünnen → Suspension 3\*

Stabilität der Reagenzien:

- Lösung 1 ist bei 4°C 4 Wochen und bei -20°C 2 Monate haltbar.
- Suspension 2 und 3 bei 4°C stabil (s. Packungsetikett).

**Tabelle 9.5: Pipettierschema Glucose- und Fructosenachweis.**

Lösung	Volumen, µL	Messung (340 nm)
Lösung 1 (TEA, NADP, ATP, MgSO <sub>4</sub> )	60	
Leerwert / Standard / Probe	90	Nach ca. 3 min E <sub>1</sub>
Suspension 2 (HK, G6P-DH)	10	Nach ca. 15 min E <sub>2</sub>
Suspension 3 (PGI)	10	Nach ca. 15 min E <sub>3</sub>

Extinktionsdifferenzen berechnen sich wie folgt:

$$dE_{\text{Glucose}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$dE_{\text{Fructose}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

Mit Hilfe der mitgelieferten Glucose Standardlösung (0,5 g L<sup>-1</sup>) und einer selbst erstellten Fructose Standardlösung (z. B. 5 g L<sup>-1</sup>) wird eine Kalibrierkurve von 0,5 bis 50 mg L<sup>-1</sup> aufgezeichnet. Hierbei ist zu beachten, dass die Fructose-Lösung nicht dauerhaft stabil ist.

### 9.2.2 Enzymatischer Nachweis von Acetat

Acetat: Modifiziertes Protokoll 1:20 basierend auf Boehringer Mannheim/R-Biopharm Best. Nr. 10148261035.

Herstellung der Lösungen:

- Lösung der Flasche 1 unverdünnt verwenden → Lösung 1
- Flasche 2 mit 7 mL bidest. Wasser lösen → Lösung 2
- Flasche 3: Enzym-Suspension 1:50 verdünnen → Enzym 3\*
- Flasche 4 mit 6,25 mL bidest. Wasser lösen → Enzym 4\*

Stabilität der Reagenzien:

- Lösung 2 ist bei 4°C für 4 Wochen und bei -20°C für 2 Monate haltbar.
- Enzymlösung 4 ist bei 4°C 5 Tage haltbar.

**Tabelle 9.6: Pipettierschema Acetatnachweis.**

Lösung	Volumen, µL	Messung (340 nm)
Lösung 1 (TEA, L-Apfelsäure, MgCl)	50	
Lösung 2 (ADP, CoA, NAD)	10	
Leerwert / Standard / Probe	50	Nach ca. 3 min E <sub>0</sub>
Suspension 3 (L-Malat-DH, Citrat-Synthase)	25	Nach ca. 3 min E <sub>1</sub> .
Suspension 4 (AcCoA-Synthase)	25	Nach ca. 15 min E <sub>2</sub> :  Bestimmung der Acetatkonzentration.

Extinktionsdifferenzen berechnen sich wie folgt:

$$dE_{Ac} = \left( (E_2 - E_0) - \frac{(E_1 - E_0)^2}{E_2 - E_0} \right)_{\text{Probe}} - \left( (E_2 - E_0) - \frac{(E_1 - E_0)^2}{E_2 - E_0} \right)_{\text{Leerwert}}$$

Mit Hilfe der mitgelieferten Acetat Standardlösung (0,149 g L<sup>-1</sup>) wird eine Kalibrierkurve von 0,3 bis 29,8 mg L<sup>-1</sup> aufgezeichnet.

### 9.2.3 Enzymatischer Nachweis von G6P und F6P

für Konzentrationen zwischen 25 und 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Chemikalien (ausreichend für eine 96-Well-Platte):

- a. TEA-Puffer ( $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ ) +  $\text{MgCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), pH=7,6 (ewig haltbar)
  - 32,5 g Triethanolamin Hydrochlorid
  - ca. 40 mL NaOH ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ )
  - 6,5 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{*H}_2\text{O}$
  - 1 g  $\text{MgCl}_2\text{*6H}_2\text{O}$
 in 250 mL Wasser
- b. NADP-Lösung (ca.  $3500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (bei  $0\text{-}4^\circ\text{C}$  ca. 3 Wochen haltbar)
  - 27,5 mg NADP- $\text{Na}_2$ -Salz
 in 10 mL TEA-Puffer
- c. Enzymlösungen (bei  $0\text{-}4^\circ\text{C}$  mehrere Wochen haltbar)
  - G6P-DH (No. 127 655 (Roche), ca.  $350 \text{ U mg}^{-1}$   $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 1:10 verdünnen:  
100  $\mu\text{L}$  Enzym + 900  $\mu\text{L}$  TEA-Puffer
  - PGI (No. 128 139 (Roche), ca.  $350 \text{ U mg}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 1:10 verdünnen:  
100  $\mu\text{L}$  Enzym + 900  $\mu\text{L}$  TEA-Puffer

Zur Kalibrierung Standardlösungen von 25 bis  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  ansetzen.

**Tabelle 9.7: Pipettierschema G6P- und F6P-Nachweis.**

Lösung	Volumen, $\mu\text{L}$	Messung (340 nm)
Lösung 1 (TEA, EDTA, NADP, MgCl)	80	
Leerwert / Standard / Probe	200	Nach ca. 3 min $E_1$
Suspension 2 (G6P-DH)	10	Nach ca. 15 min $E_2$ : Bestimmung der G6P-Konzentration.
Suspension 3 (PGI)	10	Nach ca. 15 min $E_3$ : Bestimmung der F6P-Konzentration.

Auswertung:

$$\Delta E_{\text{G6P}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$\Delta E_{\text{F6P}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

### 9.2.4 Enzymatischer Nachweis von DHAP, GAP, FBP

für Konzentrationen zwischen 50 und 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Chemikalien (ausreichend für eine 96-Well-Platte):

- a. TEA-Puffer (0,7 mol  $\text{L}^{-1}$ ), pH=7,6 (ewig haltbar)
  - 32,5 g Triethanolamin Hydrochlorid
  - 40 mL NaOH (2 mol  $\text{L}^{-1}$ )
  - 6,5 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
 in 250 mL Wasser
- b. NADH-Lösung (ca. 1,5 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) (bei 0-4°C 2-3 Wochen haltbar)
  - 10,6 mg NADH-Na-Salz
 in 10 mL TEA-Puffer
- c. Enzymlösungen (bei 0-4°C mehrere Wochen haltbar) Verdünnung mit TEA
  - GDH (No. 127 752 (Roche), ca. 170 U  $\text{mg}^{-1}$ , 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) 1:10
  - TIM (No. 109 762 (Roche), ca. 5000 U  $\text{mg}^{-1}$ , 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) 1:10
  - Aldolase (No. 102 652 (Roche), ca. 9 U  $\text{mg}^{-1}$ , 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) 1:5

Zur Kalibrierung Standardlösungen von 25 bis 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ansetzen.

**Tabelle 9.8: Pipettierschema DHAP-, GAP- und FBP-Nachweis.**

Lösung	Volumen, $\mu\text{L}$	Messung (340 nm)
Lösung 1 (TEA, EDTA, NADH)	80	
Leerwert / Standard / Probe	200	Nach ca. 3 min $E_1$
Suspension 2 (GDH)	10	Nach ca. 15 min $E_2$ : Bestimmung der DHAP- Konzentration.
Suspension 3 (TIM)	10	Nach ca. 15 min $E_3$ : Bestimmung der GAP- Konzentration.
Suspension 3 (Aldolase)	10	Nach ca. 15 min $E_4$ : Bestimmung der FBP- Konzentration.

Auswertung:

$$\Delta E_{\text{DHAP}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$\Delta E_{\text{GAP}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

$$\Delta E_{\text{FBP}} = (E_4 - E_3)_{\text{Probe}} - (E_4 - E_3)_{\text{Leerwert}}$$

### 9.2.5 Enzymatischer Nachweis von PEP und Pyruvat

für Konzentrationen bis  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$

Chemikalien (ausreichend für eine 96-Well-Platte):

- a. TEA-Puffer ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH=7,6 (ewig haltbar)
  - 92,9 g Triethanolamin Hydrochlorid
  - 15,1 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
  - mit NaOH ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ) bis pH=7,6
 in 1 L Wasser
- b. NADH-Lösung (ca.  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (bei  $0-4^\circ\text{C}$  ca. 3 Wochen haltbar)
  - 7,1 mg NADH-Na-Salz
 in 10 mL TEA-Puffer
- c. Salzlösung
  - 18,2 g  $\text{MgSO}_4$ , 53,0 g KCl, 3,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
 in 1 L Wasser
- d. ADP-Lösung (ca.  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ )
  - 42,6 mg ADP
 in 10 mL TEA Puffer
- e. Enzymlösungen (bei  $0-4^\circ\text{C}$  mehrere Wochen haltbar), Verdünnung in TEA
  - L-LDH (No. 127 230 (Roche),  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 1:100
  - PK (No. 128155 (Roche), ca.  $200 \text{ U mg}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) 1:10

Zur Kalibrierung Standardlösungen von 0 bis  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$  ansetzen.

**Tabelle 9.9: Pipettierschema Pyruvat- und PEP-Nachweis.**

Lösung	Volumen, $\mu\text{L}$	Messung (340 nm)
NADH-Lösung	140	
Salzlösung	15	
ADP-Lösung	5	
Leerwert / Standard / Probe	125	Nach ca. 3 min $E_1$
Suspension 2 (L-LDH)	8,5	Nach ca. 15 min $E_2$ : Bestimmung der Pyruvatkonzentration.
Suspension 3 (PK)	10	Nach ca. 15 min $E_3$ : Bestimmung der PEP- Konzentration.

Auswertung:  $\Delta E_{\text{Pyr}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$

$\Delta E_{\text{PEP}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$



## 9.2.6 Flüssigchromatographischer Nachweis mit Massenspektrometer

**Tabelle 9.10: LC-MS-System.**

Software Xcalibur 1.2	Thermo Finnigan, Dreieich
Automatischer Probengeber AS 1000	Thermo Spectronic, Dreieich
Quarternäre HPLC-Pumpe P1100	Thermo Spectronic, Dreieich
Entgaser D 1100	Thermo Spectronic, Dreieich
Diodenarray-Detektor UV 1000	Thermo Spectronic, Dreieich
ESI Massenspektrometer LCQ-Advantage	Thermo Spectronic, Dreieich
HPLC-Säule Aquasil 250 x 4.9	Thermo Hypersil
Stickstoffgenerator ESP 2	DWT, Essen

**Tabelle 9.11: Einstellungen des Ionendetektionssystems.**

Capillary Temp (C):	350.00
APCI Vaporizer Temp (C):	0.00
AGC:	On
AGC Off Ion Time (ms):	5.000
Sheath Gas Flow (l):	60.00
Aux Gas Flow (l):	20.00
Source Type:	ESI
Source Voltage (kV):	2.50
Source Current (uA):	80.00
Capillary Voltage (V):	-21.00
Tube Lens Offset (V):	0.00
Multipole RF Amplifier (Vp-p):	400.00
Multipole 1 Offset (V):	3.00
Multipole 2 Offset (V):	6.50
InterMultipole Lens Voltage (V):	14.00
Trap DC Offset Voltage (V):	10.00
Zoom Micro Scans:	5
Zoom AGC Target:	10000000.00
Zoom Max Ion Time (ms):	50.00
Full Micro Scans:	7
Full AGC Target:	10000000.00
Full Max Ion Time (ms):	200.00
SIM Micro Scans:	5
SIM AGC Target:	20000000.00
SIM Max Ion Time (ms):	200.00
MSn Micro Scans:	3
MSn AGC Target:	20000000.00
MSn Max Ion Time (ms):	200.00

### 9.3 Konstruktionszeichnungen Probenentnahmesystem

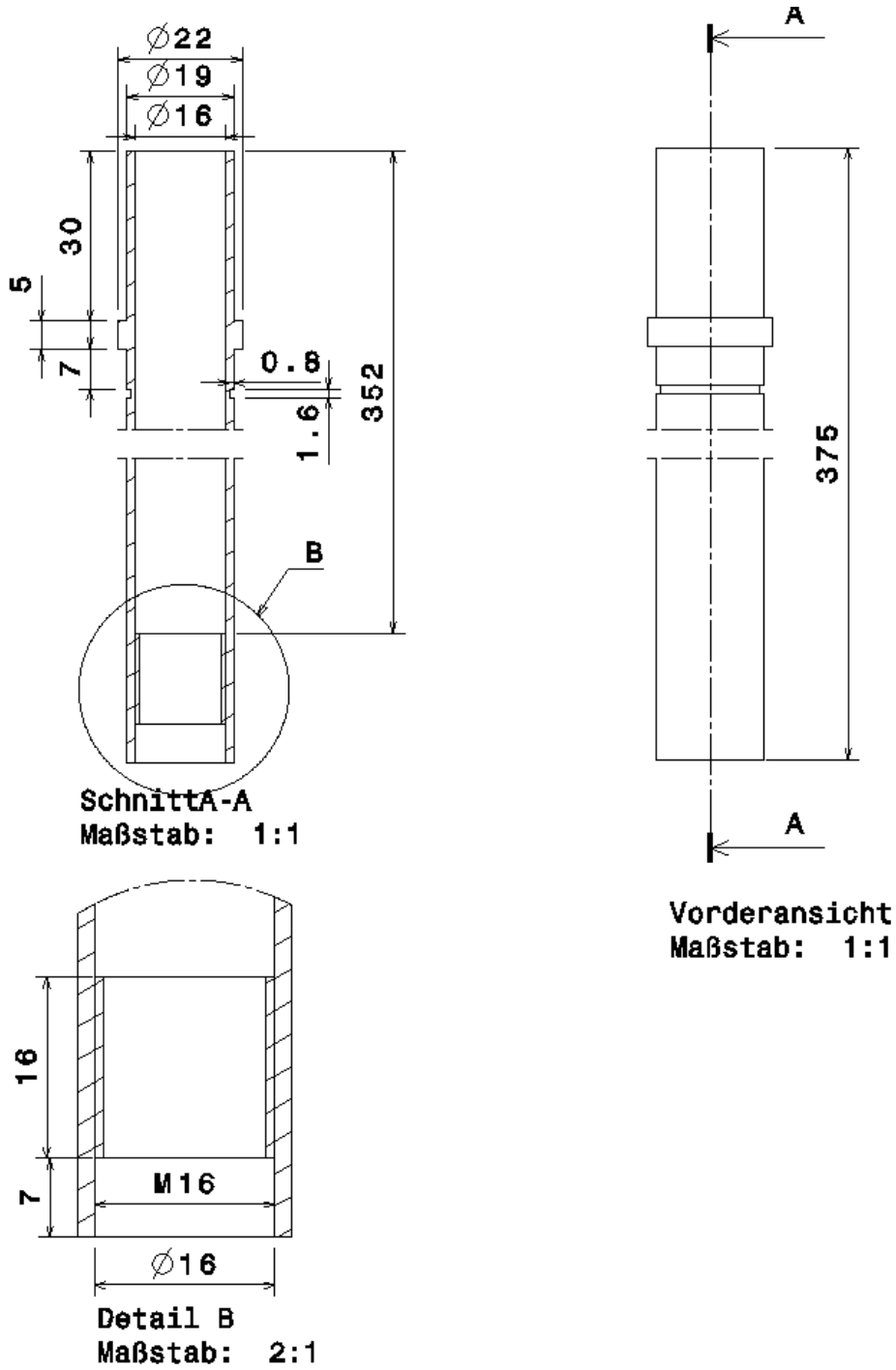
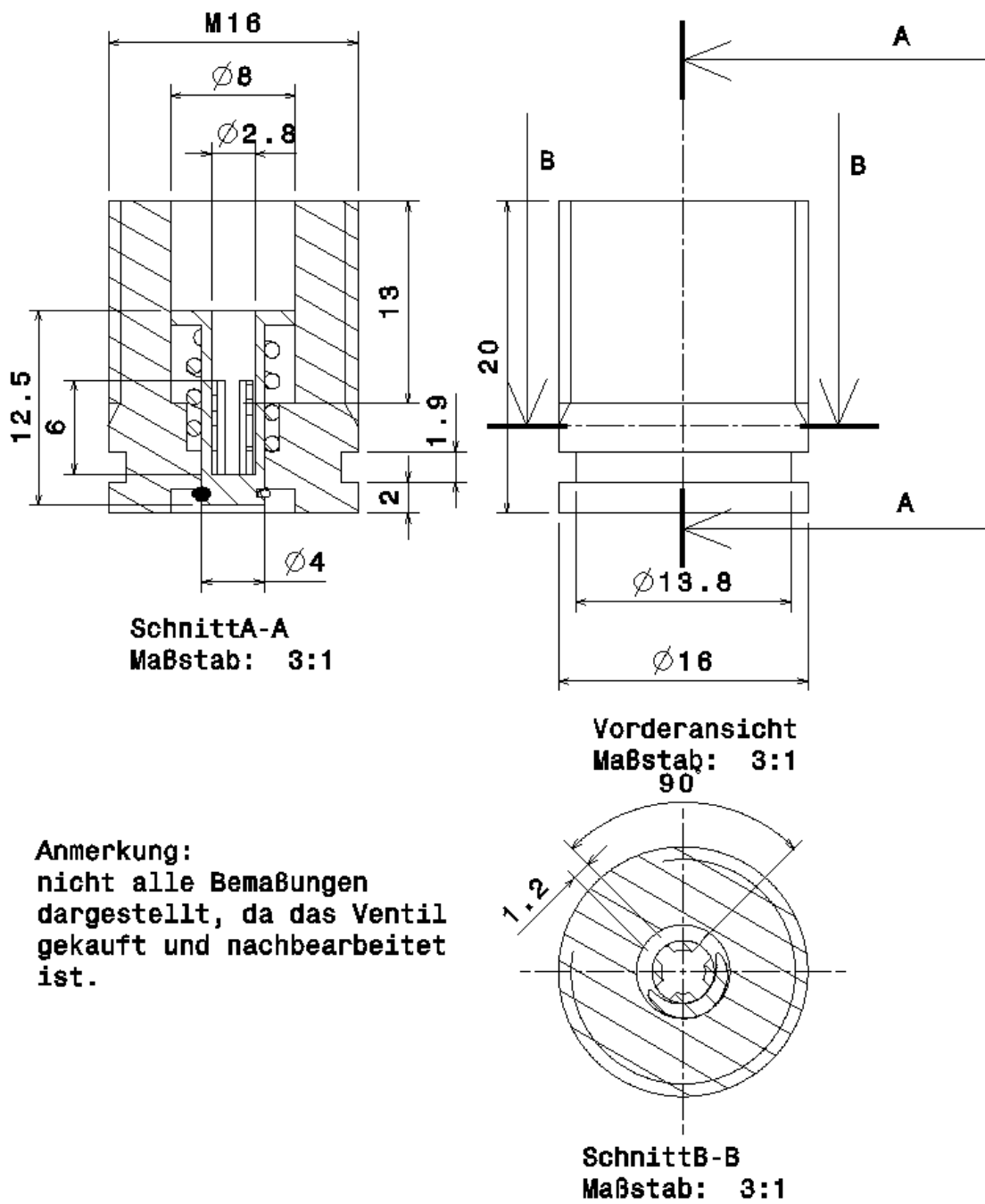


Abbildung 9.1: Konstruktionszeichnung Probensonde.



Anmerkung:  
nicht alle Bemaßungen  
dargestellt, da das Ventil  
gekauft und nachbearbeitet  
ist.

Abbildung 9.2: Konstruktionszeichnung Probenentnahmeventil.



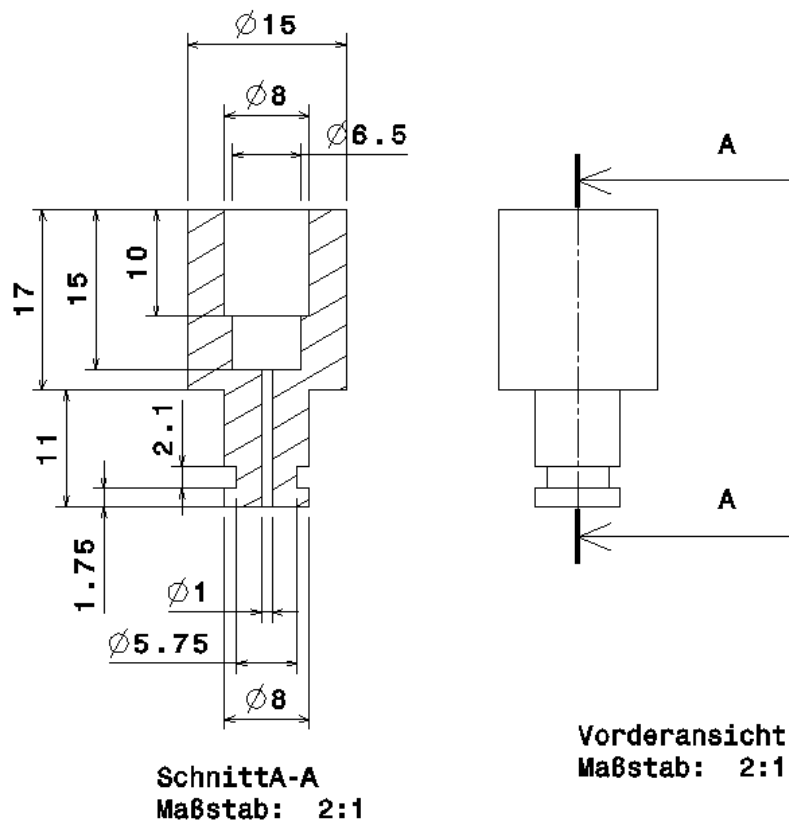


Abbildung 9.4: Konstruktionszeichnung Adapter zum Einkleben einer Kanüle mit Durchmesser 0.8 mm.

## 9.4 Untersuchungen im Fließgleichgewicht

### 9.4.1 Stationäre Flussanalysen

**Tabelle 9.12: Intrazelluläre Flussraten der stationären Zustände in mol L(Zellen)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (G: Glucose, F: Fructose, A: Acetat).**

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C-Quelle	100 % G			90%G / 10%F		10%G / 90%F		90%G / 10%A		
$\mu$ , h <sup>-1</sup>	0,125	0,25	0,4	0,125	0,25	0,125	0,25	0,125	0,25	0,3
qS (Gluc)	0,650	1,470	2,975	0,556	1,511	0,055	0,073	1,440	2,466	3,229
qS (Fruc)	0,000	0,000	0,000	0,047	0,090	0,654	2,782	0,000	0,000	0,000
qAce	0,003	0,009	0,422	0,001	0,002	0,003	0,186	-0,571	-1,036	-1,249
qCO2	2,065	3,784	6,636	1,831	4,748	2,032	7,400	5,265	7,916	9,789
qBTM	1,829	5,020	10,366	1,785	4,852	2,214	9,359	4,515	8,954	12,085
pgi	0,568	1,244	2,508	0,476	1,293	-0,045	-0,348	1,237	2,063	2,685
pfk	0,581	1,280	2,583	0,488	1,327	-0,029	-0,281	1,269	2,127	2,772
aldo	0,581	1,280	2,583	0,535	1,417	0,625	2,501	1,269	2,127	2,772
gap-dh	1,088	2,359	4,750	0,999	2,640	1,162	4,627	2,357	3,896	5,059
eno	1,088	2,359	4,750	0,999	2,640	1,162	4,627	2,357	3,896	5,059
pk	0,286	0,470	0,909	0,247	0,634	0,268	0,991	0,540	0,682	0,822
pyr-dh	0,808	1,590	3,160	0,726	1,896	0,822	3,192	1,665	2,523	3,207
ak	-0,014	-0,039	0,323	-0,016	-0,044	-0,018	0,097	-0,614	-1,121	-1,364
cs	0,641	1,130	1,806	0,564	1,458	0,620	2,165	1,830	2,755	3,370
ict-dh	0,641	1,130	1,806	0,564	1,458	0,620	2,165	1,830	2,755	3,370
mal-dh	0,592	0,997	1,530	0,517	1,329	0,561	1,916	1,710	2,517	3,049
pep-co	0,129	0,355	0,733	0,126	0,343	0,157	0,661	0,319	0,633	0,854
g6p-dh	0,073	0,200	0,414	0,071	0,194	0,089	0,374	0,180	0,358	0,483
r5p-im	0,057	0,156	0,322	0,055	0,151	0,069	0,290	0,140	0,278	0,375
r5p-im	0,016	0,045	0,092	0,016	0,043	0,020	0,083	0,040	0,080	0,108
tk	0,016	0,045	0,092	0,016	0,043	0,020	0,083	0,040	0,080	0,108
tk	0,016	0,045	0,092	0,016	0,043	0,020	0,083	0,040	0,080	0,108
ATP-Verbr.	7,538	12,529	21,434	6,555	16,821	7,095	25,135	18,368	25,648	30,986
NAD(P)H Ox.	3,205	5,657	9,851	2,820	7,282	3,099	11,177	7,997	11,683	14,326
Biomassebildg.	1,720	4,718	9,750	1,678	4,564	2,083	8,798	4,247	8,416	11,360

**Tabelle 9.13: Stationäre Zustände: Prozentuale Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in mol% mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> bezogen auf den aufgenommenen Kohlenstoff (G: Glucose, F: Fructose, A: Acetat).**

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C-Quelle	100 % G			90%G / 10%F		10%G / 90%F		90%G / 10%A		
μ, h <sup>-1</sup>	0,125	0,25	0,4	0,125	0,25	0,125	0,25	0,125	0,25	0,3
qS (Gluc)	100,0	100,0	100,0	92,3	94,4	7,7	2,6	71,6	70,4	72,1
qS (Fruc)	0,0	0,0	0,0	7,7	5,6	92,3	97,4	0,0	0,0	0,0
qAce	0,5	0,6	14,2	0,1	0,1	0,4	6,5	-28,4	-29,6	-27,9
qCO <sub>2</sub>	317,7	257,3	223,1	303,7	296,6	286,8	259,2	261,9	226,0	218,6
qBTM	281,3	341,4	348,5	296,1	303,1	312,4	327,8	224,6	255,7	269,8
pgi	87,3	84,6	84,3	78,9	80,8	-6,3	-12,2	61,5	58,9	60,0
pfk	89,3	87,1	86,8	81,0	82,9	-4,1	-9,8	63,1	60,7	61,9
aldo	89,3	87,1	86,8	88,8	88,6	88,2	87,6	63,1	60,7	61,9
gap-dh	167,4	160,4	159,7	165,8	165,0	163,9	162,0	117,2	111,2	113,0
eno	167,4	160,4	159,7	165,8	165,0	163,9	162,0	117,2	111,2	113,0
pk	43,9	32,0	30,6	41,0	39,6	37,8	34,7	26,9	19,5	18,3
pyr-dh	124,3	108,1	106,2	120,4	118,4	116,0	111,8	82,8	72,0	71,6
ak	-2,2	-2,6	10,9	-2,7	-2,8	-2,6	3,4	-30,5	-32,0	-30,5
cs	98,5	76,8	60,7	93,6	91,1	87,5	75,8	91,0	78,7	75,3
ict-dh	98,5	76,8	60,7	93,6	91,1	87,5	75,8	91,0	78,7	75,3
mal-dh	91,1	67,8	51,4	85,7	83,0	79,1	67,1	85,0	71,9	68,1
pep-co	19,9	24,1	24,6	20,9	21,4	22,1	23,2	15,9	18,1	19,1
g6p-dh	11,2	13,6	13,9	11,8	12,1	12,5	13,1	9,0	10,2	10,8
r5p-im	8,7	10,6	10,8	9,2	9,4	9,7	10,2	7,0	7,9	8,4
r5p-im	2,5	3,0	3,1	2,6	2,7	2,8	2,9	2,0	2,3	2,4
tk	2,5	3,0	3,1	2,6	2,7	2,8	2,9	2,0	2,3	2,4
tk	2,5	3,0	3,1	2,6	2,7	2,8	2,9	2,0	2,3	2,4
ATP-Verbr.	1159,5	852,1	720,6	1087,4	1051,0	1001,3	880,3	913,7	732,3	691,8
NAD(P)H Ox.	492,9	384,7	331,2	467,8	455,0	437,4	391,4	397,8	333,6	319,9
Biomassebildg.	264,5	320,8	327,8	278,4	285,1	294,0	308,1	211,2	240,3	253,6

## 9.5 Untersuchungen der quasi-stationären Zustände

### 9.5.1 Quasi-stationäre Flussanalysen

**Tabelle 9.14: Intrazelluläre Flussraten der quasi-stationären Zustände in mol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (G: Glucose, F: Fructose, A: Acetat).**

Experiment	1-1 <sub>m</sub>	1-2 <sub>m</sub>	1-3 <sub>m</sub>	2-1 <sub>m</sub>	2-2 <sub>m</sub>	2-3 <sub>m</sub>	3-1 <sub>m</sub>	3-2 <sub>m</sub>	3-3 <sub>m</sub>
C-Quelle	100 % Glucose			100 % Glucose			90 % G / 10 % F		
μ <sub>m</sub> , h <sup>-1</sup>	0,349	0,251	0,159	0,120	0,145	0,209	0,130	0,171	0,226
qS (Gluc)	2,896	2,599	2,075	0,909	1,220	1,747	0,640	0,833	0,960
qS (Fruc)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055	0,067	0,067
qAce	0,388	0,276	0,154	0,006	0,013	0,023	0,000	0,000	0,001
qCO <sub>2</sub>	6,779	7,255	7,279	3,209	3,712	4,829	2,115	2,659	2,953
qBTM	9,819	7,786	4,862	2,232	3,581	5,610	2,055	2,736	3,208
pgi	2,454	2,249	1,856	0,809	1,059	1,495	0,548	0,710	0,816
pfk	2,524	2,304	1,891	0,824	1,084	1,535	0,562	0,729	0,839
aldo	2,524	2,304	1,891	0,824	1,084	1,535	0,617	0,796	0,906
gap-dh	4,655	4,297	3,587	1,560	2,025	2,845	1,152	1,483	1,683
eno	4,655	4,297	3,587	1,560	2,025	2,845	1,152	1,483	1,683
pk	0,939	1,048	1,106	0,464	0,506	0,630	0,286	0,354	0,388
pyr-dh	3,149	3,103	2,841	1,217	1,476	1,985	0,837	1,062	1,191
ak	0,294	0,202	0,108	-0,015	-0,021	-0,031	-0,020	-0,026	-0,030
cs	1,879	2,127	2,251	1,011	1,141	1,459	0,652	0,816	0,902
ict-dh	1,879	2,127	2,251	1,011	1,141	1,459	0,652	0,816	0,902
mal-dh	1,618	1,920	2,121	0,951	1,046	1,310	0,598	0,743	0,817
pep-co	0,694	0,550	0,344	0,158	0,253	0,396	0,145	0,194	0,227
g6p-dh	0,392	0,311	0,194	0,089	0,143	0,224	0,082	0,109	0,128
r5p-im	0,305	0,242	0,151	0,069	0,111	0,174	0,064	0,085	0,100
r5p-im	0,087	0,069	0,043	0,020	0,032	0,050	0,018	0,024	0,029
tk	0,087	0,069	0,043	0,020	0,032	0,050	0,018	0,024	0,029
tk	0,087	0,069	0,043	0,020	0,032	0,050	0,018	0,024	0,029
ATP-Verbr.	22,422	25,872	28,036	12,188	13,335	16,625	7,575	9,401	10,316
NAD(P)H Ox.	10,149	11,170	11,550	5,060	5,725	7,326	3,258	4,075	4,505
Biomassebildg.	9,2334	7,3211	4,572	2,099	3,368	5,272	1,932	2,577	3,0151



**Tabelle 9.15: Intrazelluläre Flussraten der quasi-stationären Zustände in mol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (G: Glucose, F: Fructose, A: Acetat).**

Experiment	4-1 <sub>m</sub>	4-2 <sub>m</sub>	4-3 <sub>m</sub>	5-1 <sub>m</sub>	5-2 <sub>m</sub>	5-3 <sub>m</sub>	6-1 <sub>m</sub>	6-2 <sub>m</sub>	6-3 <sub>m</sub>
C-Quelle	10 % G / 90 % F			90 % G / 10 % A			90 % G / 10 % A		
μ <sub>m</sub> , h <sup>-1</sup>	0,144	0,185	0,227	0,148	0,190	0,230	0,290	0,270	0,255
qS (Gluc)	0,061	0,081	0,115	1,276	1,538	2,036	2,712	2,641	2,826
qS (Fruc)	0,732	0,978	1,329	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
qAce	0,003	0,006	0,006	-0,523	-0,641	-0,844	-1,052	-1,023	-1,093
qCO <sub>2</sub>	2,254	2,943	3,857	4,439	5,163	6,768	8,384	8,255	8,790
qBTM	2,495	3,400	4,799	4,265	5,345	7,138	9,992	9,636	10,349
pgi	-0,051	-0,072	-0,101	1,084	1,297	1,715	2,262	2,207	2,360
pfk	-0,034	-0,048	-0,066	1,115	1,336	1,766	2,334	2,276	2,434
aldo	0,698	0,930	1,263	1,115	1,336	1,766	2,334	2,276	2,434
gap-dh	1,297	1,725	2,333	2,059	2,457	3,246	4,267	4,166	4,454
eno	1,297	1,725	2,333	2,059	2,457	3,246	4,267	4,166	4,454
pk	0,295	0,382	0,489	0,427	0,473	0,614	0,721	0,721	0,764
pyr-dh	0,914	1,203	1,598	1,405	1,637	2,152	2,735	2,689	2,866
ak	-0,021	-0,026	-0,040	-0,564	-0,692	-0,912	-1,147	-1,115	-1,192
cs	0,686	0,892	1,161	1,545	1,798	2,355	2,890	2,846	3,030
ict-dh	0,686	0,892	1,161	1,545	1,798	2,355	2,890	2,846	3,030
mal-dh	0,620	0,802	1,034	1,432	1,656	2,165	2,624	2,590	2,754
pep-co	0,177	0,240	0,339	0,301	0,378	0,504	0,706	0,681	0,732
g6p-dh	0,100	0,136	0,192	0,170	0,214	0,285	0,399	0,385	0,413
r5p-im	0,078	0,106	0,149	0,132	0,166	0,222	0,310	0,299	0,321
r5p-im	0,022	0,030	0,043	0,038	0,048	0,064	0,089	0,086	0,092
tk	0,022	0,030	0,043	0,038	0,048	0,064	0,089	0,086	0,092
tk	0,022	0,030	0,043	0,038	0,048	0,064	0,089	0,086	0,092
ATP-Verbr.	7,839	10,133	13,013	15,065	17,167	22,399	26,845	26,609	28,257
NAD(P)H Ox.	3,433	4,465	5,806	6,669	7,695	10,070	12,322	12,163	12,938
Biomassebildg.	2,3485	3,1956	4,5081	4,008	5,027	6,709	9,394	9,060	9,733

**Tabelle 9.16: Quasi-stationäre Zustände: Prozentuale Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in mol% mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> bezogen auf den aufgenommenen Kohlenstoff (G: Glucose, F: Fructose, A: Acetat).**

Experiment	1-1 <sub>m</sub>	1-2 <sub>m</sub>	1-3 <sub>m</sub>	2-1 <sub>m</sub>	2-2 <sub>m</sub>	2-3 <sub>m</sub>	3-1 <sub>m</sub>	3-2 <sub>m</sub>	3-3 <sub>m</sub>
C-Quelle	100 % Glucose			100 % Glucose			90 % G / 10 % F		
μ <sub>m</sub> , h <sup>-1</sup>	0,349	0,251	0,159	0,120	0,145	0,209	0,130	0,171	0,226
qS (Gluc)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	92,1	92,6	93,5
qS (Fruc)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,9	7,4	6,5
qAce	13,4	10,6	7,4	0,7	1,1	1,3	0,1	0,0	0,1
qCO <sub>2</sub>	234,1	279,2	350,8	353,0	304,3	276,4	304,3	295,7	287,4
qBTM	339,1	299,6	234,3	245,6	293,6	321,0	295,6	304,2	312,3
pgi	84,8	86,5	89,5	89,0	86,8	85,5	78,8	78,9	79,4
pfk	87,2	88,7	91,1	90,7	88,9	87,8	80,9	81,1	81,6
aldo	87,2	88,7	91,1	90,7	88,9	87,8	88,8	88,5	88,2
gap-dh	160,8	165,3	172,9	171,6	166,0	162,8	165,8	164,9	163,8
eno	160,8	165,3	172,9	171,6	166,0	162,8	165,8	164,9	163,8
pk	32,4	40,3	53,3	51,1	41,5	36,0	41,1	39,4	37,8
pyr-dh	108,8	119,4	136,9	133,9	121,0	113,6	120,4	118,1	115,9
ak	10,2	7,8	5,2	-1,7	-1,7	-1,7	-2,8	-2,9	-2,9
cs	64,9	81,9	108,5	111,2	93,6	83,5	93,9	90,8	87,8
ict-dh	64,9	81,9	108,5	111,2	93,6	83,5	93,9	90,8	87,8
mal-dh	55,9	73,9	102,2	104,7	85,8	74,9	86,0	82,7	79,5
pep-co	24,0	21,2	16,6	17,4	20,8	22,7	20,9	21,5	22,1
g6p-dh	13,5	12,0	9,4	9,8	11,7	12,8	11,8	12,2	12,5
r5p-im	10,5	9,3	7,3	7,6	9,1	10,0	9,2	9,5	9,7
r5p-im	3,0	2,7	2,1	2,2	2,6	2,9	2,6	2,7	2,8
tk	3,0	2,7	2,1	2,2	2,6	2,9	2,6	2,7	2,8
tk	3,0	2,7	2,1	2,2	2,6	2,9	2,6	2,7	2,8
ATP-Verbr.	774,4	995,5	1351,2	1341,0	1093,2	951,4	1089,8	1045,3	1004,3
NAD(P)H Ox.	350,5	429,8	556,7	556,7	469,3	419,3	468,7	453,1	438,5
Biomassebildg.	318,9	281,7	220,4	231,0	276,1	301,7	278,0	286,5	293,5

**Tabelle 9.17: Quasi-stationäre Zustände: Prozentuale Verteilung der intrazellulären Stoffflüsse in mol% mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> bezogen auf den aufgenommenen Kohlenstoff (G: Glucose, F: Fructose, A: Acetat).**

Experiment	4-1 <sub>m</sub>	4-2 <sub>m</sub>	4-3 <sub>m</sub>	5-1 <sub>m</sub>	5-2 <sub>m</sub>	5-3 <sub>m</sub>	6-1 <sub>m</sub>	6-2 <sub>m</sub>	6-3 <sub>m</sub>
C-Quelle	10 % G / 90 % F			90 % G / 10 % A			90 % G / 10 % A		
μ <sub>m</sub> , h <sup>-1</sup>	0,144	0,185	0,227	0,148	0,190	0,230	0,290	0,270	0,255
qS (Gluc)	7,7	7,7	8,0	70,9	70,6	70,7	72,0	72,1	72,1
qS (Fruc)	92,3	92,3	92,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
qAce	0,4	0,6	0,4	-29,1	-29,4	-29,3	-28,0	-27,9	-27,9
qCO <sub>2</sub>	284,4	277,9	267,0	246,7	236,9	235,0	222,7	225,3	224,3
qBTM	314,8	321,0	332,2	237,0	245,3	247,8	265,5	263,0	264,1
pgi	-6,5	-6,8	-7,0	60,3	59,5	59,5	60,1	60,2	60,2
pfk	-4,2	-4,5	-4,6	62,0	61,3	61,3	62,0	62,1	62,1
aldo	88,1	87,8	87,4	62,0	61,3	61,3	62,0	62,1	62,1
gap-dh	163,6	162,8	161,5	114,4	112,8	112,7	113,4	113,7	113,6
eno	163,6	162,8	161,5	114,4	112,8	112,7	113,4	113,7	113,6
pk	37,3	36,0	33,8	23,7	21,7	21,3	19,2	19,7	19,5
pyr-dh	115,3	113,6	110,6	78,1	75,1	74,7	72,7	73,4	73,1
ak	-2,6	-2,5	-2,8	-31,3	-31,8	-31,7	-30,5	-30,4	-30,4
cs	86,6	84,2	80,4	85,9	82,5	81,8	76,8	77,7	77,3
ict-dh	86,6	84,2	80,4	85,9	82,5	81,8	76,8	77,7	77,3
mal-dh	78,2	75,7	71,5	79,6	76,0	75,2	69,7	70,7	70,3
pep-co	22,3	22,7	23,5	16,7	17,3	17,5	18,8	18,6	18,7
g6p-dh	12,6	12,8	13,3	9,5	9,8	9,9	10,6	10,5	10,6
r5p-im	9,8	10,0	10,3	7,4	7,6	7,7	8,2	8,2	8,2
r5p-im	2,8	2,9	3,0	2,1	2,2	2,2	2,4	2,3	2,4
tk	2,8	2,9	3,0	2,1	2,2	2,2	2,4	2,3	2,4
tk	2,8	2,9	3,0	2,1	2,2	2,2	2,4	2,3	2,4
ATP-Verbr.	989,1	956,6	900,9	837,3	787,9	777,7	713,2	726,2	721,0
NAD(P)H Ox.	433,1	421,5	402,0	370,7	353,2	349,6	327,4	332,0	330,1
Biomassebildg.	296,3	301,7	312,1	222,7	230,7	232,9	249,6	247,3	248,4

## 9.6 Metabolische Kontrollanalyse

Elastizitäten, berechnet anhand der verwendeten kinetischen Modelle nach Chassagnole et al. (2002).

$$\varepsilon_{F6P}^{PGI} = \frac{\partial r_{PGI}}{\partial c_{F6P}} \cdot \frac{c_{F6P}}{r_{PGI}} =$$

$$= - \frac{c_{F6P}}{\left( c_{G6P} - \frac{c_{F6P}}{K_{PGI,F6P}} \right)} \cdot \left[ \frac{1}{K_{PGI,eq}} + \frac{\left( c_{G6P} - \frac{c_{F6P}}{K_{PGI,F6P}} \right) \cdot \frac{K_{PGI,G6P}}{K_{PGI,F6P}} \left( 1 + \frac{c_{6PG}}{K_{PGI,F6P,6PGinh}} \right)}{K_{PGI,G6P} \left[ 1 + \frac{c_{F6P}}{K_{PGI,F6P}} \left( 1 + \frac{c_{6PG}}{K_{PGI,F6P,6PGinh}} \right) + \frac{c_{6PG}}{K_{PGI,G6P,6PGinh}} \right] + c_{G6P}} \right]$$

$$\varepsilon_{FBP}^{Aldo} = \frac{\partial r_{Aldo}}{\partial c_{FBP}} \cdot \frac{c_{FBP}}{r_{Aldo}} =$$

$$= \frac{c_{FBP}}{\left( c_{FBP} - \frac{c_{GAP} \cdot c_{DHAP}}{K_{Aldo,eq}} \right)} - \frac{c_{FBP} \cdot \left( 1 + \frac{c_{GAP}}{K_{Aldo,GAP,inh}} \right)}{K_{Aldo,FBP} + c_{FBP} + \frac{K_{Aldo,GAP} \cdot c_{DHAP}}{K_{Aldo,eq} \cdot V_{Aldo,bif}} + \frac{K_{Aldo,DHAP} \cdot c_{GAP}}{K_{Aldo,eq} \cdot V_{Aldo,bif}} + \frac{c_{FBP} \cdot c_{GAP}}{K_{Aldo,GAP,inh}} + \frac{c_{DHAP} \cdot c_{GAP}}{K_{Aldo,eq} \cdot V_{Aldo,bif}}}$$

$$\xi_{F6P}^{PFK} = \frac{\partial r_{PFK}}{\partial c_{F6P}} \cdot \frac{c_{F6P}}{r_{PFK}} =$$

$$\frac{\left[ 1 + \frac{L_{PFK}}{1 + c_{F6P}} \frac{A_3}{K_{PFK,F6P,S} \cdot A_2} \right]^{\eta_{PFK}} + \left( c_{F6P} + K_{PFK,F6P,S} \cdot \frac{A_2}{A_3} \right) \cdot \left[ \frac{L_{PFK} \cdot \eta_{PFK} \cdot A_3}{K_{PFK,F6P,S} \cdot A_2} \cdot \left( 1 + c_{F6P} \frac{A_3}{K_{PFK,F6P,S} \cdot A_2} \right)^{-\eta_{PFK}-1} \right]}{1 - c_{F6P}} \cdot \frac{1}{\left( c_{F6P} + K_{PFK,F6P,S} \cdot \frac{A_2}{A_3} \right) \cdot \left[ 1 + \frac{L_{PFK}}{1 + c_{F6P}} \frac{A_3}{K_{PFK,F6P,S} \cdot A_2} \right]^{\eta_{PFK}}}$$

$$A_1 = \left[ c_{ATP} + K_{PFK,ATP,S} \cdot \left( 1 + \frac{c_{ADP}}{K_{PFK,ADP,c}} \right) \right]$$

$$A_2 = 1 + \frac{c_{PEP}}{K_{PFK,PEP}} + \frac{c_{ADP}}{K_{PFK,ADP,b}} + \frac{c_{AMP}}{K_{PFK,AMP,b}}$$

$$A_3 = 1 + \frac{c_{ADP}}{K_{PFK,ADP,a}} + \frac{c_{AMP}}{K_{PFK,AMP,a}}$$

mit: