

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Metabolische Kontrollanalyse der mikrobiellen L-Phenylalanin-  
Herstellung im Zulaufverfahren**

**Michael Jürgen Weiner**

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. Andreas Kremling

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

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Georg Sprenger,  
Universität Stuttgart

Die Dissertation wurde am 19.05.2015 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen  
am 02.09.2015 angenommen.



*Stets findet Überraschung statt.*

*Da, wo man's nicht erwartet hat.*

Wilhelm Busch  
(1832 - 1908)

deutscher Zeichner, Maler und Schriftsteller



## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz. Zum Erfolg dieser Arbeit haben viele Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte:

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz für die ausgezeichnete Betreuung, die konstruktiven Ratschläge und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Besonders Bedanken möchte ich mich außerdem für die mir zur Verfügung stehenden Freiräume beim Etablieren von Methoden und beim Bearbeiten dieses Projektes. Ebenso möchte ich ihm für die Bereitschaft der langfristigen Förderung dieses Projektes durch Anschaffung des neuen Massenspektrometers und das mir damit entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Beim Coreferenten Prof. Dr. rer. nat. Sprenger (Lehrstuhl für Mikrobiologie, Univ. Stuttgart) und bei dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Kremling (Fachgebiet für Systembiotechnologie) bedanke ich mich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe.

Den Projektpartnern des Instituts für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sprenger und Herrn Dr. rer. nat. Albermann, danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, die konstruktiven und angenehmen Diskussionen sowie ihre Ideen. Herrn Dr. rer. nat. Albermann danke ich zusätzlich für die Erstellung der rekombinanten Stämme, sowie für die von ihm durchgeführten Proteomanalysen. Bei Frau Dr. rer. nat. Gottlieb (Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart) möchte ich mich für die Übergabe des Ausgangsstammes zu Beginn dieses Projektes bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung dieses Forschungsvorhabens.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Herrn Dr.-Ing. Hannes Link danke ich für die theoretische und praktische Einarbeitung in das Thema. Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Kathrin Castiglione, Christina Pfaffinger und Julia Tröndle für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation und die guten Verbesserungsvorschläge. Bei allen meinen Studenten für ihre tatkräftige Mitarbeit. Besonderer Dank gilt hierbei Franziska Berghofer, Korbinian Binder, Simone Frank, Anika Nitsche, Christina Pfaffinger, Ingmar Polte, Andreas Schmieder und Julia Tröndle für ihre Bereitschaft, mich zu den unmöglichsten Tageszeitpunkten bei der Kurzzeitanalysen-Durchführung zu unterstützen.

Bei meinen Eltern und meinem Bruder für die durch sie erfahrene Unterstützung und natürlich bei meiner Lebensgefährtin Julia, die mir in den wichtigen Zeiten Rückhalt gegeben hat.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>6</b>
3.1	Bioreaktionstechnik .....	6
3.1.1	Mikrobielles Wachstum.....	6
3.1.2	Betrieb von Bioreaktoren.....	8
3.1.3	Bestimmung spezifischer Reaktionsraten.....	12
3.2	Metabolische Analysen.....	14
3.2.1	Dynamische metabolische Analysen .....	14
3.2.2	Stationäre metabolische Analysen .....	15
3.3	Metabolom-Quantifizierung .....	17
3.3.1	Probenahme und Inaktivierung des Stoffwechsels .....	18
3.3.2	Extraktion und Aufarbeitung .....	19
3.3.3	Quantifizierung und analytische Plattformen .....	20
3.4	Metabolische Stoffflussanalyse .....	22
3.4.1	<sup>13</sup> C-Stoffflussanalysen .....	22
3.4.2	Stöchiometrische Metabolit-Bilanzierung .....	23
3.4.3	Genomweite Metabolit-Bilanzierung .....	24
3.5	Thermodynamische Analyse von Reaktionsnetzwerken .....	29
3.6	Metabolische Kontrollanalyse .....	31
3.6.1	Abschätzung von Elastizitäten.....	31
3.6.2	Abschätzung von Kontrollkoeffizienten.....	32
3.7	Biologische Grundlagen - <i>Escherichia coli</i> .....	36
3.7.1	Zentralstoffwechsel.....	36
3.7.2	Glycerin-Stoffwechsel .....	41
3.7.3	Biosyntheseweg aromatischer Aminosäuren .....	41
3.7.4	Polysaccharide als Speicherstoffe.....	42
3.8	L-Phenylalanin.....	44
3.8.1	Industrielle Bedeutung und Produktion von L-Phenylalanin .....	44
3.8.2	Ansätze zur mikrobiellen Herstellung von L-Phenylalanin mit <i>E. coli</i> .....	45

---

<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>48</b>
4.1	Mikroorganismen und Stammhaltung .....	48
4.2	Kulturmedien.....	50
4.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	52
4.3.1	Gewinnung von kompetenten Zellen mit anschließender Plasmid-Transformation .....	52
4.3.2	Vorkulturen .....	53
4.3.3	Parallele Zulauf-Kultivierung im 0,5 L-Maßstab.....	54
4.3.4	Zulauf-Kultivierung im 15 L-Maßstab mit einer Kohlenstoffquelle.....	56
4.3.5	Zulaufkultivierung im 15 L-Maßstab mit zwei Kohlenstoffquellen .....	59
4.4	Parallelisierte Kurzzeitanalysen nach schnellem Medienwechsel .....	61
4.5	Quantitativer Nachweis extrazellulärer Substanzen.....	64
4.5.1	Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmasse.....	64
4.5.2	Durchflusszytometrie .....	64
4.5.3	HPLC-Analyse zur Quantifizierung von Glycerin und organischen Säuren .....	65
4.5.4	HPLC-Analyse zur Quantifizierung von Aminosäuren .....	65
4.5.5	Enzymatischer Nachweis von Glucose, organischen Säuren und Ammoniak ....	66
4.6	Gewinnung von U- <sup>13</sup> C-markiertem Zellextrakt .....	67
4.7	Probenahme und Aufarbeitung zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite .....	69
4.8	Quantitativer Nachweis intrazellulärer Metabolite .....	71
4.8.1	Massenspektrometrische Analyse .....	71
4.8.2	Quantifizierung von Speicherstoffen.....	72
4.9	Berechnungsmethoden .....	73
4.9.1	Genomweite Stoffflussabschätzung .....	73
4.9.2	Netzwerk basierende thermodynamische Analysen.....	74
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>75</b>
5.1	Uniform markierter <sup>13</sup> C-Zellextrakt zur quantitativen Metabolom-Analytik.....	75
5.1.1	Parallelisierte Herstellung von salzreduziertem Zellextrakt .....	75
5.1.2	Vergleichende Charakterisierung verschiedener Zellextrakte .....	77
5.1.3	Optimierung der PEP-Konzentration in uniform <sup>13</sup> C-markiertem Zellextrakt....	80
5.1.4	Diskussion .....	82



---

5.2	Reaktionstechnische Charakterisierung von L-Phenylalanin-Produktionsstämmen	83
5.2.1	Plasmid-Stabilität während der L-Phenylalanin-Produktion	83
5.2.2	Einfluss der Malat-Enzyme auf die L-Phenylalanin-Produktion	90
5.2.3	Charakterisierung der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktion	96
5.3	Speicherstoffsynthese von <i>E. coli</i> -Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion	99
5.3.1	Glucose-Ausfluss während der Zellüberführung zur metabolischen Analyse	99
5.3.2	Glucose-Speicherung in Glycogen- und Trehalose-Deletionsstämmen	102
5.3.3	Trehalose-Speicherung aus Glycerin und/ oder Laktat in rekombinanten <i>E. coli</i> -Zellen	107
5.4	L-Phenylalanin-Produktionsprozess im 15 L-Maßstab zur metabolischen Analyse	114
5.5	Vergleichende metabolische Satz-Analysen mit <i>E. coli</i> Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion	120
5.5.1	Beschreibung des Referenzzustandes	120
5.5.2	Kurzzeitanalysen im Satzverfahren	129
5.5.3	Diskussion	144
5.6	Vergleichende metabolische Analysen im Zulaufbetrieb mit <i>E. coli</i> Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion	147
5.6.1	Beschreibung des Referenzzustandes	147
5.6.2	Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb	149
5.6.3	Diskussion	167
5.7	Thermodynamische Analyse des Stoffwechsellnetzwerkes	169
5.8	Metabolische Kontrollanalyse	175
5.8.1	Metabolisches stöchiometrisches Netzwerk	175
5.8.2	Elastizitäten	176
5.8.3	Kontrollkoeffizienten zu verschiedenen Produktionszeitpunkten	186
5.8.4	Diskussion	198
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>201</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>208</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>210</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>228</b>

---

<b>Anhang</b> .....	<b>232</b>
A.1 Verwendete Chemikalien und Gerätschaften .....	232
A.2 Medien und Lösungen .....	235
A.3 Kultivierungssystem .....	239
A.4 Massenspektrometrie .....	240
A.5 Flüssigkeitschromatographie .....	241
A.5 Sonstige Nachweismethoden.....	244
A.6 Stoffflussberechnungen .....	245
A.7 MCA-Modell .....	264
A.8 Proteomanalyse.....	265
A.8.1 Methode .....	265
A.8.2 Vergleich des Proteomhaushaltes von Zellen während der metabolischen Kurzeitanalysen .....	266
A.8.3 Vergleich des Proteomhaushaltes von Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Produktionsprozesses.....	270
A.9 Miniaturisiertes Probenahmesystem zur schnellen Probenahme .....	271
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>281</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>284</b>

# 1 Einleitung

Die Idee, Bakterien als kleine Fabriken zur Herstellung einer Vielzahl chemischer und pharmazeutischer Produkte zu entwickeln (Woolston *et al.*, 2013), entstand bald nachdem erstmals Fremd-Gene in eine Bakterienzelle eingebracht wurden (Cohen *et al.*, 1973). Am Beispiel von einfachen Komponenten, wie dem in zahlreichen mikrobiellen Studien untersuchten Produkt Ethanol, wurde dabei jedoch schnell ersichtlich, dass eine einfache Aneinanderreihung von Genen nicht zielführend ist. Vielmehr bedarf es einer Vielzahl an genetischen Veränderungen, um den mikrobiellen Stoffwechsel effektiv zur gewünschten Produktbildung auszurichten (Woolston *et al.*, 2013). Neben zufallsbasierten Mutagenese-Strategien gewannen dabei in den vergangenen 20 Jahren vor allem Ansätze zur rationalen Entwicklung mikrobieller Produktionssysteme mehr und mehr an Bedeutung. Dabei werden Methoden, welche die gezielte Charakterisierung von mikrobiellen Stoffwechselnetzwerken und die damit verbundene direkte Verbesserung von Produktbildung oder Zell-Eigenschaften ermöglichen, unter dem Begriff „*Metabolic Engineering*“ zusammengefasst (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Zusätzlich zu den in der Zelle vorliegenden Metaboliten (Metabolom), den katalysierenden Enzymen und Proteinen (Proteom) und der mRNA (Transkriptom) ist dabei vor allem die Bestimmung der vorliegenden Reaktionsraten respektive Stoffflüsse (Fluxom) und deren Kontrolle von zentralem Interesse (Stephanopoulos und Stafford, 2002). Die von Kacser und Burns (1973) eingeführte metabolische Kontrollanalyse (aus dem Englischen ‚*metabolic control analysis*‘ **MCA**) stellt eine Möglichkeit dar, die Kontrolle von intrazellulären Stoffflüssen mathematisch zu beschreiben.

Neben der korrekten Beschreibung von intrazellulären Stoffwechselfvorgängen besitzen die Ansätze des „*Metabolic Engineering*“ durch ihr selbst definiertes Ziel, Mikroorganismen zur kosteneffizienten Produktion von Chemikalien, pharmazeutischen Wirkstoffen oder Treibstoffen zu entwickeln, einen starken industriellen Bezug. Trotz dieser industriellen Relevanz und der Vielzahl an theoretischen Studien und Arbeiten mit Wildtyp-Stämmen sind in den vergangenen Jahren nur wenige erfolgreiche Optimierungen von industriell relevanten Produktionsorganismen mit der Methodik der MCA beschrieben worden. Beispiele hierfür sind die Penicillin-Herstellung (Nielsen, 1997), die Lysin-Synthese (Simpson *et al.*, 1998) und die Ethanol-Gewinnung (Miskovic und Hatzimanikatis, 2010). Ein Grund für die geringe Anzahl an erfolgreichen Studien und den starken theoretischen Fokus der meisten MCA-Studien ist in der experimentellen Datengenerierung zu sehen. Die benötigten umfangreichen Informationen aus einem lebenden biologischen System unter definierten Bedingungen und die anschließende mathematische Verwertung stellen in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit interdisziplinärer Herangehensweisen in den Vordergrund.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Enzyme ermöglichen in lebenden Zellen die biochemische Katalyse einer oder mehrerer Reaktionen. Gleichzeitig kontrollieren Enzyme direkt die zelluläre Stoffflussverteilung innerhalb bestimmter Stoffwechselwege (Kacser und Burns, 1973). Um detaillierte Informationen bezüglich der Regulation eines Stoffflusses hin zu einem bestimmten Produkt zu erlangen, ist die Identifikation und genaue Charakterisierung der regulierenden Enzyme hinsichtlich ihrer Funktion und ihrer kinetischen Eigenschaften in einem Stoffwechselnetzwerk notwendig. Wie bereits in mehreren Studien beschrieben, können Enzym-Eigenschaften durch *in vitro* Untersuchungen mit aufgereinigten Enzymen nur unzureichend beschrieben werden (Teusink *et al.*, 2000; Visser und Heijnen, 2003). Dieses Erkenntnis macht eine Enzym-Charakterisierung direkt in der lebenden Zelle notwendig. Die dazu erforderlichen sogenannten metabolischen Analysen können unter dynamischen oder stationären Bedingungen durchgeführt werden.

Grundlage dynamischer Analysen ist in den meisten Ansätzen die abrupte Änderung der Substratverfügbarkeit unter zuvor metabolisch stationären Bedingungen. Die resultierende dynamische Antwort der Zelle auf die Gleichgewichtsstörung ermöglicht im Prinzip die *in vivo* Beschreibung von Enzym-Eigenschaften. Neben dem hohen experimentellen und analytischen Aufwand einer hochauflösenden dynamischen Charakterisierung wirkt sich hierbei vor allem die Problematik, Stoffwechselwege nicht gezielt auslenken zu können, negativ auf die Identifikation enzymatischer Regulationsschritte aus.

Im Gegensatz zu dynamischen Analysen steht bei stationären Analysen nicht die dynamische Antwort der Zellen auf eine Veränderung der Substratverfügbarkeit im Vordergrund, sondern die Charakterisierung des sich ausbildenden neuen Fließgleichgewichtes. In mehreren sequentiell durchgeführten stationären Analysen konnte Link (2009) durch den Einsatz unterschiedlicher Kohlenstoffquellen und durch das Einstellen der Substratzufuhr eine gezielte Auslenkung des Zellstoffwechsels auf neue Gleichgewichtszustände erreichen. Für die dabei angewendete Methodik der sogenannten metabolischen Kurzzeitanalysen wurde Zellsuspension aus dem zu charakterisierenden Prozess entnommen, die Biomasse durch schnelle Zentrifugation abgetrennt und mit frischem Medium in einen kleineren Analysenreaktor überführt, wo die Auslenkung des Prozessgleichgewichtes durch unterschiedliche Kohlenstoffquellen und unterschiedliche Zufuhrraten erfolgte. Durch diese parallel zum operierenden Prozess durchgeführten metabolischen Analysen konnte eine Störung desselbigen erfolgreich vermieden werden. Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der sequentiell gewonnenen Daten ist ein über die Prozesszeit gleichbleibendes Proteom der Zellen, wie es durch eine kontinuierliche Prozessführung (Kresnowati *et al.*, 2008; Nasution *et al.*, 2008) oder wie von Link *et al.* (2010) beschrieben durch einen wachstumskontrollierten halb-kontinuierlichen Prozess realisiert werden kann. Gleichzeitig stellt ein vergleichbares

Proteom der Zelle die Grundlage für die Anwendbarkeit von Berechnungsansätzen wie der metabolischen Kontrollanalyse (MCA) zur Bestimmung der stoffflusskontrollierenden Reaktionsschritte dar. Allgemein kommt die halb-kontinuierliche Prozessführung in industriellen Prozessen aufgrund ihrer hohen Flexibilität und der optimalen Anpassbarkeit der Kultivierungsbedingungen verbreitet zum Einsatz (Schügerl, 1985). Unter Produktionsbedingungen ist jedoch meist keine wachstumskontrollierte Prozessführung möglich, so dass ein konstantes Proteom der Zelle nicht gewährleistet werden kann. Dies schließt eine sequentielle Durchführung von stationären metabolischen Analysen aus.

Ein Beispiel für einen halb-kontinuierlich betriebenen Prozess ist die mikrobielle L-Phenylalanin-Produktion. Die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin besitzt als essentielle Aminosäure große Bedeutung in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie (Sprenger, 2007). Aufgrund des Verzichts auf teure und umweltbelastende chemische Katalysatoren und der Möglichkeit der stereoselektiven Gewinnung erfolgt die industrielle L-Phenylalanin-Synthese bereits heute zum überwiegenden Teil durch mikrobielle Synthese. Durch Verwendung von rekombinanten *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämmen und der Kohlenstoffquelle Glucose konnten hierbei Produktkonzentrationen von bis zu  $50 \text{ g L}^{-1}$  realisiert werden (Backman *et al.*, 1990). Eine alternative Kohlenstoffquelle ist Glycerin. Neben weiteren Vorteilen fördert vor allem die steigende günstige Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle als Abfallprodukt bei der weltweit zunehmenden Biodiesel-Herstellung das industrielle Interesse (Almeida *et al.*, 2012; Wendisch *et al.*, 2011). In der Literatur beschriebene Studien zur L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin bleiben dabei mit Produktkonzentrationen von  $0,4\text{--}5,6 \text{ g L}^{-1}$  deutlich hinter den mit Glucose erzielten Ergebnissen zurück (Khamduang *et al.*, 2009; Thongchuang *et al.*, 2012). Auch erste vom Projektpartner des Instituts für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführte Kultivierungen bestätigten die im Vergleich zu Glucose verringerte Produktivität mit Glycerin (Gottlieb, 2010).

Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist es, die den Stofffluss zum Produkt kontrollierenden Reaktionsschritte während der mikrobiellen Herstellung des industriell relevanten Produktes L-Phenylalanin ausgehend von der Kohlenstoffquelle Glycerin zu bestimmen. Das Interesse dieser Arbeit liegt des Weiteren darin, mögliche Ursachen für die im Vergleich zur Kohlenstoffquelle Glucose verringerte Produktivität und den frühen Produktionsabbruch aufzuzeigen.

Auf Basis der vom Projektpartner zur Verfügung gestellten rekombinanten *E. coli*-Stämme ist es somit zu Beginn notwendig, einen standardisierter Prozess im Labor-/ Technikumsmaßstab unter halb-kontinuierlichen Zulaufbedingungen zu etablieren, welcher die Grundlage für die folgenden Arbeiten und die Durchführung von metabolischen Analysen darstellt. Um die Möglichkeit der wiederholten Entnahme von Zellsuspension aus dem laufenden Prozess zur

metabolischen Analyse gewährleisten zu können, muss hierbei ein ausreichendes Reaktionsvolumen des Produktionsprozesses sichergestellt werden. Die Verfügbarkeit von rekombinanten Stämmen mit unterschiedlichsten genetischen Modifikationen im Aromatenbiosyntheseweg (beispielsweise L-Tyrosin-Auxotrophie) sowie im Zentralstoffwechsel (beispielsweise Deletion der Pyruvatkinase-codierenden Gene) macht eine gezielte Anpassung der Prozessführung an diese stammspezifischen Eigenschaften notwendig. Eine klare Prozess-Gliederung in Wachstumsphase und Produktionsphase gewährleistet hierbei die Möglichkeit, entsprechende reaktionstechnische Anpassungen der notwendigen Prozessführung vorzunehmen.

Diese standardisierte Prozessführung ermöglicht die detaillierte reaktionstechnische Charakterisierung der verschiedenen rekombinanten Stämme hinsichtlich L-Phenylalanin-Bildung und weiterer Größen wie beispielsweise Wachstum und Nebenproduktbildung. Durch die dabei gewonnenen Erkenntnisse kann ein vielversprechender rekombinanter Stamm zur genauen metabolischen Analyse ausgewählt werden. Anhand der im Labor-/Technikumsmaßstab charakterisierten Produktionsphasen des ausgewählten Produktionsstammes gilt es, im Anschluss metabolisch interessante Zeitpunkte während der L-Phenylalanin-Produktion zur detaillierten metabolischen Analyse zu identifizieren.

Aufgrund des im halb-kontinuierlichen Produktionsprozess zu erwartenden instationären Produktionsverhaltens kann nicht von einem langfristig konstanten Proteom der Zellen während der Produktionsphase ausgegangen werden. Eine Vergleichbarkeit der zu erzielenden Daten ist somit durch sequentiell durchgeführte stationäre metabolische Analysen nicht gewährleistet. Um trotzdem eine Vergleichbarkeit von Daten aus mehreren metabolischen Analysen zu ermöglichen, sind in diesem Forschungsvorhaben parallelisiert durchgeführte metabolische Kurzzeitanalysen zielführend. Durch geeignete Wahl der dabei eingesetzten Substrate und der Substratzufuhrdaten gilt es, das metabolische Fließgleichgewicht gezielt und nachweisbar auf neue Fließgleichgewichte auszulernen.

Die während der metabolischen Analysen zu gewinnenden Proben müssen eine genaue Charakterisierung des intra- und extrazellulären Metaboloms sowie des Fluxoms ermöglichen. Eine Voraussetzung hierfür ist es, dass die eingesetzten Methoden zur Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten und zur genomweiten Stoffflussabschätzung an die in dieser Forschungsarbeit eingesetzten rekombinanten L-Phenylalanin-Produktionsstämme angepasst und optimiert werden. Gleiches gilt für eine entsprechende thermodynamische Analyse des Stoffwechselnetzwerkes.

Basierend auf den während der metabolischen Analysen bestimmten Daten für Metabolom, Fluxom und Thermodynamik kann für die ausgewählten Produktionszeitpunkte eine Identifikation der Reaktionsschritte erfolgen, welche den Stofffluss zum Produkt L-Phenylalanin kontrollieren. Hierzu stellt der von Kacser und Burns (1973) eingeführte Ansatz der MCA die Möglichkeit der mathematischen Beschreibbarkeit bereit. Durch die

Identifikation der im Reaktionsnetzwerk mit Glycerin relevanten kontrollierenden Enzyme ist es abschließend möglich, Ursachen für die begrenzte Produktivität und den Produktionsabbruch aufzuzeigen.

Anhand der entwickelten Zielsetzung konnte für diese Arbeit der folgende Arbeitsplan erstellt werden:

- Anpassung und Optimierung von Methoden zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite
- Reaktionstechnische Charakterisierung von rekombinanten *E. coli*-Stämmen zur L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin mittels standardisierter Prozessführung im Labor-/ Technikumsmaßstab
- L-Phenylalanin-Produktionsprozess zur detaillierten metabolischen Analyse
  - Ausführliche Prozessbeschreibung eines ausgewählten Produktionsstammes
  - Auswahl von metabolisch interessanten Produktionszeitpunkten zur metabolischen Analyse
- Parallelisierte stationäre metabolische Analysen
  - Realisierung von gezielten Auslenkungen des metabolischen Fließgleichgewichtes
  - Charakterisierung des intrazellulären Metaboloms und Fluxoms
- Thermodynamische Analyse des Reaktionsnetzwerkes
- Metabolische Kontrollanalyse
  - Beschreibung des Reaktionsnetzwerkes
  - Auswahl von Effektoren und Abschätzen von Elastizitäten
  - Bestimmung und Interpretation von Kontrollkoeffizienten

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Bioreaktionstechnik

Mikrobielle Prozesse können allgemein durch eine Vielzahl an zeitabhängigen Größen wie Konzentrationen, Temperatur und pH beschrieben werden. Diese werden sowohl durch den Zellstoffwechsel als auch durch den Massen- und Stofftransport beeinflusst. Dieses Kapitel beschreibt die Grundlagen mikrobiellen Wachstums und fasst die mathematische Beschreibung von mikrobiellen Prozessen unter kontrollierten Bedingungen zusammen. Im letzten Teil wird auf die Abschätzung spezifischer Raten aus den im Prozess bestimmaren Parametern eingegangen.

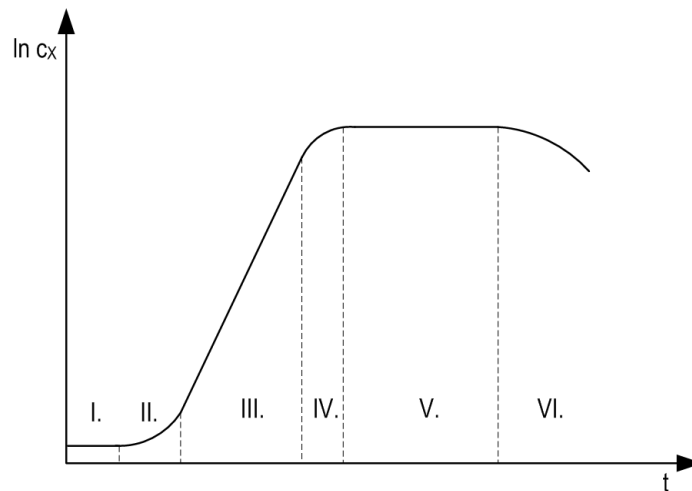
#### 3.1.1 Mikrobielles Wachstum

Um Wachstum zu ermöglichen, benötigen heterotrophe Mikroorganismen organische Kohlenstoffverbindungen, Sauerstoff, Stickstoffverbindungen, Mineralsalze und Spurenelemente. Ist der Zusatz von spezifischen Substanzen (beispielsweise Aminosäuren) notwendig, werden diese Mikroorganismen als auxotroph für diese Substanz(en) bezeichnet. Sämtliche Verbindungen werden über das wässrige Kultivierungsmedium zur Verfügung gestellt und ermöglichen der Zelle einen gezielten Stoffaustausch und Wachstum.

#### Wachstumsphasen

Unter unlimitierten, aber begrenzten Nährstoffbedingungen lassen sich im Satzverfahren sechs Wachstumsphasen beschreiben (Monod, 1949), die in Abbildung 3.1 dargestellt sind. Nach Überführung und Adaptation der Zellen an die eingestellten Bedingungen (Verzögerungsphase) setzt Wachstum mit einer ansteigenden Rate ein (Übergangsphase). In der anschließenden exponentiellen Wachstumsphase wird die maximal mögliche spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{max}$ ) aufrecht erhalten, bis ein oder mehrere Medienbestandteile limitierend werden (Limitierungsphase) und somit die Wachstumsrate abnimmt. In der folgenden stationären Phase stehen Wachstum und Absterberate im Gleichgewicht. Mit Beginn der letzten Phase (Absterbephase) übersteigt die Absterberate die Wachstumsrate.





**Abbildung 3.1:** Wachstumsphasen im unlimitierten aber begrenzten Satzverfahren: Verzögerungsphase (I), Übergangsphase (II), exponentielle Wachstumsphase (III), Limitierungsphase (IV), stationäre Phase (V) und Absterbephase (VI).

Zur kinetischen Beschreibung des Wachstums wird von einem unstrukturierten und unsegregierten Zustand ausgegangen, was eine Unterscheidung von Individuen in der Zellpopulation und das Vorhandensein von Substrukturen ausschließt. Hierdurch beschreibt die Wachstumsrate  $r_X$  die Veränderung der Biomasse-Konzentration  $c_X$  über die Zeit  $t$ , welche unter unlimitierten Bedingungen proportional zur vorliegenden Biomasse ist.

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad (3.1)$$

Mit  $r_X$ : Wachstumsrate,  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$   
 $c_X$ : Biomasse-Konzentration,  $\text{g L}^{-1}$   
 $t$ : Zeit, h  
 $\mu$ : Spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$

Somit folgt die Definition der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$ :

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (3.2)$$

Gleichzeitig wird durch Integration von Gleichung (3.2) eine Beschreibung der exponentiellen Wachstumskinetik ermöglicht:

$$c_X = c_X^0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (3.3)$$

Mit  $c_X^0$ : Initiale Biomasse-Konzentration,  $\text{g L}^{-1}$

In definierten Medien ohne Komplexbestandteile, wie beispielsweise Hefeextrakt oder Pepton, stellt in der Regel die Kohlenstoffquelle die limitierende Komponente dar. Durch die von Monod (1949) beschriebene Sättigungskinetik wird ein formaler Zusammenhang zwischen der

spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  und der limitierenden Konzentration der Kohlenstoffquelle  $c_S$  beschrieben:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (3.4)$$

Mit  $\mu_{max}$ : Maximale spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_S$ : Substratkonzentration,  $\text{g L}^{-1}$   
 $K_S$ : Halbsättigungskonstante,  $\text{g L}^{-1}$

Hierbei beschreibt die maximale spezifische Wachstumsrate  $\mu_{max}$  eine im absoluten Substratüberschuss erreichbare theoretische Größe, wohingegen die Halbsättigungskonstante  $K_S$  der Substratkonzentration entspricht, bei der die halbe maximale spezifische Wachstumsrate vorliegt.

Analog zur spezifischen Wachstumsrate wird die spezifische Aufnahme- oder Bildungsrate einer beliebigen Komponente  $i$  durch die zeitliche Veränderung ihrer Konzentration im Medium beschrieben:

$$q_i \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_i}{dt} \quad (3.5)$$

Zur Beschreibung von Ausbeutekoeffizienten können allgemein die in Beziehung zu stellenden Raten ins Verhältnis gesetzt werden. Hierbei beschreibt  $Y_{i/j}$  den Ausbeutekoeffizienten der Komponente  $i$  bezüglich der Komponente  $j$ :

$$Y_{i/j} = \frac{q_i}{q_j} \quad (3.6)$$

Im Beispiel des substratbezogenen Biomasseausbeutekoeffizienten  $Y_{X/S}$  ergibt sich somit das Verhältnis der beiden Konzentrationsänderungen von Biomasse und Substrat:

$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad (3.7)$$

### 3.1.2 Betrieb von Bioreaktoren

Rührkesselreaktoren beschreiben die wichtigste Gruppe an Produktionsreaktoren in der Biotechnologie (Weuster-Botz, 2006). Als Rührorgan werden in dieser Gruppe vorrangig Scheibenblattrührer eingesetzt, welche eine ideale Durchmischung des Reaktionsansatzes und somit räumlich konstante (isotrope) Prozessbedingungen (Konzentrationen, Reaktionsgeschwindigkeiten) gewährleisten sollen. Des Weiteren werden für einen idealen Rührkesselreaktor isobare und isotherme Reaktionsbedingungen angenommen. Die allgemeine

Stoffbilanzgleichung für den idealen Rührkesselreaktor ist dabei wie folgt beschrieben (Schügerl, 1985):

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R \quad (3.8)$$

Mit	$F_{ein}$ :	Zulaufstrom, L h <sup>-1</sup>
	$F_{aus}$ :	Ablaufstrom, L h <sup>-1</sup>
	$c_i$ :	Konzentration der Komponente $i$ im Reaktor, g L <sup>-1</sup>
	$c_{i,ein}$ :	Konzentration der Komponente $i$ im Zulauf, g L <sup>-1</sup>
	$c_{i,aus}$ :	Konzentration der Komponente $i$ im Ablauf, g L <sup>-1</sup>
	$r_i$ :	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente $i$ , g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
	$V_R$ :	Volumen des Reaktionsansatzes, L

Für Bioreaktoren sind dabei drei unterschiedliche Betriebsweisen beschrieben: Satzbetrieb, kontinuierlicher Betrieb und halb-kontinuierlicher Betrieb.

### Satzbetrieb

Im Satzbetrieb werden alle benötigten Nährstoffe zu Prozessbeginn im Reaktionsansatz vorgelegt und keine Medien während des Betriebes zugeführt. Ausnahmen stellen hierbei Titrationsmittel und gasförmige Substanzen wie zum Beispiel zur Versorgung mit Sauerstoff dar. Somit ergibt sich ein näherungsweise konstantes Volumen des Reaktionsansatzes  $V_R$ . Durch diese einfachste Betriebsweise des Rührkesselreaktors kann die in (3.8) gezeigte Gleichung wie folgt vereinfacht werden:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad (3.9)$$

### Kontinuierlicher Betrieb

Im kontinuierlichen Betrieb werden dem Bioreaktor Nährstoffe mit einem konstanten Zulaufstrom  $F_{ein}$  von außen zugeführt. Um ein gleichbleibendes Volumen des Reaktionsansatzes zu gewährleisten, wird gleichzeitig Zellsuspension aus dem Reaktor entnommen (Ablaufstrom  $F_{aus}$ ). Hierdurch ist es möglich die im Reaktionsansatz vorliegenden Konzentrationen  $c_i$  konstant zu halten. Es ergibt sich aus (3.8) die folgende Darstellung der Stoffbilanz:

$$0 = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R \quad (3.10)$$

Bei gleichen Volumenströmen im Zu- und Ablauf erfolgt die Definition der Verdünnungsrate  $D$  (aus dem Englischen ‚*dilution rate*‘) zu:

$$D \equiv \frac{F}{V_R} = \frac{F_{ein}}{V_R} = \frac{F_{aus}}{V_R} \quad (3.11)$$

Mit  $F$ : Volumenstrom,  $L h^{-1}$

Dies erlaubt die Vereinfachung von Gleichung (3.10) zu:

$$r_i = D \cdot (c_{i,aus} - c_{i,ein}) \quad (3.12)$$

### Halb-kontinuierlicher Betrieb

Beim halb-kontinuierlichen Betrieb von Bioreaktoren werden dem Reaktionsansatz von außen ein oder mehrere Nährstoffe zugeführt. Aus diesem Grund wird diese Betriebsweise auch oft als „Zulaufverfahren“ bezeichnet. Auf einen Ablauf wie beim kontinuierlichen Betrieb wird hingegen verzichtet. Vorteile gegenüber dem Satzbetrieb ergeben sich durch die Möglichkeit der substratlimitierenden Medienzufuhr, durch welche Substratüberschussinhibierungen und Sauerstofflimitierungen vermieden werden können. Im Vergleich zum kontinuierlichen Betrieb sind hingegen die vereinfachte Handhabung und das einfachere „Anfahren“ des Prozesses zu nennen (Schügerl, 1985).

Durch den Wegfall des Volumenstroms im Ablauf vereinfacht sich die in (3.8) genannte Gleichung zu:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R \quad (3.13)$$

Aufgrund der stetigen Volumenzufuhr von außen erfolgt eine Verdünnung des Reaktionsansatzes  $V_R$ , was eine getrennte Beschreibung der zeitlichen Änderungen der Prozessparameter  $V_R$  und  $c_i$  notwendig macht.

$$V_R \cdot \frac{dc_i}{dt} + c_i \cdot \frac{dV_R}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R \quad (3.14)$$

Gleichzeitig wird die Volumenänderung durch den Zulauf-Volumenstrom  $F_{ein}$  beschrieben:

$$\frac{dV_R}{dt} = F_{ein} \quad (3.15)$$

Durch Einsetzen von (3.15) in (3.14) und anschließender Umformung ergibt sich folgende vereinfachte Beschreibung der zeitlichen Konzentrationsänderung einer beliebigen Komponente  $i$  im Reaktionsansatz:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F_{ein}}{V_R} \cdot (c_{i,ein} - c_i) + r_i \quad (3.16)$$

Um nun gezielt eine bestimmte Substratkonzentration im Reaktor konstant zu halten oder ein substratlimitiertes Zulaufverfahren zu realisieren, wird mathematisch gesehen keine zeitliche Änderung der im Reaktor vorliegenden Substratkonzentration ( $dc_s/dt=0$ ) zugelassen. Hierdurch ergibt sich aus (3.16) der einzustellende Zulaufvolumenstrom  $F_{ein}$ :

$$F_{ein} = \frac{-V_R \cdot r_S}{(c_{S,ein} - c_S)} \quad (3.17)$$

Die entsprechende Reaktionsrate  $r_S$  wird durch die biomassespezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  beschrieben:

$$-r_S = q_S \cdot c_X \quad (3.18)$$

Unter Annahme einer zeitlich unveränderten Biomasseausbeute  $Y_{X/S}$  und Nichtberücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels folgt somit aus Gleichung (3.17) mit (3.18) und (3.7):

$$F_{ein} = \frac{V_R \cdot c_X}{(c_{S,ein} - c_S) \cdot Y_{X/S}} \cdot \mu_{Soll} \quad (3.19)$$

Mit  $\mu_{Soll}$ : Einstellende Wachstumsrate,  $h^{-1}$

Sowohl das Reaktionsvolumen  $V_R$  als auch die Biomassekonzentration  $c_X$  sind dabei zeitlich veränderliche Größen. Diese Zeitabhängigkeit kann zum Beispiel durch die exponentielle Wachstumskinetik (Gleichung 3.3) beschrieben werden:

$$F_{ein}(t) = \frac{V_R^0 \cdot c_X^0 \cdot \mu_{Soll}}{(c_{S,ein} - c_S) \cdot Y_{X/S}} \cdot e^{\mu_{Soll} \cdot t} \quad (3.20)$$

Mit  $V_R^0$ : Initiales Reaktionsvolumen, L

Wie von Jenzsch *et al.* (2006) beschrieben, wird durch das in Gleichung (3.20) dargestellte Zulaufverfahren eine Selbstregulation der spezifischen Reaktionsraten ermöglicht. Voraussetzung hierfür ist, dass eine Limitation nur durch das zugeführte Substrat vorliegt und keine wachstumsinhibierenden Substanzen gebildet werden.

### 3.1.3 Bestimmung spezifischer Reaktionsraten

Spezifische Reaktionsraten können aus experimentell bestimmten Konzentrationsverläufen abgeschätzt werden. Im Zeitraum eines vorliegenden Fließgleichgewichtes ermöglicht die Regressionsanalyse dabei eine Linearisierung der experimentell bestimmten Daten. Liegt im betrachteten kurzen Messzeitraum keine oder eine nichtauflösbare Konzentrationsänderung des Biokatalysators vor, erfolgt die mathematische Beschreibung der spezifischen Reaktionsraten über die gemittelte Biomassekonzentration  $\bar{c}_X$  (Link, 2009):

$$c_i(t) = c_i^0 + q_i \cdot \bar{c}_X \cdot t \quad (3.21)$$

In aeroben Prozessen ermöglicht die quantitative Erfassung der Abgaszusammensetzung die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme (aus dem Englischen ‚oxygen uptake rate‘ **OUR**) und Kohlendioxidbildung (aus dem Englischen ‚carbon evolution rate‘ **CER**). Grundlage hierfür stellt die Beschreibung des Sauerstoffeintrages im Medium (aus dem Englischen ‚oxygen transfer rate‘ **OTR**) durch Massenbilanzierung in der Gasphase dar.

$$OTR = \frac{\dot{V}_{Gas}^{ein} \cdot x_{O_2}^{ein} - \dot{V}_{Gas}^{aus} \cdot x_{O_2}^{aus}}{V_R \cdot V_M} \quad (3.22)$$

Mit  $\dot{V}_{Gas}^{ein}$ : Gasvolumenstrom im Einlass, L h<sup>-1</sup>

$\dot{V}_{Gas}^{aus}$ : Gasvolumenstrom im Auslass, L h<sup>-1</sup>

$x_{O_2}^{ein}$ : Molanteil Sauerstoff im Einlass, -

$x_{O_2}^{aus}$ : Molanteil Sauerstoff im Auslass, -

$V_M$ : Molares Volumen eines idealen Gases (22,414 L mol<sup>-1</sup>)

Der Gasvolumenstrom im Auslass lässt sich durch den Eingangsvolumenstrom und die Bilanzierung der Inertgas-Anteile beschreiben:

$$\dot{V}_{Gas}^{ein} \cdot x_{Inert}^{ein} = \dot{V}_{Gas}^{aus} \cdot x_{Inert}^{aus} \quad (3.23)$$

Mit:

$$x_{Inert} + x_{O_2} + x_{CO_2} = 1 \quad (3.24)$$

Aus den Gleichungen (3.23) und (3.24) folgt somit:

$$\dot{V}_{Gas}^{ein} \cdot \theta = \dot{V}_{Gas}^{aus} \quad (3.25)$$

$$\theta = \frac{1 - x_{O_2}^{ein} - x_{CO_2}^{ein}}{1 - x_{O_2}^{aus} - x_{CO_2}^{aus}} \quad (3.26)$$

Unter der Annahme  $OTR=OUR$  ergibt sich aus Gleichung (3.25) und (3.26) somit:

$$OUR = \frac{\dot{V}_{Gas}^{ein}}{V_R \cdot V_M} (x_{O_2}^{ein} - \theta \cdot x_{O_2}^{aus}) \quad (3.27)$$

Analog gilt für die  $CER$ :

$$CER = \frac{\dot{V}_{Gas}^{ein}}{V_R \cdot V_M} (\theta \cdot x_{CO_2}^{aus} - x_{CO_2}^{ein}) \quad (3.28)$$

Durch Division der Raten für  $OUR$  und  $CER$  durch die jeweils vorliegende Biomassekonzentration wird abschließend eine Beschreibung der spezifischen Raten von  $OUR$  und  $CER$  möglich.

## 3.2 Metabolische Analysen

Um Ansatzpunkte für eine gezielte Modifikation des Zellstoffwechsels identifizieren zu können, ist eine umfangreiche Kenntnis der beteiligten Enzyme und aktiven Stoffwechselwege notwendig. Metabolische Analysen sind experimentelle Techniken, die eine solche Datengewinnung *in vivo* ermöglichen. Hierbei wird zwischen dynamischen und stationären Ansätzen unterschieden. Beide beinhalten die Störung eines metabolischen Gleichgewichtes und die anschließende Analyse der zellulären Reaktion.

### 3.2.1 Dynamische metabolische Analysen

Dynamische metabolische Analysen, oftmals auch als Pulsexperimente bezeichnet, dienen primär zur *in vivo* Bestimmung von Enzym-Kinetiken (Magnus *et al.*, 2006; Oldiges und Takors, 2005). Grundlage für solche Analysen stellt dabei meist ein kontinuierlicher Prozess unter metabolisch stationären Bedingungen dar. Die Störung dieses metabolischen Gleichgewichtes kann durch unterschiedliche Vorgehensweisen erreicht werden. Neben einem abrupten Wechsel der Kohlenstoffquelle (Visser *et al.*, 2004) wird meist eine Veränderung der Substratverfügbarkeit durchgeführt, zum Beispiel durch einen Substratpuls (Chassagnole *et al.*, 2002; Mashego *et al.*, 2007b; Nasution *et al.*, 2006; Visser *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006). Ebenso sind Gleichgewichtsauslenkungen durch Variation von Prozess-Größen wie der Sauerstoffversorgung beschrieben (Mashego *et al.*, 2007b). In allen diesen Ansätzen wird eine Auslenkung des metabolischen Gleichgewichts und somit eine zeitabhängige Veränderung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen beschrieben (Magnus *et al.*, 2006). Durch eine zeitlich hochauflösende Probenahme und anschließende Quantifizierung der intrazellulären Metabolite ist eine Charakterisierung der dynamischen Antwort der Zelle auf die Gleichgewichtsstörung möglich.

In den meisten Studien zur dynamischen metabolischen Analyse erfolgt die Auslenkung des metabolischen Gleichgewichts direkt im Rührkesselreaktor, in dem auch das Gleichgewicht eingestellt wurde (Mashego *et al.*, 2007b; Nasution *et al.*, 2006; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2006). Nachteile ergeben sich hierbei durch die Zeit, die abhängig vom Prozess notwendig sein kann, bis das ausgelenkte metabolische Gleichgewicht wieder den Zustand vor der Auslenkung erreicht. Im ungünstigsten Fall kann pro Kultivierung nur eine dynamische Auslenkung untersucht werden (Aboka *et al.*, 2006).

Eine Alternative stellen Techniken wie der „*Bioscope*“ Reaktor dar, welche die Durchführung von dynamischen metabolischen Analysen parallel zum operierenden Gleichgewichtsreaktor ermöglichen (Mashego *et al.*, 2006; Visser *et al.*, 2002). Der „*Bioscope*“ Reaktor basiert dabei auf einem Strömungsrohrreaktor, welcher über ein Ventil mit dem im metabolischen Gleichgewicht befindlichen Rührkesselreaktor verbunden ist (Visser *et al.*, 2002; Wu *et al.*,



2006). Zur Störung des Gleichgewichtes wird Zellsuspension mit einer konstanten Flussrate aus dem Rührkesselreaktor durch den Strömungsrohrreaktor geleitet und am Reaktoreingang mit einer Substratlösung versetzt. Eine Vielzahl an Ventilen, die in unterschiedlichen Abständen zum Reaktoreingang positioniert sind, ermöglichen dabei eine zeitlich hochauflösende Probenahme.

### 3.2.2 Stationäre metabolische Analysen

Die Zielsetzung von stationären metabolischen Analysen ist es, mehrere unterschiedliche Fließgleichgewichtszustände zur Charakterisierung des Zellstoffwechsels zu nutzen. Vergleichbar zu den dynamischen Studien wird auch bei den meisten Ansätzen zur stationären metabolischen Analyse ein kontinuierlicher Prozess zur Realisierung des initialen metabolischen Fließgleichgewichtes genutzt (Kresnowati *et al.*, 2008; Nasution *et al.*, 2008). Neben dieser kontinuierlichen Prozessführung ist auch die halb-kontinuierliche Betriebsweise unter Wachstum-kontrollierenden Zulaufbedingungen beschrieben (Link *et al.*, 2010).

Die anhaltende Auslenkung des initialen Fließgleichgewichtes erfolgt durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle (Link *et al.*, 2010), das Einstellen einer vom Ausgangszustand abweichenden Substratverfügbarkeit (Nasution *et al.*, 2008) oder durch Änderung anderer Prozessparameter, zum Beispiel Änderung des pH (Kresnowati *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu dynamischen Analysen, bei welchen die initiale Reaktion der Zellen auf die Änderung der Bedingungen verfolgt wird, ist bei stationären Analysen das sich ausbildende neue metabolische Gleichgewicht von Interesse. Zur Charakterisierung dieses neuen metabolischen Gleichgewichtes erfolgt die Bestimmung von extrazellulären und intrazellulären Stoffflüssen sowie die intrazelluläre Metabolom-Analyse (Kresnowati *et al.*, 2008; Link *et al.*, 2010; Nasution *et al.*, 2008). Gegenüber der dynamischen Analyse ist somit für die stationäre Analyse von Reaktionsnetzwerken vor allem der Wegfall einer zeitlich hochauflösenden Probenahme und der damit verbundene geringere analytische Aufwand von Vorteil (Link *et al.*, 2010). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung eines neuen Fließgleichgewichtes innerhalb weniger Minuten nachweisbar ist und dass innerhalb dieser kurzen Analysenzeit keine Änderung des zellulären Proteoms erfolgt (Link *et al.*, 2010). Der identische Proteomhaushalt der einzelnen metabolischen Fließgleichgewichtszustände ermöglicht die Nutzung stationärer Methoden zur Datengewinnung für Berechnungsansätze zur *in vivo* Bestimmung von stoffflusskontrollierenden Reaktionen (beispielsweise Metabolische Kontrollanalyse (MCA)).

Analog zu dynamischen metabolischen Analysen, erfolgt auch in vielen Studien zu stationären metabolischen Analysen die Auslenkung des metabolischen Gleichgewichtes direkt im Rührkesselreaktor, in dem auch das initiale Gleichgewicht eingestellt wurde

(Kresnowati *et al.*, 2008; Nasution *et al.*, 2008). Nachteile ergeben sich hierbei durch die Zeit, die benötigt wird, um nach Charakterisierung des ausgelenkten Gleichgewichtes das initiale Gleichgewicht wieder einzustellen. Gleichzeitig können langfristige Auslenkungen des metabolischen Systems Einfluss auf den eigentlichen Prozess nehmen (Aboka *et al.*, 2006). Gerade im Falle eines sich schnell ändernden Metabolismus, wie er in industriellen Prozessen mit rekombinanten Stämmen vorliegen kann, beeinflusst eine andauernde Auslenkung des Stoffwechsels den Prozess nachhaltig. Eine Alternative stellen analog zu dynamischen Analysen Techniken dar, welche die Durchführung von stationären metabolischen Analysen parallel zum operierenden Gleichgewichtsreaktor ermöglichen. Beispiele hierfür sind die Methoden des „*Biocurve*“ Reaktors (Aboka *et al.*, 2006) und der „metabolischen Kurzzeitanalyse nach schnellem Medienwechsel“ (aus dem Englischen ‚*rapid media transition*‘ **RMT**) (Link *et al.*, 2010).

Der Ansatz des „*Biocurve*“ Rohrreaktors ähnelt dem „*Bioscope*“ Reaktor für dynamische metabolische Analysen (Aboka *et al.*, 2006). Auch bei Verwendung des „*Biocurve*“ Reaktors wird Zellsuspension aus dem im Gleichgewicht befindlichen Rührkesselreaktor zusammen mit dem Substrat in den Analysenreaktor gepumpt. Im Gegensatz zum „*Bioscope*“ Reaktor verfügt der „*Biocurve*“ Reaktor jedoch über eine interne Medienrückführung, die eine ideale Durchmischung des Systems ermöglicht.

Auch der Ansatz zur „metabolischen Kurzzeitanalyse nach schnellem Medienwechsel“ ermöglicht eine Auslenkung des metabolischen Gleichgewichtes parallel zu einem im Gleichgewicht befindlichen Prozess (Link *et al.*, 2010). Hierzu wird Zellsuspension aus dem „großen“ Rührkesselreaktor entnommen und das Kulturmedium schnell durch Zentrifugation abgetrennt. Nach Resuspendieren der Zellen in frischem Medium wird die Zellsuspension in einen parallel zum Prozess arbeitenden „kleinen“ Laborrührkesselreaktor überführt. In diesem Analysenreaktor erfolgt die eigentliche Auslenkung des metabolischen Gleichgewichtes durch den Einsatz verschiedener Kohlenstoffquellen oder durch das Einstellen einer anderen Substratverfügbarkeit. Im Gegensatz zu den speziell entwickelten Reaktoren der „*Bioscope*“- oder „*Biocurve*“-Ansätze kann im Falle der *RMT* auf kommerziell verfügbare Laborrührkesselsysteme zurückgegriffen werden. Dies ermöglicht die Verwendung von standardisierten und etablierten Systemen zur Online-Sensorik von pH und gelöstsauerstoffkonzentration, zur Detektion von Abgaskomponenten wie Sauerstoff und Kohlendioxid sowie zur Regelung von pH und Substratzufuhr. Nachteile ergeben sich bei der *RMT* durch die geringe zur Verfügung stehende Analysenzeit, bevor die Zellen durch Anpassung des Proteoms auf die geänderten Reaktionsbedingungen reagieren können. Link *et al.* (2010) konnten für einen Analysenzeitraum von rund 30 Minuten ein unverändertes Proteom bei *E. coli* nachweisen.

### 3.3 Metabolom-Quantifizierung

Die qualitative und quantitative Erfassung möglichst vieler intrazellulärer Metabolite wird unter dem Begriff „Metabolomics“ zusammengefasst. Eine besondere Herausforderung bei der quantitativen Bestimmung intrazellulärer Metabolite stellt dabei ihre hohe Umsetzungsgeschwindigkeit dar. Im Gegensatz zum unveränderlichen Genom und zu den langen Änderungszeiten des Proteoms (Minuten bis Stunden) stellt das Metabolom die Ebene dar, auf welcher der Organismus innerhalb von Sekundenbruchteilen auf neue Umweltgegebenheiten reagieren kann (Goodacre *et al.*, 2004). Diese hohen Umsetzungsgeschwindigkeiten ( $\text{mM s}^{-1}$ ) und die geringen vorliegenden, um Größenordnungen variierenden intrazellulären Konzentrationen (nM–mM) wirken sich negativ auf die Quantifizierbarkeit aus (Rabinowitz, 2007). Auch die hohe chemische und physikalische Metabolit-Diversität erschwert diesen Prozess (Wu *et al.*, 2005).

Erste Ansätze zur Quantifizierung von Stoffwechselintermediaten in *E. coli* gehen auf die frühen 1970er Jahre zurück (Lowry *et al.*, 1971). Seitdem wurden signifikante Weiterentwicklungen sowohl bei den verwendeten Methoden der Probengewinnung als auch bei den verwendeten Quantifizierungstechniken erzielt. Trotz der im Vergleich zu frühen Ansätzen enorm verbesserten Nachweisbarkeit von intrazellulären Metaboliten stellt die Metabolom-Analyse auch heute noch einen der herausforderndsten und sich am schnellsten entwickelnden Bereiche der Biotechnologie dar. Neuere Entwicklungen werden dabei von Link *et al.* (2012), Mashego *et al.* (2007a), Rabinowitz (2007) und Zenobi (2013) zusammengefasst.

Generell lassen sich die bei der Metabolom-Quantifizierung notwendigen Arbeitsschritte in folgende Teilgebiete gliedern:

- Probenahme und Inaktivierung des Stoffwechsels
- Extraktion und Aufarbeitung
- Quantifizierung und Analyse

Ebenso gilt, dass sich alle Schritte gegenseitig beeinflussen können und jede Methodik spezifische Vor- und Nachteile mit sich bringt.

### 3.3.1 Probenahme und Inaktivierung des Stoffwechsels

Aufgrund der hohen intrazellulären Umsatzraten ( $\text{mM s}^{-1}$ ) und der mit niedrigen Konzentrationen vorliegenden intrazellulären Metabolite ( $\text{nM}$ – $\text{mM}$ ) werden hohe Anforderungen an die eigentliche Probenahme zur Metabolom-Quantifizierung gestellt. Neben einer Probenahmedauer von wenigen Millisekunden (de Koning und van Dam, 1992) ist eine bei der Probenahme stattfindende Inaktivierung des Zellstoffwechsels in den meisten Ansätzen zielführend.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Probenahmesystemen zur Metabolom-Analyse entwickelt. Jedes für sich ist dabei für einen bestimmten Reaktortyp und ein entsprechendes Aufarbeitungsprotokoll optimiert worden (Schädel und Franco-Lara, 2009). Die Integration des Probenahmesystems erfolgt meist direkt in den Bioreaktor oder über eine ventilgesteuerte Verbindung zum Bioreaktor. Hierbei sind Ansätze beschrieben, die bei der Probenahme die Zellsuspension in eine Inaktivierungslösung (Lange *et al.*, 2001) oder einen Wärmetauscher (Schaub *et al.*, 2006) zur dortigen Inaktivierung des Zellstoffwechsels leiten. Im Vergleich zu den in Stahlreaktoren integrierten Einbauten sind nur wenige Probenahmesysteme in einfache Labor-Glasrührkesselreaktoren integrierbar. Ein Beispiel ist das von Hiller *et al.* (2007a) beschriebene System, welches die Dispersion von Zellsuspension in einer Inaktivierungslösung durch das Anlegen von Unterdruck auf das verwendete Probenahmerohr erlaubt. Durch vollautomatisierte Systeme respektive Systeme zur kontinuierlichen Probenahme und Inaktivierung des Zellstoffwechsels werden des Weiteren hohe Probenahmefrequenzen ( $> 5 \text{ s}^{-1}$ ) ermöglicht (Larsson und Törnkvist, 1996; Weuster-Botz, 1997). Eine Gesamtlösung aus Reaktor und Probenahmesystem zur Metabolom-Quantifizierung stellt der „Bioscope“ Reaktor dar (Visser *et al.*, 2002). In diesem miniaturisierten Strömungsrohrreaktor wird Zellsuspension aus einem Laborrührkesselreaktor zusammen mit einer definierten Lösung an  $^{13}\text{C}$ -markierter Kohlenstoffquelle geleitet. Über Schaltventile kann die durch den Reaktor wandernde Zellsuspension an einer Vielzahl von Positionen des Strömungsrohres beprobt werden. In Abhängigkeit von der Entfernung zum Strömungsrohrbeginn und des eingestellten Flusses kann die Veränderung des Metabolit-Markierungsmusters zeitlich aufgelöst werden.

Analog zu der Vielzahl an Probenahmesystemen sind auch unterschiedlichste Ansätze zur Inaktivierung des Zellstoffwechsels beschrieben. Eine weit verbreitete Methode ist die Dispergierung der Zellsuspension in einer kalten Methanol-Lösung (Winder *et al.*, 2008). Des Weiteren sind vielfältige Ansätze beschrieben, welche hohe Temperaturen und unterschiedliche Säuren und Laugen verwenden (Mashego *et al.*, 2007a). Grundlegendes Problem bei der Inaktivierung von prokaryotischen Zellen ist das sogenannte ‚cell leakage‘, welches die Beschädigung und das Auslaufen der Zelle beim Inaktivierungsvorgang beschreibt, wodurch intrazelluläre Metabolite in den Kulturüberstand gelangen (Link *et al.*,

2008; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2009). Erfolgt nach der Inaktivierung des Zellstoffwechsels eine Trennung von Zellmasse und Kulturüberstand, führt dies zu signifikanten Fehlern bei der Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten. Um diese Problematik bei der Metabolomanalyse zu berücksichtigen, wird eine Extraktion der gesamten Probe (Zellmasse und Kulturüberstand) und eine anschließende rechnerische Korrektur um die extrazellulären Bestandteile empfohlen (Bolten *et al.*, 2007). Die Quantifizierung der extrazellulären Metabolite erfolgt dabei durch Vermessung einer separaten, nicht mit Inaktivierungslösung versetzten Probe. Problematisch ist hierbei das im Verhältnis zum intrazellulären Volumen große extrazelluläre Volumen des Kulturüberstandes. Hierdurch können bereits geringste extrazelluläre Konzentrationen zur Maskierung von intrazellulären Metabolit-Konzentrationen bei der rechnerischen Bilanzierung führen (Taymaz-Nikerel *et al.*, 2009). Eine Alternative, um das Auslaufen der Zellen bei der Inaktivierung zu umgehen, ist die Probenahme mit anschließender Filtration (Bolten *et al.*, 2007; Link *et al.*, 2012). Hierbei wird die Zellmasse nach der Probennahme vom Kulturüberstand abgetrennt und im Anschluss inaktiviert oder extrahiert. Durch den zusätzlichen Arbeitsschritt bis zur Inaktivierung des Zellstoffwechsels steigt das Risiko eines nicht-bilanzierbaren Metabolit-Verlustes aufgrund der in diesem Zeitraum vorliegenden metabolischen Aktivität der Zellen. Neueste Studien versuchen deswegen, Filtrationsmethoden mit Ansätzen der vollautomatisierten Probenahme zu verbinden, um die Gesamtdauer der Probenahme, Filtration und Inaktivierung zu reduzieren (da Luz *et al.*, 2014).

### 3.3.2 Extraktion und Aufarbeitung

Zielsetzung bei der Extraktion von Proben zur Metabolom-Quantifizierung ist die vollständige Freisetzung aller intrazellulären Metabolite, ohne diese zu zersetzen oder zu modifizieren. Gleichzeitig dient die Extraktion der nachhaltigen Inaktivierung von Enzymen, um eine verbleibende metabolische Restaktivität während der weiteren Probenaufarbeitung zu vermeiden. Randbedingungen für die anschließende Analyse, wie zum Beispiel niedrige Salzkonzentrationen zur Vermeidung von Ionen-Unterdrückungseffekten bei der Massenspektrometrie (Annesley, 2003), müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

Generell werden bei der Extraktion zur Metabolom-Quantifizierung zwei unterschiedliche Vorgehensweisen unterschieden. Ein Ansatz beschreibt die alleinige Extraktion der zuvor vom Kulturüberstand separierten Biomasse (beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration). Andere Ansätze beschreiben die Extraktion der gesamten Probe, gefolgt von einer anschließenden rechnerischen Korrektur bezüglich der extrazellulären Bestandteile. Die für jeden dieser Ansätze resultierenden Konsequenzen sind in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

Für die eigentliche Metabolit-Freisetzung sind vorrangig Extraktionsmethoden in kochendem gepufferten Wasser oder Ethanol üblich (Hiller *et al.*, 2007b; Winder *et al.*, 2008). Des Weiteren sind Ansätze zur Metabolit-Extraktion durch einen niedrigen oder hohen pH, Tau-Frier-Zyklen, organische Lösungsmittel oder mechanischen Aufschluss durch beispielsweise Ultraschall beschrieben (Jaki *et al.*, 2006; Rabinowitz und Kimball, 2007). Dabei wurde gezeigt, dass durch eine parallele Anwendung mehrerer Extraktionsmethoden die hohe chemische Diversität der Metabolite am besten berücksichtigt wird und dadurch die größte Anzahl an Metaboliten quantitativ erfasst werden kann (Mashego *et al.*, 2007a). Gleichzeitig muss jedoch der daraus resultierende experimentelle und analytische Mehraufwand berücksichtigt werden.

Im Anschluss an die Extraktion können Schritte zur Proben-Aufkonzentrierung, wie zum Beispiel Gefriertrocknung, die bei der Inaktivierung und Extraktion erfolgten Verdünnungsschritte kompensieren (Link, 2009).

### 3.3.3 Quantifizierung und analytische Plattformen

Wie in den Vorkapiteln beschrieben, liegen während der Probengewinnung zur Metabolom-Analyse unterschiedlichste Bedingungen bezüglich Temperatur, pH und des eingesetzten Lösungsmittels vor. Aufgrund der hohen chemischen Diversität der zu quantifizierenden Substanzen muss deshalb in Abhängigkeit vom jeweiligen Metabolit mit einem unterschiedlich starken Metabolit-Verlust durch Zersetzung oder Modifikation während des Aufarbeitungsprozesses gerechnet werden. Matrixeffekte und Ionen-Unterdrückungseffekte in der Massenspektrometrie erschweren zusätzlich die korrekte Metabolit-Quantifizierung (Annesley, 2003). Um trotz dieser Verluste und der auftretenden Analyse-Effekte eine akkurate Quantifizierung der in der Zelle vorliegenden Konzentrationen zu ermöglichen, hat sich in den letzten Jahren die Verwendung von uniform (U)-<sup>13</sup>C-markierten internen Standards in der massenspektrometrischen Metabolom-Analyse etabliert (aus dem Englischen *isotope dilution mass-spectrometry* **IDMS**) (Bennett *et al.*, 2008; Link *et al.*, 2012; Mashego *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005). Die während des Aufarbeitungsprozesses in einer bekannten Konzentration zugegebenen U-<sup>13</sup>C-markierten Metabolite ermöglichen durch ihre hohe chemische und physikalische Ähnlichkeit zu den zu analysierenden U-<sup>12</sup>C-Metaboliten eine Bilanzierung des Metabolit-Verlustes während der Aufarbeitung. Zur Gewinnung von U-<sup>13</sup>C-markierten Metaboliten ist die Extraktion von auf U-<sup>13</sup>C-markierten Substraten kultivierter Biomasse beschrieben (Wu *et al.*, 2005). Stehen entsprechende U-<sup>13</sup>C-markierte Metabolite nicht zur Verfügung, können alternativ Standard-Additionsverfahren zur korrekten Metabolit-Quantifizierung eingesetzt werden. Nachteilig sind hierbei der signifikant steigende

experimentelle Aufwand sowie die durch die notwendige Probenaufteilung drastisch erhöhte Probenanzahl.

An die verwendeten Plattformen zur Metabolom-Analyse werden hohe Ansprüche gestellt. Im idealen Fall wäre eine Methode in der Lage, alle in der Zelle vorliegenden Metabolite innerhalb eines Messdurchganges in kürzester Zeit qualitativ und quantitativ aus kleinsten Probenvolumina ohne störende Matrixeffekte zu erfassen. In der Realität kann keine der nachfolgend beschriebenen Methoden alle diese Ansprüche erfüllen.

In frühesten Ansätzen zur Metabolom-Analyse ist der Einsatz von enzymatischen Nachweismethoden oder der Dünnschichtchromatographie beschrieben (Bochner und Ames, 1982; Gancedo und Gancedo, 1973). Diese historischen Methoden wurden in den vergangenen Jahrzehnten durch um Zehnerpotenzen sensitivere Techniken ersetzt. Neben dem Einsatz der Kernspinresonanzspektrometrie (NMR) hat sich dabei vor allem die Massenspektrometrie als sensitive quantitative Messtechnik etabliert, welche die gleichzeitige Bestimmung unterschiedlichster Metabolite erlaubt. Neben der Kopplung mit Kapillar-Elektrophorese (CE-MS) stehen bei der Massenspektrometrie vor allem die Kombinationen mit vorgeschalteter Gaschromatographie (GC-MS) oder Flüssigkeitschromatographie (LC-MS) im Vordergrund (Büscher *et al.*, 2009). Die wichtigste Ionisations-Technik für Metabolom-Analysen ist die Elektronenspray-Ionisation (ESI) (Mashego *et al.*, 2007a). Ionenpaar-Zusätze im Laufmittel wie Tributylamin (TBA) stabilisieren dabei das Ionenspray bei der Ionisation und ermöglichen somit niedrigere Nachweisgrenzen (Büscher *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2007). Gleichzeitig wird durch TBA die chromatographische Metabolit-Auftrennung verbessert. Nachteilig ist jedoch die durch TBA verursachte nachhaltige Verschmutzung der empfindlichen Optikelemente im Massenspektrometer (Büscher *et al.*, 2010). Alternative Ansätze wie die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) erreichen keine vergleichbare chromatographische Auftrennung und Stabilisierung der Ionisation (Teleki *et al.*, 2015). Neueste Entwicklungen im Bereich der Flüssigkeitschromatographie wie zum Beispiel das Arbeiten bei hohen Drücken (UHPLC > 500 bar) oder niedrigsten Flussraten (nano/ $\mu$ LC, nL- $\mu$ L min<sup>-1</sup>) ermöglichen eine verbesserte chromatographische Auftrennung der Metabolite bei verkürzter Messzeit (Büscher *et al.*, 2010). Gleichzeitig können auch niedrigste Probenvolumina nutzbar gemacht werden. Durch die genannten Entwicklungen sind mittlerweile Hochleistungsmethoden beschrieben, welche beispielsweise die simultane sensitive Quantifizierung von 138 Metaboliten innerhalb einer Messzeit von 25 Minuten ermöglichen (Büscher *et al.*, 2010).

## 3.4 Metabolische Stoffflussanalyse

Intrazelluläre Stoffflüsse stellen im Gegensatz zu Metabolom, Proteom und Transkriptom eine nur indirekt bestimmbare Größe dar (Sauer, 2006). Aus diesem Grund sind für die Abschätzung von intrazellulären Stoffflüssen theoretische, modellbasierende Berechnungsansätze notwendig, welche durch experimentelle Messinformationen wie intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen und extrazelluläre Stoffflüsse gestützt werden. Diese Ansätze werden dabei allgemein unter dem Begriff der Metabolischen Stofffluss-Analyse (aus dem Englischen ‚*metabolic flux analysis*‘ **MFA**) zusammengefasst. Die verschiedenen verwendeten Methoden ermöglichen eine Untergliederung in die Gebiete der „<sup>13</sup>C-Stoffflussanalyse“ (Wiechert 2001), der „stöchiometrischen Metabolit-Bilanzierung“ (Stephanopoulos *et al.*, 1998) und der „genomweiten Metabolit-Bilanzierung“ (Oberhardt *et al.*, 2009; Orth und Palsson, 2010; Palsson, 2000).

### 3.4.1 <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen

In den vergangenen Jahren konnten signifikante Entwicklungen im Bereich der <sup>13</sup>C-Stoffflussanalysen (<sup>13</sup>C-MFA) erzielt werden (Noack *et al.*, 2011; Nöh und Wiechert, 2011; Wiechert und Nöh, 2013; Wiechert, 2001). Grundlage hierfür ist die verbesserte analytische Erfassbarkeit von intrazellulären Metaboliten, welche durch zunehmend sensitive Nachweismethoden gefördert wird (siehe Kapitel 3.3.3). Gestützt werden diese Entwicklungen durch die ansteigende Verfügbarkeit von benutzerorientierten Berechnungsplattformen für die <sup>13</sup>C-MFA (Weitzel *et al.*, 2013; Zamboni *et al.*, 2005).

Generell beschreiben alle Ansätze zur <sup>13</sup>C-MFA die Verwendung von <sup>13</sup>C-markierten Substraten als Kohlenstoffquelle. Die Bestimmung der daraus resultierenden Markierungsmuster einzelner Stoffwechsel-Intermediate mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) oder Massenspektrometrie stellt die Grundlage für die anschließende Abschätzung der intrazellulären Stoffflüsse dar.

In der ursprünglichen Methodik der <sup>13</sup>C-MFA erfolgt die intrazelluläre Stoffflussabschätzung im Zustand eines vorliegenden metabolischen und isotopischen Gleichgewichtes, wie es durch kontinuierliche Prozesse erreicht werden kann (Sauer, 2006; Wiechert, 2001; Zamboni *et al.*, 2009). Durch die Bestimmung von Markierungsmustern proteingebundener Aminosäuren können Rückschlüsse auf die Stoffflussverteilung in Stoffwechselwegen des Zentralmetabolismus gezogen werden. Nachteile werden hierbei in der langen Dauer bis zur vollständigen Markierung des Proteins und den resultierenden experimentellen Kosten gesehen (Nöh und Wiechert, 2006; Schaub *et al.*, 2008; Wiechert und Nöh, 2013). Die dabei über lange Prozesszeiten notwendigen stationären Bedingungen verhindern außerdem eine



Anwendbarkeit für die meisten industriellen Prozesse. Des Weiteren ist zur Erfassung von Stoffwechselwegen abseits des Zentralstoffwechsels eine Ausweitung der Markierungsanalyse auf jeden einzelnen Metabolit des entsprechenden Stoffwechselweges notwendig.

Neuere Ansätze beschreiben die  $^{13}\text{C}$ -MFA unter isotopisch instationären, aber metabolisch stationären Bedingungen (Noack *et al.*, 2011; Nöh und Wiechert, 2011; Nöh *et al.*, 2007; Schaub *et al.*, 2008; Wiechert und Nöh, 2013). Hierbei erfolgt ein abrupter Wechsel von einem U- $^{12}\text{C}$ -markierten Substrat auf eine Substratmischung mit definiertem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsmuster. Die quantitative Verfolgung der dabei erzielten dynamischen Veränderungen des intrazellulären Metabolit-Markierungsmusters erfordert zeitlich hochauflösende Probenahmen und sensitivste Nachweismethoden. Die mathematische Beschreibung solcher dynamischen Systeme erfolgt über mehrdimensionale Differentialgleichungssysteme. Gleichzeitig kann durch die direkte Quantifizierung von dynamischen Metabolit-Markierungsmustern auf den langzeitigen Einsatz von teuren  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffquellen verzichtet werden.

### 3.4.2 Stöchiometrische Metabolit-Bilanzierung

Allgemein können Stoffflüsse innerhalb eines metabolischen Netzwerkes durch die dynamische Massenbilanz der beteiligten Metabolite  $X_i$  korreliert werden (Schilling *et al.*, 2001):

$$\frac{dX_i}{dt} = \sum_j n_{i,j} \cdot v_j \quad (3.29)$$

Hierbei beschreibt  $v_j$  den  $j$ -ten Stofffluss im metabolischen Netzwerk. Die Reaktionsstöchiometrie wird durch den Parameter  $n_{i,j}$  wiedergegeben.

Durch Zusammenfassen aller stöchiometrischen Koeffizienten und Stoffflüsse in den Matrizen  $N$  und  $v$  wird eine Beschreibung der dynamischen Massenbilanz in Matrix-Schreibweise ermöglicht.

$$\frac{dX}{dt} = N \cdot v \quad (3.30)$$

Unter Fließgleichgewichtsbedingungen ergibt sich folgendes lineares Gleichungssystem:

$$0 = N \cdot v \quad (3.31)$$

Die Anzahl an Reaktionen innerhalb eines metabolischen Netzwerkes ist in der Regel größer als die Anzahl der beteiligten Metabolite (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Um somit unter Gleichgewichtsbedingungen eine eindeutige Lösbarkeit des linearen Gleichungssystems (3.31) zu ermöglichen, muss der Freiheitsgrad durch gemessene Größen reduziert werden. Hierzu wird bei der Methode der stöchiometrischen Metabolit-Bilanzierung zur intrazellulären

Stoffflussabschätzung auf ein stark vereinfachtes Netzwerk zurückgegriffen. Für jeden verbliebenen Freiheitsgrad muss ein Stofffluss des Vektors  $v$  experimentell bestimmt werden. Praktikabel ist hierbei zum Beispiel die Bestimmung von extrazellulären Stoffflüssen.

Wie Stephanopoulos *et al.* (1998) beschreiben, kann der Stoffflussvektor  $v$  aus Gleichung (3.31) dazu in die gemessenen Stoffflüsse  $v_m$  und in die berechneten Stoffflüsse  $v_c$  unterteilt werden:

$$0 = N_m \cdot v_m + N_c \cdot v_c \quad (3.32)$$

Im Falle eines bestimmten Systems mit einer invertierbaren, quadratischen Matrix  $N_c$  können die nicht gemessenen Stoffflüsse  $v_c$  wie folgt berechnet werden:

$$v_c = -N_c^{-1} \cdot N_m \cdot v_m \quad (3.33)$$

Für überbestimmte Systeme wird die Lösbarkeit durch Verwendung der Moore-Penrose Pseudo-Inversen ermöglicht (Stephanopoulos *et al.*, 1998):

$$v_c = -N_c^\# \cdot N_m \cdot v_m \quad (3.34)$$

Die Methodik der stöchiometrischen Metabolit-Bilanzierung ermöglicht somit die Abschätzung von intrazellulären Stoffflüssen in stark vereinfachten metabolischen Netzwerken.

### 3.4.3 Genomweite Metabolit-Bilanzierung

Aufgrund der begrenzten Anzahl an direkt messbaren Stoffflüssen ist das lineare Gleichungssystem  $0 = N \cdot v$  in großen stöchiometrischen Netzwerken stark unterbestimmt. Gleichzeitig hat die Genom-Sequenzierung und Annotation von *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2006) zu einer signifikanten Erweiterung der metabolischen *E. coli* Modelle geführt (Reed und Palsson, 2003). Einfache Modelle mit 14 Reaktionen (Majewski und Domach, 1990) konnten dabei nach und nach zu genomweiten Modellen mit 931 Reaktionen (Modell: *iJR904*; (Reed *et al.*, 2003)) respektive 1387 Reaktionen (Modell: *iAF1260*; (Feist *et al.*, 2007)) und 1473 Reaktionen (Modell: *iJO1366*; (Orth *et al.*, 2011)) erweitert werden. Um eine intrazelluläre Stoffflussabschätzung innerhalb solch großer Modelle zu ermöglichen, wurden Ansätze zur genomweiten Metabolit-Bilanzierung entwickelt, die durch Einführung weiterer Bedingungen und Annahmen eine Bestimmbarkeit ermöglichen (aus dem Englischen ‚constraint based approaches‘) (Becker *et al.*, 2007; Bordbar *et al.*, 2014; McCloskey *et al.*, 2013; Orth und Palsson, 2010; Palsson, 2000; Schilling *et al.*, 2001).

Im Folgenden werden drei aufeinander aufbauende unterschiedliche Ansätze zur genomweiten Metabolit-Bilanzierung näher erläutert: „Flussbilanz-Analyse“ (aus dem Englischen *flux balance analysis* ‘**FBA**’), „Flussvarianz-Analyse“ (aus dem Englischen *flux variability analysis* ‘**FVA**’) und „geometrische FBA“ (aus dem Englischen *geometric FBA* ‘**gFBA**’). Ein grafischer Vergleich der drei Ansätze ist im Anschluss durch Abbildung 3.2 gegeben.

### Flussbilanz-Analyse (FBA)

Die FBA stellt einen der ersten Ansätze dar, intrazelluläre Stoffflüsse innerhalb komplexer Netzwerke abzuschätzen (Edwards und Palsson, 2000; Palsson, 2000; Schilling *et al.*, 2001). Hierbei steht im ersten Schritt die Beschreibung des möglichen Lösungsraumes der Stoffflussverteilungen im Vordergrund. Zur Beschränkung des Lösungsraumes werden dabei grundlegende physikalisch-chemische Regeln wie die Reaktionsstöchiometrie (Massenbilanz), thermodynamische Randbedingungen (Reaktionsreversibilität und Reaktionsrichtung) sowie enzyme-spezifische Randbedingungen (maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$ ) verwendet (Beard *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2002; Reed und Palsson, 2003; Reed, 2012). Dies ermöglicht eine Begrenzung der Lösungsfreiheit jedes einzelnen Stoffflusses  $v_i$ :

$$\alpha_i \leq v_i \leq \beta_i \quad (3.35)$$

Der Grad der Begrenzung kann hierbei reaktionsabhängig angepasst werden. So können zum Beispiel gemessene extrazelluläre Raten mit sehr engen Wertebereichen versehen werden, wohingegen bei intrazellulären Reaktionen meist lediglich die vorliegende Stoffflussrichtung oder die Möglichkeit zur Stoffflussumkehr begrenzt wird.

Innerhalb des so aufgespannten möglichen Lösungsraumes erfolgt die Abschätzung der tatsächlich in der Zelle vorliegenden Stoffflussverteilung (Reed *et al.*, 2003). Hierfür werden klassische Optimierungsverfahren zur Lösung des linearen Gleichungssystems eingesetzt. Hierzu wird eine Optimierungsgröße  $Z$  durch Linearkombination aller Stoffflüsse  $v_i$  mit der Gewichtung  $w_i$  maximiert (Orth und Palsson, 2010):

$$\max Z_{opt} = \sum_i w_i \cdot v_i \quad (3.36)$$

Die Optimierungsgröße beschreibt dabei einen einzelnen Stofffluss des Gleichungssystems. Häufig verwendete Kriterien sind die Optimierung auf Biomassebildung, Bildung eines bestimmten Metaboliten oder die Energiebereitstellung in Form von ATP (Schuetz *et al.*, 2007).

Einschränkungen ergeben sich für die FBA durch die methodische Notwendigkeit eines vorliegenden Fließgleichgewichtes sowie durch die Beschränkung auf singuläre Lösungen (siehe Abbildung 3.2). Auch die fehlende Berücksichtigung von Regulationsmechanismen wird kritisch betrachtet (Orth und Palsson, 2010).

### Flussvarianz-Analyse (FVA)

Der durch die Evolution geprägte mikrobielle Stoffwechsel besitzt eine große Anzahl an redundanten Stoffwechselwegen, die es ermöglichen, unter unterschiedlichsten Bedingungen Wachstum oder Erhaltungsstoffwechsel zu betreiben. Durch diese alternativen Stoffwechselwege ist es möglich, dass angestrebte Optimierungsgrößen (beispielsweise Wachstum) durch unterschiedliche Stoffflussverteilungen identisch erzielt werden. Ein Nachweis solcher ausweichenden Flussverteilungen konnte durch Markierungsexperimente erbracht werden (Flores *et al.*, 2002). Hierbei wurde durch eine veränderte Möglichkeit der Glucose-Aufnahme (PTS oder GalP-Permease) ein signifikanter Unterschied in der Stoffflussverteilung des Zentralstoffwechsels hervorgerufen.

Um die metabolische Redundanz der Stoffflussverteilungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung zu berücksichtigen, wurde die Methodik der FVA entwickelt (Mahadevan und Schilling, 2003). Analog zur FBA wird hierbei im ersten Schritt eine optimale Lösung durch Linearkombination aller Stoffflüsse ermittelt. Für die folgenden Schritte wird der berechnete Wert der Optimierungsgröße  $Z_{opt}$  fixiert. In einer Folge aus einzelnen Optimierungen wird jeder einzelne Stofffluss  $v_i$  maximiert und anschließend minimiert, um die Varianz der einzelnen Flüsse hinsichtlich der fixierten Gesamtlösung zu ermitteln.

$$\begin{array}{ll}
 \max v_i & \\
 \min v_i & \text{für } i = 1 \dots n \quad (3.37) \\
 \hline
 s.t. & N \cdot v = 0 \\
 & f^T v \geq k Z_{opt} \quad \text{für } k \in [0; 1] \\
 & \alpha_i \leq v_i \leq \beta_i
 \end{array}$$

Neben Lösungen, die das fixierte Optimierungskriterium identisch beschreiben, besteht durch die Gewichtung des Varianzkriteriums  $k$  auch die Möglichkeit, Lösungen zu berücksichtigen, die das Kriterium annähernd erfüllen.

Insgesamt ermöglicht die FVA somit die Aufspannung eines Lösungsraumes, welcher durch die bestimmten Minima und Maxima (Eckpunkte) definiert ist (siehe Abbildung 3.2). Eine rechenintensive Bestimmung aller möglichen Einzel-Lösungen wird hierdurch vermieden.

### Geometrische FBA (gFBA)

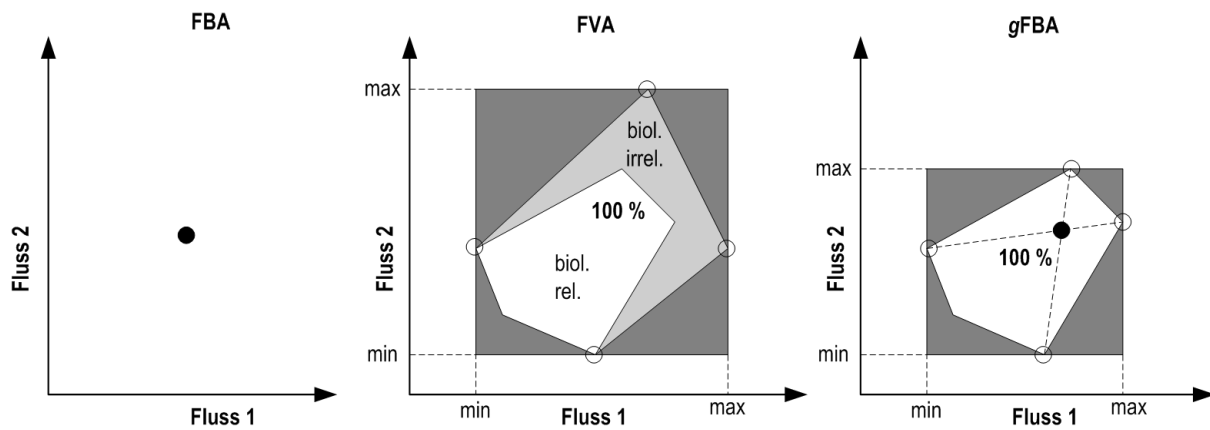
Mit den in der FVA bestimmten minimalen und maximalen Grenzen des Lösungsraumes ist im mathematischen Sinn die Erfüllung des Varianzkriteriums realisiert. Dennoch müssen die Ergebnisse in biologisch relevante und irrelevante Lösungen differenziert werden. Biologisch relevante Alternativlösungen ermöglichen die Darstellung von Stoffflussredundanzen und sind somit essentieller Bestandteil der Analyse von metabolischen Netzwerken. Nicht relevante Lösungen stellen hingegen zum Beispiel Schleifenreaktionen dar (siehe Abbildung 3.2). Diese werden durch redundante mehrstufige Stoffwechselwege erzeugt, welche den gleichen Nettofluss wie eine direkt gerichtete Reaktion besitzen. Diese mathematisch korrekte Lösung besitzt jedoch aufgrund der unrealistischen Absolut-Werte der Einzelreaktionen sowie des zusätzlich notwendigen Proteoms keinerlei biologische Relevanz. Ursache für diese Art von Lösungen in den Ansätzen zur genomweiten Metabolit-Bilanzierung ist die fehlende Berücksichtigung von Maschenregeln, wie sie für elektrische Regelkreise beschrieben sind (zweites Kirchhoff'sches Gesetz).

Ansätze zur Identifizierung von Schleifenreaktion sind durch die *lFVA* (aus dem Engl.: ‚loopless FVA‘) (Schellenberger, *et al.*, 2011) und die *tFVA* (aus dem Engl.: ‚thermodynamically constrained FVA‘) (Müller und Bockmayr, 2013) beschrieben. Hierbei werden weitere thermodynamische Randbedingungen und weiterführende Algorithmen zur Schleifenidentifikation und Elimination eingesetzt. Ein Nachteil dieser Ansätze ist die stark gesteigerte Rechenzeit (*lFVA*, Modell *iAF1260*: Zeitfaktor 300 (Schellenberger *et al.*, 2011)).

Die geometrische FBA stellt eine weitere Möglichkeit dar, biologisch irrelevante Lösungen zu vermeiden. Dabei wird im ersten Schritt als zusätzliches Optimierungskriterium die Minimierung des Gesamtstoffflusses gesetzt (Smallbone und Simeonidis, 2009).

$$\begin{array}{ll} \min \sum_i |v_i| & \text{für } i = 1 \dots n \quad (3.38) \\ \hline \text{s.t.} & N \cdot v = 0 \\ & Z = Z_{opt} \\ & \alpha_i \leq v_i \leq \beta_i \end{array}$$

Dieses zusätzliche Kriterium basiert auf der Annahme, dass der Gesamtstofffluss proportional zur benötigten Enzymmenge ist, welchen die Zelle aufgrund des notwendigen Energieaufwandes für die Enzym-Expression gering hält (Holzhütter, 2004). Durch diesen Schritt werden Schleifenreaktionen und Reaktionen mit unrealistisch hohen Umsatzraten eliminiert. Die in diesem zweistufigen Optimierungsprozess gewonnene singuläre Lösung beschreibt dabei eine geometrische Zentrierung des anfänglich definierten Lösungsraumes.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der mittels Methoden der genomweiten Metabolit-Bilanzierung (FBA: Flussbilanz-Analyse, FVA: Flussvarianz-Analyse, gFBA: Geometrische Flussbilanz-Analyse) erzielbaren Lösungen. FBA: singuläre Optimierungslösung (schwarzer Punkt) ohne Kenntnis alternativer Lösungen; FVA: Die minimal und maximal möglichen Lösungen eines Stoffflusses (Kreise) spannen einen Lösungsraum auf (Viereck), in dem Lösungen liegen, die das Optimierungskriterium zu 100 % erfüllen (weiße und hellgraue Fläche), und andere, die das Optimierungskriterium nicht zu 100 % erfüllen (dunkelgraue Fläche); gFBA: Lösungen der FVA, die das Optimierungskriterium erfüllen, werden in biologisch relevante (weiße Fläche) und irrelevante Lösungen (hellgraue Fläche) unterteilt. Durch eine zweite Optimierung werden biologisch irrelevante Lösungen entfernt. Der mögliche Lösungsraum reduziert sich, bevor durch geometrische Modellierung eine singuläre Lösung bestimmt wird (schwarzer Punkt).

### 3.5 Thermodynamische Analyse von Reaktionsnetzwerken

Metabolom- und Fluxom-Daten stellen die Grundlage für die kinetische und stöchiometrische Beschreibung von metabolischen Netzwerken dar. Trotz der stetigen Verbesserung von Analysetechniken und Apparaten ist jedoch auch heute noch keine vollständige genomweite Erfassung möglich. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren vermehrt auf die thermodynamische Analyse von Reaktionsnetzwerken zurückgegriffen (aus dem Englischen ‚*network-embedded thermodynamic analysis*‘ **NET**-Analysen). Hierbei werden thermodynamische Informationen zur weiteren Beschränkung des Reaktionsnetzwerkes (Alberty, 2006; Henry *et al.*, 2007; Jol *et al.*, 2010; Nielsen, 1997), zur Klassifizierung von Reaktionen hinsichtlich ihrer Gleichgewichtslage (Canelas *et al.*, 2011; Kümmel *et al.*, 2006) und zur Überprüfung von experimentell bestimmten Metabolom- und Fluxom-Daten (Fleming *et al.*, 2009; Kümmel *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2002) genutzt.

Grundlage der thermodynamischen Analyse von Reaktionsnetzwerken stellt das zweite Gesetz der Thermodynamik dar. Dieses beschreibt, dass eine Reaktion nur dann in eine vorgegebene Richtung ablaufen kann, wenn die entsprechende freie Gibbs'sche Reaktionsenergie  $\Delta_r G$  negativ ist.

Die freie Gibbs'sche Reaktionsenergie setzt sich dabei aus der Gibbs'schen Bildungsenergie  $\Delta_f G$  und der Reaktionsstöchiometrie zusammen:

$$\Delta_r G_j = \sum_i n_{i,j} \cdot \Delta_f G_i \quad (3.39)$$

Die Gibbs'sche Bildungsenergie ist durch die Standard Gibbs'sche Bildungsenergie  $\Delta_f G^0$ , die Reaktionstemperatur  $T$ , die universelle Gaskonstante  $R$  ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) und die beteiligten Metabolit-Konzentrationen  $X_i$  definiert:

$$\Delta_f G_i = \Delta_f G_i^0 + R \cdot T \cdot \ln X_i \quad (3.40)$$

Die Standard Gibbs'sche Bildungsenergie für eine bestimmte Reaktionsbedingung (Ionenstärke, pH, Temperatur) kann aus experimentellen Daten berechnet werden (Alberty, 1998). Hierzu werden experimentell bestimmte Bildungsenergien und Gleichgewichtskonstanten (beispielsweise aus Goldberg *et al.*, 1993) auf standardisierte Bedingungen zurückgeführt.

Alternative Ansätze ermöglichen die theoretische Beschreibung der Standard Gibbs'schen Bildungsenergie durch die Summe der Einzelenergien  $\Delta_{gr} G_i^0$  der verschiedenen Molekülgruppen eines Metaboliten (Jankowski *et al.*, 2008):

$$\Delta_f G_{theo}^0 = \sum_{i=1}^{N_{gr}} n_i \cdot \Delta_{gr} G_i^0 \quad (3.41)$$

Die Bestimmbarkeit der Standard Gibbs'schen Bildungsenergie stellt somit die Grundlage für die Berechnung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien und der thermodynamischen Analyse von stöchiometrischen Netzwerken dar.

Die genomweite Abschätzung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien für eine bestimmte Reaktion  $k$  unterliegt dabei Optimierungsprozeduren, wie sie von Kümmel *et al.* (2006) beschrieben werden.

$$\begin{array}{l}
 \min/ \max \quad \Delta_r G_k \\
 \hline
 s.t. \quad \Delta_r G_j < 0 \forall v_j > 0 \\
 \quad \quad \Delta_r G_j > 0 \forall v_j < 0 \\
 \quad \quad X_i^{min} \leq X_i \leq X_i^{max}
 \end{array} \quad (3.42)$$

Hierbei erfolgt die Bestimmung der minimalen und maximalen freien Gibbs'schen Reaktionsenergien der Reaktion  $k$  unter Berücksichtigung der Konsistenz aller übrigen Reaktionen  $j$  hinsichtlich der vorliegenden Stoffflussrichtungen und der jeweiligen freien Gibbs'schen Reaktionsenergie. Dies ermöglicht sowohl die Beschreibung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien als auch die Beschreibung von Konzentrationsbereichen nicht quantifizierbarer Metabolite.



### 3.6 Metabolische Kontrollanalyse

Die Ursprünge der metabolischen Kontrollanalyse (MCA) sind durch die Arbeiten von Heinrich und Rapoport (1974) sowie Kacser und Burns (1973) beschrieben. Seitdem wurde eine Vielzahl an Arbeiten veröffentlicht, welche eine umfassende mathematische Beschreibung des MCA-Ansatzes und seine experimentelle Umsetzung ermöglichten (Fell, 1992; Hatzimanikatis und Bailey, 1996; Visser und Heijnen, 2002).

Die MCA stellt eine mathematische Möglichkeit dar, die Kontrolle eines bestimmten Stoffflusses oder eines bestimmten Metaboliten in einem metabolischen Netzwerk quantitativ zu beschreiben. Eine genaue *in vivo* Erfassung jeder einzelnen Reaktionskinetik ist dabei nicht notwendig, was die Anwendbarkeit für komplexe metabolische Netzwerke unterstreicht. Die Beschreibung der metabolischen Kontrolle erfolgt über die sogenannten Fluss-Kontrollkoeffizienten  $C_{e_j}^{v_i}$  und Konzentrations-Kontrollkoeffizienten  $C_{e_j}^{X_i}$ :

$$C_{e_j}^{v_i} = \frac{e_j}{v_i} \frac{dv_i}{de_j} = \frac{d \ln v_i}{d \ln e_j} \quad (3.43)$$

$$C_{e_j}^{X_i} = \frac{e_j}{X_i} \frac{dX_i}{de_j} = \frac{d \ln X_i}{d \ln e_j} \quad (3.44)$$

Die Kennzahlen beschreiben, welchen quantitativen Einfluss eine Änderung einer bestimmten Enzymkonzentration  $e_j$  auf einen bestimmten Stofffluss  $v_i$  oder eine bestimmte Metabolit-Konzentration  $X_i$  nimmt.

Grundlage zur Beschreibung dieser globalen regulatorischen Parameter ist die Kenntnis der lokalen Gleichgewichtsvariablen (Stoffflüsse und Metabolit-Konzentrationen), welche in den sogenannten Elastizitäten  $\varepsilon$  zusammengefasst werden können und die spezifische Flexibilität jeder einzelnen Reaktion beschreiben.

#### 3.6.1 Abschätzung von Elastizitäten

Die Abschätzung von Elastizitäten kann direkt aus mechanistischen Modellen erfolgen. Grundlage zur Bestimmung dieser kinetischen Modelle ist die korrekte Beschreibung der mechanistischen Geschwindigkeitsgleichungen jeder einzelnen Reaktion. Aufgrund der hohen Diskrepanz zwischen den *in vitro* einstellbaren und *in vivo* vorliegenden Reaktionsbedingungen ist für die Parameteridentifikation in komplexen Ganzzellansätzen die Anwendung von dynamischen *in vivo* Bestimmungen unumgänglich (Visser und Heijnen, 2003). Dies geht mit einem hohen experimentellen, analytischen und mathematischen Aufwand einher. Gleichzeitig ergeben sich durch die *in vivo* beschränkte Auslenkbarkeit von Metabolit-Konzentrationen Grenzen bei der Parameteridentifikation (Visser und Heijnen, 2003).

Nicht-mechanistische Ansätze wie linear logarithmische Modelle (lin-log) stellen eine Alternative für mechanistische Modelle dar. Hierbei wurde gezeigt, dass lin-log Modelle die Dynamik von komplexen metabolischen Netzwerken wiedergeben können (Visser und Heijnen, 2003). Die allgemeine Reaktionsgeschwindigkeit einer beliebigen Reaktion  $j$  wird durch den lin-log Ansatz wie folgt beschrieben (Wu *et al.*, 2004):

$$v_j = e_j(a_j + p_{j,1} \ln X_1 + p_{j,2} \ln X_2 + \dots + p_{j,m} \ln X_m) \quad (3.45)$$

Die Ratengleichung ist dabei proportional zur Konzentration des katalysierenden Enzyms  $e$  und einer Linearkombination von logarithmierten Metabolit-Konzentrationen  $X_i$ . Durch Normierung der Reaktionsrate, der Enzymkonzentration und der Metabolit-Konzentrationen auf einen Referenzzustand ergibt sich folgende Beschreibung:

$$\frac{v_j}{v_j^0} = \frac{e_j}{e_j^0} \left( 1 + \varepsilon_{X_1}^{v_j} \ln \frac{X_1}{X_1^0} + \varepsilon_{X_2}^{v_j} \ln \frac{X_2}{X_2^0} + \dots + \varepsilon_{X_m}^{v_j} \ln \frac{X_m}{X_m^0} \right) \quad (3.46)$$

Oder umgeformt in Matrixschreibweise:

$$\left[ \frac{v}{v^0} \frac{e^0}{e} \right] - 1 = \left[ \ln \frac{X}{X^0} \right] [\varepsilon_X^v] \quad (3.47)$$

In dieser Form beschreiben die Elastizitäts-Koeffizienten die kinetischen Modellparameter  $p$  und geben die Auslenkbarkeit jeder einzelnen Reaktion wieder.

$$\varepsilon_{X_i}^{v_j} \equiv \frac{X_i}{v_j} \frac{\partial v_j}{\partial X_i} = \frac{\partial \ln v_j}{\partial \ln X_i} \quad (3.48)$$

Eine Alternative zum lin-log Ansatz stellt für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht die Abschätzung von Elastizitäten durch thermokinetische Modelle dar (Nielsen, 1997):

$$\varepsilon_{X_i}^{v_j} = - \frac{n_{i,j} \cdot R \cdot T}{A_j - A_j^\#} \quad (3.49)$$

Im Falle von reversiblen Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht gilt dabei für den Parameter  $A_j^\#$  ein Wert von Null (Nielsen, 1997). Damit kann eine Abschätzung der Elastizitäten direkt aus den Affinitäten  $A$  erfolgen, welche die negative Gibbs'sche Reaktionsenergie beschreiben.

### 3.6.2 Abschätzung von Kontrollkoeffizienten

Zur direkten Abschätzung von Kontrollkoeffizienten ist, wie in Gleichung (3.43) dargestellt, die Variation von Enzymaktivitäten notwendig.

Eine indirekte Beschreibung von Kontrollkoeffizienten ist durch die in Kapitel 3.8.1 eingeführten Elastizitäten gegeben. Die Verbindung von Kontrollkoeffizienten und Elastizitäten werden dabei durch die Summations- und Verbindungstheoreme (Kacser und Burns, 1973) wiedergegeben:

$$\sum_j C_{e_j}^{v_i} = 1 \quad (3.50)$$

$$\sum_j C_{e_j}^{v_i} \cdot \varepsilon_{X_i}^{v_j} = 0 \quad (3.51)$$

Die von Kacser und Burns (1973) eingeführten Theoreme beruhen auf einem frühen MCA-Ansatz, der weder Verzweigungen im Reaktionsnetzwerk noch die Erhaltung von funktionellen Einheiten berücksichtigt (Link, 2009). Es folgten eine Vielzahl an MCA-Ansätzen, welche die Struktureigenschaften von metabolischen Reaktionsnetzwerken besser erfassten. Ein Überblick dieser historischen Ansätze ist durch Visser und Heijnen (2002) gegeben, welche gleichzeitig einen technischen Ansatz zur Linearisierung der Massenbilanz-Gleichung für unabhängige Metabolite im Gleichgewichtszustand und somit eine Beschreibbarkeit von Kontrollkoeffizienten lieferten:

Ausgangspunkt ist hierzu die Massenbilanz-Gleichung, welche durch die stöchiometrische Matrix  $N$  (Metabolite  $m \times$  Stoffflüsse  $n$ ) und durch die Raten-Matrix  $v$  beschrieben wird:

$$\frac{dX}{dt} = N \cdot v \quad (3.52)$$

Hierbei sind die Reaktionsraten abhängig von der Enzymkonzentration  $e$ , der intrazellulären Metabolit-Konzentration  $X$  und der extrazellulären Metabolit-Konzentrationen  $c$ .

$$v = f(e, X, c) \quad (3.53)$$

Um skalierbare Koeffizienten beschreiben zu können, erfolgt eine Normierung von Gleichung (3.52) und (3.53) auf einen Referenzzustand (Enzym-Konzentrationen  $e_0$ , Stoffflüsse  $v_0$ , Metabolit-Konzentrationen  $X_0$  und  $c_0$ ):

$$[X_0] \frac{d \frac{X}{X_0}}{dt} = N \cdot [v_0] \cdot \frac{v}{v_0} \quad (3.54)$$

$$\frac{v}{v_0} = f\left(\frac{e}{e_0}, \frac{X}{X_0}, \frac{c}{c_0}\right) \quad (3.55)$$

Hierbei beschreibt  $[X_0]$  eine Diagonal-Matrix mit den Elementen  $[X_0]_i^i = X_0^i$  und  $[v_0]$  eine Diagonal-Matrix mit den Elementen  $[v_0]_i^i = v_0^i$ .  $(X / X_0)$  ist ein Vektor mit  $m$  Elementen der Form  $(X_i / X_{i0})$ .  $(v / v_0)$  beschreibt einen Vektor mit  $n$  Elementen der Form  $(v_i / v_{i0})$ .  $(e / e_0)$  stellt ein Vektor mit  $n$  Elementen der Form  $(e_i / e_{i0})$  dar und  $(c / c_0)$  ist ein Vektor mit  $m_c$  Elementen der Form  $(c_i / c_{i0})$ .

Die Trennung von abhängigen Metaboliten wird im Ansatz von Visser und Heijnen (2002) durch eine normierte Link-Matrix  $L_0$  berücksichtigt.

$$\left(\frac{X}{X_0} - i\right) = L_0 \cdot \left(\frac{X^{ind}}{X_0^{ind}} - i\right) \quad (3.56)$$

Der Vektor  $i$  beschreibt hierbei den Einheitenvektor. Die normierte Link-Matrix ist durch die reduzierte stöchiometrische Matrix  $N_R$  beschreibbar:

$$L_0 = [X_0]^{-1} \cdot N \cdot (N_R)^\# \cdot [X_0^{ind}] \quad (3.57)$$

Die unabhängige normierte Massenbilanz ergibt sich somit aus Gleichung (3.54) zu:

$$[X_0^{ind}] \frac{d\left(\frac{X}{X_0}\right)^{ind}}{dt} = N_R \cdot [v_0] \cdot \frac{v}{v_0} \quad (3.58)$$

Die allgemeine Form der Ratengleichung aus Gleichung (3.55) kann dabei durch Verwendung von Elastizitäten linearisiert werden.

$$\left(\frac{v}{v_0} - i\right) = E_{e_0} \cdot \left(\frac{e}{e_0} - i\right) + E_{X_0} \cdot \left(\frac{X}{X_0} - i\right) + E_{c_0} \cdot \left(\frac{c}{c_0} - i\right) \quad (3.59)$$

Hierbei beschreibt die Matrix  $E$  alle Elastizitätskoeffizienten (Reihen: Reaktionen; Spalten: Metabolite). Unter Annahme, dass die Reaktionsrate proportional zur Enzymaktivität ist, ergibt sich:

$$\frac{v}{v_0} = \frac{e}{e_0} + E_{X_0} \cdot \left(\frac{X}{X_0} - i\right) + E_{e_0} \cdot \left(\frac{c}{c_0} - i\right) \quad (3.60)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (3.60) in die unabhängige normierte Massenbilanz (3.58) folgt:

$$[X_0^{ind}] \frac{d\left(\frac{X}{X_0}\right)^{ind}}{dt} = N_R \cdot [v_0] \cdot \left[ \frac{e}{e_0} + E_{X_0} \cdot L_0 \cdot \left(\left(\frac{X}{X_0}\right)^{ind} - i\right) + E_{c_0} \cdot \left(\frac{c}{c_0} - i\right) \right] \quad (3.61)$$

Oder unter Fließgleichgewichtsbedingungen  $\left(\frac{d\left(\frac{X}{X_0}\right)^{ind}}{dt} = 0\right)$ :

$$0 = N_R \cdot [v_0] \cdot \left[ \frac{e}{e_0} + E_{X_0} \cdot L_0 \cdot \left(\left(\frac{X}{X_0}\right)^{ind} - i\right) + E_{c_0} \cdot \left(\frac{c}{c_0} - i\right) \right] \quad (3.62)$$

Durch Umformung ergibt sich:

$$\frac{X}{X_0} - i = -\Psi \cdot \frac{e}{e_0} - \Psi \cdot E_{c_0} \cdot \left( \frac{c}{c_0} - i \right) \quad (3.63)$$

mit:

$$\Psi = L_0 \cdot (N_R \cdot [v_0] \cdot E_{X_0} \cdot L_0)^{-1} \cdot N_R \cdot [v_0] \quad (3.64)$$

Aus Gleichung (3.44) und (3.63) mit (3.64) folgen die Konzentrations-Kontrollkoeffizienten:

$$C^X = \frac{e_0}{X_0} \frac{dX}{de} = \frac{d\left(\frac{X}{X_0} - 1\right)}{d\left(\frac{e}{e_0}\right)} = -L_0 \cdot (N_R \cdot [v_0] \cdot E_{X_0} \cdot L_0)^{-1} \cdot N_R \cdot [v_0] \quad (3.65)$$

Aus diesen Konzentrations-Kontrollkoeffizienten ist die Bestimmung der Fluss-Kontrollkoeffizienten möglich (detailliert in Visser und Heijnen (2002)):

$$C^{v_0} = E_{X_0} \cdot C^X + i \quad (3.66)$$

Neben dem hier aufgeführten Ansatz von Visser und Heijnen (2002) basiert auch der Ansatz von Hatzimanikatis und Bailey (1996) auf Linearisierung von Gleichung (3.60), was zu vergleichbaren Korrelationen führt.

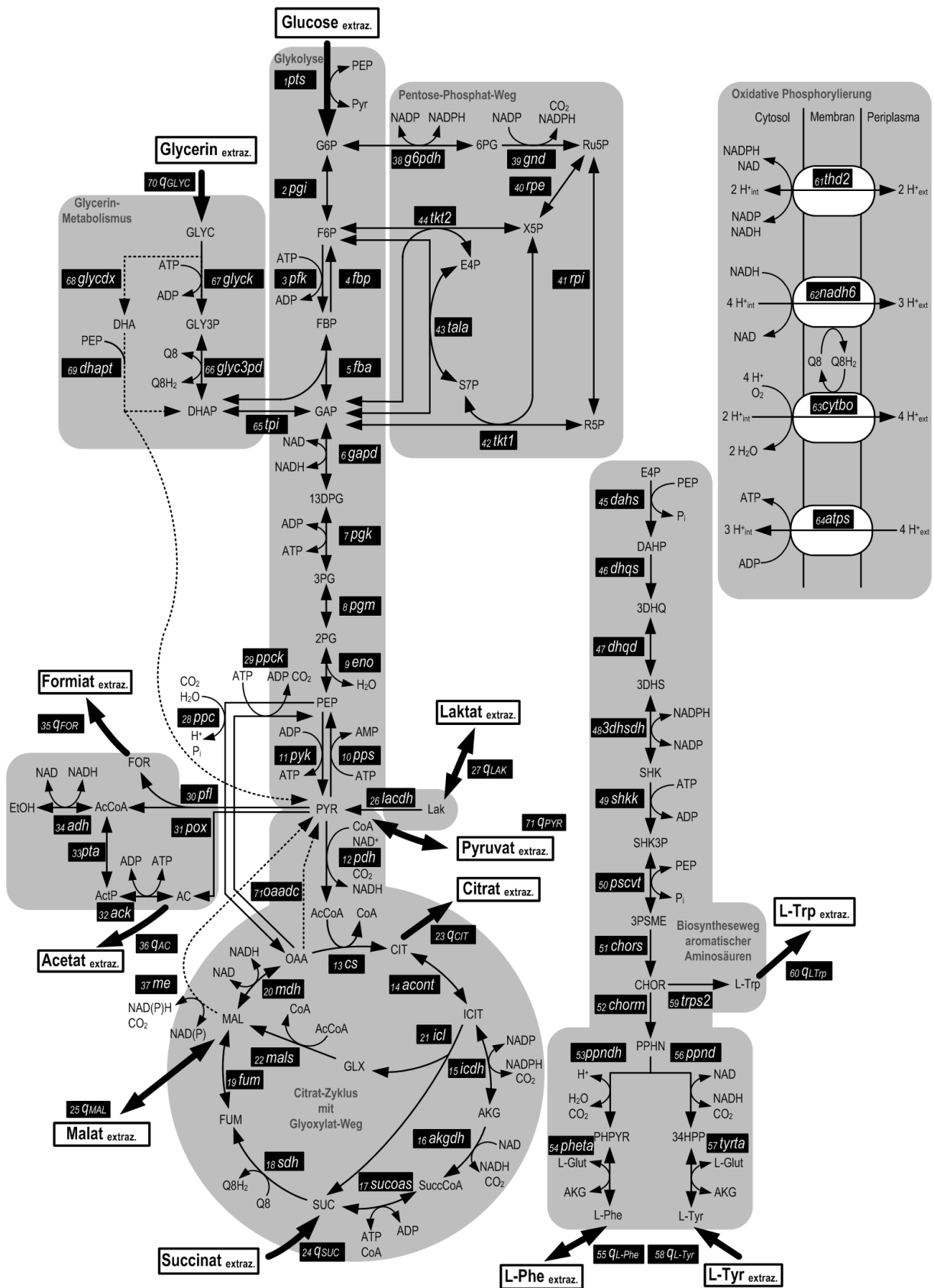
## 3.7 Biologische Grundlagen - *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein gram-negatives, fakultativ anaerobes Bakterium und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Entdeckt wurde es 1895 von dem deutsch-österreichischen Mediziner und Namensgeber Theodor Escherich. Für die meisten *E. coli*-Stämme liegt kein pathogenes Verhalten vor (Donnenberg, 2002). Zellwachstum ist für *E. coli* unter verschiedensten Umweltbedingungen beschrieben. Neben dem Wachstum in definierten Flüssigmedien und Medien mit Komplexbestandteilen ist auch das Oberflächenwachstum auf Nährplatten möglich (Storhas, 2003). Hierbei liegt ein Temperatur-Optimum von 37 °C und ein optimaler pH-Bereich von 6,5–7,3 vor. Die somit gegebenen vielfältigen Möglichkeiten zur Handhabung von *E. coli* ermöglichten eine frühzeitige, genaue Charakterisierung des Bakteriums. Die dabei erzielten Kenntnisse über den Stoffwechsel, die Enzymregulation und die Mechanismen der Signaltransduktion in Kombination mit der frühen Veröffentlichung des Genoms (Blattner *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2006) machen *E. coli* zu einem der wichtigsten Modellorganismen (Keseler *et al.*, 2013) und einem beliebten Organismus für biotechnologische Anwendungen (Storhas, 2003).

Im Folgenden werden für diese Arbeit wichtige Stoffwechselwege in *E. coli* beschrieben. Sofern nicht anders referenziert, sind diese durch *E.coli*-Datenbanken (Karp *et al.*, 2014) und das genomweite *E. coli*-Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

### 3.7.1 Zentralstoffwechsel

Der Zentralstoffwechsel von *E. coli* untergliedert sich in Glykolyse, Gluconeogenese, Citrat-Zyklus, Glyoxylat-Stoffwechsel, Pyruvat-Stoffwechsel, Pentose-Phosphat-Weg und die Atmungskette. Die einzelnen Reaktionsschritte sind in Abbildung 3.3 dargestellt und werden im Folgenden erläutert.



**Abbildung 3.3:** Vereinfachte Darstellung des Zentralstoffwechsels (Glykolyse, Gluconeogenese, Citrat-Zyklus, Pyruvat-Metabolismus, Pentose-Phosphat-Weg und Atmungskette), des Glycerin-Metabolismus und des Syntheseweges für aromatische Aminosäuren in *E. coli*.

## Glykolyse und Gluconeogenese

Die Glykolyse beschreibt die enzymatischen Reaktionen des Abbaus von Glucose zu Pyruvat. Die dazu notwendige Glucose wird über das Phosphotransferasesystem (pts) in die Zelle transportiert und dabei zu Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Die benötigte Phosphat-Gruppe wird von einem Molekül Phosphoenolpyruvat (PEP) übertragen. Mittels Phosphoglucose-Isomerase (pgi) erfolgt die Umlagerung zu Fructose-6-Phosphat (F6P). Die darauf folgende Reaktion beschreibt unter Energieverbrauch (ATP) die Umsetzung von F6P zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) durch die Phosphofruktokinase (pfk). Die katalytische Umsetzung von FBP zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehydphosphat (GAP) wird durch die Fructosebisphosphat-Aldolase (fba) realisiert. Diese phosphorylierten Dreifachzucker werden durch die Triosephosphat-Isomerase (tpi) ineinander umgewandelt. Ausgehend von GAP erfolgt die Umsetzung zu 1,3-Bisphosphoglycerat (13DPG) mittels der GAP-Dehydrogenase (gapd) unter Bildung von NADH. Unter Energiegewinn (ATP) wird 13DPG mittels der Phosphoglycerat-Kinase (pgk) zu 3-Phosphoglycerat (3PG) umgewandelt, welches durch die Phosphoglycerat-Mutase (pgm) im Gleichgewicht mit 2-Phosphoglycerat (2PG) steht. Die Enolase (eno) ermöglicht unter Wasserabspaltung die PEP-Bildung. Durch die Dephosphorylierung von PEP zu Pyruvat (PYR) mittels Pyruvatkinase (pyk) wird im letzten Schritt erneut freie Energie in Form von ATP gewonnen. Insgesamt wird in der Glykolyse somit die Umwandlung von einem Glucose-Molekül zu zwei Molekülen Pyruvat und der Regenerierung von zwei ATP-Molekülen und einer Einheit NADH ermöglicht.

Die Umkehr der glykolytischen Reaktionen wird als Gluconeogenese bezeichnet. Beim Wachstum auf Dicarbonsäuren erfolgt die erste gluconeogenetische Umsetzung entweder durch die PEP-Carboxykinase (ppck) oder durch zwei Isoformen des Malatenzyms (me). Die PEP-Carboxykinase setzt dabei Oxalacetat (OAA) unter ATP-Verbrauch und CO<sub>2</sub>-Bildung zu PEP um. Die beiden Malatenzyme (me) ermöglichen hingegen die Bildung von Pyruvat aus Malat (MAL) unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung und NADH- (*maeA* codiertes Isoenzym) respektive NADPH- (*maeB* codiertes Isoenzym) Bildung. Die Umwandlung von PYR zu PEP wird anschließend über die ATP-verbrauchende PEP-Synthase (pps) realisiert. Mit Ausnahme der Bildung von F6P aus FBP durch die Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp) werden die weiteren Reaktionen der Gluconeogenese jeweils durch die gleichen Enzyme wie bei der Glykolyse katalysiert.

## Citrat-Zyklus und Glyoxylat-Stoffwechsel

Der Citrat-Zyklus ermöglicht unter aeroben Bedingungen den maximalen Energiegewinn durch Pyruvat-Veratmung. In der vorgelagerten Reaktion der Pyruvatdehydrogenase (pdh)



wird hierzu PYR zu Acetyl-Coenzym A (AcCoA) unter NADH-Bildung decarboxyliert. In der folgenden Eingangsreaktion des Citrat-Zyklus setzt die Citratsynthase (cs) AcCoA und das Zyklusendprodukt OAA zu Citrat um. Der nachgeschalteten Umlagerung zu Isocitrat (ICIT) durch den (Iso-)Citrat-Hydrolase-Komplex (aconit) folgt die Decarboxylierung zu  $\alpha$ -Ketoglutarat (AKG) unter NADPH-Gewinnung mittels der Isocitrat-Dehydrogenase (icdh). Der Umwandlung von AKG zu Succinyl-CoA (SucCoA) unter NADH-Bildung und CO<sub>2</sub>-Abspaltung durch die AKG-Dehydrogenase (akgdh) ist die Hydrolyse zu Succinat (SUC) mittels SucCoA-Synthetase (sucoas) unter Generierung von ATP nachgeschaltet. Bei der anschließenden Bildung von Fumarat (FUM) aus SUC über die membrangebundene SUC-Dehydrogenase (sdh) werden Elektronen auf Ubichinon (Q8) übertragen. Durch Protonenaufnahme aus dem Cytoplasma wird dieses reduziert (Q8H<sub>2</sub>) (Fuchs und Schlegel, 2007). Anschließend katalysiert die Fumarase (fum) die Umsetzung von FUM zu MAL. Das Zyklus-Endprodukt OAA wird durch die MAL-Dehydrogenase (mdh) unter NADH-Bildung aus MAL gewonnen.

Um Wachstum auf niedermolekularen Kohlenstoffquellen wie zum Beispiel Acetat zu realisieren (Sauer und Eikmanns, 2005), kann in *E. coli* eine verkürzte Form des Citrat-Zyklus, der sogenannte Glyoxylat-Stoffwechsel, erfolgen. Ausgehend von ICIT erfolgt hierbei durch die Isocitrat-Lyase (icl) die Bildung von SUC und Glyoxylat (GLX), welches durch die Malat-Synthase (mals) zu MAL umgesetzt wird.

## Pyruvat-Stoffwechsel

Unter dem Begriff des Pyruvat-Stoffwechsels werden im Folgenden weitere Reaktionen zusammengefasst, welche die Bildung oder den Verbrauch eines der drei Schlüsselmetabolite PYR, OAA oder PEP ermöglichen.

Unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen wird Pyruvat in der gemischten Säuregärung umgesetzt. In der Eingangsreaktion der PYR-Formiat-Lyase (pfl) wird hierbei analog zur PYR-Dehydrogenase AcCoA gebildet. Im Unterschied zur aeroben Verwertung wird dabei anstelle von CO<sub>2</sub> Formiat (FOR) abgespalten. AcCoA kann im Folgenden über die Alkoholdehydrogenase (adh) weiter zu Ethanol (EtOH) verstoffwechselt oder über die Acetyltransferase (pta) und Acetatkinase (ack) zu Acetat (AC) umgewandelt werden. Eine direkte Acetat-Bildung aus PYR wird des Weiteren durch die PYR-Oxidase (pox) ermöglicht. Über die reversible Laktat-Dehydrogenase (lacd) wird die Bildung von PYR und NADH ausgehend von Laktat (LAK) ermöglicht. Eine Nebenproduktbildung von Laktat ist dabei alternativ auch ausgehend von DHAP über Methylglyoxal durch die Glyoxalase oder die Methylglyoxal-Reduktase möglich (nicht dargestellt).

Die PEP-Carboxylase (ppc) stellt eine PEP-verbrauchende Reaktion dar. Hierbei wird unter CO<sub>2</sub>-Fixierung das Citrat-Zyklus-Intermediat OAA gebildet. Im Gegensatz zu anderen Bakterien konnte bisher keine spezifische OAA-Decarboxylase (oaadc) in *E. coli* nachgewiesen werden (Sauer und Eikmanns, 2005). Es wurde jedoch gezeigt, dass das in *E. coli* enthaltene Multikomplexenzym der 2-keto-4-hydroxy-Glutarat-Aldolase die Funktion einer OAA-Decarboxylase übernehmen kann (Kornberg und Sadler, 1961; Patil und Dekker, 1992) und somit eine weitere Möglichkeit der Pyruvat-Bildung gegeben ist.

### **Pentose-Phosphat-Stoffwechsel**

Der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel ist durch die drei Metabolite G6P, F6P und GAP mit der Glykolyse verbunden und gewährleistet die Bildung von Erythrose-4-Phosphat (E4P) für die Aromatenbiosynthese und die NADPH-Bereitstellung.

Im oxidativen Zweig des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels erfolgt im ersten Schritt die Umwandlung von G6P zu 6-Phosphogluconat (6PG) unter NADPH-Bildung durch die G6P-Dehydrogenase (g6pdh). Durch Decarboxylierung von 6PG zu Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) durch die 6PG-Dehydrogenase (gnd) wird erneut NADPH regeneriert.

Im nicht-oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels kann Ru5P entweder zu Ribose-5-Phosphat (R5P) durch die R5P-Isomerase (rpi) oder zu Xylose-5-Phosphat (X5P) durch die Ru5P-Epimerase (rpe) umgesetzt werden. Diese beiden Stoffe werden durch die Transketolase (tkt1) zu GAP und Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) umgewandelt. Die zweite Reaktion der Transketolase (tkt2) ermöglicht die Bildung von E4P und X5P aus F6P und GAP. Auch die Reaktion der Transaldolase (tala) gewährleistet die Bildung von E4P und F6P, wobei diese die Umsetzung von S7P und GAP beschreibt.

### **Elektronentransportphosphorylierung der Atmungskette**

Die beim Substrat-Abbau gebildeten reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH werden mittels hintereinander geschalteten Membranproteinkomplexen zur Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff genutzt.

Durch Oxidation von NADH auf der Cytosol-Seite werden durch die NADH-Dehydrogenase (nadh6) Elektronen auf Ubichinon übertragen und dabei pro Vorgang drei H<sup>+</sup> aus der Zelle transportiert. Die Elektronen-Übertragung an Sauerstoff erfolgt dann im gekoppelten Schritt durch den Cytochrom-Oxidase-Komplex (cytbo), welcher pro Reaktion vier H<sup>+</sup> aus der Zelle transportiert. Des Weiteren sind für *E. coli* zwei Transhydrogenase-Isoformen (thd2, membrangebunden und gelöst) beschrieben, die einen beidseitigen direkten Protonen-Transfer von NAD(H) auf NADP(H) unter Transport von Protonen aus der Zelle ermöglichen

(Sauer *et al.*, 2004). Der durch diese Reaktionen erzielte aktive Transport von Protonen aus der Zelle erzeugt einen elektrochemischen Potentialgradienten, welcher dann die ATP-Synthase (atps) zur ATP-Regenerierung antreibt. (Fuchs und Schlegel, 2007)

### 3.7.2 Glycerin-Stoffwechsel

Die Aufnahme von Glycerin erfolgt in *E. coli* durch passive Diffusion (Gottlieb, 2010) und wird bei niedrigen Glycerin-Konzentrationen (< 5 mM) durch den Glycerinfacilitator GlpF unterstützt (Heller *et al.*, 1980; Richey und Lin, 1972). Der folgende Stoffwechsel ist durch zwei mögliche Reaktionswege beschrieben. Unter aeroben Bedingungen erfolgt die ATP-abhängige Phosphorylierung von Glycerin zu Glycerin-3-Phosphat (GLY3P) mittels der Glycerinkinase (glyck). Anschließend setzt die Ubiquinol-regenerierende Reaktion der GLY3P-Dehydrogenase (glyc3pd) GLY3P zum Glykolyse-Intermediat DHAP um (Gottlieb *et al.*, 2014). Unter anaeroben Bedingungen wird Glycerin über die Glycerin-Dehydrogenase (glycdx) zu Dihydroxyaceton (DHA) umgesetzt (Gonzalez *et al.*, 2008). Aus der PEP-verbrauchenden Folgereaktion der DHA-Phosphat-Transferase (dhapt) werden dann die Glykolyse-Intermediate DHAP und PYR gewonnen.

### 3.7.3 Biosyntheseweg aromatischer Aminosäuren

Ausgangsstoffe für den Aromatenbiosyntheseweg sind das Pentose-Phosphat-Stoffwechsel-Intermediat E4P und PEP. In der Eingangsreaktion wird 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) durch die PEP-verbrauchende Reaktion der DAHP-Synthase (dahs) gebildet. Der anschließenden Ringbildung zu 3-Dehydroquinat (3DHQ) durch die 3DHQ-Synthase (dhqs) folgt die Umwandlung zu 3-Dehydroshikimat (3DHS) mittels 3DHQ-Dehydratase (dhqd). Die Bildung von Shikimat (SHIK) wird durch die NADPH-abhängige 3DHS-Dehydrogenase (3dhsdh) realisiert. Die folgende ATP-abhängige Phosphorylierung zu SHIK-3-phosphat (SHK3P) wird durch die SHIK-Kinase (shikk) katalysiert. In der anschließenden zweiten PEP-verbrauchenden Reaktion des Aromatenbiosyntheseweges wird 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (3PSME) durch die 3PSME-Synthase (pscvt) gewonnen, welches durch die Chorismat-Synthase (chors) zu Chorismat (CHOR) umgewandelt wird. Von CHOR ausgehend folgen die drei Synthesewege für L-Phenylalanin (L-Phe), L-Tyrosin (L-Tyr) und L-Tryptophan (L-Trp). Im ersten Schritt der L-Phenylalanin-Synthese wird CHOR durch das *pheA* codierte Isoenzym der CHOR-Mutase (chorm) zu Prephenat (PPHN) umgewandelt. Durch CO<sub>2</sub>- und Wasser-Abspaltung mittels der PPHN-Dehydrogenase (ppndh) wird Phenylpyruvat (PHPYR) gewonnen, welches abschließend durch die Glutamat-(L-Glut) abhängige Tyrosin-Aminotransferase (pheta) zu L-Phenylalanin und AKG umgesetzt wird.

Für die Synthese von L-Tyrosin erfolgt die Bildung von PPHN durch das *tyrA* codierte Isoenzym der chorm. Durch anschließende Decarboxylierung unter NADH-Regenerierung mittels Prephenat-Dehydrogenase (*tyrA* codiert) wird 4-Hydroxyphenylpyruvat (34HPP) gebildet, welches analog zur L-Phenylalanin-Synthese durch die Tyrosin-Aminotransferase zu L-Tyrosin umgewandelt wird (Knaggs, 2003).

Die Regulation des Aromatenbiosyntheseweges erfolgt in *E. coli* auf transkriptioneller und allosterischer Ebene (Bongaerts *et al.*, 2001). Hierbei nehmen die drei Produkte L-Phe, L-Tyr und L-Trp eine zentrale Rolle ein. In der Eingangsreaktion werden die drei Isoenzyme der DAHP-Synthase jeweils durch eines der Produkte inhibiert (*aroG* codiertes Isoenzym: L-Phe sensitiv; *aroF* codiertes Isoenzym: L-Tyr sensitiv; *aroH* codiertes Isoenzym: L-Trp sensitiv) (Bongaerts *et al.*, 2001; Kikuchi *et al.*, 1997; Sprenger, 2007). Hierbei konnte für die beiden L-Phe und L-Tyr sensitiven Isoenzyme eine inhibierende Wirkung der entsprechenden Aminosäuren bereits bei Konzentrationen von 0,1 mM bestimmt werden (McCandliss *et al.*, 1978). Die transkriptionelle Regulation der DAHP-Synthase erfolgt durch die Repressoren TyrR und TrpR (Pittard *et al.*, 2005). Bongaerts *et al.* (2001) beschreiben des Weiteren eine transkriptionelle Kontrolle der SHIK-Kinase durch L-Tyrosin sowie eine allosterische Kontrolle der SHIK-Dehydrogenase durch SHIK. Für die abschließenden Reaktionen der L-Phe- und L-Tyr-Synthese werden die Isoenzyme der CHOR-Mutase respektive der PPHN-Dehydrogenase durch die beiden Aminosäuren-Produkte reguliert (*pheA* codiertes Enzym: L-Phe sensitiv; *tyrA* Enzym: L-Tyr sensitiv) (Bongaerts *et al.*, 2001; Sprenger, 2007).

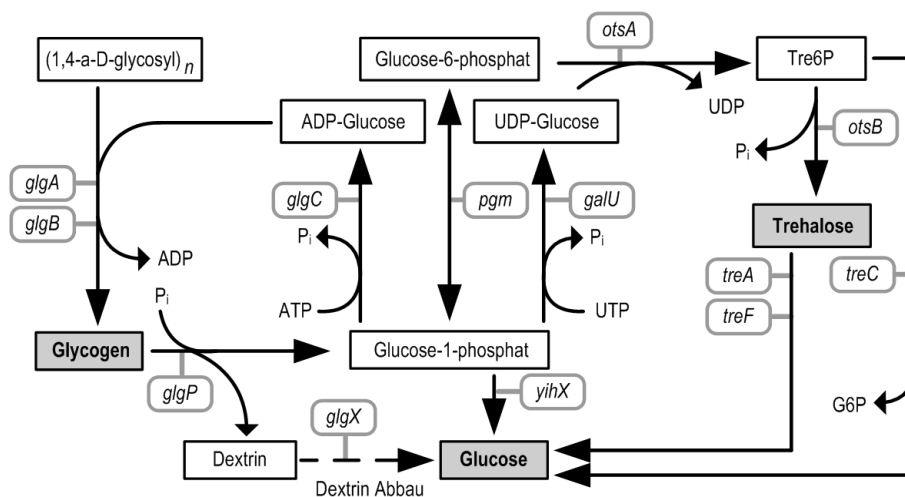
### 3.7.4 Polysaccharide als Speicherstoffe

In *E. coli* sind die beiden Polysaccharide Glycogen und Trehalose als Speicherstoffe von zentraler Bedeutung. Deren Stoffwechsel ist in Abbildung 3.4 dargestellt und wird im Folgenden genauer erläutert.

Glycogen beschreibt ein aus Glucose-Monomeren aufgebautes, verzweigtes Polymer ( $\alpha$ -1,4- und  $\alpha$ -1,6-Verbindungen), das in Wildtyp *E. coli* als Speicherstoff mit einem Gewichtsanteil von ca. 2,5 % vorliegt (Feist *et al.*, 2007). Die Glycogen-Bildung erfolgt ausgehend von Glucose-1-phosphat unter ATP-Verbrauch (siehe Abbildung 3.4). Grundlage für die Glycogen-Synthese sind die beiden Enzyme ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (codiert durch *glgC*) und Glycogen-Synthase (codiert durch *glgA*) (Dauvillée *et al.*, 2005). Diese ermöglichen die Ausbildung von  $\alpha$ -1,4-verknüpften Glucose-Ketten. Neben diesen beiden Enzymen ist die Aktivität eines weiteren Enzymes (im Englischen: ‚glycogen branching enzyme‘, codiert durch *glgB*) beschrieben, welches eine  $\alpha$ -1,6-Querverknüpfung der linearen Ketten ermöglicht (Dauvillée *et al.*, 2005). Die Glycogen-Synthese ist in *E. coli* unter Kohlenstoffüberschussbedingungen beschrieben, wenn gleichzeitig eine Limitierung durch

andere essentielle Nährstoffe vorliegt (Preiss und Romeo, 1994). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass wachsende Zellen bis zu 15,3 % ihrer Trockenmasse in Glycogen anreichern können (Holme und Palmstierna, 1956). Der Glycogen-Abbau erfolgt durch ein die  $\alpha$ -1,6-Verbindung trennendes Enzym (codiert durch *glgX*) und die Glycogen-Phosphorylase (codiert durch *glgP*) (Dauvillée *et al.*, 2005). Die Regulation der Glycogen-Bildung und des Glycogen-Abbaus erfolgt über einen globalen Regulator der Kohlenstoffspeicherung (Csr), welcher die Reaktionen der Glykolyse respektive Gluconeogenese inaktiviert oder aktiviert (Revelles *et al.*, 2013; Romeo *et al.*, 2013).

Neben dem Speicherstoff Glycogen nimmt vor allem Trehalose eine zentrale Rolle bei der Kohlenstoffspeicherung in *E. coli* ein. Trehalose besitzt als Disaccharid eine  $\alpha$ , $\alpha$ -1,1-glykosidische Verbindung von zwei Glucose-Monomeren. In *E. coli* wird Trehalose eine Bedeutung bei der Osmo-Regulation unter osmotischen Stressbedingungen wie hohen Salz- und Zuckerkonzentrationen sowie dem Vorliegen von anderen Kultivierungs-Produkten zugeschrieben (Li *et al.*, 2012; Purvis *et al.*, 2005; Ruhál *et al.*, 2013). Die Synthese von Trehalose wird ausgehend von Glucose-6-phosphat (G6P) und UDP-Glucose durch die beiden Enzyme Trehalose-6-phosphat-Synthase und Phosphatase (codiert durch die Gene *otsA* und *otsB*) ermöglicht (siehe Abbildung 3.4). Der Abbau des Disaccharids erfolgt über Trehalasen, die konsekutiv exprimiert im Periplasma (*treA*) respektive im Cytosol (*treF*) vorliegen. Der Transport von Trehalose aus dem Cytosol in das Periplasma wird durch sogenannte ‚stretch-activated proteins‘ vereinfacht (Li *et al.*, 2012). Diese stellen eine Gruppe von Transport-Kanälen dar, die zur gezielten zellulären osmotischen Regulation eine der schnellsten Transportmöglichkeiten in *E. coli* beschreiben (Sleator und Hill, 2002).



**Abbildung 3.4:** Vereinfachte Darstellung des Glycogen- (Karp *et al.*, 1996) und Trehalose- (Purvis *et al.*, 2005) Speicherstoffwechsels in *E. coli*.

## 3.8 L-Phenylalanin

### 3.8.1 Industrielle Bedeutung und Produktion von L-Phenylalanin

L-Phenylalanin ist eine proteinogene Aminosäure, die durch die aromatische Ringstruktur der Seitenkette gekennzeichnet ist (siehe Abbildung 3.3).

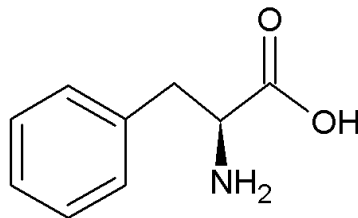


Abbildung 3.3: Chemische Strukturformel von L-Phenylalanin.

Neben der Verwendung in Infusionslösungen und als Grundbaustein für Pharmaprodukte (beispielsweise entzündungshemmende Medikamente, Wirkstoffe gegen Bluthochdruck und HIV) besitzt L-Phenylalanin als essentielle Aminosäure große Bedeutung in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie (Sprenger, 2007 und 2006). Hierbei wird L-Phenylalanin vorrangig als Methyl ester zusammen mit Asparaginsäure für die Synthese des künstlichen Süßstoffes und Lebensmittelzusatzstoffes Aspartam eingesetzt (Schmid *et al.*, 2001). Durch die zunehmende Verwendung des Süßstoffes in Getränken (Leuchtenberger *et al.*, 2005) und Lebensmitteln (Ager *et al.*, 1998; Bongaerts *et al.*, 2001) nimmt die Aspartam-Herstellung den größten Anteil an der L-Phenylalanin-Herstellung ein. Hierbei wird ein jährliches Marktvolumen von rund 18.000 Tonnen beschrieben und weitere 20.000 Tonnen jährlich für den chinesischen Markt angenommen (Sprenger, 2006).

Die Herstellung von L-Phenylalanin kann dabei durch chemische Totalsynthese, Extraktion aus proteinreichen Substanzen, enzymatische Synthese sowie durch mikrobielle Ansätze erfolgen (Sprenger, 2006). Die enzymatische Synthese erfolgt hierbei vorrangig durch Aminierung der *trans*-Zimtsäure und Transaminierung oder reduktive Aminierung von Phenylpyruvat (Chao *et al.*, 1999; Hummel *et al.*, 1987; Nakamichi *et al.*, 1989). Aufgrund des möglichen Verzichts auf teure und umweltbelastende chemische Katalysatoren und der Möglichkeit der stereoselektiven Gewinnung erfolgt die industrielle L-Phenylalanin-Synthese bereits heute primär durch mikrobielle Synthese. Biotechnologische Ansätze zur industriellen L-Phenylalanin-Herstellung greifen vorrangig auf rekombinante Stämme von *E. coli* und *Corynebacterium glutamicum* zurück (Sprenger, 2006 und 2007).

### 3.8.2 Ansätze zur mikrobiellen Herstellung von L-Phenylalanin mit *E. coli*

Erste Ansätze zur mikrobiellen Herstellung von L-Phenylalanin mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen mit der Kohlenstoffquelle Glucose sind bereits in den 1980er Jahren beschrieben worden (Choi und Tribe, 1982). Hierbei konnten im Satzbetrieb Produkt-Konzentrationen von  $10,9 \text{ g L}^{-1}$  und im kontinuierlichen Betrieb L-Phenylalanin-Konzentrationen von  $8,7 \text{ g L}^{-1}$  erzielt werden. Die verwendeten Modifikationen im Aromatenbiosyntheseweg gehen dabei auf die Arbeiten von Tribe und Pittard (1979) zurück.

Bereits in diesen frühen Studien war die Deregulation des Aromatenbiosyntheseweges von zentralem Interesse (Sprenger, 2006). Wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, besitzen die drei Endprodukte des Aromatenbiosyntheseweges (L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan) bereits bei geringen Konzentrationen eine stark inhibierende Wirkung auf die Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges respektive auf die weiteren Schritte der eigenen Bildung. Zur Umgehung dieser Rückkopplungsschleifen sind in der Literatur unterschiedliche Ansätze beschrieben, die oft in Kombination eingesetzt werden. So verhindert die Deletion der Gene zur L-Tyrosin- (Sprenger, 2007) oder L-Tryptophan- (Berry, 1996) Bildung einen Kohlenstoffabfluss in Richtung der beiden unerwünschten Aminosäuren. Gleichzeitig kann hierdurch die Rückkopplungsinhibierung durch diese beiden Stoffe vermieden werden. Als Konsequenz muss eine Zufuhr der Aminosäuren während der Wachstumsphase erfolgen, um weiterhin eine Biomassebildung gewährleisten zu können. Dies macht limitierende L-Tryptophan- respektive limitierende L-Tyrosin-Zulaufverfahren notwendig (Förberg und Häggström, 1988; Gerigk *et al.*, 2002a; Gerigk *et al.*, 2002b). Das Einbringen von rückkopplungsresistenten Gen-Varianten des Aromatenbiosyntheseweges stellt eine genetische Möglichkeit dar, die Inhibierung durch die Aminosäuren zu umgehen. Rückkopplungsresistente Varianten der Chorismat-Mutase (*pheA*<sup>ibr</sup>) sind hierbei in einer Vielzahl an Studien zur L-Phenylalanin-Produktion beschrieben (Backman *et al.*, 1990; Bongaerts *et al.*, 2001; Oldiges *et al.*, 2004; Sprenger, 2007; Yakandawala *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010). Gleiches gilt für die Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges. Hier sind Ansätze für die Gene *aroF* (Backman *et al.*, 1990; Oldiges *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2014; Ruffer *et al.*, 2004; Sprenger, 2007) und *aroG* (Báez-Viveros *et al.*, 2004; Bongaerts *et al.*, 2001; Gosset *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2014) aufgeführt. Die höchsten Produkt-Konzentrationen ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) mit der Kohlenstoffquelle Glucose sind dabei durch den kombinierten Ansatz der rückkopplungsresistenten Gene *pheA* und *aroF* beschrieben (Backman *et al.*, 1990). Eine reaktionstechnische Möglichkeit die inhibierende Wirkung von L-Phenylalanin auf den Stofffluss im Aromatenbiosyntheseweg zu reduzieren, stellt die *in situ* Abtrennung des Produktes dar. Hierbei sind für L-Phenylalanin Ansätze mit integrierter flüssig-flüssig Reaktivextraktion beschrieben (Gerigk *et al.*, 2002b; Ruffer *et al.*, 2004). Bei im Zulaufprozess vorliegenden L-Phenylalanin-Konzentrationen von über  $30 \text{ g L}^{-1}$  konnte

durch die integrierte Produktabtrennung eine Produktionsrate von rund  $41 \text{ mg}_{\text{gBTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bis zum Prozessabbruch aufrecht erhalten werden (Rüffer *et al.*, 2004).

Neben der Deregulation der Aminosäuresynthese ist auch die verbesserte Versorgung des Aromatenbiosynthesewegs mit den beiden Schlüsselmetaboliten Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) von besonderem Interesse (Bongaerts *et al.*, 2001; Ikeda, 2006). Die native Bereitstellung von E4P erfolgt dabei über den Pentose-Phosphat-Stoffwechsel. Für die Kohlenstoffquelle Glucose sind Studien beschrieben, welche die Deletion der Phosphoglucose-Isomerase-Gene (*pgi*) nutzen, um den generellen Kohlenstofffluss in diesem Stoffwechselweg zu erhöhen (Mascarenhas *et al.*, 1991). Gezielte Erhöhungen des Stoffflusses hin zu E4P setzen hingegen auf die Überexpression der Gene der Transketolase (*tkt*) und Transaldolase (*tala*) (Draths *et al.*, 1992; Gottlieb *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 1996; Lu und Liao, 1997). Zur Verbesserung der PEP-Bereitstellung für die Aminosäuresynthese stehen Ansätze im Vordergrund, welche den intrazellulären PEP-Verbrauch in konkurrierenden Reaktionen reduzieren. Hierbei sind Mutationen der Pyruvatkinase zur Aktivitätsreduzierung des PEP-verbrauchenden Enzyms sowie Deletionen der Pyruvatkinase-Gene (*pykA*, *pykF*) beschrieben (Gosset *et al.*, 1996; Gottlieb, 2010). Gleiches gilt für die Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Miller *et al.*, 1987). Wird für die Produktion von L-Phenylalanin Glucose als Kohlenstoffquelle eingesetzt, stellt jedoch das PEP-abhängige Aufnahmesystem (PTS) die Reaktion mit dem größten PEP-Verbrauch dar. Ansätze zur Modifikation der Glucose-Aufnahme wie zum Beispiel durch erleichterte Diffusion sind vielzählig beschrieben und hinsichtlich der L-Phenylalanin-Produktion von Sprenger (2006) zusammengefasst. Insgesamt ist vor allem das notwendige ausgewogene Verhältnis an zur Verfügung stehendem E4P und PEP als Herausforderung bei der aromatischen Aminosäure-Produktion beschrieben (Berry, 1996; Shen *et al.*, 2012).

In den letzten Jahren wurden neben der Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle für die mikrobielle L-Phenylalanin-Produktion auch Ansätze mit Glycerin beschrieben (Gottlieb *et al.*, 2014; Gottlieb, 2010; Khamduang *et al.*, 2009; Thongchuang *et al.*, 2012). Da Glycerin als wesentliches Nebenprodukt bei der weltweit zunehmenden Biodiesel-Herstellung anfällt, ist für das Substrat eine gute Verfügbarkeit beschrieben (Almeida *et al.*, 2012; Wendisch *et al.*, 2011). Neben dem passiven Stofftransport durch Diffusion kann Glycerin dabei auch zusätzlich durch erleichterte Diffusion (Facilitator GlpF) von *E. coli* aufgenommen werden (Heller *et al.*, 1980; Richey und Lin, 1972). Durch die Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle kann somit im Vergleich zu Glucose PEP bei der Substrataufnahme eingespart werden. Ohne Berücksichtigung des Energiemetabolismus ergibt sich somit eine theoretische Kohlenstoffausbeute von 90 % bei der Herstellung von L-Phenylalanin aus Glycerin. Bei Glucose können maximal 45 % des eingesetzten Kohlenstoffs in L-Phenylalanin umgesetzt werden (Gottlieb, 2010). Des Weiteren liegt bei Glycerin ein im Vergleich zu



Glucose verbesserter Reduktionsgrad  $\kappa$  (Glycerin:  $\kappa = 4,67$ ; Glucose:  $\kappa = 4,00$ ) vor (Yazdani und Gonzalez, 2008). Trotz dieser prinzipiellen Vorteile konnten in ersten beschriebenen Studien nur geringe L-Phenylalanin-Konzentrationen ( $0,4\text{--}5,6 \text{ g L}^{-1}$ ) im Satzbetrieb mit Glycerin erzielt werden (Khamduang *et al.*, 2009; Thongchuang *et al.*, 2012). Auch erste vom Projektpartner im Zulaufbetrieb durchgeführte Kultivierungen blieben mit einer maximalen Produktkonzentration von  $12,9 \text{ g L}^{-1}$  hinter den mit Glucose erzielten L-Phenylalanin-Konzentrationen zurück (Gottlieb, 2010).

## 4 Material und Methoden

In den nachfolgenden Kapiteln werden zentrale in dieser Arbeit angewendete Methoden und das dafür benötigte Material beschrieben. Allgemeine Gerätschaften und die verwendeten Chemikalien können dem Anhang entnommen werden (siehe Tabelle A.1 und A.2).

### 4.1 Mikroorganismen und Stammhaltung

In diesem Projekt wurde eine Vielzahl unterschiedlicher *E. coli*-Stämme zur L-Phenylalanin-Produktion eingesetzt und charakterisiert. Die Stammkonstruktion wurde dabei vom Projektpartner des Instituts für Mikrobiologie der Universität Stuttgart unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Sprenger durchgeführt.

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Stämme und Plasmide sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Da die Stammkonstruktion nicht Teil dieser Arbeit war, werden die dabei angewandten Methoden hier nicht erläutert, sondern können den in Tabelle 4.1 angegebenen Referenzen entnommen werden.

Die Stammhaltung von untransformierten Stämmen erfolgte bei  $-80\text{ °C}$  in Kryo-Kulturen. Zur Erstellung von Kryo-Kulturen wurden die auf Agar-Platten gelieferten Stämme in LB-Medium überführt und in Schüttelkolben kultiviert ( $37\text{ °C}$ ). Die Zellernte erfolgte im exponentiellen Wachstum. Nach Zugabe von sterilem Glycerin (20 % (v/v) Endkonzentration) und Aliquotieren in sterile Kryo-Gefäße wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach Einbringen des Plasmids erfolgte die Stammhaltung von transformierten Stämmen bei  $4\text{ °C}$  auf Minimal-Medium-Agarplatten.

**Tabelle 4.1:** In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme und Plasmide. Aufgeführt sind ihre Bezeichnung, ihr Genotyp, die Resistenz gegenüber den Selektionsmarkern Ampicillin (A), Kanamycin (K) und Chloramphenicol (C) sowie ihre Referenz in der Literatur ([1]: Gottlieb, 2010; [2]: Weiner *et al.*, 2014a; [3]: Weiner *et al.*, 2014b; [4]: Weiner *et al.*, 2014c; [5]: Ruffer *et al.*, 2004; [6]: Sprenger, 2007).

Stammbezeichnung	Genotyp	Selektionsmarker			Referenz
		A	K	C	
K12	-				DSM 498
FUS4.11 <sub>kan</sub> pF81 <sub>amp</sub>	W3110 $\Delta$ <i>pheA-tyrA-aroF</i> , $\Delta$ <i>lacIZYA::P<sub>tac</sub>-aroFBL</i> , $\Delta$ <i>pykA::FRT</i> , <i>pykF::FRT-Kan-FRT</i> pF81 <sub>amp</sub>	X	X		[1] [2]
FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub>	W3110 $\Delta$ <i>pheA-tyrA-aroF</i> , $\Delta$ <i>lacIZYA::P<sub>tac</sub>-aroFBL</i> , $\Delta$ <i>pykA</i> , $\Delta$ <i>pykF</i> pF81 <sub>kan</sub>		X		[2]
FUS4.11 $\Delta$ <i>maeA</i> pF81 <sub>kan</sub>	W3110 $\Delta$ <i>pheA-tyrA-aroF</i> , $\Delta$ <i>lacIZYA::P<sub>tac</sub>-aroFBL</i> , $\Delta$ <i>pykA</i> , $\Delta$ <i>pykF</i> , $\Delta$ <i>maeA</i> pF81 <sub>kan</sub>		X		[3]
FUS4.11 $\Delta$ <i>maeA</i> $\Delta$ <i>maeB</i> pF81 <sub>kan</sub>	W3110 $\Delta$ <i>pheA-tyrA-aroF</i> , $\Delta$ <i>lacIZYA::P<sub>tac</sub>-aroFBL</i> , $\Delta$ <i>pykA</i> , $\Delta$ <i>pykF</i> , $\Delta$ <i>maeA</i> , <i>maeB::FRT-cat</i> pF81 <sub>kan</sub>		X	X	[3]
FUS4.15 $\Delta$ <i>glg</i> pF81 <sub>kan</sub>	W3110 $\Delta$ <i>pheA-tyrA-aroF</i> , $\Delta$ <i>lacIZYA::P<sub>tac</sub>-aroFBL</i> , $\Delta$ <i>pykA</i> , $\Delta$ <i>pykF</i> , $\Delta$ <i>maeA</i> , $\Delta$ <i>maeB</i> , <i>glgBXCAP::FRT-cat</i> pF81 <sub>kan</sub>		X	X	[4]
FUS4.15 $\Delta$ <i>glg</i> $\Delta$ <i>ots</i> pF81 <sub>kan</sub>	W3110 $\Delta$ <i>pheA-tyrA-aroF</i> , $\Delta$ <i>lacIZYA::P<sub>tac</sub>-aroFBL</i> , $\Delta$ <i>pykA</i> , $\Delta$ <i>pykF</i> , $\Delta$ <i>maeA</i> , $\Delta$ <i>maeB</i> , $\Delta$ <i>glgBXCAP</i> , <i>otsBA::FRT-cat</i> pF81 <sub>kan</sub>		X	X	[4]
FUS4 pF81 <sub>kan</sub>	W3110 $\Delta$ <i>pheA-tyrA-aroF</i> , $\Delta$ <i>lacIZYA::P<sub>tac</sub>-aroFBL</i> pF81 <sub>kan</sub>		X		[4]

Vektor Bezeichnung	Genotyp	Selektionsmarker			Referenz
		A	K	C	
pF81 <sub>amp</sub>	pJF119EH, $P_{tac}::aroF$ , <i>pheA<sup>fbr</sup></i> , <i>aroB</i> , <i>aroL</i> <i>Amp<sup>R</sup></i>	X			[1] [5] [6]
pF81 <sub>kan</sub>	pJF119EH, $P_{tac}::aroF$ , <i>pheA<sup>fbr</sup></i> , <i>aroB</i> , <i>aroL</i> , <i>Kn<sup>R</sup></i>		X		[2]

## 4.2 Kulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien zur Kultivierung von *E. coli* sind im Folgenden beschrieben.

### **Lysogeny Broth Medium (LB Medium):**

Das von Bertani (2004) formulierte Medium wurde in dieser Arbeit zur Stammhaltung und zur Gewinnung transformationskompetenter Zellen sowie zur eigentlichen Transformation verwendet. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle A.3 beschrieben. Alle Komponenten wurden in VE-Wasser gelöst und nach Einstellen des pH (pH 7 mit NaOH 5 M) auf das finale Volumen eingestellt. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven (121 °C, 20 min).

### **Minimal-Medium zur L-Phenylalanin-Produktion:**

Kultivierungen zur L-Phenylalanin-Produktion wurden in dieser Arbeit mit einem vom Projektpartner beschriebenen definierten Minimal-Medium (Albermann *et al.*, 2008; Gottlieb, 2010) durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung ist in den Tabellen A.4 und A.5 beschrieben. Alle temperaturstabilen Medienkomponenten (siehe Tabelle A.4) wurden zusammen in VE-Wasser gelöst und nach Einstellen des pH (pH 7 mit NaOH 2M) und des Volumens autoklaviert (121 °C, 20 min). Des Weiteren wurde von jeder temperatursensitiven Medienkomponente eine konzentrierte Lösung hergestellt (siehe Tabelle A.4), welche anschließend sterilfiltriert (0,22 µm) wurde. Von den Kohlenstoffquellen Glycerin und Laktat wurden ebenfalls konzentrierte Lösungen erstellt (siehe Tabelle A.4), welche durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert wurden. Nach Abkühlen des Grundmediums wurden die temperatursensitiven Medienkomponenten sowie die Kohlenstoffquellen unter sterilen Bedingungen zugefügt.

Das hier beschriebene Medium wurde auch für die metabolischen Kurzzeitanalysen nach schnellem Medienwechsel verwendet. Aufgrund der zum Analysezeitpunkt vorliegenden L-Phenylalanin-Produktion wurde hierbei auf die Zugabe der Auxotrophie-Aminosäuren sowie auf die beschriebenen Kohlenstoffquellen und Antibiotika verzichtet.

Für Kultivierungen im 15 L-Maßstab wurde dem Medium zusätzlich die in Tabelle A.5 beschriebene Spurenelementlösung mit einer Konzentration von 1 mL L<sup>-1</sup> zugefügt.

### **Minimal-Medium zur U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung:**

Für die ersten Kultivierungsschritte zur U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung im Schüttelkolben und Laborrührkesselreaktor wurde ein Minimal-Medium eingesetzt (Hiller *et al.*, 2007b). Die genaue Zusammensetzung ist in den Tabellen A.6 und A.7 beschrieben. Alle temperaturstabilen Medienkomponenten (siehe Tabelle A.6) wurden in VE-Wasser gelöst und nach Einstellen des pH (pH 7 mit NaOH 2M) autoklaviert (121 °C, 20 min). Des Weiteren wurde von jeder temperatursensitiven Medienkomponente eine konzentrierte Lösung hergestellt (siehe Tabelle A.6), welche anschließend sterilfiltriert (0,22 µm) wurde. Die

U-<sup>13</sup>C-markierte Glucose wurde separat gelöst und autoklaviert (121 °C, 20 min). Nach Abkühlen des Grundmediums wurden die temperatursensitiven Medienkomponenten sowie die Kohlenstoffquelle unter sterilen Bedingungen zugefügt. Wurden Stämme mit Auxotrophien eingesetzt, enthielt das Medium zusätzlich die entsprechende Aminosäure (50 mg L<sup>-1</sup>).

**Agar-Platten:**

Neben Flüssigmedien wurden in dieser Arbeit auch Agarplatten eingesetzt. Zur Erstellung von LB-Agarplatten wurde das Medium vor Sterilisation mit Agar versetzt (20 g L<sup>-1</sup>) und zu Platten gegossen. Für Minimal-Medium-Agarplatten wurde eine konzentrierte Agar-Lösung separat vom Grundmedium autoklaviert. Die noch warmen Lösungen (< 60 °C) wurden unter sterilen Bedingungen vereinigt, die filtrierten temperatursensitiven Komponenten zugefügt und zu Platten gegossen.

Entsprechende Selektionsmarker wurden den Agar-Ansätzen erst kurz vor dem Gießprozess zugefügt, um eine möglichst hohe Stabilität gewährleisten zu können.

Neben den hier beschriebenen Kultur-Medien wurden weitere Lösungen und Puffer eingesetzt. Deren Zusammensetzung und Herstellung ist im Anhang (Kapitel A.2) beschrieben.

## 4.3 Kultivierung von *E. coli*

### 4.3.1 Gewinnung von kompetenten Zellen mit anschließender Plasmid-Transformation

Um die jeweiligen Produktionsvektoren in einen untransformierten Stamm einbringen zu können, wurde in diesem Projekt ein zweistufiges Verfahren angewendet. Dieses gliedert sich in die Herstellung transformationskompetenter Zellen und die anschließende Transformation. Zuvor erfolgte ein Ausstrich und Inkubation (37 °C, 24 h) des untransformierten Stammes aus der Kryo-Haltung auf LB-Agar.

#### Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode. Hierfür wurden 100 mL LB-Medium mit 1,5 mL einer Übernacht-Vorkultur (10 mL LB bei 37 °C und 200 min<sup>-1</sup>; Kolonie von Platte) inokuliert und bei 37 °C und 250 min<sup>-1</sup> bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub>=0,4–0,6 kultiviert. Nach dem Ernten (10 min bei 3.200 g, 4 °C) wurden die Zellpellets in 40 mL vorgekühltem sterilem TfbI-Puffer (siehe Tabelle 4.2) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert, nochmals abzentrifugiert (10 min bei 3.200 g, 4 °C) und schließlich in 4 mL vorgekühltem sterilen TfbII-Puffer (siehe Tabelle 4.3) resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension in sterile Reaktions-Gefäße aliquotiert (200 µL) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

**Tabelle 4.2:** Zusammensetzung des TfbI-Puffers zur Herstellung transformationskompetenter Zellen. Substanzen gelöst in bidestilliertem Wasser; pH 5,8 mit Essigsäure (20 %) eingestellt.

Substanz	Konzentration
Calciumchlorid	1,45 g L <sup>-1</sup>
Glycerin, 99,5 %	150 mL L <sup>-1</sup>
Kaliumacetat	2,95 g L <sup>-1</sup>
Manganchlorid-Tetrahydrat	10,00 g L <sup>-1</sup>
Rubidiumchlorid	12,10 g L <sup>-1</sup>

**Tabelle 4.3:** Zusammensetzung des TfbII-Puffers zur Herstellung transformationskompetenter Zellen. Substanzen gelöst in bidestilliertem Wasser; pH 6,5 mit NaOH (6 M) eingestellt.

Substanz	Konzentration
Calciumchlorid	11,00 g L <sup>-1</sup>
Glycerin, 99,5 %	150 mL L <sup>-1</sup>
MOPS Puffer	2,10 g L <sup>-1</sup>
Rubidiumchlorid	1,20 g L <sup>-1</sup>

### Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen

Zur Transformation eines Plasmids in *E. coli*-Zellen wurden 2 µL Plasmid-Lösung in 200 µL Rubidiumchlorid-kompetente Zellen pipettiert und die Lösung 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (42 °C, 45 s) durch Inkubation im Wasserbad. Nach Inkubation auf Eis (3 min) wurden 600 µL LB-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben. Nach anschließender Inkubation (37 °C, 45 min) wurden je 200 µL des Ansatzes auf LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika-Resistenzen ausplattiert. Nach 24 h erfolgte der Übertrag einzelner Kolonien auf Minimal-Medium-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika-Resistenzen. Diese wurden für rund 46 h bei 37 °C inkubiert.

### 4.3.2 Vorkulturen

Vorkulturen zur Inokulation des 15 L-Rührkesselreaktors und des parallelen 0,5 L-Systems wurden in einem zweistufigen Prozess gewonnen. Die Kohlenstoffquellen im Vorkultur-Medium wurden analog zu den im Rührkesselreaktor während der Wachstumsphase eingesetzten Kohlenstoffquellen gewählt (Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle: Glycerin 7 g L<sup>-1</sup>; Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle: Laktat 5 g L<sup>-1</sup>; Glycerin und Laktat als Kohlenstoffquelle: Glycerin 4,5 g L<sup>-1</sup>, Laktat 2,5 g L<sup>-1</sup>).

Für Vorkulturen von Stämmen mit zusätzlicher Chloramphenicol-Resistenz wurde dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Medium zusätzlich in Ethanol gelöstes Chloramphenicol (Endkonzentration 20 mg L<sup>-1</sup>) zugegeben.

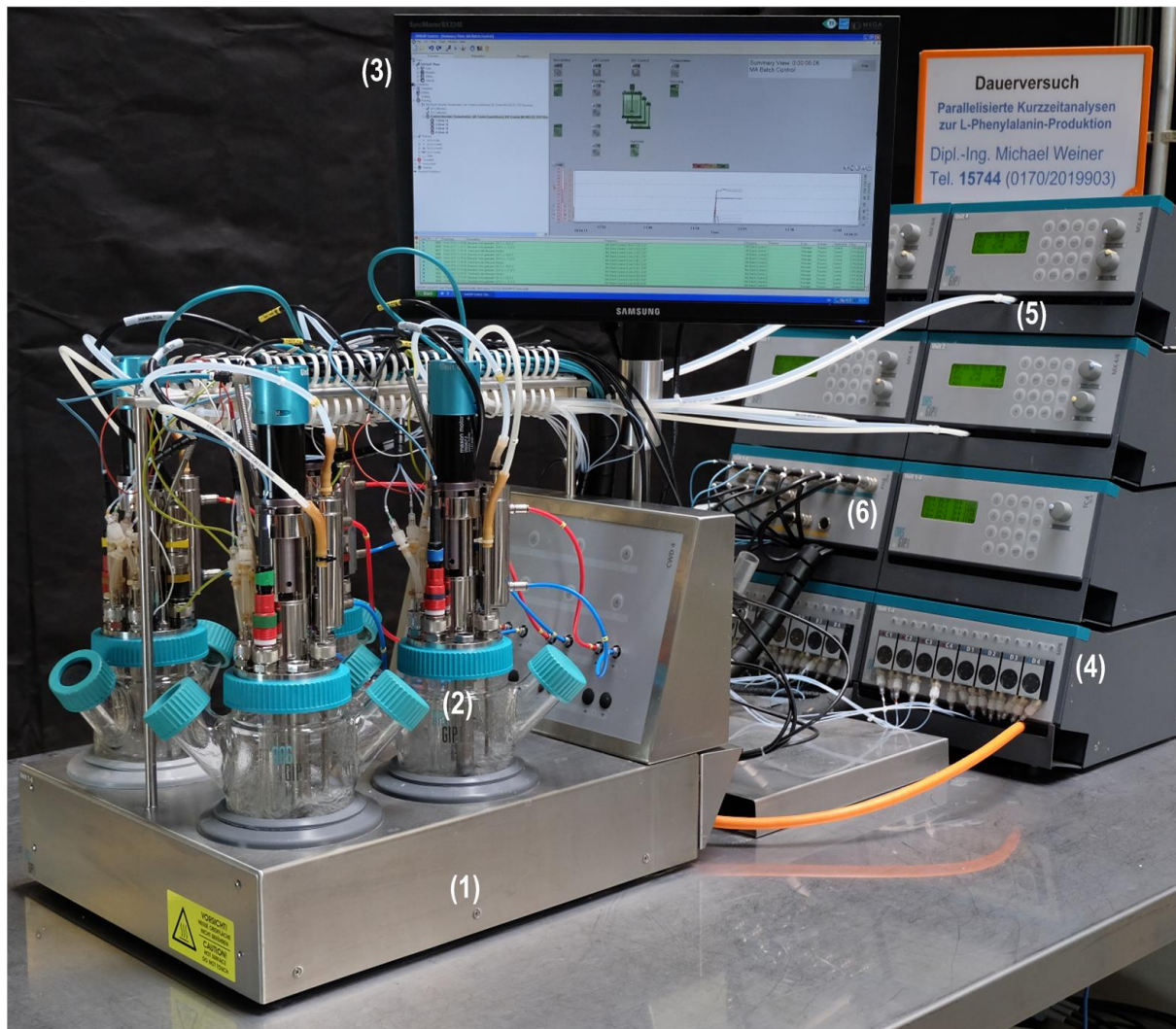
In einem ersten Schritt wurden zwei einzelne Kolonien des zu verwendenden Stammes von Minimal-Medium-Agarplatten in zwei mit je 10 mL Minimal-Medium gefüllte Schüttelkolben (Nominalvolumen 100 mL) überführt. Nach 24-stündiger Inkubation (37 °C, 100 min<sup>-1</sup>) wurde der gesamte Inhalt beider Kolben gleichmäßig auf zehn mit je 100 mL Minimal-Medium gefüllte Schüttelkolben (Nominalvolumen 500 mL) aufgeteilt. Es folgte eine erneute Inkubation für rund 28 h (37 °C, 200 min<sup>-1</sup>) und anschließende Nutzung des gesamten Vorkulturansatzes zur Inokulation des 15 L-Rührkesselreaktors.

Im Falle der parallelen Kultivierung im 0,5 L-Maßstab wurde die Biomasse nach dem zweiten Inkubationsschritt durch Zentrifugation (4 °C, 3.200 g, 10 min) steril abgetrennt. Nach Verwurf des Überstandes wurde die Biomasse in rund 20 mL sterilem Phosphatpuffer resuspendiert und konnte somit über eine Einwegspritze in die Laborrührkesselreaktoren überführt werden.

### **4.3.3 Parallele Zulauf-Kultivierung im 0,5 L-Maßstab**

Zur parallelen Charakterisierung der L-Phenylalanin-Produktion verschiedener rekombinanter Stämme oder zur Charakterisierung von unterschiedlichen Reaktionsbedingungen wurde ein Parallelbioreaktorsystem mit vier Glas-Laborrührkesselreaktoren (maximales Arbeitsvolumen 1000 mL) eingesetzt (DASGIP<sup>®</sup> Parallelbioreaktorsystem, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Jeder Reaktor wurde dabei mit einer aktiven über Kopf angetriebenen Röhreinheit mit zwei Rushton-Scheibenblattrührern ausgestattet. Die Medien-Temperierung (37 °C) erfolgte über einen mit Wasser durchströmten elektrischen Heiz-/Kühlblock, in welchen die vier einwandigen Glasreaktoren eingesetzt wurden. Die Gasversorgung erfolgte über vier separate Gasmischstationen, welche eine unabhängige und individuelle Versorgung jedes einzelnen Reaktors mit einer beliebigen Gas-Zusammensetzung aus Druckluft, Stickstoff und Sauerstoff ermöglichten. Die Versorgung mit Titrationsmitteln (NaOH 2 M und H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 42 %), Antischaummittel und Zulaufmedien erfolgte durch 16 miniaturisierte steuerbare Schlauchpumpen, deren Drehzahlsensor Rückschlüsse auf die tatsächlich geförderten Volumina erlaubte. Die genauen eingesetzten Bauteile, Software und Messtechnik der Anlage sind in Tabelle A.14 aufgeführt. Ein Überblick über den Versuchsaufbau ist durch Abbildung 4.1 gegeben.





**Abbildung 4.1:** Versuchsaufbau zur parallelen Zulauf-Kultivierung im 0,5 L-Maßstab. 1: Heiz-/Kühlblock, 2: Glas-Rührkesselreaktor ausgestattet mit Sensorik, Zufuhrleitungen und Rühreinheit, 3: Prozess-Monitor, 4: 16 Peristaltikpumpen zur Förderung von Säure, Base, Antischaum-Mittel und Zulaufmedien, 5: Gasmischstationen, 6: Steuer- und Ausleseeinheiten für pH, Gelöstsauerstoffkonzentration, Temperatur und Rührerdrehzahl.

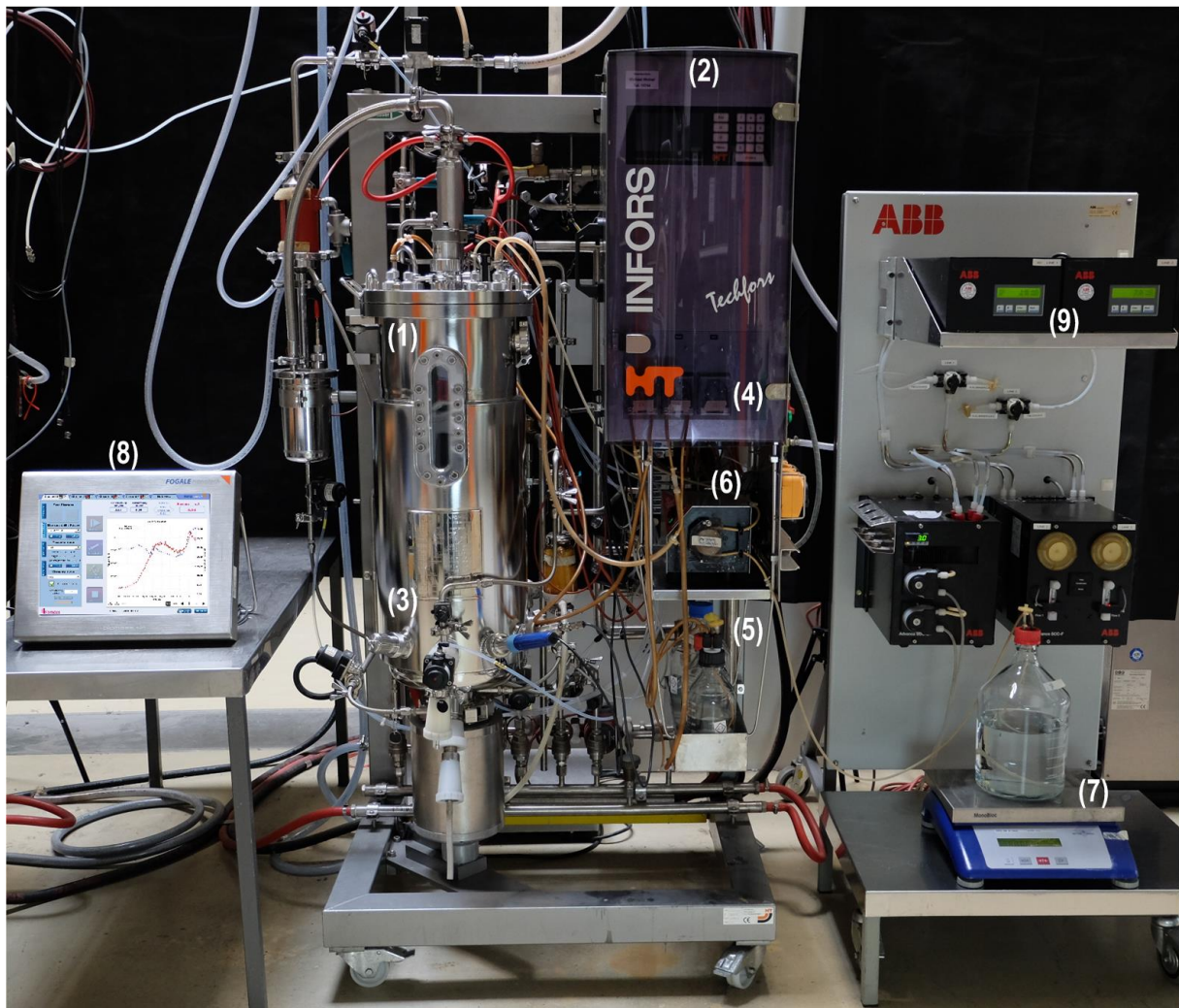
Die Sterilisation der mit VE-Wasser gefüllten Kessel erfolgte im Autoklaven (121 °C, 20 min). Die Desinfektion der Zulaufleitungen für Titrationsmittel, Antischaummittel und Zulaufmedien erfolgte nach einem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll mit Ethanol (70%), Natronlauge (2 M) und sterilem VE-Wasser. Die somit erzielte desinfizierende Wirkung ist durch Girot *et al.* (1990) beschrieben. Nach Abkühlen der Reaktoren wurde das enthaltene Wasser unter aseptischen Bedingungen über die Seitenarme verworfen und die Glasgefäße mit 500 mL sterilem Minimal-Medium ohne Kohlenstoffquelle gefüllt. Nach Anschluss der Gefäße an der Arbeitsstation, Einstellen der Prozessbedingungen (37 °C, pH 7) und Kalibrieren der Abgasanalyseeinheit (Sauerstoff-Signal: 0 % mit Stickstoff, 20,95 % mit Raumluft; Kohlendioxid-Signal: 0 % mit Stickstoff, oberer Referenzwert mit integrierter Kalibrierzelle) erfolgte die Zugabe des Inokulums. Gleichzeitig wurde mit der konstanten Zufuhr des in Tabelle A.10 beschriebenen Mediums begonnen. Die dabei eingestellte

Zulauftrate von  $0,22 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  wurde zu jeder Probenahme an das aktualisierte Volumen und die Biomassekonzentration angepasst. Die Versorgung mit Sauerstoff erfolgte mittels im Medium dispergierter Druckluft. Eine Kaskadenschaltung von Rührerdrehzahl ( $500\text{--}1200 \text{ min}^{-1}$ ) und Begasungsrate ( $4,00\text{--}8,00 \text{ vvm}$ ) ermöglichte eine Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf 40 %. Probenahmen wurden bei dieser Anlage durch ein in dieser Arbeit miniaturisiertes und weiter entwickeltes System zur schnellen Probenahme ermöglicht. Grundlage stellte hierbei das von Hiller *et al.* (2007a) beschriebene System dar. Konstruktionsdaten des miniaturisierten Systems können dem Anhang (Abbildung A.10–A.18) entnommen werden.

#### 4.3.4 Zulauf-Kultivierung im 15 L-Maßstab mit einer Kohlenstoffquelle

Im Folgenden soll die Durchführung des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses mit Glycerin oder Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle beschrieben werden.

Der Produktionsprozess wurde im 15 L-Maßstab unter halb-kontinuierlichen Zulaufbedingungen realisiert. Hierzu wurde ein 42 L-Edelstahlrührkesselreaktor mit vier äquidistanten Strömungsbrechern und drei Rushton-Scheibenblattrührern (Techfors, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) eingesetzt. Um während des laufenden Prozesses Probenahmen zur Quantifizierung des intrazellulären Metaboloms zu ermöglichen, wurde ein eigens dafür entwickeltes Probenahmesystem (Hiller *et al.*, 2007a) zur schnellen Probennahme und Inaktivierung des Zellstoffwechsels verwendet. Weitere Bauteile, Software und Messtechnik der Anlage sind in Tabelle A.13 aufgeführt. Des Weiteren ist in Abbildung 4.2 ein Überblick über den Versuchsaufbau gegeben.

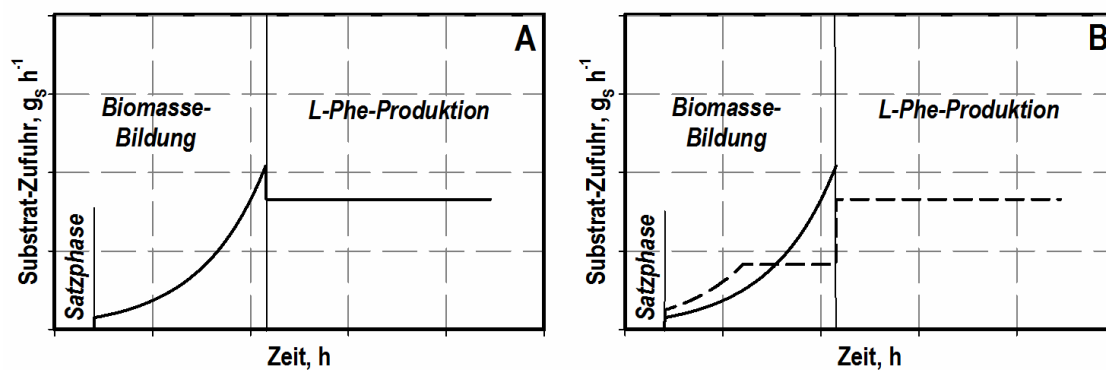


**Abbildung 4.2:** Versuchsaufbau zur Zulauf-Kultivierung im 15 L-Maßstab. 1: 42 L-Edelstahlrührkesselreaktor, 2: Steuereinheit, 3: Probenahmesystem zur schnellen Probenahme und Inaktivierung des Metabolismus, 4: Peristaltikpumpen zur Förderung von Säure, Base und Antischaum-Mittel, 5: Titrationsmittel und Antischaum, 6: Peristaltikpumpe zur Förderung des Zulaufmediums, 7: Zulaufmedium auf Analysenwaage, 8: Monitor für Permittivitätssonde, 9: Abgasanalytik für Kohlendioxid und Sauerstoff.

Vor *in situ* Sterilisation der Anlage (121 °C, 20 min) wurde der Kessel mit einer konzentrierten Lösung der temperaturstabilen Mediensalze befüllt. Nach Abkühlen auf 37 °C erfolgte die aseptische Zufuhr der sterilfiltrierten konzentrierten Lösungen der temperatursensitiven Mediensalze, Auxothrophiestoffe, Antibiotika sowie der separat autoklavierten Satzkohlenstoffquelle. Zusammen mit dem Inokulum (1 L) wurde somit ein Anfangsvolumen von 15 L bei einer Glycerin-Anfangskonzentration von 4 g L<sup>-1</sup> oder Laktat-Anfangskonzentration von 1,6 g L<sup>-1</sup> realisiert. Die Versorgung mit Sauerstoff erfolgte mittels im Medium dispergierter Druckluft. Eine Kaskadenschaltung von Rührerdrehzahl (200–1000 min<sup>-1</sup>), Begasungsrate (0,33–1,75 vvm) und Absolutdruck (1,0–1,5 bara) sicherte eine minimale Gelöstsauerstoffkonzentration von 40 %. Durch Zugabe von wahlweise

Phosphorsäure (42 %) oder Ammoniak (25 %) wurde eine pH-Regelung auf 7,0 ermöglicht. Die Temperatur wurde über die gesamte Prozesszeit konstant bei 37 °C gehalten.

Die nach der Inokulation folgenden Prozessphasen sind in Abbildung 4.3 dargestellt und gliedern sich in Wachstumsphase und L-Phenylalanin-Produktionsphase. Bei Verwendung von Glycerin oder Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle kamen über den gesamten Prozess jeweils drei unterschiedliche Zulaufmedien zum Einsatz (siehe Tabelle A.12). Diese wurden zuvor aus separat autoklavierten oder sterilfiltrierten konzentrierten Lösungen unter sterilen Bedingungen zusammengefügt. Zulaufmedien der Wachstumsphase enthielten neben der Kohlenstoffquelle, einer Stickstoffquelle und dem Selektionsmarker auch die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin zum Ausgleich der vorliegenden Auxotrophien. Das notwendige Verhältnis der beiden Aminosäuren wurde in zuvor durchgeführten Untersuchungen bestimmt (Daten nicht gezeigt) und im Projektverlauf weiter angepasst. Zulaufmedien der Produktionsphase enthielten dagegen lediglich die jeweilige Kohlenstoffquelle, den Selektionsmarker und zwei unterschiedliche Stickstoffquellen (Ammoniumsulfat und Ammoniumphosphat). Während der Produktionsphase sollte durch die Zugabe dieser beiden Stickstoffquellen zusammen mit dem Titrationsmittel Ammoniak eine Stickstofflimitierung vermieden werden. Gleichzeitig sollten die beiden Ammoniumsalze einer möglichen Phosphat- oder Sulfat-Limitierung entgegen wirken. Schuhmacher *et al.* (2014) konnten dabei für die L-Tryptophan-Synthese zeigen, dass ein Unterschreiten einer Mindestkonzentration an Phosphat die L-Tryptophan-Synthese reduziert. Im Folgenden werden die einzelnen Prozessphasen genauer erläutert.



**Abbildung 4.3:** Prozessphasen und Zulaufprofile während des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses im 15 L-Maßstab. **A)** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit einer alleinigen Kohlenstoffquelle; **B)** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit zwei Kohlenstoffquellen (Glycerin: gestrichelte Linie, Laktat: durchgezogene Linie).

In der Wachstumsphase folgte nach einer initialen Satzphase (ca. 8–15 h) eine exponentielle Medienzufuhr. Hierzu wurden die Zulaufmedien 1 und 2 sequentiell nach einem vorgegebenen exponentiellen Zulaufprofil (siehe Gleichung (3.20)) über eine steuerbare Schlauchpumpe in den Kessel gefördert. In der von Jenzsch *et al.* (2006) beschriebenen Gleichung wurde dabei

eine Soll-Wachstumsrate ( $\mu_{Soll}$ ) von  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , ein Anfangsvolumen ( $V_0$ ) von 15 L und eine theoretische Biomasseausbeute ( $Y_{XS}$ ) von  $0,25 \text{ g g}^{-1}$  vorgegeben. Insgesamt sollte in dieser Prozessphase eine Biomasse-Konzentration von mindestens  $20 \text{ g L}^{-1}$  für die während der Produktionsphase durchzuführenden metabolischen Analysen erzielt werden. Aufgrund der vorliegenden Auxotrophien der Produktionsstämme bezüglich L-Phenylalanin und L-Tyrosin war hierzu eine Zufuhr der beiden Aminosäuren mit den Zulaufmedien notwendig. Um eine Wachstumslimitierung aufgrund der Auxotrophien zu vermeiden, sollte durch die gewählte Aminosäure-Konzentration in den Zulaufmedien eine Aminosäure-Konzentration von  $> 10 \text{ mg L}^{-1}$  im Prozess sichergestellt werden. Gleichzeitig sollten jedoch zu Beginn der Produktionsphase hohe Aminosäure-Konzentrationen aufgrund der beschriebenen rückkopplungsinhibierenden Wirkung der Aminosäuren auf die Aminosäureproduktion (siehe Kapitel 3.7.3) vermieden werden.

Nach 40–45 h erfolgte die Induktion der Proteinexpression zur L-Phenylalanin-Produktion durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG;  $0,3 \text{ mM}$  Konzentration im Prozess) und der Beginn der Produktionsphase. Die Förderrate ( $0,18 \text{ g}_{\text{Substrat}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) des über die gesamte Produktionsphase verwendeten Zulaufmediums 3 (siehe Tabelle A.12) wurde an die zu Produktionsbeginn vorliegende Biomasse angepasst und der volumetrische Fluss über die Prozesszeit konstant gehalten. Für die gewählte Förderrate konnte in Vorarbeiten des Projektpartners die höchste L-Phenylalanin-Ausbeute nachgewiesen werden (Gottlieb, 2010).

#### 4.3.5 Zulaufkultivierung im 15 L-Maßstab mit zwei Kohlenstoffquellen

Ein Kohlenstofffluss in den Citrat-Zyklus ausgehend von Glycerin kann in Pyruvatkinase-negativen ( $\Delta pykA$ ,  $\Delta pykF$ ) Stämmen nur durch alternative Stoffwechselwege wie der PEP-Carboxylase ermöglicht werden (siehe Kapitel 3.7). In Vorversuchen konnte für entsprechende Stämme ein deutlich verringertes Wachstum ( $< 0,05 \text{ h}^{-1}$ ) mit Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um in diesem Projekt auch für Pyruvatkinase-negative Stämme eine ausreichend schnelle Biomassebildung während der Wachstumsphase des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses zu ermöglichen, war eine von Kapitel 4.3.4 abweichende Prozessführung notwendig. Dabei wurde die generelle Einteilung des Prozesses in Wachstumsphase und L-Phenylalanin-Produktionsphase, wie in Abbildung 4.3 dargestellt, beibehalten. Um während der Wachstumsphase von Pyruvatkinase-negativen Stämmen einen höheren Kohlenstofffluss in den Zentralstoffwechsel zu ermöglichen, wurde in diesem Zeitraum die zusätzliche Kohlenstoffquelle Laktat eingesetzt. Laktat kann über die Laktatdehydrogenase zu Pyruvat abgebaut werden und stellt damit einen direkten Zugang zum Zentralstoffwechsel dar (siehe Kapitel 3.7). Auf den Einsatz von Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde in der Wachstumsphase nicht verzichtet, um bei Beginn der

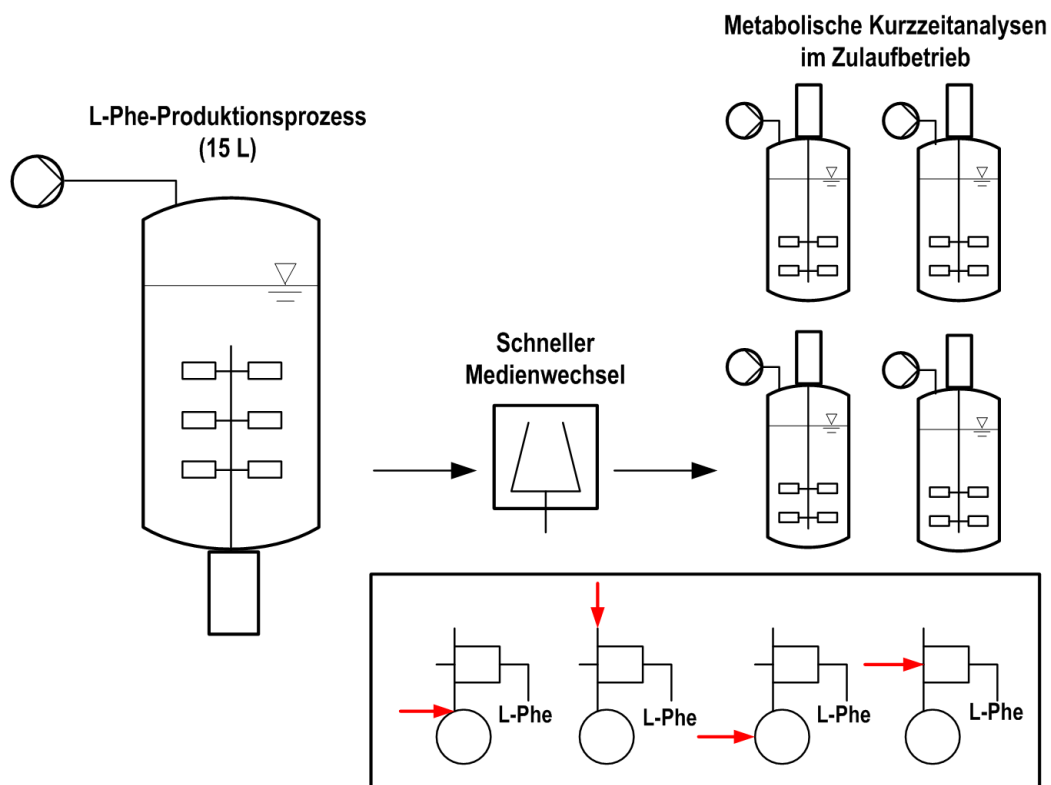
L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin eine ausreichend hohe Expression des Glycerin-Metabolismus gewährleisten zu können. So wurden bereits in der Satzphase beide Kohlenstoffquellen im Medium vorgelegt (Glycerin:  $2,4 \text{ g L}^{-1}$  Laktat:  $1,6 \text{ g L}^{-1}$ ). Für das gewählte Verhältnis aus Glycerin und Laktat wurde in Vorversuchen die höchste Wachstumsrate erzielt (Daten nicht gezeigt). Zu Beginn der exponentiellen Medienzufuhr wurden beide Kohlenstoffquellen über ein Zulaufmedium (Zulaufmedium 1: siehe Tabelle A.11 und A.12) gemeinsam nach dem in Gleichung (3.20) beschriebenen exponentiellen Zulaufprofil zugeführt. Hierbei wurde angenommen, dass Laktat die alleinige wachstumslimitierende Kohlenstoffquelle darstellt (theoretische Biomasseausbeute ( $Y_{XS}$ ) von  $0,4 \text{ g g}^{-1}$ ). Nach Verbrauch des ersten Zulaufmediums wurden die beiden Kohlenstoffquellen voneinander entkoppelt. Glycerin wurde über ein separates Zulaufmedium (Zulaufmedium 2b: siehe Tabelle A.11 und A.12) mit konstanter Rate gefördert. Die eigentliche Wachstumskohlenstoffquelle Laktat wurde hingegen in einem eigenen Zulaufmedium (Zulaufmedium 2a: siehe Tabelle A.11 und A.12) weiterhin mit exponentiell zunehmender Förderrate zugeführt. Nach Abschluss der Biomassebildungsphase erfolgte die L-Phenylalanin-Produktionsphase wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben.

## 4.4 Parallelisierte Kurzzeitanalysen nach schnellem Medienwechsel

Zur metabolischen Charakterisierung von L-Phenylalanin-Produktionsstämmen wurden in dieser Arbeit Kurzzeitanalysen nach schnellem Medienwechsel durchgeführt. Die hierbei verwendete Methodik des schnellen Medienwechsels ist von Link *et al.* (2010) beschrieben.

Im Gegensatz zu dem von Link *et al.* (2010) beschriebenen Ansatz konnten die metabolischen Kurzzeitanalysen in dieser Arbeit aufgrund des angenommenen instationären Verhaltens im L-Phenylalanin-Produktionsprozess nicht sequentiell durchgeführt werden. Aus diesem Grund erfolgte die Realisierung von metabolischen Kurzzeitanalysen im Parallelansatz. Hierbei wurde das in Kapitel 4.3.3 beschriebene Parallelbioreaktorsystem mit vier Glas-Rührkesselreaktoren eingesetzt. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Reaktionsansätze wurde dabei durch eine mit Sauerstoff angereicherte Druckluftbegasung (24 % O<sub>2</sub> und ~ 8 vvm) und eine Rührerdrehzahl von 1.200 min<sup>-1</sup> gewährleistet. Die Regelung des pH (pH 7,0) erfolgte automatisiert durch Zugabe von Natronlauge (2 M) oder Phosphorsäure (21 %).

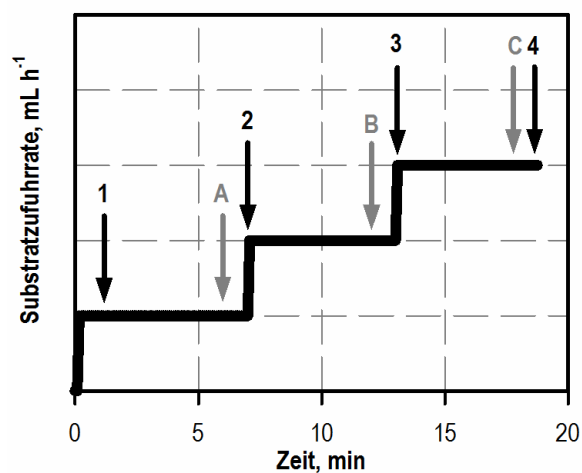
Ein schematischer Überblick über die Methodik der parallelisierten Kurzzeitanalysen nach schnellem Medienwechsel ist in Abbildung 4.4 gegeben.



**Abbildung 4.4:** Schematischer Überblick über die Methodik der parallelisierten Kurzzeitanalysen (im Zulaufbetrieb) nach schnellem Medienwechsel.

Zur Durchführung der metabolischen Analysen wurden 3,6 L Zellsuspension aus dem L-Phenylalanin-Produktionsprozess entnommen und die Biomasse schnell durch Zentrifugation (37 °C, 3.260 g, 7,5 min) abgetrennt. Nach Verwurf des Überstandes wurde die Biomasse in vortemperiertem (37 °C) Minimal-Medium (400 mL) resuspendiert und zu gleichen Teilen in vier Messgefäße verteilt. Anschließend wurde der Inhalt jedes Messgefäßes in jeweils einen vorbereiteten Analysenreaktor überführt. Hierzu wurde ein mit Deckel versehener Seitenarm des Analysenreaktors kurzfristig geöffnet und nach dem Befüllvorgang unmittelbar wieder verschlossen. In jedem Analysenreaktor waren 400 mL Minimal-Medium (37 °C, pH 7) vorgelegt. Wurden die Analysen im Satzbetrieb durchgeführt, enthielten die vorgelegten Medien bereits das jeweilige Substrat. Im Gegensatz dazu erfolgte die Substratzufuhr unter Zulaufbedingungen über miniaturisierte Schlauchpumpen. Hierbei wurde das in Abbildung 4.5 schematisch dargestellte Stufenprofil individuell für jede Kohlenstoffquelle über die Prozessleitsoftware eingestellt. Die tatsächlich aus dem Vorlagenbehälter entnommenen Substratmengen konnten dabei durch Analysenwaagen erfasst und aufgezeichnet werden. Die eingestellten Zufuhrraten und die verwendeten Substratlösungen sind in Tabelle 4.4 beschrieben. Über die gesamte Analysenzeit von 19 min wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben parallel aus allen vier Reaktionsansätzen entnommen. Ermöglicht wurde dies durch das in Kapitel 4.3.3 beschriebene modifizierte System zur schnellen Probenahme. Die genauen Probenahme-Zeitpunkte sind in Abbildung 4.5 für das Zulaufverfahren dargestellt. Für den Satzbetrieb wurden diese analog umgesetzt. Neben einer zu Beginn des Zulaufverfahrens (1 min) entnommenen Probe wurde jeweils am Ende einer Gleichgewichtsstufe (7, 13, 19 min) eine Probenahme zur Bestimmung von extrazellulären Metaboliten und der vorliegenden Biomassekonzentration durchgeführt. Eine Minute vor Ende der Gleichgewichtsstufe (6, 12, 18 min) wurde jeweils eine Probe zur Bestimmung von intrazellulären Metaboliten entnommen.





**Abbildung 4.5:** Zulaufprofil während der metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb. Probenahmezeitpunkte zur Bestimmung von extrazellulären Substanzen sind durch schwarze Pfeile (1–4) gekennzeichnet. Probenahmezeitpunkte zur Bestimmung von intrazellulären Metaboliten sind durch graue Pfeile (A, B und C) gekennzeichnet.

**Tabelle 4.4:** Zulaufmedien und Förderraten während der im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen.

Analysenreaktor	1	2	3	4
Substrat	Pyruvat	Glucose	Succinat	Glycerin
Konzentration im Zulaufmedium	100 g L <sup>-1</sup>	50 g L <sup>-1</sup>	60 g L <sup>-1</sup>	80 g L <sup>-1</sup>
Zufuhrrate 1	13 mL h <sup>-1</sup>	16 mL h <sup>-1</sup>	24 mL h <sup>-1</sup>	17 mL h <sup>-1</sup>
Zufuhrrate 2	31 mL h <sup>-1</sup>	32 mL h <sup>-1</sup>	43 mL h <sup>-1</sup>	36 mL h <sup>-1</sup>
Zufuhrrate 3	50 mL h <sup>-1</sup>	49 mL h <sup>-1</sup>	62 mL h <sup>-1</sup>	55 mL h <sup>-1</sup>

## 4.5 Quantitativer Nachweis extrazellulärer Substanzen

### 4.5.1 Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmasse

Die optische Dichte (OD) von Kulturproben wurde mit einem Einstrahlphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Bei Überschreiten der Messobergrenze von 0,35 wurden die Proben entsprechend mit Phosphat-Puffer verdünnt. Eventuelle Fehler bei der Probenvorbereitung wurden durch drei separate Messansätze berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration wurden 2 mL der Zellsuspension in ein zuvor trocken ausgewogenes Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (20 min, 17.530 g). Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet anschließend bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Ansatz erneut ausgewogen. Die Massendifferenz der beiden Messungen beschreibt die in 2 mL Zellsuspension enthaltene Biomasse. Messungenauigkeiten wurden durch drei separate Messansätze berücksichtigt.

### 4.5.2 Durchflusszytometrie

Für den qualitativen Vergleich zwischen lebenden Zellen und toten Zellen in der L-Phenylalanin-Produktionsphase wurde in dieser Arbeit die Methode der Durchflusszytometrie angewendet. Die Gerätebauteile, Einstellungen und verwendeten Lösungen können Tabelle A.27 entnommen werden. Als Laufmittel wurde bidestilliertes, filtriertes (0,22 µm) Wasser verwendet. Zur Regulation der gemessenen Partikelanzahl auf 900–1200 s<sup>-1</sup> wurden Durchflussgeschwindigkeiten von 0,5–2,0 µL s<sup>-1</sup> gewählt. Zur Probenvorbereitung wurde die aus dem Prozess entnommene Zellsuspension mit filtrierter (0,22 µm) Kochsalzlösung (0,85 % (w/v)) auf eine Partikelzahl von ca. 10<sup>9</sup> mL<sup>-1</sup> verdünnt. Im Anschluss wurden die beiden Farbstoffe RH414 (3 µM) und DiBAC4(3) (0,75 µM) zugegeben. RH414 diente hierbei zur Minimierung der Hintergrundstreuung durch Zellbruchstücke. DiBAC4(3) diente zur Färbung von depolarisierten Zellmembranen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Software FlowMax<sup>®</sup>.

### 4.5.3 HPLC-Analyse zur Quantifizierung von Glycerin und organischen Säuren

Die Quantifizierung der Kohlenstoffquellen Glycerin und Laktat sowie der Analysen-Kohlenstoffquellen Succinat und Pyruvat erfolgte mittels ‚*high performance liquid chromatographie*‘ (HPLC). Gleiches gilt für das Nebenprodukt Acetat im Kulturüberstand. Hierzu wurden zentrifugierte (4 °C, 50.000 g, 10 min) Proben des Kulturüberstandes filtriert (0,22 µm), ggf. mit VE-Wasser verdünnt und analysiert. Die notwendige Metabolit-Auftrennung wurde durch einen isokratischen Betrieb (0,7 mL min<sup>-1</sup>; 5 mM Schwefelsäure) einer Aminex<sup>®</sup> Trennsäule (Hauptsäule: HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm; Vorsäule: Micro-Guard Cation H Cartridge; Bio Rad, Hercules, USA) bei 60 °C realisiert. Die Detektion der einzelnen Metabolite erfolgte über den Brechungsindex. Die Quantifizierung wurde durch den Vergleich mit einer externen Kalibrierung (0,1-20,0 g L<sup>-1</sup>) und Vermessung von Doppelansätzen realisiert. Die Bauteile der Flüssigkeitschromatographie-Anlage sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A.19). Probensequenzierung und Datenauswertung wurde mit der Software ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) realisiert.

### 4.5.4 HPLC-Analyse zur Quantifizierung von Aminosäuren

Die Quantifizierung der Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Glutamat im Kulturüberstand erfolgte mittels HPLC nach vorangegangener Derivatisierung (Methode adaptiert von Phenomenex Application No. 15992). Hierzu wurden zentrifugierte (4 °C, 50.000 g, 10 min) Proben des Kulturüberstandes filtriert (0,22 µm) und ggf. mit VE-Wasser verdünnt. Die anschließend durch den Probengeber realisierte automatisierte Derivatisierung mit den in Tabelle A.21–A.24 aufgeführten Chemikalien ist in Tabelle A.25 beschrieben. Abschließend wurden 20 µL der derivatisierten Probe in das Chromatographiesystem injiziert. Die Aminosäure-Auftrennung wurde auf einer C18-Trennsäule (Hauptsäule: Gemini, 150 mm x 4,6 mm x 5 µM, 110 Å; Vorsäule: SecurityGuard Cartridges C18 4,0 mm x 3,0 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) bei 40 °C Betriebstemperatur mit dem im Anhang (Tabelle A.26) beschriebenen binären Gradienten aus Eluent A (40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,6 mit NaOH eingestellt) und Eluent B (45 % (v/v) Acetonitril, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) VE-Wasser) realisiert. Die Detektion der einzelnen Aminosäuren erfolgte über das resultierende Fluoreszenzsignal (Anregung bei 340 nm; Emission bei 450 nm). Die Quantifizierung wurde durch den Vergleich mit einer externen Kalibrierung (10–1500 mg L<sup>-1</sup>) und Vermessung von Doppelansätzen realisiert. Die Bauteile der Flüssigkeitschromatographie-Anlage sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A.20). Probensequenzierung und Datenauswertung wurden mit der Software Chromgate (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) realisiert.

#### **4.5.5 Enzymatischer Nachweis von Glucose, organischen Säuren und Ammoniak**

Die quantitative Bestimmung von Glucose, Malat und Ammonium im Kulturüberstand erfolgte indirekt über jeweils eine einstufige enzymatische Umsetzungsreaktion. Der hierbei auftretende NADH-Verbrauch (Ammonium) respektive die NADPH-Bildung (Glucose) oder NADH-Bildung (Malat) ist äquimolar zur umgesetzten Eduktmenge und photometrisch (340 nm) quantifizierbar.

Zur quantitativen Differenzierung von D- und L-Laktat als Nebenprodukt im Kulturüberstand wurde ein zweistufiger enzymatischer Ansatz unter photometrischem Nachweis der NADH-Bildung bei 340 nm durchgeführt.

Alle enzymatischen Nachweise wurden wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Die Analytkonzentrationen in den Proben wurden mittels einer mitgeführten externen Kalibrierung im Doppelansatz quantifiziert. Die eingesetzten Volumina wurden dabei für den Einsatz in Mikrotiterplatten modifiziert. Für die enzymatischen Nachweise wurden zentrifugierte (4 °C, 50.000 g, 10 min) Proben des Kulturüberstandes filtriert (0,22 µm) und entsprechend des Kalibrierbereiches mit VE-Wasser verdünnt. Bezugsquelle, Nachweisbereiche und Beschreibungen der enzymatischen Umsetzungsreaktionen können Tabelle A.28 entnommen werden.

## 4.6 Gewinnung von U-<sup>13</sup>C-markiertem Zellextrakt

Das Protokoll zur Herstellung von U-<sup>13</sup>C-markiertem Zellextrakt gliederte sich in zwei sequentielle Teilschritte.

Im ersten Teilschritt der Extrakt-Herstellung erfolgte die Gewinnung von U-<sup>13</sup>C-markierter Biomasse. Die hierfür notwendige Vorkultur wurde durch Inkubation (37 °C, 200 min<sup>-1</sup>, 15 h) von Zellen aus der Stammhaltung (LB-Kryo) in zwei mit Minimal-Medium (100 mL) befüllten Schüttelkolben (500 mL) gewonnen. Hierbei wurde U-<sup>13</sup>C-markierte Glucose (5 g L<sup>-1</sup>) als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt. Nach Abtrennen der gewonnenen U-<sup>13</sup>C-markierten Biomasse durch Zentrifugation (4 °C, 3.260 g, 10 min) und Resuspendieren des Zellpellets in sterilem Phosphatpuffer (10 mL) erfolgte die aseptische Überführung in einen mit 500 mL Minimal-Medium (5,2 g L<sup>-1</sup> U-<sup>13</sup>C-Glucose) gefüllten sterilen Laborrührkesselreaktor. Das hierbei eingesetzte System entspricht einem Einfachansatz des in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Parallelsystems. Die genauen Bestandteile der Anlage sowie die Reaktorvorbereitung und der Betrieb kann somit Kapitel 4.3.3 entnommen werden. Nach Verbrauch der vorgelegten Satzglucose erfolgte im Falle von *E. coli* K12 die Ernte der U-<sup>13</sup>C-markierten Biomasse. Für *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> wurde durch erneute Zugabe von U-<sup>13</sup>C-Glucose (1,4 g L<sup>-1</sup>) und zusätzlicher IPTG-Zugabe (0,3 mM) die Proteinexpression zur Aminosäure-Produktion initialisiert. Nach Verbrauch der vorgelegten Satzglucose erfolgte auch für *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> die Ernte der U-<sup>13</sup>C-markierten Biomasse. Hierbei wurde durch Zentrifugation (37 °C, 3.260 g, 10 min) die Biomasse insteril abgetrennt und nach Verwurf des Überstandes in einem vortemperierten (37 °C), niedrig konzentrierten Phosphatpuffer (10 mM, pH 7, Zusammensetzung siehe Tabelle A.9) resuspendiert.

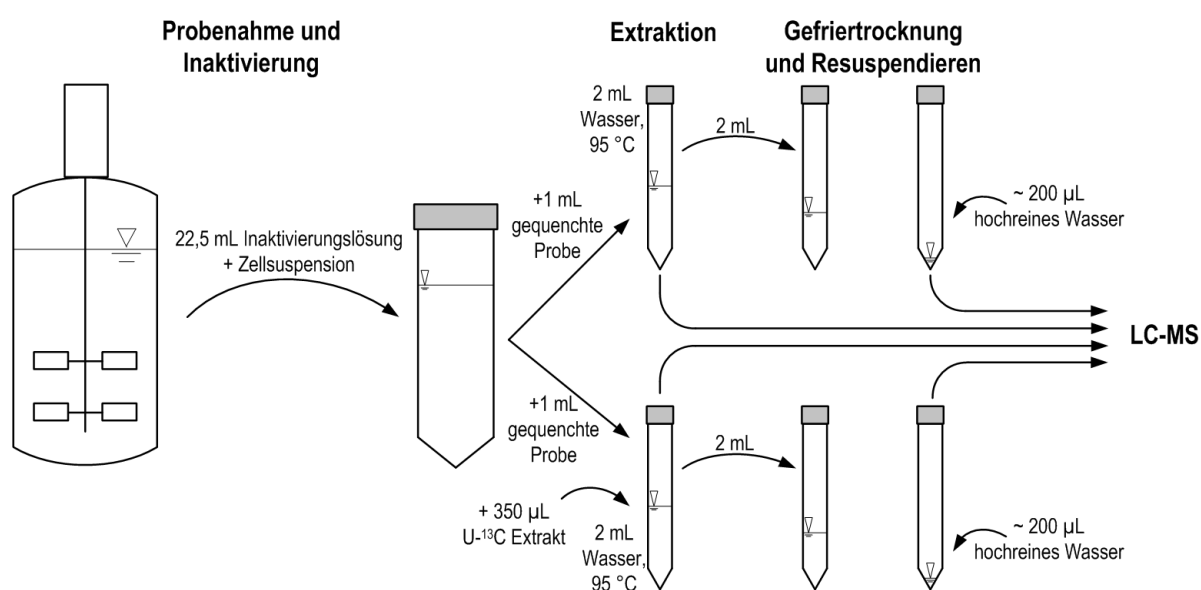
Der zweite Teilschritt der Extrakt-Herstellung wurde für alle verwendeten Stämme unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die U-<sup>13</sup>C-markierte Biomasse-Suspension wurde zu gleichen Teilen auf acht parallelisierte, mit Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) gefüllte (8 mL) Milliliter-Bioreaktoren verteilt und nach Zugabe von U-<sup>13</sup>C-Glucose (6 g L<sup>-1</sup>) bei 37 °C kultiviert (Rührerdrehzahl 2.800 min<sup>-1</sup>, Begasungsrate ~10 vvm, pH 7). Die Funktionsweise des dabei verwendeten „bioREACTOR 48“ Systems (2mag, München, Deutschland) kann der Literatur entnommen werden (Kusterer *et al.*, 2008; Puskeiler *et al.*, 2005; Weuster-Botz *et al.*, 2005). Bauteile und Software sind in Tabelle A.15 aufgeführt. Eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff wurde durch eine mit Sauerstoff angereicherte Druckluftbegasung (30% O<sub>2</sub>) sichergestellt. Um das Einbringen von <sup>12</sup>C-markiertem Kohlenstoff in den Prozess der U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Gewinnung zu vermeiden, wurde das Gasgemisch vor Eintritt in den Bioreaktor zur Fällung des enthaltenen Kohlendioxids durch Kalilauge (4 M) geleitet. Durch die parallel zur Kultivierung mit einem Blutzuckermessgerät (Accu-Chek<sup>®</sup>, Roche, Basel, Schweiz) bestimmte Glucose-Konzentration in den einzelnen Reaktionsansätzen konnte ein Zeitpunkt kurz vor dem vollständigen Verbrauch der vorgelegten Satzglucose (< 0,1 g L<sup>-1</sup>) zur

Zellextraktion gewählt werden. Die Extraktion (5 min) wurde dabei durch Transfer der einzelnen Reaktionsansätze in mit heißem Extraktions-Wasser (20 mL, 30 mM TEA, 95 °C) gefüllte Reaktionsgefäße eingeleitet. Die im Wasserbad (95 °C) fixierten Reaktionsgefäße wurden dabei wiederholt geschüttelt, um eine optimale Durchmischung des Extraktionsansatzes zu gewährleisten. Nach Abkühlen der Ansätze auf Eis erfolgte anschließend die Abtrennung von Zelltrümmern durch Zentrifugation (4 °C, 3.260 g, 20 min). Der resultierende Überstand wurde daraufhin auf frische Reaktionsgefäße verteilt und eingefroren (-80 °C). Durch Gefriertrocknung (-62 °C, 36 h) und Resuspendieren der Pellets in einem möglichst geringen Volumen an hochreinem Wasser (LC-MS ultragrade) konnte die Konzentration an U-<sup>13</sup>C-Metaboliten im Extrakt abschließend erhöht werden.

## 4.7 Probenahme und Aufarbeitung zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite

Um eine schnelle Inaktivierung des Zellstoffwechsels bei der Probenahme im Parallelbioreaktorsystem während der metabolischen Analysen zu ermöglichen, wurde zu Beginn dieser Arbeit eine miniaturisierte und weiterentwickelte Version des von Hiller *et al.* (2007a) beschriebenen Probenahmesystems in das 0,5 L-Parallelbioreaktorsystem integriert. Konstruktionsdaten des miniaturisierten Systems können dem Anhang (Abbildung A.10–A.18) entnommen werden. In Vorbereitung zur Probenahme wurde das Entnahmerohr mit 22,5 mL Inaktivierungslösung gefüllt und auf  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Durch Reduzierung des Innendrucks auf 200 mbar und anschließendes Ankoppeln am Gegenstück im Analysenreaktor erfolgte die Probenahme mit gleichzeitiger Inaktivierung des Zellstoffwechsels. In Arbeiten zur Charakterisierung des modifizierten Probenahmesystems konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von Methanol (60 %, 30 mM Triethanolamin) als Inaktivierungslösung eine ausreichende durchschnittliche Inaktivierungstemperatur von  $< -25\text{ }^{\circ}\text{C}$  nach der Probenahme erreicht wird (siehe Abbildung A.19).

Nach der Probenahme erfolgte die Überführung der inaktivierten Zellsuspension in ein separates vorgekühltes Reaktionsgefäß (Ethanol-Eis-Bad,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und Lagerung der Probe bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Direkt nach Ende der metabolischen Kurzzeitanalyse erfolgte die weitere Probenaufarbeitung aller Proben mit den zwei in Abbildung 4.6 beschriebenen Ansätzen. Gleichzeitig erfolgte durch Vermessung der optischen Dichte die Bestimmung der eingesetzten Biomasse-Konzentration.



**Abbildung 4.6:** Protokoll zur Probenahme und Probenaufarbeitung zur intrazellulären Metabolom-Analyse mit und ohne Verwendung von U- $^{13}\text{C}$ -markiertem Zellextrakt.

Die beiden Ansätze zur Aufarbeitung von intrazellulären Metabolomproben unterschieden sich durch Verwendung eines internen Standards. So wurde beim ersten Aufarbeitungsansatz 1 mL inaktivierte Zellsuspension zusammen mit 350  $\mu\text{L}$   $\text{U-}^{13}\text{C}$ -markiertem Zellextrakt als interner Standard zur Extraktion zugegeben. Im zweiten Aufarbeitungsansatz wurde auf den internen Standard verzichtet. Für die spätere Datenauswertung wurde vorrangig der Aufarbeitungsansatz mit  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -markiertem Zellextrakt zur Metabolit-Quantifizierung genutzt. Hingegen wurde der zweite Ansatz für die Bestimmung von Metaboliten gewählt, welche nicht im  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -markierten Zellextrakt enthalten waren. Hierbei erwies sich die Vermeidung des zusätzlich eingebrachten Extraktes als positiv für die dem Massenspektrometer vorgeschaltete Ionisation.

Die eigentliche Extraktion erfolgte für 5 min bei 95 °C in 2 mL gepuffertem VE-Wasser (30 mM TEA, pH 7). Nach Abkühlen der Proben auf Eis und Abtrennen der Zellbruchstücke (Zentrifugation, 4 °C, 3.260 g, 20 min), wurden je 500  $\mu\text{L}$  der Ansätze für die direkte massenspektrometrische Analyse gelagert (-20 °C). Vom verbleibenden Überstand wurden 2 mL in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C eingefroren. Durch vollständige Gefriertrocknung der Ansätze und anschließendem Resuspendieren in hochreinem Wasser konnten die Proben abschließend aufkonzentriert werden. Auch die Lagerung dieser Proben erfolgte bei -20 °C.

Insgesamt standen somit pro Probenahme vier verschieden aufgearbeitete Proben zur massenspektrometrischen Analyse zur Verfügung. Hierbei unterschieden sich die Proben in der Quantifizierungstechnik (interner Standard oder externe Kalibrierung) sowie in den vorliegenden Salzkonzentrationen. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, ermöglichte dies einen möglichst umfassenden Nachweis einer großen Anzahl an Metaboliten.



## 4.8 Quantitativer Nachweis intrazellulärer Metabolite

### 4.8.1 Massenspektrometrische Analyse

Aufgrund eines Gerätedefektes wurden während dieser Arbeit zwei unterschiedliche massenspektrometrische Methoden zur Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten verwendet.

Die Bestimmung von Phosphoenolpyruvat-Konzentrationen während der in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Untersuchungen wurde mit einer von Luo *et al.* (2007) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Bauteile der Flüssigkeitschromatographie-Anlage sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A.16). Innerhalb dieser Methode erfolgte die chromatographische Metabolit-Auftrennung mittels einer RP-C18 Säule (Hauptsäule: Synergi Hydro 150 mm x 2,0 mm x 4 µm, 80 Å; Vorsäule: SecurityGuard Cartridges C18 Aq 4 mm x 2,0 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) bei 35 °C Betriebstemperatur und einer konstanten Flussrate von 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Der verwendete zeitliche Gradient aus Eluent A (wässrige 10 mM Tributylamin Lösung; pH 4,95 mit Essigsäure eingestellt) und Eluent B (Methanol) ist in Tabelle A.18 im Anhang beschrieben. Das Injektionsvolumen der gekühlten (4 °C) Proben betrug 20 µL unter Nutzung der gesamten Injektionsschleife. Die Ionisation des Flüssigkeitsstroms wurde durch Elektronenspray-Ionisation (ESI) realisiert. Durch Luftzerlegung (ECO2-ESP, DWT, Essen, Deutschland) wurde hierfür Stickstoff zur Nutzung als ‚sheathgas‘ bereitgestellt. Die Detektion von negativ geladenen Ionen (SIM Modus) erfolgte anschließend mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ Advantage; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Helium (Air Liquide, Alphagaz 1, Paris, Frankreich) wurde als Stützgas (‚auxilliary gas‘) eingesetzt. Probensequenzierung und Datenauswertung wurden mit der Software Xcalibur 1.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

In sämtlichen weiteren Metabolom-Untersuchungen wurde die intrazelluläre Metabolit-Quantifizierung durch eine von Büscher *et al.* (2010) beschriebene UHPLC-MS-Methode realisiert. Die dafür verwendeten Bauteile der Flüssigkeitschromatographie-Anlage sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A.17). Als Trennsäule wurde eine Acquity HSS T3 (Hauptsäule: 150 mm x 2,1 mm x 1,8 µm, 100 Å; Vorsäule: VanGuard 2,1 mm x 5,0 mm; Waters Corporation, Milford, USA) bei 40 °C Betriebstemperatur eingesetzt. Der verwendete Gradient aus Eluent A (Lösung aus 10 mM Tributylamin, 15 mM Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol) und Eluent B (2-Propanol) sowie die über den Gradient veränderlichen Flussraten sind in Tabelle A.18 im Anhang beschrieben. Das Injektionsvolumen der gekühlten (4 °C) Proben betrug 10 µL unter Nutzung der gesamten Injektionsschleife. Die Ionisation des aufgeheizten Flüssigkeitsstroms wurde durch Elektronenspray-Ionisation (HESI) realisiert. Durch Luftzerlegung (ECO2-ESP, DWT, Essen, Deutschland) wurde hierfür Stickstoff zur Nutzung als ‚sheathgas‘ bereitgestellt. Die Detektion von negativ geladenen Ionen (SIM

Modus) erfolgte anschließend mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (TSQ Vantage; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Argon (Air Liquide, Alphagaz 2, Paris, Frankreich) wurde als Stützgas („auxilliary gas“) eingesetzt. Probensequenzierung und Datenauswertung wurden mit der Software Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

#### 4.8.2 Quantifizierung von Speicherstoffen

Zur Quantifizierung von intrazellulärem Glycogen wurde in dieser Arbeit ein kommerziell verfügbarer enzymatischer Nachweis eingesetzt (MAK016, Sigma-Aldrich). Zur Probenvorbereitung wurden hierzu 2 mL Zellsuspension direkt nach der Probenahme in Kalilauge gekocht (4 mL 45 % KOH, 95 °C, 2 h). Hierdurch erfolgte die Glycogen-Extraktion aus den Zellen und gleichzeitig die Beseitigung einer möglichen Hintergrundkonzentration an Glucose. Nach Präzipitieren des Glycogens mit Ethanol (99 %, 12 mL) und Abtrennen des Pellets durch Zentrifugation (4 °C, 3.260 g, 10 min) wurde das Präzipitat mit 1 mL VE-Wasser gelöst und angesäuert (HCl). Anschließend wurde die Probe erneut präzipitiert (Ethanol 99 %, 1 mL) und gefriergetrocknet. Vor der eigentlichen Analyse wurde die getrocknete Probe mit dem vom Hersteller mitgelieferten Hydrolysepuffer resuspendiert. Die Analyse wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt (Fluoreszenznachweis: Anregung 535 nm, Emission 587 nm). Mit der in Hydrolysepuffer gelösten Probe erfolgte zusätzlich eine Kontrolle auf eine mögliche Hintergrundkonzentration an Glucose. Hierzu wurde die in Kapitel 4.5.5 beschriebene Methode eingesetzt.

Zur Quantifizierung von intrazellulärer Trehalose wurde die in Kapitel 4.5.3 beschriebene HPLC-Methode angewendet. Zur Probenvorbereitung wurde hierzu Zellsuspension direkt nach der Probenahme im doppelten Volumen VE-Wasser gekocht (95 °C, 5 min). Nach Abtrennen der Zellbruchstücke durch Zentrifugation (4 °C, 3.260 g, 20 min) wurde der Überstand bis zur Analyse kühl gelagert (4 °C).

Für beide intrazellulären Speicherstoffe wurde die Quantifizierung durch den Vergleich mit externen Kalibrierungen und Vermessung von Doppelansätzen realisiert.

## 4.9 Berechnungsmethoden

### 4.9.1 Genomweite Stoffflussabschätzung

Zur Abschätzung von intrazellulären Stoffflussverteilungen wurden in dieser Arbeit die genomweiten Modellierungsansätze der geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA) und Flussvarianz-Analyse (FVA) genutzt. Grundlage war hierbei die MATLAB<sup>®</sup> (The Mathworks Inc., Natick, USA) basierende COBRA Platform 2.0 (Schellenberger *et al.*, 2011) mit dem genomweiten *E. coli* K12 MG1655 Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007).

Das genomweite Modell wurde an die genetischen Besonderheiten der L-Phenylalanin-Produktionsstämme sowie die Reaktionsbedingungen angepasst:

So wurde in sämtlichen Berechnungen für die Prephenat-Dehydrongease ein Null-Fluss vorgegeben (L-Tyrosin-Auxotrophie:  $\Delta tyrA$ ). Gleiches galt für die Pyruvatkinase in Pyruvatkinase-negativen Stämmen ( $\Delta pykA$ ,  $\Delta pykF$ ). Eine L-Tyrosin-Aufnahme aus dem Medium wurde hingegen ermöglicht, um Biomassebildung zu gewährleisten.

Aufgrund der durchgehend aeroben Reaktionsbedingungen wurde dem anaeroben Glycerin-Metabolismus kein Kohlenstoff zur Verfügung gestellt (Null-Fluss der Glycerin-Dehydrogenase). Gleiches gilt für die Reaktion der Fructose-6-phosphat-Aldolase, für welche eine Inhibierung durch die Prozesskohlenstoffquelle Glycerin beschrieben ist (Schürmann und Sprenger, 2001). Eine theoretische L-Tryptophan-Aufnahme respektive Glucose-Aufnahme aus dem Medium wurde unterbunden, wenn der entsprechende Stoff nicht im Medium vorgelegt wurde. Die Vermeidung der Stoffflüsse über die Fumarat-Reduktase, L-Aspartase und AcetylCoA-Synthase war des Weiteren notwendig, um Schleifenreaktionen um den Citrat-Zyklus zu unterbinden.

Zur weiteren Beschränkung des theoretischen Lösungsraumes wurden bei den Berechnungen experimentell bestimmte extrazelluläre Stoffflüsse wie die Substrataufnahmeraten, L-Phenylalanin-Bildung, Nebenprodukt-Bildung und Atmungsraten eingesetzt, welche nach den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Gleichungen (3.21), (3.27) und (3.28) berechnet wurden. Welche gemessene Rate für welche Berechnung genutzt wurde, ist dabei in den entsprechenden Ergebniskapiteln aufgeführt. Die Maximierung der Biomassebildung diente für alle Berechnungsansätze als Zielfunktion. Hierbei wurde ein 99,9 %iges Varianz-Kriterium für die Varianzbestimmung angewendet. Um Messfehler der experimentell bestimmten Raten bei der Varianzanalyse berücksichtigen zu können, wurden die Standardabweichungen der experimentell bestimmten Flüsse in die Berechnungen einbezogen. Hierzu wurden die oberen und unteren Grenzen der Stoffflüsse in allen möglichen Kombinationen alternierend vorgegeben und somit der größte mögliche Lösungsraum aufgespannt.

Die durch das genomweite Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) vorgegebene Stöchiometrie der Atmungskette ist in Kapitel 3.7 durch Abbildung 3.3 beschrieben. Eine weitere Möglichkeit der Beschreibung der oxidativen Phosphorylierung stellt der P/O-Quotient dar,

welcher das Verhältnis von produziertem ATP pro reduziertem Sauerstoff angibt ( $\text{mol}_{\text{ATP}} \text{mol}_{\text{O}_2}^{-1}$ ). Da in *E. coli* die Oxidation der Reduktionsäquivalente nicht notwendigerweise mit der Phosphorylierung gekoppelt ist (Anraku und Gennis, 1987), ist in der Literatur eine große Diskrepanz zwischen dem mechanistischen Wert und den experimentell gewonnenen P/O-Quotienten beschrieben (Kayser, 1999). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auf eine genaue Beschränkung des P/O-Quotienten bei der theoretischen Stoffflussabschätzung verzichtet.

#### 4.9.2 Netzwerk basierende thermodynamische Analysen

Die Abschätzung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien erfolgte in dieser Arbeit mit der MATLAB® (The Mathworks Inc., Natick, USA) basierenden Oberfläche anNET (Zamboni *et al.*, 2008) in Kombination mit dem genomweiten *E. coli* Modell *iJR904* GSM/GPR (Reed *et al.*, 2003). Für die Berechnung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergie ist die Kenntnis der Standard Gibbs'schen Bildungsenergie jedes an der Reaktion beteiligten Metaboliten notwendig. Die von anNET verwendete Datenbank greift auf die von Alberty (1998) beschriebenen experimentell bestimmten Werte der Standard Gibbs'schen Bildungsenergien zurück. Die Beschreibung des Aromatenbiosynthesewegs ist jedoch unvollständig und teilweise fehlerhaft. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit für die Bestimmung der Standard Gibbs'schen Bildungsenergien des Aromatenbiosynthesewegs auf den theoretischen Berechnungsansatz von Jankowski *et al.* (2008) zurückgegriffen, welcher die Bildungsenergien über die Summe der Einzelenergien der verschiedenen Molekül-Gruppen abschätzt (siehe Kapitel 3.5). Die so ermittelten Stoffdaten des Aromatenbiosynthesewegs sind über die Online-Datenbank „eQuilibrator“ zugänglich (Flamholz *et al.*, 2012).

Für die Berechnungen wurden die gemessenen Metabolit-Konzentrationen inklusive des bestimmten Fehlers berücksichtigt. Nicht-experimentell bestimmte Metabolit-Konzentrationen waren in den Berechnungen mit Wertebereichen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 10 mM hinterlegt. Die Energieladung (aus dem Englischen ‚energy charge‘) wurde mit einem Wertebereich von 0,5 bis 1,0 vorgegeben. Die Verhältnisse von NADH/NAD und NADPH/NADP konnten Werte von 0,001–0,200 annehmen. Die physikalischen intrazellulären Bedingungen wurden wie von Kümmel *et al.* (2006) beschrieben angenommen (pH 7,6; Ionenstärke 0,15 M).

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Uniform markierter $^{13}\text{C}$ -Zellextrakt zur quantitativen Metabolom-Analytik\*

Aufgrund der hohen chemischen Diversität der in metabolischen Studien zu analysierenden Substanzen muss bei der quantitativen Metabolom-Bestimmung mit unterschiedlich starken Verlusten während der Probenahme, Probeninaktivierung und Probenaufarbeitung gerechnet werden (Wu *et al.*, 2005). Des Weiteren wirken sich Matrixeffekte und die Unterdrückung von einzelnen Ionen bei der massenspektrometrischen Analyse negativ auf die Quantifizierung von Metaboliten aus (Annesley, 2003). Um diese Probleme bei der Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten zu berücksichtigen, hat sich in den letzten Jahren die Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markierten Isotopen als interner Standard etabliert (Bennett *et al.*, 2008; Mashego *et al.*, 2004). Die Gewinnung solcher Isotope erfolgt dabei meist durch die Extraktion von Zellen, die auf uniform (U)- $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten kultiviert wurden (Wu *et al.*, 2005).

Im Folgenden soll auf das während dieses Forschungsvorhabens neu erarbeitete und standardisierte Protokoll zur parallelisierten Herstellung von salzreduziertem markiertem Zellextrakt eingegangen werden. Im Anschluss an die daraus resultierende Charakterisierung von verschiedenen Zellextrakten wurden in dieser Arbeit Strategien verfolgt, um die Konzentration von Schlüsselmetaboliten der L-Phenylalanin-Synthese im markierten Zellextrakt zu erhöhen. Diese Optimierungsstrategien werden in diesem Kapitel abschließend beschrieben.

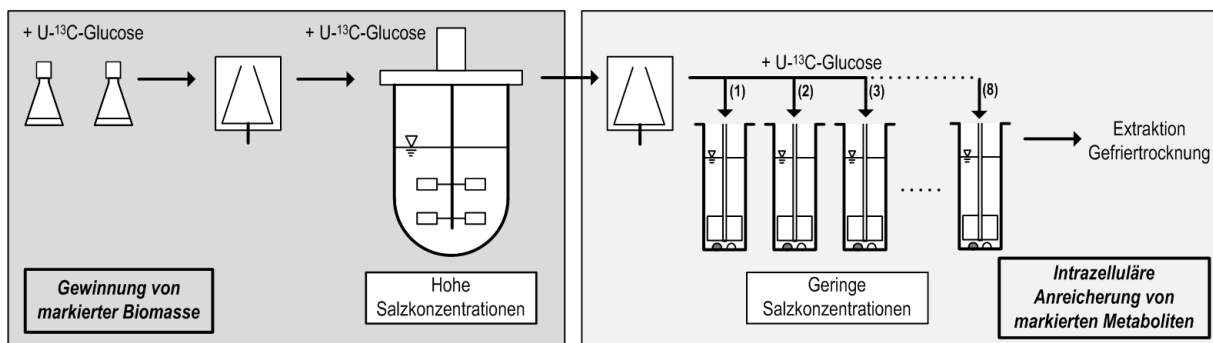
#### 5.1.1 Parallelisierte Herstellung von salzreduziertem Zellextrakt

Allgemein lassen sich vier Hauptanforderungen an die Herstellung von U- $^{13}\text{C}$ -markiertem Zellextrakt definieren:

- Hohe intrazelluläre Konzentrationen der gewünschten Metabolite zum Zeitpunkt der Zellextraktion
- Hohe Metabolit-Konzentrationen im Zellextrakt
- Niedrige Konzentrationen an Mediensalzen im Zellextrakt zur Reduzierung der Unterdrückungseffekte während der massenspektrometrischen Analyse
- Einsatz von geringen Mengen an U- $^{13}\text{C}$ -markierter Kohlenstoffquelle zur Kostenreduzierung

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Schmideder A, Albermann C, Binder K, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015a): Parallelized small-scale production of uniformly  $^{13}\text{C}$ -labeled cell extract for quantitative metabolome analysis. *Anal Biochem* 478: 134–140.

Zur Erfüllung dieser Anforderungen wurde das Protokoll zur Herstellung von  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem Zellextrakt in zwei sequentielle Teilschritte untergliedert. Diese sind in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt und sollen im Folgenden kurz zusammengefasst werden. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte kann Kapitel 4.6 entnommen werden.



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung des Herstellungsprotokolls zur Gewinnung von  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem Zellextrakt. Gewinnung von  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter Biomasse: Sequentielle Kultivierung in Schüttelkolben und im 0,5 L-Rührkesselreaktor. Reduzierung der Mediensalze und Anreicherung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen: Parallelisierte Kultivierung im Milliliter-Bioreaktorsystem.

Im ersten Teilschritt der Extrakt-Herstellung erfolgte die Gewinnung von  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -markierter Biomasse. Hierzu wurden Zellen sequentiell in Schüttelkolben und im 0,5 L Rührkesselreaktor unter Satzbedingungen kultiviert. Durch die Verwendung von  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glucose als einziger Kohlenstoffquelle in definiertem Mineralsalzmedium konnte eine einheitliche  $^{13}\text{C}$ -Markierung der Biomasse gewährleistet werden. Durch die Möglichkeit, die Gelöstsauerstoff-Konzentration im 0,5 L-Rührkesselreaktor zu regeln, konnte eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff sichergestellt werden. Dies schloss einen möglichen Verlust des teuren Substrates bei anaerober Nebenproduktbildung aus und stellte gleichzeitig eine hohe Biomasseausbeute sicher. Der Verbrauch der vorgelegten Satzglucose konnte dabei direkt im Prozess durch den Anstieg der Gelöstsauerstoff-Konzentration im Medium nachgewiesen werden. Dies ermöglichte eine zeitnahe Überführung der Zellen in den zweiten Teilschritt des Protokolls und gewährleistete eine hohe metabolische Aktivität der Zellen.

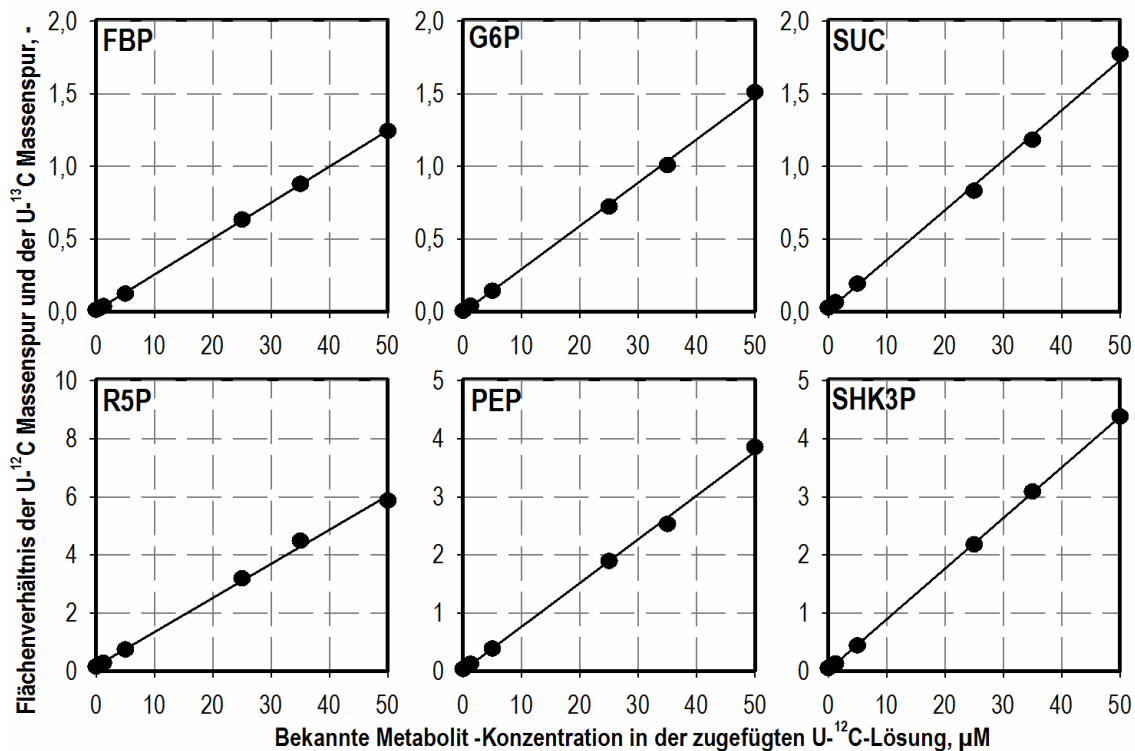
Zu Beginn des zweiten Teilschrittes der Extrakt-Herstellung erfolgte eine Abtrennung der Biomasse vom Mineralsalzmedium durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen in einem gering-konzentrierten Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) resuspendiert und im parallelisierten Milliliter-Ansatz in diesem Puffer kultiviert. Dadurch wurde die Mediensalzkonzentration drastisch reduziert. Dies gewährleistete eine niedrige Konzentration an störenden Mediensalzen im resultierenden  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Zellextrakt. Die Aufkonzentrierung der Biomasse durch die Zell-Überführung in den kleineren Maßstab gewährleistete hohe Biomassekonzentrationen bei der abschließenden Zellextraktion, was eine Voraussetzung für

hohe Metabolit-Konzentrationen im U-<sup>13</sup>C-markierten Zellextrakt darstellt. Des Weiteren konnte durch den parallelisierten Ansatz im Milliliter-Maßstab die Menge an eingesetzter U-<sup>13</sup>C-Glucose gering gehalten und vergleichende Mehrfachansätze realisiert werden. Die parallel zur Kultivierung durchgeführte Bestimmung der Glucose-Konzentration in den einzelnen Reaktionsansätzen ermöglichte die Wahl eines Extraktions-Zeitpunktes kurz vor dem vollständigen Verbrauch der vorgelegten Satzglucose. Dies gewährleistete eine hohe intrazelluläre Anzahl und Konzentration an unterschiedlichen Metaboliten. Gleichzeitig wurde hierdurch abermals eine optimale Nutzung des verwendeten Substrates sichergestellt.

### 5.1.2 Vergleichende Charakterisierung verschiedener Zellextrakte

Mit dem im Vorkapitel beschriebenen neuen standardisierten Protokoll zur Herstellung von U-<sup>13</sup>C-markierten Zellextrakten wurden mehrere Extrakte aus unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen gewonnen. Im Folgenden wird die Charakterisierung der gewonnenen Zellextrakte aus dem *E. coli* K12 Wildtyp-Stamm und dem rekombinanten L-Phenylalanin-Produktionsstamm *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> beschrieben.

Zur korrekten Quantifizierung der U-<sup>13</sup>C-Metabolite wurden von jedem Extrakt jeweils sechs Proben gleichen Volumens mit unterschiedlich stark verdünnten Lösungen einer U-<sup>12</sup>C-Lösung aus den entsprechenden kommerziell verfügbaren U-<sup>12</sup>C-Metaboliten versetzt (resultierende U-<sup>12</sup>C-Konzentrationen: 0; 1,25; 5; 25; 35 und 50 µM). Das aus der massenspektrometrischen Analyse resultierende Flächenverhältnis der U-<sup>12</sup>C- und U-<sup>13</sup>C-Massenspuren wurde über das Verfahren der Standardaddition zur Identifikation der im U-<sup>13</sup>C-markierten Zellextrakt vorliegenden Metabolit-Konzentrationen genutzt. In Abbildung 5.2 sind beispielhaft für die Metabolite Glucose-6-Phosphat (G6P), Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), Phosphoenolpyruvat (PEP), Ribose-5-phosphat (R5P), Succinat (SUC) und Shikimat-3-phosphat (SHK3P) die beim Verfahren der Standardaddition genutzten linearen Regressionsanalysen dargestellt. Es wird eine gute lineare Korrelation für alle dargestellten Metabolite ersichtlich. Um eine korrekte Quantifizierung auch für Metabolite mit einer Konzentrationen über 50 µM sicherstellen zu können, wurde die beschriebene Standardaddition mit jeweils drei unterschiedlich stark verdünnten Proben der U-<sup>13</sup>C-markierten Zellextrakte wiederholt (*E. coli* K12: unverdünnt, 1:5, 1:50; *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>: unverdünnt, 1:3, 1:30).



**Abbildung 5.2:** Lineare Regression der mit verschiedenen stark verdünnten Lösungen an U-<sup>12</sup>C-Metaboliten versetzten U-<sup>13</sup>C-Zellextrakt-Proben für die Metabolite Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), Glucose-6-Phosphat (G6P), Succinat (SUC), Ribose-5-phosphat (R5P), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Shikimat-3-phosphat (SHK3P). Aufgetragen ist die bekannte Konzentration der zugefügten U-<sup>12</sup>C-Metabolite (x-Achse) gegenüber dem Flächenverhältnis der U-<sup>12</sup>C- und U-<sup>13</sup>C-Massenspuren (m/z) (y-Achse). Die dargestellten Daten für FBP, G6P, R5P und PEP beschreiben den Extrakt aus *E. coli* K12 Zellen. Die Daten für SUC und SHK3P beschreiben den Extrakt von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>.

Die mit Hilfe des Standardadditionsverfahrens bestimmten Metabolit-Konzentrationen für die beiden Extrakte aus *E. coli* K12 und *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die ermittelten Unterschiede bei den erzielten Metabolit-Konzentrationen sind charakteristisch für den jeweils verwendeten Stamm. So wurden im Vergleich zu *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> beim Wildtyp-Stamm hohe Konzentrationen an organischen Säuren wie Succinat (2,1 mM), Malat (1,1 mM), Fumarat (1,0 mM) und  $\alpha$ -Ketoglutarat (0,6 mM) nachgewiesen. Organische Säuren stellen klassische Nebenprodukte bei der Kultivierung von *E. coli* unter Satzbedingungen dar (Jantama *et al.*, 2008). Die für *E. coli* K12 gemessene Nebenproduktbildung kann somit dem letzten Schritt der Extrakt-Herstellung, der Satzkultivierung im Milliliter-Maßstab, zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei der Verwendung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> für die Extrakt-Gewinnung ein deutlicher Anstieg der Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges Shikimat-3-Phosphat (K12: 9,28 µM; FUS4: 935,01 µM) und Chorismat (K12: nicht nachweisbar; FUS4: 160,46 µM) sowie des Produktes L-Phenylalanin (K12: 114,90 µM; FUS4: 6695,56 µM) bestimmt. Ebenso lag im Pentose-



Phosphat-Stoffwechsel eine deutlich erhöhte (+369 %) Konzentration an Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) vor. Da S7P zusammen mit Glyceraldehyd-3-Phosphat über die Transaldolase zu Erythrose-4-Phosphat (E4P) umgewandelt werden kann, besitzt S7P hohe Bedeutung bei der Versorgung des Aromatenbiosyntheseweges mit E4P. Aus diesem Grund kann die erhöhte S7P-Konzentration im U-<sup>13</sup>C-Zellextrakt aus *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> mit der vorliegenden L-Phenylalanin-Bildung begründet werden. Eine weitere stammspezifische Eigenschaft des Zellextraktes aus *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> ist durch das Fehlen von L-Tyrosin im Extrakt erkennbar. Die Ursache hierfür ist die für den gewählten Produktionsstamm vorliegende L-Tyrosin-Auxothrophie.

**Tabelle 5.1:** Metabolit-Konzentrationen in zwei verschiedenen U-<sup>13</sup>C-markierten Zellextrakten, hergestellt aus den Stämmen *E. coli* K12 und *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>. (m/z = verwendete Massenspur; n. n. = nicht nachweisbar)

Metabolit	Metabolit-Konzentration im U- <sup>13</sup> C-Zellextrakt, $\mu\text{M}$			
	U- <sup>12</sup> C m/z	U- <sup>13</sup> C m/z	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub>
2/3PG	185,0	188,0	507,04 $\pm$ 66,62	287,77 $\pm$ 6,62
6PG	275,0	281,0	13,49 $\pm$ 0,17	69,96 $\pm$ 9,30
AcCoA	808,1	831,1	81,88 $\pm$ 1,02	71,77 $\pm$ 4,47
AKG	145,0	150,0	625,98 $\pm$ 19,59	80,64 $\pm$ 0,13
AMP	346,0	356,0	87,05 $\pm$ 3,10	168,53 $\pm$ 9,54
ADP	426,0	436,0	83,70 $\pm$ 2,46	165,18 $\pm$ 10,11
ATP	506,0	516,0	94,35 $\pm$ 5,45	187,03 $\pm$ 14,48
CHOR	179,0	188,0	n. n.	160,46
CIT/ICIT	191,0	197,0	779,59 $\pm$ 5,60	1078,25 $\pm$ 86,69
DHAP	339,0	345,0	45,44 $\pm$ 4,45	107,87 $\pm$ 13,45
FBP	339,0	345,0	74,60 $\pm$ 0,82	227,90 $\pm$ 0,82
G6P	259,0	265,0	208,38 $\pm$ 9,88	336,49 $\pm$ 54,16
FUM	115,0	119,0	1049,45 $\pm$ 12,53	117,06 $\pm$ 20,01
L-Phe	164,0	173,0	114,90 $\pm$ 9,53	6695,56 $\pm$ 76,58
L-Tyr	180,0	189,0	35,04 $\pm$ 1,12	n. n.
MAL	133,0	137,0	1065,29 $\pm$ 12,48	136,25 $\pm$ 4,59
NAD	540,0	555,0	81,76 $\pm$ 2,15	143,32 $\pm$ 1,58
NADH	664,0	685,0	52,36 $\pm$ 9,40	103,55 $\pm$ 10,38
NADP	742,0	763,0	10,68 $\pm$ 2,12	19,21 $\pm$ 1,14

Fortsetzung von **Tabelle 5.1**: Metabolit-Konzentrationen in zwei verschiedenen U-<sup>13</sup>C-markierten Zellextrakten, hergestellt aus den Stämmen *E. coli* K12 und *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>.

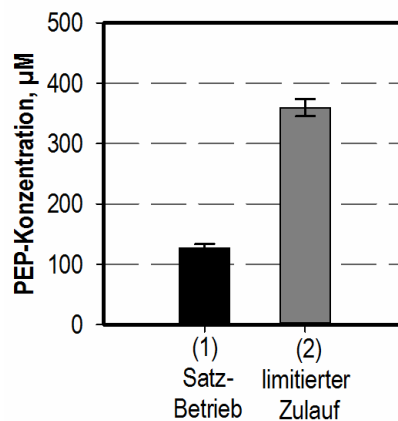
Metabolit	Metabolit-Konzentration im U- <sup>13</sup> C-Zellextrakt, $\mu\text{M}$			
	U- <sup>12</sup> C m/z	U- <sup>13</sup> C m/z	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub>
NADPH	744,1	765,1	36,31 $\pm$ 0,43	87,34 $\pm$ 8,62
PEP	167,0	170,0	67,91 $\pm$ 9,47	138,14 $\pm$ 24,51
PYR	87,0	90,0	4619,00 $\pm$ 91,60	1323,94 $\pm$ 280,49
R5P	229,0	234,0	14,21 $\pm$ 0,13	28,95 $\pm$ 0,26
Ru5P	229,0	234,0	33,15 $\pm$ 11,55	27,14 $\pm$ 4,51
S7P	289,0	296,0	26,11 $\pm$ 1,32	122,51 $\pm$ 9,71
SHK3P	253,0	260,0	9,28 $\pm$ 4,05	635,01 $\pm$ 32,50
SUC	117,0	121,0	2072,80 $\pm$ 86,78	278,51 $\pm$ 12,65

### 5.1.3 Optimierung der PEP-Konzentration in uniform <sup>13</sup>C-markiertem Zellextrakt

Neben der generellen Zielsetzung U-<sup>13</sup>C-Extrakt mit möglichst vielen Metaboliten zu gewinnen, kann es in Abhängigkeit von dem zu analysierenden metabolischen Netzwerk von Bedeutung sein, die Gewinnung bestimmter Schlüssel-Metabolite im U-<sup>13</sup>C-Extrakt sicherzustellen. Ein Schlüsselmetabolit der aromatischen Aminosäuresynthese ist Phosphoenolpyruvat (PEP), da es im Aromatenbiosyntheseweg sowohl bei der Eingangsreaktion (DAHP-Synthase) als auch bei der Reaktion der 3PSME-Synthase als Cosubstrat benötigt wird. Aus diesem Grund sollte in diesem Projekt die U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung hinsichtlich einer verbesserten PEP-Gewinnung optimiert werden.

In der Literatur wurde gezeigt, dass die intrazelluläre PEP-Konzentration in *E. coli* stark durch die Glucose-Verfügbarkeit reguliert wird (Xu *et al.*, 2012). Hierbei ist beschrieben, dass der Verbrauch an PEP bei Substratmangel nahezu sofort unterbrochen wird, um bei erneuter Verfügbarkeit von Glucose eine schnelle Aufnahme des Substrates über das Phosphotransferasesystem sicherstellen zu können. Aus diesem Grund wurde die in Kapitel 5.1.1 beschriebene Methodik der U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Gewinnung hinsichtlich der Substratversorgung im letzten Kultivierungsschritt modifiziert. Neben vier vergleichenden Ansätzen im Milliliter-Maßstab, welche weiterhin im Satzbetrieb durchgeführt wurden, erfolgte parallel über eine Mehrkanal-Schlauchpumpe für vier weitere Ansätze eine

substratlimitierte  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glucose-Zufuhr. Zur Charakterisierung des Einflusses der Substratzufuhr auf die intrazelluläre PEP-Konzentration wurde der Stamm *E. coli* K12 eingesetzt, welcher zu gleichen Teilen in die acht Reaktionsansätze überführt wurde. Die somit unter unterschiedlichen Substratzufuhrbedingungen gewonnenen  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Zellextrakte wurden im Anschluss hinsichtlich ihrer Konzentration an PEP analysiert. Die ermittelten PEP-Konzentrationen sind in Abbildung 5.3 dargestellt.



**Abbildung 5.3:** Phosphoenolpyruvat (PEP)-Konzentration in zwei verschiedenen  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Zellextrakten. (1) Zellextrakt aus *E. coli* K12 gewonnen mit satzweise vorgelegter  $U\text{-}^{13}\text{C}$  Glucose. (2) Zellextrakt aus *E. coli* K12 gewonnen unter substratlimitierender  $U\text{-}^{13}\text{C}$ -Glucose Zufuhr.

Aus Abbildung 5.3 wird eine unter Zulaufbedingungen deutlich erhöhte PEP-Konzentration (+184 %) im Zellextrakt ersichtlich. Dieses Ergebnis korreliert mit der in der Literatur (Xu *et al.*, 2012) beschriebenen Bedeutung der Glucose-Verfügbarkeit auf die intrazelluläre PEP-Konzentration: Neben einem verringerten PEP-Verbrauch durch das Phosphotransferasesystem wird der Verbrauch an PEP unter Glucose-limitierenden Bedingungen zusätzlich reduziert, um eine schnelle Wiederaufnahme der Kohlenstoffquelle bei Substratüberschuss sicherstellen zu können.

### 5.1.4 Diskussion

Durch das in diesem Forschungsvorhaben etablierte neue und standardisierte Protokoll zur U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung wurde eine systematische Charakterisierung von Extrakten aus unterschiedlichen Stämmen ermöglicht. Es wurden deutliche stammspezifische Unterschiede in den gewonnenen Extrakten aus *E. coli* K12 und *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> nachgewiesen. Des Weiteren konnte der Einfluss der Substratverfügbarkeit im letzten Kultivierungsschritt der Extrakt-Herstellung auf die intrazellulären Metabolit-Konzentrationen gezeigt werden.

Durch diese Ergebnisse wird die Möglichkeit der gezielten U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Optimierung betont. In vielen Studien, die Metabolom-Analysen zur Charakterisierung von Stoffwechselnetzwerken nutzen, sind bestimmte Schlüssel-Metabolite von besonderem Interesse (Magnus *et al.*, 2006; Mashego *et al.*, 2007a; Oldiges *et al.*, 2004). Für diese Anwender kann die optimierte U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung eine deutliche Verbesserung bei der Metabolom-Quantifizierung darstellen. Ansätze, die hingegen ein möglichst großes Spektrum an Metaboliten quantitativ erfassen wollen, könnten dies durch eine gezielte Mischung aus U-<sup>13</sup>C-Extrakten verschiedener Stämme und Kultivierungsstrategien realisieren. Auch dies setzt die Verfügbarkeit von standardisierten Protokollen zur U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung voraus. Für die folgenden Forschungsarbeiten wurde durch die Erhöhung der PEP-Konzentration im gewonnenen U-<sup>13</sup>C Zellextrakt eine wichtige Optimierung der Metabolom-Quantifizierung eines Schlüssel-Metaboliten des Aromatenbiosyntheseweges erfolgreich realisiert. Des Weiteren konnten durch Verwendung des L-Phenylalanin-Produzenten *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> weitere Metabolite der Aromatenbiosyntheseweges im U-<sup>13</sup>C-Zellextrakt zugänglich gemacht werden.

## 5.2 Reaktionstechnische Charakterisierung von L-Phenylalanin-Produktionsstämmen

Zur Identifikation eines geeigneten Stammes für die detaillierte metabolische Analyse der mikrobiellen L-Phenylalanin-Produktion wurden in dieser Arbeit unterschiedliche reaktionstechnische Charakterisierungen von mehreren rekombinanten Stämmen durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde hierzu ein standardisierter Prozess im 15 L-Maßstab entwickelt, der an stammspezifische Eigenschaften (beispielsweise Deletionen der für die Pyruvatkinase codierenden Gene) angepasst wurde. Die detaillierte Beschreibung der Prozessdurchführung findet sich in den Kapiteln 4.3.5 und 4.3.6.

In den folgenden Kapiteln wird auf die reaktionstechnische Charakterisierung von verschiedenen *E. coli*-Stämmen zur Bestimmung der Plasmid-Stabilität und der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktion eingegangen. Des Weiteren werden Ergebnisse aufgeführt, die den Einfluss der Malat-Enzyme auf die L-Phenylalanin-Produktion charakterisieren.

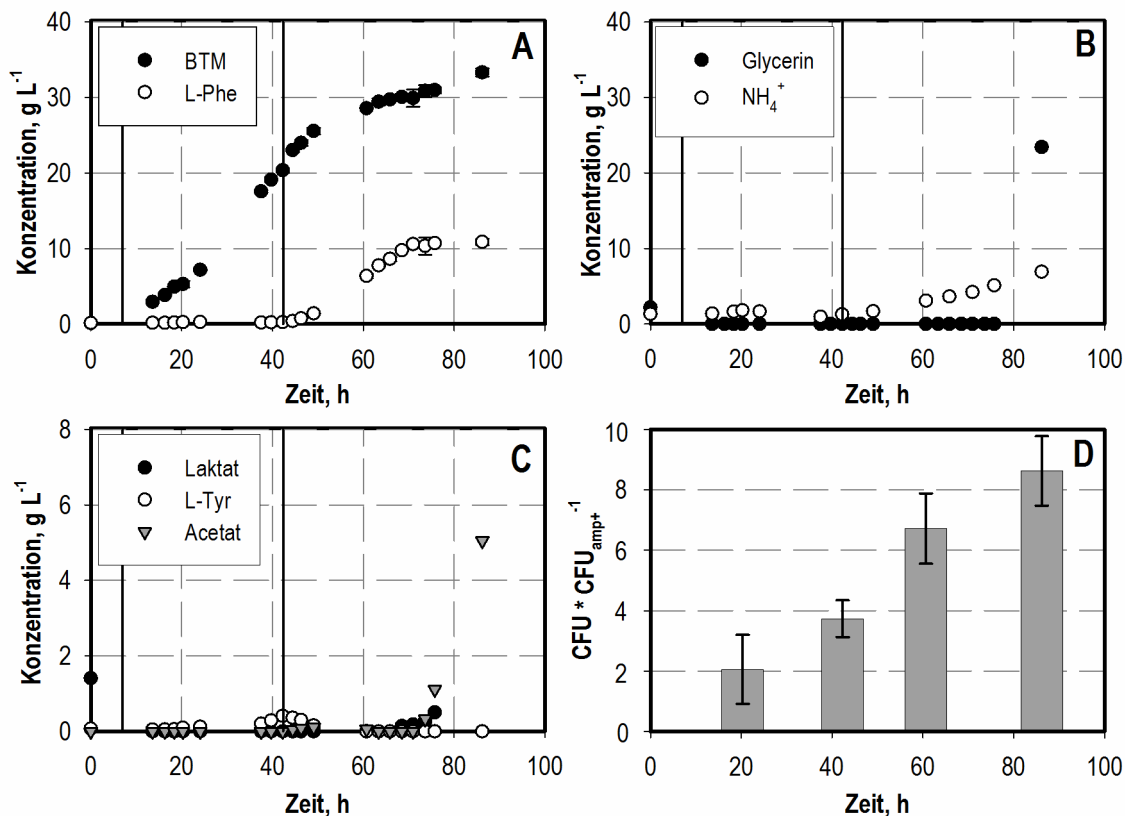
### 5.2.1 Plasmid-Stabilität während der L-Phenylalanin-Produktion \*

Der für die Prozessentwicklung verwendete Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> ist auxotroph auf die beiden Aminosäuren L-Tyrosin ( $\Delta tyrA$ ) und L-Phenylalanin ( $\Delta pheA$ ). Um Wachstum zu ermöglichen, müssen dem Reaktionsansatz somit beide Aminosäuren zugeführt werden. Durch Induktion des Vektors pF81<sub>amp</sub> (*laclq*) mit Isopropyl- $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG) wird eine L-Phenylalanin-Bildung ermöglicht. Das Plasmid enthält sowohl native Gene des Aromatenbiosyntheseweges (*aroF*, *aroB*, *aroL*), als auch heterologe Gene (*pheA<sub>FBR</sub>*) für eine rückkopplungsresistente Enzymvariante der Chorismat-Mutase respektive Prephenat-Dehydratase. Der Vektor pF81<sub>amp</sub> ist somit eine genetische Voraussetzung, um die L-Phenylalanin-Bildung überhaupt ermöglichen zu können. Als Selektionsmarker für Plasmid-tragende Zellen dienen die Plasmid-codierten Gene zur Expression der  $\beta$ -Lactamase, welche eine Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wie zum Beispiel Ampicillin ermöglichen. Aufgrund der beschriebenen Bedeutung des Plasmids für die Aminosäureproduktion erfolgte zu Projektbeginn eine Charakterisierung der Plasmidstabilität während der standardisierten Prozessführung.

Ein weiteres Merkmal des verwendeten Ausgangsstammes ist die Gen-Deletion der beiden Pyruvatkinase-Isoenzyme (*pykA*, *pykF*), die eine verbesserte intrazelluläre Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat (PEP) für die Aminosäuresynthese ermöglichen soll. Aufgrund dieser Modifikation im Zentralstoffwechsel von *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> war es notwendig, Laktat als zweite Kohlenstoffquelle neben Glycerin während der initialen Wachstumsphase im

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Albermann C, Gottlieb K, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014a): Fed-batch production of L-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 83: 62–69.

standardisierten Prozess zuzuführen (siehe Kapitel 4.3.6). Die während der Kultivierung von *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> im 15 L-Maßstab erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.4 dargestellt.



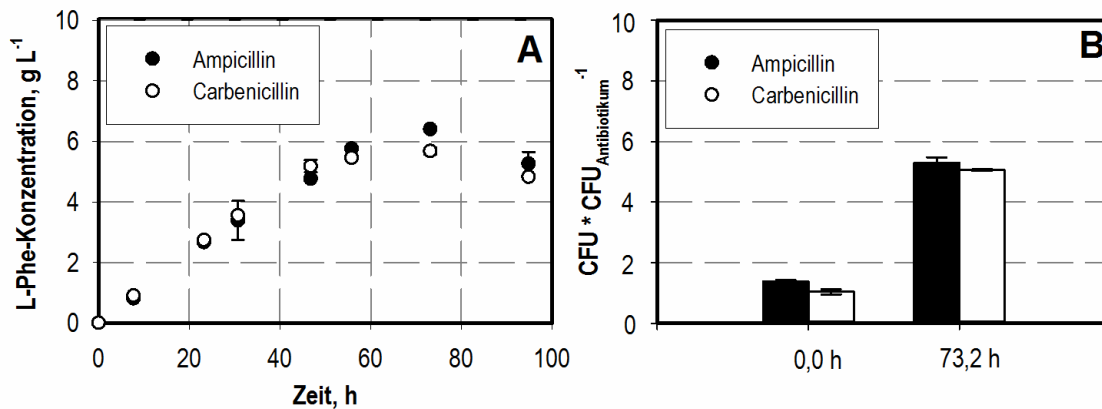
**Abbildung 5.4:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> im 15 L-Maßstab aus Glycerin und Ammoniak. Die erste vertikale Hilfslinie (7,0 h) beschreibt die Phase der Zulaufphase. Die zweite vertikale Hilfslinie (42,3 h) beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●) und L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) Konzentration; **B)** Glycerin- (●) und Ammonium- ( $\text{NH}_4^+$ , ○) Konzentration; **C)** Laktat- (●), L-Tyrosin- (L-Tyr, ○) und Acetat- (▽) Konzentration; **D)** Verhältnis der Kolonie-bildenden Einheiten (aus dem Englischen ‚Colony Forming Units‘, CFU) auf LB-Agar-Plattenausstrichen ohne (CFU) und mit Ampicillin ( $\text{CFU}_{\text{amp}^+}$ ).

Im Anschluss an die siebenstündige initiale Zulaufphase erfolgte, wie in Abbildung 5.4 gekennzeichnet, der Zulauf-Beginn. Während der darauf folgenden ersten Zulaufphase wurde ein vollständig substratlimitiertes exponentielles Wachstum erzielt. Die beiden Kohlenstoffquellen Glycerin und Laktat konnten nicht im Medienüberstand nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.4 B und C). Die in dieser Prozessphase experimentell ermittelte durchschnittliche Wachstumsrate betrug  $0,1 \text{ h}^{-1}$  und entsprach somit der durch die Zulaufphase vorgegebenen theoretischen Wachstumsrate. Die daraus resultierende Biomassekonzentration von  $20,4 \text{ g L}^{-1}$  konnte nach 42,3 h nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.4 A). Eine ausreichende Versorgung mit den Auxotrophie-Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin

wurde während der ersten Prozessphase zu allen Messzeitpunkten nachgewiesen. Nach 42,3 h lagen  $0,41 \text{ g L}^{-1}$  L-Tyrosin und  $0,24 \text{ g L}^{-1}$  L-Phenylalanin im Kulturüberstand vor. Nach Induktion der Proteinexpression für die Aminosäuresynthese (42,3 h) mittels IPTG (0,3 mM) erfolgte die L-Phenylalanin-Bildung rein auf der Kohlenstoffquelle Glycerin. Hierzu wurde die Biomasse-spezifische Glycerin-Zufuhr rate zum Induktionszeitpunkt auf  $0,18 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  eingestellt und der volumetrische Fluss konstant gehalten. Während dieser zweiten Prozessphase wurde eine maximale spezifische Produktionsrate von rund  $13 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  sowie eine maximale Produktausbeute von  $0,12 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{Gly}}^{-1}$  ermittelt. Dabei konnte im Reaktionsansatz nach 70 h Prozesszeit (27,7 h Produktionszeit) eine maximale Produktkonzentration von  $10,6 \text{ g L}^{-1}$  nachgewiesen werden. Die mit dem Zulaufmedium zugeführten Stickstoffsalze sowie die durch die Titration mittels Ammoniak realisierte Stickstoffversorgung führten über den gesamten Prozessverlauf zu einer nachweisbaren Ammonium-Konzentration im Kulturüberstand. Zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches lagen rund  $4,2 \text{ g L}^{-1}$  Ammonium vor, sodass eine Stickstoff-Limitierung als Grund für den Produktionsabbruch ausgeschlossen werden konnte. Bereits kurz vor Produktionsabbruch (68,5 h) wurde hingegen eine einsetzende Nebenproduktbildung an Laktat und Acetat nachgewiesen. Diese organischen Säuren reicherten sich bis zum Prozessende im Reaktionsmedium auf eine Konzentration von  $5,1 \text{ g L}^{-1}$  (Acetat) und  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (Laktat) an. Die zugeführte Kohlenstoffquelle Glycerin konnte erst in der letzten Prozessprobe (86,2 h) im Überstand mit  $23,4 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt werden. Die nachgewiesene einsetzende Nebenproduktbildung kann somit nicht durch einen möglichen Substratüberschuss-metabolismus erklärt werden. Zur Charakterisierung der Plasmidstabilität über die Prozesszeit wurden Plattenausstriche von steril verdünnten Kulturproben auf LB-Platten mit dem Selektionsmarker Ampicillin (AMP<sup>+</sup>) durchgeführt. Parallel dazu wurden Negativkontrollen auf LB-Platten ohne Antibiotika angefertigt. Nach Inkubation der Kulturplatten (37 °C, 24 h) wurde die Kolonien-Anzahl bestimmt. Das Verhältnis zwischen der Gesamtzahl an Kolonien (CFU) und Plasmid-tragenden Kolonien (CFU<sub>AMP<sup>+</sup></sub>) ist in Abbildung 5.4 D dargestellt. Hierdurch wird ersichtlich, dass der Anteil an Plasmid-freien Zellen kontinuierlich über die Kultivierungsdauer zunahm. Zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches waren schließlich weniger als 12 % der Zellen Plasmid-tragend.

Neben Ampicillin stehen auch andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit gleicher biologischer Wirkungsweise zur Verfügung. Hierbei ist zum Beispiel für das Antibiotikum Carbenicillin die im Vergleich zu Ampicillin höhere Resistenz gegenüber der Hydrolyse durch die  $\beta$ -Lactamase beschrieben (Technische Informationen Antibiotika, Carl-Roth AG). Um den Einfluss der unterschiedlichen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika auf die Plasmidstabilität zu charakterisieren, wurde eine vergleichende parallele Kultivierung (0,5 L-Maßstab) mit den beiden  $\beta$ -Lactam-Antibiotika durchgeführt. Hierzu wurde in Schüttelkolben gewonnene

Biomasse mittels Zentrifugation abgetrennt und in PBS-Puffer steril in zwei parallel betriebene Laborrührkesselreaktoren überführt (Biomassekonzentration zu Prozessbeginn:  $\sim 1,3 \text{ g L}^{-1}$ ). Das vorgelegte definierte Kulturmedium (0,5 L) sowie das Vorkulturmedium waren dabei entweder mit Ampicillin ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) oder Carbenicillin ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) versetzt. Bei der folgenden konstanten Zulauf-Kultivierung ( $0,3 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) im 0,5 L-Maßstab erfolgte die Induktion der Proteinexpression mittels IPTG direkt zu Prozessbeginn. Die dabei erzielten L-Phenylalanin-Konzentrationsverläufe sowie die zu Prozessbeginn und Prozessende bestimmten Verhältnisse zwischen Plasmid-freien (CFU) und Plasmid-tragenden Kolonien ( $\text{CFU}_{\text{Antibiotikum}}$ ) sind in Abbildung 5.5 dargestellt.



**Abbildung 5.5:** Parallelansatz im Halbliter-Maßstab zur Charakterisierung der Stabilität des Vektors pF81<sub>amp</sub>: **A)** L-Phenylalanin-Konzentrationsverläufe in den Ansätzen mit Ampicillin (●) respektive Carbenicillin (○) als eingesetzten Selektionsmarker **B)** Verhältnis der Kolonie-bildenden Einheiten (aus dem Englischen ‚Colony Forming Units‘, CFU) auf LB-Agar-Plattenausstrichen ohne (CFU) und mit Antibiotikum ( $\text{CFU}_{\text{Antibiotikum}}$ ) für die Ansätze mit Ampicillin (●) respektive Carbenicillin (○).

Die in Abbildung 5.5 A gezeigten L-Phenylalanin-Konzentrationen haben bis kurz vor Produktionsabbruch (55,8 h) einen nahezu identischen Verlauf. Für den Ansatz mit Ampicillin als Selektionsmarker konnte nach 73,2 h eine im Vergleich mit dem Carbenicillin-Ansatz leicht erhöhte maximale Produktkonzentration (Ampicillin-Ansatz:  $6,4 \text{ g L}^{-1}$ ; Carbenicillin-Ansatz:  $5,7 \text{ g L}^{-1}$ ) nachgewiesen werden. Bei der Bestimmung des Anteils an Plasmid-tragenden Zellen wurde für beide Reaktionsansätze ein vergleichbarer Plasmid-Verlust über die Prozesszeit bestimmt. Zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches waren im Ansatz mit Ampicillin noch rund 19 % der Zellen Plasmid-tragend. Für den Ansatz mit Carbenicillin wurde ein leicht höherer Wert von 20 % bestimmt. Des Weiteren ist hervorzuheben, dass bereits zu Prozessbeginn im Rührkesselreaktor mit Ampicillin als Selektionsmarker nur noch 73 % der Zellen Plasmid-tragend waren und somit bereits ein Plasmidverlust in der Vorkultur stattfand. Für den Ansatz mit Carbenicillin konnte dies nicht beobachtet werden. Zu

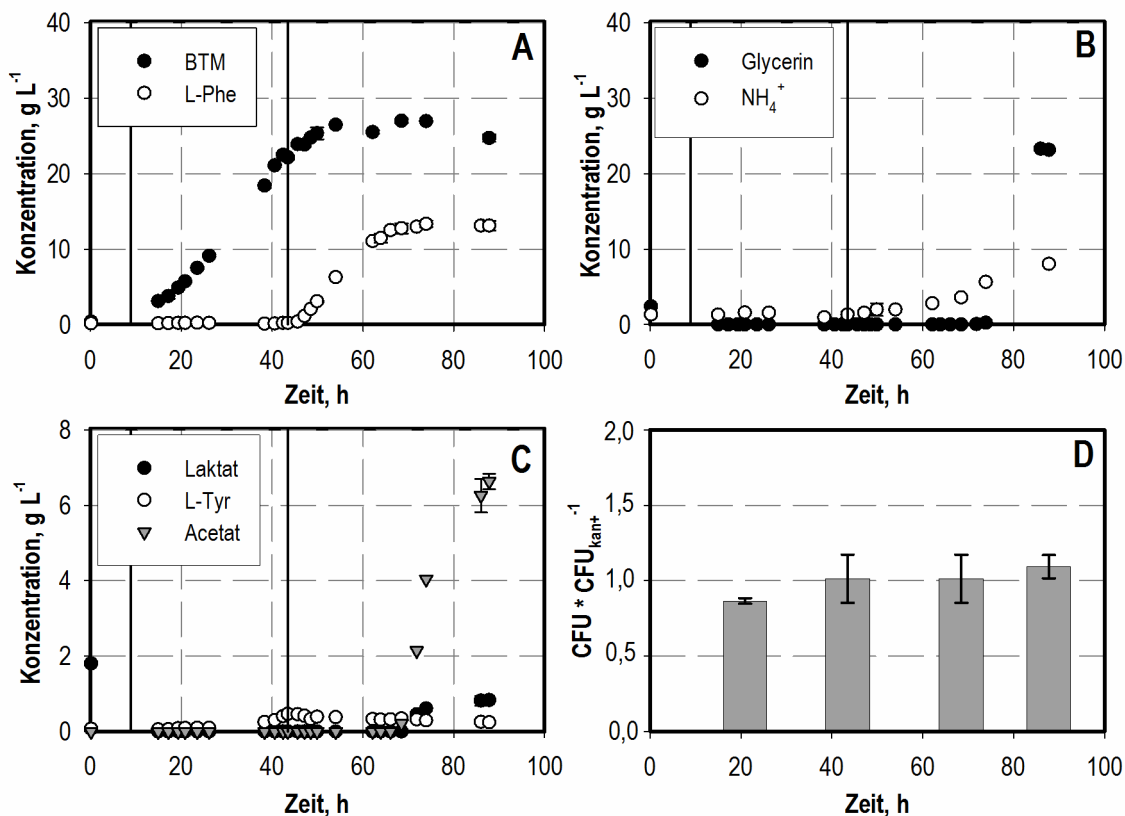


Prozessbeginn im Rührkesselreaktor lag ein im Vergleich zum Ampicillin-Ansatz hoher Anteil an Plasmid-tragenden Zellen von 97 % vor.

Neben  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kommen in Kultivierungen mit *E. coli* auch verbreitet Aminoglycosid-Antibiotika wie Kanamycin als Selektionsmarker zum Einsatz. Im Gegensatz zur extrazellulären Inaktivierung der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfolgt die Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika intrazellulär. Hierbei wird die Bindungsstelle des Antibiotikums durch Phosphorylierung, Adenylierung oder Acetylierung enzymatisch verändert, so dass der Wirkstoff nicht mehr an die bakteriellen Ribosomen binden kann (Mutschler *et al.* 2008). Neben dem beschriebenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika-resistenten Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> stand für diese Arbeit auch ein Produktionsstamm zur Verfügung, welcher auf dem Produktionsvektor pF81<sub>kan</sub> Gene zur Resistenz gegenüber Kanamycin trägt (*E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub>). Mit Ausnahme der beschriebenen unterschiedlichen Resistenzen sind beide Stämme genetisch identisch, so dass ein direkter reaktionstechnischer Vergleich beider Stämme zur Charakterisierung des Einflusses von Aminoglycosid-Antibiotika auf die Plasmidstabilität ermöglicht wurde. Hierzu wurde eine standardisierte Kultivierung von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Maßstab durchgeführt, bei der das Antibiotikum Kanamycin als Selektionsmarker eingesetzt wurde. Die dabei erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

Während der Kultivierung des Stammes *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> erfolgte im Anschluss an die initiale Satzphase nach rund 8,9 h der Zulauf-Beginn. Während dieser exponentiellen Zulaufphase konnte auch für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> ein vollständig substratlimitiertes exponentielles Wachstum erzielt werden. Am Ende der Wachstumsphase wurde nach 43,5 h eine Biomassekonzentration von 22,1 g L<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 5.6 A) bestimmt. Mit dem standardisierten Zulaufverfahren konnte des Weiteren auch für diesen rekombinanten Stamm eine ausreichende Versorgung mit den Auxotrophie-Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin während der ersten Prozessphase realisiert werden. Nach 43,5 h wurden dabei 0,46 g L<sup>-1</sup> L-Tyrosin und 0,21 g L<sup>-1</sup> L-Phenylalanin im Kulturüberstand nachgewiesen (siehe Abbildung 5.6 A und C). Nach Induktion der Proteinexpression für die Aminosäuresynthese (43,5 h) mittels IPTG (0,3 mM) setzte die L-Phenylalanin-Bildung ein. Während der anschließenden zweiten Prozessphase konnte eine maximale spezifische Produktionsrate von 22 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> sowie eine maximale Produktausbeute von 0,15 g<sub>L-Phe</sub> g<sub>Gly</sub><sup>-1</sup> bestimmt werden. Damit lag eine im Vergleich zur Kultivierung von *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> um 69 % gesteigerte maximale spezifische Produktionsrate sowie eine um 25 % erhöhte Produktausbeute vor. Des Weiteren wurde nach 73,9 h für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> eine im Vergleich zu *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> um 2,8 g L<sup>-1</sup> gesteigerte maximale L-Phenylalanin-Konzentration von 13,4 g L<sup>-1</sup> nachgewiesen (siehe Abbildung 5.6 A). Ammonium wurde zu jedem Probenzeitpunkt nachgewiesen, so dass erneut eine Stickstofflimitierung als Ursache für

den Produktionsabbruch ausgeschlossen werden konnte. Die mittels Titration und Zulaufmedien realisierte Stickstoffversorgung führte nach Abbruch der L-Phenylalanin-Bildung zu einer Anreicherung von Ammonium im Medium. Die zum Zeitpunkt des Prozessabbruches nachgewiesene Ammonium-Konzentration betrug  $8,1 \text{ g L}^{-1}$  (siehe Abbildung 5.6 B). Vergleichbar zu *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> konnte auch mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> kurz vor Produktionsabbruch eine einsetzende Nebenproduktbildung an Acetat und Laktat bestimmt werden. Die organischen Säuren reicherten sich dabei bis auf eine Konzentration von  $6,6 \text{ g L}^{-1}$  (Acetat) und  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  (Laktat) an. Die Stabilität des Plasmids pF81<sub>kan</sub> wurde über den gesamten Prozess zu mehreren Zeitpunkten mittels vergleichender Plattenausstriche auf LB-Platten mit und ohne Zusatz von Kanamycin bestimmt. Die dadurch ermittelten Verhältnisse zwischen Plasmid-freien (CFU) und Plasmid-tragenden Kolonien (CFU<sub>kan+</sub>) sind in Abbildung 5.6 D dargestellt. Abbildung 5.6 D beschreibt dabei ein konstantes Verhältnis von  $\sim 1$  über die gesamte Prozesszeit. Ein Plasmidverlust konnte somit zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.6:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Maßstab aus Glycerin und Ammoniak. Die erste vertikale Hilfslinie (8,9 h) beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie (43,5 h) beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●) und L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) Konzentration; **B)** Glycerin- (●) und Ammonium- (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ○) Konzentration; **C)** Laktat- (●), L-Tyrosin- (L-Tyr, ○) und Acetat- (▼) Konzentration; **D)** Verhältnis der koloniebildenden Einheiten (aus dem Englischen ‚Colony Forming Units‘, CFU) auf LB-Agar-Plattenausstrichen ohne (CFU) und mit Kanamycin (CFU<sub>kan+</sub>).

## Diskussion

Durch die reaktionstechnische Charakterisierung von *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> im 15 L- und 0,5 L-Maßstab konnte für beide verwendete  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Ampicillin und Carbenicillin) ein hoher Plasmidverlust über die Prozesszeit nachgewiesen werden. Hierbei verbesserte das gegen die enzymatische Hydrolyse stabilere Antibiotikum Carbenicillin die Plasmidstabilität nur zu Prozessbeginn. Diese Plasmid-Instabilitäten während Kultivierungen von *E. coli* können auf die extrazelluläre Inaktivierung des Antibiotikums durch die  $\beta$ -Lactamase zurückgeführt werden. In der Literatur (Friehs, 2004) ist beschrieben, dass die  $\beta$ -Lactamase-Aktivität einer moderat angewachsenen 500  $\mu$ L-Vorkultur ausreichend ist, um sämtliches Ampicillin eines 40 L Reaktionsansatzes innerhalb einer Minute zu inaktivieren. Des Weiteren wurde eine Erhöhung der extrazellulären  $\beta$ -Lactamase-Aktivität um 90 % innerhalb einer Prozesszeit von 24 h nachgewiesen (Georgiou *et al.*, 1988). Dies verstärkt den beschriebenen Effekt der extrazellulären Antibiotika-Inaktivierung und ermöglicht so das Wachstum von Plasmid-freien Zellen. Für den Kanamycin-resistenten Produktionsstamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> wurde hingegen im 15 L-Maßstab unter Verwendung des Aminoglycosid-Antibiotikums die Plasmidstabilität bis zum Prozessabbruch aufrecht erhalten. Aufgrund der bei der Verwendung von Aminoglycosid-Antibiotika notwendigen intrazellulären Inaktivierung, zu der nur Zellen mit den entsprechenden Plasmid-codierten Enzymen in der Lage sind, wird Wachstum nur für Plasmid-tragende Zellen ermöglicht. Durch die verbesserte Plasmidstabilität während der Produktionsphase konnte die Produktionsleistung des Ausgangsstammes erhöht werden. Neben der um 2,8 g L<sup>-1</sup> gesteigerten maximalen L-Phenylalanin-Konzentration konnten auch die entsprechende maximale spezifische Produktionsrate (+69 %) sowie die Produktausbeute (+25 %) gesteigert werden. Trotz der mit diesem Stamm bis zum Prozessabbruch vorliegenden hohen Plasmidstabilität konnte die L-Phenylalanin-Bildung nicht länger aufrechterhalten werden, so dass neben der Plasmidstabilität weitere Ursachen für den Produktionsabbruch vorliegen müssen.

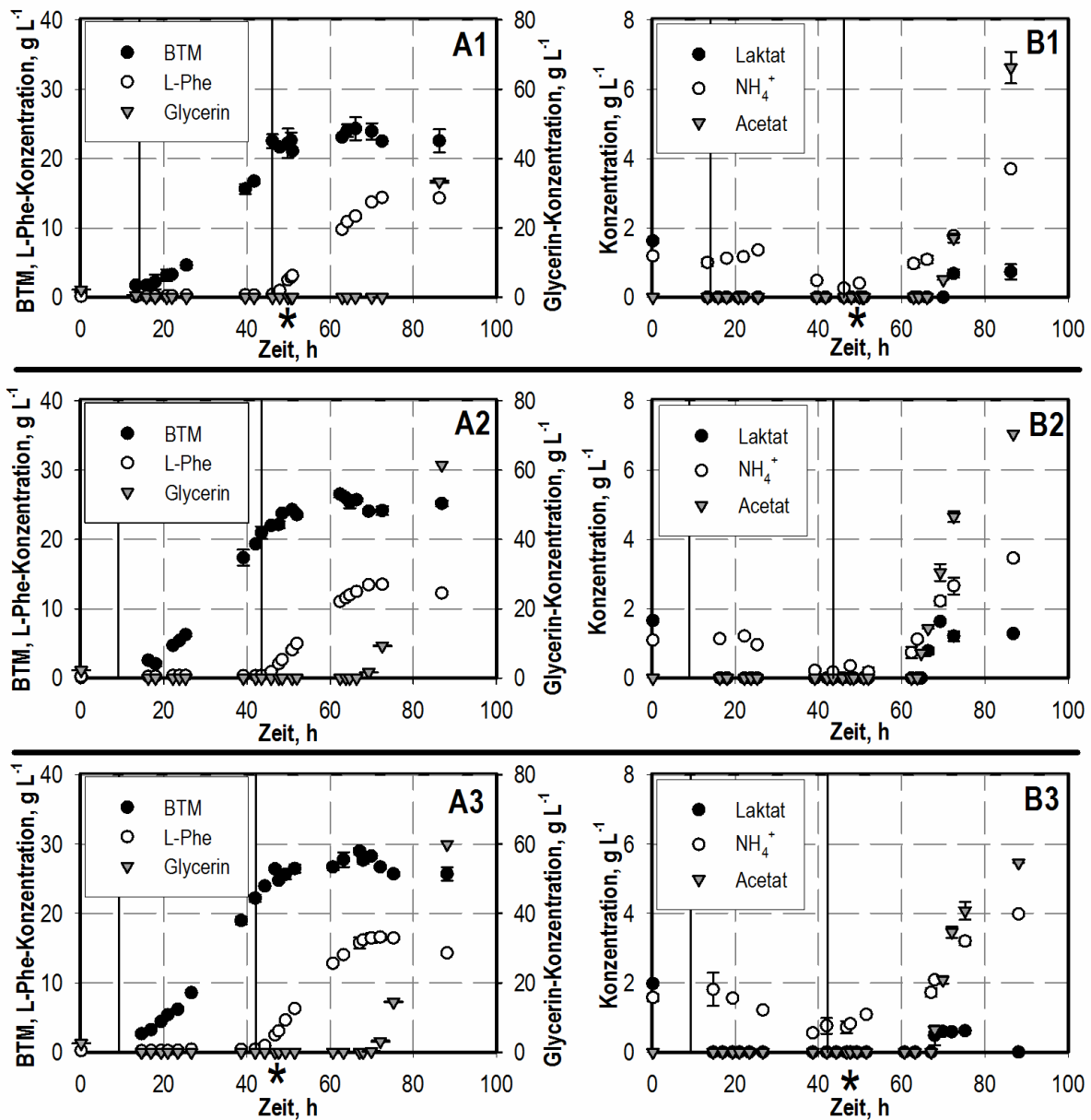
Neben der Charakterisierung der Plasmidstabilität wurde für die im 15 L-Maßstab charakterisierten rekombinanten Stämme übereinstimmend eine kurz vor Produktionsabbruch eintretende Nebenproduktbildung an Laktat und Acetat nachgewiesen. Dieses Prozessverhalten verdeutlicht die signifikante Veränderung des Metabolismus weg von der L-Phenylalanin-Produktion hin zur Nebenproduktbildung. Die Art der gebildeten Nebenprodukte verdeutlichen des Weiteren die Fähigkeit des Ausgangsstammes, trotz der Deletion der Pyruvatkinase Kohlenstoff über Pyruvat in den Zentralstoffwechsel zu schleusen und in Nebenprodukte umzuwandeln. Ein denkbarer alternativer Stoffwechselweg ist hierbei zum Beispiel eine Kombination aus aktiver Phosphoenolpyruvat-Carboxylase und den Malat-Enzymen.

### 5.2.2 Einfluss der Malat-Enzyme auf die L-Phenylalanin-Produktion\*

Wie durch die Kultivierungen von *E. coli* FUS4.11 Stämmen zur Charakterisierung der Plasmidstabilität gezeigt wurde, tritt bei diesen Stämmen eine Nebenproduktbildung von Acetat und Laktat bei Produktionsabbruch im 15 L-Maßstab auf. Diese beiden Substanzen sind Endprodukte des Pyruvat-Metabolismus in *E. coli* und setzen somit eine mögliche Pyruvat-Bildung als Ausgangsstoff voraus. Aufgrund der in diesen Stämmen vorliegenden Gen-Deletion der beiden Pyruvatkinase-Isoenzyme (*pykA* und *pykF*) ist eine direkte Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat nicht möglich. Am Ende des Produktionsprozesses müssen somit andere Stoffwechselwege aktiv sein, um einen Zugang zu Pyruvat zu gewährleisten. Die Malat-Enzyme stellen eine solche Alternative dar. Die beiden Isoenzyme (codiert durch *maeA* und *maeB*) ermöglichen durch eine NAD- (*maeA*) oder NADP- (*maeB*) abhängige Decarboxylierung von Malat die Bildung von Pyruvat (Sauer und Eikmanns, 2005). Malat könnte in den verwendeten Pyruvatkinase-negativen Stämmen durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase und den anschließenden Reaktionen des Citrat-Zyklus gebildet und so die Nebenproduktbildung am Ende der Produktionsphase verursacht werden. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der Einfluss der Malat-Enzyme auf den Metabolismus der L-Phenylalanin-Produktion untersucht werden.

Hierfür wurden ausgehend vom Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11 vom Projektpartner Mutanten mit Gen-Deletion des NAD-abhängigen Isoenzym (*E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*) oder mit Gen-Deletionen beider Isoenzyme (*E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB*) zur Verfügung gestellt. Für die Transformationen der Stämme wurde der Produktionsvektor pF81<sub>kan</sub> gewählt, da für dieses Plasmid, wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, eine vollständige Stabilität bis zum Prozessende nachgewiesen wurde. Die beiden resultierenden Malat-Enzym-Deletionsmutanten (*E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA* pF81<sub>kan</sub> und *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub>) wurden für die folgende reaktionstechnische Charakterisierung des Einflusses der Malat-Enzyme auf die L-Phenylalanin-Produktion genutzt. Hierzu wurden Zulauf-Kultivierungen mit den beiden Malat-Enzym-Deletionsmutanten im standardisierten 15 L-Produktionsprozess durchgeführt. Die dabei erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Da für diese Zulauf-Kultivierungen im Vergleich zu Kapitel 5.2.1 weiter optimierte Zulaufmedien eingesetzt wurden (siehe Anhang Tabelle A.12), wurde die Kultivierung des Ausgangsstammes *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> ohne Deletionen der Malat-Enzyme wiederholt. Die daraus resultierenden Konzentrationsverläufe sind ebenfalls in Abbildung 5.7 aufgeführt.

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014b): Improvement of constraint-based flux estimation during L-phenylalanine production with *Escherichia coli* using targeted knock-out mutants. *Biotechnol Bioeng* 111: 1406–1416.



**Abbildung 5.7:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> (**A1** und **B1**) *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA* pF81<sub>kan</sub> (**A2** und **B2**) und *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub> (**A3** und **B3**) im 15 L-Rührkesselreaktor. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A**) Biotrockenmasse- (BTM, ●), L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) und Glycerin- (▼) Konzentration; **B**) Laktat- (●), Ammonium- (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ○) und Acetat- (▼) Konzentration. Die schwarzen Sterne (\*) beschreiben den Prozesszeitpunkt, zu dem intrazelluläre Stoffflussabschätzungen durchgeführt wurden.

Wie aus Abbildung 5.7 ersichtlich wird, konnte in der ersten Prozessphase des standardisierten Prozesses im 15 L-Maßstab für alle drei rekombinanten Stämme ein vollständig substratlimitiertes exponentielles Wachstum realisiert werden. Die vorgegebene exponentiell zunehmende Zulauftrate wurde in allen drei Ansätzen in eine vergleichbare Wachstumsrate von

0,09–0,10 h<sup>-1</sup> umgesetzt. Hierdurch lagen zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression ähnliche Biomasse-Konzentrationen von 21,0–22,5 g L<sup>-1</sup> vor (siehe Abbildung 5.7 A). Während der zweiten Prozessphase zeigte sich für alle drei rekombinanten Stämme eine vergleichbare L-Phenylalanin-Bildung (siehe Abbildung 5.7 A). Dabei konnten maximale spezifische Produktionsraten von 24–28 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> bestimmt werden. Nach einer Produktionszeit von 26,4–30,1 h lagen in den drei Reaktionsansätzen L-Phenylalanin-Konzentrationen von 13,5–16,6 g L<sup>-1</sup> vor (siehe Abbildung 5.7 A). Ammonium wurde zu jedem Probenahmezeitpunkt in allen drei Kultivierungen nachgewiesen (siehe Abbildung 5.7 B). Eine Stickstofflimitierung konnte somit ausgeschlossen werden. Wie bereits für den Referenzstamm gezeigt (siehe Kapitel 5.2.1), fand bei der Kultivierung von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> erneut eine Nebenproduktbildung an Laktat und Acetat beim Abbruch der L-Phenylalanin-Bildung statt. Hingegen konnte eine Glycerin-Anreicherung im Medium erst mit der letzten Prozessprobe nachgewiesen werden. Die beiden Malat-Enzym-Deletionsmutanten zeigten ein vergleichbares Prozessverhalten. Auch in den Reaktionsansätzen von *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ maeA pF81<sub>kan</sub> und *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ maeA  $\Delta$ maeB pF81<sub>kan</sub> konnte mit Rückgang der Produktbildung eine einsetzende Nebenproduktbildung an Acetat und Laktat bestimmt werden, bevor sich in den letzten Prozessstunden die Kohlenstoffquelle Glycerin im Medium anreicherte. In den drei Reaktionsansätzen wurden bei Prozessabbruch Acetat-Konzentrationen von 5,5–7,1 g L<sup>-1</sup> und Laktat-Konzentrationen von 0,6–1,3 g L<sup>-1</sup> bestimmt. Eine Nebenproduktbildung an Malat konnte für alle drei Reaktionsansätze nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die bei Prozessabbruch ermittelten Konzentrationen betragen 0,1–0,3 g L<sup>-1</sup>. Eine Zusammenfassung der Prozesskenngrößen zur Charakterisierung des Einflusses der Malat-Enzyme auf die L-Phenylalanin-Produktion ist in Tabelle 5.2 aufgeführt.

**Tabelle 5.2:** Zusammenfassung der im standardisierten Produktionsprozess ermittelten Prozesskenngrößen während der Kultivierung von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub>, *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ maeA pF81<sub>kan</sub> und *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ maeA  $\Delta$ maeB pF81<sub>kan</sub>.

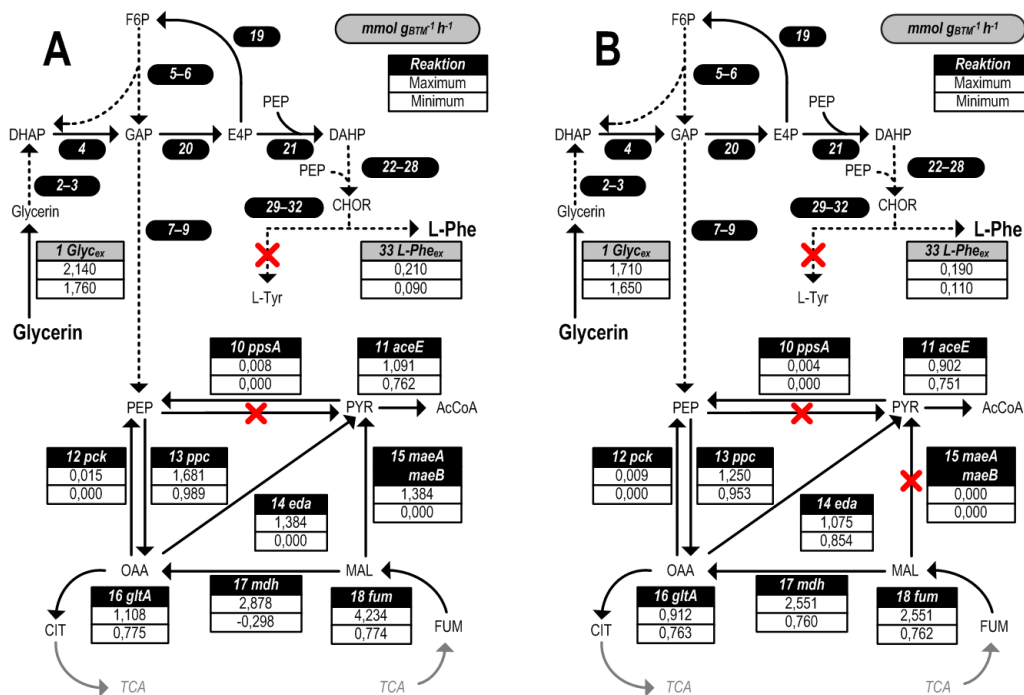
	<i>E. coli</i> FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub>	<i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta$ maeA pF81 <sub>kan</sub>	<i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta$ maeA $\Delta$ maeB pF81 <sub>kan</sub>
Biomasse bei Induktion	22,5 ± 1,0 g L <sup>-1</sup>	21,0 ± 0,9 g L <sup>-1</sup>	22,2 ± 0,5 g L <sup>-1</sup>
Max. spezif. Produktionsrate	25 ± 4 mg g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	24 ± 1 mg g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	28 ± 1 mg g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Max. L-Phe-Konzentration	14,4 ± 0,3 g L <sup>-1</sup>	13,5 ± 0,3 g L <sup>-1</sup>	16,6 ± 0,4 g L <sup>-1</sup>
Max. Acetat-Konzentration	6,6 ± 0,5 g L <sup>-1</sup>	7,1 ± 0,0 g L <sup>-1</sup>	5,5 ± 0,0 g L <sup>-1</sup>
Max. Laktat-Konzentration	0,6 ± 0,2 g L <sup>-1</sup>	1,6 ± 0,1 g L <sup>-1</sup>	0,6 ± 0,1 g L <sup>-1</sup>
Max. Malat-Konzentration	0,10 ± 0,01 g L <sup>-1</sup>	0,22 ± 0,01 g L <sup>-1</sup>	0,34 ± 0,01 g L <sup>-1</sup>

Die durch den standardisierten Produktionsprozess gewonnenen Konzentrationsverläufe für die Kultivierungen des Referenzstammes *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> und der Deletionsmutante *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub> wurden zur weiteren Charakterisierung des Metabolismus während der L-Phenylalanin-Produktion genutzt. Hierzu wurden die möglichen intrazellulären Stoffflussbereiche während der L-Phenylalanin-Produktion theoretisch mittels Flussvarianz-Analyse abgeschätzt. Für die Berechnungen wurden Prozess-Zeitpunkte gewählt, zu denen eine hohe L-Phenylalanin-Bildung nachweisbar war (siehe Abbildung 5.7). Als Randbedingungen wurden dem Modell die experimentell ermittelten spezifischen extrazellulären Raten für Substrataufnahme, L-Phenylalanin-Bildung und der Sauerstoffaufnahme vorgegeben. Diese Raten und die entsprechenden Messfehler wurden aus den jeweiligen Prozessverläufen bestimmt und sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

**Tabelle 5.3:** Experimentell bestimmte extrazelluläre Stoffflüsse während der Kultivierung von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> (Prozesszeit 49,8 h) und *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub> (Prozesszeit 46,8 h) zur intrazellulären Stoffflussabschätzung mittels Flussvarianz-Analyse. Einheit: mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, Ausnahme Biomassebildung (h<sup>-1</sup>).

	<i>E. coli</i> FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub>	<i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta$ <i>maeA</i> $\Delta$ <i>maeB</i> pF81 <sub>kan</sub>	Verwendung im theoretischen Modell
Glycerin-Aufnahme, q <sub>Gly</sub>	1,95 ± 0,19	1,68 ± 0,03	Randbedingung
L-Phe-Bildung, q <sub>L-Phe</sub>	0,15 ± 0,06	0,15 ± 0,04	Randbedingung
O <sub>2</sub> -Aufnahme, OUR	5,80 ± 0,10	3,59 ± 0,06	Randbedingung
CO <sub>2</sub> -Bildung, CER	4,00 ± 0,19	2,85 ± 0,07	Validierung
Biomassebildung, $\mu$	< 0,05	< 0,05	Optimierung/ Validierung

Ein Ausschnitt aus den für den Zentralstoffwechsel und den Aromatenbiosyntheseweg ermittelten intrazellulären Stoffflussbereichen ist in Abbildung 5.8 dargestellt. Eine detaillierte Auflistung weiterer in diesen Berechnungen theoretisch abgeschätzter Stoffflüsse kann dem Anhang (Tabelle A.29 und A.30) entnommen werden.



**Abbildung 5.8:** Theoretisch abgeschätzte Lösungsräume der intrazellulären Stoffflussverteilungen (Flussvarianz-Analyse) während der L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> (A) und *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub> (B). Hierbei beschreiben Kreuze Gen-Deletionen im vorliegenden Stammsystem. Gestrichelte Linien symbolisieren mehrere enzymatische Reaktionen, welche durch die kursiven Nummern repräsentiert sind. Die hinter den Reaktionsnummern folgenden kursiven Abkürzungen beschreiben das katalysierende Enzym/die codierenden Gene respektive den extrazellulären Stofffluss. Eine genaue Beschreibung jeder einzelnen Reaktion sowie die im genomweiten Modell (iAF1260, Feist *et al.* 2007) verankerte Reaktionsbezeichnung kann Tabelle A.29 und A.30 entnommen werden. Für die theoretische Stoffflussabschätzung vorgegebene, experimentell ermittelte Randbedingungen der Substrataufnahme und Produktbildung sind grau hinterlegt dargestellt.

Die in Abbildung 5.8 A dargestellte Stoffflussverteilung für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> beschreibt einen Stofffluss ausgehend von der Kohlenstoffquelle Glycerin über Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP) in die Glykolyse, wo eine Aufteilung des Kohlenstoffflusses erfolgt. Der Pentose-Phosphat-Stoffwechselweg wird dabei über die Transketolase (*tktA*) bedient. Die Versorgung des Citrat-Zyklus erfolgt aufgrund der Deletion der Pyruvatkinase (*pyk*) über die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (*ppc*). Die L-Phenylalanin-Bildung wird durch einen linearen Stoffwechselweg ausgehend von der Umsetzung von Erythrose-4-phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) beschrieben. Die für diese Abschätzung theoretisch ermittelte Wachstumsrate von  $0,04 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  ist in guter Übereinstimmung mit der experimentell ermittelten Rate ( $\mu < 0,05 \text{ h}^{-1}$ ). Die für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> durchgeführten Varianz-Analysen beschreiben für viele Reaktionen der Glykolyse und des Aromatenbiosyntheseweges einen kleinen Lösungsraum. Für diese Reaktionen ist damit eine sehr hohe Vorhersagegenauigkeit gegeben. Im Gegensatz dazu sind im Bereich des Pyruvat-Metabolismus und des Citrat-Zyklus hohe Varianzen erkennbar. Große Unterschiede zwischen



dem minimal und maximal möglichen Stofffluss liegen dabei für die enzymatischen Reaktionen der Fumarase (*fum*), der Malat-Enzyme (*maeA*, *maeB*) und der Oxalacetat-Decarboxylase (*eda*) vor. Als Folge dieser Varianzen konnte auch die genaue Reaktionsrichtung der Malatdehydrogenase (*mdh*) nicht bestimmt werden, was durch einen möglichen sowohl positiven als auch negativen Betrag des Stoffflusses ersichtlich wird (siehe Abbildung 5.8 A). Des Weiteren geben die Berechnungen für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> einen deutlichen Unterschied zwischen der theoretisch bestimmten Kohlendioxidbildung ( $2,76 \pm 0,32 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) und der experimentell nachgewiesenen Rate ( $4,00 \pm 0,19 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) wieder.

Die in Abbildung 5.8 B dargestellte Stoffflussverteilung für *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub> ist durch die zusätzliche Deletion der Malat-Enzyme und dem sich daraus ergebenden Nullfluss über diese Enzyme gekennzeichnet. Die für diesen Stamm bestimmte intrazelluläre Stoffflussverteilung ist in weiten Teilen vergleichbar mit der für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> beschriebenen. Auch für den Malat-Enzym-Deletionsstamm treten nur geringe Stofffluss-Varianzen im Bereich des Glycerin-Metabolismus, der Glykolyse sowie dem Pentose-Phosphat- und Aminosäure-Stoffwechsel auf. Im Gegensatz zu *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> konnten für den Stamm mit inaktiven Malat-Enzymen im Bereich des Pyruvat-Metabolismus deutlich verringerte Varianzen zwischen den minimalen und maximalen Stoffflüssen der Fumarase (*fum*) und der Oxalacetat-Decarboxylase (*eda*) erzielt werden. Des Weiteren konnte die Reaktionsrichtung der Malatdehydrogenase (*mdh*) eindeutig bestimmt werden. Die für diese Abschätzung theoretisch ermittelte Wachstumsrate von  $0,03 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  ist in guter Übereinstimmung mit der experimentell ermittelten Rate ( $\mu < 0,05 \text{ h}^{-1}$ ). Genauso liegt ein im Vergleich mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> geringerer Unterschied zwischen theoretisch bestimmter Kohlendioxidbildung ( $2,52 \pm 0,13 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) und experimentell gemessener Rate ( $2,85 \pm 0,07 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) vor.

## Diskussion

Durch die reaktionstechnische Charakterisierung der beiden Malat-Enzym-Deletionsstämme *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA* pF81<sub>kan</sub> und *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub> im standardisierten 15 L-Produktionsprozess wurden im Vergleich mit dem Referenzstamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> keine Unterschiede im Prozessverhalten nachgewiesen. Neben einer vergleichbaren Wachstumsphase wurde in der zweiten Prozessphase eine L-Phenylalanin-Bildung mit ähnlichen maximalen spezifischen Produktionsraten und Endkonzentrationen erzielt (siehe Tabelle 5.2). Eine Aktivität der Malat-Enzyme während der L-Phenylalanin-Produktion kann somit ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde durch die bei Produktionsabbruch einsetzende Nebenproduktbildung an Acetat und Laktat ein mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> übereinstimmendes Nebenproduktspektrum nachgewiesen. Dieses

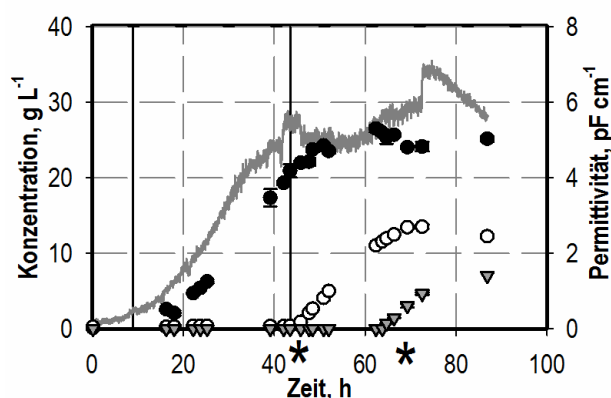
identische Verhalten belegt, dass die Pyruvat-Versorgung in Pyruvatkinase-negativen Stämmen und die daraus resultierende Nebenproduktbildung an Acetat und Laktat nicht durch die Malat-Enzyme verursacht wird.

Durch die im Produktionsprozess experimentell ermittelten extrazellulären Stoffflüsse war es durch theoretische Varianz-Analyse des Weiteren möglich, intrazelluläre Stoffflussbereiche für die unterschiedlichen rekombinanten Stämme abzuschätzen. Die für die Stoffflussverteilung von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> bestimmten Varianzen im Pyruvat-Metabolismus unterstreichen die in der Literatur beschriebene Bedeutung und die ausgeprägte Redundanz des Pyruvat-Phosphoenolpyruvat-Oxalacetat-Knotenpunktes in *E. coli* (Sauer und Eikmanns, 2005). Durch die große Anzahl an konkurrierenden Reaktionen in diesem Bereich des Stoffwechselnetzwerkes werden exakte theoretische Stoffflussvorhersagen ohne genaue Kenntnisse der real vorliegenden aktiven Enzyme erschwert. Diese Problematik konnte in den durchgeführten Stoffflussberechnungen für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> vor allem durch die Unterschiede zwischen der theoretischen und experimentell bestimmten Kohlendioxidbildung wiedergegeben werden. Durch den experimentell gewonnenen Nachweis der Inaktivität der Malat-Enzyme während der L-Phenylalanin-Produktion konnte der vorliegende Informationsgehalt im stöchiometrischen Netzwerk soweit erhöht werden, dass eine deutliche Verringerungen der Stoffflussvarianzen erzielt werden konnte. Die Verbesserung der theoretischen Stofffluss-Abschätzung für *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA*  $\Delta$ *maeB* pF81<sub>kan</sub> wird dabei vor allem durch die genauere Vorhersage der Kohlendioxidbildung belegt. Des Weiteren wurde durch die verbesserte Stoffflussberechnung gezeigt, dass die Pyruvat-Versorgung in Pyruvatkinase-negativen Stämmen durch die im genomweiten Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) verankerte Oxalacetat-Decarboxylase erfolgt. Dieses Modellenzym beschreibt dabei die Aktivität des in *E. coli* vorliegenden multifunktionalen Enzyms der 2-keto-4-Hydroxyglutarat-Aldolase (Kornberg und Sadler, 1961; Patil und Dekker, 1992).

### 5.2.3 Charakterisierung der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktion

Für eine anhaltende L-Phenylalanin-Produktion mit hohen spezifischen Produktionsraten ist der Erhalt eines vitalen Biokatalysators von großer Bedeutung. Gleichzeitig kann das Absterben von Biomasse eine mögliche Ursache für den in den Vorkapiteln beschriebenen Produktionsabbruch darstellen. Aus diesem Grund wurde während dieser Arbeit eine Charakterisierung der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktion im standardisierten 15 L-Prozess durchgeführt. Neben der ‚offline‘ durchgeführten Methodik der Durchflusszytometrie wurde ‚online‘ eine Sonde zur Bestimmung der Permittivität eingesetzt.

Zur Beschreibung der Zellvitalität wurde mit dem rekombinanten Produktionsstamm *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA* pF81<sub>kan</sub> eine Kultivierung im standardisierten 15 L-Produktionsprozess durchgeführt. Die dabei erzielten Konzentrationsverläufe von Biotrockenmasse, L-Phenylalanin und Nebenprodukt Acetat sind in Abbildung 5.9 zusammengefasst. Das gezeigte Prozessverhalten stimmt dabei mit den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Kultivierungen überein. Die genaue Beschreibung der Prozessparameter kann somit Kapitel 5.2.2 entnommen werden.

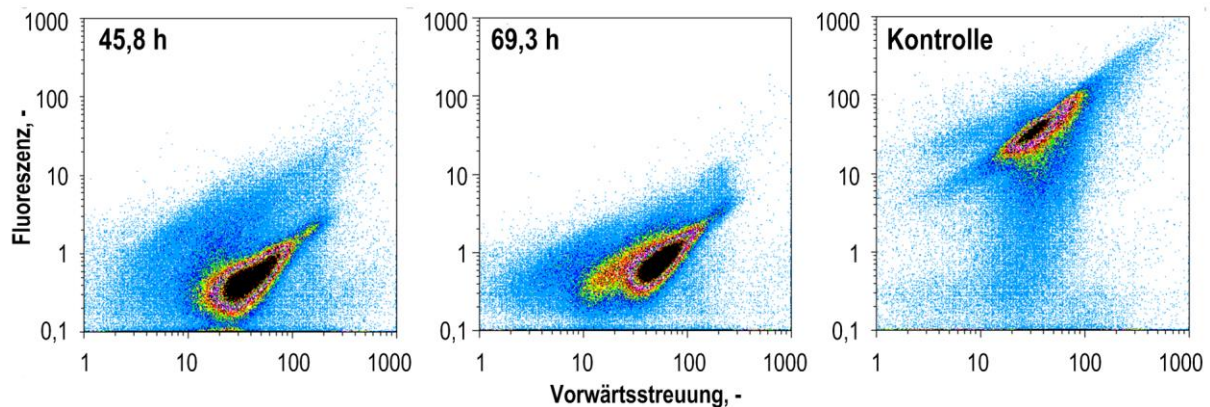


**Abbildung 5.9:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4.11  $\Delta$ *maeA* pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. Dargestellt: Permittivität (graue Linie; Sprung nach etwa 72 h durch Änderung des Absolutdrucks im Reaktionsansatz verursacht), Biotrockenmasse- (●), L-Phenylalanin- (○) und Acetat- (▼) Konzentration. Die schwarzen Sterne (\*) beschreiben die vergleichenden Prozesszeitpunkte zur ‚offline‘-Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Durchflusszytometrie.

Des Weiteren ist in Abbildung 5.9 der kontinuierlich im Prozess bestimmte Verlauf der Permittivität dargestellt. Die Permittivität beschreibt die Durchlässigkeit eines Materials für elektrische Felder und stellt somit eine indirekte Messgröße für lebensfähige Zellen dar. Aus Abbildung 5.9 wird ersichtlich, dass der Permittivitätsverlauf eine gute qualitative Übereinstimmung mit den durch Probenahmen gewonnenen Verlauf der Biotrockenmasse-Konzentration besitzt. Während in der exponentiellen Wachstumsphase eine entsprechende Zunahme der Permittivität beschrieben wurde, ergab sich in der Produktionsphase ein nahezu konstanter Verlauf. Ebenso wird ersichtlich, dass eine konstante Permittivität bis deutlich über den Abbruch der L-Phenylalanin-Bildung hinaus vorlag. Erst am Prozessende bei hohen Acetatkonzentrationen war eine absinkende Permittivität nachweisbar.

Zur weiteren Charakterisierung der Lebendzellzahl wurden jeweils zu Beginn (45,8 h) und am Ende (69,3 h) der Produktionsphase Biomasseproben aus dem laufenden Prozess entnommen und mittels der Methodik der Durchflusszytometrie vermessen. Der dabei verwendete Fluoreszenzfarbstoff DiBAC4(3) färbt depolarisierte Membranen stärker als polarisierte

Membranen. Durch Auftragung von Probenfluoreszenz gegen die Partikelgröße kann somit eine Unterscheidung zwischen lebenden Zellen (polarisierte Membran) und toten Zellen (depolarisierte Membran) getroffen werden. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit  $\beta$ -Propiolacton (0,75 %) abgetötet und ebenfalls vermessen. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 5.10 aufgeführt.



**Abbildung 5.10:** Charakterisierung der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktionsphase mittels Durchflusszytometrie. Die linke und mittlere Abbildung beschreiben gegen die Zellgröße aufgetragene Fluoreszenzsignale von mit DiBAC4(3) angefärbten Biomasseproben zu Beginn (45,8 h) und Ende (69,3 h) der L-Phenylalanin-Produktion. Rechts dargestellt die Fluoreszenzsignale von mit  $\beta$ -Propiolacton abgetöteter Biomasse (Kontrolle).

Zwischen den in Abbildung 5.10 dargestellten Fluoreszenzsignalen der beiden Prozessproben ist eine gute Übereinstimmung erkennbar. Bei nahezu identischer Fluoreszenz waren lediglich geringe Änderungen in der Vorwärtsstreuung nachweisbar. Eine Ursache hierfür können leichte Veränderungen der Zellmorphologie während der Produktionsphase darstellen. Der Vergleich mit den Fluoreszenzsignalen der Negativkontrolle (Zellen mit depolarisierter Membran) zeigt, dass in beiden Prozessproben nahezu ausschließlich Zellen mit polarisierter Membran und somit lebende Zellen vorlagen.

## Diskussion

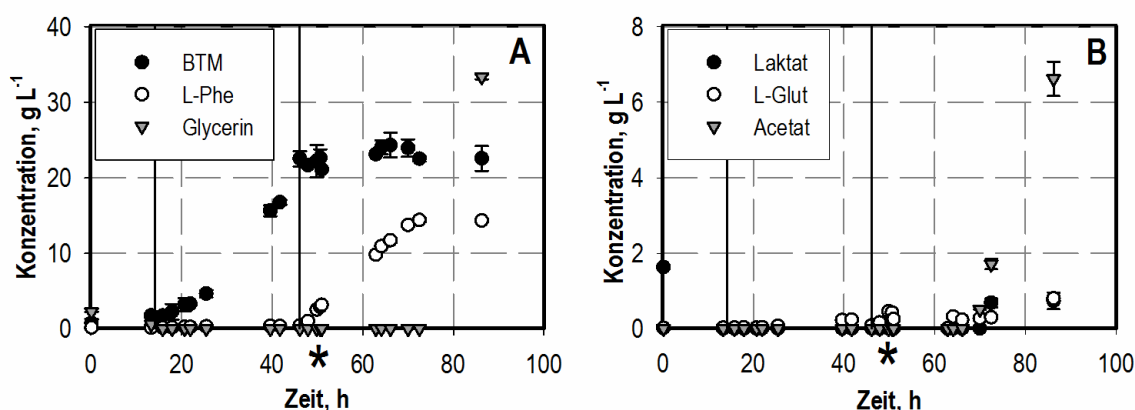
Zur Charakterisierung der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktion wurden in diesem Projekt zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Sowohl die kontinuierlich im Prozess bestimmte Permittivität als auch die Fluoreszenzmarkierung von Biomasseproben gaben keinen Hinweis für eine Beschädigung der Zellmembran respektive ein Absterben der Biomasse über die Prozesszeit. Die gezeigten Ergebnisse beschreiben, dass auch bei Abbruch der L-Phenylalanin-Bildung nahezu ausschließlich lebensfähige Zellen vorlagen. Das Absterben von Biomasse konnte somit als mögliche Ursache für den beschriebenen Abbruch der L-Phenylalanin-Bildung ausgeschlossen werden.

### 5.3 Speicherstoffsynthese von *E. coli*-Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion\*

Bereits während der in diesem Projekt initial durchgeführten reaktionstechnischen Charakterisierung von verschiedenen rekombinanten L-Phenylalanin-Produktionsstämmen wurden Teile der gewonnenen Biomasse aus dem laufenden 15 L-Prozess entnommen und zur Methodenetablierung der parallelisierten Kurzzeitanalysen (siehe Kapitel 4.4) genutzt. Die dabei erzielten und im Folgenden beschriebenen Erkenntnisse machten eine genaue Charakterisierung der Speicherstoffsynthese von *E. coli* Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion notwendig.

#### 5.3.1 Glucose-Ausfluss während der Zellüberführung zur metabolischen Analyse

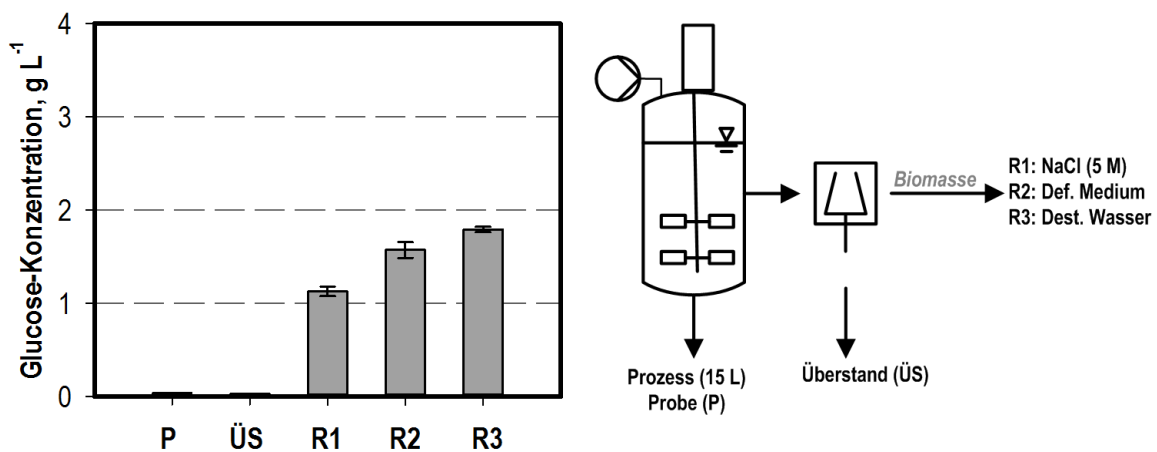
Die ersten Arbeiten zur metabolischen Analyse von L-Phenylalanin-Produktionsstämmen wurden in diesem Projekt mit dem verbesserten Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> durchgeführt. Die im standardisierten Prozess mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.11 dargestellt und in Kapitel 5.2.1 beschrieben. Als Analysen-Zeitpunkt wurde eine Prozesszeit während der Produktionsphase gewählt, zu der eine hohe L-Phenylalanin-Bildung ( $25 \pm 10 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) vorlag (siehe Abbildung 5.11; 49,8 h). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Produktbildung durch eine konstante Glycerin-Zufuhr.



**Abbildung 5.11:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●), L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) und Glycerin- (▼) Konzentration; **B)** Laktat- (●), L-Glutamat- (L-Glut, ○) und Acetat- (▼) Konzentration. Die schwarzen Sterne (\*) beschreiben den Prozesszeitpunkt, zu dem Zellsuspension zur metabolischen Analyse entnommen wurde.

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014c): Carbon storage in recombinant *Escherichia coli* during growth on glycerol and lactic acid. *Biotechnol Bioeng* 111: 2508–2519.

Für die Durchführung der metabolischen Analyse wurde zu einer Prozesszeit von 49,8 h Biomasse aus dem laufenden Produktionsprozess entnommen und mit der Methode des schnellen Medienwechsels (siehe Kapitel 4.4) in ein parallelisiertes Analysensystem überführt. Überraschenderweise wurde im 0,5 L-Parallelansatz des Analysensystems nach Transfer der zuvor abgetrennten und in frischem Medium resuspendierten Zellen eine initiale Glucose-Konzentration von  $1,78 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  mittels HPLC und enzymatischem Nachweis bestimmt. Da Glucose weder im Analysenmaßstab noch im standardisierten 15 L-Prozess als Kohlenstoffquelle zum Einsatz kam, sollte zunächst der genaue Zeitpunkt des Glucose-Ausflusses aus den Zellen bestimmt werden. Hierzu wurde während einer wiederholten Kultivierung von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Maßstab erneut Zellsuspension aus dem Prozess entnommen und mit der Methode des schnellen Medienwechsels in den Analysenmaßstab überführt. Während dieser Prozedur wurden bei jedem Arbeitsschritt (siehe Abbildung 5.12) Proben entnommen und der Glucose-Gehalt enzymatisch bestimmt. Des Weiteren wurde im letzten Arbeitsschritt die Biomasse zu gleichen Teilen in drei Medien (Medium 1: 5 M Kochsalzlösung, Medium 2: definiertes Salzmedium (siehe Kapitel 4.2), Medium 3: destilliertes Wasser) mit unterschiedlichem Salzgehalt resuspendiert, um einen möglichen Einfluss des Salzgehaltes auf den Glucose-Ausfluss zu charakterisieren.



**Abbildung 5.12:** Glucose-Konzentration während der Biomasse-Überführung (*E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub>) vom 15 L-Produktionsprozess in den Analysenmaßstab zur metabolischen Analyse. Die Konzentrationen wurden im Prozess (P), im Überstand nach Abtrennen der Biomasse (ÜS) und nach dem Resuspendieren in Medien mit unterschiedlichem Salzgehalt (R1: 5 M Kochsalzlösung, R2: definiertes Salzmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 4.4), R3: destilliertes Wasser) bestimmt.

Die in Abbildung 5.12 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Glucose weder im 15 L-Prozess noch im Kulturüberstand nach Abtrennen der Biomasse vorhanden war. Erst in den Proben, die nach dem Resuspendieren der Zellen in den drei unterschiedlichen Medien gewonnen wurden, konnte eine hohe Glucose-Konzentration von  $1,13\text{--}1,79 \text{ g L}^{-1}$  nachgewiesen werden.

Dabei wurde eine Abhängigkeit der Glucose-Ausflussmenge vom Salzgehalt des Resuspensionsmediums bestimmt. Mit zunehmendem Salzgehalt des Mediums verringerte sich die nachgewiesene Glucose-Konzentration im Medium. Für das ebenfalls im 15 L-Prozess verwendete definierte Salzmedium wurde ein spezifischer Glucose-Ausfluss von  $67,6 \pm 2,3 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  nachgewiesen. Eine Vermeidung des Glucose-Ausflusses durch die Verwendung von Medien mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen konnte nicht erzielt werden.

## Diskussion

Durch wiederholte Kultivierungen von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Maßstab wurde ein reproduzierbarer hoher Glucose-Ausfluss während der Zellüberführung in den Analysenmaßstab zur metabolischen Analyse nachgewiesen. Für metabolische Kurzzeitanalysen ist die gezielte Auslenkung des intrazellulären Stoffwechsels von zentraler methodischer Bedeutung, um durch Analyse der zellulären Reaktion auf die geänderten Bedingungen Rückschlüsse auf den metabolischen Zustand der Zelle ziehen zu können. In der Praxis erfolgt die Auslenkung des Stoffwechsels beispielsweise durch schnellen Wechsel der Kohlenstoffquelle oder Variation der Substrataufnahmeraten (siehe Kapitel 3.4). Der in diesem Kapitel beschriebene Glucose-Ausfluss machte eine gezielte Auslenkung des Metabolismus unmöglich. Durch die in allen Ansätzen des Analysenmaßstabes vorliegende Glucose-Konzentration konnte weder ein Wechsel auf eine andere alleinige Kohlenstoffquelle erfolgen, noch konnte eine Substrataufnahmerate gezielt durch Substratlimitation variiert werden. In nicht-dargestellten Ergebnissen wurde des Weiteren nachgewiesen, dass unabhängig von einer im Analysenmaßstab zusätzlich zur ausgeflossenen Glucose zur Verfügung gestellten Kohlenstoffquelle (beispielsweise Glycerin, Pyruvat oder Succinat) eine Wiederaufnahme von Glucose neben der zweiten Kohlenstoffquelle erfolgte. Die so beobachtbare evolutionäre Prägung von *E. coli* auf die Kohlenstoffquelle Glucose führte in allen Reaktionsansätzen zu einer einheitlichen, intrazellulären glykolytischen Stoffflussverteilung, was durch intrazelluläre Stoffflussabschätzung bestimmt wurde. Diese Erkenntnis verdeutlicht die Unmöglichkeit, den Metabolismus in Gegenwart der ausgeflossenen Glucose gezielt auszulenken.

Um die Durchführbarkeit von gezielten metabolischen Analysen zu gewährleisten, war somit eine genaue Charakterisierung der Ursachen des Glucose-Ausflusses notwendig.

Als Zeitpunkt des Glucose-Austritts konnte der letzte Arbeitsschritt der Zellüberführung, das Resuspendieren der abgetrennten Zellmasse in frischem Medium, bestimmt werden. Dieser innerhalb von Sekunden erfolgende hohe Glucose-Ausfluss setzt zwei metabolische Eigenschaften der Zellen voraus. Zum einen muss der vorliegende *E. coli*-Stamm in der Lage

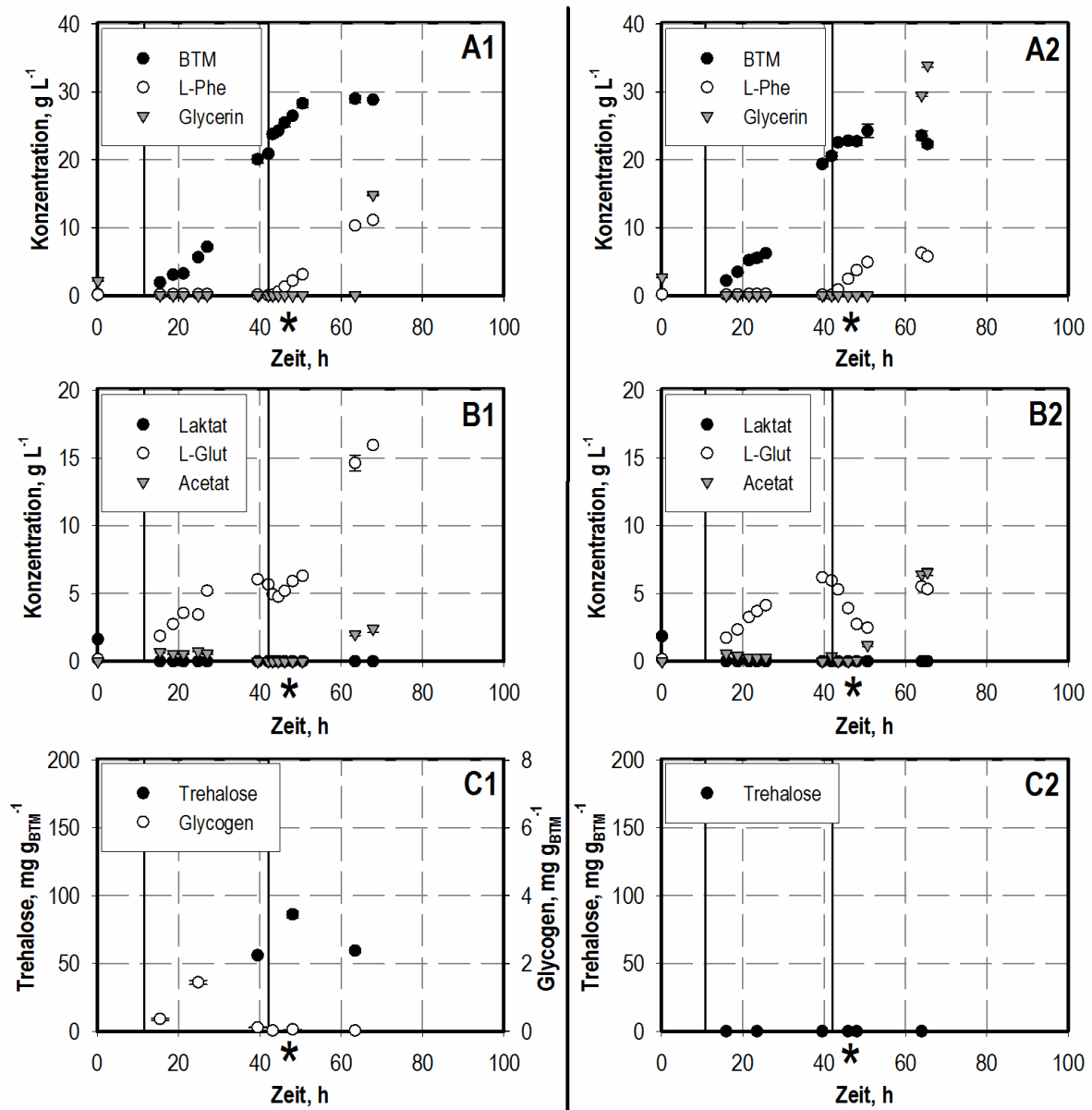
sein, während der vorangehenden Prozesszeit die ihm zugeführten Kohlenstoffquellen in Glucose umzuwandeln und intrazellulär zu speichern. Zum anderen muss es dem Organismus möglich sein, den gebildeten Speicherstoff mit hohen Raten abzubauen und die Glucose-Monomere ins Medium zu sekretieren. In der Literatur sind Glycogen und Trehalose als zentrale Glucose-Speicherstoffe in *E. coli* beschrieben (Dauvillée *et al.*, 2005; Preiss und Romeo, 1994; Purvis *et al.*, 2005; Strøm und Kaasen, 1993). Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, sind dabei für das Polysaccharid Glycogen sowohl Regulationsfaktoren (Csr) und Gene für den Glycogen-Aufbau (*glgC*, *glgA*, *glgB*), als auch Gene für unterschiedliche Glycogen-abbauende Enzyme (*glgX* und *glgP*) bekannt. Des Weiteren wird für Glycogen die Möglichkeit beschrieben, große Mengen des Speicherstoffes (15,3 % der Biomasse) intrazellulär anzureichern (Holme und Palmstierna, 1956). Für das sich sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma anreichernde Disaccharid Trehalose sind neben den Genen des Trehalose-Aufbaus (*otsA*, *otsB*) vor allem die hohen Aktivitäten von bis zu  $4,5 \text{ U mg}_{\text{Gesamtprotein}}^{-1}$  der Trehalose-abbauenden Trehalasen von Bedeutung (Li *et al.*, 2012). Durch die beschriebenen Eigenschaften der beiden Speicherstoffe wird ersichtlich, dass beide Substanzen die im L-Phenylalanin-Produktionsstamm aufgetretene Glucose-Speicherung und den nachgewiesenen Glucose-Ausfluss verursachen können. Dies machte eine genaue Charakterisierung der Speicherstoffsynthese von Glycogen und Trehalose während der L-Phenylalanin-Produktion notwendig.

### 5.3.2 Glucose-Speicherung in Glycogen- und Trehalose-Deletionsstämmen

Zur genauen Charakterisierung der intrazellulären Speicherstoffsynthese von Glycogen und Trehalose während der L-Phenylalanin-Produktion wurden vom Projektpartner zwei L-Phenylalanin-Produktionsstämme mit unterschiedlichen Deletionen im Glycogen- und Trehalose-Metabolismus zur Verfügung gestellt. Im rekombinanten Stamm *E. coli* FUS4.15  $\Delta glg$  pF81<sub>kan</sub> wurden dabei die von Dauvillée *et al.* (2005) beschriebenen Gene für Glycogen-Bildung (*glgC*, *glgA* und *glgB*) und Glycogen-Abbau (*glgX* und *glgP*) entfernt. Zusätzlich zu den Modifikationen im Glycogen-Metabolismus wurden beim Stamm *E. coli* FUS4.15  $\Delta glg \Delta ots$  pF81<sub>kan</sub> die Gene für Trehalose-Bildung (*otsA* und *otsB*) entfernt. Die Charakterisierung dieser beiden Deletionsstämmen erfolgte im standardisierten 15 L-Produktionsprozess und wird im Folgenden beschrieben.

Die während der Kultivierung von *E. coli* FUS4.15  $\Delta glg$  pF81<sub>kan</sub> erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.13 A1–C1 dargestellt.



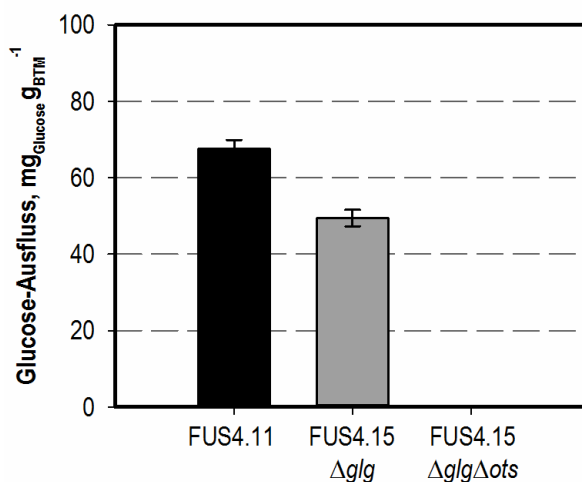


**Abbildung 5.13:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> (**A1**, **B1** und **C1**) und *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg  $\Delta$ ots pF81<sub>kan</sub> (**A2**, **B2** und **C2**) im 15 L-Rührkesselreaktor. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●), L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) und Glycerin- (▼) Konzentration; **B)** Laktat- (●), L-Glutamat- (L-Glut, ○) und Acetat- (▼) Konzentration. **C)** Trehalose- (●) und Glycogen- (○) Konzentration. Die schwarzen Sterne (\*) beschreiben den Prozesszeitpunkt, zu dem Zellsuspension zur Charakterisierung eines möglichen Glucose-Ausflusses entnommen wurde.

In der in Abbildung 5.13 dargestellten ersten Prozessphase konnte mit *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> die vorgegebene Wachstumsrate von  $0,1 \text{ h}^{-1}$  umgesetzt werden. Hierdurch wurde am Ende der ersten Prozessphase nach 42,1 h eine Biotrockenmasse von  $20,9 \text{ g L}^{-1}$  erreicht (siehe Abbildung 5.13 A1). Im Gegensatz zu vorangegangenen Kultivierungen mit dem Stamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> wurde für

*E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> in der ersten Prozessphase eine Anreicherung an L-Glutamat im Medium nachgewiesen (siehe Abbildung 5.13 B1). Bei Induktion lagen rund  $5,7 \text{ g L}^{-1}$  der Aminosäure vor. Nach Induktion der Proteinexpression und Beginn der Produktionsphase wurde ein anfänglicher Rückgang der L-Glutamat-Konzentration nachgewiesen, bevor sich die Aminosäure nach rund 46 h erneut im Medium anreicherte. Bei Prozessende (67,8 h) konnte eine hohe L-Glutamat-Konzentration von  $15,9 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt werden. Die sich während der zweiten Prozessphase ausbildende maximale spezifische Produktionsrate von  $19 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  war im Vergleich zu *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> um 24 % verringert. Nach 67,8 h wurde im Reaktionsansatz mit *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> eine ebenfalls verringerte maximale L-Phenylalanin-Konzentration von  $11,1 \text{ g L}^{-1}$  nachgewiesen (siehe Abbildung 5.13 A1). Ein Substratüberschuss konnte anhand einer entsprechenden Glycerin-Konzentration erst in der letzten Prozessprobe bestimmt werden. Bereits vor Ende der L-Phenylalanin-Bildung reicherte sich, vergleichbar mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub>, Acetat im Medium an (siehe Abbildung 5.13 B1). Im Gegensatz zum Vergleichsstamm wurde für *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> keine Nebenproduktbildung an Laktat bestimmt (siehe Abbildung 5.13 B1).

Zur Charakterisierung der Speicherstoffsynthese von *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> während des standardisierten Prozesses wurden die intrazellulären Polysaccharide Glycogen und Trehalose quantifiziert. Der in Abbildung 5.13 C1 dargestellte Konzentrationsverlauf für Glycogen zeigt, dass nur geringste Mengen des Speicherstoffes ( $< 2 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) nachgewiesen wurden, was die erfolgreiche Inaktivierung des Glycogen-Metabolismus durch die durchgeführten Gen-Deletionen beschreibt. Im Gegensatz dazu konnten am Ende der Wachstumsphase und während der Produktionsphase hohe intrazelluläre Trehalose-Konzentrationen ( $> 50 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) bestimmt werden (siehe Abbildung 5.13 C1). Zur Charakterisierung eines möglichen Glucose-Ausflusses wurde nach 45,5 h Biomasse aus dem laufenden 15 L-Prozess entnommen und analog zur Kultivierung von *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> mit der Methode des schnellen Medienwechsels behandelt. Der dabei bestimmte Glucose-Ausfluss betrug  $49,4 \pm 2,2 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . In Abbildung 5.14 ist ein Vergleich der ermittelten spezifischen Glucose-Ausflüsse für die Glycogen-Deletionsmutante und den Referenzstamm dargestellt. Hieraus wird ein im Vergleich zu *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> ( $67,6 \pm 2,3 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) nur geringfügig reduzierter Glucose-Ausfluss für *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> ersichtlich. Dies verdeutlicht, dass der Stamm *E. coli* FUS4.15  $\Delta$ glg pF81<sub>kan</sub> weiterhin die Fähigkeit besitzt, Glucose intrazellulär zu speichern und bei Bedarf in kurzer Zeit freizusetzen.



**Abbildung 5.14:** Glucose-Ausfluss aus verschiedenen rekombinanten L-Phenylalanin-Produktionsstämmen während der Zellüberführung aus dem 15 L-Produktionsprozess in den 0,5 L-Analysenmaßstab zur metabolischen Analyse: *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> (FUS4.11), *E. coli* FUS4.15 Δglg pF81<sub>kan</sub> (FUS4.15 Δglg) und *E. coli* FUS4.15 Δglg Δots pF81<sub>kan</sub> (FUS4.15 Δglg Δots).

Die während der Kultivierung der Glycogen-Trehalose-Doppeldeletionsmutante *E. coli* FUS4.15 Δglg Δots pF81<sub>kan</sub> erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.13 A2–C2 dargestellt. In der ersten Prozessphase dieser Kultivierung konnte ein substratlimitiertes exponentielles Wachstum von 0,09 h<sup>-1</sup> bei einer vorgegebenen Wachstumsrate von 0,1 h<sup>-1</sup> erzielt werden. Nach 41,9 h lag im Reaktionsansatz eine Biomassekonzentration von 20,6 g L<sup>-1</sup> vor (siehe Abbildung 5.13 A2). Vergleichbar mit dem Glycogen-Deletionsstamm *E. coli* FUS4.15 Δglg pF81<sub>kan</sub> konnte auch für *E. coli* FUS4.15 Δglg Δots pF81<sub>kan</sub> eine L-Glutamat-Anreicherung im Medium während der Wachstumsphase beobachtet werden (siehe Abbildung 5.13 B2). Nach Induktion der Proteinexpression (41,9 h) wurde erneut eine anfängliche Abnahme der extrazellulären L-Glutamat-Konzentration bestimmt, bevor sich die Aminosäure bei Prozessende erneut im Medium anreicherte. In der Produktionsphase wurde eine im Vergleich mit *E. coli* FUS4.15 Δglg pF81<sub>kan</sub> um 43 % verringerte L-Phenylalanin-Bildung nachgewiesen (siehe Abbildung 5.13 A2). Die maximale bestimmte L-Phenylalanin-Konzentration betrug 6,3 g L<sup>-1</sup> (64 h). Bereits nach 48 h und somit noch vor Produktionsabbruch trat eine einsetzende Nebenproduktbildung an Acetat auf. Die organische Säure reicherte sich bis zum Prozessende auf eine Konzentration von 6,6 g L<sup>-1</sup> an (siehe Abbildung 5.13 B2). Vergleichbar mit *E. coli* FUS4.15 Δglg pF81<sub>kan</sub> konnte auch für *E. coli* FUS4.15 Δglg Δots pF81<sub>kan</sub> keine Nebenproduktbildung an Laktat bestimmt werden. Zur Charakterisierung einer möglichen intrazellulären Glucose-Speicherung wurde die intrazelluläre Trehalose-Konzentration während der Kultivierung der Glycogen-Trehalose-Doppeldeletionsmutante bestimmt. Die in

Abbildung 5.13 C2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass durch die eingebrachten zusätzlichen Deletionen der Trehalose-Gene eine intrazelluläre Speicherung von Trehalose über die gesamte Prozesszeit vermieden werden konnte. Zur Charakterisierung eines möglichen Glucose-Ausflusses wurde nach 45,5 h Biomasse aus dem 15 L-Prozess entnommen und mit der Methode des schnellen Medienwechsels behandelt. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Kultivierungen wurde dabei für *E. coli* FUS4.15  $\Delta glg \Delta ots$  pF81<sub>kan</sub> kein Glucose-Ausfluss nachgewiesen (siehe Abbildung 5.14).

## Diskussion

Durch die reaktionstechnische Charakterisierung der beiden rekombinanten Glycogen- und Trehalose-Deletionsstämme im 15 L-Produktionsprozess konnte im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> eine Vielzahl an Unterschieden im Prozessverhalten aufgezeigt werden. So wurde für beide Stämme über nahezu die gesamte Prozesszeit eine L-Glutamat-Anreicherung im Medium nachgewiesen. In Bakterien ist die osmotische Regulation durch den Austauschstoff L-Glutamat bekannt (Larsen *et al.*, 1987; Trüper und Galinski, 1990). Durch die in den vorliegenden Stämmen eingebrachten Deletionen im Speicherstoffwechsel wurde eine Synthese von Glycogen nachweislich erfolgreich verhindert. Die auftretende Nebenproduktbildung an L-Glutamat könnte somit einen Versuch der Zelle darstellen, die osmotischen Schutzstoffe Glycogen respektive Trehalose zu ersetzen. Die zwischenzeitliche Abnahme der L-Glutamat-Konzentration im Medium kann dabei mit der einsetzenden L-Phenylalanin-Bildung in Verbindung gesetzt werden. In den ersten Stunden der L-Phenylalanin-Synthese erfolgt eine Umstellung des Proteoms von Wachstum auf Produktbildung. Da L-Glutamat im letzten Schritt der L-Phenylalanin-Synthese (katalysiert durch die Tyrosin-Aminotransferase) als Cosubstrat benötigt wird, kann eine Wiederaufnahme der Aminosäure in den ersten Stunden der Produktionsphase mit einer für die L-Phenylalanin-Synthese nicht ausreichenden Bereitstellung an L-Glutamat zusammenhängen, welche im weiteren Verlauf der Produktionsphase ausgeglichen werden kann. Neben der Nebenproduktbildung an L-Glutamat wurden weitere Unterschiede im Nebenproduktspektrum bestimmt. Die für *E. coli* FUS4.15  $\Delta glg$  pF81<sub>kan</sub> und *E. coli* FUS4.15  $\Delta glg \Delta ots$  pF81<sub>kan</sub> im Vergleich zum Ausgangsstamm nicht auftretende Nebenproduktbildung an Laktat verdeutlicht die weitreichende Veränderung des Zellmetabolismus. Des Weiteren wurde durch die Quantifizierung der beiden Polysaccharide Glycogen und Trehalose eine starke intrazelluläre Anreicherung an Trehalose bereits während der Wachstumsphase des Produktionsprozesses nachgewiesen (*E. coli* FUS4.15  $\Delta glg$  pF81<sub>kan</sub>). Durch Deletionen der entsprechenden Gene konnte eine Trehalose-Anreicherung und der daraus resultierende Glucose-Ausfluss bei der Zellüberführung zur metabolischen Analyse vollständig vermieden werden (*E. coli* FUS4.15  $\Delta glg \Delta ots$  pF81<sub>kan</sub>). Der somit erfolgreich

erzielte Nachweis, dass Glucose während des Produktionsprozesses als Disaccharid gespeichert wird und bei Bedarf als Glucose-Monomere ausgeschleust werden kann, bestätigt die bereits von Li *et al.* (2012) beschriebene hohe Aktivität der Trehalose-abbauenden Trehalasen. Trotz der erfolgreichen Vermeidung des Kohlenstoffabflusses in die Speicherstoffsynthese wurde jedoch für beide rekombinanten Stämme eine deutlich verringerte Produktion an L-Phenylalanin nachgewiesen. Für die Doppeldeletionsmutante *E. coli* FUS4.15  $\Delta glg \Delta ots$  pF81<sub>kan</sub> wurde eine im Vergleich mit dem Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> um 57 % verringerte Produktbildung bestimmt. Diese verringerte Aminosäure-Bildung verdeutlicht, dass die eingebrachten Deletionen im Speicherstoffwechsel nicht zielführend für eine effiziente Prozessführung sind. Somit war es von zentraler Bedeutung, die Ursachen für die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung zu identifizieren und diese durch entsprechende reaktionstechnische Veränderungen zu verhindern. Untersuchungen hierzu werden im folgenden Kapitel beschrieben.

### 5.3.3 Trehalose-Speicherung aus Glycerin und/ oder Laktat in rekombinanten *E. coli*-Zellen

Um die genaue Ursache für die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung in den L-Phenylalanin-Produktionsstämmen zu identifizieren, wurden zwei stammspezifische Eigenschaften des Produktionsprozesses betrachtet.

Der erste Aspekt berücksichtigte die in den Produktionsstämmen vorliegende Gen-Deletion der Pyruvatkinase (*pykA* und *pykF*). Durch diese Modifikation in der Glykolyse ist es notwendig, neben Glycerin noch eine weitere Kohlenstoffquelle (Laktat) einzubringen, um den Zugang zum Zentralstoffwechsel und somit Wachstum zu ermöglichen. Eine Versorgung des Zentralstoffwechsels und vor allem des Citrat-Zyklus kann in der Wachstumsphase somit unabhängig von Glycerin erfolgen. Da der Glycerin-Transport in die Zelle jedoch zu einem großen Teil durch passive Diffusion erfolgt (Lu *et al.*, 2003), könnte dies zu einer Überschussversorgung der Glykolyse und somit zu einem intrazellulären Kohlenstoffüberschuss führen. Diesem Überschuss könnte die Zelle durch Anreicherung von Speicherstoffen entgegen wirken. Unterstützt wird diese Annahme durch die bereits am Ende der Wachstumsphase vorliegende maximale intrazelluläre Trehalose-Konzentration (siehe Abbildung 5.13 C1).

Der zweite mögliche Aspekt der intrazellulären Trehalose-Anreicherung berücksichtigte die in der Literatur für Trehalose beschriebene Rolle als osmotischer Schutzstoff in *E. coli* (Strøm und Kaasen, 1993). Das in diesem Projekt verwendete definierte Salzmedium (siehe Kapitel 4.2) ist dabei sowohl in der Salzkonzentration als auch in der Art der Mineralsalze vergleichbar mit anderen in der Literatur beschriebenen definierten Salzmedien

(beispielsweise Medien nach Hiller *et al.* (2007b) und Korz *et al.* (1995)). Aus diesem Grund wurde ein osmotischer Stress, welcher durch das verwendete Kultivierungsmedium verursacht werden kann, ausgeschlossen. Hingegen sollte ein möglicher osmotischer Stress durch die verwendeten Kohlenstoffquellen Glycerin und Laktat untersucht werden.

Beide Aspekte zur Identifikation der Ursachen der intrazellulären Trehalose-Anreicherung machten eine Charakterisierung von L-Phenylalanin-Produktionsstämmen mit aktiver Pyruvatkinase im Produktionsprozess notwendig. Der entsprechende Stamm trägt die Bezeichnung *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> und ist in Kapitel 4.1 beschrieben.

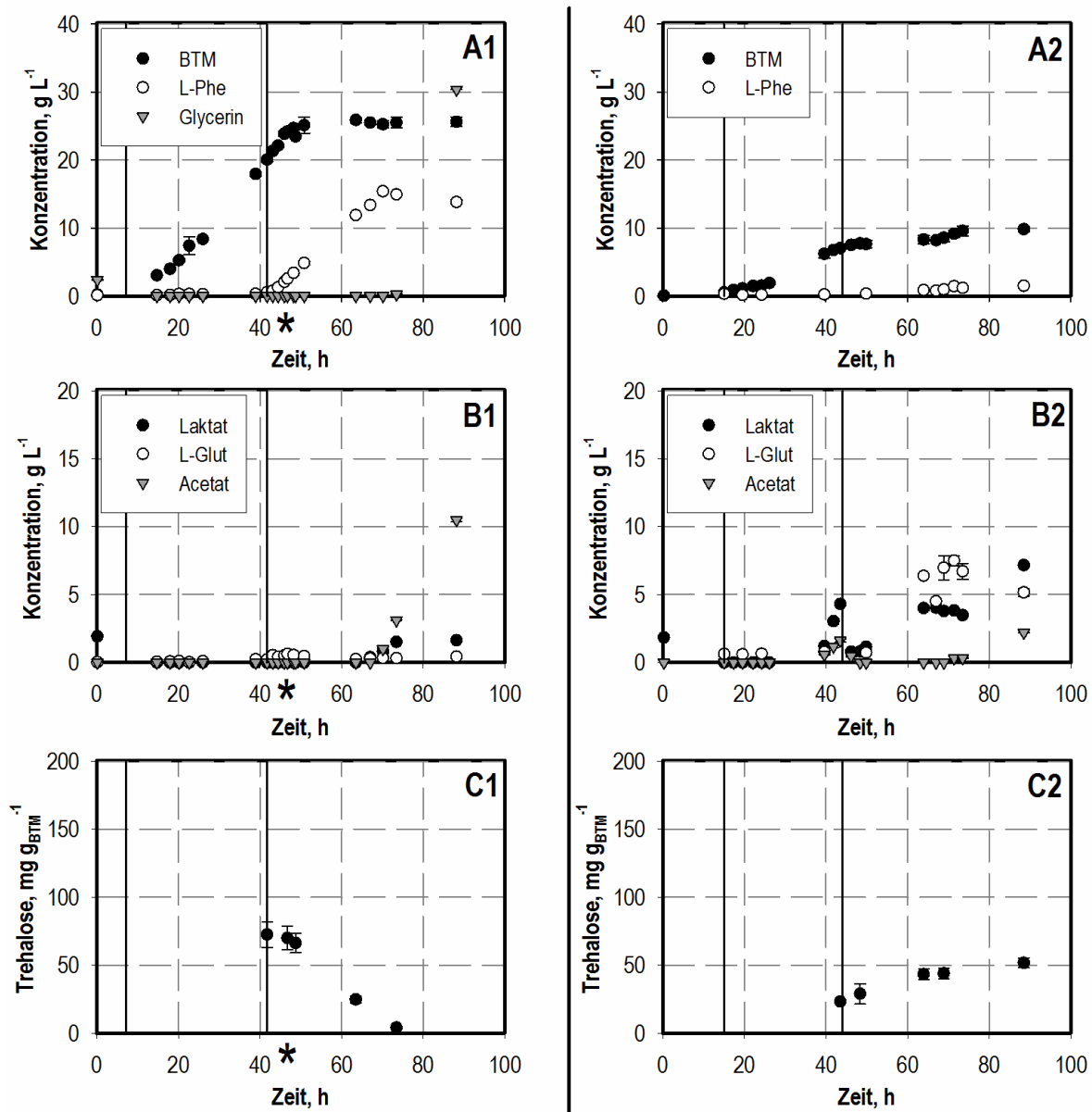
### **Einfluss der Deletion der Pyruvatkinase auf die Trehalose-Anreicherung**

Zur Bestimmung eines möglichen Einflusses der Deletion der Pyruvatkinase-codierenden Gene auf die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung wurde der L-Phenylalanin-Produktionsstamm mit aktiver Pyruvatkinase (*E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>) im standardisierten Prozess charakterisiert und mit dem Ausgangsstamm mit deletierter Pyruvatkinase (*E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub>) verglichen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden bei der Kultivierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> ebenfalls die beiden Kohlenstoffquellen Glycerin und Laktat während der Wachstumsphase eingesetzt. Die dabei erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.15 A1–C1 dargestellt. In der ersten Prozessphase konnte ein substratlimitiertes exponentielles Wachstum realisiert werden ( $\mu_{\text{gemessen}} = 0,09 \text{ h}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{vorgegeben}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$ ). Nach 41,7 h wurde im Reaktionsansatz eine daraus resultierende Biomasse-Konzentration von  $20,1 \text{ g L}^{-1}$  bestimmt (siehe Abbildung 5.15 A1). Vergleichbar mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> konnten auch für *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> während der Wachstumsphase nur geringe L-Glutamat-Konzentrationen ( $< 0,25 \text{ g L}^{-1}$ ) im Medium nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.15 B1). Nach IPTG-Zugabe (41,7 h) setzte die L-Phenylalanin-Bildung ein. Während der folgenden Produktionsphase wurde eine im Vergleich zu *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> ( $25 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) leicht verringerte maximale spezifische Produktionsrate von  $22 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bestimmt. Die maximale Produktkonzentration von  $15,4 \text{ g L}^{-1}$  lag nach 70,2 h vor (siehe Abbildung 5.15 A1). Die bei Produktionsabbruch bereits vorhandene Nebenproduktbildung an Acetat war genauso wie die am Prozessende nachweisbare Laktat-Bildung vergleichbar mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub>. Bei Prozessende (88,2 h) lagen rund  $1,6 \text{ g L}^{-1}$  Laktat und  $10,5 \text{ g L}^{-1}$  Acetat vor (siehe Abbildung 5.15 B1). Zu diesem Zeitpunkt wurde außerdem eine starke Glycerin-Anreicherung im Medium ( $30,4 \text{ g L}^{-1}$ ) gemessen (siehe Abbildung 5.15 A1). Zur Charakterisierung einer möglichen intrazellulären Glucose-Speicherung wurde die intrazelluläre Trehalose-Konzentration während der Kultivierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> bestimmt. Die in Abbildung 5.15 C1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bereits am Ende der Wachstumsphase hohe Trehalose-Konzentrationen von rund  $72 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  intrazellulär

vorlagen. Ebenso wird ersichtlich, dass die gespeicherte Trehalose während der Produktionsphase bis hin zum Prozessende abgebaut wurde. Zur erneuten Charakterisierung eines möglichen Glucose-Ausflusses wurde nach 45,6 h Biomasse aus dem 15 L-Prozess entnommen und mit der Methode des schnellen Medienwechsels behandelt. Der dabei ermittelte Glucose-Ausfluss betrug  $64 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und ist somit nahezu identisch zu dem bei *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> ermittelten Glucose-Ausfluss.

## Diskussion

Durch die reaktionstechnische Charakterisierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im standardisierten Prozess konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass die Pyruvatkinase-Deletion im Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> keinen Einfluss auf die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung nimmt. Dabei wurde ein zu *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> nahezu identischer Glucose-Ausfluss während der Zellüberführung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> nachgewiesen. Das mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> vergleichbare Prozessverhalten von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> bezüglich Biomassebildung, maximaler Produktkonzentration und Nebenproduktspektrum unterstreicht den nicht vorhandenen negativen Einfluss der Pyruvatkinase-Deletion. Die für den Stamm mit aktiver Pyruvatkinase bestimmte leicht verringerte maximale spezifische Produktionsrate kann jedoch durch den möglichen Kohlenstoffabfluss in den Zentralstoffwechsel über die Pyruvatkinase begründet werden. Der während der Kultivierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> bestimmte Konzentrationsverlauf der intrazellulären Trehalose macht hingegen deutlich, dass die höchste Trehalose-Konzentration bereits während der Wachstumsphase erreicht wird (siehe Abbildung 5.15 C1). Diese Erkenntnis bestärkt die Vermutung einer möglichen Einflussnahme der in dieser Prozessphase verwendeten beiden Kohlenstoffquellen Glycerin und Laktat auf die Trehalose-Anreicherung.



**Abbildung 5.15:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor unter Variation der eingesetzten Kohlenstoffquelle. Abbildung **A1**, **B1** und **C1**: Glycerin und Laktat in der Wachstumsphase; Glycerin in der Produktionsphase. Abbildung **A2**, **B2** und **C2**: Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●), L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) und Glycerin- (▼) Konzentration; **B)** Laktat- (●), L-Glutamat- (L-Glut, ○) und Acetat- (▼) Konzentration. **C)** Intrazelluläre Trehalose-Konzentration (●). Die schwarzen Sterne (\*) beschreiben den Prozesszeitpunkt, zu dem Zellsuspension zur Charakterisierung eines möglichen Glucose-Ausflusses entnommen wurde.



### **Einfluss der verwendeten Kohlenstoffquelle auf die Trehalose-Anreicherung**

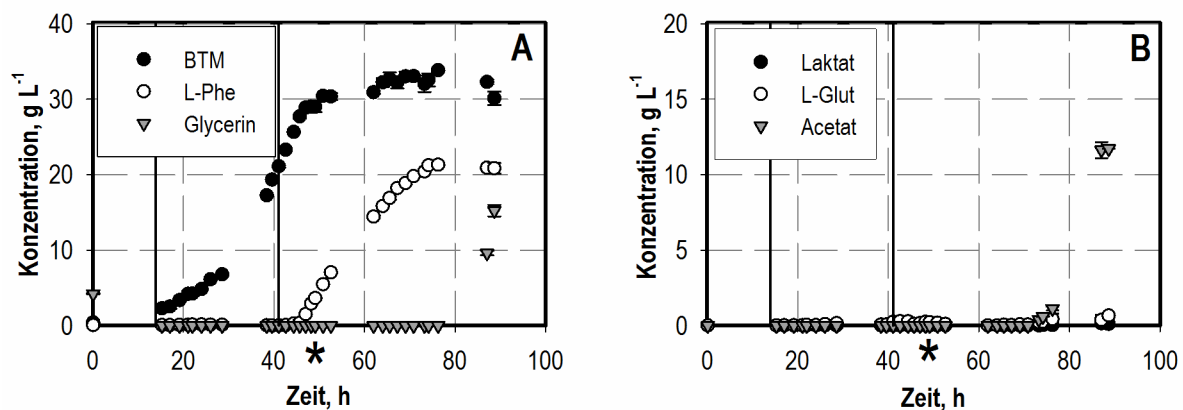
Zur Bestimmung eines möglichen Einflusses der verwendeten Kohlenstoffquelle auf die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung wurde der Produktionsstamm mit aktiver Pyruvatkinase (*E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>) in zwei separaten Ansätzen jeweils mit einer der beiden Kohlenstoffquellen (Glycerin oder Laktat) als alleinige Kohlenstoffquelle kultiviert.

In einem ersten Ansatz erfolgte hierzu die Kultivierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> mit der alleinigen Kohlenstoffquelle Laktat. Die in Kapitel 4.3.6 beschriebene zweiphasige Prozessstrategie wurde zur besseren Vergleichbarkeit beibehalten. Die Zusammensetzung der Zulaufmedien mit Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle können Tabelle A.12 entnommen werden.

Die mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> und Laktat als Kohlenstoffquelle erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.15 A2–C2 dargestellt. Dabei wurde bereits in der ersten Prozessphase ein deutlich verschlechtertes Prozessverhalten beobachtet. Neben einer im Vergleich zu bisherigen Kultivierungen stark reduzierten Biomassekonzentration von  $7,0 \text{ g L}^{-1}$  wurde am Ende der Wachstumsphase (43,5 h) eine Substratanreicherung und eine Nebenproduktbildung an Acetat nachgewiesen (siehe Abbildung 5.15 B2). Das vorgegebene substratlimitierte exponentielle Wachstum ( $\mu_{\text{vorgegeben}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$ ) konnte nicht umgesetzt werden. Im Zeitraum des Zulaufmedienwechsels und der IPTG-Zugabe (43,5 h) erfolgte ein nahezu vollständiger Abbau der angereicherten Laktat- und Acetat-Konzentrationen. In der zweiten Prozessphase wurde eine im Vergleich zu Prozessphasen mit Glycerin als Kohlenstoffquelle deutlich reduzierte L-Phenylalanin-Bildung nachgewiesen. Nach 88,5 h betrug die maximale Produktkonzentration  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (siehe Abbildung 5.15 A2). Die angestrebte Substratlimitierung konnte über die Produktionszeit nicht aufrecht gehalten werden, so dass sich erneut Laktat im Medium anreicherte. Des Weiteren war eine Nebenproduktbildung an L-Glutamat und Acetat nachweisbar (siehe Abbildung 5.15 B2). Zur Charakterisierung einer möglichen intrazellulären Glucose-Speicherung wurde die intrazelluläre Trehalose-Konzentration während der Kultivierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> mit Laktat bestimmt. Die in Abbildung 5.15 C2 dargestellten Ergebnisse unterstreichen, dass bereits am Ende der Wachstumsphase Trehalose-Konzentrationen von rund  $23 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  intrazellulär vorlagen und sich bis Prozessende auf über  $50 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  erhöhten (siehe Abbildung 5.15 C2).

Zur Bestimmung eines möglichen Einflusses der verwendeten Kohlenstoffquelle erfolgte in einem zweiten Ansatz die Kultivierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> auf der alleinigen Kohlenstoffquelle Glycerin. Die in Kapitel 4.3.6 beschriebene zweiphasige Prozessstrategie wurde beibehalten und die Zusammensetzung der Zulaufmedien entsprechend angepasst (siehe Tabelle A.12). Die mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> und Glycerin als Kohlenstoffquelle erzielten

Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.16 dargestellt. Aus Abbildung 5.16 A wird ersichtlich, dass ein vollständig substratlimitiertes exponentielles Wachstum während der ersten Prozessphase erzielt wurde ( $\mu_{\text{gemessen}} = 0,09 \text{ h}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{vorgegeben}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$ ). Bei IPTG-Zugabe nach 41,0 h lag eine Biomasse-Konzentration von  $21,1 \text{ g L}^{-1}$  vor (siehe Abbildung 5.15 A). Eine L-Glutamat-Bildung konnte während der Wachstumsphase nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 5.15 B). In der zweiten Prozessphase war eine maximale spezifische Produktionsrate von  $30 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bestimmbar, die nach 35,3 h Produktionszeit zu einer L-Phenylalanin-Konzentration von  $21,3 \text{ g L}^{-1}$  führte (76,3 h). Eine Nebenproduktbildung an Acetat setzte kurz vor Produktionsabbruch ein (73,3 h) und resultierte bei Prozessende (88,7 h) in einer Konzentration von  $11,7 \text{ g L}^{-1}$ . Eine geringe Laktat- ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) und L-Glutamat-Bildung ( $0,7 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde in den letzten beiden Probenahmezeitpunkten bestimmt. Eine intrazelluläre Trehalose-Anreicherung war über die gesamte Prozesszeit nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte bei einer nach 48,3 h durchgeführten Zellentnahme und Überführung mit der Methodik des schnellen Medienwechsels zur metabolischen Analyse kein Glucose-Ausfluss beobachtet werden.



**Abbildung 5.16:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor mit Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●), L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) und Glycerin- (▼) Konzentration; **B)** Laktat- (●), L-Glutamat- (L-Glut, ○) und Acetat- Konzentration (▼). Die schwarzen Sterne (\*) beschreiben den Prozesszeitpunkt, zu dem Zellsuspension zur Charakterisierung eines möglichen Glucose-Ausflusses entnommen wurde.

## Diskussion

Durch Variation der Kohlenstoffquelle (Glycerin oder Laktat) in zwei unabhängigen Kultivierungen von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> konnte ein signifikanter Einfluss der verwendeten Kohlenstoffquelle auf die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von Laktat als Kohlenstoffquelle wurde neben einem signifikant verschlechterten Prozessverhalten hinsichtlich Wachstum und L-Phenylalanin-Produktion eine deutliche Anreicherung von Trehalose über die gesamte Prozesszeit ermittelt. Durch die Verwendung von Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle konnte die Disaccharid-Speicherung und der dadurch mögliche Glucose-Ausfluss hingegen erfolgreich verhindert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Laktat, welches für die Kultivierung von Pyruvatkinase-negativen Stämmen als zusätzliche Kohlenstoffquelle verwendet wird, die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung verursacht. Eine mögliche Begründung für diese zelluläre Reaktion auf die organische Säure ist die beschriebene wachstumsinhibierende Wirkung von Laktat auf *E. coli* (Ibrahim *et al.*, 2008; Purvis *et al.*, 2005). Die Bildung des als osmotischer Schutzstoff beschriebenen Disaccharids Trehalose (Larsen *et al.*, 1987) könnte in diesem Zusammenhang als zelluläre Schutzreaktion auf die inhibierende Säure gesehen werden. Neben einer Trehalose-Anreicherung in Gegenwart von hohen Konzentrationen an anorganischen Salzen und Hexosen ist in der Literatur ebenfalls eine gesteigerte Trehalose-Anreicherung in Gegenwart der organischen Säure Pyruvat beschrieben (Purvis *et al.*, 2005). Diese in der Literatur beschriebene Reaktion der Zelle auf Pyruvat unterstützt die in dieser Arbeit bestimmten Ergebnisse für die Kohlenstoffquelle Laktat.

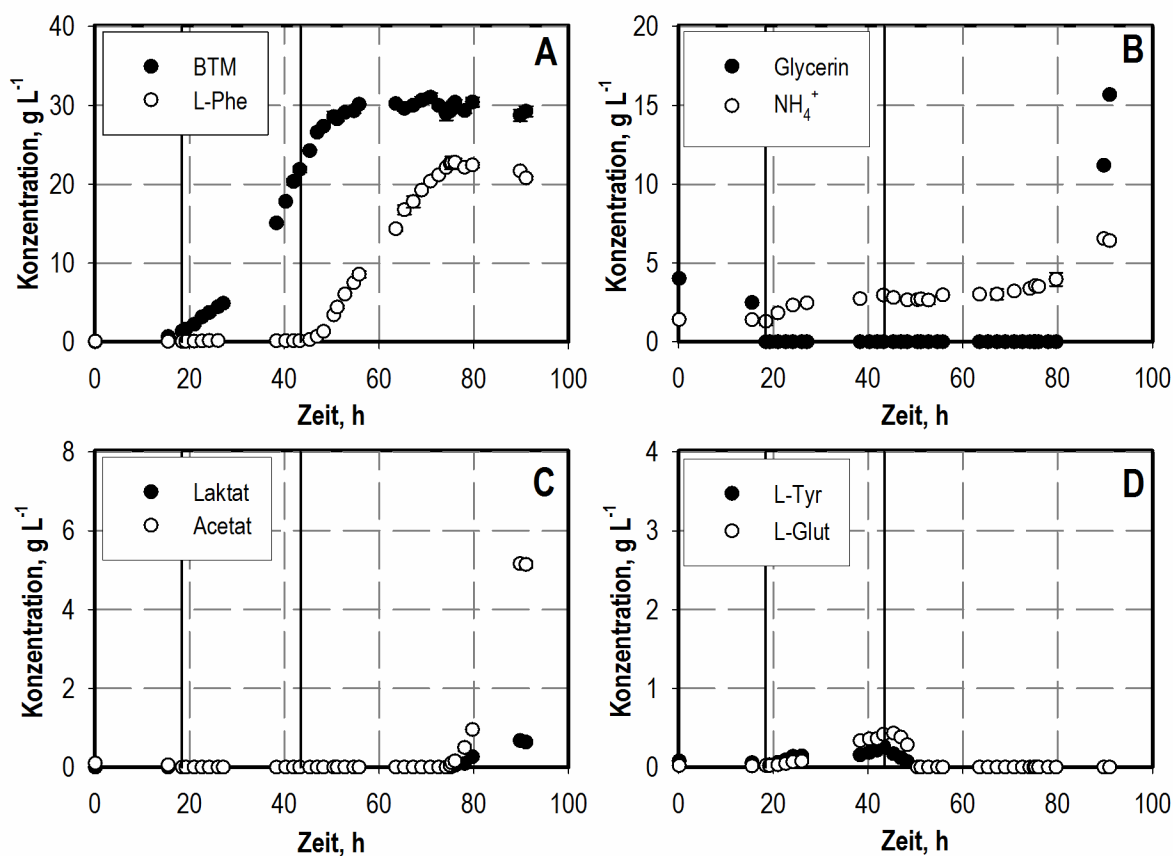
Neben der Vermeidung der intrazellulären Trehalose-Anreicherung wurde während der Kultivierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> auf der Kohlenstoffquelle Glycerin eine deutlich gesteigerte L-Phenylalanin-Bildung im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> bestimmt. Die für *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub> nachgewiesene maximale Produktkonzentration von 14,4 g L<sup>-1</sup> konnte um 48 % auf 21,3 g L<sup>-1</sup> gesteigert werden. Die maximale spezifische Produktionsrate erhöhte sich um 20 % auf 30 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Die verbesserte L-Phenylalanin-Produktion kann direkt mit dem Wegfall der Trehalose-Anreicherung in Verbindung gebracht werden. Sowohl der vermiedene Kohlenstoffabfluss in die Speicherstoffsynthese als auch der reduzierte osmotische Stress durch die fehlende inhibierende organische Säure Laktat trugen somit zur Prozessverbesserung bei.

## 5.4 L-Phenylalanin-Produktionsprozess im 15 L-Maßstab zur metabolischen Analyse\*

Durch die in Kapitel 5.2 beschriebenen reaktionstechnischen Charakterisierungen von verschiedenen L-Phenylalanin-Produktionsstämmen sowie durch die in Kapitel 5.3 beschriebenen Untersuchungen zur Speicherstoffsynthese wurde eine Vielzahl an Erkenntnissen gewonnen, die eine gezielte Optimierung des 15 L-Prozesses ermöglichten. In einem nächsten Schritt war es somit notwendig, einen rekombinanten Stamm für die weitere detaillierte metabolische Analyse auszuwählen. Hierbei machten es die beschriebenen Ergebnisse zur Charakterisierung der Plasmidstabilität (siehe Kapitel 5.2.1) und die Ergebnisse zur intrazellulären Trehalose-Anreicherung (siehe Kapitel 5.3) notwendig, den Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> zu ersetzen. Neben der verbesserten Plasmidstabilität durch Verwendung des Selektionsmarkers Kanamycin sollte die intrazelluläre Trehalose-Anreicherung durch die Verwendung von Glycerin als alleiniger Kohlenstoffquelle vermieden werden. Der Verzicht auf eine zweite Kohlenstoffquelle während der Wachstumsphase machte die Verwendung eines Stammes mit aktiver Pyruvatkinase notwendig. Mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> wurde ein rekombinanter L-Phenylalanin-Produktionsstamm gewählt, der alle genannten Anforderungen erfüllt. Im Folgenden soll detailliert auf das für den Produktionsstamm *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> ermittelte Prozessverhalten eingegangen werden.

Die zur Charakterisierung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> durchgeführte Kultivierung erfolgte im standardisierten zweiphasigen Zulaufverfahren im 15 L-Maßstab unter Verwendung von Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle. Die genaue Durchführung kann Kapitel 4.3.5 entnommen werden. Die dabei erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.17 dargestellt. Nach der initialen Satzphase erfolgte der Zulauf-Beginn bei einer Prozesszeit von 18,4 h. Wie aus Abbildung 5.17 A ersichtlich wird, konnte während der ersten Zulaufphase ein vollständig substratlimitiertes exponentielles Wachstum auf dem Substrat Glycerin realisiert werden. Die durch die Glycerin-Zufuhr vorgegebene Wachstumsrate ( $\mu_{\text{vorgegeben}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$ ) wurde mit einem Wert von  $\mu_{\text{gemessen}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$  umgesetzt. Dies resultierte in einer Biotrockenmasse-Konzentration von  $21,1 \text{ g L}^{-1}$  am Ende der ersten Prozessphase (43,2 h) (siehe Abbildung 5.17 A). Eine ausreichende Versorgung mit den Auxotrophie-Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin wurde während der Wachstumsphase zu allen Messzeitpunkten nachgewiesen. Gleichzeitig konnte durch eine optimierte Zusammensetzung der Zulaufmedien (siehe Tabelle A.12) eine überhöhte Anreicherung der beiden Aminosäuren während der Wachstumsphase vermieden und somit die inhibierende Wirkung der beiden Aminosäuren auf die Eingangsreaktion der Aminosäuresynthese (dahs) zu Beginn der Produktionsphase reduziert werden. Mit Ende der ersten Prozessphase (43,2 h) wurden  $0,27 \text{ g L}^{-1}$  L-Tyrosin und  $0,14 \text{ g L}^{-1}$  L-Phenylalanin im Kulturüberstand nachgewiesen (siehe Abbildung 5.17 A und D).

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015b): Perturbation experiments: Approaches for metabolic pathway analysis in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* DOI 10.1007/10\_2015\_326.

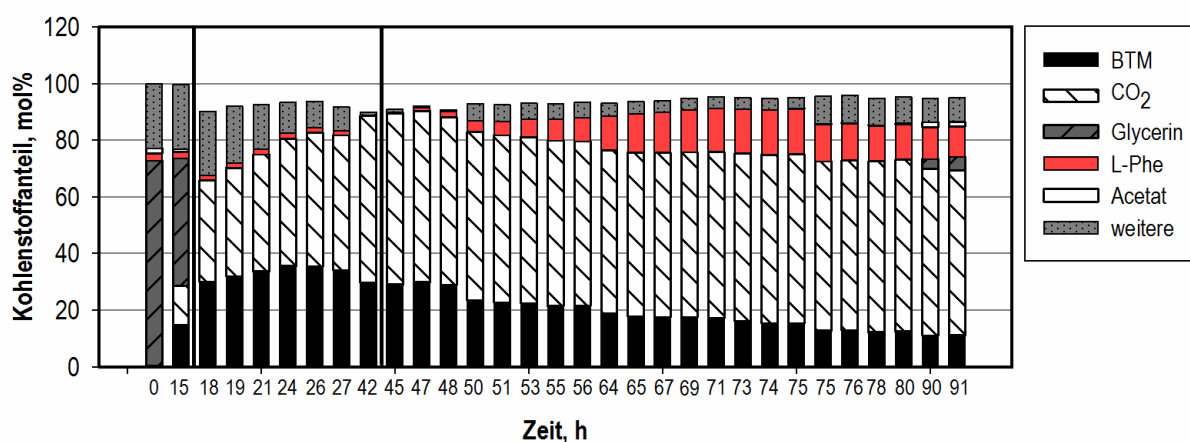


**Abbildung 5.17:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor mit Glycerin als Kohlenstoffquelle. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●) und L-Phenylalanin-Konzentration (L-Phe, ○); **B)** Glycerin- (●) und Ammonium-Konzentration (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ○); **C)** Laktat- (●) und Acetat- Konzentration (○); **D)** L-Tyrosin- (L-Tyr, ●) und L-Glutamat- Konzentration (L-Glut, ○).

Nach Induktion der Proteinexpression wurde ein Verbrauch des im Medium verbliebenen L-Tyrosins bis 48,3 h bestimmt. Die dadurch anhaltende Biomassezunahme erreichte nach 48,3 h eine Trockenmasse-Konzentration von 27,4 g L<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 5.17 A). Durch den vollständigen Verbrauch der inhibierenden Aminosäure L-Tyrosin konnte anschließend die maximale spezifische Produktionsrate erreicht werden (34 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Nach einer Produktionszeit von rund 36,8 h (76 h) war eine L-Phenylalanin-Konzentration von 22,8 g L<sup>-1</sup> im Medium nachweisbar (siehe Abbildung 5.17 A). Zu diesem Zeitpunkt lag bereits eine beginnende Nebenproduktbildung an Acetat und Laktat vor (siehe Abbildung 5.17 C). Die beiden organischen Säuren reicherten sich bis Prozessende im Kulturüberstand an (Acetat: 5,2 g L<sup>-1</sup>; Laktat: 0,7 g L<sup>-1</sup>). Neben dem mittels HPLC bestimmten qualitativen Nachweis für Laktat konnte mit einem quantitativen enzymatischen Nachweis ein Isomeren-Anteil an D-Laktat von über 99 % bestimmt werden. Eine mögliche Nebenproduktbildung der beiden

organischen Säuren Malat und Formiat wurde durch entsprechende enzymatische Nachweise überprüft. Beide Substanzen konnten nur in Spuren ( $< 0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) am Prozessende im Reaktionsansatz nachgewiesen werden. Durch die optimierte Zusammensetzung der Ammoniumsalze in den Zulaufmedien in Kombination mit dem Titrationsmittel Ammoniak wurde über die Produktionszeit eine nahezu konstante Ammonium-Konzentration im Medium von  $2,7\text{--}3,5 \text{ g L}^{-1}$  realisiert (siehe Abbildung 5.17 B). Erst mit Abbruch der Produktbildung reicherte sich die Stickstoffquelle im Medium an. Eine Substratlimitierung konnte bis kurz vor Prozessende nachgewiesen werden.

Zur genauen Bilanzierung des gesamten Prozesses diente die in Abbildung 5.18 dargestellte integrale Kohlenstoffbilanz. Diese beschreibt einerseits die vollständige analytische Erfassbarkeit des Prozesses, welche zu jedem beschriebenen Probenzeitpunkt bei  $> 90 \%$  liegt. Des Weiteren werden aus der Bilanz die entsprechenden Kohlenstoffanteile der verschiedenen Prozessphasen ersichtlich. Während der Wachstumsphase erfolgt die Umsetzung von Glycerin in Biomasse und Kohlendioxid, wohingegen in der Produktionsphase der Anteil der Biomasse am Gesamtkohlenstoff abnimmt und dafür eine Zunahme des Anteils an L-Phenylalanin deutlich wird. Ebenso ist ersichtlich, dass auch während der Produktionsphase ein großer Anteil des eingesetzten Kohlenstoffs durch Atmung verloren geht. Über die Prozesszeit von  $48,3\text{--}76,0 \text{ h}$  konnte eine substratbezogene Ausbeute von  $Y_{\text{L-Phe/ Glycerin}} = 0,20 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$  bestimmt werden. Gottlieb (2010) beschrieb eine maximale mit Glycerin theoretisch mögliche L-Phenylalanin-Ausbeute von  $Y_{\text{L-Phe/ Glycerin}} = 0,55 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$ , welche für nicht-wachsende Zellen und ohne Berücksichtigung der Energieerhaltung ermittelt wurde. Die für *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> experimentell ermittelte Ausbeute beträgt somit rund 36 % der maximal möglichen theoretischen Ausbeute mit Glycerin.



**Abbildung 5.18:** Integrale Kohlenstoffbilanz zu verschiedenen Zeitpunkten des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor mit Glycerin als Kohlenstoffquelle. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. Dargestellt: Anteil an Biotrockenmasse (BTM), Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), Glycerin, L-Phenylalanin (L-Phe), Acetat und weitere Komponenten (L-Tyrosin, Laktat, L-Glutamat, Citrat und Probenentnahme) an der Gesamtmenge an Kohlenstoff.

## Diskussion

Durch die Verwendung von *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> und der alleinigen Kohlenstoffquelle Glycerin konnten die Vorteile einer anhaltenden Plasmid-Stabilität und einer vermiedenen intrazellulären Trehalose-Anreicherung erfolgreich zur Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion genutzt werden. Im Vergleich mit dem zu Projektbeginn verwendeten Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> wurde die maximale spezifische Produktionsrate von  $13 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  um 162 % auf  $34 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erhöht. Des Weiteren lag eine um  $12,2 \text{ g L}^{-1}$  (+115 %) gesteigerte maximale Produktkonzentration von  $22,8 \text{ g L}^{-1}$  im Reaktionsansatz mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> vor. Daraus resultierend verbesserte sich die substratbezogene L-Phenylalanin-Ausbeute von  $Y_{\text{L-Phe/Glycerin}} = 0,12 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$  auf  $Y_{\text{L-Phe/Glycerin}} = 0,20 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$ .

Neben der genannten reaktionstechnischen Verbesserung ergeben sich bei Betrachtung der in Abbildung 5.17 ab 43,2 h dargestellten Produktionsphase weitere metabolisch interessante Fragestellungen. So ist unklar, warum die zum Zeitpunkt einer hohen L-Phenylalanin-Produktion experimentell ermittelte substratbezogene Produktausbeute ( $Y_{\text{L-Phe/Glycerin}} = 0,20 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$ ) im Vergleich zur theoretisch möglichen L-Phenylalanin-Ausbeute ( $Y_{\text{L-Phe/Glycerin}} = 0,55 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$ ) geringer ausfällt. Mögliche Ursachen hierfür sind dabei einerseits in der fehlenden Berücksichtigung des Energiemetabolismus bei der Berechnung des theoretischen Wertes zu sehen. Eine zuverlässige theoretische Bestimmung des Einflusses des Energiemetabolismus auf die Produktausbeute ist aufgrund

widersprüchlicher Literaturangaben (Andersen, 1980; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2010) bezüglich biologischer Kenngrößen wie dem vorliegenden P/O-Verhältnis bei der Verwendung von Glycerin nicht möglich. Andererseits wird durch die deutliche Unterschreitung der theoretischen maximalen L-Phenylalanin-Ausbeute der Einfluss von weiteren metabolisch kontrollierenden Reaktionen im Stoffwechselnetzwerk offensichtlich. Eine Identifikation dieser kontrollierenden Schritte alleine aus dem reaktionstechnisch beschreibbaren Prozessverhalten ist dabei nicht möglich und bedarf gezielter metabolischer Analysen des Stoffwechselnetzwerkes.

Ebenso wie der Zeitpunkt einer hohen L-Phenylalanin-Produktion ist auch der Zeitpunkt kurz vor Produktionsabbruch von besonderem metabolischen Interesse. Aus Abbildung 5.17 wird eine nach 75 h einsetzende Verschiebung des Metabolismus weg von der L-Phenylalanin-Produktion hin zur Nebenproduktbildung von Acetat erkennbar, bevor nach 76 h die L-Phenylalanin-Bildung vollständig abbricht. Eine zu diesem Zeitpunkt möglicherweise vorliegende vollständige Inhibierung der L-Phenylalanin-Bildung durch das Produkt kann aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden. Wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, ist das Chorismat-umsetzende Enzym (chorm, codiert durch das Gen *pheA*) des Wildtyp-*E.coli* sensitiv gegenüber der Aminosäure L-Phenylalanin. In dem hier beschriebenen rekombinanten *E. coli*-Stamm konnte diese mögliche Stoffwechsel-Schwachstelle durch das Einbringen einer rückkopplungsresistenten Enzyme-Variante (codiert durch das Gen *pheA<sup>fbr</sup>*) über das Plasmid pF81<sub>kan</sub> umgangen werden. Eine Inhibierung der chorm durch das Produkt L-Phenylalanin kann somit ausgeschlossen werden. Neben der chorm ist auch die Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges Angriffspunkt für die Rückkopplungsinhibierung durch L-Phenylalanin (siehe Kapitel 3.7.3). Die drei Isoenzyme der DAHP-Synthase werden dabei jeweils durch eines der Produkte des Aromatenbiosyntheseweges inhibiert (*aroG* codiertes Isoenzym: L-Phe sensitiv; *aroF* codiertes Isoenzym: L-Tyr sensitiv; *aroH* codiertes Isoenzym: L-Trp sensitiv). Eine inhibierende Konzentration an L-Tyrosin konnte durch die in dieser Arbeit etablierte L-Tyrosin-Zufuhrstrategie nachweislich ausgeschlossen werden. Auch L-Tryptophan konnte zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs nicht im Medium nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 50 mg L<sup>-1</sup>). Des Weiteren konnte bereits mit einem vergleichbaren rekombinanten L-Phenylalanin-Produktionsstamm (*E.coli* F-4 pF81) und der Kohlenstoffquelle Glucose gezeigt werden, dass unter Zulaufbedingungen L-Phenylalanin-Konzentrationen von über 33 g L<sup>-1</sup> erreicht werden können (Rüffer *et al.*, 2004). Erst bei diesen deutlich höheren L-Phenylalanin-Konzentrationen konnte der Produktionsabbruch nachweislich auf die Produktinhibierung zurückgeführt werden. Die in dieser Arbeit beim Produktionsabbruch vorliegenden maximalen L-Phenylalanin-Konzentrationen von 22,8 g L<sup>-1</sup> liegen somit deutlich unter den von Rüffer *et al.* (2004) beschriebenen Konzentrationen von über 33 g L<sup>-1</sup>. Da in dem Zeitraum des Produktionsabbruchs auch keine prozesstechnischen Veränderungen von außen vorgegeben werden, erfolgt die Verschiebung des Metabolismus zu



diesem Prozesszeitpunkt rein durch metabolische Kontrolle. Die Identifikation der entsprechenden regulierenden intrazellulären Reaktionen könnte somit direkt dazu beitragen, den Produktionsabbruch besser zu verstehen und Ansatzpunkte für die Verlängerung der Produktionsphase zu schaffen.

## 5.5 Vergleichende metabolische Satz-Analysen mit *E. coli* Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion\*

Durch die reaktionstechnische Charakterisierung des L-Phenylalanin-Produktionsstammes *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> konnten zwei metabolisch interessante Prozess-Zeitpunkte während der Produktionsphase im 15 L-Maßstab identifiziert werden (siehe Kapitel 5.4). Um mögliche Ursachen für die beim ersten Zeitpunkt vorliegende begrenzte substratspezifische L-Phenylalanin-Ausbeute respektive mögliche Ursachen für den Produktionsabbruch beim zweiten Zeitpunkt zu identifizieren, war eine genauere intrazelluläre Analyse der Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion notwendig. Eine solche Charakterisierung wird dabei durch gezielte metabolische Analysen (MA) ermöglicht. Diese wurden in diesem Projekt durch metabolische Kurzzeitanalysen realisiert, welche zu den entsprechenden Prozesszeitpunkten (metabolische Analyse 1, MA1 und metabolische Analyse 2, MA2) durchgeführt wurden.

Bei der Methodik der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalyse erfolgt die mehrfache gezielte Auslenkung eines im Fließgleichgewicht befindlichen Metabolismus (Referenzzustand) mit anschließender Charakterisierung der sich einstellenden neuen Fließgleichgewichte (siehe Kapitel 3.4.2). Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Zustände zu gewährleisten, müssen folgende Voraussetzungen sichergestellt werden:

- Beschreibbarkeit des Fließgleichgewichtes im Referenzzustand
- Mehrfache parallelisierte Auslenkung des Referenzzustandes und Ausbildung neuer Fließgleichgewichte
- Beschreibbarkeit der neuen Fließgleichgewichte
- Vergleichbares Proteom der Zellen über den jeweiligen Analysenzeitraum

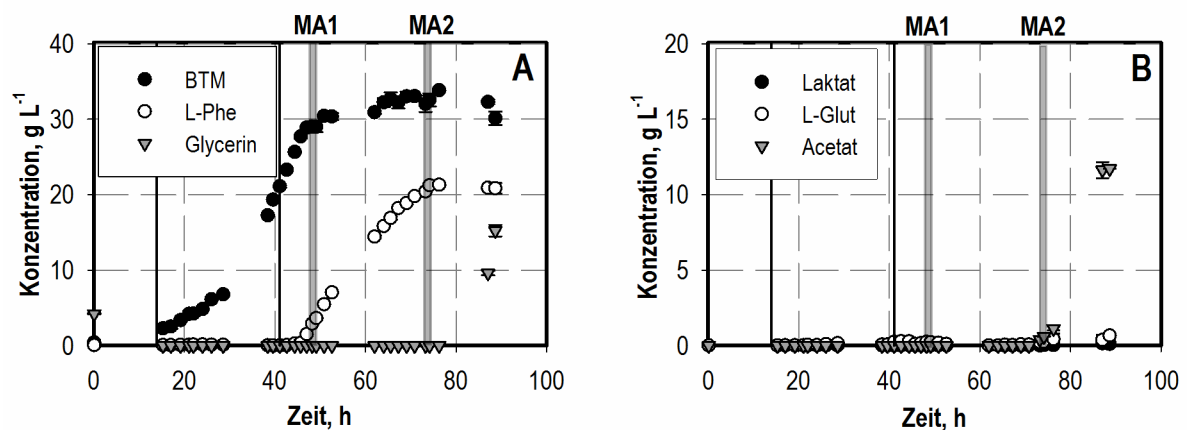
### 5.5.1 Beschreibung des Referenzzustandes

In diesem Projekt war es von Interesse, den metabolischen Zustand der Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion zu verschiedenen Prozesszeitpunkten genau zu beschreiben. Der Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Maßstab stellte den metabolischen Referenzzustand dar. Für die Durchführung von metabolischen Kurzzeitanalysen im Satzbetrieb war folglich die Durchführung einer Zulaufkultivierung im 15 L-Maßstab mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> notwendig. Die dabei erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.19 zusammengefasst. Das Prozessverhalten stimmt mit der in Kapitel 5.4 beschriebenen Kultivierung überein. Des Weiteren werden durch Abbildung 5.19 die Zeitpunkte der beiden durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen wiedergegeben. Diese

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015b): Perturbation experiments: Approaches for metabolic pathway analysis in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* DOI 10.1007/10\_2015\_326.

Zeiträume entsprechen den in Kapitel 5.4 beschriebenen metabolisch interessanten Produktionszuständen:

- Metabolische Analyse 1 (MA1): Zeitraum, bei der eine hohe L-Phenylalanin-Bildung vorliegt, aber die maximale theoretische Produktausbeute nicht erreicht wird.
- Metabolische Analyse 2 (MA2): Zeitraum einsetzender Nebenproduktbildung kurz vor Abbruch der L-Phenylalanin-Produktion.



**Abbildung 5.19:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●), L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) und Glycerin- Konzentration (▽); **B)** Laktat- (●), L-Glutamat- (L-Glut, ○) und Acetat-Konzentration (▽). Die grauen Balken beschreiben die beiden Prozesszeiträume, zu denen die metabolischen Kurzzeitanalysen (MA1 und MA2) durchgeführt wurden.

In diesem Projekt wurde die Durchführung der metabolischen Kurzzeitanalysen parallel zum laufenden Produktionsprozess realisiert (siehe Kapitel 4.4). Die Auslenkung des metabolischen Gleichgewichtes erfolgte somit nicht direkt im 15 L-Rührkesselreaktor, sondern im parallel operierenden Analysenmaßstab. Aus diesem Grund konnten die während der metabolischen Kurzzeitanalysen im Produktionsprozess gewonnenen Prozessdaten zur Beschreibung des jeweiligen Referenzzustandes verwendet werden. Die dabei ermittelten extrazellulären Raten für Substrataufnahme (Glycerin), Atmung (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), Produktbildung (L-Phe) und der zum zweiten Zeitpunkt vorliegenden Nebenproduktbildung (Acetat) sind in Tabelle 5.4 aufgeführt.

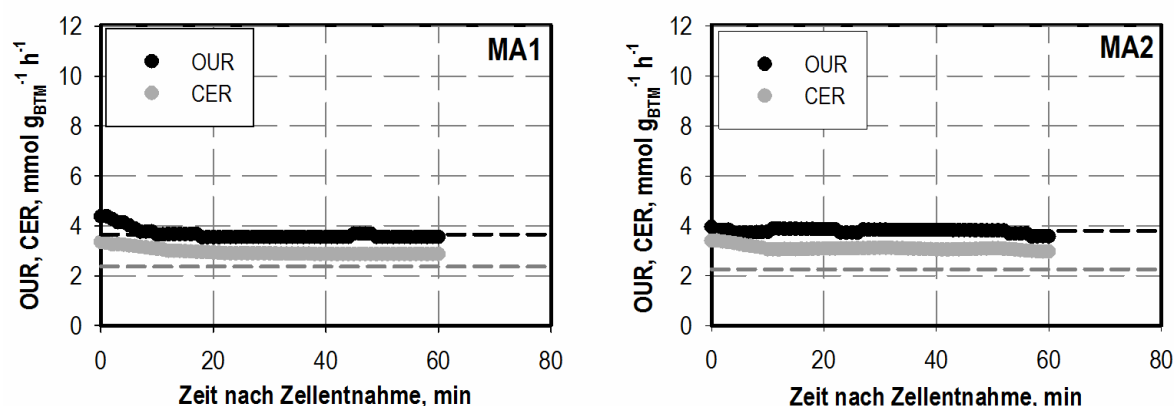
**Tabelle 5.4:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA und FVA) bestimmten zellspezifischen Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Phenylalanin-Bildung, Acetat-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum im 15 L-Produktionsprozess im Zeitraum der beiden metabolischen Kurzzeitanalysen (MA1 und MA2). Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

<b>MA1</b>	Fluss (gemessen),	Fluss (gFBA),	Min. Fluss (FVA),	Max. Fluss (FVA),
Reaktion	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Glycerin-Aufnahme	1,77 ± 0,07	1,77 (*)	1,70 (*)	1,84 (*)
L-Phe-Bildung	0,17 ± 0,00	0,17 (*)	0,17 (*)	0,17 (*)
Acetat-Bildung	-	-	-	-
O <sub>2</sub> -Aufnahme	3,65 ± 0,18	3,65 (*)	3,47 (*)	3,83 (*)
CO <sub>2</sub> -Bildung	2,97 ± 0,12	2,37	2,31	2,42
Biomassebildung	< 0,05 h <sup>-1</sup>	0,04 h <sup>-1</sup>	0,03 h <sup>-1</sup>	0,04 h <sup>-1</sup>

<b>MA2</b>	Fluss (gemessen),	Fluss (gFBA),	Min. Fluss (FVA),	Max. Fluss (FVA),
Reaktion	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mmol g <sub>BTM</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Glycerin-Aufnahme	1,49 ± 0,07	1,49 (*)	1,42 (*)	1,56 (*)
L-Phe-Bildung	0,07 ± 0,01	0,07 (*)	0,06 (*)	0,08 (*)
Acetat-Bildung	0,12 ± 0,02	0,12 (*)	0,10 (*)	0,14 (*)
O <sub>2</sub> -Aufnahme	3,82 ± 0,06	3,82 (*)	3,76 (*)	3,87 (*)
CO <sub>2</sub> -Bildung	3,12 ± 0,10	2,25	2,16	2,34
Biomassebildung	< 0,05 h <sup>-1</sup>	0,03 h <sup>-1</sup>	0,03 h <sup>-1</sup>	0,04 h <sup>-1</sup>

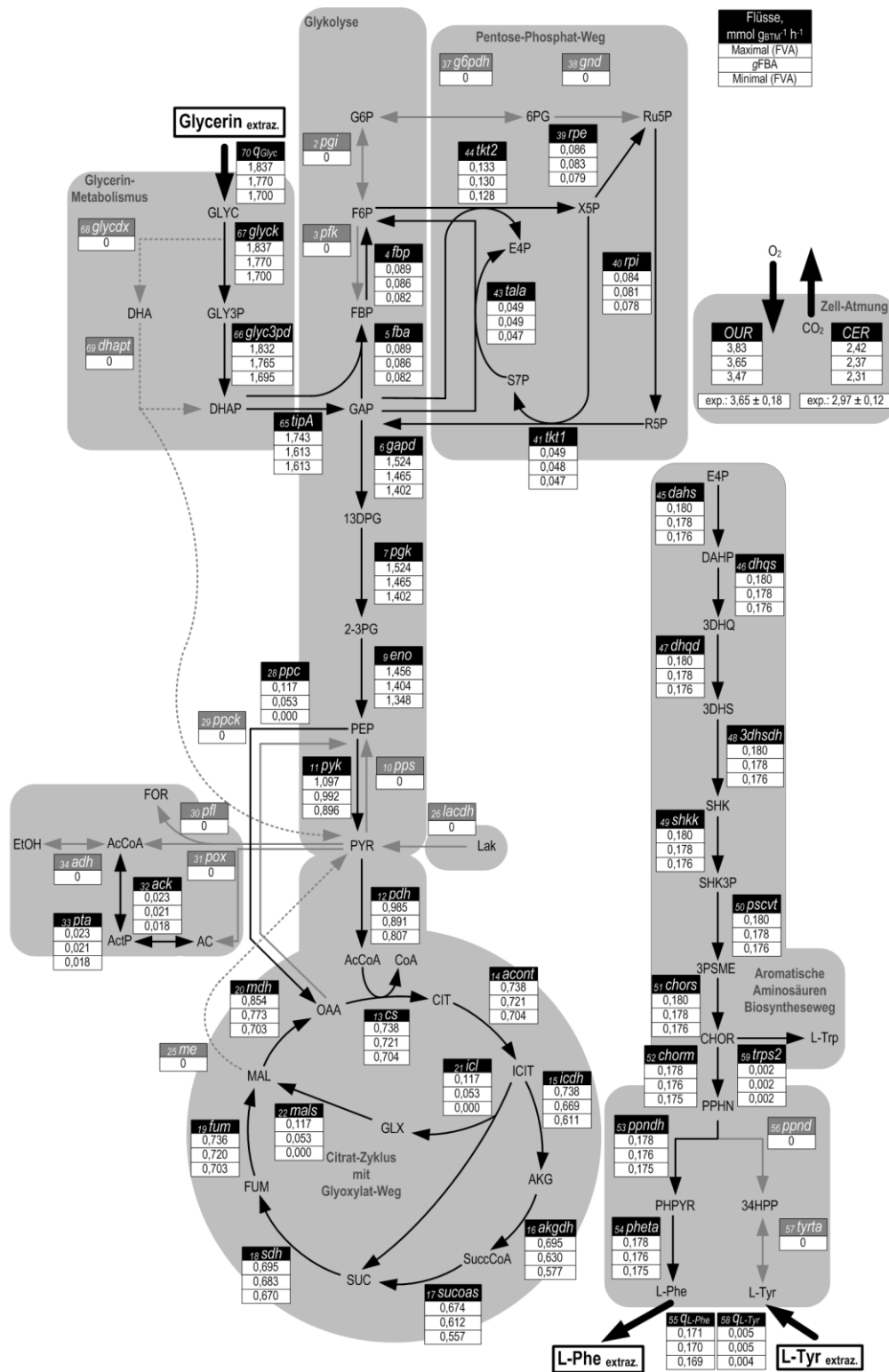
Als Nachweis für das zu den beiden Analysezeitpunkten im 15 L-Produktionsprozess vorliegende Fließgleichgewicht dienten die entsprechenden bestimmten Raten für Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildung, welche in Abbildung 5.20 dargestellt sind. Die dargestellten Verläufe der zellspezifischen Atmung im 15 L-Prozess beschreiben einen 60-minütigen Zeitraum ab Zellentnahme zur metabolischen Analyse. Nach einer initialen Abnahme der Raten, welche durch die Suspensionsentnahme verursacht wurde, lagen für die restliche Darstellungszeit konstante Werte der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildung vor. In Kombination mit der in diesem Zeitraum beschreibbaren konstanten biomassespezifischen Substrataufnahme, welche prozesstechnisch durch eine konstante Glycerin-Zufuhr realisiert wurde, beschreiben diese konstanten Atmungsraten das extrazelluläre Fließgleichgewicht des Produktionsprozesses.



**Abbildung 5.20:** Zellspezifische Sauerstoffaufnahme (OUR, ●) und Kohlendioxidbildungsrate (CER, ●) im 15 L-Produktionsprozess während des Zeitraumes der beiden metabolischen Kurzzeitanalysen (MA1 und MA2). Der X-Achsen-Ursprung entspricht der Entnahmezeit der Zellsuspension zur metabolischen Analyse. Die horizontalen unterbrochenen Linien beschreiben die mittels theoretischer Stoffflussabschätzungen (gFBA) bestimmten zellspezifischen Sauerstoffaufnahme (schwarz) und Kohlendioxidbildungsrate (grau).

Die zu beiden Analysezeitpunkten im Prozess ermittelten Gleichgewichte der extrazellulären Stoffflüsse ermöglichten eine Abschätzung der jeweils vorliegenden intrazellulären Stoffflussverteilungen. Zur Beschreibung dieser Stoffflussverteilungen wurden zwei verschiedene theoretische Berechnungsansätze angewendet. Die mittels Flussvarianz-Analyse (FVA) ermittelten Ergebnisse stellen die maximalen und minimalen Stoffflussgrenzen des abbildbaren Lösungsraumes dar. Hingegen beschreibt das Ergebnis der geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA) die zentrierte Lösung eines Stoffflussraumes unter Minimierung des benötigten Proteoms. Grundlage für die durchgeführten Berechnungen stellte das genomweite *E. coli*-Modell iAF1260 (Feist *et al.*, 2007) dar. Die durchgeführten Anpassungen des genomweiten Modells an den vorliegenden Produktionsstamm *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> sowie weitere Annahmen sind in Kapitel 4.9.1 beschrieben. Eine Aktivität der Malat-Enzyme konnte durch die in Kapitel 5.2.2 beschriebenen Ergebnisse ausgeschlossen werden, was eine weitere Modellbeschränkung ermöglichte. Die für die Stoffflussberechnungen vorgegebenen experimentell bestimmten extrazellulären Raten sind in Tabelle 5.4 aufgeführt.

Ein Ausschnitt der aus der genomweiten Berechnung resultierenden intrazellulären Stoffflussverteilung zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion ist in Abbildung 5.21 dargestellt.

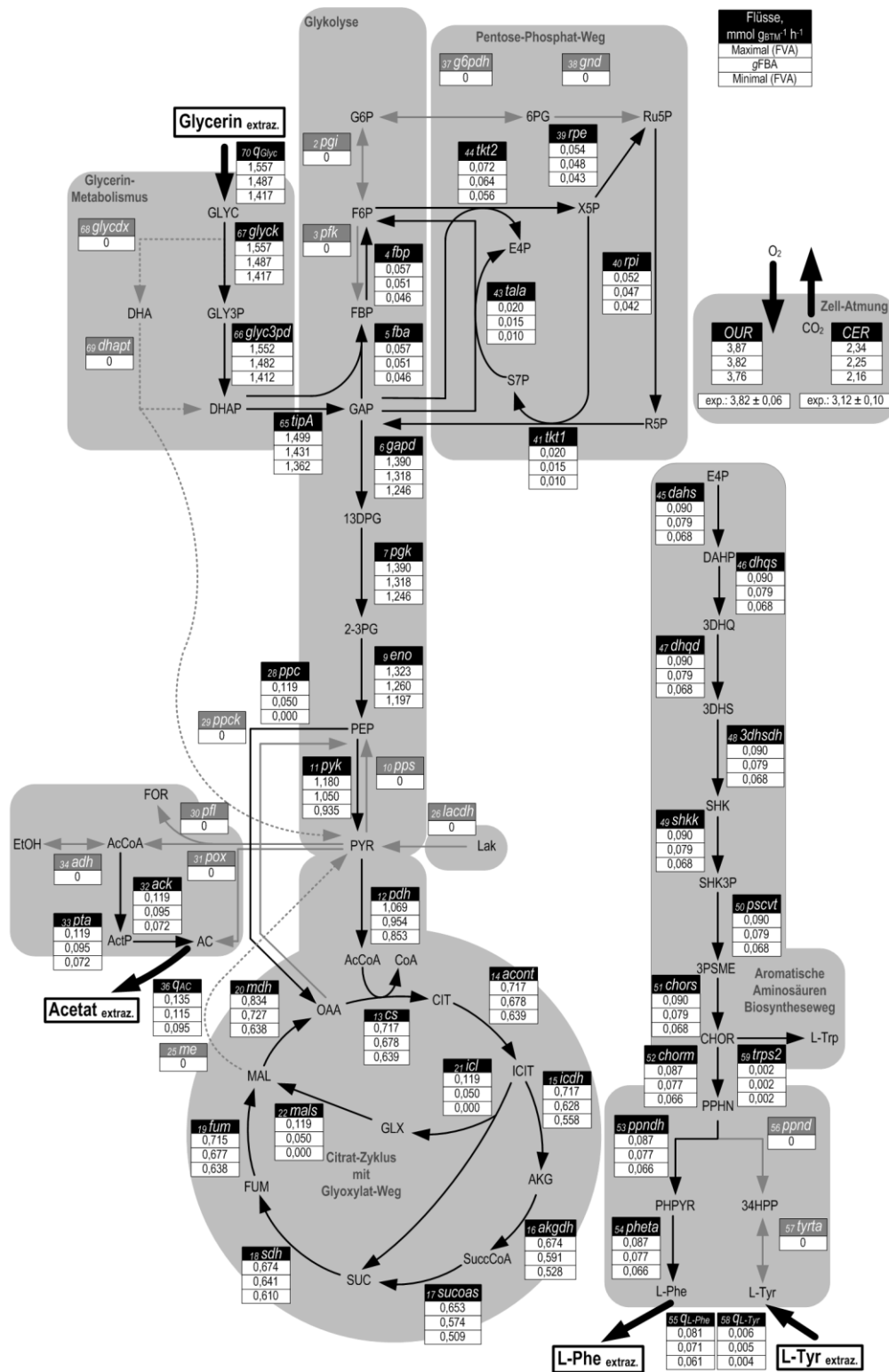


**Abbildung 5.21:** Intrazelluläre Stoffflussverteilung im 15 L-Produktionsprozess zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (MA1), ermittelt durch Flussvarianz-Analyse (FVA) und geometrische Flussbilanz-Analyse (gFBA) des genomweiten Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die Pfeilrichtung definiert die Reaktionsrichtung. Die eingerahmten Zahlen beschreiben den Betrag des ermittelten Flusses (mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Obere Zahl: Oberstes Limit der FVA-Lösung; Mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; Untere Zahl: Unterstes Limit der FVA-Lösung. Für die Zell-Atmung sind zusätzlich die experimentell bestimmten Raten (exp.) aufgeführt. Inaktive Reaktionen sind durch grau hinterlegte Reaktionsnamen und Pfeile beschrieben. Vorgaben: Glycerin-Aufnahme; L-Phenylalanin-Bildung; Sauerstoffaufnahme.

Aus Abbildung 5.21 wird ein Kohlenstofffluss ausgehend von Glycerin und dem Glycerin-Metabolismus (glyck und glyc3pd) in die Glykolyse ersichtlich. Im Folgenden beschreiben beide Berechnungsansätze für den Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion eine vergleichbare Aufteilung der Kohlenstoffflüsse ausgehend von Glyceraldehyd-3-Phosphat (GAP) in gluconeogenetische Reaktionen hin zu Fructose-6-Phosphat (F6P) und glycolytische Reaktionen hin zu Phosphoenolpyruvat (PEP). PEP-verbrauchende Reaktionen werden durch die Pyruvatkinase (pyk), die PEP-Carboxylase (ppc) und durch zwei Enzyme des Aromatenbiosyntheseweges (dahs und pscvt) katalysiert. Abhängig vom Berechnungsansatz gehen 38–43 % des Glycerin-Eingangsfusses in den Citrat-Zyklus über. Der Glyoxalat-Weg ist in beiden Berechnungsansätzen mit geringen Stoffflüssen versehen, die bei der Varianz-Analyse eine hohe Unsicherheit aufzeigen. Die Versorgung des Pentose-Phosphat-Weges erfolgt über GAP und F6P. Insgesamt gehen rund 9–11 % des eingebrachten Glycerins in den Pentose-Phosphat-Stoffwechsel über. Eine Bildung von Glucose-6-phosphat sowie Stoffflüsse im oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges wurden bei beiden Berechnungsansätzen nicht bestimmt. Diese Erkenntnis stimmt mit bereits in der Literatur geführten Ergebnissen überein. Auch Jung Oh *et al.* (2008) beschreiben bei ihren theoretischen Stoffflussabschätzungen zur Shikimat-Produktion mit *E. coli* auf der Kohlenstoffquelle Glycerin eine Inaktivität des oxidativen Teils des Pentose-Phosphat-Weges. Experimentell geführte Nachweise, wie zum Beispiel <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente, liegen für die Kohlenstoffquelle Glycerin nicht vor.

Die Versorgung des Aromatenbiosyntheseweges mit Erythrose-4-Phosphat (E4P) erfolgt zu rund 76 % über die Transketolase (tkt2). Im Aromatenbiosyntheseweg wurde mit beiden Berechnungsansätzen ein nahezu linearer Stofffluss zum Produkt L-Phenylalanin bestimmt. Ein Verlust an Kohlenstoff ergibt sich in diesem Stoffwechselweg lediglich durch die zur Biomassebildung notwendige Aminosäure L-Tryptophan. Zur Validierung dieser theoretisch bestimmten Stoffflussverteilung erfolgt in Abbildung 5.20 ein Vergleich der experimentell bestimmten biomassespezifischen Kohlendioxidbildungsraten mit den durch theoretische Stoffflussabschätzung berechneten Werten (siehe auch Tabelle 5.4). Hierbei wird eine gute Übereinstimmung der theoretischen Werte mit den experimentell ermittelten Daten ersichtlich (Abweichung ca. 20 %).

Neben der Berechnung der intrazellulären Stoffflussverteilung zum Zeitpunkt einer hohen L-Phenylalanin-Produktion (MA1) erfolgte ebenfalls eine Abschätzung der Stoffflüsse kurz vor Produktionsabbruch (MA2). Ein Ausschnitt der aus der Berechnung resultierenden genomweiten intrazellulären Stoffflussverteilung des Produktionsprozesses ist in Abbildung 5.22 dargestellt.

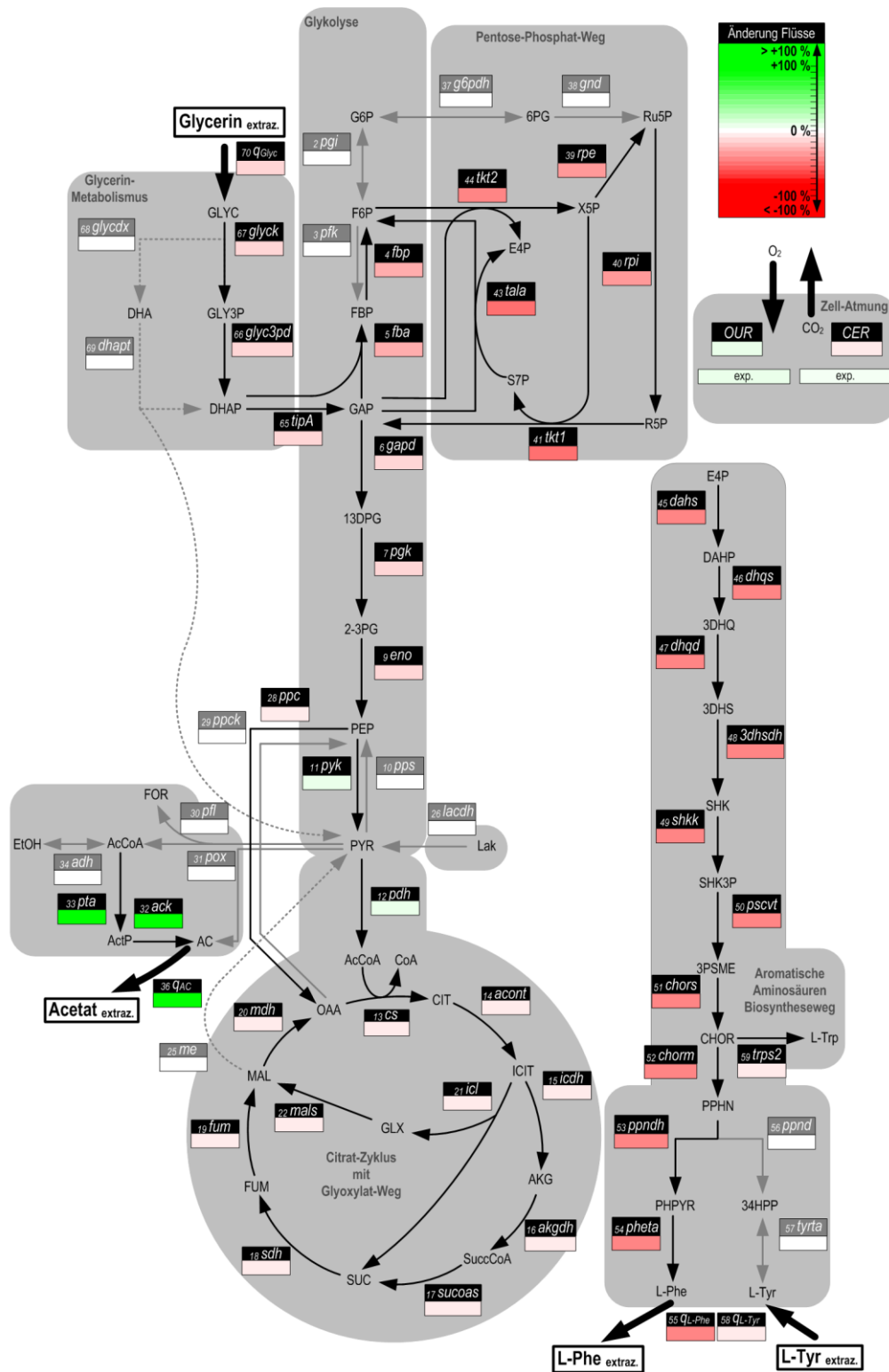


**Abbildung 5.22:** Intrazelluläre Stoffflussverteilung im 15 L-Produktionsprozess zum Zeitpunkt kurz vor Produktionsabbruch (MA2), ermittelt durch Flussvarianz-Analyse (FVA) und geometrische Flussbilanz-Analyse (gFBA) des genomweiten Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die Pfeilrichtung definiert die Reaktionsrichtung. Die eingerahmten Zahlen beschreiben den Betrag des ermittelten Flusses (mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Obere Zahl: Oberstes Limit der FVA-Lösung; Mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; Untere Zahl: Unterstes Limit der FVA-Lösung. Für die Zell-Atmung sind zusätzlich die experimentell bestimmten Raten (exp.) aufgeführt. Inaktive Reaktionen sind durch grau hinterlegte Reaktionsnamen und Pfeile beschrieben. Vorgaben: Glycerin-Aufnahme; L-Phenylalanin-Bildung; Acetat-Bildung, Sauerstoffaufnahme.



Mit beiden Berechnungsansätzen wurde eine mit dem Zeitpunkt hoher Produktivität vergleichbare Stoffflussverteilung erzielt (siehe Abbildung 5.22). Eine Inaktivierung/Aktivierung von zuvor in-/aktiven Reaktionen konnte für den zweiten Analysezeitpunkt nicht bestimmt werden. Einzige Ausnahme stellt der aktive Acetat-Metabolismus dar, welcher durch die zu diesem Zeitpunkt im Prozess nachgewiesene und bei der Berechnung vorgegebene Nebenproduktbildung ( $0,12 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) begründet ist. Neben diesen qualitativen Ähnlichkeiten der beiden Stoffflussverteilungen ergaben sich beim direkten Vergleich der beiden Datensätze signifikante quantitative Unterschiede. Diese sind durch die Darstellung der relativen prozentualen Änderungen der intrazellulären Stoffflüsse (Daten der geometrischen Fluss-Bilanzanalyse) in Abbildung 5.23 beschrieben. Der Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion stellt dabei den Bezugswert dar.

Bei konstanter volumetrischer Glycerin-Zufuhr während der Produktionsphase wurde bei gleichzeitiger Zunahme der Biomasse-Konzentration eine leicht verringerte spezifische Glycerin-Aufnahme (-16 %) zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches bestimmt. Diese wird in Abbildung 5.23 durch die reduzierten Stoffflüsse im Glycerin-Metabolismus (-16 %) und den leicht verringerten Kohlenstoff-Umsatz im Citrat-Zyklus (-6 %) ersichtlich. Größere relative Änderungen konnten hingegen für die gluconeogenetischen Reaktionen der Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp) und Fructosebisphosphat-Aldolase (fba) bestimmt werden (-40 %). Die Verringerung dieser Reaktionen beschreibt eine deutlich verschlechterte Bereitstellung an F6P für den Pentose-Phosphat-Phosphat-Weg. Hieraus resultierend konnte in diesem Stoffwechselweg ein Rückgang der Stoffflüsse von bis zu 68 % bestimmt werden. Die verringerte Bereitstellung des Pentose-Phosphat-Intermediats E4P und die bei den theoretischen Berechnungen vorgegebene um 58 % reduzierte L-Phenylalanin-Bildung beschreiben den Rückgang der Stoffflüsse im Aromatebiosyntheseweg (-56 %). Neben dieser deutlichen Reduzierung der Stoffflüsse hin zum Produkt L-Phenylalanin wird durch Abbildung 5.23 die signifikante Steigerung der Stoffflüsse ausgehend von AcetylCoA hin zum Nebenprodukt Acetat ersichtlich ( $> +300 \%$ ). Gleichzeitig erfolgte eine um 7 % verstärkte Bereitstellung an AcetylCoA.



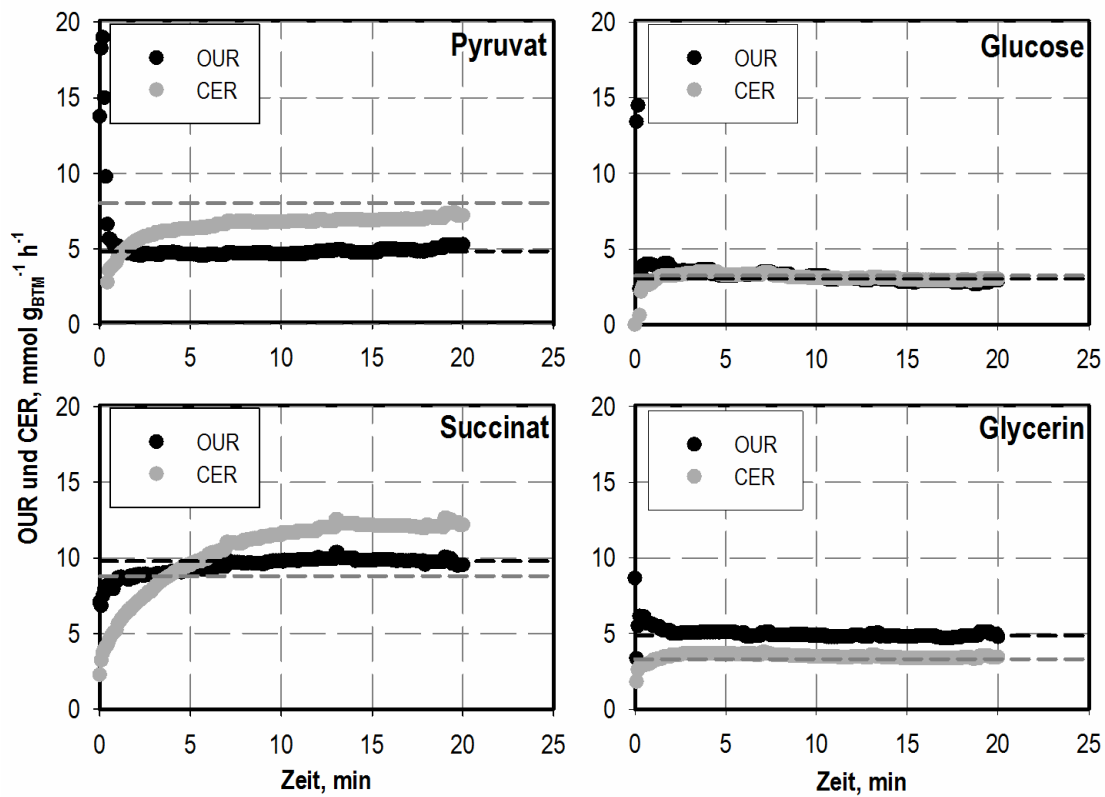
**Abbildung 5.23:** Prozentuale Änderung der theoretischen intrazellulären Stoffflussverteilung (Daten der geometrische Flussbilanz-Analyse, Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007)) im 15 L-Produktionsprozess zum Zeitpunkt kurz vor Produktionsabbruch (MA2) bezogen auf den Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (MA1). Verstärkte Stoffflüsse zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches werden durch grüne Farbskalierungen beschrieben. Reduzierte Stoffflüsse werden durch rote Farbskalierungen dargestellt. Die Pfeilrichtung definiert die Reaktionsrichtung. Für die Zell-Atmung sind zusätzlich die Änderungen der experimentell bestimmten Raten (exp.) aufgeführt. Inaktive Reaktionen sind durch grau hinterlegte Reaktionsnamen und Pfeile beschrieben.

### 5.5.2 Kurzzeitanalysen im Satzverfahren

Um zu den beiden interessanten Prozesszeitpunkten (MA 1 und MA 2) jeweils eine mehrfache Auslenkung des im Produktionsprozess vorliegenden metabolischen Gleichgewichtes zu erzielen, wurde in diesem Projekt die Methodik der metabolischen Kurzzeitanalysen genutzt. Hierzu wurde Biomasse zu den beiden Zeitpunkten aus dem laufenden Prozess entnommen und mit der Methode des schnellen Medienwechsels (Link *et al.*, 2010) in ein Analysensystem im 0,5 L-Maßstab überführt. Die gezielte Auslenkung des Stoffwechsels erfolgte dort durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Pyruvat, Glucose, Succinat und Glycerin), welche im Analysenreaktor vorgelegt wurden. Um eine Vergleichbarkeit des zellulären Proteoms bei den unterschiedlichen Auslenkungen gewährleisten zu können, wurden diese vier Kurzzeitanalysen parallelisiert durchgeführt.

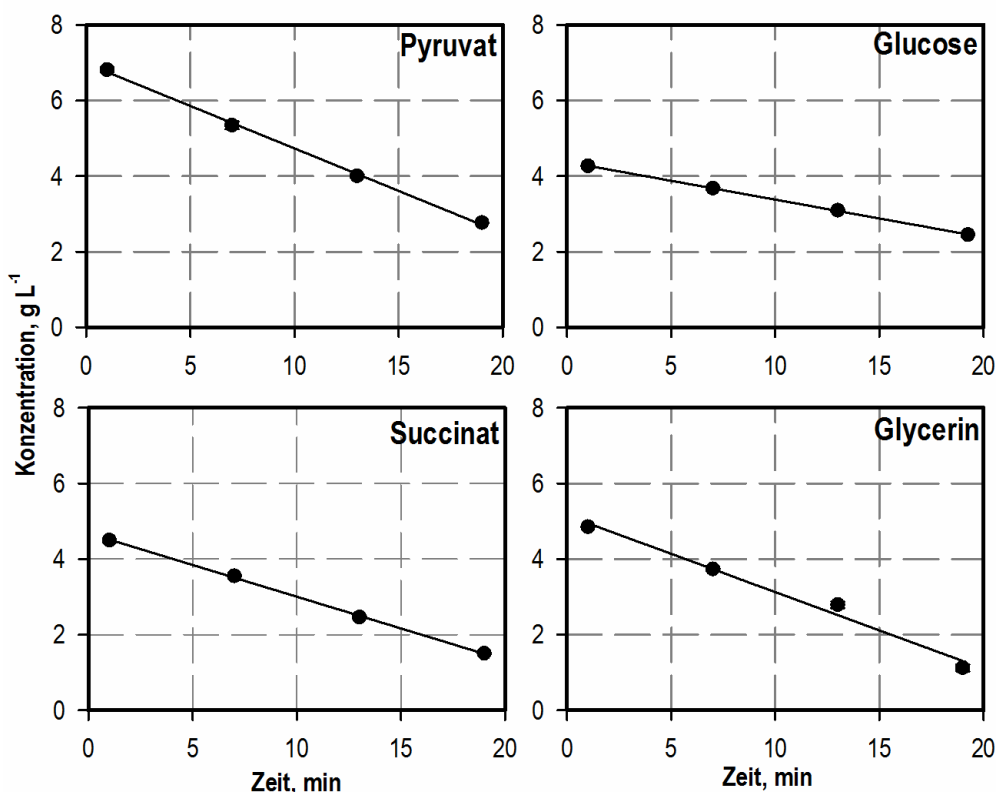
Die Reaktion der Zellen auf die vier Substrate wurde durch Quantifizierung der extrazellulären Stoffflüsse über eine Analysenzeit von rund 20 Minuten charakterisiert. In Abbildung 5.24 sind die während der vier Kurzzeitanalysen des ersten Prozesszeitpunktes (MA 1) bestimmten biomassespezifischen Atmungsraten für Sauerstoffaufnahme (OUR) und Kohlendioxidbildung (CER) dargestellt.

Innerhalb weniger Minuten nach Zellzugabe nehmen die Verläufe für OUR und CER in allen Reaktionsansätzen konstante Werte an. Dieses Gleichgewicht wurde für Kohlendioxid im Vergleich zu Sauerstoff bei hoher Rate (siehe Succinat) verzögert nachgewiesen. Ursache hierfür ist die im Vergleich zu Sauerstoff erhöhte Löslichkeit von Kohlendioxid im Kulturmedium (Gros *et al.*, 1999). Anhand der Verläufe der biomassespezifischen Sauerstoffaufnahme wird die vollständige Ausbildung der jeweiligen neuen Fließgleichgewichte innerhalb einer Analysendauer von rund fünf Minuten ersichtlich. Die ab diesem Zeitpunkt vorliegenden gemittelten Raten beschreiben die vorliegenden Gleichgewichtsflüsse für Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildung.



**Abbildung 5.24:** Biomassespezifische Sauerstoffaufnahme (OUR, ●) und Kohlendioxidbildungsrate (CER, ●) in den vier im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat, Glucose, Succinat und Glycerin zum ersten Prozesszeitpunkt (MA1). Der X-Achsen-Ursprung entspricht dem Überführungszeitpunkt der Zellsuspension in den Analysenmaßstab. Die horizontalen unterbrochenen Linien beschreiben die mittels theoretischer Stoffflussabschätzungen (gFBA) bestimmte biomassespezifische Sauerstoffaufnahme (schwarz) und Kohlendioxidbildungsrate (grau).

Die während der Kurzzeitanalysen des ersten Prozesszeitpunktes (MA1) in den vier Reaktionsansätzen bestimmten Verläufe der eingesetzten Substratkonzentrationen sind in Abbildung 5.25 dargestellt.



**Abbildung 5.25:** Substratkonzentrationen während der vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat, Glucose, Succinat und Glycerin zum ersten Prozesszeitpunkt (MA1). Die schwarze Linie beschreibt die jeweils ermittelte lineare Regression.

Abbildung 5.25 zeigt einen direkt nach Überführung der Biomasse in den Analysenmaßstab einsetzenden Verbrauch der verschiedenen Kohlenstoffquellen. Für alle Reaktionsansätze konnte in der dargestellten Analysenzeit von rund 19 Minuten eine konstante Abnahme der Substratkonzentration nachgewiesen werden. Durch die in Abbildung 5.25 dargestellte lineare Regression erfolgte eine Abschätzung der über den Analysenzeitraum vorliegenden biomassespezifischen Aufnahme rate. Neben der Substrataufnahme wurde in jedem Analysenreaktor die entsprechende L-Phenylalanin-Bildung und, falls nachweisbar, eine substratspezifische Nebenproduktbildung quantifiziert. Bei Verwendung der Kohlenstoffquellen Pyruvat und Glycerin wurde eine Acetatbildung bestimmt. Neben Acetat war eine Laktatbildung im Reaktionsansatz mit Glycerin nachweisbar. Für die Kohlenstoffquelle Succinat lag eine Bildung der organischen Säuren Pyruvat und Malat vor. Für die Kohlenstoffquelle Glucose wurden keine Nebenprodukte nachgewiesen. Tabelle 5.5 fasst die zu beiden Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2) in den jeweils vier metabolischen Kurzzeitanalysen erfassten extrazellulären biomassespezifischen Raten zusammen.

**Tabelle 5.5:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA und FVA) bestimmten zellspezifischen Raten für Substrat-Aufnahme, Produkt-Bildung, Nebenprodukt-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum während der vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2). Einheit:  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ). Als Substrate wurden dabei Pyruvat, Glucose, Succinat oder Glycerin eingesetzt. Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

Pyruvat	MA1			MA2		
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)
Substrat	$5,14 \pm 0,07$	$5,14^{(*)}$	$5,07\text{--}5,20^{(*)}$	$4,15 \pm 0,01$	$4,15^{(*)}$	$4,14\text{--}4,16^{(*)}$
L-Phe	$0,06 \pm 0,00$	$0,06^{(*)}$	$0,06\text{--}0,06^{(*)}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$	$0,00\text{--}0,00^{(*)}$
Acetat	$0,98 \pm 0,01$	$0,98^{(*)}$	$0,96\text{--}0,99^{(*)}$	$2,10 \pm 0,01$	$2,10^{(*)}$	$2,09\text{--}2,11^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$4,86 \pm 0,19$	$4,86^{(*)}$	$4,67\text{--}5,04^{(*)}$	$4,54 \pm 0,39$	$4,54^{(*)}$	$4,15\text{--}4,93^{(*)}$
CO <sub>2</sub>	$6,91 \pm 0,17$	8,04	7,90–8,18	$6,01 \pm 0,49$	5,65	5,63–5,67
Biomasse	< 0,05	0,11	0,10–0,11	< 0,05	0,07	0,07–0,07

Glucose	MA1			MA2		
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)
Substrat	$1,03 \pm 0,01$	$1,03^{(*)}$	$1,02\text{--}1,04^{(*)}$	$1,59 \pm 0,01$	$1,59^{(*)}$	$1,58\text{--}1,59^{(*)}$
L-Phe	$0,14 \pm 0,00$	$0,14^{(*)}$	$0,14\text{--}0,14^{(*)}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$	$0,00\text{--}0,00^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$3,03 \pm 0,20$	$3,03^{(*)}$	$2,83\text{--}3,23^{(*)}$	$2,71 \pm 0,12$	$2,71^{(*)}$	$2,60\text{--}2,83^{(*)}$
CO <sub>2</sub>	$3,08 \pm 0,13$	3,23	3,04–3,25	$2,96 \pm 0,09$	2,85	$2,67\text{--}2,98^{(*)}$
Biomasse	< 0,05	0,04	0,04–0,04	< 0,05	0,07	0,07–0,07

Succinat	MA1			MA2		
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)
Substrat	$3,25 \pm 0,03$	$3,25^{(*)}$	$3,22\text{--}3,28^{(*)}$	$2,62 \pm 0,02$	$2,62^{(*)}$	$1,70\text{--}1,70^{(*)}$
L-Phe	$0,21 \pm 0,00$	$0,21^{(*)}$	$0,20\text{--}0,21^{(*)}$	$0,11 \pm 0,00$	$0,11^{(*)}$	$0,11\text{--}0,11^{(*)}$
Malat	$0,07 \pm 0,00$	$0,07^{(*)}$	$0,07\text{--}0,07^{(*)}$	$0,39 \pm 0,00$	$0,39^{(*)}$	$0,38\text{--}0,39^{(*)}$
Pyruvat	$0,30 \pm 0,00$	$0,30^{(*)}$	$0,30\text{--}0,30^{(*)}$	$0,19 \pm 0,00$	$0,19^{(*)}$	$0,19\text{--}0,19^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$9,79 \pm 0,17$	$9,79^{(*)}$	$9,62\text{--}9,96^{(*)}$	$7,04 \pm 0,43$	$7,04^{(*)}$	$6,61\text{--}7,48^{(*)}$
CO <sub>2</sub>	$11,79 \pm 0,55$	8,81	6,90–7,03	$8,00 \pm 1,03$	6,23	5,30–5,37
Biomasse	< 0,05	0,03	0,07–0,08	< 0,05	0,03	0,05–0,05

Fortsetzung **Tabelle 5.5:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA und FVA) bestimmten zellspezifischen Raten für Substrat-Aufnahme, Produkt-Bildung, Nebenprodukt-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum während der vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2). Einheit:  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ). Als Substrat wurden dabei Pyruvat, Glucose, Succinat oder Glycerin eingesetzt. Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

Glycerin	MA1			MA2		
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (FVA)
Substrat	$4,57 \pm 0,02$	$4,57$ (*)	$4,55\text{--}4,59$ (*)	$3,51 \pm 0,01$	$3,51$ (*)	$3,51\text{--}3,52$ (*)
L-Phe	$0,00 \pm 0,00$	$0,00$ (*)	$0,00\text{--}0,00$ (*)	$0,00 \pm 0,00$	$0,00$ (*)	$0,00\text{--}0,00$ (*)
Acetat	$1,20 \pm 0,01$	$1,20$ (*)	$1,20\text{--}1,21$ (*)	$0,62 \pm 0,00$	$0,62$ (*)	$0,62\text{--}0,62$ (*)
Laktat	$1,01 \pm 0,00$	$1,01$ (*)	$1,01\text{--}1,01$ (*)	$0,86 \pm 0,00$	$0,86$ (*)	$0,86\text{--}0,86$ (*)
O <sub>2</sub>	$4,86 \pm 0,10$	$4,86$ (*)	$4,76\text{--}4,96$ (*)	$4,93 \pm 0,13$	$4,93$ (*)	$4,81\text{--}5,06$ (*)
CO <sub>2</sub>	$3,47 \pm 0,10$	$3,30$ (*)	$2,40\text{--}2,46$	$3,83 \pm 0,07$	$3,80$ (*)	$2,37\text{--}2,38$
Biomasse	$< 0,05$	$0,13$	$0,10\text{--}0,11$	$< 0,05$	$0,07$	$0,11\text{--}0,11$

Ein grafischer Vergleich der zu beiden Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2) in den einzelnen Analysenansätzen erzielbaren extrazellulären Raten ist des Weiteren in Abbildung 5.26 dargestellt.

Beim in Abbildung 5.26 dargestellten Vergleich der beiden Analysezeitpunkte (MA1 und MA2) für die Kohlenstoffquelle Pyruvat wird eine verringerte metabolische Aktivität der Zellen zum zweiten Zeitpunkt ersichtlich. Hierbei wurde eine um 20 % reduzierte spezifische Substrataufnahme bestimmt. Der im Vergleich zur Substrataufnahme verringerte Rückgang der spezifischen Raten für Sauerstoff (-13 %) und Kohlendioxid (-7 %) beschreibt hingegen eine verstärkte Nutzung des Kohlenstoffes für die Atmung. Eine Produkt-Bildung konnte zum zweiten Analysezeitpunkt (MA2) nicht nachgewiesen werden. Die bereits bei der ersten Analyse aufgetretene Nebenprodukt-Bildung an Acetat verstärkte sich während der zweiten Analyse (+115 %). Durch die Kurzzeitanalysen auf der Kohlenstoffquelle Pyruvat konnte somit analog zum Produktionsprozess eine deutliche Verschiebung des Zellstoffwechsels weg von der L-Phenylalanin-Produktion hin zu einer verstärkten Nebenprodukt-Bildung beschrieben werden.

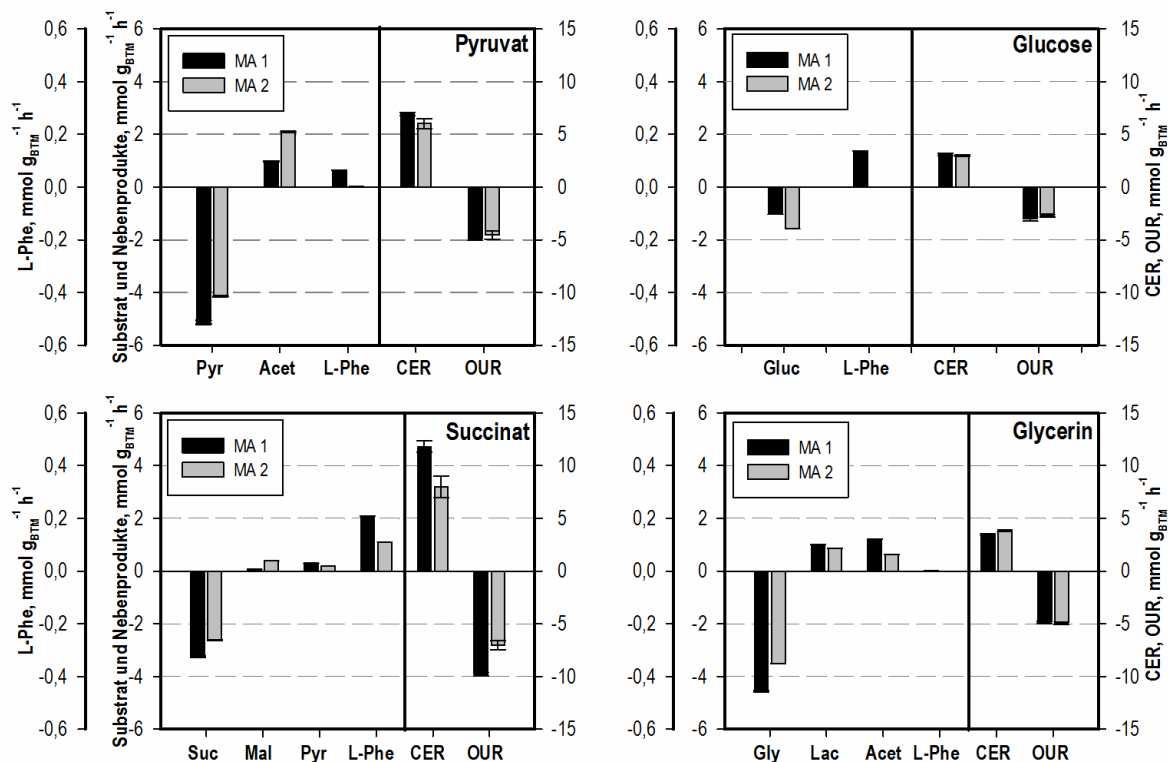
Zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion konnte mit Glucose als Kohlenstoffquelle während der im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Analyse eine L-Phenylalanin-Bildung von  $0,14 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  nachgewiesen werden. Die in der Literatur für Glucose beschriebenen maximalen spezifischen L-Phenylalanin-Bildungsraten beschreiben Werte von  $0,25\text{--}0,33 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Oldiges 2004; Rüffer *et al.* 2004). Eine mögliche Ursache für die im Vergleich zur Literatur verringerte Produktbildung mit Glucose als Kohlenstoffquelle ist im Proteom der Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin als Substrat zu sehen. Aufgrund der diffusiven Aufnahme von Glycerin und der Verstoffwechslung über den

Glycerin-Metabolismus kann für die Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin nicht von einer optimalen Bereitstellung von Aufnahmesystemen und Enzymen des Glucose-Stoffwechsels ausgegangen werden. Dies wird ebenfalls durch eine nachgewiesene geringe Glucose-Aufnahmerate von  $1,03 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ersichtlich. Der nicht für das Substrat Glucose optimierte Zellstoffwechsel kann somit zu der im Vergleich zur Literatur verringerten L-Phenylalanin-Bildung bei Einsatz von Glucose als Kohlenstoffquelle während der metabolischen Analysen führen. Für den zweiten Analysezeitpunkt (MA2) wurde eine verstärkte Substrataufnahme der Zellen bestimmt (+55 %). Dabei konnte die höhere Glucose-Aufnahme nicht in die Bildung von L-Phenylalanin umgesetzt werden. Bei leicht verringerten Atmungsraten ( $\text{O}_2$ : -11 %,  $\text{CO}_2$ : -4 %) während der zweiten metabolischen Analyse wurde ebenfalls keine Nebenprodukt-Bildung nachgewiesen.

Bei der Verwendung von Succinat als Kohlenstoffquelle wurde in den metabolischen Kurzzeitanalysen eine deutlich verringerte Aktivität der Zellen zum zweiten Analysezeitpunkt nachgewiesen. Neben einer reduzierten Substrataufnahme (-20 %), war auch die Atmung deutlich reduziert ( $\text{O}_2$ : -28 %,  $\text{CO}_2$ : -32 %). Eine um 48 % verringerte Produkt-Bildung war zum zweiten Analysezeitpunkt messbar. Während beider Analysen wurde eine Nebenprodukt-Bildung an Malat und Pyruvat bestimmt.

Auch für die im 15 L-Prozess verwendete Kohlenstoffquelle Glycerin konnte in den metabolischen Kurzzeitanalysen eine verringerte Substrataufnahme zum zweiten Analysezeitpunkt (MA2) nachgewiesen werden (-23 %). Im Gegensatz dazu lag in der zweiten Satzanalyse (MA 2) eine im Vergleich zur ersten Analyse (MA1) erhöhte Sauerstoffaufnahme (+1 %) und Kohlendioxidbildung (+11 %) vor, was abermals die Verschiebung des Stoffwechsels in der Zeit zwischen den beiden metabolischen Analysen verdeutlicht. Eine L-Phenylalanin-Bildung konnte während beider Analysen aus nicht geklärten Gründen nicht nachgewiesen werden. Wie auch beim späteren Produktionsabbruch im 15 L-Maßstab wurde in beiden Analysen eine Nebenproduktbildung an Laktat und Acetat bestimmt.



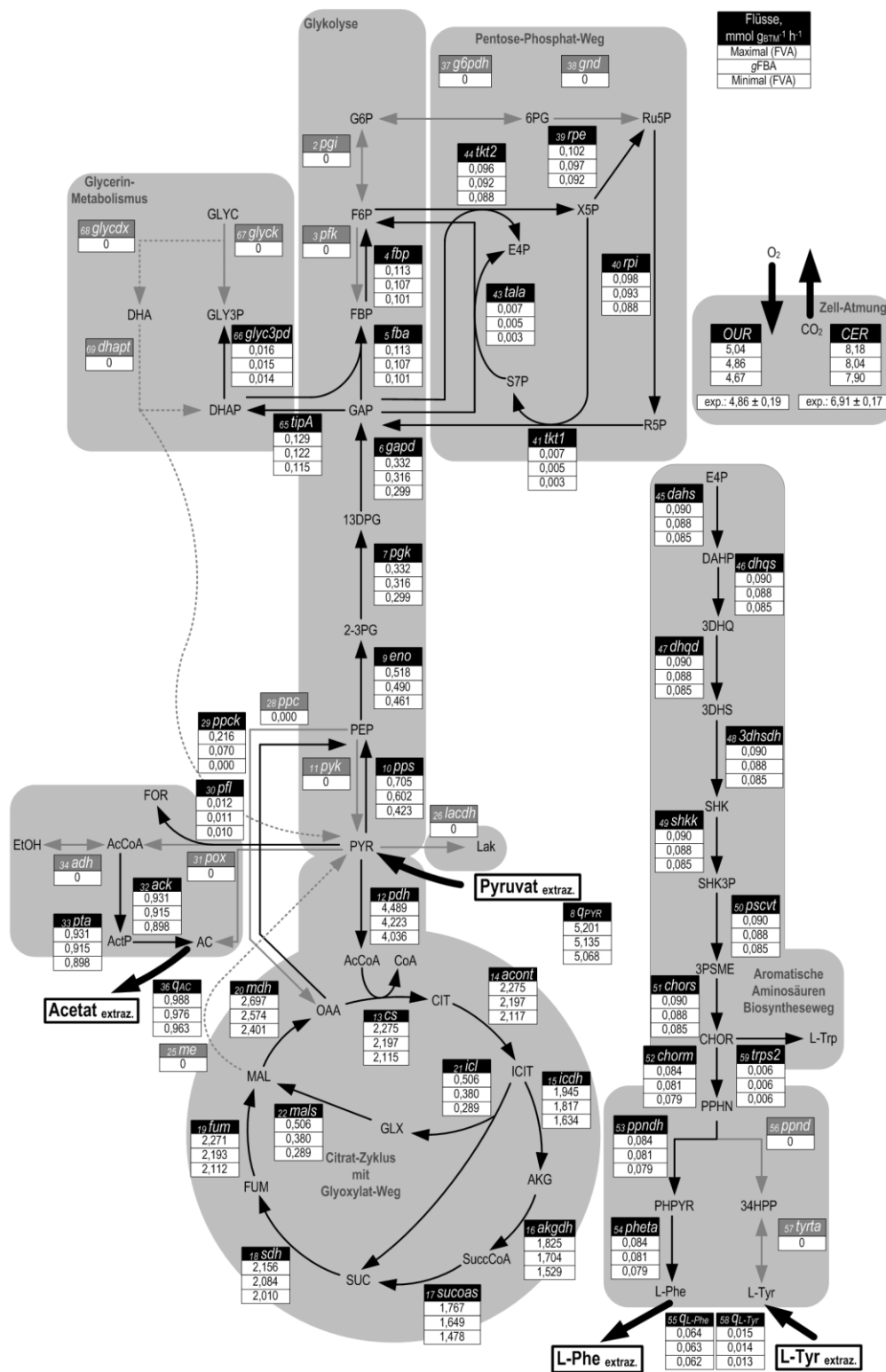


**Abbildung 5.26:** Biomassenspezifische Raten für Substrataufnahme, L-Phenylalanin-Bildung, Nebenproduktbildung und Atmung in den vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat, Glucose, Succinat und Glycerin zu den zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten MA1 (●) und MA2 (○).

Die zu beiden Prozesszeitpunkten in den metabolischen Kurzzeitanalysen ermittelten extrazellulären Gleichgewichts-Stoffflüsse ermöglichten eine Abschätzung der in den Analysen vorliegenden intrazellulären Stoffflussverteilungen. Zur Beschreibung dieser Stoffflussverteilungen wurden erneut die beiden theoretischen Berechnungsansätze der Flussvarianz-Analyse (FVA) und der geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA) angewendet. Die für die Stoffflussberechnungen vorgegebenen experimentell bestimmten extrazellulären Raten sind in Tabelle 5.5 aufgeführt. Im Folgenden werden die für die verschiedenen Kohlenstoffquellen berechneten Stoffflussverteilungen kurz zusammengefasst.

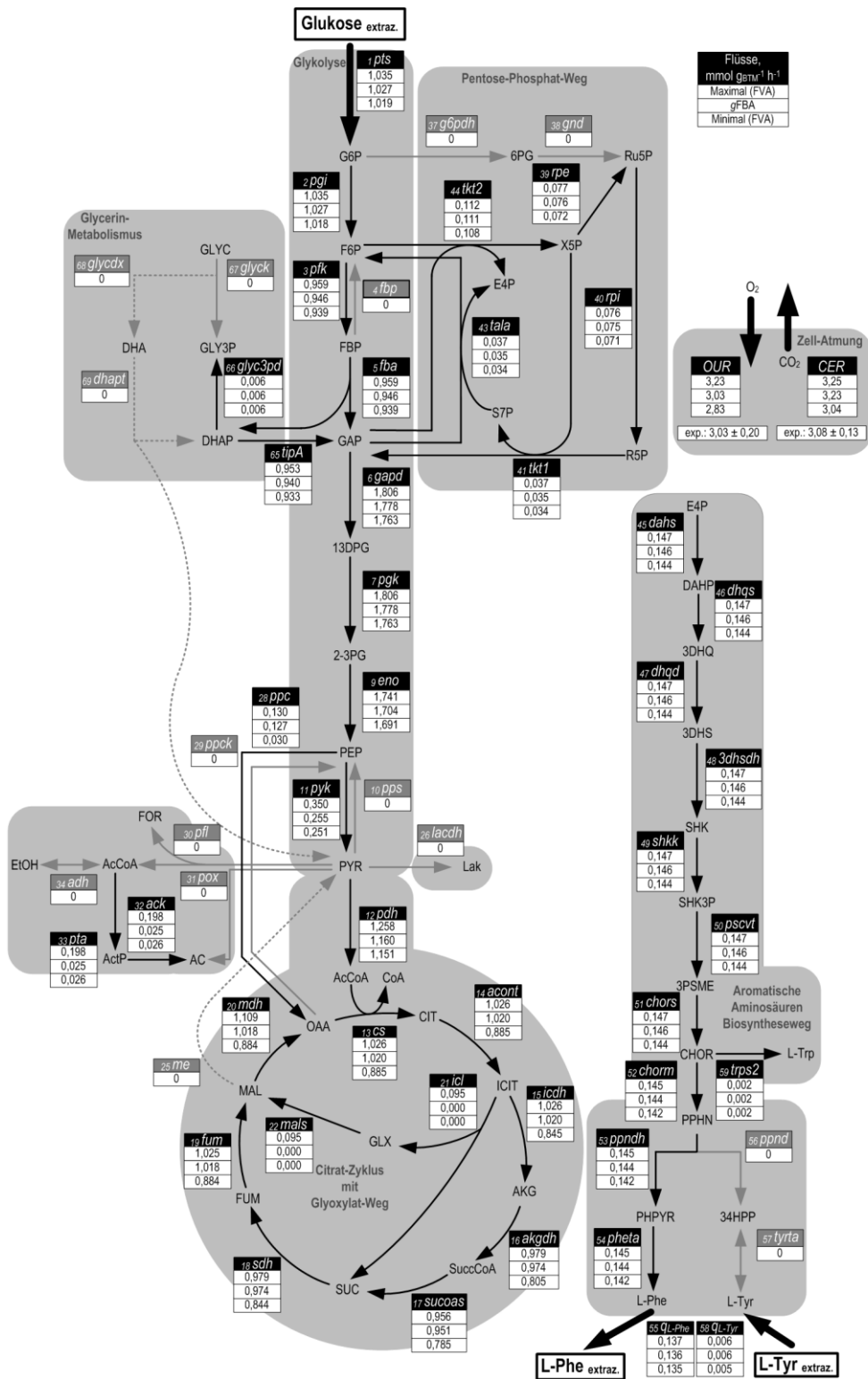
Ein Ausschnitt der aus der Berechnung resultierenden genomweiten intrazellulären Stoffflussverteilung der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Pyruvat ist in Abbildung 5.27 dargestellt. Hierbei sind mehrere von Pyruvat ausgehende Kohlenstoffflüsse erkennbar. Der größte Anteil an Kohlenstoff wird in beiden Berechnungsansätzen über die Pyruvatdehydrogenase (pdh) zu AcetylCoA abgebaut. Ausgehend von AcetylCoA erfolgt die experimentell bestimmte und bei den Berechnungen vorgegebene Nebenproduktbildung an Acetat. Des Weiteren erfolgt über die PEP-Synthase (pps) der gluconeogenetische Fluss von Pyruvat zu PEP. Die dabei mittels FVA ermittelte Varianz wird durch die ebenfalls PEP-bereitstellende Reaktion der PEP-Carboxykinase (ppck)

verursacht, deren Fluss ihrerseits eine Varianz aufweist. Von PEP ausgehend erfolgt der lineare Stofffluss der Gluconeogenese hin zu Fructose-6-Phosphat (F6P). Der Kohlenstofffluss von F6P über die Transketolase (tkt2) beschreibt 94 % des Stoffflusses hin zu Erythrose-4-Phosphat (E4P) und somit zum Aromatenbiosyntheseweg. Dabei wird der Stofffluss im Aromatenbiosyntheseweg hauptsächlich durch die Vorgabe der L-Phenylalanin-Bildung definiert. Eine Aktivität des oxidativen Teils des Pentose-Phosphat-Weges konnte rechnerisch nicht bestimmt werden. Bezogen auf die Substrataufnahme liegen 41–45 % des Kohlenstoffflusses im Citrat-Zyklus vor. Eine Aktivität des Glyoxylat-Weges ist mit beiden Berechnungsansätzen bestimmbar. Die hierbei berechnete Unsicherheit des Flusses im Glyoxylat-Weg verursacht die in Abbildung 5.27 dargestellte Varianz bei den enzymatischen Umsetzungen der Isocitratdehydrogenase (icdh),  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (akgdh) und Succinyl-CoA-Synthase (sucoas). Alle anderen Varianzen des Stoffwechselweges zeigen hingegen geringe Werte auf. Der in Tabelle 5.5 aufgeführte und in Abbildung 5.24 dargestellte Vergleich zwischen experimentell bestimmter und theoretisch abgeschätzter Kohlendioxidbildung (gFBA) beschreibt eine Abweichung von rund 16 % und somit eine gute Validierung der theoretisch ermittelten Stoffflussverteilung.



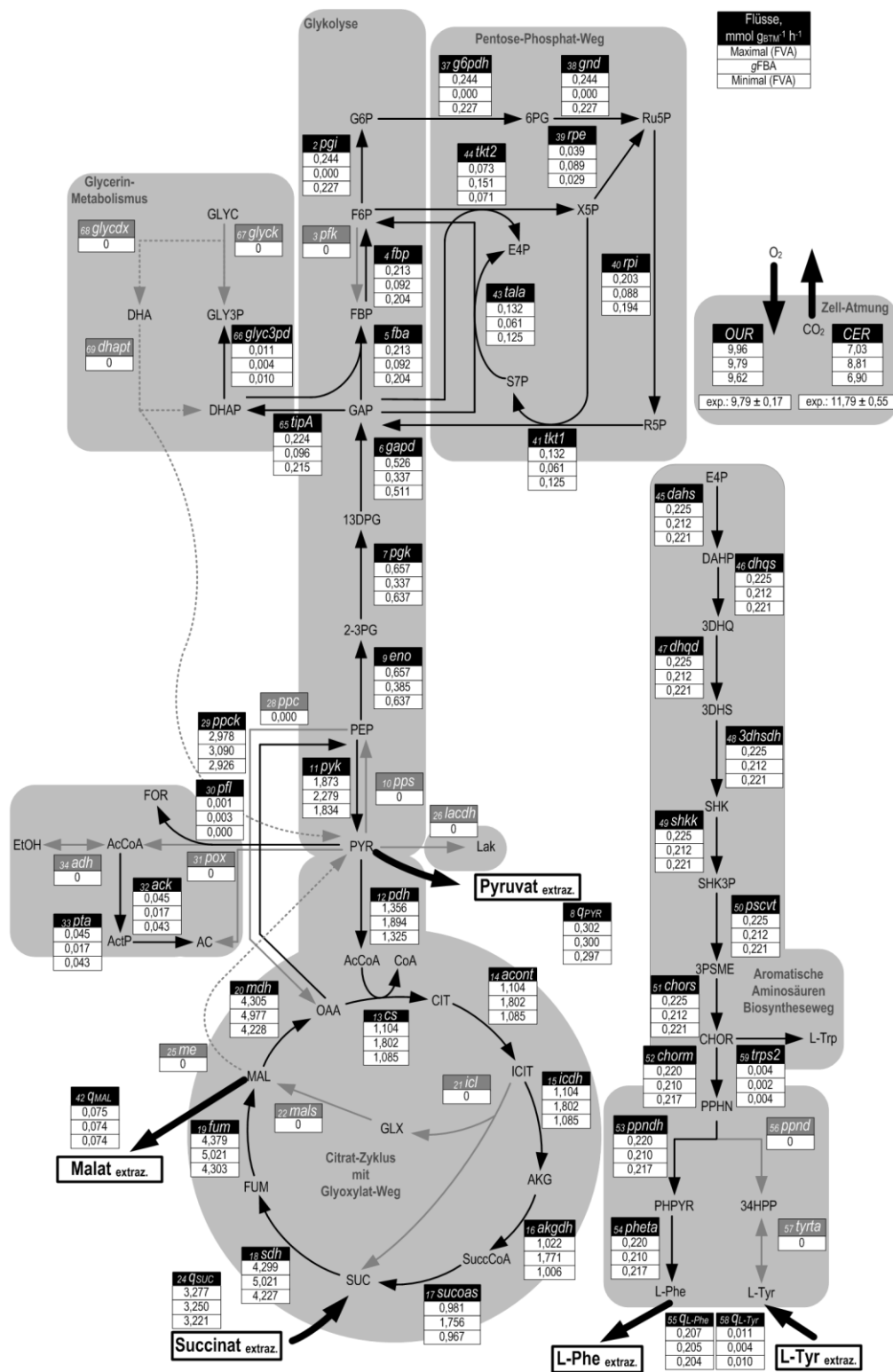
**Abbildung 5.27:** Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Pyruvat, ermittelt durch Flussvarianz-Analyse (FVA) und geometrische Flussbilanz-Analyse (gFBA) des genomweiten Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die Pfeilrichtung definiert die Reaktionsrichtung. Die eingerahmten Zahlen beschreiben den Betrag des ermittelten Flusses (mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Obere Zahl: Oberstes Limit der FVA-Lösung; Mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; Untere Zahl: Unterstes Limit der FVA-Lösung. Für die Zell-Atmung sind zusätzlich die experimentell bestimmten Raten (exp.) aufgeführt. Inaktive Reaktionen sind durch grau hinterlegte Reaktionsnamen und Pfeile beschrieben. Vorgaben: Pyruvat-Aufnahme; L-Phenylalanin-Bildung; Acetat-Bildung und Sauerstoffaufnahme.

Ein Ausschnitt der Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Glucose ist in Abbildung 5.28 dargestellt. Hierbei ist für beide Berechnungsansätze ein glycolytischer Fluss ausgehend von Glucose-6-Phosphat (G6P) hin zu Phosphoenolpyruvat (PEP) beschrieben. Der Hauptanteil an PEP wird für vier verbrauchende Reaktionen benötigt: Für die Glucose-Aufnahme durch das Phosphotransferase-System (pts), als Cosubstrat an zwei Stellen des Aromatenbiosyntheseweges (dahs und pscvt), für den Abbau zu Pyruvat durch die Pyruvatkinase (pyk) und in der den Citrat-Zyklus bedienenden Reaktion der PEP-Carboxylase (ppc). Neben der Pyruvat-bildenden Reaktion der Pyruvatkinase wird Pyruvat bei der Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle hauptsächlich durch das Phosphotransferase-System zur Verfügung gestellt. Die Versorgung des Aromatenbiosyntheseweges mit E4P erfolgt zu 74–77 % durch die Transketolase (tkt2) und zu 23–26 % über die Transaldolase (tala). Im Aromatenbiosyntheseweg beschreiben beide Berechnungsansätze einen linearen Stofffluss zum Produkt, wobei geringe Verluste an Kohlenstoff durch die Stoffflüsse der Biomassebildung verursacht werden. Insgesamt wurden durch die Varianz-Analyse für die meisten Stoffflüsse geringe Unsicherheiten bestimmt. Ausnahmen sind die PEP-Carboxylase und die Reaktionen des Glyoxylat-Weges. Der in Tabelle 5.5 aufgeführte und in Abbildung 5.24 dargestellte Vergleich zwischen experimentell bestimmter und theoretisch abgeschätzter Kohlendioxidbildung (gFBA) beschreibt für die beschriebene Stoffflussverteilung eine geringe Abweichung von rund 4 %.



**Abbildung 5.28:** Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Glucose, ermittelt durch Flussvarianz-Analyse (FVA) und geometrische Flussbilanz-Analyse (gFBA) des genomweiten Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die Pfeilrichtung definiert die Reaktionsrichtung. Die eingerahmten Zahlen beschreiben den Betrag des ermittelten Flusses ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Obere Zahl: Oberstes Limit der FVA-Lösung; Mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; Untere Zahl: Unterstes Limit der FVA-Lösung. Für die Zell-Atmung sind zusätzlich die experimentell bestimmten Raten (exp.) aufgeführt. Inaktive Reaktionen sind durch grau hinterlegte Reaktionsnamen und Pfeile beschrieben. Vorgaben: Glucose-Aufnahme; L-Phenylalanin-Bildung und Sauerstoffaufnahme.

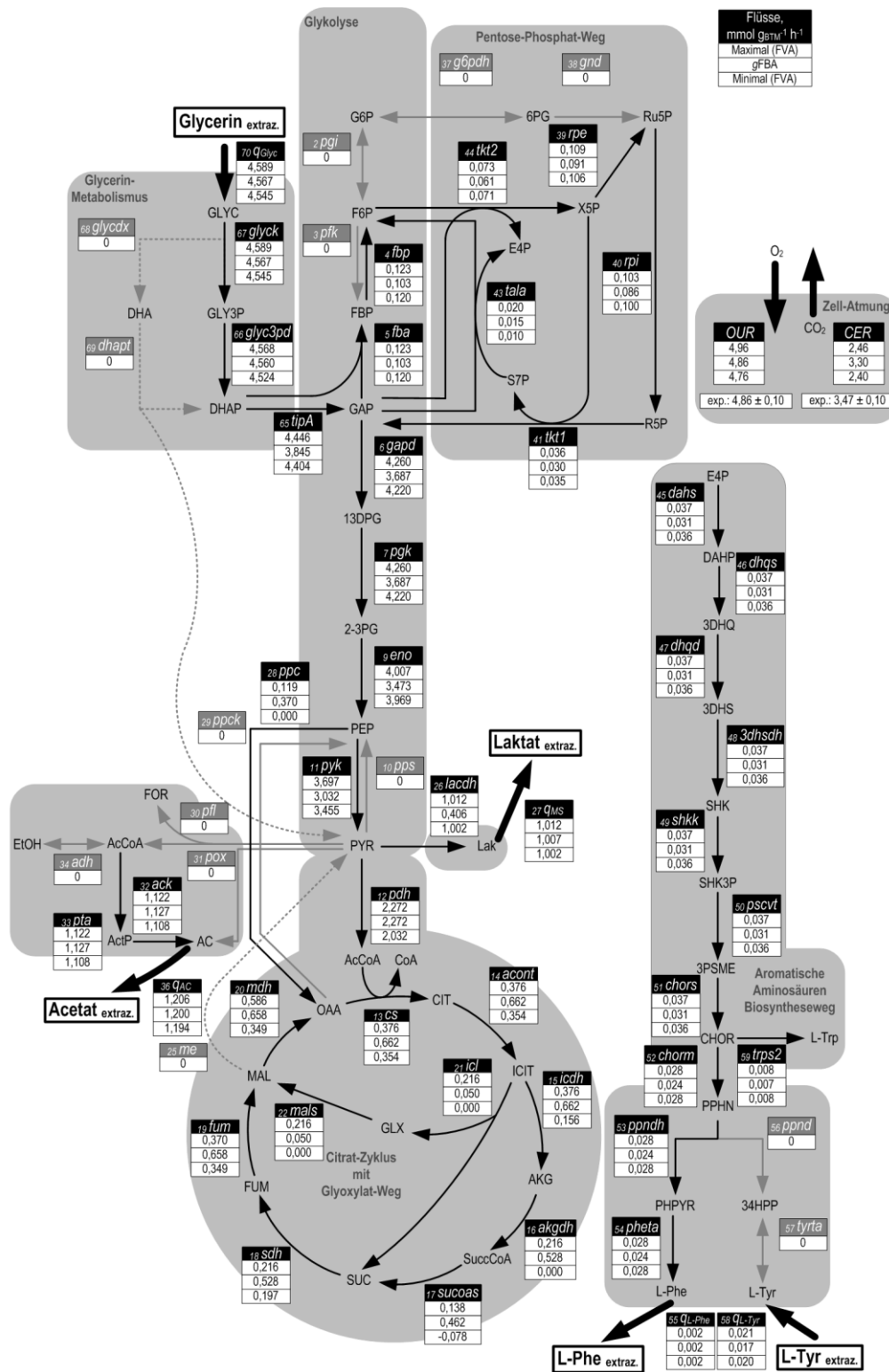
Für die Berechnung der intrazellulären Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Analyse (MA1) auf dem Substrat Succinat mussten bei den beiden Berechnungsansätzen unterschiedliche Randbedingungen verwendet werden. So erfolgte bei der Varianz-Analyse analog zu den vorangegangenen Berechnungen keine Beschränkung der L-Tyrosin-Aufnahme und somit der maximal möglichen Biomassebildung. Die für diesen Ansatz berechnete Atmungsrate für CO<sub>2</sub> (6,90–7,03 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) zeigte eine hohe Abweichung (42 %) von der experimentell bestimmten Kohlendioxidbildung (11,79 ± 0,55 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Gleichzeitig lag in dem berechneten Ansatz eine verstärkte Biomassebildung vor, welche experimentell nicht nachweisbar war. Aus diesem Grund wurde die maximal mögliche Biomassebildung im Ansatz der gFBA durch die Beschränkung der L-Tyrosin-Aufnahme begrenzt. Die somit berechnete Kohlendioxidbildung (8,80 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) ist in der Lage, den experimentellen Wert mit einem Fehler von 23 % verbessert zu beschreiben (siehe Abbildung 5.24). Eine Beschränkung der L-Tyrosin-Aufnahme bei der Berechnung der Varianz-Analyse führte hingegen zur Ausbildung von Schleifenreaktionen und unrealistisch hohen Varianzen (Daten nicht gezeigt). Ursachen hierfür sind in der durch die begrenzte Biomassebildung erhöhte Kohlenstoffverfügbarkeit im Reaktionsnetzwerk in Kombination mit der Nebenproduktbildung an Pyruvat zu sehen. Die Bildung von Pyruvat ist im genomweiten Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) über 33 verschiedene Reaktionen realisierbar. Diese Anzahl an bei der Berechnung konkurrierenden Stoffflüssen führt in Kombination mit dem durch die L-Tyrosin-Aufnahme begrenzten Optimierungskriterium zu den beschriebenen Schleifenreaktionen und den Stoffflussvarianzen. Ein Ausschnitt der ermittelten Stoffflussverteilungen ist für beide Berechnungsansätze in Abbildung 5.29 dargestellt. Ausgehend von Succinat liegt der Kohlenstofffluss primär im Citrat-Zyklus vor. Der erste Verlust an Kohlenstoff ist durch die Nebenproduktbildung an Malat beschrieben, bevor über die PEP-Carboxykinase (ppck) eine Versorgung der gluconeogenetischen Reaktionen erfolgt. Die unterschiedlichen Randbedingungen der Berechnungsmethoden werden durch die voneinander abweichenden Werte der Kohlenstoffflüsse im Citrat-Zyklus verdeutlicht. So führt die begrenzte Biomassebildung im Fall der gFBA zu einem verstärkten Gesamtfluss im Citrazyklus und somit zu einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Bildung. Für die Varianz-Analyse konnten hingegen in diesem Stoffwechselweg nur verringerte Stoffflüsse berechnet werden. Weitere Unterschiede werden im Pentose-Phosphat-Weg ersichtlich. So wurde für die gFBA im Gegensatz zur FVA keine Aktivität des oxidativen Teils des Pentose-Phosphat-Weges bestimmt. Die unterschiedlich aktiven Stoffwechselwege beschreiben auch eine deutlich abweichende Versorgung des Aromatenbiosyntheseweges mit Erythrose-4-phosphat (E4P). So erfolgt im Fall der gFBA die E4P-Bereitstellung primär über die Transketolase (tkt2). Die FVA beschreibt hingegen für die Transaldolase (tala) eine höhere Aktivität. Im Aromatenbiosyntheseweg zeigen beide Berechnungsansätze aufgrund der Linearität des Reaktionsnetzwerkes eine hohe Übereinstimmung.



**Abbildung 5.29:** Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Succinat, ermittelt durch Flussvarianz-Analyse (FVA) und geometrische Flussbilanz-Analyse (gFBA) des genomweiten Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die Pfeilrichtung definiert die Reaktionsrichtung. Die eingerahmten Zahlen beschreiben den Betrag des ermittelten Flusses (mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Obere Zahl: Oberstes Limit der FVA-Lösung; Mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; Untere Zahl: Unterstes Limit der FVA-Lösung. Für die Zell-Atmung sind zusätzlich die experimentell bestimmten Raten (exp.) aufgeführt. Inaktive Reaktionen sind durch grau hinterlegte Reaktionsnamen und Pfeile beschrieben. Vorgaben: Succinat-Aufnahme; L-Phenylalanin-Bildung; Malat-Bildung; Pyruvat-Bildung, Sauerstoffaufnahme und im Fall der gFBA L-Tyrosin-Aufnahme.

Analog zu der intrazellulären Stoffflussberechnung während der metabolischen Kurzzeitanalyse auf dem Substrat Succinat wurden auch für die Kohlenstoffquelle Glycerin unterschiedliche Randbedingungen für die Stoffflussabschätzungen angewendet. Die mittels Flussvarianz-Analyse berechnete Atmungsrate für CO<sub>2</sub> (2,40–2,46 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) zeigte erneut eine im Vergleich zur experimentell bestimmten Kohlendioxidbildung (3,47 ± 0,10 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) hohe Abweichung von rund 30 %. Eine in einer zweiten Berechnung vorgegebene Kohlendioxidbildungsrate führte wiederum zur Ausbildung von Schleifenreaktionen und hohen Varianzen (Daten nicht gezeigt). Als Ursache hierfür ist analog zur Berechnung mit Succinat als Kohlenstoffquelle die berücksichtigte Nebenproduktbildung an Laktat zu sehen. Aufgrund der direkten Möglichkeit, Laktat aus Pyruvat zu bilden (lacdh), ist die Bedeutung der für Glycerin nachgewiesenen Laktat-Bildung mit der Pyruvat-Bildung bei Verwendung der Kohlenstoffquelle Succinat gleichzusetzen. Weiter erhöht wird diese Stoffflussunsicherheit durch die Möglichkeit der Laktat-Bildung über den Methylglyoxalweg ausgehend von DHAP (Reaktionsweg nicht dargestellt). Im Gegensatz zur Flussvarianz-Analyse war mit der gFBA eine Stoffflussabschätzung mit einer vorgegebenen Kohlendioxidbildungsrate, welche gerade noch eine Biomassebildung ermöglichte (3,30 mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) realisierbar. Grund hierfür ist das bei der gFBA-Berechnung angewendete zweite Optimierungskriterium (siehe Kapitel 3.6.3), welches Schleifenreaktionen als Lösungen ausschließt. Ein Ausschnitt der ermittelten Stoffflussverteilungen ist für beide Berechnungsansätze in Abbildung 5.30 dargestellt. Ausgehend von Glycerin erfolgt der Kohlenstofffluss im Glycerin-Metabolismus zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Hier wird ein zentraler Unterschied der beiden Berechnungsansätze sichtbar. Bei der geometrischen Flussanalyse erfolgt die Nebenproduktbildung an Laktat hauptsächlich über den Methylglyoxalweg ausgehend von DHAP (Fluss nicht dargestellt), wohingegen bei der Flussvarianz-Analyse eine Laktat-Bildung ausschließlich über die Laktatdehydrogenase beschrieben wird (lacdh). Diese für die beiden Berechnungsansätze nachweisbaren Unterschiede bei der Stoffflussverteilung hin zu Laktat verursachen die in Abbildung 5.30 dargestellten Abweichungen der Glykolyse-Stoffflüsse. Keine Unterschiede sind hingegen bei der Versorgung des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels sichtbar. Analog zur Beschreibung des substratlimitierten Referenzzustandes (siehe Kapitel 5.5.1) erfolgt auch bei den im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Analysen auf der Kohlenstoffquelle Glycerin die Versorgung des Aromatenbiosyntheseweges mit E4P primär (81 %) über die Transketolase (tkt2). Im Aromatenbiosyntheseweg wurde nur ein geringer Stofffluss bestimmt, dessen Ursache in der vorgegebenen geringen L-Phenylalanin-Bildung liegt.





**Abbildung 5.30:** Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Glycerin, ermittelt durch Flussvarianz-Analyse (FVA) und geometrische Flussbilanz-Analyse (gFBA) des genomweiten Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die Pfeilrichtung definiert die Reaktionsrichtung. Die eingerahmten Zahlen beschreiben den Betrag des ermittelten Flusses (mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Obere Zahl: Oberstes Limit der FVA-Lösung; Mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; Untere Zahl: Unterstes Limit der FVA-Lösung. Für die Zell-Atmung sind zusätzlich die experimentell bestimmten Raten (exp.) aufgeführt. Inaktive Reaktionen sind durch grau hinterlegte Reaktionsnamen und Pfeile beschrieben. Vorgaben: Glycerin-Aufnahme; L-Phenylalanin-Bildung; Acetat-Bildung; Laktat-Bildung, Sauerstoffaufnahme und im Fall der gFBA Kohlendioxidbildung.

Auch die extrazellulären Raten der zweiten metabolischen Analyse (MA2) wurden zur Abschätzung der intrazellulären Stoffflussverteilungen mittels Flussvarianz-Analyse und geometrischer Flussbilanz-Analyse genutzt. Aufgrund der dabei erzielten qualitativ identischen Verteilungen und Problemstellungen wird an dieser Stelle auf eine weitere Beschreibung verzichtet.

### 5.5.3 Diskussion

Zur genaueren metabolischen Charakterisierung von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion wurden in diesem Projekt zu zwei Produktionszeitpunkten metabolische Analysen realisiert. Die hierzu durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen wurden im Satzverfahren betrieben und erfolgten parallel zum laufenden Prozess. Hierdurch konnte eine Störung des im Prozess vorliegenden metabolischen Gleichgewichtes nachweisbar vermieden werden.

Die zum Zeitpunkt der metabolischen Analysen im Prozess quantifizierten extrazellulären Raten ermöglichten dabei eine genaue Beschreibung des Referenzzustandes. Die mit theoretischen Berechnungsansätzen bestimmten intrazellulären Stoffflussverteilungen geben einen Einblick in die zu den beiden Produktionszeitpunkten aktiven Stoffwechselwege. Ein Vergleich mit in der Literatur beschriebenen theoretischen Flussanalysen mit der Kohlenstoffquelle Glycerin (Jung Oh *et al.*, 2008) bestätigt die in dieser Arbeit bestimmten Flussverteilungen. Eine weitere experimentelle Verifikation einzelner Stoffflüsse könnte hingegen nur durch  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente realisiert werden. Für die Kohlenstoffquelle Glucose ist diese Vorgehensweise trotz enormem experimentellen und analytischen Aufwand (siehe Kapitel 3.6.1) in verschiedenen Arbeitsgruppen etabliert und entsprechende Datensätze sind in der Literatur verfügbar (Nöh *et al.*, 2007; Okahashi *et al.*, 2014). Da  $^{13}\text{C}$ -markiertes Glycerin nicht kommerziell verfügbar ist, liegen entsprechende Datensätze für diese Kohlenstoffquelle nicht vor.

Die in den metabolischen Kurzzeitanalysen beobachtbare Reaktion der Zellen auf die eingestellten Analysebedingungen bestätigen, dass der Stamm *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> aus dem Produktionsprozess mit Glycerin in der Lage ist, in kürzester Zeit neue Kohlenstoffquellen aufzunehmen und umzusetzen. Dies setzt das Vorhandensein entsprechender Aufnahmesysteme für Glucose, Succinat und Pyruvat voraus. Das PEP-verbrauchende Phosphotransferase-System in *E. coli* repräsentiert dabei eine Vielzahl an alternativen Enzymen, die eine Glucose-Aufnahme ermöglichen. Neben induzierbaren Expressionssystemen liegen weitere Varianten konstitutiv exprimiert in *E. coli* vor (Kundig und Roseman, 1970; Saier, 1977). Eine Aufnahme von Succinat ist für *E. coli* durch die Dicarbonsäure-Transporter SBP1 und SBP2 (*dcta* und *dctb*) beschrieben (Lo und Bewick, 1977). Erst kürzlich konnte hingegen die Existenz von zwei noch nicht genauer spezifizierten

aktiven Pyruvat-Aufnahmesystemen nachgewiesen werden, von denen eines konstitutiv exprimiert in *E. coli* vorliegt (Kreth *et al.*, 2013).

Die Verwendung dieser unterschiedlichen Kohlenstoffquellen als Substrate während der metabolischen Analysen ermöglichte eine signifikante Auslenkung des Produktionsgleichgewichtes und, in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle, auch eine Neuausrichtung der Stoffflüsse. Die bestimmbar extrazellulären Flüsse zeigten nach wenigen Minuten (< 6 min) konstante Werte. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Daten von Link *et al.* (2010) überein, welche bei gleicher Methodik ebenfalls ein nach wenigen Minuten vorliegendes extrazelluläres Gleichgewicht für den Wildtyp-Stamm *E. coli* K12 aufwiesen.

Des Weiteren konnten Link *et al.* (2010) durch Proteomanalysen nachweisen, dass die bei den metabolischen Kurzzeitanalysen erzielten Reaktionen der Zellen nicht durch eine Veränderung des Proteoms während der Zellüberführung oder der Kultivierung im Analysenmaßstab verursacht werden und somit alleinig der metabolischen Kontrolle unterliegen. Zur Überprüfung der Übertragbarkeit dieser von Link *et al.* (2010) beschriebenen Ergebnisse auf das in dieser Arbeit vorliegende Stammsystem wurden vom Projektpartner Proteomanalysen zur Charakterisierung des zellulären Proteoms durchgeführt (methodische Beschreibung siehe Anhang Kapitel A.8.1). Beim Vergleich des Proteoms der Zellen aus dem Produktionsprozess zum Zeitpunkt der Zellentnahme und am Ende der metabolischen Kurzzeitanalysen konnten im analytischen Rahmen der angewendeten 2D-Gele keine Unterschiede nachgewiesen werden (siehe Abbildung A.1–A.8). Dies bestätigt die von Link *et al.* (2010) beschriebenen Ergebnisse und unterstreicht die Anwendbarkeit der gewählten Methodik für die metabolische Charakterisierung von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion.

Durch die im Satzverfahren betriebenen Kurzzeitanalysen wurden signifikante Auslenkungen der metabolischen Stoffflüsse erzielt. Dies konnte durch theoretische Berechnungen der intrazellulären Stoffflüsse nachgewiesen werden. Diese beschreiben starke Veränderungen für weite Teile der Stoffflüsse im Citrat-Zyklus (+205 %), in der Glykolyse (+206 %) und für den Pentose-Phosphat-Weg (-53 %) im Vergleich zum Ausgangszustand des 15 L-Prozesses. Diese ausgeprägte Variation der Stoffflüsse stellt jedoch gleichzeitig für einige Reaktionen die maximal mögliche Auslenkung dar. Ein Einfluss des Überschussmetabolismus auf das Stoffwechselverhalten während der metabolischen Satzanalysen konnte durch die auftretende Nebenproduktbildung nachgewiesen werden. In der Literatur wird die Nebenproduktbildung in aeroben *E. coli*-Kultivierungen (Doelle *et al.*, 1982; Wolfe, 2005) analog zur aeroben Ethanol-Bildung von Crabtree-positiven Hefen (Rozpędowska *et al.*, 2011) als Resultat des Überschussmetabolismus diskutiert. Das am häufigsten beschriebene Nebenprodukt für *E. coli* ist Acetat, dessen Bildung einer starken Regulation unterliegt (Wolfe, 2005). Die weitere Ausprägung des Nebenproduktspektrums von *E. coli* ist hoch divers und umfasst neben organischen Säuren wie Pyruvat und  $\alpha$ -Ketoglutarat auch zentrale Stoffwechselintermediate

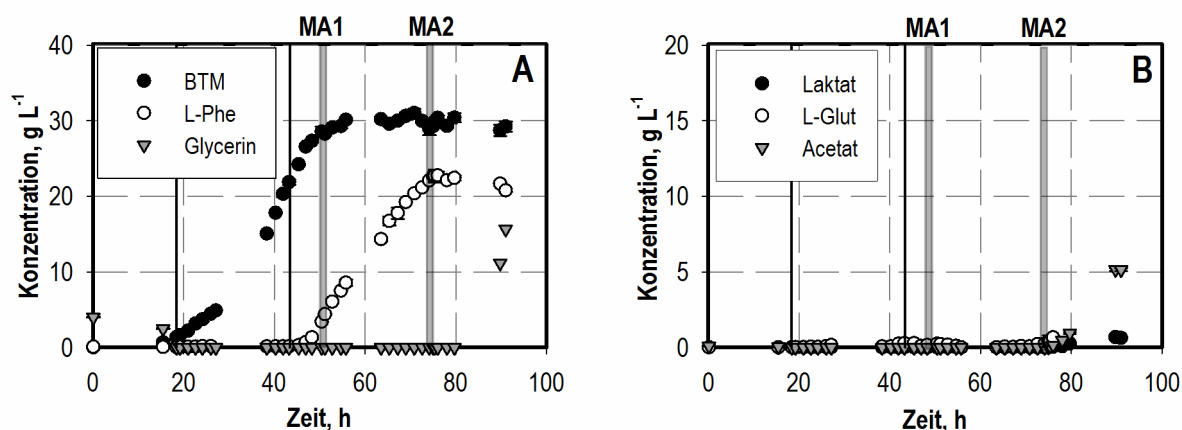
(Paczia *et al.*, 2012). Der teilweise während der metabolischen Satzanalysen vorliegende Überschussmetabolismus erschwert die metabolische Charakterisierung der Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion. Einerseits wird durch die maximale Auslenkung des Metabolismus eine Beschreibung von kinetischen Randbedingungen gefördert, wohingegen die eigentliche Beschreibung der metabolischen Flexibilität in kinetischen Bereichen der Produktionssysteme nicht begünstigt wird. Des Weiteren wirkt sich die Nebenproduktbildung, wie in dieser Arbeit gezeigt, negativ auf die Varianz-Analyse bei theoretischen Stoffflussberechnungen aus. Gleiches gilt für die intrazelluläre Metabolom-Quantifizierung. Eine korrekte Bilanzierung der in der Zelle vorliegenden Substanzen wird durch ins Medium ausgeschleuste Metabolite des Überschussmetabolismus erschwert oder unmöglich gemacht (Paczia *et al.*, 2012). Um die genannten negativen Einflüsse des Überschussstoffwechsels auf die metabolische Charakterisierung der Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion zu vermeiden, war somit eine besser kontrollierbare Auslenkung des Referenz-Gleichgewichtes notwendig. Die dafür notwendige Vorgehensweise wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

## 5.6 Vergleichende metabolische Analysen im Zulaufbetrieb mit *E. coli* Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion\*

Durch die im Satzverfahren durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der Produktionsstamm *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> in der Lage ist, die als Substrate vorgelegten Kohlenstoffquellen in kürzester Zeit aufzunehmen und umzusetzen. Gleichzeitig beschreibt diese Störung des metabolischen Produktionsgleichgewichtes jedoch für einige Reaktionen die maximal mögliche Stofffluss-Auslenkung und fördert damit den Einfluss des Überschussmetabolismus bei gleichzeitiger Reduktion der Beschreibbarkeit des metabolisch interessanten Prozess-Zustandes. Um eine gezieltere Auslenkung des Produktionssystems zu realisieren, sollten deswegen während einer weiteren Kultivierung im 15 L-Maßstab Kurzzeitanalysen im Zulaufverfahren durchgeführt werden.

### 5.6.1 Beschreibung des Referenzzustandes

Um Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion in metabolischen Analysen im Zulaufbetrieb zu charakterisieren, wurde eine erneute Kultivierung des Produktionsstammes *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Maßstab durchgeführt. Die erzielten Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 5.31 zusammengefasst und in Kapitel 5.4 diskutiert. Teile der gewonnenen Biomasse wurden analog zu den metabolischen Kurzzeitanalysen im Satzverfahren während der metabolisch interessanten Produktionszeitpunkte (MA1 und MA2; siehe Abbildung 5.31) entnommen und zur metabolischen Analyse in das Analysensystem überführt.



**Abbildung 5.31:** L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. Die erste vertikale Hilfslinie beschreibt das Ende der Satzphase. Die zweite vertikale Hilfslinie beschreibt die Induktion der Proteinexpression und den Beginn der L-Phenylalanin-Produktion. **A)** Biotrockenmasse- (BTM, ●), L-Phenylalanin- (L-Phe, ○) und Glycerin- Konzentration (▼); **B)** Laktat- (●), L-Glutamat- (L-Glut, ○) und Acetat-Konzentration (▼). Die grauen Balken beschreiben die beiden Prozesszeiträume, zu denen die metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufverfahren (**MA1** und **MA2**) durchgeführt wurden.

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015b): Perturbation experiments: Approaches for metabolic pathway analysis in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* DOI 10.1007/10\_2015\_326.

Analog zu den vorangegangenen metabolischen Analysen im Satzbetrieb beschreibt das im Prozess vorliegende Stofffluss-Gleichgewicht den zu charakterisierenden Referenzzustand. Dieser wurde erneut durch die parallel zu den metabolischen Kurzzeitanalysen im Produktionsprozess gewonnenen extrazellulären Stoffflüsse charakterisiert. Die dabei ermittelten biomassespezifischen Raten für Substrataufnahme (Glycerin), Atmung ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ), Produkt-Bildung (L-Phe) und der zum zweiten Analysezeitpunkt vorliegenden Nebenprodukt-Bildung (Acetat) sind in Tabelle 5.6 aufgeführt. Abweichungen von den in Tabelle 5.4 beschriebenen Raten sind dabei durch geringfügige Schwankungen der Zulaufmedien-Zusammensetzung, der vorliegenden Biomasse-Konzentrationen und Unterschiede beim Reaktorvolumen begründbar.

**Tabelle 5.6:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA und FVA) bestimmten zellspezifischen Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Phenylalanin-Bildung, Acetat-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum im 15 L-Produktionsprozess im Zeitraum der beiden im Zulaufverfahren durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen (**MA1** und **MA2**). Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

<b>MA1</b>	Fluss (gemessen),	Fluss (gFBA),	Min. Fluss (FVA),	Max. Fluss (FVA),
Reaktion	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$
Glycerin-Aufnahme	$2,18 \pm 0,01$	2,18 (*)	2,17 (*)	2,19 (*)
L-Phe-Bildung	$0,30 \pm 0,00$	0,30 (*)	0,30 (*)	0,30 (*)
$\text{O}_2$ -Aufnahme	$3,25 \pm 0,01$	3,12	3,10	3,14
$\text{CO}_2$ -Bildung	$2,67 \pm 0,01$	2,40	2,39	2,41
Biomassebildung	$< 0,05 \text{ h}^{-1}$	$0,04 \text{ h}^{-1}$	$0,04 \text{ h}^{-1}$	$0,04 \text{ h}^{-1}$

<b>MA2</b>	Fluss (gemessen),	Fluss (gFBA),	Min. Fluss (FVA),	Max. Fluss (FVA),
Reaktion	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$
Glycerin-Aufnahme	$1,15 \pm 0,01$	1,15 (*)	1,14 (*)	1,16 (*)
L-Phe-Bildung	$0,03 \pm 0,01$	0,03 (*)	0,02 (*)	0,03 (*)
Acetat-Bildung	$0,04 \pm 0,00$	0,04 (*)	0,04 (*)	0,04 (*)
$\text{O}_2$ -Aufnahme	$3,99 \pm 0,00$	2,66	2,64	2,68
$\text{CO}_2$ -Bildung	$3,06 \pm 0,00$	2,16	2,15	2,18
Biomassebildung	$< 0,05 \text{ h}^{-1}$	$0,02 \text{ h}^{-1}$	$0,02 \text{ h}^{-1}$	$0,03 \text{ h}^{-1}$

Die weitere Abschätzung der im Referenzzustand intrazellulär vorliegenden Stoffflüsse erfolgte mittels geometrischer Flussbilanz-Analyse (gFBA) und Flussvarianz-Analyse (FVA). Die für die Berechnungen vorgegebenen Messdaten sind in Tabelle 5.6 markiert. Ein Auszug der für das genomweite Modell bestimmten Stoffflüsse kann dem Anhang in Tabelle A.31–

A.41 entnommen werden. Die aktiven Reaktionen und Stoffflussrichtungen stimmen mit den in Kapitel 5.5.1 beschriebenen Stoffflussverteilungen überein, weswegen auf eine erneute Darstellung an dieser Stelle verzichtet wird.

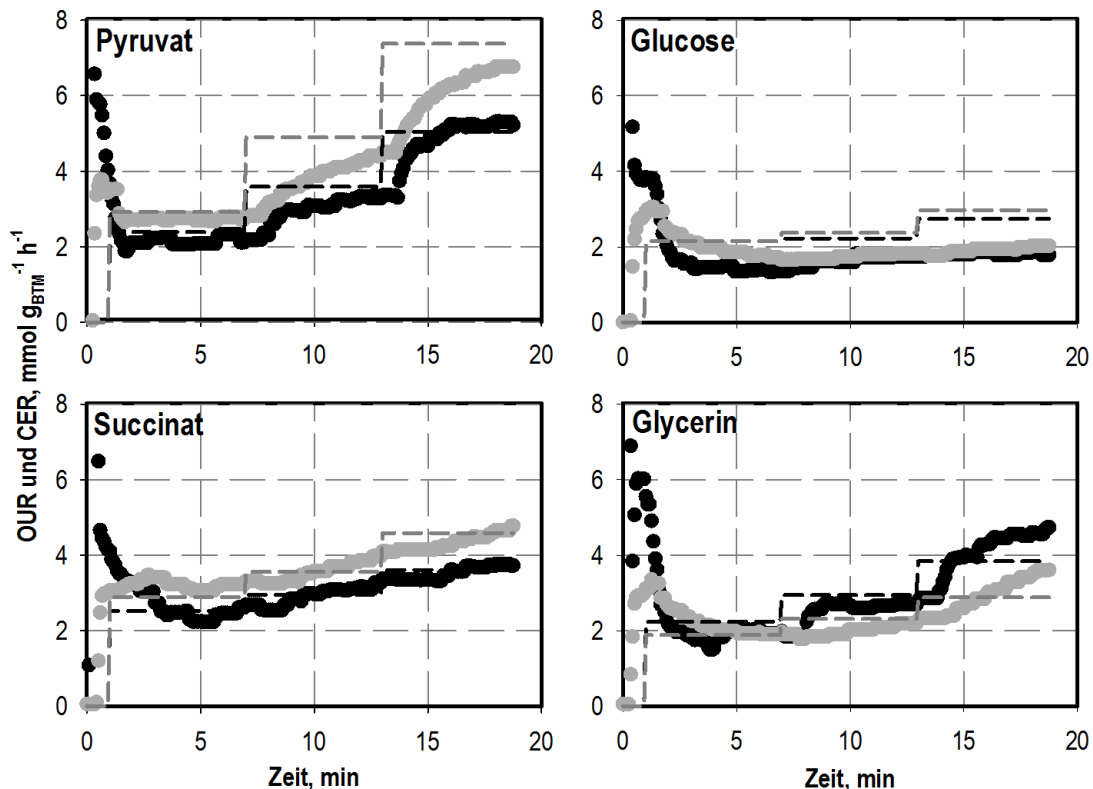
## 5.6.2 Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb

Mit einem kontrollierten Zulaufverfahren besteht die reaktionstechnische Möglichkeit, die zelluläre Substrataufnahmerate gezielt einstellen zu können. Durch die damit verbundene Begrenzung der intrazellulären Stoffflüsse kann eine maximale Auslenkung der Stoffflüsse und somit Einflüsse des Überschussmetabolismus vermieden werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Substratversorgung während der im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen durch eine konstante Zulaufmedienzufuhr umgesetzt. Die Substratversorgung war so gewählt, dass die in mehreren vorangegangenen Satzanalysen bestimmte maximal mögliche biomassespezifische Substrataufnahmerate nicht überschritten werden sollte. Durch die in Kapitel 5.5.2 nachgewiesene Fähigkeit des Produktionsstammes *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>, innerhalb von weniger als sechs Minuten ein neues Fließgleichgewicht während der metabolischen Analysen zu erreichen, war es des Weiteren möglich, durch den substratlimitierten Zulaufbetrieb drei verschiedene Gleichgewichtszustände pro Analysenreaktor einzustellen. Hierfür wurde mit einer niedrigen konstanten Substratzufuhr begonnen, welche für rund sechs Minuten konstant gehalten und nach erfolgter Probennahme entsprechend dem in Kapitel 4.4 beschriebenen Stufenprofil erhöht wurde. Die sich daraus ergebende Analysendauer von rund 20 Minuten ist identisch mit der Dauer der im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Analysen. Wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben, konnte für diesen Analysenzeitraum von rund 20 Minuten (+10 min für Zellüberführung) eine Vergleichbarkeit des Proteoms der Zellen im Produktionsprozess und im Analysensystem sichergestellt werden.

Die während der ersten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb (MA1) bestimmten biomassespezifischen Kohlendioxidbildungsraten (CER) und Sauerstoffaufnahmeraten (OUR) sind in Abbildung 5.32 dargestellt. Vergleichend dazu sind die mittels geometrischer Flussbilanz-Analyse (gFBA) theoretisch abgeschätzten Atmungsraten durch unterbrochene Stufenprofile wiedergegeben. Vor allem durch die experimentell bestimmten OUR-Daten für die Kohlenstoffquellen Pyruvat und Glycerin wird ein Erreichen der Gleichgewichtszustände innerhalb der vorgegebenen konstanten Zulaufphasen (sechs Minuten) ersichtlich. Eine Ausbildung von drei Fließgleichgewichtszuständen innerhalb der verfügbaren Analysenzeit konnte somit erfolgreich realisiert werden. Die Verläufe der Kohlendioxidbildung zeigen aufgrund der im Vergleich zu Sauerstoff höheren Löslichkeit von Kohlendioxid in Wasser (Gros *et al.*, 1999) einen verzögerten Verlauf. Für die Kohlenstoffquellen Glucose und Succinat ist die Ausbildung der Abgasstufen weniger deutlich erkennbar als für Pyruvat und

Glycerin. Ursache hierfür sind die für Succinat und Glucose vorgegebenen geringen Unterschiede zwischen den Substratzufuhrraten (siehe Tabelle 4.4) und die daraus resultierenden geringen Unterschiede in den Absolutwerten der Abgasraten.

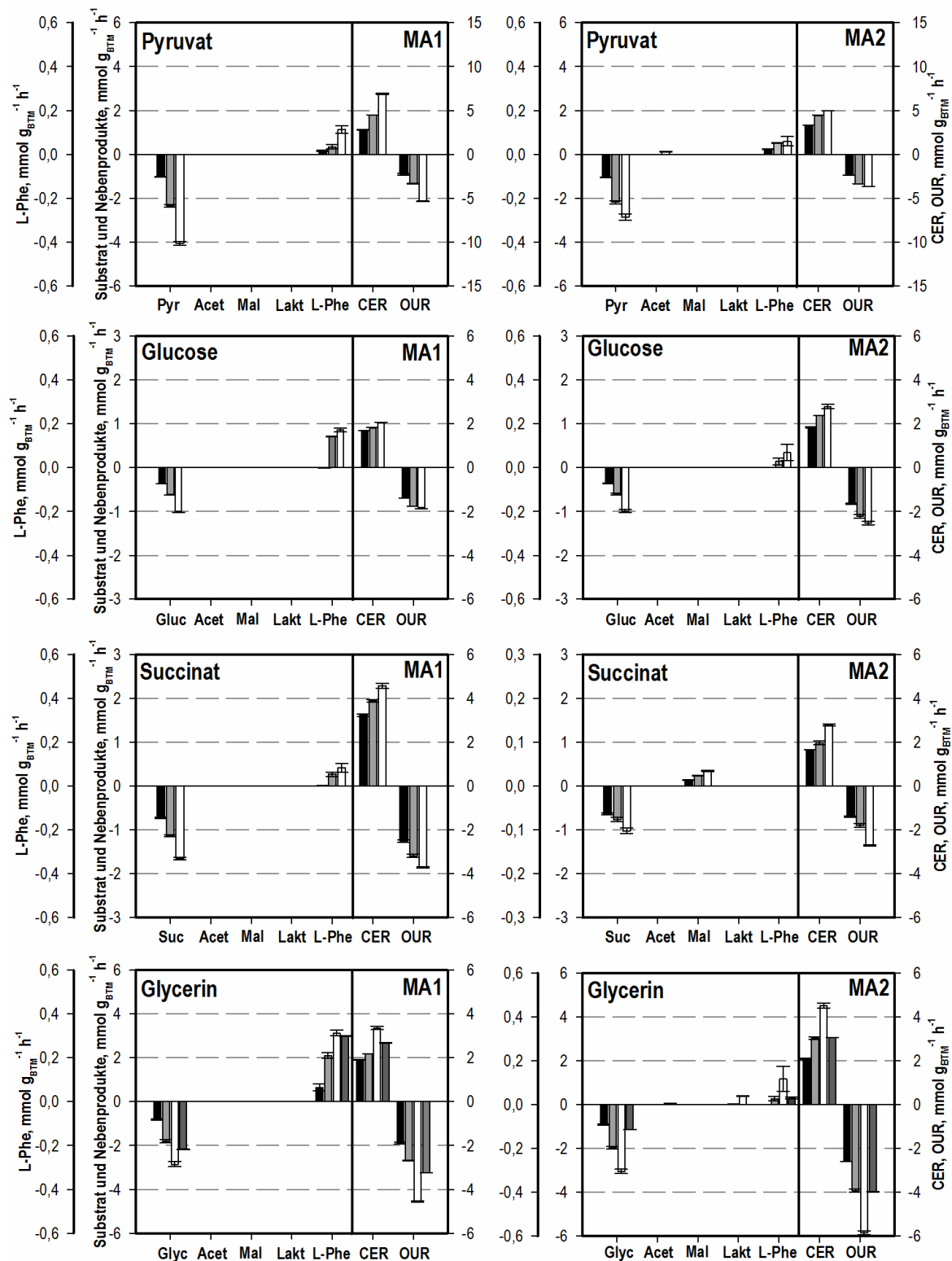
Des Weiteren zeigt der Vergleich zwischen theoretisch bestimmten und experimentell ermittelten Atmungsraten eine gute Übereinstimmung. Für die Kohlenstoffquellen Pyruvat, Succinat und Glycerin liegt in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und der jeweiligen Substratzufuhr rate eine maximale Abweichung von 0–18 % vor. Für die Kohlenstoffquelle Glucose wurde eine höhere Abweichung bestimmt. Vor allem für die letzte Zulaufstufe wurde eine deutliche Abweichung von knapp 50 % ermittelt. Eine der Hauptursachen ist hierbei in der hohen Begasungsrate ( $> 8$  vvm) in Kombination mit den geringen Atmungsraten während der metabolischen Analysen zu sehen. Diese bewirkte eine stärkere Verdünnung des Gasanteils an  $\text{CO}_2$  in der Abluft (0,1–0,5 % (v/v)) und auch eine verschlechterte Bestimmbarkeit der Sauerstoffabnahme im Gasstrom.



**Abbildung 5.32:** Zellspezifische Sauerstoffaufnahme rate (OUR, ●) und Kohlendioxidbildungsrate (CER, ●) in den vier im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat, Glucose, Succinat und Glycerin zum ersten Prozesszeitpunkt (MA1). Der X-Achsen-Ursprung entspricht dem Überföhrungszeitpunkt der Zellsuspension in den Analysenmaßstab. Die horizontalen unterbrochenen Linien beschreiben die mittels theoretischer Stoffflussabschätzungen (gFBA) bestimmte biomassespezifische Sauerstoffaufnahme rate (schwarz) und Kohlendioxidbildungsrate (grau).



Die während der verschiedenen Zulaufphasen gewonnenen Proben wurden hinsichtlich Produkt-Bildung und einer möglichen Nebenprodukt-Bildung respektive Substratanreicherung analysiert (HPLC und enzymatische Nachweise). Während der zum Zeitpunkt hoher Produktion durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen (MA1) konnte in keinem Analysenreaktor eine Substratanreicherung bestimmt werden. Im Gegensatz dazu war zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs in den beiden Analysenreaktoren mit den Kohlenstoffquellen Pyruvat und Succinat eine Kohlenstoffanreicherung für die letzten Gleichgewichtsstufen nachweisbar (Pyruvat: dritte Stufe; Succinat: zweite und dritte Stufe). Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da die entsprechende Substratzufuhr dieser Gleichgewichtsstufen nachweisbar unterhalb der in den Satzanalysen bestimmten maximalen Substrataufnahmeraten lag. Gleichzeitig konnte in den Satzanalysen jedoch gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Substrataufnahme von Pyruvat und Succinat bei Prozessende abnimmt (siehe Abbildung 5.26), was die starke Veränderung des Produktions-Metabolismus in den letzten Prozessstunden verdeutlicht. Kleinste Variationen des Analysezeitpunktes (MA 2) können somit zu den genannten Veränderungen der maximal möglichen Substrataufnahmeraten führen. Die für die beiden Analysezeitpunkte bestimmten Zusammensetzungen der Kulturüberstände sowie die Bilanzierung der zugeführten Substratmengen ermöglichten die Beschreibung der in jeder Zulaufphase vorliegenden konstanten extrazellulären biomassenspezifischen Stoffflüsse. Diese sind in den Tabellen 5.7–5.10 aufgeführt und vergleichend in Abbildung 5.33 dargestellt (Referenzzustand siehe Tabelle 5.6).



**Abbildung 5.33:** Biomassenspezifische Raten für Substrataufnahme, L-Phenylalanin-Bildung, Nebenproduktbildung und Atmung während der drei konstanten Zulaufphasen (A: ●, B: ●, C: ○) der vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat, Glucose, Succinat und Glycerin zu den zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten MA1 und MA2. Für die Kohlenstoffquelle Glycerin sind als Referenz zusätzlich die im 15 L-Produktionsprozess vorliegenden extrazellulären Flüsse aufgeführt (●) (siehe Kapitel 5.6.1).

Trotz des unvollständigen Verbrauches der zugeführten Menge an Pyruvat während der zweiten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA2) konnten für beide Analysen drei verschiedene hohe Substrataufnahmen eingestellt werden (siehe Abbildung 5.33 und Tabelle 5.7). Auch die mit den Substrataufnahmeraten korrelierenden Atmungsraten geben diese drei Gleichgewichtszustände wieder. Die Substratanreicherung in der dritten Gleichgewichtsstufe (C) der zweiten Analyse (MA 2) resultierte dabei in einer im Vergleich zur ersten Analyse (MA1) verringerten dritten Aufnahmerate. Gleichzeitig wurde während dieser Zulaufphase eine geringe Acetat-Bildung ( $0,11 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) nachgewiesen. Analog zur Kohlenstoffaufnahme konnten während beider Analysen steigende L-Phenylalanin-Bildungsraten bestimmt werden. Im Gegensatz zu den Kurzzeitanalysen im Satzbetrieb war für die im Zulaufbetrieb durchgeführten Analysen auch beim zweiten Analysezeitpunkt (MA2) eine Produktbildung nachweisbar. Diese Erkenntnis verstärkt die für die Satzanalysen beschriebene Vermutung, dass der in Satzexperimenten vorliegende Überschussmetabolismus einen starken Einfluss auf den Zellmetabolismus während der metabolischen Kurzzeitanalysen nimmt.

**Tabelle 5.7:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA) bestimmten zellspezifischen Raten für Substrat-Aufnahme, Produkt-Bildung, Nebenprodukt-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum während der zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2) im Zulaufbetrieb mit drei Zulaufzuständen (A, B und C) durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle. Einheit:  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ). Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

Pyruvat	MA1					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$1,03 \pm 0,02$	$1,03^{(*)}$	$2,35 \pm 0,05$	$2,35^{(*)}$	$4,07 \pm 0,08$	$4,07^{(*)}$
L-Phe	$0,02 \pm 0,00$	$0,02^{(*)}$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03^{(*)}$	$0,11 \pm 0,02$	$0,11^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$2,27 \pm 0,10$	2,39	$3,33 \pm 0,04$	3,59	$5,37 \pm 0,04$	5,04
CO <sub>2</sub>	$2,78 \pm 0,03$	2,92	$4,50 \pm 0,01$	4,90	$6,90 \pm 0,04$	7,38
Biomasse	< 0,05	0,10	< 0,05	0,05	< 0,05	0,00

Fortsetzung **Tabelle 5.7**: Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA) bestimmten zellspezifischen Raten für Substrat-Aufnahme, Produkt-Bildung, Nebenprodukt-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum während der zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (**MA1** und **MA2**) im Zulaufbetrieb mit drei Zulaufzuständen (**A**, **B** und **C**) durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle. Einheit:  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ). Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

Pyruvat	MA2					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$1,05 \pm 0,02$	$1,05^{(*)}$	$2,19 \pm 0,08$	$2,19^{(*)}$	$2,86 \pm 0,15$	$2,86^{(*)}$
L-Phe	$0,02 \pm 0,00$	$0,02^{(*)}$	$0,05 \pm 0,00$	$0,05^{(*)}$	$0,06 \pm 0,02$	$0,06^{(*)}$
Acetat	-	-	-	-	$0,11 \pm 0,01$	$0,11^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$2,35 \pm 0,04$	2,39	$3,35 \pm 0,00$	3,41	$3,66 \pm 0,05$	3,92
CO <sub>2</sub>	$3,33 \pm 0,00$	2,94	$4,39 \pm 0,06$	4,63	$4,96 \pm 0,04$	5,53
Biomasse	< 0,05	0,00	< 0,05	0,04	< 0,05	0,06

Mit der Kohlenstoffquelle Glucose (siehe Abbildung 5.33 und Tabelle 5.8) konnte für beide metabolische Analysen ein vollständig substratlimitiertes Zulaufverfahren realisiert werden. Eine Nebenproduktbildung wurde in keinem der Reaktionsansätze nachgewiesen. Für die jeweils geringste Glucose-Aufnahme ( $0,36 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) konnte zu beiden Analysezeitpunkten keine L-Phenylalanin-Bildung bestimmt werden. Analog zu den im Vorkapitel beschriebenen Satz-Experimenten konnte die in der Literatur (Oldiges 2004; Rüffer *et al.* 2004) beschriebenen maximale L-Phenylalanin-Produktionsraten ( $0,25\text{--}0,33 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) mit Glucose als Kohlenstoffquelle auch unter Zulaufbedingungen nicht erreicht werden ( $0,17 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Die primäre Ursache hierfür ist erneut in dem nicht für Glucose optimierten Stoffwechsel und Proteom der Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin als Kohlenstoffquelle zu sehen. Neben dieser im Vergleich zur Literatur verringerten maximalen L-Phenylalanin-Bildung auf Glycerin, lag während der zweiten Analyse (MA2) eine im Vergleich zur ersten Analyse (MA1) deutlich verringerte Produktbildung für die beiden hohen Zulaufstufen (B und C) vor. Gleichzeitig konnte dabei eine erhöhte Zellatmung nachgewiesen werden.

**Tabelle 5.8:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA) bestimmten zellspezifischen Raten für Substrat-Aufnahme, Produkt-Bildung, Nebenprodukt-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum während der zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (**MA1** und **MA2**) im Zulaufbetrieb mit drei Zulaufzuständen (**A**, **B** und **C**) durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Einheit:  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ). Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

Glucose	MA1					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$0,36 \pm 0,01$	$0,36^{(*)}$	$0,61 \pm 0,07$	$0,61^{(*)}$	$0,94 \pm 0,03$	$0,94^{(*)}$
L-Phe	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$	$0,14 \pm 0,00$	$0,14^{(*)}$	$0,17 \pm 0,01$	$0,17^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$1,37 \pm 0,03$	2,15	$1,75 \pm 0,01$	2,22	$1,83 \pm 0,03$	2,74
CO <sub>2</sub>	$1,67 \pm 0,01$	2,15	$1,82 \pm 0,02$	2,37	$2,03 \pm 0,05$	2,97
Biomasse	< 0,05	0,00	< 0,05	0,00	< 0,05	0,03

Glucose	MA2					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$0,36 \pm 0,01$	$0,36^{(*)}$	$0,60 \pm 0,02$	$0,60^{(*)}$	$0,99 \pm 0,03$	$0,99^{(*)}$
L-Phe	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$	$0,03 \pm 0,02$	$0,03^{(*)}$	$0,07 \pm 0,04$	$0,07^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$1,66 \pm 0,03$	2,15	$2,23 \pm 0,09$	2,52	$2,53 \pm 0,07$	$3,12^{(*)}$
CO <sub>2</sub>	$1,83 \pm 0,03$	2,15	$2,38 \pm 0,00$	2,59	$2,78 \pm 0,10$	3,30
Biomasse	< 0,05	0,00	< 0,05	0,02	< 0,05	0,05

Für das Substrat Succinat konnte in der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA 1) ebenfalls ein vollständig substratlimitiertes Zulaufprofil umgesetzt werden (siehe Abbildung 5.33 und Tabelle 5.9). Die Substrataufnahme der ersten Gleichgewichtsstufe (A) wurde nicht in L-Phenylalanin umgesetzt. Für die beiden folgenden Zufuhr-Stufen (B und C) war eine Produkt-Bildung nachweisbar. Trotz der bereits geschilderten Substratanreicherung konnten auch während der zweiten metabolischen Analyse (MA2) drei unterschiedlich hohe Aufnahmeraten eingestellt werden. Eine Produktbildung wurde dabei in keiner Gleichgewichtsstufe nachgewiesen. Hingegen lag ein zunehmender Malat-Fluss aus der Zelle vor. Die Atmungsraten waren in der zweiten Analyse (MA2) reduziert. Eine wie in den Satzexperimenten bestimmte Nebenprodukt-Bildung an Pyruvat konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht erneut den auch für die Kohlenstoffquelle Pyruvat

beschriebenen verringerten Einfluss des Überschussmetabolismus während der im Zulaufbetrieb realisierten metabolischen Kurzzeitanalysen.

**Tabelle 5.9:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA) bestimmten zellspezifischen Raten für Substrat-Aufnahme, Produkt-Bildung, Nebenprodukt-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum während der zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2) im Zulaufbetrieb mit drei Zulaufzuständen (A, B und C) durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Succinat als Kohlenstoffquelle. Einheit:  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ). Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

Succinat	MA1					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$0,73 \pm 0,01$	$0,73^{(*)}$	$1,14 \pm 0,02$	$1,14^{(*)}$	$1,66 \pm 0,03$	$1,66^{(*)}$
L-Phe	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$	$0,05 \pm 0,01$	$0,05^{(*)}$	$0,08 \pm 0,02$	$0,08^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$2,51 \pm 0,06$	2,52	$3,19 \pm 0,06$	2,95	$3,72 \pm 0,03$	3,61
CO <sub>2</sub>	$3,22 \pm 0,07$	2,89	$3,89 \pm 0,07$	3,56	$4,58 \pm 0,12$	4,59
Biomasse	< 0,05	0,00	< 0,05	0,01	< 0,05	0,03

Succinat	MA2					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$0,63 \pm 0,02$	$0,63^{(*)}$	$0,77 \pm 0,05$	$0,77^{(*)}$	$1,02 \pm 0,06$	$1,02^{(*)}$
L-Phe	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00^{(*)}$
Malat	$0,14 \pm 0,00$	$0,14^{(*)}$	$0,23 \pm 0,01$	$0,23^{(*)}$	$0,34 \pm 0,01$	$0,34^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$1,40 \pm 0,03$	1,79	$1,80 \pm 0,09$	1,87	$2,71 \pm 0,04$	2,12
CO <sub>2</sub>	$1,65 \pm 0,01$	1,97	$1,96 \pm 0,08$	2,03	$2,79 \pm 0,04$	2,32
Biomasse	< 0,05	0,00	< 0,05	0,00	< 0,05	0,01

Für die Kohlenstoffquelle Glycerin konnte für beide metabolischen Analysen ein vollständiger Verbrauch der zugeführten Substratmenge nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.33 und Tabelle 5.10). Analog zu den eingestellten Substrataufnahmeraten ergaben sich dabei zunehmende Produktbildungsraten. Während der ersten Analyse (MA1) wurden hohe Produktionsraten von bis zu  $0,31 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  erreicht. In der zweiten Analyse (MA2) konnte eine Produktbildung nur bei hoher Glycerin-Zufuhr (B und C) bestimmt werden.

Gleichzeitig wurde eine im Vergleich zur ersten Analyse (MA1) verstärkte Zellatmung und eine einsetzende Nebenprodukt-Bildung an Laktat bestimmt. Glycerin ist außerdem die im 15 L-Produktionsprozess eingesetzte Kohlenstoffquelle. In Abbildung 5.33 ist hierzu ein Vergleich der zum Analysezeitpunkt im 15 L-Prozess vorliegenden extrazellulären Flüsse (siehe Tabelle 5.6) und der während der metabolischen Kurzzeitanalysen mit Glycerin bestimmten Stoffflüsse dargestellt. Hierbei wird für beide Analysezeitpunkte ersichtlich, dass die in den metabolischen Kurzzeitanalysen eingestellten Substrataufnahmeraten eine beidseitige Auslenkung der im Prozess vorliegenden Aufnahme rate darstellen. Gleiches gilt für die resultierenden Atmungsraten und Produktbildungsraten.

**Tabelle 5.10:** Vergleich der experimentell und theoretisch (gFBA) bestimmten zellspezifischen Raten für Substrat-Aufnahme, Produkt-Bildung, Nebenprodukt-Bildung, Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidbildung und Wachstum während der zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2) im Zulaufbetrieb mit drei Zulaufzuständen (A, B und C) durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Glycerin als Kohlenstoffquelle. Einheit:  $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ). Vorgegebene Randbedingungen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung sind mit \* gekennzeichnet.

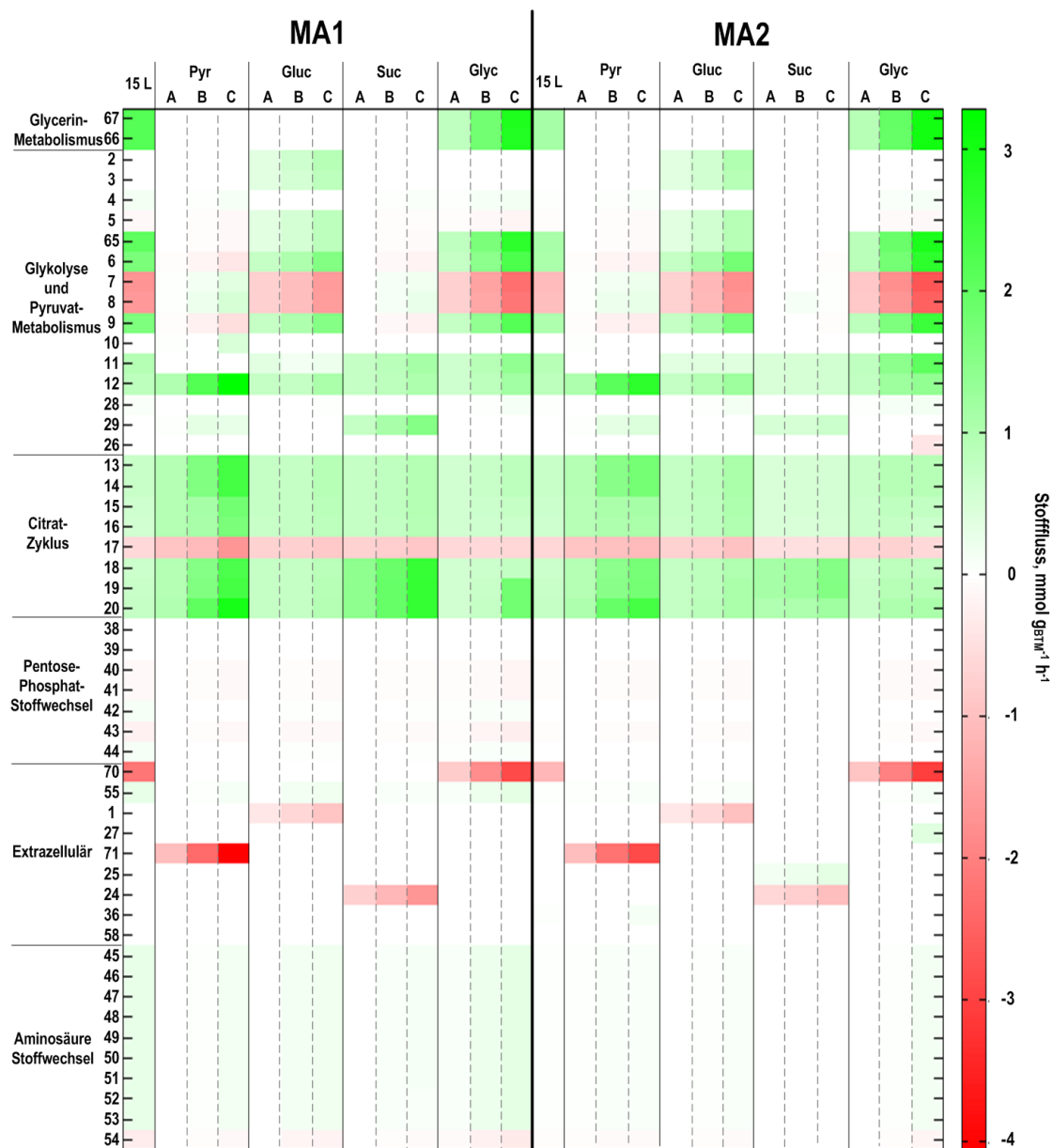
Glycerin	MA1					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$0,82 \pm 0,03$	$0,82^{(*)}$	$1,81 \pm 0,07$	$1,81^{(*)}$	$2,86 \pm 0,11$	$2,86^{(*)}$
L-Phe	$0,07 \pm 0,02$	$0,07^{(*)}$	$0,21 \pm 0,01$	$0,21^{(*)}$	$0,31 \pm 0,01$	$0,31^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$1,89 \pm 0,05$	2,23	$2,69 \pm 0,01$	2,94	$4,55 \pm 0,03$	3,84
CO <sub>2</sub>	$1,91 \pm 0,02$	1,88	$2,19 \pm 0,00$	2,31	$3,36 \pm 0,07$	2,88
Biomasse	< 0,05	0,00	< 0,05	0,03	< 0,05	0,07

Glycerin	MA2					
	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)	Fluss (gemessen)	Fluss (gFBA)
Substrat	$0,91 \pm 0,03$	$0,91^{(*)}$	$1,98 \pm 0,06$	$1,98^{(*)}$	$3,06 \pm 0,10$	$3,06^{(*)}$
L-Phe	$0,01 \pm 0,00$	$0,01^{(*)}$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03^{(*)}$	$0,12 \pm 0,06$	$0,12^{(*)}$
Laktat	-	-	-	-	$0,39 \pm 0,01$	$0,39^{(*)}$
O <sub>2</sub>	$2,60 \pm 0,01$	2,49	$3,93 \pm 0,07$	3,63	$5,85 \pm 0,09$	4,17
CO <sub>2</sub>	$2,09 \pm 0,03$	2,07	$3,03 \pm 0,06$	2,81	$4,52 \pm 0,12$	2,96
Biomasse	< 0,05	0,02	< 0,05	0,07	< 0,05	0,10

Mit den während der metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb gewonnenen extrazellulären Stoffflussverteilungen wurden analog zu den Analysen im Satzbetrieb die intrazellulären Stoffflussverteilungen abgeschätzt. Die dabei erzielten Ergebnisse stimmen hinsichtlich der aktiven Enzyme und der Stoffflussrichtungen mit den in Kapitel 5.5.2 beschriebenen Ergebnissen der Satzexperimente überein. Unterschiede ergaben sich lediglich bei den berechneten Stoffflussgrößen, die entsprechend der vorgegebenen Substrataufnahme variierten. Die mittels Flussvarianz-Analyse (FVA) bestimmten Stoffflussbereiche sind in den Tabellen A.31–A.40 im Anhang aufgeführt. Allgemein wurde durch die in den metabolischen Analysen im Zulaufbetrieb vermiedene respektive deutlich reduzierte Nebenproduktbildung eine im Vergleich zu den Satzanalysen verringerte Varianz der meisten Stoffflüsse bestimmt. Dies ermöglichte des Weiteren, dass für beide Berechnungsansätze (gFBA und FVA) die gleichen Randbedingungen an gemessenen extrazellulären Stoffflüssen genutzt werden konnten. Berechnungsansatz-spezifische Anpassungen wie für die Berechnungen der Satzanalysen waren für die im Zulaufbetrieb durchgeführten Analysen nicht notwendig, da aufgrund der vermiedenen Nebenproduktbildung keine Schleifenreaktionen auftraten.

Die Ergebnisse der geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA) werden durch die Tabellen A.31–A.40 beschrieben. Des Weiteren ist in Abbildung 5.34 ein direkter Vergleich aller während der metabolischen Analysen im Zulaufbetrieb bestimmten Stoffflussverteilungen (gFBA) dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, dass durch Variation der Substrataufnahmeraten eine gezielte Auslenkung der intrazellulären Stoffflüsse ermöglicht wurde. In allen Stoffwechselwegen konnte eine Variation der Stoffflüsse entsprechend der vorgegebenen Substrataufnahme nachgewiesen werden. Die erzielten Auslenkungen stellen dabei eine Möglichkeit der beidseitigen gezielten Beschreibung der im 15 L-Produktionsprozess vorliegenden Stoffflussverteilungen dar. Des Weiteren wird vor allem für die glykolytischen und gluconeogenetischen Reaktionen ersichtlich, dass durch die gezielte Wahl der eingesetzten Kohlenstoffquellen eine Umkehr von Reaktionen oder Aktivierung von im 15 L-Prozess inaktiven Reaktionen ermöglicht wurde. Auch die starken Größen-Unterschiede der Stoffflüsse im Citrat-Zyklus beschreiben die deutliche Auslenkung des Metabolismus während der metabolischen Analysen. Gleichzeitig wird deutlich, dass die gewählten Substrate nur geringen Einfluss auf die Stoffflussrichtungen im Pentose-Phosphat-Weg nehmen konnten. Durch die vorgegebene Aminosäuresynthese erfolgt im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel Substrat-unabhängig die Ausrichtung auf die Erythrose-4-Phosphat-Bereitstellung für den Aromatenbiosyntheseweg.





**Abbildung 5.34:** Vergleichende Flusskarte der theoretisch bestimmten intrazellulären Stoffflussverteilungen (gFBA) während der unterschiedlichen Substratzufuhrphasen (A, B und C) der unter Zulaufbedingungen durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen (MA1 und MA2) mit den Substraten Pyruvat (Pyr), Glucose (Gluc), Succinat (Suc) und Glycerin (Glyc). Jeweils am linken Rand ist die im 15 L-Produktionsprozess vorliegende intrazelluläre Stoffflussverteilung auf der Kohlenstoffquelle Glycerin aufgeführt. Die Y-Achse beschreibt die Reaktionen der unterschiedlichen Stoffwechselwege. Die dabei geführten Nummern geben die in Abbildung 3.3 eingeführten Reaktionen wieder. Die Definition der Stoffflussrichtung ist durch das genomweite Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

Sowohl während der im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen als auch während der Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb konnte eine deutliche Auslenkung der intrazellulären Stoffflüsse erreicht werden. Gleichzeitig lag in Abhängigkeit des Substrates eine Neuausrichtung der Stoffflussverteilungen im Vergleich zum Produktionsprozess vor.

Der kurze Analysenzeitraum und das über diesen Zeitraum konstante zelluläre Proteom legen eine entsprechende Regulation auf Metabolom-Ebene nahe. Durch die in Kapitel 5.2.3 beschriebene Bestimmung der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktion wurde des Weiteren die Annahme eines vergleichbaren Anteils an lebensfähigen Zellen zu den beiden Analysezeitpunkten getroffen.

Für die weitere detaillierte intrazelluläre Charakterisierung der L-Phenylalanin-Produktion war somit eine Quantifizierung der intrazellulär vorliegenden Metabolite notwendig. Hierzu erfolgte jeweils am Ende der drei Zulaufphasen (6, 12 und 18 Minuten Analysendauer) eine intrazelluläre Probenahme. Die dabei angewendete Methodik der Probenahme und Aufarbeitung wurde wie in Kapitel 4.7 beschrieben durchgeführt. In den nachfolgenden Abbildungen 5.35–5.38 werden Auszüge der quantifizierten intrazellulären Metabolite gruppiert nach ihrer Lage im Stoffwechsel dargestellt und diskutiert. Intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen sind dabei auf ein intrazelluläres Volumen von  $1,3 \mu\text{L mg}_{\text{BTM}}^{-1}$  (Link, 2009) bezogen.

Während der im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen konnten für die Substrate Glucose und Glycerin die höchsten intrazellulären Fructose-6-phosphat- (F6P) Konzentrationen bestimmt werden (siehe Abbildung 5.35). Dabei wurde während der ersten Analyse (MA1) analog zum Stufenprofil der Substrataufnahme eine zunehmende F6P-Konzentration für die beiden Kohlenstoffquellen bestimmt. Dies gilt auch für die zweite Analyse mit Glucose (MA2). Im Gegensatz dazu lag zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches (MA2) in der metabolischen Analyse mit Glycerin ein abnehmendes F6P-Profil vor. Diese veränderte Möglichkeit der F6P-Bereitstellung mit Glycerin ist vor allem deswegen von Interesse, da F6P einen Ausgangsstoff für den Pentose-Phosphat-Weg darstellt. Über die Transketolase (tkt2) erfolgt hieraus direkt die E4P-Versorgung für den Aromatenbiosyntheseweg. Eine verringerte intrazelluläre F6P-Konzentration bei zunehmender Glycerin-Zufuhr könnte dabei auf eine verschlechterte F6P-Versorgung durch die vorangehenden Reaktionen deuten. Weiter hervorzuheben ist die gute Übereinstimmung der intrazellulären F6P-Konzentrationen während der metabolischen Analysen mit Glycerin und dem 15 L-Produktionsprozess mit Glycerin als Kohlenstoffquelle. Aus der extrazellulären Substrataufnahme des Produktionsprozesses resultiert die dargestellte intrazelluläre F6P-Konzentration im 15 L-Prozess. Eine vergleichbare Konzentration an F6P während der metabolischen Analysen erfordert eine ähnliche Substrataufnahme. Dies verdeutlicht die gute metabolische Beschreibbarkeit des Produktionsprozesses durch die Methodik der im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen. Für die beiden Substrate Pyruvat und Succinat wurden nur geringe Unterschiede der intrazellulären F6P-Konzentration bestimmt.

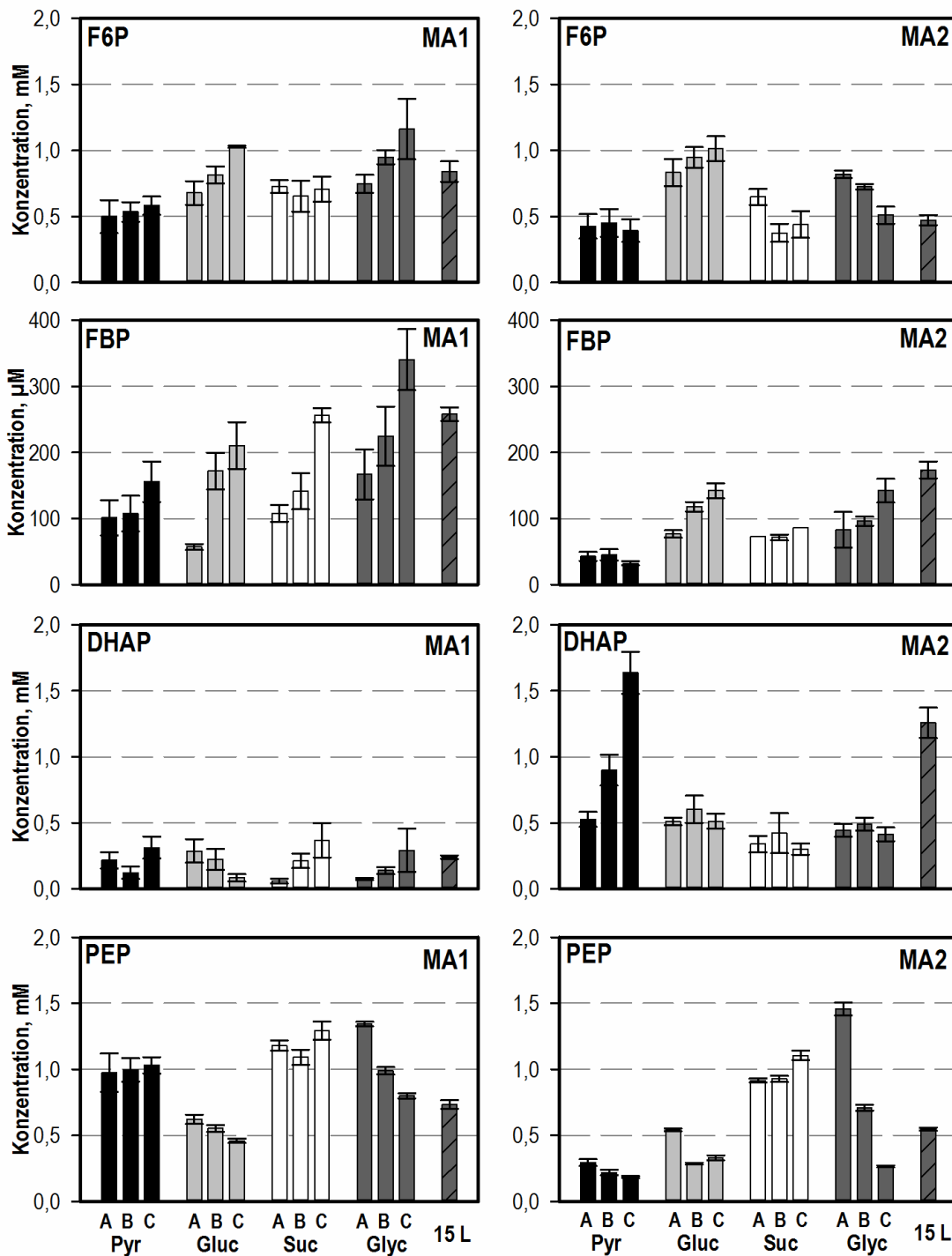
Das von Außen eingestellte Substrat-Zulaufprofil wird auch durch das Glykolyse-Intermediat Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) wiedergegeben. In Abbildung 5.35 wird während der ersten

Analyse eine substratunabhängige Zunahme der Metabolit-Konzentration bei steigender Substratzufuhr ersichtlich. Im Gegensatz dazu konnte während der zweiten Analyse eine deutlich reduzierte FBP-Konzentration in allen Reaktionsansätzen bestimmt werden.

Für Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) wurde in der zweiten Analyse hingegen eine im Vergleich zur ersten Analyse deutlich erhöhte Metabolit-Konzentration in den Zellen nachgewiesen. Besonders deutlich ist dies für die Kohlenstoffquelle Pyruvat (siehe Abbildung 5.35).

Phosphoenolpyruvat (PEP) ist bei der intrazellulären Charakterisierung von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion von besonderem Interesse, da es als Cosubstrat im Aromatenbiosyntheseweg (dahs und pscvt) benötigt wird. Für die beiden Substrate Succinat und Pyruvat wurden während der metabolischen Analyse zum Zeitpunkt hoher Produktion (MA1) vergleichbare konstante intrazelluläre PEP-Konzentrationen von 1,0–1,3 mM bestimmt. Bei Produktionsabbruch (MA2) konnten hingegen für Pyruvat nur noch deutlich verringerte PEP-Konzentrationen gemessen werden. Ausnahme stellt der Analysen-Ansatz mit Succinat als Kohlenstoffquelle dar. In diesem Reaktor wurden auch während der zweiten Analyse nahezu unveränderte PEP-Konzentrationen bestimmt. Während des Einsatzes von Glucose als Kohlenstoffquelle lag in beiden Analysen bei zunehmender Substratzufuhr eine abnehmende PEP-Konzentration in den Zellen vor. Ursache hierfür ist die Bedeutung von PEP bei der Glucose-Aufnahme über das Phosphotransferase-System. Der als globaler Regulator beschriebene Metabolit PEP (Xu *et al.*, 2012) wird bei geringer Substratverfügbarkeit in der Zelle gespeichert, um bei gesteigener Substratverfügbarkeit eine schnelle Aufnahme gewährleisten zu können. Auch für Glycerin als Substrat war eine abnehmende PEP-Konzentration während der metabolischen Analysen nachweisbar. Dies ist mit der bei gesteigerter Substratzufuhr erhöhten L-Phenylalanin-Bildung zu erklären. Im Vergleich der beiden Analysezeitpunkte ist bei Produktionsabbruch jedoch eine stärkere Auslenkung der PEP-Konzentration mit Glycerin nachweisbar. Bei vergleichbarer Substratzufuhr wie beim ersten Analysezeitpunkt (MA1) und gleichzeitig verringerter L-Phenylalanin-Bildung konnte somit eine deutliche Veränderung der intrazellulären PEP-Bereitstellung nachgewiesen werden.

## Glykolyse



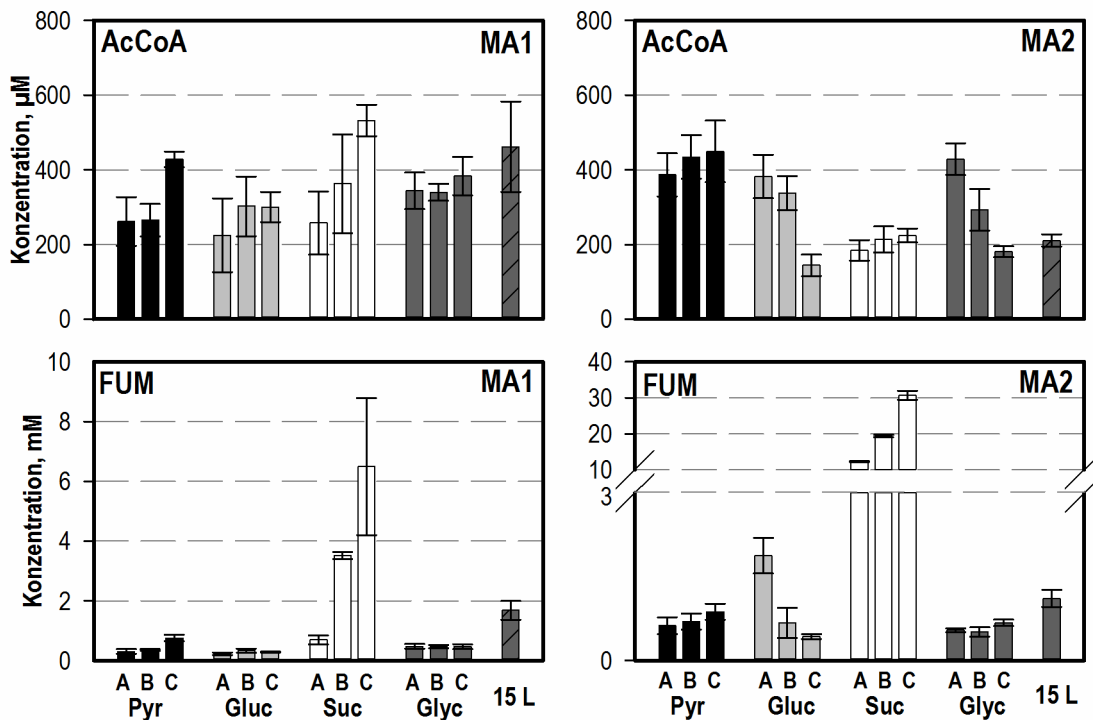
**Abbildung 5.35:** Intrazelluläre Konzentrationen der Glykolyse-Intermediate Fructose-6-phosphat (F6P), Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Phosphoenolpyruvat (PEP) während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb (drei Zulaufraten: A, B, und C) unter Verwendung der vier Kohlenstoffquellen Pyruvat (Pyr, ●), Glucose (Gluc, ●), Succinat (Suc, ○) und Glycerin (Glyc, ●) zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2). Ganz rechts dargestellt ist die zum Zeitpunkt der metabolischen Kurzzeitanalysen im Produktionsprozess (15 L, schraffiert) bestimmte intrazelluläre Metabolit-Konzentration.

Als Intermediate des Zentralstoffwechsels sind in Abbildung 5.36 die intrazellulären Metabolit-Konzentrationen von Acetyl-CoA (AcCoA) und Fumarat dargestellt. Hierbei wurde für AcCoA zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs (MA2) eine im Vergleich zur ersten Analyse (MA1) verringerte intrazelluläre Konzentration auf der Kohlenstoffquelle Succinat gemessen. Des Weiteren konnte während der zweiten Analyse eine Abnahme der AcCoA-Konzentration bei zunehmender Glucose- und Glycerin-Zufuhr bestimmt werden. Selbiges war zum Zeitpunkt einer hohen Produktion (MA1) nicht nachweisbar.

Während der beiden metabolischen Analysen mit Succinat als Substrat wurden intrazellulär hohe Fumarat- (FUM) Konzentrationen bestimmt. Da Succinat nach der Aufnahme in die Zelle durch die Succinatdehydrogenase direkt im ersten Reaktionsschritt zu FUM abgebaut werden kann, werden entsprechend hohe FUM-Konzentrationen durch die Stoffwechsel-Nähe des Metaboliten zum eingesetzten Substrat verursacht. Diese lagen zur zweiten Analyse (MA2) deutlich erhöht vor.

Die Quantifizierung von weiteren intrazellulären Metaboliten des Citrat-Zyklus war nicht möglich. Durch die in diesem Projekt verwendete sensitive massenspektrometrische Methode zur Metabolom-Quantifizierung konnten auch kleinste Konzentrationen ( $< 10 \mu\text{M}$ ) mit hoher Intensität nachgewiesen werden. Aus diesem Grund konnten Citrat-Zyklus-Intermediate wie Malat und  $\alpha$ -Ketoglutarat mit hohen Intensitäten im extrazellulären Überstand bestimmt werden. Durch die angewendete Direktextraktion der gesamten Zellsuspension bei der Probengewinnung zur Metabolomanalyse erfolgte somit eine Maskierung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen.

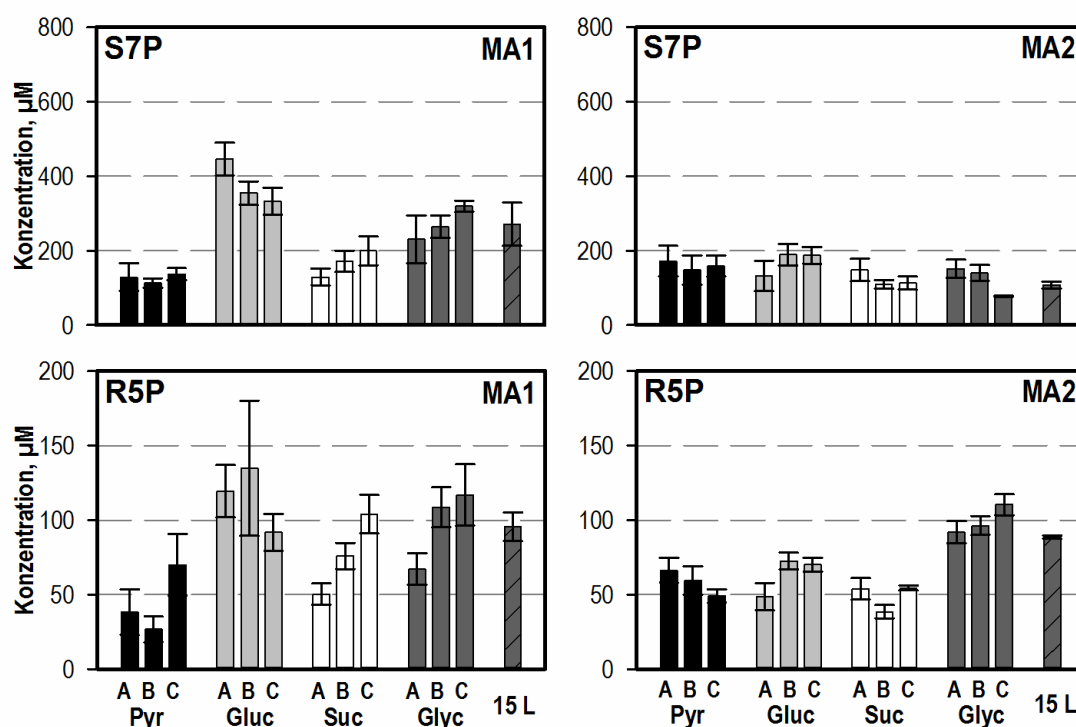
## Zentralstoffwechsel



**Abbildung 5.36:** Intrazelluläre Konzentrationen der Zentralstoffwechsel-Intermediate AcetylCoA (AcCoA) und Fumarat (FUM) während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb (drei Zulaufarten: A, B, und C) unter Verwendung der vier Kohlenstoffquellen Pyruvat (Pyr, ●), Glucose (Gluc, ●), Succinat (Suc, ○) und Glycerin (Glyc, ●) zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2). Ganz rechts dargestellt ist die zum Zeitpunkt der metabolischen Kurzzeitanalysen im Produktionsprozess (15 L, schraffiert) bestimmte intrazelluläre Metabolit-Konzentration.

Die intrazellulären Konzentrationen der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel-Intermediate Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) und Ribose-5-phosphat (R5P) während der metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb sind in Abbildung 5.37 dargestellt. Beim Vergleich der beiden Analysezeitpunkte (MA1 und MA2) konnte für S7P eine verringerte intrazelluläre Metabolit-Konzentration auf den Substraten Glucose und Glycerin bei einsetzendem Produktionsabbruch (MA 2) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ergänzt den zum Zeitpunkt der abbrechenden L-Phenylalanin-Bildung im Pentose-Phosphat-Weg bestimmten verringerten Stofffluss über die Transaldolase mit Glycerin und Glucose. Auch für R5P wurde bei abbrechender Produktion eine verringerte Metabolit-Konzentration auf der Kohlenstoffquelle Glucose nachgewiesen.

## Pentose-Phosphat-Stoffwechsel



**Abbildung 5.37:** Intrazelluläre Konzentrationen der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel-Intermediate Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) und Ribose-5-phosphat (R5P) während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb (drei Zulaufsraten: A, B, und C) unter Verwendung der vier Kohlenstoffquellen Pyruvat (Pyr, ●), Glucose (Gluc, ●), Succinat (Suc, ○) und Glycerin (Glyc, ●) zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2). Ganz rechts dargestellt ist die zum Zeitpunkt der metabolischen Kurzzeitanalysen im Produktionsprozess (15 L, schraffiert) bestimmte intrazelluläre Metabolit-Konzentration.

Für den Aromatenbiosyntheseweg konnten die drei Metabolite 3-Dehydroshikimat (3DHS), Shikimat-3-phosphat (SHK3P) und Prephenat (PPHN) während der metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb quantifiziert werden (siehe Abbildung 5.38). Besonders hervorzuheben sind die hierbei bestimmten Unterschiede zwischen den beiden Analysezeitpunkten (MA1 und MA2). So wurden während der ersten metabolischen Analyse für alle vier Kohlenstoffquellen vergleichbare intrazelluläre 3DHS-Konzentrationen (< 1,5 mM) bestimmt. Hingegen lag während der zweiten metabolischen Analyse für die Ansätze mit Glycerin als Substrat eine starke Anreicherung (2–8 mM) des Metaboliten vor. Gleichzeitig bestätigte die im 15 L-Prozess bestimmte intrazelluläre 3DHS-Konzentration von rund 5,5 mM die Metabolit-Anreicherung bei der Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle. Dieses Ergebnis zeigt, dass zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches prinzipiell ein Kohlenstofffluss in den Aromatenbiosyntheseweg bei Verwendung der Prozesskohlenstoffquelle Glycerin möglich ist. Gleichzeitig wird jedoch deutlich, dass im

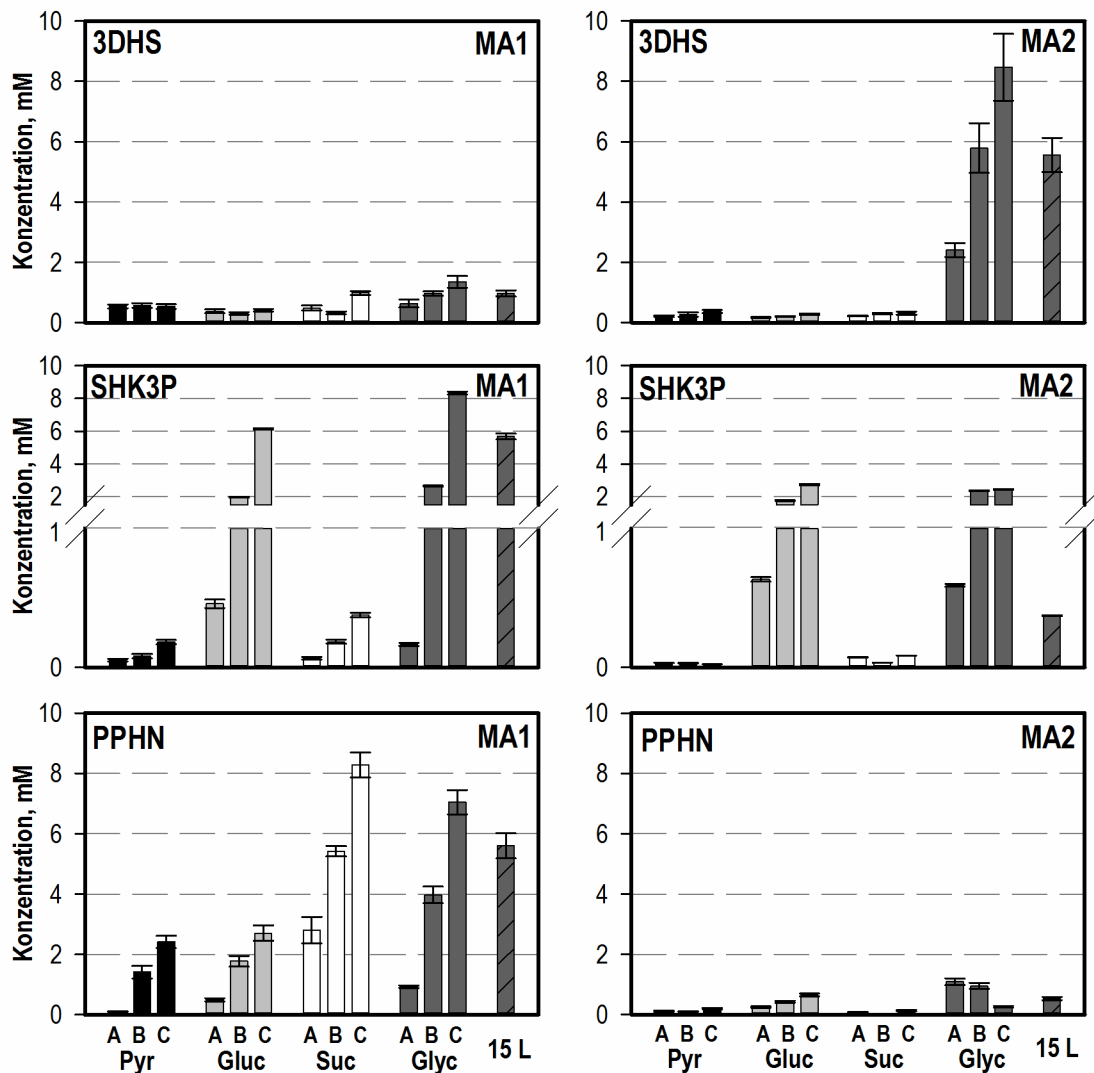
Vergleich zum Zeitraum hoher L-Phenylalanin-Produktion ein signifikanter Unterschied beim Verhältnis der 3DHS-bildenden und der 3DHS-verbrauchenden Reaktionen vorliegt.

Für die beiden Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerin konnten des Weiteren während beider metabolischen Analysen hohe intrazelluläre SHK3P-Konzentrationen bestimmt werden. Auch dieses Ergebnis beschreibt die zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches weiter bestehende Möglichkeit des Kohlenstoffflusses in den Aromatenbiosyntheseweg. Für diese beiden Kohlenstoffquellen ist darüber hinaus die im Vergleich zur ersten Analyse (MA1) reduzierte Auslenkung der dritten Gleichgewichtsstufe (C) hervorzuheben. Konnte zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Bildung noch eine deutliche Erhöhung der intrazellulären SHK3P-Konzentration bei der höchsten Substratzufuhr rate bestimmt werden, lag diese zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches auf dem Niveau der mittleren Substratzufuhr rate (B). Insgesamt beschreibt dies die zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches stärker begrenzte Möglichkeit der SHK3P-Bildung. Für die beiden organischen Säuren Pyruvat und Succinat als Kohlenstoffquellen konnte zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches hingegen keinerlei Auslenkung der intrazellulären SHK3P-Konzentration bestimmt werden.

Die in Abbildung 5.38 beschriebene intrazelluläre Prephenat-Konzentration verdeutlicht die zum zweiten Analysezeitpunkt abbrechende L-Phenylalanin-Bildung. Während zum Zeitpunkt hoher Produktion für alle vier Kohlenstoffquellen hohe Prephenat-Konzentrationen (bis 8 mM) nachweisbar waren, lagen diese zum Zeitpunkt des Produktionsendes deutlich reduziert (< 1,5 mM) vor.



## Aminosäurestoffwechsel



**Abbildung 5.38:** Intrazelluläre Konzentrationen der Aminosäurestoffwechsel-Intermediate 3-Dehydroshikimat (3DHS), Shikimat-3-phosphat (SHK3P) und Prephenat (PPHN) während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb (drei Zulaufstraten: A, B, und C) unter Verwendung der vier Kohlenstoffquellen Pyruvat (Pyr, ●), Glucose (Gluc, ●), Succinat (Suc, ○) und Glycerin (Glyc, ●) zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2). Ganz rechts dargestellt ist die zum Zeitpunkt der metabolischen Kurzzeitanalysen im Produktionsprozess (15 L, schraffiert) bestimmte intrazelluläre Metabolit-Konzentration.

### 5.6.3 Diskussion

Durch die in dieser Arbeit im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen konnte innerhalb der gegebenen Analysenzeit von rund 20 Minuten ein gezieltes Einstellen von drei konstanten biomassespezifischen Substrataufnahmeraten für jeden Analysenreaktor erfolgreich realisiert werden. Die für jede Zulaufphase bestimmten konstanten Atmungsraten für Kohlendioxid und Sauerstoff bestätigen dabei die bereits in den Satzexperimenten gezeigte Fähigkeit des Produktionsstammes *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub>, innerhalb kurzer Zeit verschiedene

Kohlenstoffquellen aufzunehmen und umzusetzen. Ebenso wurde damit die schnelle Ausbildung eines neuen metabolischen Fließgleichgewichtes verifiziert. Durch das substratlimitierende Zulaufverfahren konnte für den ersten Analysezeitpunkt eine Nebenproduktbildung und somit ein möglicher Einfluss des für den Satzbetrieb beschriebenen Überschussmetabolismus vollständig vermieden werden. Die für das Substrat Succinat zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches nachweisbare Substratanreicherung in den beiden letzten Gleichgewichtsstufen (B und C) verdeutlicht eine im Vergleich zu den Satzexperimenten verringerte maximal mögliche Aufnahme rate. Dies unterstreicht die im 15 L-Prozess sichtbare deutliche und schnelle Veränderung des Zellmetabolismus am Ende der L-Phenylalanin-Produktionsphase.

Die unter Zulaufbedingungen bestimmten extrazellulären Stoffflüsse wurden zur weiteren theoretischen Abschätzung der intrazellulären Stoffflussverteilungen genutzt. Im Vergleich zu den im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Analysen konnte dabei anhand der experimentell bestimmten Atmungsraten eine deutlich verbesserte Übereinstimmung mit den theoretisch abgeschätzten Datensätzen (gFBA und FVA) aufgezeigt werden. Dies bestätigt die in Kapitel 5.5.2 diskutierte Einflussnahme des Überschussmetabolismus auf die theoretische Stoffflussvarianz in Satzexperimenten. Allgemein wird durch metabolische Kurzzeitanalysen die wiederholte mehrfache Auslenkung des in einem Referenzzustand vorliegenden intrazellulären Fließgleichgewichtes angestrebt. Durch das gezielte Einstellen der Substrataufnahmeraten während der metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb wurde eine zielgerichtete Variation der intrazellulären Stoffflussverteilungen erreicht. Aufgrund der unter substratlimitierten Bedingungen erfolgreich vermiedenen maximalen Stoffflüssauslenkung, wie sie in Satzexperimenten nachweisbar war, sind die Kurzzeitanalysen unter Zulaufbedingungen somit besser in der Lage, die im ebenfalls substratlimitierten Prozess vorliegende Stoffflussverteilung zu beschreiben.

Durch quantitative Charakterisierung der intrazellulären Metabolite während der im Zulaufbetrieb durchgeführten Analysen konnte eine signifikante Auslenkung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen durch Variation der Substrataufnahme nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht die Fähigkeit der Zellen, die vorliegende Stoffflussverteilung durch alleinige Variation der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen gezielt umzulenken. Des Weiteren beschreiben die zwischen den beiden Analysezeitpunkten nachgewiesenen intrazellulären Änderungen der einzelnen Metabolit-Konzentrationen und deren spezifische Variation bei Auslenkung des Referenzzustandes die signifikante Veränderung des Zellmetabolismus am Ende der L-Phenylalanin-Produktionsphase.

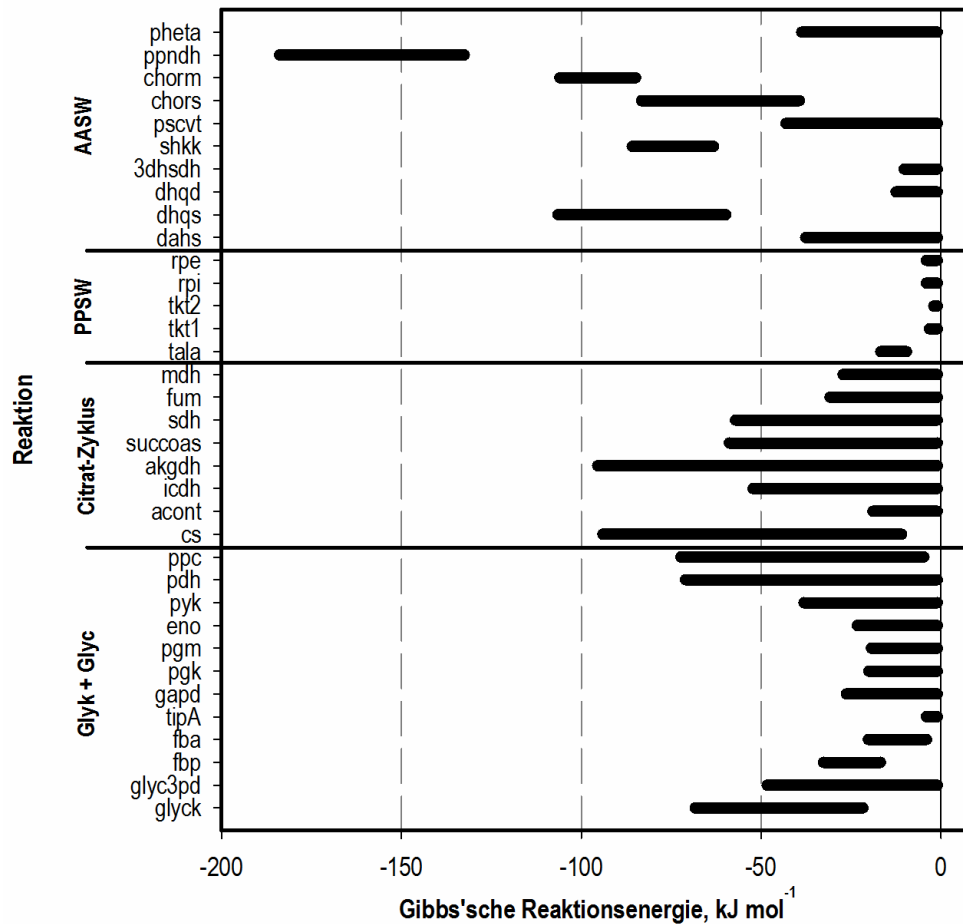
Ebenso ist hervorzuheben, dass durch die im Vergleich zu den Satzexperimenten verdreifachte Anzahl an Gleichgewichtsstufen die Menge an gewonnenen Datensätzen innerhalb einer Analyse signifikant erhöht werden konnte. Dies ermöglicht eine verbesserte Daten-basierende Analyse der während der L-Phenylalanin-Produktion vorliegenden metabolischen Kontrolle.

## 5.7 Thermodynamische Analyse des Stoffwechselnetzwerkes

Dem zweiten Gesetz der Thermodynamik zur Folge kann eine Reaktion nur in eine vorgegebene Richtung erfolgen, wenn die freie Gibbs'sche Reaktionsenergie negativ ist. Gleichzeitig wird bei bekannter Reaktionsrichtung eine thermodynamische Abschätzung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen ermöglicht (siehe Kapitel 3.7). Diese Eigenschaften prädestinieren die thermodynamische Analyse von Reaktionsnetzwerken für die Überprüfung und Ergänzung von experimentell gewonnenen Stofffluss- und Metabolom-Daten (Kümmel *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden sowohl für den 15 L-Produktionsprozess als auch für die unter Zulaufbedingungen gewonnenen Daten der metabolischen Kurzzeitanalysen thermodynamische Analysen durchgeführt.

Für die thermodynamische Analyse wurden die mittels geometrischer Flussbilanz-Analyse bestimmten Reaktionsrichtungen und die massenspektrometrisch quantifizierbaren Metabolom-Konzentrationen berücksichtigt. Grundlage der thermodynamischen Analyse stellte die anNET-Software (Zamboni *et al.*, 2008) dar. Für die zur Berechnung der Reaktionsenergien notwendigen Standard Gibbs'schen Bildungsenergien wurden sowohl die experimentellen Daten von Alberty (1998) als auch der theoretische Berechnungsansatz von Jankowski *et al.* (2008) und die daraus resultierende Datenbank „eQuilibrator“ (Flamholz *et al.*, 2012) verwendet (siehe Kapitel 4.9.2).

In Abbildung 5.39 sind beispielhaft die für den 15 L-Produktionsprozess bestimmten möglichen freien Gibbs'schen Reaktionsenergien dargestellt.



**Abbildung 5.39:** Mögliche freie Gibbs'sche Reaktionsenergien des Stoffwechselnetzwerkes zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Bildung (MA1). AASW: aromatische Aminosäurestoffwechsel, PPSW: Pentose-Phosphat-Stoffwechsel, Glyk: Glykolyse, Glyc: Glycerin-Metabolismus.

Die für den Produktionsprozess mit Glycerin dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges (rpe, rpi, tkt1, tkt2, tala) freie Gibbs'sche Reaktionsenergien nahe Null respektive kleine negative Werte aufweisen und somit nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht arbeiten. Dieses Ergebnis stimmt mit den von Kümmel *et al.* (2006) und Canelas *et al.* (2011) beschriebenen Reaktionsenergien des Pentose-Phosphat-Weges überein. Auch Chassagnole *et al.* (2002) beschreiben eine operative Nähe der Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges zum thermodynamischen Gleichgewicht. Niedrige freie Gibbs'sche Reaktionsenergien konnten auch für viele Reaktionen der Glykolyse (tipA, gapd, pgk, pgm, eno) bestimmt werden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den von Link (2009) und Canelas *et al.* (2011) beschriebenen Ergebnissen.

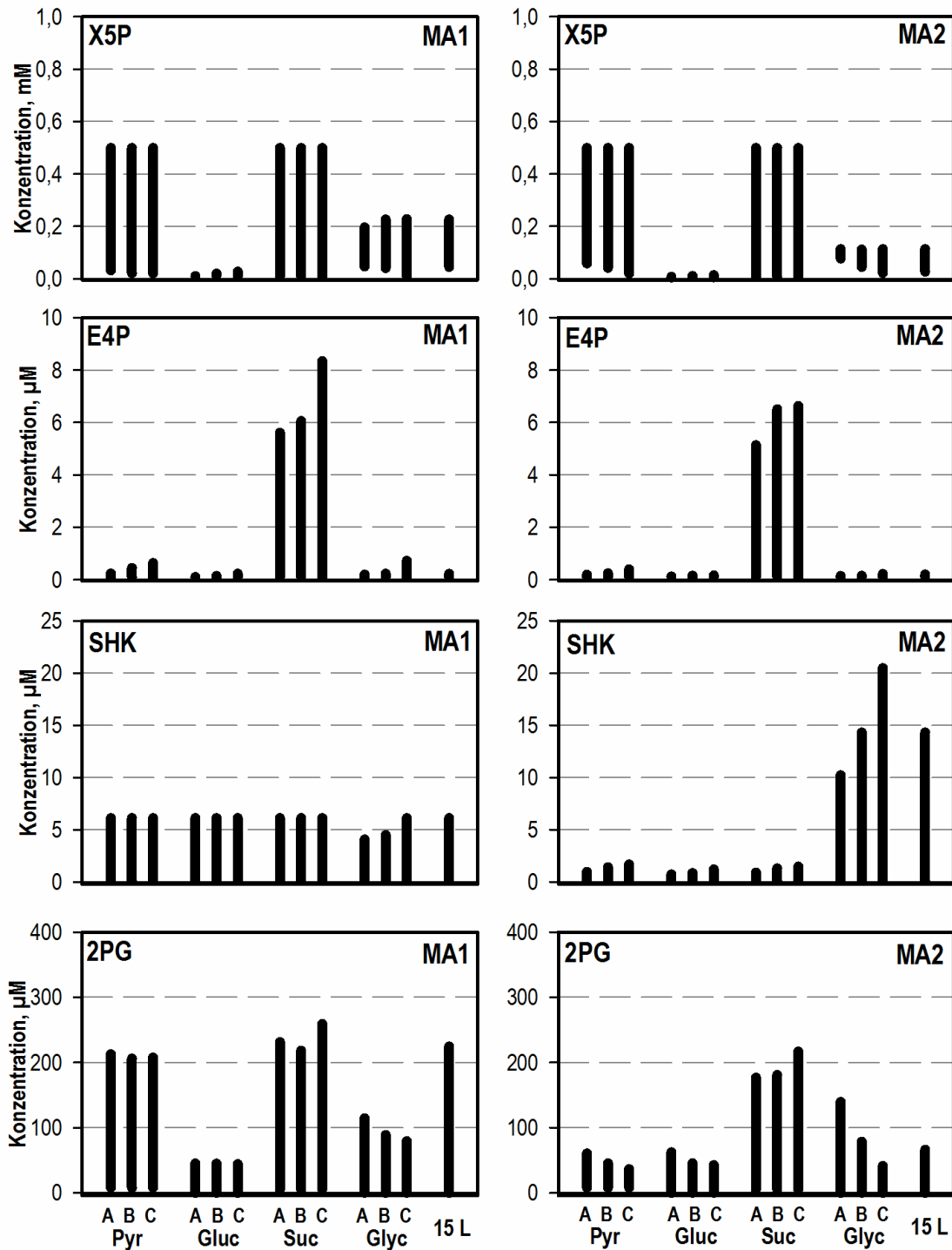
Für Reaktionen, die fern des thermodynamischen Gleichgewichtes operieren, beschreiben Zamboni *et al.* (2008) stark negative Werte der freien Gibbs'sche Reaktionsenergie ( $< -10 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Canelas *et al.* (2011) setzen bei ihren thermodynamischen Beschreibungen einen Grenzwert von  $-6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Diese Bedingung ist für die Reaktionen der Pyruvatkinase

(pyk) und Citratsynthase (cs) erfüllt. Dies gilt auch für die Dehydrogenase-Reaktionen der Pyruvatdehydrogenase (pdh),  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (akgdh), iso-Citrat-Dehydrogenase (icdh) und Succinat-Dehydrogenase (sdh). Gleiches ist auch von Link (2009) für das Reaktionsnetzwerk von *E. coli* K12 beschrieben. Für die übrigen Reaktionen des Citrat-Zyklus (aconit, mdh, fum) wurden deutlich kleinere negative Werte der möglichen freien Gibbs'schen Reaktionsenergien bestimmt. Trotzdem ist eine Eingruppierung hinsichtlich der Nähe zum thermodynamischen Gleichgewicht nicht eindeutig. Eine Ursache hierfür ist das Fehlen genauer Metabolit-Konzentrationen für einige Intermediate des Citrat-Zyklus (siehe Kapitel 5.6.2). Die bei der Berechnung getroffene Annahme eines möglichen Konzentrationsbereiches von 1  $\mu$ M–10 mM verursacht die beschriebene Varianz der möglichen freien Gibbs'schen Reaktionsenergie. In den von Link (2009) und Canelas *et al.* (2011) beschriebenen experimentell gestützten Berechnungen operieren die genannten Reaktionen nahe am thermodynamischen Gleichgewicht.

Für die gluconeogenetische Reaktion der Fructosebisphosphat-aldolase (fba) wurde in dieser Arbeit eine mögliche freie Gibbs'sche Reaktionsenergie zwischen -4 und -20 kJ mol<sup>-1</sup> bestimmt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der von Canelas *et al.* (2011) getroffenen thermodynamischen Einstufung zwischen -10 und -11 kJ mol<sup>-1</sup> und somit fern des thermodynamischen Gleichgewichtes.

Die in diesem Projekt für den Aromatenbiosyntheseweg bestimmten möglichen freien Gibbs'schen Reaktionsenergien beschreiben mitunter stark negative Werte. Dies stimmt mit den theoretischen Betrachtungen von Henry *et al.* (2007) überein. Dessen thermodynamische Analyse des *E. coli*-Reaktionsnetzwerkes identifizierte insgesamt 30 Reaktionen, welche Kandidaten für eine starke metabolische Regulation darstellen und damit stark negative Gibbs'sche Reaktionsenergien aufweisen müssen. Für den Aromatenbiosyntheseweg sind hierbei die Reaktionen der 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase (dahs), 3-Dehydroquinat-Synthase (dhqs), Chorismat-Synthase (chors), Chorismat-Mutase (chorm) und Prephenatdehydrogenase (ppndh) beschrieben.

Neben der Beschreibung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien erlaubt die thermodynamische Netzwerkanalyse die Abschätzung der möglichen Konzentrationsbereiche von nicht-experimentell bestimmten intrazellulären Metaboliten. Hierfür sind in Abbildung 5.40 beispielhaft die abgeschätzten Metabolit-Konzentration von Xylulose-5-phosphat (X5P), Erythrose-4-phosphat (E4P), Shikimat (SHK) und 2-Phosphoglycerat (2PG) dargestellt.



**Abbildung 5.40:** Theoretisch mögliche intrazelluläre Konzentrationsbereiche der nicht-experimentell bestimmten Metabolite Xylulose-5-Phosphat (X5P), Erythrose-4-Phosphat (E4P), Shikimat (SHK) und 2-Phosphoglycerat (2PG), abgeschätzt mittels thermodynamischer Analyse des Stoffwechselnetzwerkes aus Daten der beiden metabolischen Analysen (MA1 und MA2).

Für Xylulose-5-phosphat konnte im Falle der beiden Substrate Glycerin und Glucose eine enge Eingrenzung der möglichen Metabolit-Konzentrationen bestimmt werden. Vor allem für

die Kohlenstoffquelle Glucose sind nur sehr geringe X5P-Konzentrationen bis rund  $18 \mu\text{M}$  thermodynamisch sinnvoll. Dies deckt sich mit der durchgeführten massenspektrometrischen Analyse, bei welcher X5P nicht nachgewiesen wurde.

Die quantitative intrazelluläre Bestimmung von Erythrose-4-Phosphat wird durch die geringe chemische Beständigkeit des Analyten erschwert (Oldiges *et al.*, 2004). Des Weiteren beschreiben bereits frühe Ansätze (Williams *et al.*, 1980), dass durch die Tendenz von E4P zur Ausbildung von Dimeren nur geringste Metabolit-Konzentrationen *in vivo* zu erwarten sind. Für andere Organismen (*Aspergillus niger*) konnte in Untersuchungen bis zu einer Nachweisgrenze von  $25 \text{ pM}$  kein E4P gemessen werden (Ruijter und Visser, 1999). Auch in diesem Projekt war E4P intrazellulär nicht nachweisbar. Die in Abbildung 5.40 beschriebenen thermodynamisch maximal möglichen Konzentrationsbereiche an E4P während der metabolischen Kurzzeitanalysen bestätigen dabei die in der Literatur beschriebene Vermutung, dass E4P nur in äußerst niedrigen Konzentrationen in *E. coli* vorliegen kann.

Für Shikimat konnte in allen Reaktionsansätzen ein vergleichbarer Konzentrationsbereich abgeschätzt werden (MA1: ca.  $5 \mu\text{M}$ ; MA2: ca.  $2 \mu\text{M}$ ). Ausnahme stellen hierbei die Ansätze der zweiten metabolischen Analyse mit Glycerin und der dazugehörige Referenzzustand im Produktionsprozess dar. Ursache hierfür ist die in diesen Ansätzen deutlich erhöhte nachweisbare intrazelluläre 3DHS-Konzentration (siehe Kapitel 5.6.2). Da 3DHS als Ausgangsstoff für die Shikimat-Bildung dient, korreliert die Shikimat-Konzentration thermodynamisch mit der erhöhten 3DHS-Konzentration.

Neben der Abschätzung von analytisch nicht-erfassbaren Metaboliten wird durch die thermodynamische Analyse von Netzwerken auch die Unterscheidung von Isomeren gefördert. Ein Beispiel hierfür sind die beiden durch die Phosphoglyceratmutase ineinander überführbaren Isomere 2-Phosphoglycerat (2PG) und 3-Phosphoglycerat (3PG). Diese konnten in dieser Arbeit mit der gewählten massenspektrometrischen Methode nur in ihrer Gesamtheit erfasst werden. Durch die Vorgabe der Gesamtkonzentration an 2/3PG bei der thermodynamischen Netzwerkanalyse wird jedoch eine quantitative Unterscheidung der beiden Isomere ermöglicht. Die so bestimmten Konzentrationsbereiche für 2PG sind in Abbildung 5.40 aufgeführt.

## Diskussion

Durch die mathematische Lösbarkeit der thermodynamischen Netzwerkanalyse konnten die verwendeten Daten der intrazellulären Stoffflussrichtungen und Metabolit-Konzentrationen erfolgreich auf ihre Konsistenz überprüft werden.

Des Weiteren ermöglichte die Abschätzung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien eine erste Eingruppierung der Reaktionen bezüglich ihrer Nähe zum thermodynamischen

Gleichgewicht. Die bestimmten Reaktionsenergien sind in guter Übereinstimmung mit bereits für *E. coli* beschriebenen Datensätzen. Schwachstelle bei der Abschätzung der Reaktionsenergien stellen die der Berechnung zu Grunde gelegten Daten der Standard Gibbs'schen Bildungsenergien dar. Aufgrund von teilweise fehlenden experimentellen Daten rücken hierbei theoretische Berechnungsansätze in den Vordergrund (Jankowski *et al.*, 2008). Die dabei gezeigten Abweichungen zu experimentellen Daten nehmen Einfluss auf die genaue Bestimmbarkeit der Standard Gibbs'schen Bildungsenergien. Gruppenübergreifende Plattformen (Flamholz *et al.*, 2012) tragen jedoch zu einer sukzessiven Verbesserung der Datensätze bei.

Neben der freien Gibbs'schen Reaktionsenergie ermöglichen auch andere Kriterien wie die Beschreibung des aus den beteiligten Metabolit-Konzentrationen bestimmbaren Reaktionsquotienten eine Eingruppierung der Reaktionen bezüglich ihrer Nähe zum thermodynamischen Gleichgewicht (Canelas *et al.*, 2011). Voraussetzung für die dabei geführte kinetische *in vivo* Beschreibung des dynamischen Reaktionssystems ist jedoch eine genaue und zeitlich hochauflösende quantitative Erfassung aller an der Reaktion beteiligten Metabolite.



## 5.8 Metabolische Kontrollanalyse

Um Reaktionen im Stoffwechselnetzwerk identifizieren zu können, welche den Stofffluss hin zum Produkt L-Phenylalanin kontrollieren, wurde in dieser Arbeit der Ansatz der Metabolischen Kontrollanalyse (MCA) angewendet. Grundlage für die Bestimmung von Kontrollkoeffizienten sind die in Kapitel 3.8.2 hergeleiteten Gleichungen (3.65) und (3.66).

Im Folgenden soll das dabei verwendete metabolische Stoffwechselnetzwerk sowie die Abschätzung der während der Produktionsphase vorliegenden Elastizitäten beschrieben werden, bevor durch einen Vergleich der zu zwei Produktionszeitpunkten bestimmten Kontrollkoeffizienten Unterschiede im Produktionsmetabolismus diskutiert werden.

### 5.8.1 Metabolisches stöchiometrisches Netzwerk

An dieser Stelle muss hervorgehoben werden, dass der Ansatz der MCA, wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben, eine Linearisierung um einen Referenzzustand beschreibt. In dieser Arbeit stellt der L-Phenylalanin-Produktionsprozess im 15 L-Maßstab diesen Referenzzustand dar. Alle in den metabolischen Analysen erzielten ausgelenkten Stoffflüsse und Metabolit-Konzentrationen werden auf diesen Referenzzustand normiert. Aus diesem Grund konnten im Modell der MCA keine Reaktionen berücksichtigt werden, die im 15 L-Produktionsprozess keine Aktivität aufwiesen respektive für welche ein Null-Fluss bei der theoretischen Stoffflussabschätzung bestimmt wurde. Beispiele für im Referenzzustand inaktive Reaktionen im Zentralstoffwechsel sind die glykolytischen Reaktionen der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (pgi) und Phosphofruktokinase (pfk) sowie die oxidativen Reaktionen des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (g6pdh) und die Umsetzung von 6-Phosphogluconolacton zu Ribulose-5-Phosphat (gnd)). Gleiches gilt für die Reaktionen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (ppck) und Reaktionen der gemischten Säuregärung.

Für die Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (ppc) waren mit beiden theoretischen Stoffflussberechnungsansätzen (gFBA und FVA) nur sehr geringe Stoffflüsse im Referenzzustand nachweisbar (MA2: gFBA  $0,03 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , FVA  $0,00\text{--}0,07 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Gleichzeitig konnten die Daten des FVA-Berechnungsansatzes aufgrund des möglichen Null-Flusses nicht als Referenzfluss genutzt werden. Aus diesem Grund konnte die Reaktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase ebenfalls nicht im MCA-Modell berücksichtigt werden.

Alle im MCA-Modell berücksichtigten Reaktionen sind in Tabelle A.41 aufgeführt. Als Grundlage für die Stöchiometrie diente das für die theoretische Stoffflussabschätzung verwendete genomweite *E. coli* Modell iAF1260 (Feist *et al.*, 2007).

Der Energiespeicher ATP wird in der Zelle für eine Vielzahl an Prozessen benötigt, welche nicht durch die Reaktionen des Zentralstoffwechsels erfasst werden. Um diese Vorgänge im MCA-Modell berücksichtigen zu können, wurde wie bereits in anderen Studien (Link, 2009; Thomas und Fell, 1998) eine ATP-verbrauchende ATPase-Reaktion eingeführt. Die extrazelluläre Glycerin-Aufnahme durch Diffusion oder erleichterte Diffusion wurde im MCA-Modell nicht als eigenständige Reaktion berücksichtigt. Hierbei wurde bereits gezeigt, dass ungleich zur Glucose-Aufnahme über das Phosphotransferase-System (Chassagnole *et al.*, 2002; Link, 2009) keine Kontrolle durch Glycerin und den entsprechenden Aufnahmemechanismus auf die intrazellulären Reaktionen ausgeübt wird (Cintolesi *et al.*, 2012).

Das resultierende metabolische Netzwerk setzte sich aus 38 Reaktionen und 44 Metaboliten zusammen. Es ergab sich somit eine stöchiometrische Matrix  $N$  mit der Dimension  $(44 \times 38)$ . Um die in Gleichung (3.57) eingeführte reduzierte stöchiometrische Matrix  $N_R$  bestimmen zu können, war eine Einteilung der 44 Metabolite in  $m_i$  unabhängige und  $m_d$  abhängige Metabolite notwendig. Die stöchiometrische Matrix  $N$  besitzt dabei einen Rang von 37 und somit waren  $m_d = 7$  abhängige Metabolite zu wählen. Neben den Metaboliten ADP, NADH, NADPH, Q8H<sub>2</sub> und CoA wurden die beiden Metabolite L-Glutamat und L-Phenylalanin als abhängige Metabolite festgelegt. Die reduzierte stöchiometrische Matrix  $N_R$  ( $37 \times 38$ ) setzte sich aus den restlichen 37 unabhängigen Metaboliten zusammen und ermöglichte die Bestimmung der in Gleichung (3.57) definierten normierten Link-Matrix  $L_0$ .

### 5.8.2 Elastizitäten

Wie in Gleichung (3.65) und (3.66) beschrieben, ist zur Bestimmung von Kontrollkoeffizienten die Kenntnis der vorliegenden Elastizitäten  $\varepsilon_x^v$  notwendig. Die Elastizitäten beschreiben die kinetischen Eigenschaften des metabolischen Netzwerkes und werden in der Matrix  $E$  zusammengefasst. Positive Werte umschreiben hierbei eine aktivierende Wirkung des Metaboliten auf den Stofffluss, wohingegen negative Werte einer Reduzierung gleichgesetzt werden können.

Die Bestimmung von Elastizitäten erfolgte in dieser Arbeit durch zwei unterschiedliche Ansätze. Für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht (16 Reaktionen) wurden Elastizitäten über den von Nielsen (1997) eingeführten und in Gleichung (3.49) beschriebenen Ansatz aus der freien Gibbs'schen Reaktionsenergie  $\Delta_r G$  abgeschätzt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Elastizitäts-Bestimmung für die Reaktionen fern des thermodynamischen Gleichgewichtes (22 Stück) mit den in Gleichung (3.45) beschriebenen lin-log Modellen.

Um sowohl Varianzen der theoretischen Stoffflussberechnung als auch die Lösungsbereiche der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien sowie die experimentellen Fehler der intrazellulären Metabolom-Quantifizierung bei der Elastizitäts-Abschätzung berücksichtigen zu können, wurde eine Monte-Carlo-Simulation mit 10.000 Berechnungszyklen durchgeführt. Durch diesen von Wang *et al.* (2004) eingeführten Ansatz war es möglich, Daten-Unsicherheiten bei der Abschätzung der kinetischen Netzwerkeigenschaften zu berücksichtigen.

Die hierbei für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht verwendeten Lösungsbereiche der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien sind in Tabelle 5.11 aufgeführt und basieren auf Abbildung 5.40. Wie durch Gleichung (3.49) beschrieben, besitzen Reaktionen mit  $-1 < \Delta_r G < 0 \text{ kJ mol}^{-1}$  unrealistisch hohe Elastizitäten, was die Anwendbarkeit des Thermokinetik-Ansatzes von Nielsen (1997) auf niedrigere freie Gibbs'sche Reaktionsenergien einschränkt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit als höchst mögliche  $\Delta_r G_{min}$  ein Wert von  $-1 \text{ kJ mol}^{-1}$  angenommen, wie von Link (2009) vorgeschlagen. Im Gegenzug wurde, wie von Zamboni *et al.* (2008) beschrieben, ein minimaler Wert von  $-10 \text{ kJ mol}^{-1}$  für  $\Delta_r G_{max}$  angenommen, sofern keine genaueren Berechnungen vorlagen.

**Tabelle 5.11:** Gewählte Lösungsbereiche der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien  $\Delta_r G$  für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht. Die Auswahl der Reaktionen erfolgte durch NET-Analysen des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses zu den beiden Zeitpunkten der metabolischen Analysen (MA1 und MA2). Soweit keine genaueren Berechnungen vorlagen, wurde dabei ein Wert von  $-10$  oder  $-1 \text{ kJ mol}^{-1}$  angenommen.

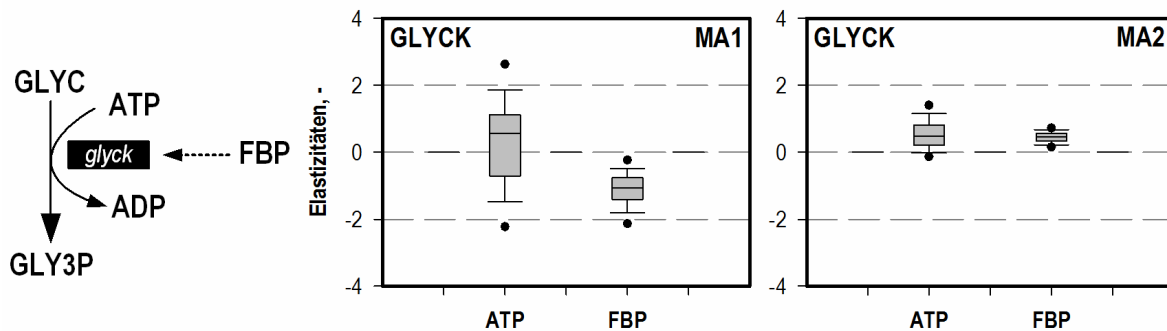
Reaktion	MA1		MA2	
	$\Delta_r G_{min}, \text{ kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G_{max}, \text{ kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G_{min}, \text{ kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G_{max}, \text{ kJ mol}^{-1}$
tipA	-7,66	-1,00	-4,09	-1,00
gapd	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
pgk	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
pgm	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
eno	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
acont	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
succoas	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
fum	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
mdh	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
rpe	-7,86	-1,00	-7,92	-1,00
rpi	-7,86	-1,00	-7,92	-1,00
tkt1	-9,57	-1,00	-4,09	-1,00
tkt2	-4,90	-1,00	-3,45	-1,00
tala	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
dhqd	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00
3dhsdh	-10,00	-1,00	-10,00	-1,00

Insgesamt konnten somit durch die Anwendung der Monte-Carlo-Simulation auf die Lösungsbereiche der Stoffflussverteilungen, Metabolit-Konzentrationen und freien Gibbs'schen Reaktionsenergien 10.000 Elastizitätsdatensätze bestimmt werden. Die für beide metabolischen Analysen (MA1 und MA2) mit dem lin-log Ansatz erzielten Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben und hinsichtlich der in der Literatur beschriebenen Effektoren diskutiert. Die Darstellung erfolgt als „Box-Plot“, wobei der Lösungsbereich von 50 % der Elastizitäten durch graue Balken wiedergegeben wird (Querbalken=Median). Fehlerbalken beschreiben die 25 %- respektive 75 %-Quantile. Schwarze Punkte kennzeichnen die 5 %- respektive 95 %-Quantile.

### **Glycerin-Stoffwechsel**

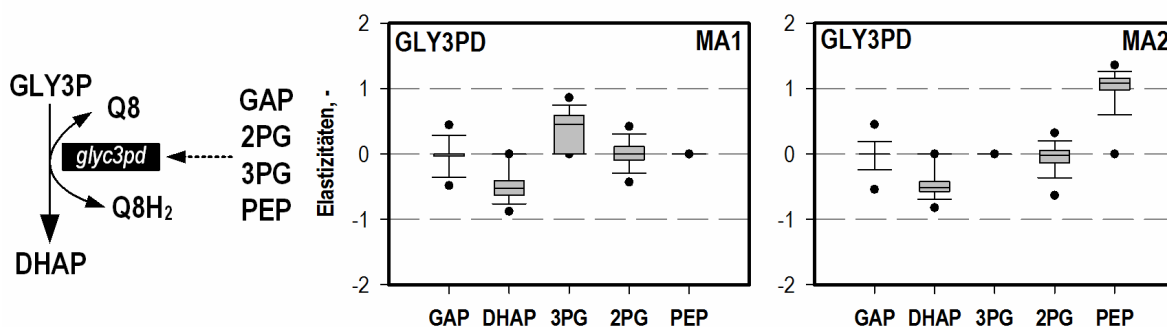
Für die Reaktion der Glycerinkinase (glyck), die erste aerobe Reaktion des Glycerin-Metabolismus, ist das Glykolyse-Intermediat Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) als primärer Regulator beschrieben (Thorner und Paulus, 1973). Die aufgeführte Inhibitionskinetik von FBP wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1–2,0 mM *in vitro* bestimmt. Die in dieser Arbeit aus den Daten der ersten metabolischen Analyse (MA1) bestimmten negativen Elastizitäten bestätigen die inhibierende Wirkung von FBP auf die Glycerinkinase (siehe Abbildung 5.41). Im Gegensatz dazu konnten aus den Daten der zweiten Analyse (MA2) leicht positive Elastizitäten bestimmt werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist in der verringerten intrazellulären FBP-Konzentration (0,03–0,19 mM) zum zweiten Analysezeitpunkt im Vergleich zur ersten Analyse (0,05–0,39 mM) zu sehen. Auch Thorner und Paulus (1973) beschreiben bei einer FBP-Konzentration von 0,1 mM eine deutlich verringerte Inhibierung von ~5% im Vergleich zu ~25% bei einer FBP-Konzentration von 0,25 mM.

Die von Pettigrew *et al.* (1990) beschriebene aktivierende Wirkung von ATP auf die Glycerinkinase konnte nur durch die positiven Elastizitäten der zweiten metabolischen Analyse bestimmt werden (siehe Abbildung 5.41).



**Abbildung 5.41:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Glycerinkinase (glyck) hinsichtlich der beiden Effektoren ATP und Fructose-1,6-bisphosphat (FBP).

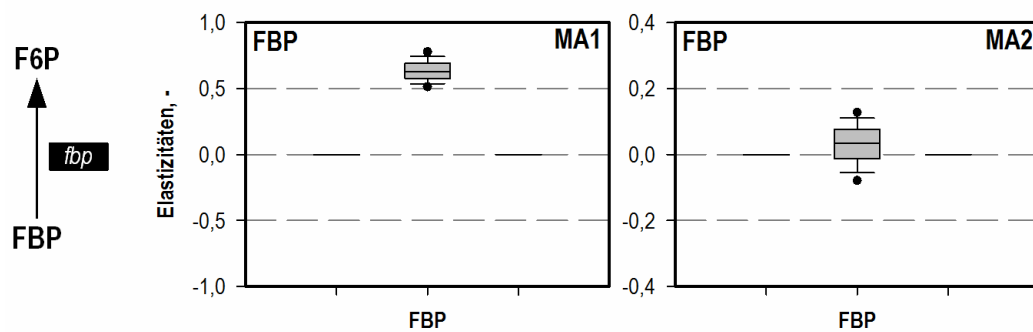
Für die aerobe Quinon-abhängige Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (gly3pd) ist eine Inhibition durch das Reaktionsprodukt Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) beschrieben (Schryvers *et al.*, 1978). Dies wird durch die in dieser Arbeit für beide Analysen bestimmten negativen Elastizitäten bestätigt (siehe Abbildung 5.42). Schryvers *et al.* (1978) vermuten des Weiteren eine inhibierende Wirkung durch die Struktur-analogen Substanzen Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), 2/3-Phosphoglycerat (2/3PG) und Phosphoenolpyruvat (PEP). Durch die in dieser Arbeit bestimmten Elastizitäten wird eine inhibierende Wirkung der Metabolite auf die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase nicht ersichtlich. Die Elastizitäten hinsichtlich Phosphoenolpyruvat lassen zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs hingegen sogar eine aktivierende Wirkung des Metaboliten vermuten.



**Abbildung 5.42:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (gly3pd) hinsichtlich der Effektoren Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), 2/3-Phosphoglycerat (2/3PG) und Phosphoenolpyruvat (PEP).

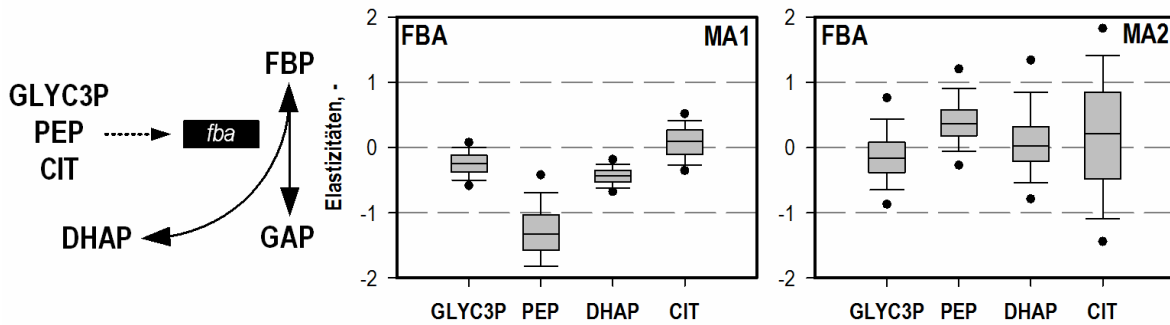
## Glykolyse und Gluconeogenese

Für die Fructose-6-Phosphat-bildende Reaktion der Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp) konnte durch die Bestimmung der Elastizitäten hinsichtlich des Eduktes Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) eine stark aktivierende Rolle des Metaboliten auf das Enzym zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (MA1) gezeigt werden (siehe Abbildung 5.43). Im Gegensatz dazu wurden zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs nur niedrige positive Elastizitätskoeffizienten bestimmt.



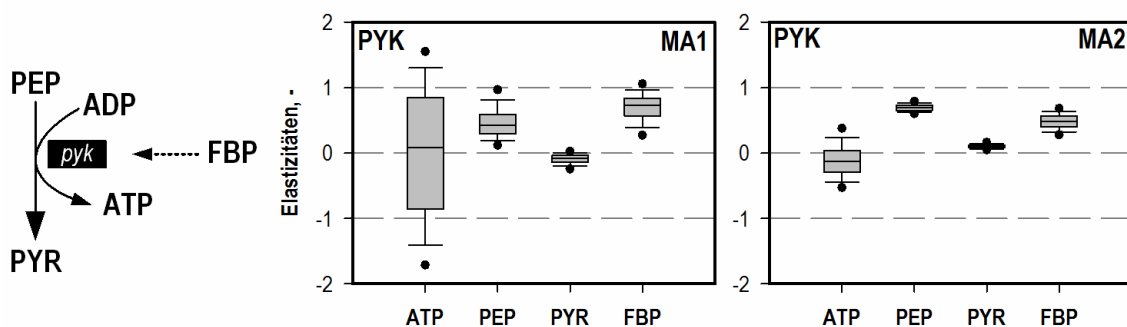
**Abbildung 5.43:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp) hinsichtlich des Eduktes Fructose-1,6-bisphosphat.

Für die Reaktion der Fructosebisphosphat-Aldolase (fba) werden in Datenbanken (Karp *et al.*, 2014) eine Vielzahl an möglichen Effektoren geführt. Hierbei sind vor allem die Metabolite Glycerin-3-Phosphat (GLYC3P), Phosphoenolpyruvat (PEP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Citrat (CIT) zu nennen. Die genaue Wirkung dieser Metabolite auf das Enzym ist dabei nicht beschrieben. Die genannten Effektoren wurden in dieser Arbeit bei der Bestimmung der Fructosebisphosphat-Aldolase-Elastizitäten berücksichtigt. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 5.44 dargestellt. Betrachtet man die Daten aus beiden Analysen, so kann für CIT keine regulierende Wirkung beschrieben werden. Hingegen kann für PEP eine sich über den Prozessverlauf ändernde regulatorische Bedeutung vermutet werden. Die Elastizitäten bezüglich GLY3P und DHAP zeigen hingegen in MA1 leicht negative Werte.



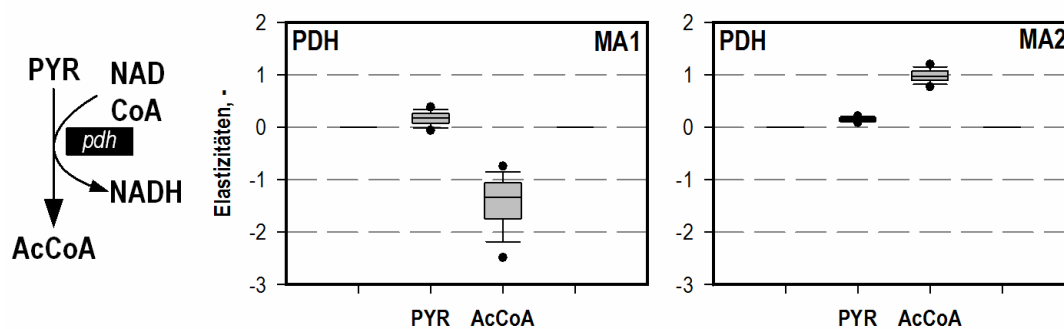
**Abbildung 5.44:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Fructosebisphosphat-Aldolase (*fba*) hinsichtlich der Effektoren Glycerin-3-Phosphat (GLYC3P), Phosphoenolpyruvat (PEP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Citrat (CIT).

Der Reaktion der Pyruvatkinase wird eine Schlüsselrolle als regulierender Schritt der Glykolyse zugesprochen. Hierbei erfolgt durch allosterische Regulation mittels Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) die Aktivierung des Enzyms (Speranza *et al.*, 1990). Entsprechend konnten in dieser Arbeit positive Elastizitäten aus den Daten der metabolischen Analysen bestimmt werden (siehe Abbildung 5.45). Ebenso wird aus den Ergebnissen deutlich, dass das Reaktionssubstrat Phosphoenolpyruvat (PEP) die Reaktion fördert. Hingegen wird aus den Daten der ersten Analyse eine leicht inhibierende Wirkung des Produktes (PYR) ersichtlich. Die von Link (2009) gezeigten Ergebnisse bestätigen die hier bestimmten Elastizitätskoeffizienten hinsichtlich FBP, PYR und PEP. Eine regulierende Wirkung von ATP auf die Pyruvatkinase, wie in Datenbanken (Karp *et al.*, 2014) vermutet, konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden.



**Abbildung 5.45:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Pyruvatkinase (*pyk*) hinsichtlich der Effektoren ATP, Phosphoenolpyruvat (PEP), Pyruvat (PYR) und Fructose-1,6-bisphosphat (FBP).

Für die Pyruvat-abbauende Reaktion der Pyruvatdehydrogenase (pdh) ist Pyruvat als Aktivator aufgeführt (Chassagnole *et al.*, 2002; Link *et al.*, 2013). Der dabei ermittelte Hill-Koeffizient der Enzymkinetik beträgt 3,68. Wie von Link (2009) beschrieben, sind Elastizitäten der Pyruvatdehydrogenase hinsichtlich Pyruvat somit auf einen Wertebereich von 0–3,68 begrenzt. Dies unterstützt die in dieser Arbeit bestimmten positiven Elastizitäten der Pyruvatdehydrogenase hinsichtlich Pyruvat. Des Weiteren konnte eine sich ändernde regulierende Wirkung des Produktes AcCoA auf die Reaktion gezeigt werden (siehe Abbildung 5.46).



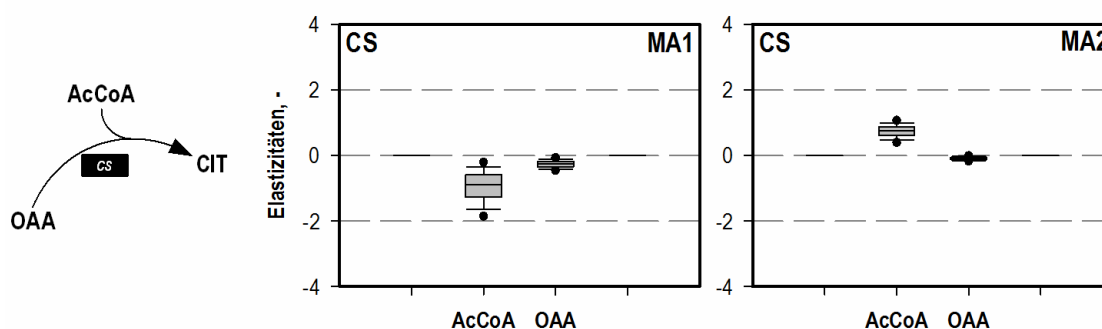
**Abbildung 5.46:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Pyruvat-Dehydrogenase (pdh) hinsichtlich der Effektoren Pyruvat (PYR) und AcCoA.

## Citrat-Zyklus

Effektoren für die Reaktionen im Citratstoffwechsel wurden in dieser Arbeit wie von Link (2009) beschrieben gewählt (siehe Tabelle A.41).

Hierbei wurde für die Citrat-Synthase (cs) eine Regulation durch Oxalacetat (OAA) und AcCoA, wie von Robinson *et al.* (1983) beschrieben, angenommen. Die daraus resultierenden Elastizitäten sind in Abbildung 5.47 dargestellt. Es wird im Gegensatz zu AcCoA ein nur geringer Einfluss von OAA auf die Reaktion der cs ersichtlich. Die gleichzeitig nachgewiesene Inhibition durch NADH (Robinson *et al.*, 1983) wurde analog zu Link (2009) mittels Elastizitätsabschätzungen im Wertebereich  $-0,1 > \varepsilon_{\text{NADH}}^{\text{cs}} > -1,0$  durch Monte-Carlo-Simulation berücksichtigt.





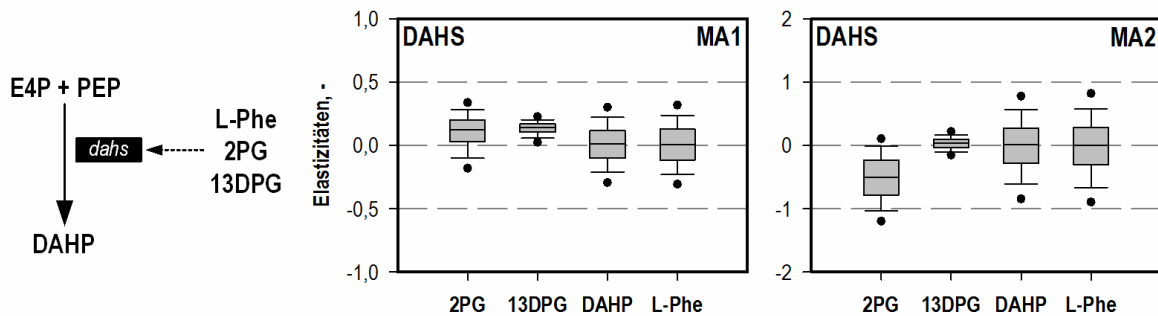
**Abbildung 5.47:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Citrat-Synthase (cs) hinsichtlich der Effektoren AcCoA und Oxalacetat (OAA).

Für das Enzym  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (akgdh) wurde die von Frank *et al.* (2007) vermutete inhibierende Wirkung des Produktes OAA ebenfalls durch Elastizitätsabschätzungen im Wertebereich  $-0,1 > \epsilon_{\text{OAA}}^{\text{akgdh}} > -1,0$  mittels Monte-Carlo-Simulation berücksichtigt. Die aktivierende Wirkung von AKG wurde hingegen durch einen Wertebereich von  $0,1 > \epsilon_{\text{AKG}}^{\text{akgdh}} > 1,0$  abgedeckt. Eine analoge Vorgehensweise für die Reaktion der akgdh ist auch von Link (2009) beschrieben.

### Aromatenbiosyntheseweg

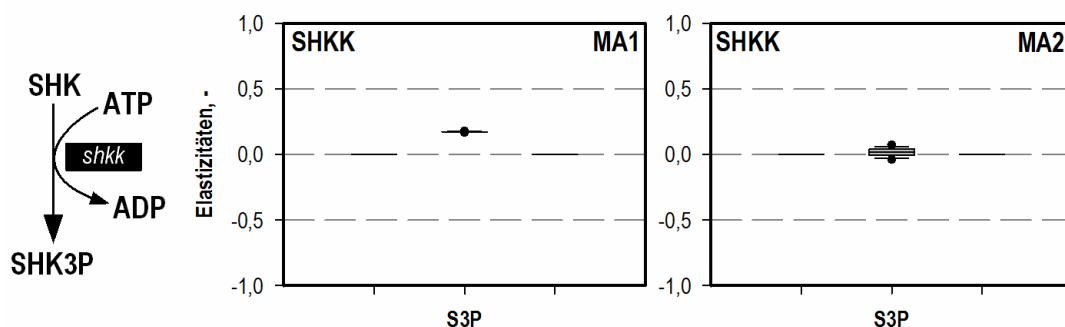
Die Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges ist durch die 3-Deoxy-D-arabino-heptulose-7-phosphat-Synthase (dahs) beschrieben. Die drei möglichen Isoformen des Enzyms (codiert durch *aroG*, *aroF*, *aroH*) werden dabei jeweils durch eines der drei Stoffwechselendprodukte L-Phe, L-Tyr und L-Trp inhibiert. Aufgrund der L-Tyr-Auxothrophie des in dieser Arbeit verwendeten Produktionsstammes wurde die inhibierende Wirkung dieser Aminosäure nicht als Effektor bei der Elastizitätsbestimmung berücksichtigt. Gleiches gilt für L-Tryptophan, welches sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu den Zeitpunkten der metabolischen Analysen nicht nachgewiesen wurden. Eine inhibierende Wirkung von L-Phe konnte durch die bestimmten Elastizitäten nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.48). Hierbei liegt für die ermittelten Elastizitäten ein breiter Lösungsbereich vor. Ursache hierfür ist der für die Berechnungen angenommene große intrazelluläre L-Phe-Konzentrationsbereich von 0,05–5,00 mM, welcher durch NET-Analysen eingeschränkt wurde. Genauere experimentelle Bestimmungen der intrazellulären L-Phe-Konzentration waren aufgrund der hohen maskierenden extrazellulären L-Phe-Konzentration nicht möglich. Auch für das Reaktionsprodukt DAHP lagen keine experimentell bestimmten Konzentrationsbereiche vor. In der Literatur wird des Weiteren eine kompetitive Hemmung der *aroG* codierten Enzymform durch die zu PEP analogen phosphorylierten Verbindungen

2-Phosphoglycerat (2PG) und 1,3-Diphosphoglycerat (13DPG) beschrieben. Die für 2PG bestimmten negativen Elastizitäten der zweiten metabolischen Analyse bestätigen diese Vermutung. Für 13DPG konnte hingegen keine regulatorische Wirkung nachgewiesen werden.



**Abbildung 5.48:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase (dahs) hinsichtlich der Effektoren 2-Phosphoglycerat (2PG), 1,3-Diphosphoglycerat (13DPG), 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) und L-Phenylalanin (L-Phe).

Die Umsetzung von Shikimat (SHK) zu Shikimat-3-Phosphat (SHK3P) erfolgt ATP-abhängig durch die Shikimatkinase (shkk). Die für diese Reaktion bestimmten Elastizitätskoeffizienten hinsichtlich des Produktes SHK3P sind in Abbildung 5.49 dargestellt. Vor allem die engen Lösungsbereiche der Elastizitäten deuten dabei auf keine signifikante Regulation durch die intrazelluläre SHK3P-Konzentration hin.

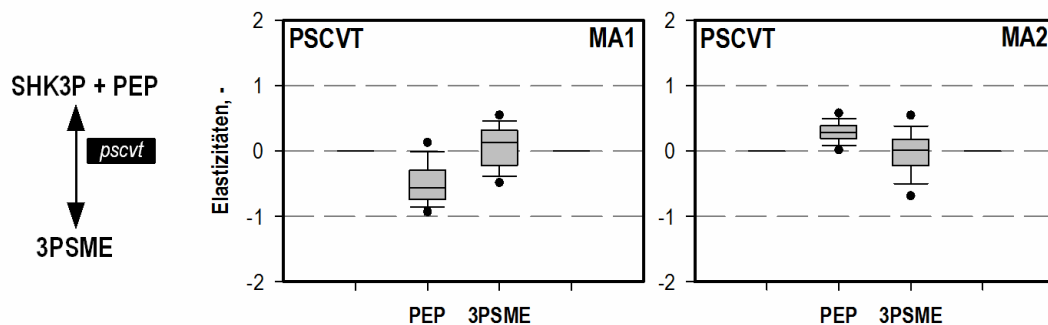


**Abbildung 5.49:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Shikimatkinase (shkk) hinsichtlich des Effektors Shikimat-3-Phosphat (S3P).

Die zweite PEP-verbrauchende Reaktion des Aromatenbiosyntheseweges wird durch die 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (psctv) beschrieben. In der Literatur wird dabei eine regulierende Wirkung des Cosubstrates PEP auf die Reaktion vermutet (Duncan *et al.*,

1984). Diese regulierende Funktion des Metaboliten konnte in dieser Arbeit durch die Elastizitätskoeffizienten wiedergegeben werden (siehe Abbildung 5.50). Hierbei beschreiben die bestimmten Parameter zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion eine inhibierende Wirkung des Metaboliten, wohingegen zum Zeitpunkt des Produktionsabbruches positive Elastizitäten bestimmt wurden.

Eine inhibierende Wirkung des Produktes 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (3PSME), wie von Gruys *et al.* (1992) vermutet, konnte nicht gezeigt werden. Eine mögliche Ursache ist der weite angenommene 3PSME-Konzentrationsbereich (0,1  $\mu$ M–10 mM) bei der Elastizitätsabschätzung. Eine experimentelle Quantifizierung dieses Metaboliten oder eine thermodynamische Eingrenzung des Lösungsbereiches war in dieser Arbeit nicht möglich.



**Abbildung 5.50:** Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten 10.000 Elastizitätskoeffizienten der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (pscvt) hinsichtlich der Effektoren Phosphoenolpyruvat (PEP) und 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat (3PSME).

## Energiestoffwechsel

Die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung wurde in dieser Arbeit durch die NADH, NADPH und  $\text{Q8H}_2$ -verbrauchenden und ATP-bildenden Reaktionen *cytbo*, *thd2* und *nadh6* berücksichtigt. Wie von Link (2009) beschrieben, wurde hierbei ein irreversibles Reaktionsverhalten mit einer linearen Kinetik angenommen. Die dabei vorliegenden Elastizitäten beschreiben somit hinsichtlich des Reaktionssubstrates einen Wert von 1. Gleiches gilt für die ATPase-Elastizität hinsichtlich ATP. Wie zuvor beschrieben (Link, 2009; Wang *et al.*, 2004), wurde auch hier eine Reaktion erster Ordnung angenommen.

### 5.8.3 Kontrollkoeffizienten zu verschiedenen Produktionszeitpunkten

Wie im Vorkapitel beschrieben, wurde in dieser Arbeit zur Berücksichtigung von Unsicherheiten hinsichtlich der vorliegenden Stoffflüsse und intrazellulären Metabolit-Konzentrationen die Methodik der Monte-Carlo-Simulation bei der Elastizitätsabschätzung eingesetzt. Die in einem Durchgang der Monte-Carlo-Simulation bestimmten Elastizitäten für aktiv regulierte Reaktionen und Reaktionen am thermodynamischen Gleichgewicht wurden dabei in der Elastizitäts-Matrix  $E$  zusammengefasst (siehe Gleichung (3.59)). Die damit mögliche Bestimmung von Fluss-Kontrollkoeffizienten erfolgte mit dem von Visser und Heijnen (2002) etablierten und in Kapitel 3.8.2 beschriebenen Ansatz. Die Stoffflussverteilung  $v_0$  (siehe Gleichung (3.65)) beschreibt dabei den Referenzzustand im 15 L-Produktionsprozess. Die damit bestimmbaren Fluss-Kontrollkoeffizienten beschreiben vereinfacht die prozentuale Veränderung einer Referenz-Stoffflussverteilung durch eine ein-prozentige Änderung einer bestimmten Enzymaktivität. Durch diesen Ansatz war die globale Identifikation von Kontrollmechanismen im metabolischen Netzwerk möglich.

Neben dem Ansatz von Visser und Heijnen (2002) erfolgte die Koeffizienten-Berechnung auch mit dem Ansatz von Hatzimanikatis und Bailey (1996). Hierbei wurden identische Ergebnisse erzielt.

Im Folgenden werden die aus 10.000 Monte-Carlo-Durchgängen gemittelten Fluss-Kontrollkoeffizienten der beiden L-Phenylalanin-Produktionszeitpunkte aufgeführt und separat diskutiert. Im Anschluss erfolgt ein direkter Vergleich der beiden Produktionszeitpunkte.

#### Fluss-Kontrollkoeffizienten zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion

Abbildung 5.51 beschreibt die abgeschätzten Fluss-Kontrollkoeffizienten zum Zeitpunkt einer hohen L-Phenylalanin-Produktion im 15 L-Prozess. Hierbei wird eine starke kontrollierende Wirkung der ATPase-Reaktion auf alle Flüsse des metabolischen Netzwerkes ersichtlich. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen von Koebmann *et al.* (2002) und Link (2009) überein. In beiden Studien konnte der Bedarf an ATP in *E. coli* als stärkste Kontrolle der Reaktionen in Glykolyse und Zentralstoffwechsel identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu beschreibt Abbildung 5.51 in Übereinstimmung mit Link (2009) nahezu keine kontrollierende Wirkung für Enzyme des Citrat-Zyklus auf den Zentralstoffwechsel. Auch in  $^{13}\text{C}$ -Markierungsstudien von Evans (1995) zur L-Glutamat-Synthese mit *E. coli* konnte experimentell nachgewiesen werden, dass eine Reduktion der Citrat-Zyklus-Aktivität die Ausrichtung der Stoffflussverteilung im Zentralstoffwechsel hin zum Produkt L-Glutamat nicht verändert. Dies bestärkt die Richtigkeit der in dieser Arbeit bestimmten geringen Kontrolle für Enzyme des Citrat-Zyklus. Eine Ausnahme stellt die Citrat-Synthase dar. Für die

Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel und im Aromatenbiosyntheseweg konnte eine negative Kontrolle durch die Citrat-Synthase bestimmt werden. Die Ursache für die negative Wirkung des Citrat-bildenden Enzyms auf die Stoffflüsse des Aromatenbiosyntheseweges ist in der durch Baldwin und Davidson (1983) beschriebenen und in dieser Arbeit für die Elastizitätsabschätzung berücksichtigten inhibierenden Wirkung des Effektors Citrat auf die Chorismat-Mutase (*chorm*) zu sehen. Die dabei nachgewiesene kompetitive Hemmung der *chorm* durch das Citrat-Zyklus-Intermediat unterstützt die in dieser Arbeit bestimmte kontrollierende Bedeutung der Citrat-Synthase für die L-Phenylalanin-Synthese. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass der Stofffluss im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel aufgrund der notwendigen E4P-Bereitstellung während der L-Phenylalanin-Produktion zu einem großen Teil durch den Stofffluss im Aromatenbiosyntheseweg definiert wird. Eine negative Kontrolle der Citrat-Synthase auf die Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, kann somit indirekt durch die Bedeutung der Citrat-Synthase für den Aromatenbiosyntheseweg begründet werden.

Für die beiden Enzyme des aeroben Glycerin-Metabolismus (*glyck* und *glyc3pd*) wurde hinsichtlich der Stoffflüsse der Glykolyse, der Gluconeogenese, des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels und im Aromatenbiosyntheseweg eine positive Kontrolle bestimmt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von Cintolesi *et al.* (2012) zur Bestimmung der metabolischen Kontrolle im Reaktionsnetzwerk zur fermentativen Ethanol-Produktion mit *E. coli* aus Glycerin überein. In dem dabei beschriebenen Reaktionsnetzwerk konnte für die Enzyme des anaeroben Glycerin-Metabolismus die im Vergleich zu Enzymen der Glykolyse stärkste positive Kontrolle der beteiligten Stoffflüsse bestimmt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die in dieser Arbeit bestimmte starke kontrollierende Eigenschaft der Enzyme des aeroben Substrat-Metabolismus.

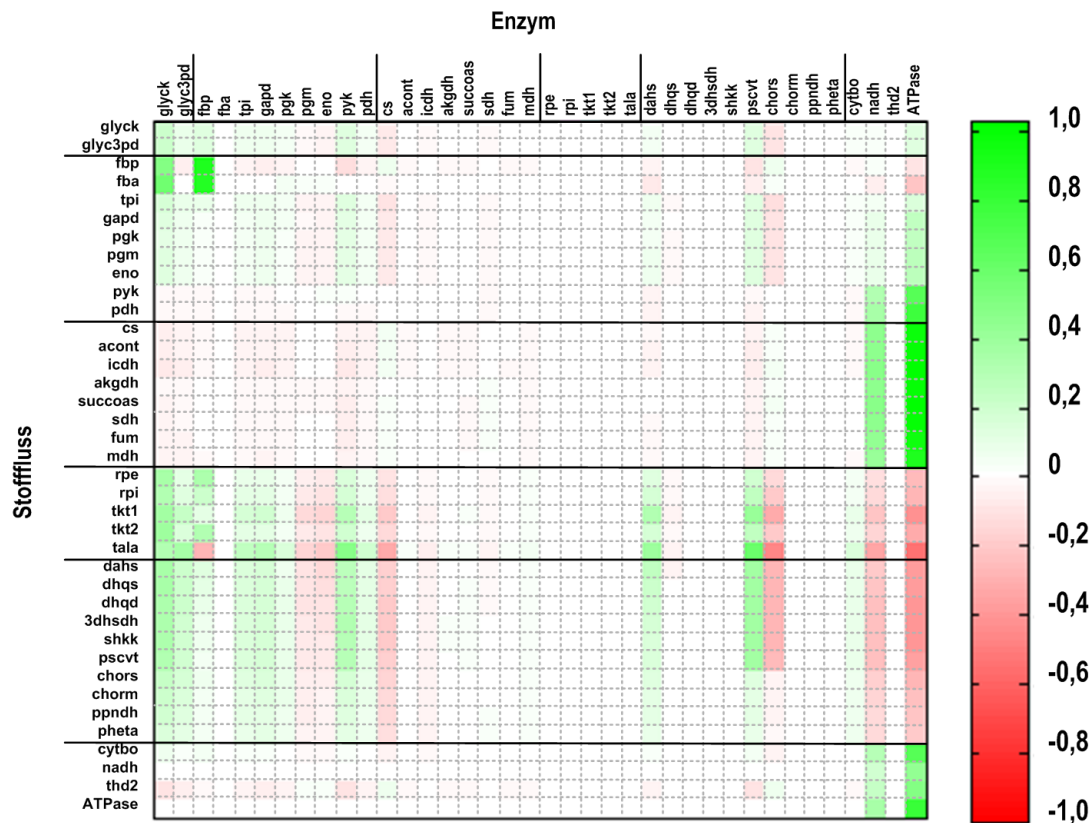
Neben dieser starken Regulation durch die Reaktionen des Glycerin-Metabolismus wurde für sämtliche Enzyme der Glykolyse und der Gluconeogenese eine im Vergleich verringerte regulierende Wirkung auf das Stoffflussnetzwerk bestimmt. Auch Link (2009) konnte bei der Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle eine regulierende Wirkung der glykolytischen Enzyme auf den gesamten Zentralstoffwechsel beschreiben. Die in der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion bestimmten Kontrollkoeffizienten zeigen für zwei Arten von Enzymen der Glykolyse eine positive Kontrolle auf die Produktbildung. Neben Enzymen, die eine Versorgung mit Ausgangsmetaboliten (FBP und GAP) des Pentose-Phosphat-Weges sicherstellen (*tpi* und *fbp*), haben vor allem Energie-liefernde Enzyme positive Kontrollkoeffizienten (*gapd*, *pgk*, *pyk* und *pdh*). Des Weiteren konnte aufgrund der bestimmten negativen Kontrollkoeffizienten der PEP-bildenden Enolase (*eno*) bezüglich der Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges eine unzureichende intrazelluläre Versorgung mit dem Cosubstrat des L-Phenylalanin-Syntheseweges zu diesem Produktionszeitpunkt ausgeschlossen werden.

Weitere die Produktbildung kontrollierende Schritte konnten direkt im Aromatenbiosyntheseweg identifiziert werden. Hierbei wurde zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion die in der Literatur (Kikuchi *et al.*, 1997) mit Glucose als Kohlenstoffquelle diskutierte hohe regulatorische Bedeutung der Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges (dahs) auch für die Kohlenstoffquelle Glycerin nachgewiesen. Gleiches gilt für die 3PSME-Synthase (pscvt). Auch für diese zweite PEP-verbrauchende Reaktion des Aromatenbiosyntheseweges konnte eine deutliche Kontrolle auf die vorangehenden Stoffflüsse im Stoffwechselweg bestimmt werden. Bereits in frühen kinetischen Studien (Fischer *et al.*, 1986) zur Inhibition der 3PSME-Synthase durch N-(Phosphonomethyl)-Glycin wurde eine regulatorische Wirkung auf die vorangehenden enzymatischen Schritte des Aromatenbiosyntheseweges vermutet. Aus biologischer Sicht wird durch die regulatorische Wirkung dieses Enzyms auch unter Abwesenheit der rückkopplungsaktiven Stoffwechselprodukte L-Tyrosin, L-Tryptophan oder L-Phenylalanin eine Regulation des Stoffflusses im Aromatenbiosyntheseweg ermöglicht. Mögliche Ziele einer Variation der 3PSME-Synthase-Aktivität sind hierbei die Kontrolle von Biomassebildung durch Regulation des Kohlenstoffflusses zu den limitierenden Aminosäuren sowie der kontrollierte Verbrauch von überschüssiger Energie in Form von PEP (pscvt) und ATP (shkk). Eine Anreicherung an hohen intrazellulären Shikimat-3-Phosphat-Konzentrationen, wie sie auch in dieser Arbeit bestimmt werden konnte (siehe Kapitel 5.6.2), wird dabei als Indikator für die regulierende Wirkung der 3PSME-Synthase-Aktivität gesehen (Fischer *et al.*, 1986). Auch neuere Studien mit Glucose als Kohlenstoffquelle stützen die regulatorische Bedeutung der 3PSME-Synthase für den Stofffluss im Aromatenbiosyntheseweg (Oldiges *et al.*, 2004). Hierbei wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -Puls-Experimenten das durch das Gen *aroA* codierte PEP-verbrauchende Enzym als vielversprechender Kandidat zur Erhöhung des Kohlenstoffflusses im Aromatenbiosyntheseweg identifiziert. Neben der 3PSME-Synthase konnte auch für die Chorismat-Synthase (chors) eine kontrollierende Wirkung auf die Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges und des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels bestimmt werden. Die dabei gezeigte negative Kontrolle wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Eine Hypothese für die mögliche Bedeutung der negativen Kontrollkoeffizienten der chors ist in der Bedeutung als Chorismat-bildendes Enzym zu sehen. Chorismat stellt im Aromatenbiosyntheseweg den zentralen Metaboliten zur Bereitstellung der drei für Biomassebildung benötigten Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan dar. Die stöchiometrischen Reaktionen der L-Tryptophan-Bildung wurden dabei nicht im MCA-Modell berücksichtigt. Gleichzeitig beschreiben die theoretisch abgeschätzten Stoffflüsse jedoch einen Kohlenstoffabfluss in die L-Tryptophan-Bildung, um Wachstum zu ermöglichen. Der gesteigerte Stofffluss zur L-Tryptophan-Bildung macht die Zurverfügungstellung der anderen für die Biomassebildung notwendigen Metabolite und somit einen gesteigerten Stofffluss im Zentralstoffwechsel notwendig (siehe leicht positive

Kontrollkoeffizienten für die Stoffflüsse des Citrat-Zyklus). Eine Erhöhung des Kohlenstoffabflusses in den Citrat-Zyklus ist dabei gleichbedeutend mit einem verringerten Stofffluss im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel und im Aromatenbiosyntheseweg. Die chors könnte somit eine kontrollierende Funktion für die L-Tryptophan-Bereitstellung besitzen.

Neben der beschriebenen kontrollierenden Wirkung einer Vielzahl an Enzymen auf die Stoffflüsse der L-Phenylalanin-Produktion werden durch Abbildung 5.51 einige Besonderheiten des MCA-Modells für die Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel ersichtlich, welche im Folgenden zusammengefasst werden. So wurde hinsichtlich der metabolischen Kontrolle der Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp) alleinig für den Stofffluss der Transaldolase (tala) eine negative Kontrolle beschrieben. Zum Verständnis dieser negativen Kontrolle auf die tala müssen die beiden unterschiedlichen Möglichkeiten der Erythrose-4-phosphat (E4P)-Bereitstellung für den Aromatenbiosyntheseweg berücksichtigt werden. Neben der Umsetzung von Glycerinaldehydphosphat (GAP) und Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) zu E4P über die tala wird die Bildung von E4P über die Transketolase (tkt2) ausgehend von Fructose-6-phosphat (F6P) und GAP ermöglicht. Durch eine theoretische Erhöhung der fbp-Aktivität, wie durch die Kontrollanalyse beschrieben, wird eine verbesserte F6P-Bereitstellung ermöglicht, was die verstärkte E4P-Bereitstellung über die tkt2-Reaktion fördert. Aufgrund der verstärkten Umsetzung von GAP zu F6P (über fba und fbp) ist somit ein anteiliger Rückgang der GAP-Nutzung für die tala-Reaktion und somit ein Stoffflussrückgang der Reaktion zu verzeichnen.

Des Weiteren wird für den Stofffluss der Transaldolase eine im Vergleich zu den weiteren Reaktionen des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels stärkere prozentuale Kontrolle beschrieben. Eine mögliche Ursache für die beschriebene erhöhte metabolische Kontrollierbarkeit dieses Stoffflusses ist in der Stoffflussabschätzung des Referenzzustandes im 15 L-Produktionsprozess zu sehen. Wie durch Tabelle A.35 aufgeführt, konnten für die tala- und tkt1-Reaktion nur sehr niedrige Stoffflüsse von  $0,091 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  abgeschätzt werden. Für alle anderen Reaktionen des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels wurden deutlich höhere Reaktionsraten ( $0,125\text{--}0,308 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) bestimmt. Bereits kleinere absolute Abweichungen von diesen theoretisch abgeschätzten Stoffflüssen können somit zu einem erhöhten prozentualen Fehler führen. Aufgrund der rechnerischen Normierung sämtlicher erzielbarer Stoffflüsse der metabolischen Analysen auf diesen Referenzzustand geben die Kontrollkoeffizienten geringe absolute Fehler kleiner Stoffflüsse verstärkt wieder. Dies führt möglicherweise im Falle der Transaldolase-Reaktionen zu einer überhöhten Betonung der metabolischen Kontrolle.



**Abbildung 5.51:** Fluss-Kontrollkoeffizienten im durch Tabelle A.41 beschriebenen stöchiometrischen Modell zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (MA1). Die Spalten beschreiben die durch die metabolische Analyse gestörten Enzyme. Die Reihen geben die resultierenden ausgenlenkten Gleichgewichtsflüsse wieder. Die für Enzyme und Reaktionen genutzten Abkürzungen sind in Kapitel 3.1 aufgeführt.

Durch die erfolgreiche Identifikation der den Stofffluss zum Produkt kontrollierenden Enzyme zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion lassen sich somit mehrere konkrete Möglichkeiten zur Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion zu diesem Prozesszeitpunkt beschreiben:

- Erhöhung des Stoffflusses im Glycerin-Stoffwechsel: Wie durch die positiven Kontrollkoeffizienten der Glycerinkinase (glyck) und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (gly3pd) auf den Aromatenbiosyntheseweg gezeigt wurde, besitzt der Glycerin-Metabolismus eine zentrale Bedeutung für den Stofffluss zum Produkt L-Phenylalanin. Neben einer Erhöhung der limitierenden Substratzufuhr in dieser Prozessphase kann durch Einbringen von zusätzlichen Kopien der glyck- und gly3pd-codierenden Gene in das Genom des Produktionsstammes eine verstärkte Expression der beiden Enzyme erreicht werden, was eine Steigerung der Produktionsrate bewirken könnte. Im Falle der glyck muss dabei zusätzlich die ausreichende intrazelluläre ATP-Versorgung hinterfragt werden.



- Erhöhung des Stoffflusses im Aromatenbiosyntheseweg: Wie durch die positiven Kontrollkoeffizienten der DAHP-Synthase (dahs) und 3PSME-Synthase (pscvt) auf den Aromatenbiosyntheseweg gezeigt wurde, stellen diese beiden Enzyme eine Möglichkeit dar, den Stofffluss zum Produkt L-Phenylalanin zu verbessern. Neben einer direkten Erhöhung der Expression beider Enzyme durch Einbringen von zusätzliche Gen-Kopien (dahs codiert durch *aroG*, *aroF*, *aroH*; pscvt codiert durch *aroA*) in das Genom steht im Falle der Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges vor allem die verbesserte Versorgung mit dem Pentose-Phosphat-Stoffwechsel-Intermediaten E4P im Vordergrund. Zielführend könnte hierbei eine Verstärkung des Stoffflusses über Fructose-6-Phosphat hin zu E4P sein (Reaktionen der *fbA*, *fbp* und *tkt2*). Auch das Einbringen einer aktiveren und gegen L-Phenylalanin insensitiven Variante der DAHP-Synthase, welche durch Cross *et al.* (2011) beschrieben wurde, könnte den Stofffluss der Eingangsreaktion verbessern.
- Reduktion des Stoffflusses über die Citrat-Synthase: Wie durch die negativen Kontrollkoeffizienten der Citrat-Synthase (*cs*) bezüglich des Aromatenbiosyntheseweges gezeigt wurde, reduziert die Aktivität dieses Citrat-bildenden Enzyms den Stofffluss im Aromatenbiosyntheseweg. Gleichzeitig beschreibt der generelle Kohlenstoffabfluss in den Zentralstoffwechsel einen Kohlenstoffverlust für die L-Phenylalanin-Produktion. Eine gezielte Reduktion der Citrat-Zyklus-Aktivität könnte somit eine Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion bewirken. Gleichzeitig muss jedoch eine ausreichende Aktivität des Citrat-Zyklus für den Erhaltungs- und Energie-Stoffwechsel sichergestellt werden. Denkbar wäre hierzu eine gezielte Expressionsregulation durch niedermolekulare Metabolite, welche über sogenannte „Riboswitches“ an die mRNA binden. Erst kürzlich konnte mit einem solchen Ansatz der Stofffluss der Citrat-Synthase zur Regulierung der Citrat-Zyklus-Aktivität und Optimierung der Lysin-Produktion genutzt werden (Zhou und Zeng, 2015).

### Fluss-Kontrollkoeffizienten zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs

Abbildung 5.52 beschreibt die abgeschätzten Fluss-Kontrollkoeffizienten zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs. Im Folgenden sollen diese qualitativ beschrieben werden.

Auch für den Zeitpunkt einer abbrechenden L-Phenylalanin-Bildung und einsetzenden Nebenproduktbildung konnte eine starke kontrollierende Wirkung der ATPase-Reaktion auf alle Flüsse des metabolischen Netzwerkes bestimmt werden. Dies verdeutlicht den über die Produktionszeit unverändert hohen Bedarf an ATP in *E. coli*.

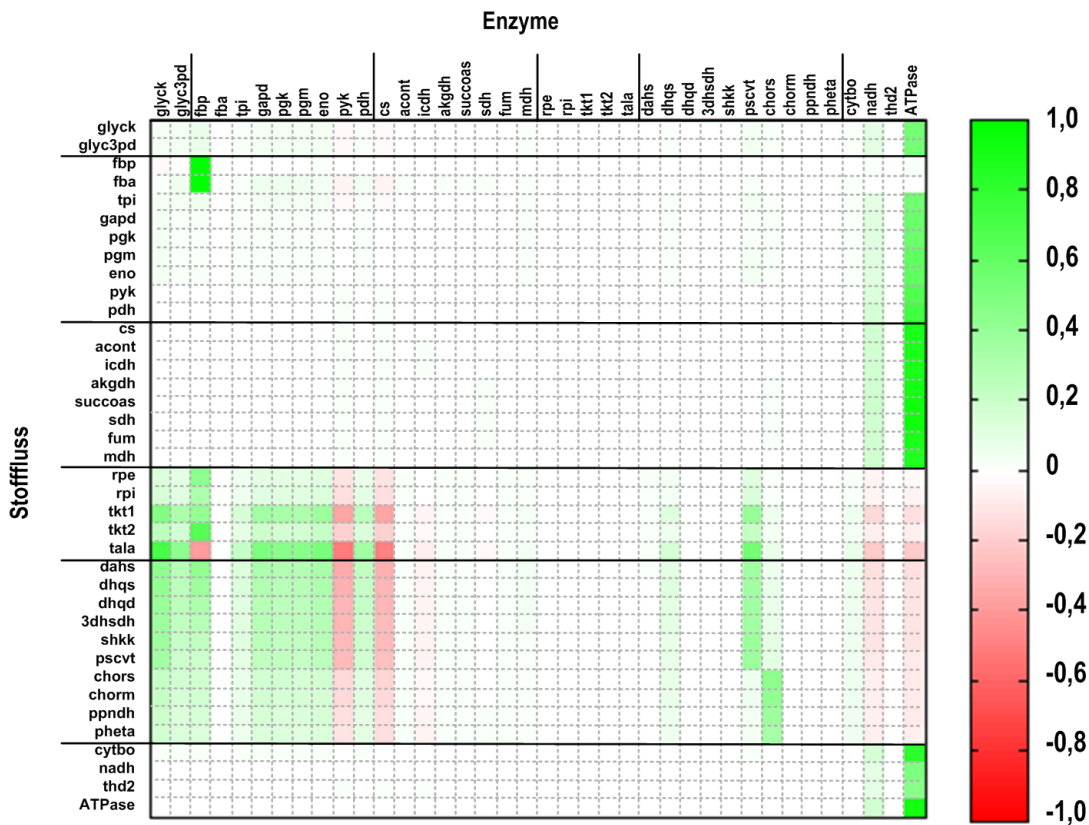
Im Citrat-Zyklus stellt die Citrat-Synthase (*cs*) weiterhin das einzige den Stofffluss zum Produkt kontrollierende Enzym dar. Auch zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs kann dies

durch die inhibierende Wirkung von Citrat auf die Chorismat-Mutase (chorm) sowie durch den Kohlenstoffabfluss in den Zentralstoffwechsel begründet werden.

Ebenso wurde durch die dargestellten Fluss-Kontrollkoeffizienten eine vorrangige Kontrolle der Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel und Aromatenbiosyntheseweg durch die enzymatischen Reaktionen im Glycerin-Metabolismus und in der Glykolyse nachgewiesen. Neben den positiv regulierenden Enzymen des Glycerin-Metabolismus (glyck und glyc3pd) zeigten auch Enzyme, die eine intrazelluläre Versorgung mit Ausgangsmetaboliten (F6P und GAP) des Pentose-Phosphat-Weges sicherstellen (tpi und fbp), eine positive Kontrolle. Gleiches gilt für Enzyme, die eine Cofaktor- (gapd und pdh) respektive ATP- (pgk) Regenerierung ermöglichen. Des Weiteren konnte durch die positiven Koeffizienten der Enolase (eno) und die negativen Koeffizienten der Pyruvatkinase (pyk) eine positive Kontrolle der intrazellulären PEP-Bereitstellung bei gleichzeitiger Vermeidung des PEP-Abflusses in den Zentralstoffwechsel bestimmt werden.

Im Aromatenbiosyntheseweg wurde hingegen eine starke Kontrolle der 3PSME-Synthase (pscvt) und Chorismat-Synthase (chors) auf die Stoffflüsse hin zum Produkt bestimmt.

Hinsichtlich der Regulierbarkeit der Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel konnten erneut die gleichen Besonderheiten aufgezeigt werden, welche bereits zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion vorlagen. So wurde hinsichtlich der metabolischen Kontrolle der Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp) erneut alleinig für den Stofffluss der Transaldolase (tala) eine negative Kontrolle nachgewiesen, was durch die Förderung der tkt2-Reaktion durch die fbp begründet werden kann. Ebenfalls ist wieder eine überhöhte Betonung der metabolischen Kontrolle der tala- und tkt1-Reaktion festzustellen (siehe Abbildung 5.52), was durch den geringen Absolutwert der Stoffflüsse im 15 L-Referenzzustand ( $< 0,01 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) begründet ist.



**Abbildung 5.52:** Fluss-Kontrollkoeffizienten im durch Tabelle A.41 beschriebenen stöchiometrischen Modell zum Zeitpunkt kurz vor Abbruch der L-Phenylalanin-Produktion (MA2). Die Spalten beschreiben die durch die metabolische Analyse gestörten Enzyme. Die Reihen geben die resultierenden ausgelenkten Gleichgewichtsflüsse wieder. Die für Enzyme und Reaktionen genutzten Abkürzungen sind in Kapitel 3.1 aufgeführt.

Durch die Identifikation der den Stofffluss zum Produkt kontrollierenden Enzyme zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs lassen sich spezifisch für diesen Zeitpunkt ebenfalls mehrere konkrete Angriffspunkte zur Verbesserung der L-Phenylalanin-Produktion beschreiben:

- Erhöhung des Stoffflusses im Glycerin-Stoffwechsel: Wie durch die positiven Kontrollkoeffizienten der Glycerinkinase (glyck) und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (gly3pd) auf den Aromatenbiosyntheseweg erneut gezeigt werden konnte, besitzt der Glycerin-Metabolismus auch bei Produktionsabbruch eine zentrale Bedeutung für den Stofffluss zum Produkt L-Phenylalanin. Da im Gegensatz zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion zeitnah zum Produktionsabbruch eine Glycerin-Anreicherung im Medium nachgewiesen werden konnte, sollten Ansätze zur Verlängerung der L-Phenylalanin-Produktion eine anhaltende Verstoffwechslung des Substrates sicherstellen. Das Einbringen von zusätzlichen Kopien der glyck- und gly3pd-codierenden Gene in Kombination mit der Sicherstellung einer ausreichenden ATP-Versorgung sollte hierzu im Vordergrund stehen.

- Reduktion des Stoffflusses über die Citrat-Synthase: Wie durch die negativen Kontrollkoeffizienten der Citrat-Synthase (*cs*) auf den Aromatenbiosyntheseweg auch zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs gezeigt wurde, reduziert die Aktivität dieses Citrat-bildenden Enzyms den Stofffluss im Aromatenbiosyntheseweg und stellt einen Kohlenstoffabfluss in den Zentralstoffwechsel dar. Analog zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion könnte eine gezielte Reduktion der Citrat-Zyklus-Aktivität durch Verwendung von „Riboswitches“ als Expressionsregulatoren eine Verlängerung der Produktionsphase bewirken.
- Verbesserung der intrazellulären PEP-Bereitstellung: Durch die positiven Kontrollkoeffizienten des PEP-bildenden Enzyms Enolase (*eno*) sowie durch die negativen Werte des PEP-verbrauchenden Enzyms der Pyruvatkinase (*pyk*) konnte eine zentrale Bedeutung der PEP-Bereitstellung zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs nachgewiesen werden. Zur Verbesserung der PEP-Bereitstellung stehen, wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben, Ansätze im Vordergrund, welche den intrazellulären PEP-Verbrauch reduzieren. Wie in Kapitel 5.3 gezeigt werden konnte, ist die Deletion der Pyruvatkinase-codierenden Gene dabei jedoch nicht zielführend. Um weiterhin einen verringerten Stofffluss in den Zentralstoffwechsel zu ermöglichen, wären Strategien zur Mutation der Pyruvatkinase denkbar (Gosset *et al.*, 1996). Auch Ansätze, die ein gezieltes Herabsetzen der Expression oder Aktivität der Pyruvatkinase zu Beginn der L-Phenylalanin-Produktion ermöglichen, könnten eine verbesserte PEP-Bereitstellung gewährleisten. Hierzu müssten Methoden wie die der „Riboswitches“ auf die Pyruvatkinase übertragen oder direkte allosterische Kontrollstrukturen des Enzyms identifiziert werden.
- Verbesserung der F6P-Bereitstellung: Durch die positiven Kontrollkoeffizienten des F6P-bildenden Enzyms der Fructose-1,6-bisphosphatase (*fbp*) konnte in der F6P-Bereitstellung eine weitere mögliche Ursache für den Produktionsabbruch identifiziert werden. Ansätze zur Verbesserung der intrazellulären F6P-Bereitstellung sind durch die Studie von Gottlieb *et al.* (2014) beschrieben, welche durch Überexpression des Fructose-1,6-bisphosphatase codierenden Gens *glgX* eine verbesserte L-Phenylalanin-Produktivität nachweisen konnten.

### **Vergleich der vorliegenden metabolischen Kontrolle zu den beiden Produktionszeitpunkten**

In diesem Abschnitt soll ein qualitativer und quantitativer Vergleich der zu den beiden L-Phenylalanin-Produktionszeitpunkten bestimmten Kontrollkoeffizienten erfolgen. Grundlage einer korrekten quantitativen Gegenüberstellung von Kontrollkoeffizienten ist dabei ein zu beiden Analysezeitpunkten vorliegendes vergleichbares Proteom der Zellen. Aufgrund der in Kapitel 5.6.1 beschriebenen Veränderungen der extrazellulären Fließgleichgewichtsbedingungen während der halb-kontinuierlichen Produktionsphase im 15 L-Maßstab konnte ein konstantes Proteom der Zellen über den Produktionszeitraum nicht automatisch angenommen werden, sondern musste experimentell überprüft werden. Hierzu erfolgte zu beiden Analysezeitpunkten (MA1 und MA2) eine Probenahme aus dem 15 L-Produktionsprozess zur Proteomanalyse. Die hierbei vom Projektpartner durchgeführte Probenaufarbeitung, 2D-Gel-Analyse und Datenauswertung ist im Anhang (Kapitel A.8.1) beschrieben. Die dabei erzielten Ergebnisse sind ebenfalls im Anhang durch 2D-Gel-Vergleiche aufgeführt (siehe Abbildung A.9). Durch den Vergleich wird ersichtlich, dass innerhalb der durch die Analyse-Methodik gegebenen Toleranz keine signifikante Neusynthese und kein relevanter Abbau von Enzymen im Prozesszeitraum zwischen den beiden metabolischen Analysen bestimmt werden konnte. Das somit zu den beiden Produktionszeitpunkten nachgewiesene vergleichbare Proteom der Zellen ermöglicht den direkten quantitativen Vergleich der in den beiden Kontrollanalysen bestimmten Koeffizienten. Eine Gegenüberstellung der zu beiden Produktionszeitpunkten für ausgewählte Enzyme bestimmten Kontrollkoeffizienten ist in Abbildung 5.53 dargestellt.

Beide Kontrollanalysen beschreiben Zeitpunkts-unabhängig eine hohe regulatorische Bedeutung des Energiestoffwechsels (ATPase und nadh) auf die Stoffflüsse im Zentralstoffwechsel (siehe Abbildung 5.53). Die hierdurch zu beiden Prozesszeitpunkten beschriebene unveränderte Relevanz des Energie-Stoffwechsels stimmt mit der in Ansätzen zur genomweiten Stoffflussabschätzung diskutierten Zielfunktion der ATP-Bildung überein (Schuetz *et al.*, 2007). In vergleichenden Berechnungen konnte hierbei gezeigt werden, dass die optimierte ATP-Gewinnung in genomweiten Berechnungsansätzen intrazelluläre Stoffflussverteilungen vergleichbar gut wiedergeben kann wie eine Optimierung hinsichtlich Biomassebildung. Begründbar ist dies durch das evolutionäre Interesse der Zellen, eine optimale Energiestoffversorgung und Wachstum dauerhaft aufrecht zu erhalten. Für den Aromatenbiosyntheseweg und den Pentose-Phosphat-Stoffwechsel ist zu beiden Prozesszeitpunkten eine negative Kontrolle durch die ATPase und NADH-Dehydrogenase beschrieben. Da für die Erhöhung der Enzymaktivität der ATPase und NADH-Dehydrogenase ein verstärkter Kohlenstofffluss im Zentralstoffwechsel notwendig ist, ist dies gleichbedeutend mit einer Reduktion der Energie-verbrauchenden Stoffflüsse im Aromatenbiosyntheseweg.

Für die Kontrollkoeffizienten der Enzyme des Glycerin-Metabolismus (glyck und glyc3pd) konnten nur geringe Änderung der Kontrolle hinsichtlich der Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel und Aromatenbiosyntheseweg zu den beiden Produktions-Zeitpunkten bestimmt werden. Dies deutet auf eine zeitlich unveränderte hohe Bedeutung dieser Enzyme auf die L-Phenylalanin-Produktion hin. Unterstützt wird diese Erkenntnis durch die bereits durch Cintolesi *et al.* (2012) nachgewiesene kontrollierende Wirkung des Glycerin-Metabolismus auf die Ethanol-Produktion aus Glycerin.

Im Citrat-Zyklus wurde für die Citrat-Synthase (cs) zu beiden Produktionszeitpunkten eine gleichbleibend hohe negative Kontrolle auf die Stoffflüsse im Aromatenbiosyntheseweg und des Pentose-Phosphat-Weges beschrieben. Diese wird, wie bereits diskutiert, durch die inhibierende Wirkung von Citrat auf die chorm (Baldwin und Davidson, 1983) und den Kohlenstoffabfluss in den Citrat-Zyklus begründet.

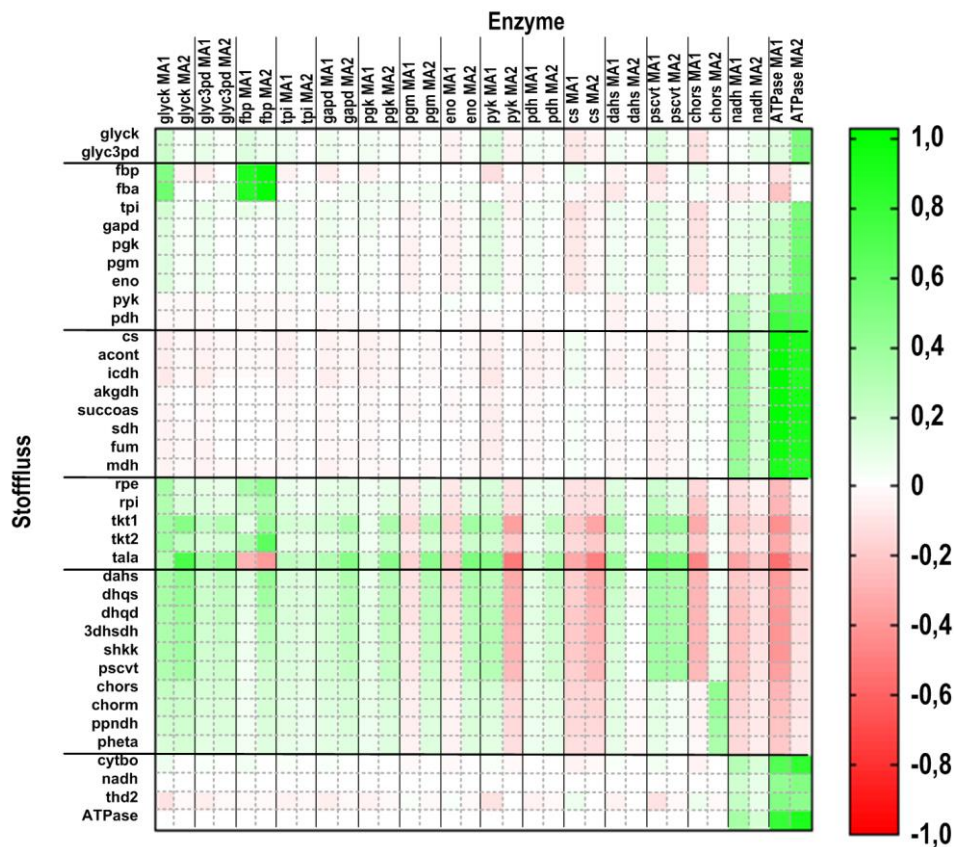
Sowohl für die Eingangsreaktion in die Glykolyse (tpi) ausgehend von Glycerin als auch für die Energie-liefernden Enzyme der gapd, pgk und pdh konnte zu beiden Produktions-Zeitpunkten eine positive Kontrolle auf die L-Phenylalanin-Bildung bestimmt werden. Die dabei zu beiden Analysen (MA1 und MA2) nahezu konstanten geringen Kontrollkoeffizienten verdeutlichen die gleichbleibende Bedeutung dieser Enzyme über die Produktionsphase.

Im Aromatenbiosyntheseweg konnte auch zum zweiten Analysenzeitpunkt eine vergleichbar hohe kontrollierende Wirkung des zweiten PEP-verbrauchenden Enzyms des Aminosäurestoffwechsels (pscvt) auf die vorangehenden Stoffflüsse aufgezeigt werden. Der Vergleich der Kontrollkoeffizienten dieses Enzyms unterstützt die von Fischer *et al.* (1986) beschriebene regulierende Bedeutung des Enzyms für den Aromatenbiosyntheseweg.

Alle bisher genannten Enzyme zeigen somit eine über die Produktionsphase vergleichbare Kontrolle auf das metabolische Netzwerk. Im Gegensatz zu den genannten Reaktionen mit unveränderter metabolischer Kontrolle konnte bei reduzierter Produktbildung und einsetzender Nebenproduktbildung (MA2) eine abnehmende Bedeutung der Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges (dahs) für die Kontrolle der L-Phenylalanin-Bildung bestimmt werden (siehe Abbildung 5.53). Hierdurch wird der verminderte Einfluss dieses Enzyms am das Ende der Produktionsphase deutlich. Für die Chorismat-Synthase (chors) wurde hingegen eine Umkehrung der metabolischen Kontrolle im Laufe der Produktionsphase bestimmt. Die zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion negativ wirkende chors besitzt zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs einen Stofffluss-erhöhenden Einfluss auf die Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Bedeutung der chors könnte in deren Bedeutung als Chorismat-bereitstellendes Enzym liegen. Chorismat ist der primäre Ausgangsstoff für die L-Tryptophan-Bildung und hat somit große Bedeutung für das Wachstum von *E. coli*. Die chors könnte somit eine regulierende Bedeutung für die L-Tryptophan-Bildung einnehmen.

Neben den genannten Veränderungen im Aromatenbiosyntheseweg konnten in dieser Arbeit vor allem für die Enzyme der Glykolyse und Gluconeogenese deutliche Veränderungen der metabolischen Kontrolle zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs (MA2) beschrieben werden. So wurde eine verstärkte regulatorische Kontrolle des Fructose-6-phosphat-bereitstellenden Enzyms (*fbp*) auf den Stofffluss im Aromatenbiosyntheseweg nachgewiesen werden (Beispiel der Eingangsreaktion:  $C(\text{MA1})_{\text{fbp}}^{\text{dahs}} = 0,12$ ;  $C(\text{MA2})_{\text{fbp}}^{\text{dahs}} = 0,41$ ). Diese Veränderung in der regulatorischen Bedeutung der Fructose-1,6-bisphosphatase hinsichtlich der L-Phenylalanin-Produktion deutet auf eine unzureichende intrazelluläre Versorgung des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels mit dem Ausgangsmetabolit F6P zum Zeitpunkt der abbrechenden Produktion hin. Diese mögliche Ursache für den Produktionsabbruch wird durch weitere experimentelle Studien gestützt. So konnten Gottlieb *et al.* (2014) durch Charakterisierung von rekombinanten *E. coli*-Stämmen mit Überexpression des Fructose-1,6-bisphosphatase-codierenden Gens *glgX* bereits eine verbesserte L-Phenylalanin-Produktivität mit Glycerin nachweisen.

Neben der veränderten Bedeutung der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel-Versorgung konnte in dieser Arbeit durch den direkten Vergleich der beiden Kontrollanalysen (siehe Abbildung 5.53) auch eine signifikant veränderte Bedeutung der intrazellulären PEP-Bereitstellung identifiziert werden. Während zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Bildung negative Kontrollkoeffizienten für die enzymatische Reaktion hin zu PEP (*pgm* und *eno*) bestimmt wurden, konnten zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs positive Koeffizienten ermittelt werden. Gleiches gilt in umgekehrter Bedeutung für die PEP-verbrauchende Pyruvatkinase (*pyk*). Diese über die Prozesszeit veränderte Bedeutung der intrazellulären PEP-Versorgung beschreibt eine vermutliche Mangelversorgung an PEP am Produktionsende und stellt somit eine weitere mögliche Ursache für den Produktionsabbruch dar. Die hierbei angenommene Relevanz einer ausreichenden PEP-Versorgung des Aromatenbiosyntheseweges für die mikrobielle L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin wird durch zahlreiche  $^{13}\text{C}$ -Markierungsstudien mit Glucose zur effektiven L-Phenylalanin-Produktion gestützt (Oldiges *et al.*, 2004; Wahl *et al.*, 2004).



**Abbildung 5.53:** Vergleich der zu zwei Produktionszeitpunkten bestimmten Fluss-Kontrollkoeffizienten: Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (MA1) und Zeitpunkt kurz vor Abbruch der L-Phenylalanin-Produktion (MA2). Die Spalten beschreiben die durch die metabolische Analyse gestörten Enzyme. Die Reihen geben die resultierenden ausgenelkten Gleichgewichtsflüsse wieder. Die für Enzyme und Reaktionen genutzten Abkürzungen sind in Kapitel 3.1 aufgeführt.

## 5.8.4 Diskussion

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche Anwendung von experimentell bestimmten und theoretisch abgeschätzten Daten aus metabolischen Kurzzeitanalysen zur Bestimmung der lokalen Elastizitätskoeffizienten im L-Phenylalanin-Produktionsprozess gezeigt. Die hierfür notwendige Kenntnis von relevanten Effektoren der regulierbaren Reaktionen stellt die Grundlage für eine korrekte Elastizitätsabschätzung von Reaktionen fern des thermodynamischen Gleichgewichtes dar. Für den *E. coli*-Metabolismus ist hierzu eine Vielzahl an Effektoren in Literaturquellen (beispielsweise Link *et al.* (2013)) und Datenbanken (beispielsweise Karp *et al.* (2014)) beschrieben. Detaillierte Kenntnisse über Effektoren und Wirkungsweisen beschränken sich hierbei jedoch oft auf zentrale Stoffwechselwege und Aufnahmesysteme wie die Glykolyse, den Citrat-Zyklus und das Glucose-transportierende Phosphotransferase-System. Kenntnisse bezüglich Effektoren der gluconeogenetischen Reaktionen, der Reaktionen des Glycerin-Metabolismus und der



Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges sind weniger umfangreich und teilweise unter für *in vivo* Prozesse irrelevanten *in vitro* Bedingungen bestimmt. Die Auswahl von relevanten Effektoren dieser Reaktionswege stellt somit eine der zentralen Herausforderungen der Elastizitätsabschätzung dar. Gleichzeitig liegt in der Nicht-Berücksichtigung von relevanten Effektoren die Gefahr des Informationsverlustes hinsichtlich zentraler kontrollierender Enzyme. Vernachlässigt man in dem in diesem Kapitel beschriebenen Modell zur metabolischen Kontrollanalyse der L-Phenylalanin-Produktion beispielsweise die nachgewiesene aktivierende Wirkung von Pyruvat auf die Pyruvatdehydrogenase (Link *et al.*, 2013), kann keine Information bezüglich der kontrollierenden Wirkung der Pyruvatkinase bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Beispiel verdeutlicht die signifikante Bedeutung der zu wählenden Effektoren.

Durch Monte-Carlo-Simulation wurden in dieser Arbeit Varianzen der theoretischen Stoffflussberechnungen, Lösungsbereiche der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien sowie experimentelle Fehler der intrazellulären Metabolom-Quantifizierung berücksichtigt. Die hierdurch aufgezeigten Lösungsbereiche der Elastizitätskoeffizienten verdeutlichen die Notwendigkeit von geringen Varianzen bei der theoretischen Stoffflussabschätzung und umfangreichen quantitativen Metabolom-Informationen.

Durch die in diesem Kapitel beschriebenen Fluss-Kontrollkoeffizienten konnten zu zwei verschiedenen L-Phenylalanin-Produktionszeitpunkten die regulatorischen Schritte des Reaktionsnetzwerkes aufgezeigt werden. Durch die nachgewiesene Anzahl an Enzymen, welche die Stoffflüsse hin zum Produkt L-Phenylalanin bestimmen, wird ersichtlich, dass die metabolische Kontrolle des Stoffwechselnetzwerkes auf viele Reaktionsschritte verteilt vorliegt. Begründet liegt dies in den von Kacser und Burns (1973) postulierten Summations- und Verbindungstheoremen (siehe Gleichung (3.50) und (3.51)), welche eine gemeinsame, unterschiedlich stark ausgeprägte Stofffluss-Kontrolle aller im Netzwerk vorliegenden Enzyme vorsehen. Diese Eigenschaft verdeutlicht ebenfalls, dass dem L-Phenylalanin-Stoffwechselnetzwerk eine Vielzahl an Kontrollgrößen übergeordnet sind, welche die theoretisch mögliche Produktausbeute und die erzielbaren Produkt-Konzentrationen negativ beeinflussen. Eine entsprechend hohe Anzahl an notwendigen genetischen Eingriffen und optimierten Prozessstrategien zur verbesserten Stoffflussausrichtung hin zum Produkt L-Phenylalanin ist die Folge. Hinsichtlich der biologischen Fragestellung konnte mit der gewählten Methodik der metabolischen Kontrollanalyse eine Vielzahl an in der Literatur für Glucose bereits beschriebenen kontrollierenden Schritte auch für die Kohlenstoffquelle Glycerin aufgezeigt werden. Vorrangig zu nennen sind hierbei die beiden PEP-verbrauchenden Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges und die eigentliche intrazelluläre PEP-Bereitstellung (Fischer *et al.*, 1986; Oldiges *et al.*, 2004; Wahl *et al.*, 2004). Zur Bestimmung dieser kontrollierenden Schritte waren in früheren Studien experimentell und

analytisch aufwendige dynamische  $^{13}\text{C}$ -Pulseexperimente sowie *in vitro* Studien notwendig. Durch die Methodik der metabolischen Kontrollanalyse konnte hingegen innerhalb einer einzelnen Kultivierung mit metabolischen Kurzzeitanalysen eine detaillierte Kenntnis über alle im Reaktionsnetzwerk berücksichtigten Enzyme und deren metabolische Kontrolle auf die L-Phenylalanin-Produktion erzielt werden. Neben den bereits in der Literatur für die Produktion von aromatischen Aminosäuren beschriebenen kontrollierenden Größen konnten in dieser Arbeit auch weitere Enzyme mit einer hohen metabolischen Kontrolle auf das Stoffwechselnetzwerk bestimmt werden. Beispielhaft hierfür sind die Enzyme des Glycerin-Metabolismus und das Citrat-bildende Enzym des Citrat-Zyklus zu nennen. Für die Enzyme des Glycerin-Metabolismus konnte in der Literatur bisher nur unter anaeroben Bedingungen eine metabolische Kontrolle beschrieben werden (Cintolesi *et al.*, 2012). Für die Citrat-Synthase lagen hingegen nur Informationen zur metabolischen Kontrolle durch das Reaktionsprodukt Citrat auf eine Reaktion des Aromatenbiosyntheseweges vor (Baldwin und Davidson, 1983).

Durch den direkten Vergleich von zu verschiedenen Produktionszeitpunkten bestimmten Kontrollkoeffizienten konnte des Weiteren eine unzureichende intrazelluläre F6P- und PEP-Versorgung als mögliche Ursache für den Produktionsabbruch identifiziert werden. Ansätze zur Verbesserung der intrazellulären F6P-Bereitstellung sind durch die Studie von Gottlieb *et al.* (2014) beschrieben, welche durch Überexpression des Fructose-1,6-bisphosphatase codierenden Gens *glgX* eine verbesserte L-Phenylalanin-Produktivität nachweisen konnten. Ansätze zur Verbesserung des intrazellulären PEP-Gehalts konzentrieren sich auf die Reduktion von PEP-verbrauchenden Reaktionen. Beispiele hierfür sind wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben die Reaktionen der Pyruvatkinase und PEP-Carboxylase. Eine vollständige Inaktivierung der Pyruvatkinase erschwert dabei, wie in dieser Arbeit beschrieben, das Wachstum mit Glycerin und macht den Einsatz von zusätzlichen Kohlenstoffquellen in der Wachstumsphase notwendig (siehe Kapitel 5.2.1). Die in diesem Projekt gewählte zweite Kohlenstoffquelle Laktat verhindert die Durchführung von gezielten metabolischen Analysen und verschlechtert das Prozessverhalten (siehe Kapitel 5.3), weshalb auf diesen Ansatz verzichtet werden sollte. Eine Alternative zur Deletion der Pyruvatkinase-codierenden Gene ist eine strukturelle Mutation des Enzyms, um eine verbleibende verringerte Aktivität sicherstellen zu können. Ansätze hierzu sind durch die Studien von Gosset *et al.* (1996) beschrieben. Des Weiteren wäre eine bei Produktionsbeginn induzierbare Gen-Deletion genauso denkbar wie eine entsprechende Expressions-Regulation auf Ebene der mRNA durch sogenannte „Riboswitches“.

## 6 Zusammenfassung

Die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin besitzt als essentielle Aminosäure große Bedeutung in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie (Sprenger, 2007). Bereits heute erfolgt die industrielle Produktion der Aminosäure primär durch mikrobielle Synthese. Dabei kommen vorrangig rekombinante *Escherichia coli* Stämme und die Kohlenstoffquelle Glucose zum Einsatz. Mögliche Produkt-Konzentrationen von bis zu  $50 \text{ g L}^{-1}$  sind in der Literatur beschrieben (Backman *et al.*, 1990). Die Kohlenstoffquelle Glycerin stellt aufgrund ihrer günstigen Verfügbarkeit eine industriell interessante Alternative zu Glucose dar. Erste in der Literatur beschriebene Studien zur L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin blieben dabei mit Produkt-Konzentrationen von  $0,4\text{--}12,9 \text{ g L}^{-1}$  deutlich hinter den mit Glucose erzielten Ergebnissen zurück (Gottlieb, 2010; Khamduang *et al.*, 2009; Thongchuang *et al.*, 2012). Die Bestimmung der Reaktionsschritte, die das Stoffwechselnetzwerk mit Glycerin als Kohlenstoffquelle kontrollieren, ist somit von besonderem Interesse. Die Metabolische Kontrollanalyse (MCA) stellt eine Möglichkeit dar, diese kontrollierenden Schritte in metabolischen Netzwerken zu ermitteln. Neben einer Vielzahl an theoretischen Studien wurde jedoch bislang nur eine geringe Anzahl an datenbasierenden Studien zu industriell relevanten Prozessen durchgeführt. Ein Grund hierfür ist der hohe experimentelle Aufwand für eine detaillierte intrazelluläre Datengewinnung, der durch die Möglichkeit eines sich verändernden Proteoms während der Produktionsphase weiter erhöht wird. Diese herausfordernden Aspekte mussten somit in diesem Forschungsvorhaben berücksichtigt werden.

Ziel dieser Arbeit war die detaillierte metabolische Analyse von Zellen aus dem Zulaufverfahren zur L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und die Identifikation der das Stoffwechselnetzwerk kontrollierenden Reaktionsschritte mittels MCA. Hierdurch sollten mögliche Ursachen für die im Vergleich zur Kohlenstoffquelle Glucose verringerte Produktivität und den frühen Produktionsabbruch im Zulaufverfahren aufgezeigt werden.

Die detaillierte metabolische Analyse des L-Phenylalanin-Stoffwechselnetzwerkes setzt eine an das Produktionssystem angepasste und optimierte Methodik der intrazellulären Metabolom-Quantifizierung voraus. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein standardisiertes Protokoll zur optimierten salzreduzierten  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Zellextraktgewinnung zur korrekten Metabolom-Quantifizierung entwickelt. Durch Variation der Substratverfügbarkeit im letzten Schritt der Extraktgewinnung konnte eine um 184 % erhöhte Konzentration des Schlüsselmetaboliten der aromatischen Aminosäuresynthese Phosphoenolpyruvat (PEP) erzielt werden. Der so an die L-Phenylalanin-Synthese angepasste  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Zellextrakt gewährleistete eine verbesserte Quantifizierung intrazellulärer Metabolite.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Schmideder A, Albermann C, Binder K, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015a): Parallelized small-scale production of uniformly  $^{13}\text{C}$ -labeled cell extract for quantitative metabolome analysis. *Anal Biochem* 478: 134–140.

Parallel dazu war es in dieser Arbeit notwendig, einen standardisierten halb-kontinuierlichen Prozess im 15 L-Maßstab zur L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin und Ammoniak zu etablieren, der als Grundlage der geplanten metabolischen Analysen dienen sollte. Der Prozess gliederte sich in die beiden Phasen Biomassebildung und L-Phenylalanin-Produktion. Genetische Eigenschaften der zu Beginn des Projektes verwendeten Stämme (L-Tyrosin-Auxotrophie und Deletion der für die Pyruvatkinase codierenden Gene) erforderten die Zufuhr der auxotrophen Aminosäure L-Tyrosin sowie der zusätzlichen Kohlenstoffquelle Laktat zur Biomassebildung. Durch eine angepasste Zufuhrstrategie für L-Tyrosin konnte eine anhaltende Inhibierung der Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges durch L-Tyrosin während der Produktionsphase erfolgreich vermieden werden. Dieser standardisierte Prozess ermöglichte die vergleichende reaktionstechnische Charakterisierung verschiedener *E. coli*-Stämme für die L-Phenylalanin-Produktion und die genaue Beschreibung des frühen Produktionsabbruchs. Auf diese Weise konnten drei unterschiedliche Einflussgrößen auf das Prozessverhalten untersucht werden.

Zunächst wurde ein signifikanter Einfluss des gewählten Selektionsmarkers auf die Plasmid-Stabilität während der Kultivierung im 15 L-Maßstab nachgewiesen. Für die zu Projektbeginn gewählten  $\beta$ -Lactam-Antibiotika konnte eine extrazelluläre Inaktivierung des Selektionsmarkers bestimmt werden, was einen starken Plasmid-Verlust zur Folge hatte. Durch Austausch der genetischen Resistenz und des Selektionsmarkers konnte eine bis Prozessende nachweisbare vollständige Plasmid-Stabilität bestimmt werden.<sup>2</sup>

Ein weiterer Aspekt, der anhand des standardisierten Prozesses analysiert wurde, war die vor Produktionsabbruch auftretende Nebenproduktbildung an Acetat und Laktat. Durch Charakterisierung von Deletionsmutanten der Malatenzym-codierenden Gene *maeA* und *maeB* wurde erfolgreich gezeigt, dass das Malatenzym in L-Phenylalanin-Produktionsstämmen keinen Einfluss auf das Nebenproduktspektrum und die erzielbare L-Phenylalanin-Produktivität nimmt. Gleichzeitig konnte hierdurch für den PEP-Pyruvat-Stoffwechselknoten eine deutlich verbesserte Vorhersagewahrscheinlichkeit bei der theoretischen Bestimmung von intrazellulären Stoffflüssen erzielt werden.<sup>3</sup>

Weitere anhand des standardisierten Prozesses durchgeführte Arbeiten zur Bestimmung der Lebendzellzahl zeigten einen unveränderten Anteil an lebensfähigen Zellen zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs. Dies erbrachte den Nachweis, dass der L-Phenylalanin-Produktionsabbruch nicht durch das Absterben des Biokatalysators verursacht wird.

<sup>2</sup> Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Albermann C, Gottlieb K, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014a): Fed-batch production of L-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 83: 62–69.

<sup>3</sup> Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014b): Improvement of constraint-based flux estimation during L-phenylalanine production with *Escherichia coli* using targeted knock-out mutants. *Biotechnol Bioeng* 111: 1406–1416.

Im Rahmen der reaktionstechnischen Charakterisierungen wurden Vorversuche zur Etablierung von metabolischen Kurzzeitanalysen während der L-Phenylalanin-Produktion durchgeführt. Dabei wurde unerwarteterweise ein Glucose-Ausfluss aus den Zellen während der Zellüberführung zur metabolischen Analyse bestimmt. Die nachgewiesenen hohen Werte von bis zu  $67,6 \pm 2,3 \text{ mg}_{\text{Glucose}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und die anschließende Wiederaufnahme der Kohlenstoffquelle während der metabolischen Analyse machte eine zielgerichtete Auslenkung des metabolischen Produktionsgleichgewichtes unmöglich. Aus diesem Grund war in dieser Arbeit die detaillierte Analyse des *E. coli*-Speicherstoffwechsels während der L-Phenylalanin-Produktion notwendig. Durch Charakterisierung verschiedener rekombinanter Stämme mit Deletionen im Glycogen- und Trehalose-Stoffwechsel wurde eine intrazelluläre Speicherung von Glucose während der Wachstumsphase in Form von Trehalose nachgewiesen. Ebenso konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die gespeicherte Trehalose den Ursprung für den Glucose-Ausfluss während der Zellüberführung zur metabolischen Analyse darstellt. Durch eine im Anschluss durchgeführte Charakterisierung der Trehalose-Speicherung in *E. coli* wurde abschließend gezeigt, dass die intrazelluläre Trehalose-Speicherung als Schutzmechanismus gegen die während der Wachstumsphase im 15 L-Produktionsprozess eingesetzte zweite Kohlenstoffquelle Laktat auftritt. Durch Verwendung von rekombinanten Stämmen mit aktiver Pyruvatkinase und Glycerin als alleiniger Kohlenstoffquelle war es somit möglich, die Trehalose-Speicherung und folglich auch einen Glucose-Ausfluss während der Zellüberführung zur metabolischen Analyse zu vermeiden.<sup>4</sup>

Durch die während der reaktionstechnischen Charakterisierung von verschiedenen L-Phenylalanin-Produktionsstämmen gewonnenen Erkenntnisse und durch die Ergebnisse zur Charakterisierung der Speicherstoffsynthese wurde die gezielte Identifikation eines vielversprechenden Produktionsstammes zur weiteren detaillierten metabolischen Analyse ermöglicht. Für die Kohlenstoffquelle Glycerin zeigte der gewählte Stamm *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> ein im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* FUS4.11<sub>kan</sub> pF81<sub>amp</sub> mit Glycerin um 162 % gesteigerte maximale spezifische Produktionsrate von  $34 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Des Weiteren lag bei Prozessende eine um 115 % gesteigerte maximale Produktkonzentration von  $22,8 \text{ g L}^{-1}$  vor. Trotz dieser verbesserten Produktivität wurden die in der Literatur mit Glucose erzielbaren Produktionsraten und Produktkonzentrationen nicht erreicht.

<sup>4</sup> Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014c): Carbon storage in recombinant *Escherichia coli* during growth on glycerol and lactic acid. *Biotechnol Bioeng* 111: 2508–2519.

Zusätzlich konnten während der L-Phenylalanin-Produktion zwei metabolisch interessante Zeitpunkte identifiziert werden, zu welchen detaillierte metabolische Analysen durchgeführt wurden (siehe Abbildung 5.54):

- Metabolische Analyse 1: Zeitpunkt einer hohen L-Phenylalanin-Produktion, bei der die maximale theoretisch mögliche Ausbeute jedoch nicht erreicht wird
- Metabolische Analyse 2: Zeitpunkt kurz vor Produktionsabbruch, bei welchem eine einsetzende Stoffwechsel-Verschiebung weg von der L-Phenylalanin-Bildung hin zur Nebenproduktbildung sichtbar wird

Für die durchgeführten metabolischen Analysen wurde in dieser Arbeit die Methodik des schnellen Medienwechsels mit anschließenden stationären Kurzzeitanalysen nach Link *et al.* (2010) gewählt. Aufgrund des instationären Prozessverhaltens im 15 L-Produktionsprozess konnte ein langfristig konstantes Proteom der Zellen und somit eine Daten-Vergleichbarkeit von sequentiell durchgeführten Analysen, wie von Link *et al.* (2010) vorgeschlagen, nicht gewährleistet werden. Aus diesem Grund wurden die metabolischen Kurzzeitanalysen in diesem Projekt im Vierfachparallelansatz während des operierenden Prozesses umgesetzt.

Die realisierten metabolischen Analysen wurden in einem ersten Schritt unter Satzbedingungen mit vier unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Pyruvat, Glucose, Succinat und Glycerin) durchgeführt. Die zelluläre Reaktion nach Überführung in den Analysenmaßstab lieferte den Nachweis, dass der aus dem Produktionsprozess mit Glycerin entnommene Stamm *E. coli* FUS4 pF81<sub>kan</sub> in der Lage ist, in kürzester Zeit mit Glucose, Succinat und Pyruvat neue Kohlenstoffquellen aufzunehmen und umzusetzen. Das sich dabei ausbildende neue metabolische Fließgleichgewicht konnte in allen vier Ansätzen nach weniger als sechs Minuten erfolgreich nachgewiesen werden. Die im Folgenden quantifizierten extrazellulären Stoffflüsse ermöglichten eine Abschätzung der intrazellulär vorliegenden Stoffflussverteilungen. Durch die gewählten Berechnungsansätze der Flussvarianz-Analyse (FVA) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA) konnte eine erfolgreiche intrazelluläre Auslenkung des Produktionsgleichgewichtes und in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquelle auch eine Neuausrichtung der Stoffflüsse nachgewiesen werden. Gleichzeitig stellte diese Auslenkung jedoch für einige Stoffwechselwege die maximal mögliche dar, was durch die bestimmte Nebenproduktbildung auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat, Succinat und Glycerin nachweisbar war. Einflüsse des Überschussmetabolismus auf die Stoffwechselregulation konnten somit in diesen satzweise betriebenen Kurzzeitanalysen nicht ausgeschlossen werden. Gleichzeitig verschlechterte die nachgewiesene Nebenproduktbildung die Vorhersagegenauigkeit der theoretischen Stofffluss-abschätzungen.<sup>5</sup>

<sup>5</sup> Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015b): Perturbation experiments: Approaches for metabolic pathway analysis in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* DOI 10.1007/10\_2015\_326.

Aus diesem Grund wurden in einem zweiten Schritt parallelisierte metabolische Kurzzeitanalysen unter Zulaufbedingungen durchgeführt. Durch das Einstellen von je drei sequentiellen konstanten Zulaufphasen mit den vier unterschiedlichen Kohlenstoffquellen wurde eine gezielte Auslenkung des Metabolismus außerhalb des Überschussmetabolismus erreicht. Gleichzeitig konnte die im Vergleich zu den Satzanalysen gewonnene Anzahl an Datensätzen verdreifacht werden, was die späteren Berechnungen der MCA begünstigte. Die für jede Zulaufphase bestimmten konstanten Atmungsraten für Kohlendioxid und Sauerstoff bewiesen erneut die sich innerhalb von jeweils sechs Minuten ausbildenden Fließgleichgewichte. Berechnungen der zu jeder Gleichgewichtsstufe vorliegenden intrazellulären Stoffflussverteilungen bestätigten die zielgerichtete Variation der Stoffflüsse in Abhängigkeit der gewählten Kohlenstoffquelle und der eingestellten Substratversorgung. Im Vergleich zu den im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Analysen konnte anhand der experimentell bestimmten Atmungsraten eine deutlich verbesserte Übereinstimmung mit den theoretisch abgeschätzten Datensätzen (gFBA und FVA) aufgezeigt werden.<sup>5</sup>

Durch quantitative Charakterisierung des intrazellulären Metabolom-Haushaltes während der im Zulaufbetrieb durchgeführten Analysen wurde des Weiteren eine signifikante Auslenkung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen durch die verschiedenen Kohlenstoffquellen und durch Variation der Substrataufnahme nachgewiesen. Des Weiteren war es alleinig anhand der zwischen den beiden Analysezeitpunkten nachweisbaren Unterschiede der einzelnen Metabolit-Konzentrationen möglich, signifikante Veränderungen des Zellmetabolismus am Ende der L-Phenylalanin-Produktionsphase zu beschreiben.<sup>5</sup>

In einer anschließend durchgeführten thermodynamischen Analyse des Reaktionsnetzwerkes konnten die experimentell respektive theoretisch bestimmten Lösungsbereiche für Fluxom und Metabolom erfolgreich validiert werden. Des Weiteren ermöglichte die Abschätzung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien die Identifikation von 16 Reaktionen, welche nahe am thermodynamischen Gleichgewicht operieren. Weiterhin war es mit der thermodynamischen Netzwerkanalyse möglich, Konzentrationsbereiche von nicht experimentell bestimmten intrazellulären Metaboliten abzuschätzen. Diese Informationen vervollständigten die für eine Kontrollanalyse notwendigen Daten.

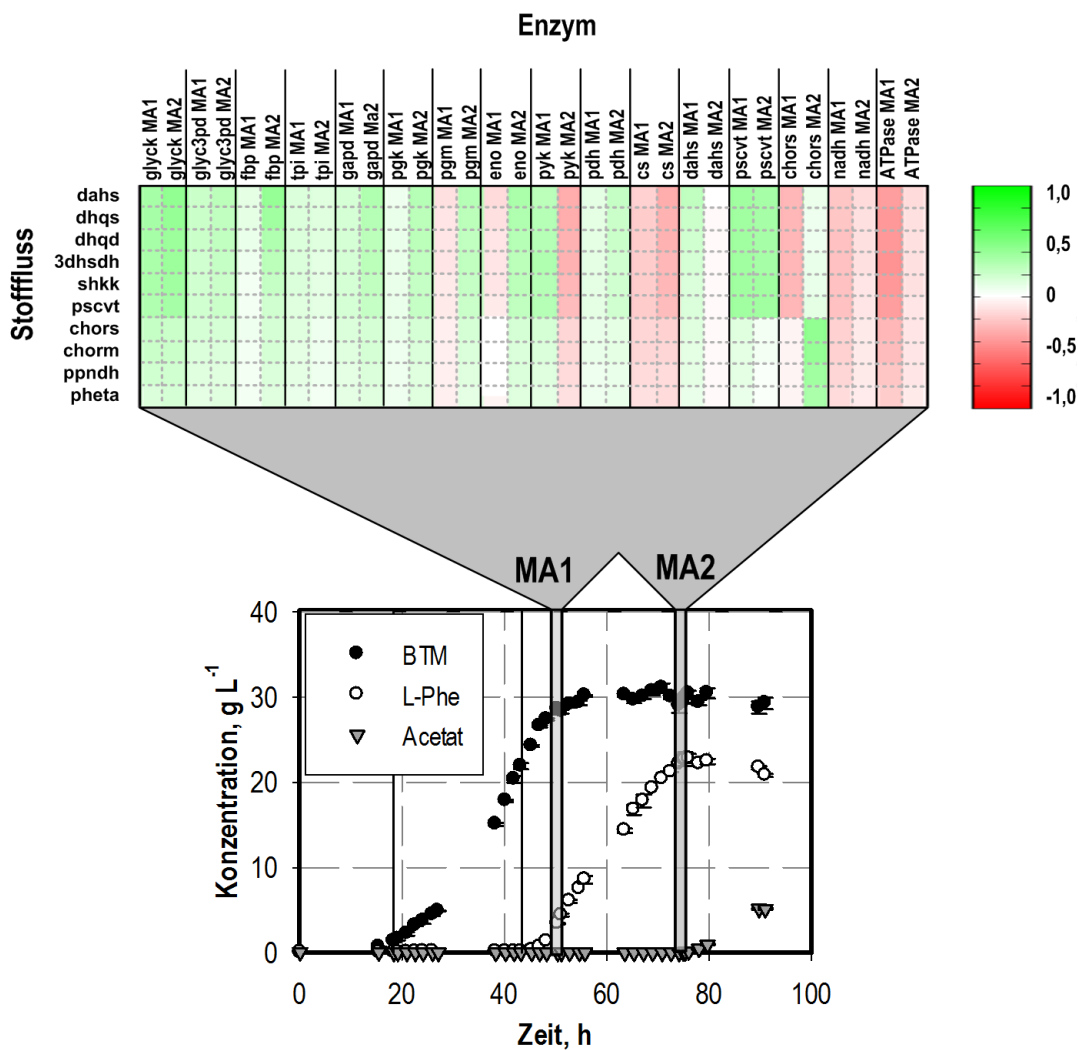
<sup>5</sup> Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015b): Perturbation experiments: Approaches for metabolic pathway analysis in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* DOI 10.1007/10\_2015\_326.

Die so experimentell bestimmten und theoretisch abgeschätzten Daten aus metabolischen Kurzzeitanalysen und thermodynamischer Analyse wurden abschließend zur Beschreibung der metabolischen Kontrolle im Reaktionsnetzwerk genutzt. Das zu Grunde gelegte Modell umfasste 38 Reaktionen und 44 Metabolite des Glycerin-Metabolismus, der Glykolyse, des Citrat-Zyklus, des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels, des Aromatenbiosyntheseweges und des Energie-Stoffwechsels. Kinetische und thermodynamische Informationen wurden in Form von Elastizitäten erfolgreich in den stochastischen Kontroll-Ansatz integriert. Anhand von Fluss-Kontrollkoeffizienten konnten zu den zwei gewählten L-Phenylalanin-Produktionszeitpunkten die regulatorischen Schritte des Reaktionsnetzwerkes aufgezeigt werden. Durch die nachgewiesene hohe Anzahl an Enzymen, welche den Stofffluss hin zum Produkt L-Phenylalanin bestimmen, wurde eine stark verteilte metabolische Kontrolle des Stoffwechselnetzwerk zu beiden Produktionszeitpunkten nachgewiesen. Diese Erkenntnis deckt sich mit der von Kacser und Burns (1973) getroffenen Annahme, welche eine gemeinsame, unterschiedlich stark ausgeprägte Stofffluss-Kontrolle aller im Netzwerk vorliegenden Enzyme annimmt.

Hinsichtlich der biologischen Fragestellung konnte mit der gewählten Methodik der metabolischen Kontrollanalyse eine Vielzahl an bereits in der Literatur für Glucose beschriebenen kontrollierenden Schritten auch für die Kohlenstoffquelle Glycerin aufgezeigt werden (siehe Abbildung 5.54). Vorrangig zu nennen sind hierbei die beiden Phosphoenolpyruvat (PEP)-verbrauchenden Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges (3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase (dahs) und 5-Enolpyruvoylshikimat-3-phosphat-Synthase (pscvt)), die Bereitstellung von Glykolyse-Intermediaten für den Pentose-Phosphat-Stoffwechsel (Fructose-1,6-bisphosphatase (fbp)) und die eigentliche intrazelluläre PEP-Bereitstellung (Enolase (eno) und Pyruvatkinase (pyk)). Im Gegensatz zu früheren Studien mit Glucose als Kohlenstoffquelle konnte in dieser Arbeit durch die gewählte Methodik der Metabolischen Kontrollanalyse auf experimentell und analytisch aufwendige dynamische  $^{13}\text{C}$ -Pulseexperimente sowie auf eine Vielzahl an *in vitro* Studien verzichtet werden. Neben den bereits für die Kohlenstoffquelle Glucose gezeigten Einflussgrößen auf die L-Phenylalanin-Produktion konnten mit der angewendeten Methodik der MCA auch bisher weniger beschriebene Enzyme als kontrollierende Größen für die L-Phenylalanin-Produktion identifiziert werden. Neben der Citrat-Synthase konnte vor allem für die Enzyme des aeroben Glycerin-Stoffwechsels eine hohe metabolische Kontrolle nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.54). Innerhalb einer einzelnen Kultivierung und den durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen wurde somit eine detaillierte Kenntnis über alle im Reaktionsnetzwerk berücksichtigten Enzyme und deren metabolische Kontrolle auf die L-Phenylalanin-Produktion gewonnen. Hinsichtlich des Produktionsabbruches konnte durch den direkten Vergleich der zu verschiedenen Produktionszeitpunkten bestimmten Kontrollkoeffizienten eine unzureichende intrazelluläre Fructose-6-phosphat- und PEP-



Versorgung als mögliche Ursache identifiziert werden (siehe Abbildung 5.54). Diese Hinweise werden durch andere Studien gestützt. So konnten Gottlieb *et al.* (2014) durch Charakterisierung von rekombinanten *E. coli*-Stämmen mit Überexpression des für Fructose-1,6-bisphosphatase codierenden Gens *glgX* eine verbesserte L-Phenylalanin-Produktivität mit Glycerin nachweisen. Die Relevanz einer ausreichenden PEP-Versorgung des Aromatenbiosyntheseweges wird durch eine Reihe an Studien mit Glucose als Kohlenstoffquelle gestützt (Oldiges *et al.*, 2004; Wahl *et al.*, 2004).



**Abbildung 5.54:** Fluss-Kontrollkoeffizienten der Stoffflüsse im Aromatenbiosyntheseweg bei den zu zwei Produktionszeitpunkten durchgeführten metabolischen Analysen (MA1 und MA2). Die Spalten beschreiben die durch die metabolische Analyse beeinflussten Enzyme. Die Reihen geben die resultierenden ausgeklenteten Gleichgewichtsflüsse wieder. Die für Enzyme und Reaktionen genutzten Abkürzungen sind in Kapitel 3.1 aufgeführt.

## 7 Ausblick

Aufgrund der großen Relevanz der bei der Elastizitätsbestimmung genutzten Daten für Metabolom, Fluxom und Thermodynamik ist eine Weiterentwicklung und Erweiterung der entsprechenden Methoden von zentraler Bedeutung.

Rasante Entwicklungen im Bereich der quantitativen Metabolom-Analyse machen eine dauerhafte Aufmerksamkeit in diesem Bereich notwendig. Hierbei sind vor allem neueste Ansätze zur automatisierten schnellen Probenfiltration von Interesse, um maskierende extrazelluläre Metabolite aus dem Probenansatz zu entfernen.

Bei den theoretischen Stoffflussabschätzungen ist neben der Weiterentwicklung der genomweiten *E. coli*-Modelle vor allem die Bereitstellung von weiteren Berechnungsansätzen analog zur geometrischen Flussbilanz-Analyse von Interesse, welche die Abschätzung von schleifenfreien Lösungsräumen ermöglichen. Zusätzliche Randbedingungen bezüglich der Aktivität einzelner Reaktionen könnten durch die Charakterisierung weiterer Deletionsmutanten bestimmt werden.

Grundlage der thermodynamischen Abschätzbarkeit von Reaktionsnetzwerken stellt die genaue Kenntnis der beteiligten Standard Gibbs'schen Bildungsenergien dar. Hierbei könnten experimentell bestimmte und in der Literatur beschriebene Bildungsenergien durch theoretische Berechnungsansätze wie von Jankowski *et al.* (2008) beschrieben verifiziert werden.

Um eine verbesserte Beschreibung der metabolischen Kontrolle in Stoffwechselnetzwerken zu ermöglichen, ist des Weiteren die Identifikation und Charakterisierung von neuen Effektoren von besonderem Interesse. Neueste Ansätze hierzu sind durch Link *et al.* (2013) beschrieben.

Hinsichtlich der Methodik der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen wäre eine Möglichkeit wünschenswert, Gleichgewichte bestimmter Stoffwechselwege noch gezielter auslenken zu können. Hierbei sind vor allem Reaktionswege fern des Zentralstoffwechsels (beispielsweise Pentose-Phosphat-Weg oder Aromatenbiosyntheseweg) von Interesse. Hierzu sollten in den metabolischen Analysen Metabolite der entsprechenden Reaktionswege eingesetzt werden, was entsprechende schnelle Aufnahmesysteme in *E. coli* notwendig macht. Erste Ansätze zur Nutzung von nicht-nativ in *E. coli* vorhandenen Transportersystemen zur metabolischen Analyse wurden im Rahmen dieses Forschungsvorhabens für Phosphoenolpyruvat-Transporter-Stämme beschrieben.\*

Die in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten ermöglichten die systematische und detaillierte Analyse eines industriell relevanten mikrobiellen Produktionsprozesses. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse über den Aromatenbiosyntheseweg bei Verwendung der Kohlenstoffquelle Glycerin und die ausgearbeitete experimentelle Methodik könnten für die Produktionsoptimierung anderer aromatischer Aminosäuren des Stoffwechselweges genutzt

\* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Albermann C, Weiner M, Tröndle J, Weuster-Botz D und Sprenger GA (2014): Utilization of organophosphate:phosphate antiporter for isotope-labeling experiments in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 361: 52–61.

---

werden. Neben der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin ist dabei vor allem die mikrobielle Produktion von L-Tryptophan von besonderem industriellen Interesse (Ikeda, 2006).

## 8 Literaturverzeichnis

- Aboka FO, Yang H, de Jonge LP, Kerste R, van Winden WA, van Gulik WM, Hoogendijk R, Oudshoorn A und Heijnen JJ (2006): Characterization of an experimental miniature bioreactor for cellular perturbation studies. *Biotechnol Bioeng* 95(6): 1032–1042.
- Ager DJ, Pantaleone DP, Henderson SA, Katritzky AR und Walters DE (1998): Synthetische nichtnitrive Süßstoffe. *Angew Chemie* 110: 1900–1916.
- Albermann C, Ghanegaonkar S, Lemuth K, Vallon T, Reuss M, Armbruster W und Sprenger GA (2008): Biosynthesis of the vitamin E compound delta-tocotrienol in recombinant *Escherichia coli* cells. *Chembiochem* 9(15): 2524–2533.
- Albermann C, Weiner M, Tröndle J, Weuster-Botz D und Sprenger GA (2014): Utilization of organophosphate:phosphate antiporter for isotope-labeling experiments in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 361: 52–61.
- Alberty RA (2006): Relations between biochemical thermodynamics and biochemical kinetics. *Biophys Chem* 124: 11–17.
- Alberty RA (1998): Calculation of Standard Transformed Gibbs Energies and Standard Transformed Enthalpies of Biochemical Reactants. *Arch Biochem Biophys* 353(1): 116–130.
- Almeida JRM, Fávoro LCL und Quirino BF (2012): Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnol Biofuels* 5: 48.
- Andersen KB (1980): Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J Bacteriol* 144(1): 114–123.
- Annesley TM (2003): Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 49(7): 1041–1044.
- Anraku Y und Gennis RB (1987): The Aerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 12: 262–266.
- Backman K, O'Connor MJ, Maruya A, Rudd E, McKay D, Balakrishnan R, Radjai M, Dipasquantonio V, Shoda D, Hatch R und Venkatasubramanian K (1990): Genetic engineering of metabolic pathways applied to the production of phenylalanine. *Ann N Y Acad Sci* 589: 16–24.
- Baldwin GS und Davidson BE (1983): Kinetic studies on the mechanism of chorismatase/prephenatedehydratase from *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* (742): 374–383.
- Báez-Viveros JL, Osuna J, Hernández-Chávez G, Soberón X, Bolívar F und Gosset G (2004): Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 87(4): 516–524.

- Beard DA, Liang S und Qian H (2002): Energy balance for analysis of complex metabolic networks. *Biophys J.* 83(1): 79–86.
- Becker SA, Feist AM, Mo ML, Hannum G, Palsson BØ und Herrgard MJ (2007): Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. *Nat Protoc* 2(3): 727–738.
- Bennett BD, Yuan J, Kimball EH und Rabinowitz JD (2008): Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nat Protoc* 3(8): 1299–1311.
- Berry A (1996): Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol* 14(7): 250–256.
- Bertani G (2004): Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *J Bacteriol* 186(3): 595–600.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B und Shao Y (1997): The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1462.
- Bochner BR und Ames BN (1982): Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J Biol Chem* 257(16): 9759–9769.
- Bolten CJ, Kiefer P, Letisse F, Portais JC und Wittmann C (2007): Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Anal Chem* 79(10): 3843–3849.
- Bongaerts J, Krämer M, Müller U, Raeven L und Wubbolts M (2001): Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng* 3(4): 289–300.
- Bordbar A, Monk JM, King ZA und Palsson BØ (2014): Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nat Rev Genet* 15(2): 107–120.
- Büscher JM, Czernik D, Ewald JC, Sauer U und Zamboni N (2009): Cross-platform comparison of methods for quantitative metabolomics of primary metabolism. *Anal Chem* 81(6): 2135–2143.
- Büscher JM, Moco S, Sauer U und Zamboni N (2010): Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Anal Chem* 82(11): 4403–4412.
- Canelas AB, Ras C, ten Pierick A, van Gulik WM und Heijnen JJ (2011): An *in vivo* data-driven framework for classification and quantification of enzyme kinetics and determination of apparent thermodynamic data. *Metab Eng* 13(3): 294–306.

- Chao YP, Lai ZJ, Chen P und Chern J (1999): Enhanced Conversion Rate of L-Phenylalanine by Coupling Reactions of Aminotransferases and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli* K-12. *Biotechnol Prog* 15: 453–459.
- Chassagnole C, Noisommit-Rizzi N, Schmid JW, Mauch K und Reuss M (2002): Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 79(1): 53–73.
- Choi YJ und Tribe DE (1982): Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant. *Biotechnol Lett* 4(4): 223–228.
- Cintolesi A, Clomburg JM, Rigou V, Zygourakis K und Gonzalez R (2012): Quantitative analysis of the fermentative metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 109(1): 187–198.
- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW und Helling RB (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 70(11): 3240–3244.
- Cross PJ, Dobson RJ, Patchett ML und Parker EJ (2011): Tyrosine Latching of a Regulatory Gate Affords Allosteric Control of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *J Biol Chem* 286(12): 10216–10224.
- Da Luz JA, Hans E und Zeng AP (2014): Automated fast filtration and on-filter quenching improve the intracellular metabolite analysis of microorganisms. *Eng Life Sci* 14: 135–142.
- Dauvillée D, Kinderf IS, Li Z, Kosar-Hashemi B, Samuel MS, Rampling L, Ball S und Morell MK (2005): Role of the *Escherichia coli* *glgX* Gene in Glycogen Metabolism. *J Bacteriol* 187(4): 1465–1473.
- 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. *Anal Biochem* 204(1): 118–123.
- Doelle H, Ewings K und Hollywood N (1982): Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 23: 1–35.
- Donnenberg MS (2002) *Escherichia coli* - Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Academic Press San Diego 2. Auflage.
- Draths KM, Pompliano DL, Conley DL, Frost JW, Berry A, Disbrow GL, Stavarsky RJ und Lievens JC (1992): Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase. *J Am Chem Soc* 114(10): 3956–3962.
- Duncan K, Lewendon A und Coggins JR (1984): The purification of 5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate synthase from an overproducing strain of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 165(1): 121–127.

- Edwards JS und Palsson BØ (2000): The *Escherichia coli* MG1655 *in silico* metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10): 5528–5533.
- Evans CT (1995): Metabolic engineering of a non-allosteric citrate synthase in an *Escherichia coli* citrate synthase mutant. *J Mol Recognit* 8: 327–333.
- Feist AM, Henry CS, Reed JL, Krummenacker M, Joyce AR, Karp PD, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V und Palsson BØ (2007): A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol Syst Biol* 3: 121.
- Fell DA (1992): Metabolic Control Analysis: A survey of its theoretical and experimental development. *Biochem J* 330: 313–330.
- Fischer RS, Berry A, Gaines CG und Jensen RA (1986): Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. *J Bacteriol* 168(3): 1147–1154.
- Flamholz A, Noor E, Bar-Even A und Milo R (2012): eQuilibrator—the biochemical thermodynamics calculator. *Nucleic Acids Res* 40: 770–775.
- Fleming R, Thiele I und Nasheuer H (2009): Quantitative assignment of reaction directionality in constraint-based models of metabolism: Application to *Escherichia coli*. *Biophys Chem* 145: 47–56.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA und Bolívar F (2002): Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by <sup>13</sup>C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 4(2): 124–137.
- Förberg C und Häggström L (1988): Phenylalanine production from a rec *Escherichia coli*-strain in fed-batch culture. *J Biotechnol* 8(4): 291–300.
- Frank RAW, Price AJ, Northrop FD, Perham RN und Luisi BF (2007): Crystal Structure of the E1 Component of the *Escherichia coli* 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Multienzyme Complex. *J Mol Biol* 368: 639–651.
- Friehs K (2004): Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. *Plasmid* 47– 82.
- Fuchs G und Schlegel HG (2007): Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart* 8. Auflage.
- Gancedo JM und Gancedo C (1973): Concentrations of intermediary metabolites in yeast. *Biochimie* 55(1): 205–211.
- Georgiou G, Shuler ML und Wilson DB (1988): Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of beta-lactamase overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 32(6): 741–748.

- Gerigk MR, Bujnicki R, Ganpo-Nkwenkwa E, Bongaerts J, Sprenger G und Takors R (2002a): Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Bioeng* 80(7): 746–754.
- Gerigk MR, Maass D, Kreutzer A, Sprenger G, Bongaerts J, Wubbolts M und Takors R (2002b): Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess Biosyst Eng* 25(1): 43–52.
- Girot P, Moroux Y, Duteil XP, Nguyen C und Boschetti E (1990): Composite affinity sorbents and their cleaning in place. *J Chromatogr* 510: 213–223.
- Goldberg RN, Tewari YB, Bell D, Fazio K, Anderson E und Al GET (1993): Thermodynamics of Enzyme-Catalyzed Reactions : Part 1 Oxidoreductases. *J Phys Chem Ref Data* 22(2).
- Gonzalez R, Murarka A, Dharmadi Y und Yazdani SS (2008): A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 10(5): 234–245.
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG und Kell DB (2004): Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 22(5): 245–252.
- Gosset G, Yong-Xiao J und Berry A (1996): A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 17(1): 47–52.
- Gottlieb K (2010): Nutzung von Glycerin und Rohglycerin als C-Quelle für die Produktion von L-Phenylalanin mit rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen. *Dissertation Universität Stuttgart, Institut für Mikrobiologie*.
- Gottlieb K, Albermann C und Sprenger GA (2014): Improvement of L-phenylalanine production from glycerol by recombinant *Escherichia coli* strains: The role of extra copies of *glpK*, *glpX*, and *tktA* genes. *Microb Cell Fact* 13: 96.
- Gros JB, Dussap CG und Catté M (1999): Estimation of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> solubility in microbial culture media. *Biotechnol Prog* 15: 923–927.
- Gruys KJ, Walker MC und Sikorski JA (1992): Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31(24): 5534–5544.
- Hatzimanikatis V und Bailey JE (1996): MCA has more to say. *J Theor Biol* 182(3): 233–242.
- Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H und Horiuchi T (2006): Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* 2(1).



- Heinrich R und Rapoport TA (1974): Linear Steady-State Treatment of Enzymatic Chains. *Eur J Biochem* 42: 97–105.
- Heller KB, Lin EC und Wilson TH (1980): Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144(1): 274–278.
- Henry CS, Broadbelt LJ und Hatzimanikatis V (2007): Thermodynamics-based metabolic flux analysis. *Biophys J* 92(5): 1792–1805.
- Hiller J, Franco-Lara E, Papaioannou V und Weuster-Botz D (2007a): Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. *Biotechnol Lett* 29(8): 1161–1167.
- Hiller J, Franco-Lara E und Weuster-Botz D (2007b): Metabolic profiling of *Escherichia coli* cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures. *Biotechnol Lett* 29(8): 1169–1178.
- Holme T und Palmstierna H (1956): Changes in glycogen and nitrogen-containing compounds in *Escherichia coli* B during growth in deficient media. *Acta Chemica Scandinavica* 10: 578–586.
- Holzhütter HG (2004): The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks. *Eur J Biochem* 271(May): 2905–2922.
- Hummel W, Schütte H, Schmidt E, Wandrey C und Kula MR (1987): Isolation of L-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4 and its application for the production of L-phenylalanine. *Appl Microbiol Biotechnol* 26: 409–416.
- Ibrahim SA, Yang H und Seo CW (2008): Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 : H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chem* 109: 137–143.
- Ikeda M (2003): Amino acid production processes. In *Microbial production of L-amino acids. Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Editor Faurie R, Thommel J; Springer; 79: 1–35
- Ikeda M (2006): Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(6): 615–626.
- Jaki BU, Franzblau SG, Cho SH und Pauli GF (2006): Development of an extraction method for mycobacterial metabolome analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41: 196–200.
- Jankowski MD, Henry CS, Broadbelt LJ und Hatzimanikatis V (2008): Group contribution method for thermodynamic analysis of complex metabolic networks. *Biophys J* 95(3): 1487–1499.
- Jantama K, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Svoronos SA und Ingram LO (2008): Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng* 101(5): 881–893.

- Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R und Lübbert A (2006): Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *J Biotechnol* 127(1): 84–94.
- Jol SJ, Kümmel A, Hatzimanikatis V, Beard DA und Heinemann M (2010): Thermodynamic calculations for biochemical transport and reaction processes in metabolic networks. *Biophys J* 99(10): 3139–3144.
- Jung Oh A, Lee HW, Saha R, Park MS, Jung J-K und Lee D-Y (2008): Exploring the Effects of Carbon Sources on the Metabolic Capacity for Predictions. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1773–1784.
- Kacser H und Burns JA (1973): The Control of Flux. *Symp Soc Exp Biol* 27: 65–104.
- Karp PD, Riley M, Paley SM und Pelligrini-Toole A (1996): EcoCyc: An encyclopedia of *Escherichia coli* genes and metabolism. *Nucleic Acids Res* 24(1): 32–39.
- Karp PD, Weaver D, Paley S, Fucher C, Kubo A, Kothari A, Krummenacker M, Subhravetti P, Weerasinghe D, Gama-Castro S, Huerta AM, Muñoz-Rascado L, Bonavides-Martinez C, Weiss V, Peralta-Gil M, Santos-Zalvaleta A, Schröder I, Mackie A, Gunsalus R, Collado-Vides J, Keseler IM und Paulsen I (2014): The EcoCyc Database. *EcoSal Plus* 1(10).
- Kayser AN (1999): Stoffflüsse in *Escherichia coli* TG1 unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen. *Dissertation TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Fakultät für Naturwissenschaften*.
- Keseler IM, Mackie A, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Bonavides-Martínez C, Fulcher C, Huerta AM, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Muniz-Rascado L, Ong Q, Paley S, Schröder I, Shearer AG, Subhraveti P, Travers M, Weerasinghe D, Weiss V, Collado-Vides J, Gunsalus RP, Paulsen I und Karp PD (2013): EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res* 41: 605–612.
- Khamduang M, Packdibamrung K, Chutmanop J, Chisti Y und Srinophakun P (2009): Production of L-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(10): 1267–1274.
- Kikuchi Y, Tsujimoto K und Kurahashi O (1997): Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 63(2): 761–762.
- Knaggs AR (2003): The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* 20: 119–136.
- Koebmann BJ, Westerhoff H V, Snoep JL, Nilsson D und Jensen PR (2002): The Glycolytic Flux in *Escherichia coli* Is Controlled by the Demand for ATP. *J Bacteriol* 184(14): 3909–3916.

- Kornberg HL und Sadler J (1961): The Metabolism of C<sub>2</sub>-Compounds in Microorganisms. 81: 503–513.
- Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA und Deckwer WD (1995): Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 39(1): 59–65.
- Kresnowati MTAP, van Winden WA, van Gulik WM und Heijnen JJ (2008): Dynamic *in vivo* metabolome response of *Saccharomyces cerevisiae* to a stepwise perturbation of the ATP requirement for benzoate export. *Biotechnol Bioeng* 99(2): 421–441.
- Kreth J, Lengeler JW und Jahreis K (2013): Characterization of Pyruvate Uptake in *Escherichia coli* K-12. *PLoS One* 8(6): 6–12.
- Kümmel A, Panke S und Heinemann M (2006): Putative regulatory sites unraveled by network-embedded thermodynamic analysis of metabolome data. *Mol Syst Biol* 2(1).
- Kundig W und Roseman S (1970): Sugar transport - Characterization of constitutive membrane-bound enzymes II of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J Biol Chem* 246(5): 1407–1418.
- Kusterer A, Krause C, Kaufmann K, Arnold M und Weuster-Botz D (2008): Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess Biosyst Eng* 31: 207–215.
- Lange HC, Eman M, Van Zuijlen G, Visser D, Van Dam JC, Frank J, De Teixeira Mattos MJ und Heijnen JJ (2001): Improved rapid sampling for *in vivo* kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 75: 406–415.
- Larsen PI, Sydnes LK, Landfald B und Strøm AR (1987): Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol* 147: 1–7.
- Larsson G und Törnkvist M (1996): Rapid sampling, cell inactivation and evaluation of low extracellular glucose concentrations during fed-batch cultivation. *J Biotechnol* 49: 69–82.
- Leuchtenberger W, Huthmacher K und Drauz K (2005): Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 1–8.
- Li H, Su H, Kim SB, Chang YK, Hong S-K, Seo Y-G und Kim CJ (2012): Enhanced production of trehalose in *Escherichia coli* by homologous expression of *otsBA* in the presence of the trehalase inhibitor, validamycin A, at high osmolarity. *J Biosci Bioeng* 113(2): 224–232.
- Liao JC, Hou SY und Chao YP (1996): Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnol Bioeng* 52: 129–140.
- Link H (2009): Rapid Media Transition for Metabolic Control Analysis of Fed-Batch Fermentation Processes. *Dissertation TU München Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik*.

- Link H, Anselment B und Weuster-Botz D (2008): Leakage of adenylates during cold methanol/glycerol quenching of *Escherichia coli*. *Metabolomics* 4(3): 240–247.
- Link H, Anselment B und Weuster-Botz D (2010): Rapid media transition: an experimental approach for steady state analysis of metabolic pathways. *Biotechnol Prog* 26(1): 1–10.
- Link H, Büscher JM und Sauer U (2012): Targeted and quantitative metabolomics in bacteria. *Method Microbiol* 39: 127–150.
- Link H, Kochanowski K und Sauer U (2013): Systematic identification of allosteric protein-metabolite interactions that control enzyme activity *in vivo*. *Nat Biotechnol* 31(4): 357–361.
- Lo TCY und Bewick MA (1977): The molecular mechanism of dicarboxylic acid transport in *Escherichia coli* K 12. *J Biol Chem* 253(21): 463–480.
- Lowry OH, Carter J, Ward JB und Glaser L (1971): The Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Level of Metabolic Intermediates in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 246: 6511–6521.
- Lu D, Grayson P und Schulten K (2003): Glycerol conductance and physical asymmetry of the *Escherichia coli* glycerol facilitator GlpF. *Biophys J* 85(5): 2977–2987.
- Lu JL und Liao JC (1997): Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase. *Biotechnol Bioeng* 53(2): 132–138.
- Luo B, Groenke K, Takors R, Wandrey C und Oldiges M (2007): Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1147(2): 153–164.
- Magnus JB, Hollwedel D, Oldiges M und Takors R (2006): Monitoring and modeling of the reaction dynamics in the valine/leucine synthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Prog* 22(4): 1071–1083.
- Mahadevan R und Schilling CH (2003): The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab Eng* 5(4): 264–276.
- Majewski RA und Domach MM (1990): Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol bioeng* 35: 731–738.
- Mascarenhas D, Ashworth DJ und Chen CS (1991): Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57(10): 2995–2999.
- Mashego MR, Rumbold K, De Mey M, Vandamme E, Soetaert W und Heijnen JJ (2007a): Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol Lett* 29(1): 1–16.

- Mashego MR, van Gulik WM und Heijnen JJ (2007b): Metabolome dynamic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to simultaneous rapid perturbations in external electron acceptor and electron donor. *FEMS Yeast Res* 7(1): 48–66.
- Mashego MR, van Gulik WM, Vinke JL, Visser D und Heijnen JJ (2006): *In vivo* kinetics with rapid perturbation experiments in *Saccharomyces cerevisiae* using a second-generation BioScope. *Metab Eng* 8(4): 370–383.
- Mashego MR, Wu L, Van Dam JC, Ras C, Vinke JL, Van Winden WA, Van Gulik WM und Heijnen JJ (2004): MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-<sup>13</sup>C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. *Biotechnol Bioeng* 85(6): 620–628.
- McCandliss RJ, Poling MD und Herrmann KM (1978): 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-Phosphate Synthase. *J Biol Chem* 253(12): 4259–4265.
- McCloskey D, Palsson BØ und Feist AM (2013): Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 9: 661.
- Miller JE, Backman KC, O'Connor MJ und Hatch RT (1987): Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 2: 143–149.
- Miskovic L und Hatzimanikatis V (2010): Production of biofuels and biochemicals: in need of an ORACLE. *Trends Biotechnol* 28(8): 391–397.
- Monod J (1949): The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* 3: 371–394.
- Müller AC und Bockmayr A (2013): Fast thermodynamically constrained flux variability analysis. *Bioinformatics* 29(7): 903–909.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth R und Schäfer-Korting M (2008): Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* Stuttgart 9. Auflage.
- Nakamichi K, Nabe K, Nishida Y und Tosa T (1989): Production of L-phenylalanine from phenylpyruvate by *Paracoccus denitrificans* containing aminotransferase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 243–246.
- Nasution U, van Gulik WM, Proell A, van Winden WA und Heijnen JJ (2006): Generating short-term kinetic responses of primary metabolism of *Penicillium chrysogenum* through glucose perturbation in the bioscope mini reactor. *Metab Eng* 8(5): 395–405.
- Nasution U, van Gulik WM, Ras C, Proell A und Heijnen JJ (2008): A metabolome study of the steady-state relation between central metabolism, amino acid biosynthesis and penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Metab Eng* 10(1): 10–23.
- Nielsen J (1997): Metabolic control analysis of biochemical pathways based on a thermokinetic description of reaction rates. *Biochem J* 138: 133–138.

- Noack S, Nöh K, Moch M, Oldiges M und Wiechert W (2011): Stationary versus non-stationary  $^{13}\text{C}$ -MFA: a comparison using a consistent dataset. *J Biotechnol* 154(2-3): 179–190.
- Nöh K, Grönke K, Luo B, Takors R, Oldiges M und Wiechert W (2007): Metabolic flux analysis at ultra short time scale: isotopically non-stationary  $^{13}\text{C}$  labeling experiments. *J Biotechnol* 129(2): 249–267.
- Nöh K und Wiechert W (2006): Experimental Design Principles for Isotopically Instationary  $^{13}\text{C}$  Labeling Experiments. *Biotechnol Bioeng* 94(2): 234–251.
- Nöh K und Wiechert W (2011): The benefits of being transient: isotope-based metabolic flux analysis at the short time scale. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(5): 1247–1265.
- Oberhardt MA, Palsson BØ und Papin JA (2009): Applications of genome-scale metabolic reconstructions. *Mol Syst Biol* 5: 320.
- Okahashi N, Kajihata S, Furusawa C und Shimizu H (2014): Reliable Metabolic Flux Estimation in *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism Using Intracellular Free Amino Acids. *Metabolites* 4(2): 408–420.
- Oldiges M (2004): Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli*. *Dissertation Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.
- Oldiges M, Kunze M, Degenring D, Sprenger GA und Takors R (2004): Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway. *Biotechnol Prog* 20(6): 1623–1633.
- Oldiges M und Takors R (2005): Applying metabolic profiling techniques for stimulus-response experiments: chances and pitfalls. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 92:173–196.
- Orth JD, Conrad TM, Na J, Lerman JA, Nam H, Feist AM und Palsson BØ (2011): A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism-2011. *Mol Syst Biol* 7: 535.
- Orth JD und Palsson BØ (2010): What is Flux Balance Analysis? *Nat Biotechnol* 28(3): 245–248.
- Paczia N, Nilgen A, Lehmann T, Gätgens J, Wiechert W und Noack S (2012): Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. *Microb Cell Fact* 11: 122.
- Palsson BØ (2000): The challenges of in silico biology moving from a reductionist paradigm to one that views cells as systems will necessitate. *Nat Biotechnol* 18: 1147–1150.

- Patil RV und Dekker EE (1992): Cloning, nucleotide sequence, overexpression, and inactivation of the *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase gene. *J Bacteriol* 174(1): 102–107.
- Pettigrew DW, Yu GJ und Liu Y (1990): Nucleotide regulation of *Escherichia coli* glycerol kinase: initial-velocity and substrate binding studies. *Biochemistry* 29(37): 8620–8627.
- Pittard J, Camakaris H und Yang J (2005): The TyrR regulon. *Mol Microbiol* 55(1): 16–26.
- Preiss J und Romeo T (1994): Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 47: 299–329.
- Price N, Famili I, Beard D und Palsson BØ (2002): Extreme Pathways and Kirchhoff's Second Law. *Biophys Chem* 83: 2879–2882.
- Purvis JE, Yomano LP und Ingram LO (2005): Enhanced Trehalose Production Improves Growth of *Escherichia coli* under Osmotic Stress. 71(7): 3761–3769.
- Puskeiler R, Kusterer A, John GT und Weuster-Botz D (2005): Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 42: 227–235.
- Rabinowitz JD (2007): Cellular metabolomics of *Escherichia coli*. *Expert Rev Proteomics* 4(2): 187–198.
- Rabinowitz JD und Kimball E (2007): Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*. *Anal Chem* 79(16): 6167–6173.
- Reed JL (2012): Shrinking the metabolic solution space using experimental datasets. *PLoS Comput Biol* 8(8): e1002662.
- Reed JL und Palsson BØ (2003): Thirteen Years of Building Constraint-Based *In Silico* Models of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185(9): 2692–2699.
- Reed JL, Vo TD, Schilling CH und Palsson BØ (2003): An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biol* 4(9): R54.
- Revelles O, Millard P, Nougayrede JP, Dobrindt U, Oswald E, Letisse F und Portais JC (2013): The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *PLoS ONE* 8(6): 1–12.
- Richey DP und Lin EC (1972): Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 112(2): 784–790.
- Robinson MS, Easom RA, Danson MJ und Weitzman PD (1983): Citrate synthase of *Escherichia coli*. Characterisation of the enzyme from a plasmid-cloned gene and amplification of the intracellular levels. *FEBS Lett* 154(1): 51–54.

- Rodriguez A, Martínez JA, Flores N, Escalante A, Gosset G und Bolivar F (2014): Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb Cell Fact* 13: 126.
- Romeo T, Vakulskas CA und Babitzke P (2013): Post-transcriptional regulation on a global scale: Form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol* 15(2): 313–324.
- Rozpędowska E, Hellborg L, Ishchuk OP, Orhan F, Galafassi S, Merico A, Woolfit M, Compagno C und Piskur J (2011): Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun* 2: 302.
- Rüffer N, Heidersdorf U, Kretzers I, Sprenger GA, Raeven L und Takors R (2004): Fully integrated L-phenylalanine separation and concentration using reactive-extraction with liquid-liquid centrifuges in a fed-batch process with *E. coli*. *Bioprocess Biosyst Eng* 26(4): 239–248.
- Ruhal R, Kataria R und Choudhury B (2013): Trends in bacterial trehalose metabolism and significant nodes of metabolic pathway in the direction of trehalose accumulation. *Microb Biotechnol* 6(5): 493–502.
- Ruijter GJG und Visser J (1999): Characterisation of *Aspergillus niger* phosphoglucose isomerase. Use for quantitative determination of erythrose-4-phosphate. *Biochimie* 81: 267–272.
- Saier MH (1977): Bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems: structural, functional, and evolutionary interrelationships. *Bacteriol Rev* 41(4): 856–871.
- Sauer U (2006): Metabolic networks in motion:  $^{13}\text{C}$ -based flux analysis. *Mol Syst Biol* 2: 62.
- Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A und Fischer E (2004): The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279(8): 6613–6619.
- Sauer U und Eikmanns BJ (2005): The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29(4): 765–794.
- Schädel F und Franco-Lara E (2009): Rapid sampling devices for metabolic engineering applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 83(2): 199–208.
- Schaub J, Mauch K und Reuss M (2008): Metabolic flux analysis in *Escherichia coli* by integrating isotopic dynamic and isotopic stationary  $^{13}\text{C}$  labeling data. *Biotechnol Bioeng* 99(5): 1170–1185.
- Schaub J, Schiesling C, Reuss M und Dauner M (2006): Integrated sampling procedure for metabolome analysis. *Biotechnol Prog* 22(5): 1434–1442.
- Schellenberger J, Lewis NE und Palsson BØ (2011): Elimination of thermodynamically infeasible loops in steady-state metabolic models. *Biophys J* 100(3): 544–553.



- Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, Zielinski DC, Bordbar A, Lewis NE, Rahmanian S, Kang J, Hyduke DR und Palsson BØ (2011): Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc* 6(9): 1290–1307.
- Schilling CH, Edwards JS, Letscher D und Palsson BØ (2001): Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems. *Biotechnol Bioeng* 71(4): 286–306.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M und Witholt B (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258–268.
- Schryvers A, Lohmeier E und Weiner JH (1978): Chemical and functional properties of the native and reconstituted forms of the membrane-bound, aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 253(3): 783–788.
- Schügerl K (1985): Bioreaktionstechnik Band 1 - Grundlagen, Formalkinetik, Reaktortypen und Prozeßführung. *Otto Salle Verlag München* 1. Auflage.
- Schuetz R, Kuepfer L und Sauer U (2007): Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 3: 119.
- Schuhmacher T, Löffler M, Hurler T und Takors R (2014): Phosphate limited Fed-Batch processes: impact on carbon usage and energy metabolism in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 190: 1–9.
- Schürmann M und Sprenger GA (2001): Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J Biol Chem* 276(14): 11055–11061.
- Shen T, Liu Q, Xie X, Xu Q und Chen N (2012): Improved production of tryptophan in genetically engineered *Escherichia coli* with *TktA* and *PpsA* overexpression. *J Biomed Biotechnol* 2012: 605219.
- Simpson TW, Shimizu H und Stephanopoulos G (1998): Experimental determination of group flux control coefficients in metabolic networks. *Biotechnol Bioeng* 58(2-3): 149–153.
- Sleator RD und Hill C (2002): Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 26: 49–71.
- Smallbone K und Simeonidis E (2009): Flux balance analysis: a geometric perspective. *J Theor Biol* 258(2): 311–315.
- Speranza ML, Valentini G und Malcovati M (1990): Fructose-1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 191: 701–704.
- Sprenger GA (2006): Aromatic Amino Acids. In *Amino Acid Biosynthesis - Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*. Editor Wendisch VF; Springer: 93–127.

- Sprenger GA (2007): From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(4): 739–749.
- Stephanopoulos GN, Aristidou AA und Nielsen J (1998): Metabolic engineering - Principles and methodologies. *Academic Press* San Diego.
- Stephanopoulos GN und Stafford DE (2002): Metabolic engineering: A new frontier of chemical reaction engineering. *Chem Eng Sci* 57: 2595–2602.
- Storhas W (2003): Bioverfahrensentwicklung. *Wiley-VCH Verlag* Weinheim.
- Strøm AR und Kaasen I (1993): Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol* 8(2): 205–210.
- Taymaz-Nikerel H, Borujeni AE, Verheijen PJT, Heijnen JJ und van Gulik WM (2010): Genome-derived minimal metabolic models for *Escherichia coli* MG1655 with estimated *in vivo* respiratory ATP stoichiometry. *Biotechnol Bioeng* 107(2): 369–381.
- Taymaz-Nikerel H, de Mey M, Ras C, ten Pierick A, Seifar RM, van Dam JC, Heijnen JJ und van Gulik WM (2009): Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 386(1): 9–19.
- Taymaz-Nikerel H, van Gulik WM und Heijnen JJ (2011): *Escherichia coli* responds with a rapid and large change in growth rate upon a shift from glucose-limited to glucose-excess conditions. *Metab Eng* 13(3): 307–318.
- Teleki A, Sánchez-Kopper A und Takors R (2015): Alkaline conditions in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for intracellular metabolite quantification using tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 475: 4–13.
- Teusink B, Passarge J, Reijenga CA, Esgalhado E, van Der Weijden CC, Schepper M, Walsh MC, Bakker BM, van Dam K, Westerhoff HV und Snoep JL (2000): Can yeast glycolysis be understood terms of *in vitro* kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *Eur J Biochem* 267: 5313–5329.
- Thomas S und Fell DA (1998): A control analysis exploration of the role of ATP utilisation in glycolytic-flux control and glycolytic-metabolite-concentration regulation. *Eur J Biochem* 258: 956–967.
- Thongchuang M, Pongsawasdi P, Chisti Y und Packdibamrung K (2012): Design of a recombinant *Escherichia coli* for producing L-phenylalanine from glycerol. *World J Microbiol Biotechnol* 2937–2943.
- Thorner JW und Paulus H (1973): Catalytic and Allosteric Properties of Glycerol Kinase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 248: 3922–3932.

- Tribe DE und Pittard J (1979): Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Appl Environ Microbiol* 38(2): 181–190.
- Trüper HG und Galinski EA (1990): Biosynthesis and fate of compatible solutes in extremely halophilic phototrophic eubacteria. *FEMS Microbiol Lett* 75(2-3): 247–254.
- Visser D und Heijnen JJ (2002): The mathematics of metabolic control analysis revisited. *Metab Eng* 4(2): 114–23.
- Visser D und Heijnen JJ (2003): Dynamic simulation and metabolic re-design of a branched pathway using linlog kinetics. *Metab Eng* 5: 164–176.
- Visser D, van Zuylen G a, van Dam JC, Eman MR, Pröll A, Ras C, Wu L, van Gulik WM und Heijnen JJ (2004): Analysis of *in vivo* kinetics of glycolysis in aerobic *Saccharomyces cerevisiae* by application of glucose and ethanol pulses. *Biotechnol Bioeng* 88(2): 157–167.
- Visser D, van Zuylen GA, van Dam JC, Oudshoorn A, Eman MR, Ras C, van Gulik WM, Frank J, van Dedem GWK und Heijnen JJ (2002): Rapid sampling for analysis of *in vivo* kinetics using the BioScope: a system for continuous-pulse experiments. *Biotechnol Bioeng* 79(6): 674–681.
- Wahl A, El Massaoudi M, Schipper D, Wiechert W und Takors R (2004): Serial  $^{13}\text{C}$ -based flux analysis of an L-phenylalanine-producing *E. coli* strain using the sensor reactor. *Biotechnol Prog* 20(3): 706–714.
- Wang L, Birol I und Hatzimanikatis V (2004): Metabolic control analysis under uncertainty: framework development and case studies. *Biophys J* 87: 3750–3763.
- Weiner M, Albermann C, Gottlieb K, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014a): Fed-batch production of L-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 83: 62–69.
- Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014b): Improvement of constraint-based flux estimation during L-phenylalanine production with *Escherichia coli* using targeted knock-out mutants. *Biotechnol Bioeng* 111(7): 1406–1416.
- Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014c): Carbon storage in recombinant *Escherichia coli* during growth on glycerol and lactic acid. *Biotechnol Bioeng* 111(12): 2508–2519.
- Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015b): Perturbation experiments: Approaches for metabolic pathway analysis in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* DOI 10.1007/10\_2015\_326.
- Weiner M, Tröndle J, Schmieder A, Binder K, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2015a): Parallelized small-scale production of uniformly  $^{13}\text{C}$ -labeled cell-extract for quantitative metabolome analysis. *Anal Biochem* 478: 134–140.

- Weitzel M, Nöh K, Dalman T, Niedenführ S, Stute B und Wiechert W (2013):  $^{13}\text{C}$ FLUX2-high-performance software suite for  $^{13}\text{C}$ -metabolic flux analysis. *Bioinformatics* 29(1): 143–145.
- Wendisch VF, Lindner SN und Meiswinkel TM (2011): Use of Glycerol in Biotechnological Applications. In *Biodiesel – Quality, Emissions and By-Products* Editor Montero G und Stoytcheva M; INTECH: 305–340.
- Weuster-Botz D (1997): Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem* 246(246): 225–233.
- Weuster-Botz D (2006): Mikro-Bioverfahrenstechnik. *Chemie Ing Tech* 78(3): 256–260.
- Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT und Arnold M (2005): Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst Eng* 28: 109–119.
- Wiechert W (2001):  $^{13}\text{C}$  Metabolic Flux Analysis. *Metab Eng* 3: 195–206.
- Wiechert W und Nöh K (2013): Isotopically non-stationary metabolic flux analysis: complex yet highly informative. *Curr Opin Biotechnol* 24(6): 979–986.
- Williams JF, Blackmore PF, Duke CC und MacLeod JK (1980): Fact, uncertainty and speculation concerning the biochemistry of D-erythrose-4-phosphate and its metabolic roles. *Int J Biochem* 12: 339–344.
- Winder CL, Dunn WB, Schuler S, Broadhurst D, Jarvis R, Stephens GM und Goodacre R (2008): Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal Chem* 80(8): 2939–2948.
- Wolfe AJ (2005): The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1): 12–50.
- Woolston BM, Edgar S und Stephanopoulos G (2013): Metabolic engineering: past and future. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 4: 259–288.
- Wu L, Mashego MR, Proell AM, Vinke JL, Ras C, van Dam J, van Winden WA, van Gulik WM und Heijnen JJ (2006): *In vivo* kinetics of primary metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* studied through prolonged chemostat cultivation. *Metab Eng* 8(2): 160–171.
- Wu L, Mashego MR, van Dam JC, Proell AM, Vinke JL, Ras C, van Winden WA, van Gulik WM und Heijnen JJ (2005): Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly  $^{13}\text{C}$ -labeled cell extracts as internal standards. *Anal Biochem* 336(2): 164–171.
- Wu L, Wang W, Winden WA Van, Gulik WM Van und Heijnen JJ (2004): A new framework for the estimation of control parameters in metabolic pathways using lin-log kinetics. *Eur J Biochem* 271: 3348–3359.

- Xu YF, Amador-Noguez D, Reaves ML, Feng X-J und Rabinowitz JD (2012): Ultrasensitive regulation of anapleurosis via allosteric activation of PEP carboxylase. *Nat Chem Biol* 8(6): 562–568.
- Yakandawala N, Romeo T, Friesen AD und Madhyastha S (2008): Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(2): 283–291.
- Yazdani SS und Gonzalez R (2008): Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metab Eng* 10(6): 340–351.
- Zamboni N, Fendt SM, Rühl M und Sauer U (2009): <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis. *Nat Protoc* 4(6): 878–892.
- Zamboni N, Fischer E und Sauer U (2005): FiatFlux-a software for metabolic flux analysis from <sup>13</sup>C-glucose experiments. *BMC Bioinformatics* 6: 209.
- Zamboni N, Kümmel A und Heinemann M (2008): anNET: a tool for network-embedded thermodynamic analysis of quantitative metabolome data. *BMC Bioinformatics* 9: 199.
- Zenobi R (2013): Single-cell metabolomics: analytical and biological perspectives. *Science* 342: 1201–1212.
- Zhou H, Liao X, Wang T, Du G und Chen J (2010): Enhanced L-phenylalanine biosynthesis by co-expression of *pheA(fbr)* and *aroF(wt)*. *Bioresour Technol* 101(11): 4151–4156.
- Zhou LB und Zeng AP (2015): Exploring Lysine Riboswitch for Metabolic Flux Control and Improvement of L-Lysine Synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Synth Biol*: DOI: 10.1021/sb500332c.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

amp	Ampicillin
BTM	Biotrockenmasse
CER	Kohlendioxidbildungsrate ( <i>,carbon evolution rate‘</i> )
CFU	Kolonie-bildenden Einheiten ( <i>,colony forming units‘</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBA	Flussbilanz-Analyse
FVA	Flussvarianz-Analyse
gFBA	Geometrische Flussbilanz-Analyse
HPLC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>,high performance liquid chromatography‘</i> )
IDMS	<i>,isotope dilution mass-spectrometry‘</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
GC-MS	Massenspektrometer mit vorgeschalteter Gaschromatographie
kan	Kanamycin
LB	<i>,lysogeny broth‘</i> -Medium
LC-MS	Massenspektrometer mit vorgeschalteter Flüssigkeitschromatographie
MA	Metabolische Analyse
MCA	Metabolische Kontrollanalyse ( <i>,metabolic control analysis‘</i> )
MFA	Metabolische Stoffflussanalyse ( <i>,metabolic flux analysis‘</i> )
OD	Optische Dichte
OTR	Sauerstoffeintrag ( <i>,oxygen transfer rate‘</i> )
OUR	Sauerstoffaufnahme ( <i>,oxygen uptake rate‘</i> )
PBS	Phosphatpuffer ( <i>,phosphate buffered saline‘</i> )
RMT	Methode des schnellen Medienwechsels ( <i>,rapid media transition‘</i> )
TBA	Tributylamin
TEA	Triethanolamin
Tfb	Transformationspuffer
U- <sup>13</sup> C	Uniform <sup>13</sup> C-markiert
UHPLC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>,ultra hplc‘</i> )
VE	Vollentsalzt
	<b>Metabolite</b>
13DPG	1,3-Bisphosphoglycerat
2PG	2-Phosphoglycerat
34HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
3DHQ	3-Dehydroquinat

---

3DHS	3-Dehydro-Shikimat
3PG	3-Phosphoglycerat
3PSME	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat
6PG	6-Phosphogluconat
AC	Acetat
AcCoA	Acetyl-CoA
AKG	$\alpha$ -Ketoglutarat
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CHOR	Chorismat
CIT	Citrat
DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat
EtOH	Ethanol
F6P	Fructose-6-Phosphat
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
FOR	Formiat
FUM	Fumarat
G6P	Glucose-6-Phosphat
GAP	Glyceraldehydphosphat
GLY3P	Glycerin-3-phosphat
GLYC	Glycerin
ICIT	Iso-Citrat
Lak	Laktat
L-Glut	L-Glutamat
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Trp	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosin
MAL	Malat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid oxidiert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduziert
OAA	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat

PHPYR	Phenylpyruvat
PPHN	Prephenat
PYR	Pyruvat
Q8	Ubiquinol oxidiert
Q8H <sub>2</sub>	Ubiquinol reduziert
R5P	Ribose-5-phosphat
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
SHK	Shikimat
SHK3P	Shikimat-3-phosphat
SUC	Succinat
X5P	Xylose-5-phosphat

### **Reaktionen respektive katalysierende Enzyme**

3dhsdh	3-Dehydro-Shikimat-Dehydrogenase
ack	Acetat-Kinase
acon	(Iso-)Citrat-Hydrolase-Komplex
adh	Alkohol-Dehydrogenase
akgdh	$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase
atps	Adenosintriphosphat-Synthase
chorm	Chorismat-Mutase
chors	Chorismat-Synthase
cs	Citrat-Synthase
cytbo	Cytochrom-Terminal-Oxidase
dahs	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase
dhapt	Dihydroxyacetonphosphat-Transferase
dhqd	3-Dehydroquinat-Dehydratase
dhqs	3-Dehydroquinat-Synthase
eno	Enolase
fba	Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase
fbp	Fructose-1,6-Bisphosphatase
fum	Fumarase
g6pdh	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
gapd	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
glyc3pd	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
glycdx	Glycerin-Dehydrogenase
glyck	Glycerin-Kinase
gnd	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase



---

icdh	Isocitrat-Dehydrogenase
icl	Isocitrat-Lyase
lacd	Laktat-Dehydrogenase
mals	Malat-Synthase
mdh	Malat-Dehydrogenase
me	Malat-Enzyme (,malic enzyme')
nadh6	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase
oaadc	Oxalacetat-Decarboxylase
pdh	Pyruvat-Dehydrogenase
pfk	Phosphofruktokinase
pfl	Pyruvat-Formiat-Lyase
pgi	Phosphoglucose-Isomerase
pgk	Phosphoglycerat-Kinase
pgm	Phosphoglycerat-Mutase
pheta	L-Phenylalanin-Transaminase
pox	Pyruvat-Oxidase
ppc	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
ppck	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
ppnd	Prephenat-Dehydrogenase
ppndh	Prephenat-Dehydratase
pps	Phosphoenolpyruvat-Synthase
psevt	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase
pta	Phosphat-Acetyl-Transferase
pts	Phosphotransferase-System
pyk	Pyruvat-Kinase
rpe	Ribulose-5-Phosphat-Epimerase
rpi	Ribulose-5-Phosphat-Isomerase
sdh	Succinat-Dehydrogenase
shkk	Shikimat-Kinase
sucoas	SucCoA-Synthase
tala	Transaldolase
thd2	NAD-Transhydrogenase
tpi	Triosephosphat-Isomerase
tk1	Transketolase 1
tk2	Transketolase 2
trps2	Tryptophan-Synthase
tyrta	Tyrosin-Aminotransferase

## A Anhang

### A.1 Verwendete Chemikalien und Gerätschaften

**Tabelle A.1:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Acetic Acid	49199	Fluka
Acetonitril, LC grade	9012	Baker
Acetonitril, LC-MS grade	34967	Fluka
Acetyl-CoA-Trilithiumsalz	10101893001	Roche Diagnostics
Adenosin-Diphosphat-Natriumsalz	A2754	Sigma-Aldrich
Adenosin-Monophosphat-Natriumsalz	A1752	Sigma-Aldrich
Adenosin-Triphosphat-Dinatriumsalz	A3377	Sigma-Aldrich
Agar	5210.1	Carl Roth
Aluminium(III)chlorid-Hexahydrat	1.01084.1000	Merck
$\alpha$ -Ketoglutarat	75890	Fluka
Ammoniak, 25 %ig	4080.2500	neoLab
Ammoniumchlorid	K298.1	Carl Roth
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	A2301.5000	AppliChem
Ammoniumsulfat	3746.1	Carl Roth
Ampicillin	K029.1	Carl Roth
Antifoam 204	A6425	Sigma-Aldrich
Anthranilat	A89855	Sigma-Aldrich
Bernsteinsäure-Dinatriumsalz-Hexahydrat	8.20151.0500	Merck
Bicin	9162.1	Carl Roth
Borsäure	1.00165.0500	Merck
Brenztraubensäure-Natriumsalz	8793.1	Carl Roth
Tri-Butylamin	90781	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid-Dihydrat	1.02382.0500	Merck
Chloramphenicol	3886.2	Carl Roth
Chorismat	C1761	Sigma-Aldrich
DL-Isocitrat-tri-Natriumsalz	I1252	Sigma-Aldrich
Cobaltchlorid-Hexahydrat	1.02539.0250	Merck
3-Dehydro-Shikimat	D5616	Sigma-Aldrich
DiBAC4(3)	21411	AAT Bioquest
Eisensulfat-Heptahydrat	P015.1	Carl Roth
Ethanol, 99 %ig	9065.1	Carl Roth
Triethanolaminhydrochlorid	T1502	Sigma-Aldrich
Fumarat	8.00269.0100	Merck
U- <sup>13</sup> C-Glucose	CLM-1396-10	Eurisotop
Glucose-Monohydrat	6887.1	Carl Roth
DL-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Lösung	G5251	Sigma-Aldrich
Glycerin, 99,5 %ig	3783.2	Carl Roth
Glycerin-3-phosphat Lithiumsalz	94124	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	2363.3	Carl Roth
Iodessigsäure	I4386	Sigma-Aldrich
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	CN08.4	Carl Roth

Fortsetzung **Tabelle A.1**: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Kaliumacetat	HN10.1	Carl Roth
Kaliumchlorid	6781.2	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	3904.3	Carl Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat	4600.1000	neoLab
Kaliumhydroxid	P1767	Sigma-Aldrich
Kalium-Phosphoenolpyruvat	P7127	Sigma-Aldrich
Kanamycinsulfat	T832.3	Carl Roth
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	1.02733.0250	Merck
Di-Lithium-Dihydroxyacetonphosphat	D7137	Sigma-Aldrich
L-Malat	8.00384.0050	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	T888.2	Carl Roth
Mangan(II)-Chlorid-Tetrahydrat	M3634	Sigma
Mangan(II)-Sulfat-Monohydrat	1.05941.0250	Merck
Methanol, LC-grade	8402	Baker
Methanol, LC-MS-grade	14262	Fluka
3-Mercaptopropionsäure	63768	Sigma-Aldrich
MOPS-Puffer	6979.2	Carl Roth
Natriumacetat-Trihydrat	6779.2	Carl Roth
Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth
Natrium-Citrat	HN13.2	Carl Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	3580.1	Carl Roth
Natrium-D-Glucose-6-Phosphat	G7879	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	T878.1	Carl Roth
Natrium-DL-Laktat	L1375	Sigma-Aldrich
Di-Natrium-Flavinadenindinukleotid-Hydrat	F6625	Sigma-Aldrich
Natrium-Formiat	71540	Fluka
Tri-Natrium-Fructose-1,6-Bisphosphat	F3627	Sigma-Aldrich
Di-Natrium-Fructose-6-Phosphat-Hydrat	F3627	Sigma-Aldrich
Natrium-L-Glutamat-Monohydrat	1.06445.1000	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	P030.3	Carl Roth
Natriumhydroxid	P031.2	Carl Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	1065210250	Merck
Natrium-Phenylpyruvat	P8001	Sigma-Aldrich
Tri-Natrium-6-Phospho-D-Gluconat	P7877	Sigma-Aldrich
Di-Natrium-Ribose-5-Phosphat-Dihydrat	83875	Sigma-Aldrich
Di-Natrium-Ribulose-5-Phosphat-Dihydrat	83899	Sigma-Aldrich
NAD	10127965001	Roche Diagnostics
NADH-Dinatriumsalz	10128015001	Roche Diagnostics
NADP-Dinatriumsalz	10128031001	Roche Diagnostics
NADPH-Tetranatriumsalz	10107824001	Roche Diagnostics
Pepton (aus Casein)	8986.2	Carl Roth
L-Phenylalanin	1709.1	Carl Roth
3-Phosphoglycerat	P8877	Sigma-Aldrich
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	9079.2	Carl Roth
Ortho-Phtaldialdehyd	5980.1	Carl Roth
Prephenat	P2384	Sigma-Aldrich
2-Propanol, LC-MS-grade	34965	Fluka
RH414	21485	AAT Bioquest

Fortsetzung **Tabelle A.1:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Chemikalie	Chemikalie
Rubidiumchlorid	R2252	Sigma-Aldrich
Salzsäure rauchend (37 %)	4625.2	Carl Roth
Schwefelsäure (95–97 %)	1.00731.2511	Merck
Sedoheptulose-7-phosphat Lithiumsalz	78832	Sigma-Aldrich
Shikimat	S5375	Sigma-Aldrich
Shikimat-3-Phosphat	-	Universität Stuttgart
Thiamin-Hydrochlorid	10.917-7	Sigma-Aldrich
L-Tyrosin	1741.2	Carl-Roth
Wasser, LC-MS-grade	14263	Fluka
Zinksulfat-Heptahydrat	1.08883.0500	Merck

**Tabelle A.2:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Gerätschaften.

Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav Varioklav EC	H+P Medizintechnik
Einstrahlphotometer Genesys 10S UV-VIS	Thermo Scientific
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD	Christ-Gefriertrocknungsanlagen
Kryostat Ultra-Kryomat K90W	MGW Lauda
Mikrotiterplattenphotometer Multiskan FC	Thermo Scientific
pH-Meter Lab850	Schott Instruments
Trockenschrank 90100080	Binder
Schüttelinkubator Multitron	Infors HT
Sterilbank FAZ 3	Waldner
Vakuumpumpe Laboport	KNF Lab
Vortexmischer Vortex Genie 2	Scientific Instruments
Waage Explorer 32000	Ohaus
Waage Explorer 120	Ohaus
Wasserbad EH	Julabo
Zentrifuge Heraeus™ Biofuge™ Stratos™	Thermo Scientific
Zentrifuge Mikro 20	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen

## A.2 Medien und Lösungen

**Tabelle A.3:** Zusammensetzung LB-Medium.

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	5,00
Natriumchlorid	10,00
Pepton (aus Casein)	10,00

**Tabelle A.4:** Minimal-Medium zur L-Phenylalanin-Produktion. KSQ = Kohlenstoffquelle.

Komponente	Endkonzentration, g L <sup>-1</sup>	Sterilisation	Konzentration Stocklösung, g L <sup>-1</sup>
Ammoniumsulfat	5,00	autoklaviert	–
Kaliumdihydrogenphosphat	3,00	autoklaviert	–
Di-Kaliumhydrogenphosphat	12,00	autoklaviert	–
Natriumchlorid	0,10	autoklaviert	–
Sterile Zugabe nach Autoklavieren			
Calciumchlorid-Dihydrat	0,0150	sterilfiltriert	15,00
Eisensulfat-Heptahydrat gepuffert in Natrium-Citrat	0,1125	sterilfiltriert	22,50 (Citratpuffer 200,00)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,30	sterilfiltriert	300,00
Thiamin	0,0075	sterilfiltriert	7,50
L-Phenylalanin	0,0750	sterilfiltriert	10,00
L-Tyrosin	0,0750	sterilfiltriert	15,00*
Glycerin	Eine KSQ: 7,00 Zweite KSQ: 4,50	autoklaviert	1000,00
Laktat	Eine KSQ: 5,00 Zweite KSQ: 2,50	autoklaviert	600,00
Ampicillin oder Kanamycin	0,100 / 0,050	sterilfiltriert	50,00

\* Da L-Tyrosin bei neutralem pH eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweist, wurden zur Herstellung von 100 mL Stocklösung ca. 3 mL KOH (5 M) hinzugefügt.

Die in Tabelle A.5 aufgeführte Spurenelemente-Lösung wurde mit Hilfe von HCl gelöst und dem Medium für Kultivierungen im 15 L-Maßstab zugefügt ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ).

**Tabelle A.5:** Spurenelementlösung für Minimal-Medium zur L-Phenylalanin-Produktion.

Komponente	Konzentration, $\text{g L}^{-1}$
Aluminium(III)chlorid-Hexahydrat	10,00
Borsäure	0,50
Cobaltchlorid-Hexahydrat	7,33
Kupferchlorid-Dihydrat	1,00
Mangansulfat-Monohydrat	11,20
Natriummolybdat-Dihydrat	2,00
Zinksulfat-Heptahydrat	2,00

**Tabelle A.6:** Minimal-Medium zur  $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Extrakt-Herstellung.

Komponente	Endkonzentration, $\text{g L}^{-1}$	Sterilisation	Konzentration Stocklösung, $\text{g L}^{-1}$
Ammoniumchlorid	0,20	autoklaviert	–
Ammoniumsulfat	2,00	autoklaviert	–
Kaliumdihydrogenphosphat	3,25	autoklaviert	–
Di-Kaliumhydrogenphosphat	2,50	autoklaviert	–
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	1,50	autoklaviert	–
Sterile Zugabe nach Autoklavieren			
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1,00	sterilfiltriert	500,00
Spurenelementlösung	$2 \text{ mL L}^{-1}$	sterilfiltriert	(siehe Tabelle A.7)

Die in Tabelle A.7 aufgeführte Spurenelemente-Lösung wurde mit Hilfe von HCl gelöst

**Tabelle A.7:** Spurenelementlösung für Minimal-Medium zur U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung.

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Aluminium(III)chlorid-Hexahydrat	1,2500
Borsäure	0,0625
Calciumchlorid-Dihydrat	5,0000
Cobaltchlorid-Hexahydrat	0,8750
Eisensulfat-Heptahydrat	9,1500
Mangansulfat-Monohydrat	1,2500
Natriummolybdat-Dihydrat	0,2500
Zinksulfat-Heptahydrat	0,2500

**Tabelle A.8:** Phosphat-Puffer (PBS) zur OD-Bestimmung und Zellüberführung.

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Kaliumchlorid	0,20
Kaliumdihydrogenphosphat	0,24
Natriumchlorid	8,00
Di-Natriumhydrogenphosphat	1,44

**Tabelle A.9:** Kalium-Phosphat-Puffer zur U-<sup>13</sup>C-Extrakt-Herstellung.

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Kalium-Dihydrogenphosphat	1,3609
Di-Kaliumhydrogenphosphat	1,7418

**Tabelle A.10:** Zulaufmedium zur parallelen Kultivierung im 0,5 L-Maßstab.

Komponente	Konzentration, g L <sup>-1</sup>
Ammoniumsulfat	7,00
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	7,00
Ampicillin oder Carbenicillin	0,10
Glycerin	150,00

**Tabelle A.11:** Zulaufmedium zur Kultivierung im 15 L-Maßstab zur L-Phenylalanin-Produktion (verwendet in Kapitel 5.2.1).

Medium Nr.	Glycerin, g L <sup>-1</sup>	Laktat, g L <sup>-1</sup>	L-Phe, g L <sup>-1</sup>	L-Tyr, g L <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , g L <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , g L <sup>-1</sup>	Kanamycin (Ampicillin), g L <sup>-1</sup>
1	100,00	60,00	2,50	3,60	80,00	-	0,10 (0,40)
2a	-	200,00	1,00	4,20	40,00	-	0,10 (0,27)
2b	400,00	-	0,50	3,75	-	-	0,10 (0,40)
3	800,00	-	-	-	37,50	37,50	0,10 (0,40)

**Tabelle A.12:** Zulaufmedium zur Kultivierung im 15 L-Maßstab zur L-Phenylalanin-Produktion (verwendet in Kapitel 5.2.2 und nachfolgenden Kapiteln).

Medium	Glycerin	Laktat	L-Phe	L-Tyr	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kanamycin
Zulaufmedien unter Einsatz von Glycerin und Laktat in der Wachstumsphase							
1	100,00	60,00	2,50	3,60	60,00	-	0,10
2a	-	200,00	1,00	3,50	40,00	-	0,10
2b	400,00	-	0,50	3,75	-	-	0,10
3	800,00	-	-	-	10,00	10,00	0,10
Zulaufmedien unter Einsatz von Laktat als alleinige Kohlenstoffquelle							
1	-	60,00	2,50	3,60	60,00	-	0,10
2a	-	220,00	1,00	3,50	40,00	-	0,10
2b	-	-	0,50	3,75	-	-	0,10
3	-	600,00	-	-	-	-	0,10
Zulaufmedien unter Einsatz von Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle							
1	120,00	-	2,50	3,60	60,00	-	0,10
2	400,00	-	1,11	3,80	25,00	-	0,10
3	800,00	-	-	-	8,00	8,00	0,10



### A.3 Kultivierungssystem

**Tabelle A.13:** Bauteile und Software des 42 L-Reaktorsystems.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Abgasanalytik	EasyLine	ABB
Abluftfilter	AB05PFR2PVH4	Pall
Drucksonde	PR-25HT8931A	Keller
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toledo
Gelöstsauerstoff-Sonde	InPro6820/25/080/1111112	Mettler Toledo
Permittivitätssonde und Aufzeichnungseinheit	<i>i</i> Biomass 465 und <i>i</i> Probe	Fogale biotech
Schlauchpumpe	Ecoline VC-360	Ismatec
Schlauchpumpe	BVP 501U	Watson Marlow
42 L-Reaktor	Fermenter TV42L K1577	Infors HT
Zuluftfilter	EMFLONRII	Pall
Zulaufwaage	IP65	Sartorius
Zulaufwaage	Viper SW 35 IntCal	Mettler Toledo
Software	IRIS V4.0	Infors HT

**Tabelle A.14:** Bauteile und Software des 0,5 L-Parallelbioreaktorsystems.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Abgasanalytik	EL2030	ABB
Kulturgefäß mit Seitenarmen	DASGIP GPI-100	Eppendorf
Rührmotor	DASGIP Overhead drive Microbiology	Eppendorf
pH- und DO-Sensor-Auslese-Einheit	DASGIP PH4PO4	Eppendorf
Temperatur- und Rührer-Regeleinheit	DASGIP TC4SC4	Eppendorf
Heiz- und Kühlblock	DASGIP Bioblock	Eppendorf
Schlauchpumpen-Regeleinheit	DASGIP MP8	Eppendorf
Gasmischstation	DASGIP MX4/1	Eppendorf
Zulaufwaagen	XA204 Delta Range	Mettler Toledo
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/225	Mettler Toledo
Gelöstsauerstoff-Sonde	Visiferm DO Sensor	Hamilton
Zu- und Abluftfilter	Midisart 2000	Sartorius
Software	DASGIP Control V4.5	Eppendorf

**Tabelle A.15:** Bauteile und Software des 48x-Parallelbioreaktorsystems.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktorblock	bioReactor 48	2mag
mL Reaktor	HTBD	PreSens Precision Sensing GmbH
Optosensorik	MultiChannel Reader for pH and DO	PreSens Precision Sensing GmbH
Gasmischstation	Brooks 5850S	Westphal Mess-und Regeltechnik GmbH,
Heizbad	Haake W15 mit Thermostat	Thermo Scientific
Software	fedbatch XP 1.0.213	DASGIP

## A.4 Massenspektrometrie

**Tabelle A.16:** Bauteile und Software der LC-MS-(Ionenfalle)-Anlage.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Entgaser	Spectra System SCM1000	Thermo Finnigan
Pumpe	Spectra System P 1100	Thermo Finnigan
Probengeber	Spectra System AS3000	Thermo Finnigan
Massenspektrometer	LCQ advantage ion trap	Thermo Finnigan
Software	Xcalibur 1.2	Thermo Finnigan
Software	LCQ Tune Plus 1.0	Thermo Finnigan

**Tabelle A.17:** Bauteile und Software der UHPLC-MS-(Triple-Quadrupol)-Anlage.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Pumpe und Entgaser	Acella	Thermo Scientific
Probengeber	PAL CTC	CTC Analytics
Säulenofen	MistraSwitch	Mayland
Massenspektrometer	TSQ Vantage	Thermo Scientific
Software	Xcalibur 2.2	Thermo Scientific
Software	LCQ Tune Plus X	Thermo Scientific

**Tabelle A.18:** Gradienten-Profile der beiden verwendeten Massenspektrometrie (MS)-Methoden.

Gradient für Ionenfallen MS			Gradient für Triple-Quadrupol MS		
Zeit, min	Gesamtvolumenstrom, mL min <sup>-1</sup>	Eluent B, %	Zeit, min	Gesamtvolumenstrom, mL min <sup>-1</sup>	Eluent B, %
0,0	0,20	0	0,0	0,40	0
15,0	0,20	0	5,0	0,40	0
25,0	0,20	20	10,0	0,40	2
55,0	0,20	20	11,0	0,35	9
60,0	0,20	35	16,0	0,25	9
65,0	0,20	35	18,0	0,25	25
70,0	0,20	60	19,0	0,15	50
75,0	0,20	60	25,0	0,15	50
75,1	0,20	90	26,0	0,15	0
80,0	0,20	90	32,0	0,40	0
			36,0	0,40	0

## A.5 Flüssigkeitschromatographie

**Tabelle A.19:** Bauteile und Software der HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Glycerin und organischen Säuren.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Entgaser und Manager	1100 Series	Agilent Technologies
Pumpe	1100 Series	Agilent Technologies
Probengeber	1100 Series	Agilent Technologies
Säulenofen	Mistral	Spark-Holland
RI-Detektor	1200 Series	Agilent Technologies
Software	ChemStation	Agilent Technologies

**Tabelle A.20:** Bauteile und Software der HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Aminosäuren.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Entgaser und Manager	Smartline 5000	Knauer GmbH
Pumpe	Smartline 1000	Knauer GmbH
Probengeber	Midas Cool	Spark-Holland
Säulenofen	Jet Stream	Knauer GmbH
Fluoreszenz-Detektor	RF-20A	Shimadzu
Software	Chromgate 3.1	Knauer GmbH

**Tabelle A.21:** Zusammensetzung der Mercaptopropionsäure-Bicin-Lösung (MCP-Bicin-Lösung).

Komponente	Volumen
Bicin-Puffer (0,04 M; pH 10,2 mit NaOH)	1 mL
Mercaptopropionsäure	2,5 µL

**Tabelle A.22:** Zusammensetzung des Ziel-Probengefäßes zur Aminosäure-Derivatisierung.

Komponente	Volumen je Probengefäß
Bicin-Puffer (0,04 M; pH 10,2 mit NaOH)	650 µL
MCP-Bicin-Lösung	8 µL

**Tabelle A.23:** Zusammensetzung der Iodessigsäurelösung.

Komponente	Volumen/ Masse
Bicin-Puffer (0,04 M; pH 10,2 mit NaOH)	10 mL
Iodessigsäure	65 mg

**Tabelle A.24:** Zusammensetzung der ortho-Phtaldialdehyd-Lösung (OPA-Lösung).

Komponente	Volumen/ Masse
Bicin-Puffer (0,04 M; pH 10,2 mit NaOH)	5 mL
Methanol	5 mL
Ortho-Phtaldialdehyd	100 mg
Mercaptopropionsäure	65 µL

**Tabelle A.25:** Derivatisierungs-Methode zur Quantifizierung von Aminosäuren.

Arbeitsschritt	Beschreibung
1	10 µL der zu analysierenden Probe ins Ziel-Probengefäß überführen
2	Mischen (3x 150 µL aufziehen und abgeben)
3	Reaktionszeit - Warten, 30 s
4	20 µL Iodessigsäurelösung (1:10 mit Bicin-Puffer (0,04 M; pH 10,2 mit NaOH) verdünnt) in Ziel-Probengefäß überführen
5	Mischen (3x 150 µL aufziehen und abgeben)
6	Reaktionszeit - Warten, 30 s
7	70 µL OPA-Lösung (1:7 mit Bicin-Puffer (0,04 M; pH 10,2 mit NaOH) verdünnt) in Ziel-Probengefäß überführen
8	Mischen (3x 150 µL aufziehen und abgeben)
9	20 µL aus Ziel-Probengefäß in den Laufmittelstrom injizieren

**Tabelle A.26:** Gradient-Profil der verwendeten HPLC-Methode zur Quantifizierung von Aminosäure.

Zeit, min	Gesamtvolumenstrom, mL min <sup>-1</sup>	Eluent A, %	Eluent B, %
0,00	1,00	100	0
3,00	1,00	100	0
8,50	1,00	75	25
28,50	1,00	60	40
30,00	1,00	60	40
30,02	1,00	0	100
32,00	1,00	0	100
34,00	1,20	20	80
38,00	1,00	100	0
43,00	1,00	100	0

## A.5 Sonstige Nachweismethoden

**Tabelle A.27:** Bauteile, Lösungen, Software und Einstellungen des Durchflusszytometers.

Bauteil	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	CyFlow®SL Basic Unit	Partec
Software	FloMax	Quantum Anylsis GmbH
Trägerfluid	Sheath Fluid	Partec
Reinigungslösung	Cleaning Solution	Partec
Desinfektionslösung	Decontamination Solution	Partec

Parameter	Verstärkung	Unterer Grenzwert	Oberer Grenzwert
Vorwärtsstreuung	200	30	999,9
Seitwärtsstreuung	300	10	999,9
Fluoreszenz 1	500	10	999,9
Fluoreszenz 2	560	10	999,9

**Tabelle A.28:** Enzymatischer Nachweis von Glucose, Malat, Pyruvat, D/L-Laktat und Ammonium.

Analyt	Nachweisgrenze	Nachweisbeschreibung	Artikel-Nr.	Hersteller
Ammonium	7,9 mg L <sup>-1</sup>	Unter NADH-Verbrauch erfolgende Umsetzung von Oxoglutarat und Ammonium zu L- Glutamat	11112732035	R-Biopharm
Glucose	25,0 mg L <sup>-1</sup>	ATP-abhängige Umsetzung von D- Glucose zu G6P und anschließende Umsetzung zu D-Glukonat-6- Phosphat unter NADPH-Bildung	10716251035	R-Biopharm
D/L-Laktat	20,4 mg L <sup>-1</sup>	Zweistufige unter NADH-Bildung erfolgende Umsetzung von D- / L- Laktat zu Pyruvat	11112821035	R-Biopharm
Malat	60,0 mg L <sup>-1</sup>	Malat-Umsetzung zu Oxalacetat unter NADH-Bildung	10139068035	R-Biopharm

## A.6 Stoffflussberechnungen

**Tabelle A.29:** Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) beschrieben durch die katalysierenden Enzyme/ Gene. Abschätzung durch Flussvarianz-Analyse während der L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin mit *E. coli* FUS4.11 pF81<sub>kan</sub>. Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

Nr. (nach Abb. 5.8)	Reaktionsbeschreibung (nach <i>iAF1260</i> , Feist <i>et al.</i> , 2007)	Reaktionsname ( <i>iAF1260</i> )/ Gene (ecocyc)	untere Grenze	obere Grenze
1	Glycerin-Aufnahme	Glyc <sub>ex</sub>	1,760	2,140
2	Glycerin-Kinase	glyck/ <i>glpK</i>	1,760	2,155
3	Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase	<i>g3pd2/ glpD</i>	1,740	2,134
4	Triose-phosphat-Isomerase	<i>tpi/ tpiA</i>	1,661	2,049
5	Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>fbp/ fbp</i>	0,066	0,117
6	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	<i>fba/ fba</i>	-0,117	-0,066
7	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	<i>gapd/ gapA</i>	1,422	1,880
8	Phosphoglycerat-Kinase	<i>pgk/ pgk</i>	-1,880	-1,422
9	Enolase	<i>eno/ eno</i>	1,422	1,885
10	Phosphoenolpyruvat-Synthetase	<i>pps/ ppsA</i>	0,000	0,008
11	Pyruvat-Dehydrogenase	<i>pdh/ aceE</i>	0,762	1,091
12	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	<i>ppck/ pck</i>	0,000	0,015
13	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	<i>ppc/ ppc</i>	0,989	1,681
14	Oxaloacetat-Decarboxylase	<i>oaadc/ eda</i>	0,000	1,384
15	Malat-Enzyme	<i>maeAB/ maeAB</i>	0,000	1,384
16	Citrat-Synthase	<i>cs/ gltA</i>	0,775	1,108
17	Malat-Dehydrogenase	<i>mdh/ mdh</i>	-0,298	2,878
18	Fumarase	<i>fum/ fum</i>	0,774	4,234
19	Transketolase	<i>tkt2/ tktA</i>	-0,163	-0,073
20	Transaldolase	<i>tala/ talA</i>	0,011	0,069
21	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat 7- phosphat-Synthetase	<i>ddpa/ aroG</i>	0,100	0,221
22	3-Dehydroquinat-Synthase	<i>dhqs/ aroB</i>	0,100	0,221
23	3-Dehydroquinat-Dehydratase	<i>dhqti/ aroD</i>	0,100	0,221

Fortsetzung **Tabelle A.29**: Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) beschrieben durch die katalysierenden Enzyme/ Gene. Abschätzung durch Flussvarianz-Analyse während der L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin mit *E. coli* FUS4.11 pF81kan. Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

Nr. (nach Abb. 5.8)	Reaktionsbeschreibung (nach <i>iAF1260</i> , Feist <i>et al.</i> , 2007)	Reaktionsname ( <i>iAF1260</i> )/ Gene (ecocyc)	untere Grenze	obere Grenze
24	Shikimat-Dehydrogenase	shk3dr/ <i>aroE</i>	0,100	0,221
25	Shikimat-Kinase	shkk/ <i>aroK</i>	0,100	0,221
26	3-Phosphoshikimat 1- Carboxyvinyltransferase	pscvt/ <i>aroA</i>	0,100	0,221
27	Chorismat-Synthase	chors/ <i>aroC</i>	0,100	0,221
28	Chorismat-Mutase	chorm/ <i>pheA</i>	0,098	0,218
29	Prephenat-Dehydrogenase	ppnd/ <i>tyrA</i>	0,000	0,000
30	Tyrosin-Transaminase	tyrta/ <i>tyrB</i>	0,000	0,000
31	Prephenat-Dehydratase	ppndh/ <i>pheA</i>	0,098	0,218
32	Phenylalanin-Transaminase	pheta/ <i>aspC</i>	-0,218	-0,098
33	L-Phe-Bildung	L-Phe <sub>ex</sub>	0,090	0,210
34	Biomasse-Bildung	$\mu$	0,024	0,064



**Tabelle A.30:** Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) beschrieben durch die katalysierenden Enzyme/ Gene. Abschätzung durch Flussvarianz-Analyse während der L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin mit *E. coli* FUS4.11  $\Delta\text{maeA} \Delta\text{maeB}$  pF81<sub>kan</sub>. Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

Nr. (nach Abb. 5.8)	Reaktionsbeschreibung (nach <i>iAF1260</i> , Feist <i>et al.</i> , 2007)	Reaktionsname ( <i>iAF1260</i> )/ Gene(ecocyc)	untere Grenze	obere Grenze
1	Glycerin-Aufnahme	Glyc <sub>ex</sub>	1,650	1,710
2	Glycerin-Kinase	glyck/ <i>glpK</i>	1,649	1,719
3	Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase	<i>g3pd2/ glpD</i>	1,634	1,707
4	Triose-phosphat-Isomerase	<i>tpi/ tpiA</i>	1,561	1,637
5	Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>fbp/ fbp</i>	0,065	0,089
6	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	<i>fba/ fba</i>	-0,089	-0,065
7	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	<i>gapd/ gapA</i>	1,345	1,484
8	Phosphoglycerat-Kinase	<i>pgk/ pgk</i>	-1,481	-1,345
9	Enolase	<i>eno/ eno</i>	1,345	1,484
10	Phosphoenolpyruvat-Synthetase	<i>pps/ ppsA</i>	0,000	0,004
11	Pyruvat-Dehydrogenase	<i>pdh/ aceE</i>	0,751	0,902
12	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	<i>ppck/ pck</i>	0,000	0,009
13	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	<i>ppc/ ppc</i>	0,953	1,250
14	Oxaloacetat-Decarboxylase	<i>oaad/ eda</i>	0,854	1,075
15	Malat-Enzyme	<i>maeAB/ maeAB</i>	0,000	0,000
16	Citrat-Synthase	<i>cs/ gltA</i>	0,763	0,912
17	Malat-Dehydrogenase	<i>mdh/ mdh</i>	0,760	2,551
18	Fumarase	<i>fum/ fum</i>	0,762	2,551
19	Transketolase	<i>tkt2/ tktA</i>	-0,140	-0,083
20	Transaldolase	<i>tala/ talA</i>	0,026	0,062
21	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat 7- phosphat-Synthetase	<i>ddpa/ aroG</i>	0,118	0,196
22	3-Dehydroquinat-Synthase	<i>dhqs/ aroB</i>	0,118	0,196
23	3-Dehydroquinat-Dehydratase	<i>dhqti/ aroD</i>	0,118	0,196
24	Shikimat-Dehydrogenase	<i>shk3dr/ aroE</i>	0,118	0,196

Fortsetzung **Tabelle A.30**: Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) beschrieben durch die katalysierenden Enzyme/ Gene. Abschätzung durch Flussvarianz-Analyse während der L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin mit *E. coli* FUS4.11  $\Delta\text{maeA} \Delta\text{maeB}$  pF81<sub>kan</sub>. Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

Nr. (nach Abb. 5.8)	Reaktionsbeschreibung (nach <i>iAF1260</i> , Feist <i>et al.</i> , 2007)	Reaktionsname ( <i>iAF1260</i> )/ Gene(ecocyc)	untere Grenze	obere Grenze
25	Shikimat-Kinase	shkk/ <i>aroK</i>	0,118	0,196
26	3-Phosphoshikimat 1-Carboxyvinyltransferase	pscvt/ <i>aroA</i>	0,118	0,196
27	Chorismat-Synthase	chors/ <i>aroC</i>	0,118	0,196
28	Chorismat-Mutase	chorm/ <i>pheA</i>	0,116	0,194
29	Prephenat-Dehydrogenase	ppnd/ <i>tyrA</i>	0,000	0,000
30	Tyrosin-Transaminase	tyrta/ <i>tyrB</i>	0,000	0,000
31	Prephenat-Dehydratase	ppndh/ <i>pheA</i>	0,116	0,194
32	Phenylalanin-Transaminase	pheta/ <i>aspC</i>	-0,194	-0,116
33	L-Phe-Bildung	L-Phe <sub>ex</sub>	0,110	0,190
34	Biomasse-Bildung	$\mu$	0,021	0,037

**Tabelle A.31**: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA1) auf der Kohlenstoffquelle Pyruvat, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA1 Nr.	PYR A			PYR B			PYR C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,006	0,006	0,006	0,049	0,049	0,049	0,116	0,116	0,116
5	-0,006	-0,006	-0,006	-0,049	-0,049	-0,049	-0,116	-0,116	-0,116
6	-0,022	-0,022	-0,022	-0,148	-0,148	-0,148	-0,362	-0,362	-0,362
7	0,022	0,022	0,022	0,148	0,148	0,148	0,362	0,362	0,362
8	0,023	0,023	0,024	0,225	0,225	0,225	0,521	0,521	0,522
9	-0,024	-0,023	-0,023	-0,225	-0,225	-0,225	-0,522	-0,521	-0,521
10	0,000	0,027	0,054	0,000	0,000	0,318	0,389	0,494	0,799
11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,974	1,001	1,029	1,894	2,212	2,212	2,987	3,292	3,397
13	0,969	0,969	0,969	1,609	1,609	1,609	2,399	2,400	2,400
14	0,969	0,969	0,969	1,609	1,609	1,609	2,399	2,400	2,400
15	0,912	0,939	0,967	1,154	1,154	1,472	1,706	1,811	2,116
16	0,911	0,938	0,966	1,104	1,104	1,422	1,603	1,708	2,013
17	-0,965	-0,938	-0,911	-1,398	-1,080	-1,079	-1,963	-1,658	-1,553
18	0,968	0,968	0,968	1,559	1,560	1,560	2,296	2,297	2,297

Fortsetzung **Tabelle A.31:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA1) auf der Kohlenstoffquelle Pyruvat, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA1 Nr.	PYR A			PYR B			PYR C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
19	0,969	0,969	0,969	1,608	1,608	1,608	2,396	2,396	2,397
20	0,971	0,999	1,026	1,745	2,063	2,063	2,680	2,985	3,090
21	0,002	0,030	0,057	0,137	0,455	0,456	0,283	0,589	0,694
22	0,002	0,030	0,057	0,138	0,455	0,456	0,284	0,589	0,694
24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
29	0,000	0,027	0,054	0,000	0,318	0,318	0,000	0,305	0,410
30	0,000	0,000	0,001	0,005	0,005	0,005	0,009	0,010	0,011
32	0,000	0,001	0,001	0,027	0,027	0,027	0,056	0,056	0,056
33	-0,001	-0,001	0,000	-0,027	-0,027	-0,027	-0,056	-0,056	-0,056
36	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
37	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
39	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
40	-0,006	-0,006	-0,006	-0,045	-0,045	-0,045	-0,107	-0,107	-0,107
41	-0,006	-0,006	-0,006	-0,043	-0,043	-0,043	-0,103	-0,103	-0,103
42	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,014	0,014	0,014
43	0,005	0,005	0,005	0,000	0,000	0,000	0,014	0,014	0,014
44	-0,010	-0,010	-0,010	-0,045	-0,045	-0,045	-0,121	-0,121	-0,121
45	0,015	0,015	0,015	0,045	0,045	0,045	0,135	0,135	0,135
46	0,015	0,015	0,015	0,045	0,045	0,045	0,135	0,135	0,135
47	0,015	0,015	0,015	0,045	0,045	0,045	0,135	0,135	0,135
48	0,015	0,015	0,015	0,045	0,045	0,045	0,135	0,135	0,135
49	0,015	0,015	0,015	0,045	0,045	0,045	0,135	0,135	0,135
50	0,015	0,015	0,015	0,045	0,045	0,045	0,135	0,135	0,135
51	0,015	0,015	0,015	0,045	0,045	0,045	0,135	0,135	0,135
52	0,015	0,015	0,015	0,042	0,042	0,042	0,130	0,130	0,130
53	0,015	0,015	0,015	0,042	0,042	0,042	0,130	0,130	0,130
54	-0,015	-0,015	-0,015	-0,042	-0,042	-0,042	-0,130	-0,130	-0,130
55	0,015	0,015	0,015	0,034	0,034	0,034	0,113	0,113	0,113
56	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
57	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
58	0,000	0,000	0,000	-0,006	-0,006	-0,006	-0,013	-0,013	-0,013
59	0,000	0,000	0,000	-0,003	-0,003	-0,003	-0,005	-0,005	-0,005
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
61	0,918	0,919	0,920	0,655	0,661	0,667	0,385	0,396	0,406
62	3,811	3,812	3,812	5,609	5,609	5,609	7,747	7,747	7,747
63	4,780	4,780	4,780	7,184	7,184	7,184	10,075	10,075	10,076
64	7,637	7,637	7,637	11,271	11,271	11,271	15,638	15,638	15,639
65	-0,006	-0,006	-0,006	-0,056	-0,056	-0,056	-0,130	-0,130	-0,130
66	0,000	0,000	0,000	-0,007	-0,006	-0,006	-0,013	-0,013	-0,013
67	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
68	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
70	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
71	-1,031	-1,031	-1,031	-2,349	-2,349	-2,349	-4,068	-4,068	-4,068
$\mu$	0,001	0,001	0,001	0,046	0,046	0,046	0,096	0,096	0,096





Fortsetzung **Tabelle A.33:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA1) auf der Kohlenstoffquelle Succinat, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA1 Nr.	SUC A			SUC B			SUC C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
29	0,728	0,728	0,728	1,102	1,103	1,103	1,560	1,561	1,561
30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
32	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,019	0,019	0,019
33	0,000	0,000	0,000	-0,007	-0,007	-0,007	-0,019	-0,019	-0,019
36	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
37	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
39	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
40	-0,001	-0,001	-0,001	-0,027	-0,026	-0,026	-0,051	-0,051	-0,051
41	-0,001	-0,001	-0,001	-0,026	-0,026	-0,026	-0,050	-0,050	-0,050
42	0,000	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,020	0,020	0,020
43	0,000	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,020	0,020	0,020
44	-0,001	-0,001	-0,001	-0,042	-0,042	-0,042	-0,071	-0,071	-0,071
45	0,001	0,001	0,001	0,057	0,057	0,057	0,091	0,091	0,091
46	0,001	0,001	0,001	0,057	0,057	0,057	0,091	0,091	0,091
47	0,001	0,001	0,001	0,057	0,057	0,057	0,091	0,091	0,091
48	0,001	0,001	0,001	0,057	0,057	0,057	0,091	0,091	0,091
49	0,001	0,001	0,001	0,057	0,057	0,057	0,091	0,091	0,091
50	0,001	0,001	0,001	0,057	0,057	0,057	0,091	0,091	0,091
51	0,001	0,001	0,001	0,057	0,057	0,057	0,091	0,091	0,091
52	0,001	0,001	0,001	0,056	0,056	0,056	0,089	0,089	0,089
53	0,001	0,001	0,001	0,056	0,056	0,056	0,089	0,089	0,089
54	-0,001	-0,001	-0,001	-0,056	-0,056	-0,056	-0,089	-0,089	-0,089
55	0,001	0,001	0,001	0,054	0,054	0,054	0,083	0,083	0,083
56	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
57	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
58	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	-0,002	-0,005	-0,005	-0,005
59	0,000	0,000	0,000	-0,001	-0,001	0,000	-0,002	-0,002	-0,002
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
61	0,700	0,700	0,701	0,502	0,502	0,502	0,256	0,257	0,258
62	3,590	3,590	3,590	3,978	3,978	3,978	4,644	4,644	4,644
63	5,038	5,038	5,038	5,906	5,906	5,906	7,216	7,216	7,216
64	7,729	7,729	7,729	8,859	8,860	8,860	10,615	10,615	10,615
65	-0,001	-0,001	-0,001	-0,029	-0,029	-0,029	-0,059	-0,059	-0,059
66	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	-0,002	-0,005	-0,005	-0,005
67	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
68	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
70	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
71	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$\mu$	0,001	0,001	0,001	0,012	0,012	0,012	0,033	0,033	0,033



Forsetzung **Tabelle A.34:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA1) auf der Kohlenstoffquelle Glycerin, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA1 Nr.	GLYC A			GLYC B			GLYC C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
57	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
58	0,000	0,000	0,000	-0,004	-0,004	-0,004	-0,010	-0,010	-0,010
59	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	-0,002	-0,004	-0,004	-0,004
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
61	1,305	1,310	1,315	1,627	1,631	1,634	1,985	1,988	1,992
62	3,850	3,850	3,850	5,218	5,218	5,218	6,906	6,906	6,906
63	4,455	4,455	4,455	5,886	5,886	5,886	7,685	7,685	7,685
64	7,342	7,342	7,342	9,720	9,720	9,720	12,678	12,678	12,678
65	0,802	0,802	0,802	1,709	1,709	1,709	2,683	2,683	2,683
66	0,824	0,824	0,824	1,805	1,805	1,805	2,847	2,847	2,847
67	0,824	0,824	0,824	1,809	1,809	1,809	2,857	2,857	2,857
68	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
70	-0,824	-0,824	-0,824	-1,809	-1,809	-1,809	-2,857	-2,857	-2,857
71	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$\mu$	0,000	0,000	0,000	0,031	0,031	0,031	0,072	0,072	0,072

**Tabelle A.35:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) im 15 L-Produktionsprozess während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA1), beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA1 Nr.	Prozess		
	u. G.	gFBA	o.G.
1	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000
4	0,129	0,130	0,131
5	-0,131	-0,130	-0,129
6	1,689	1,701	1,713
7	-1,713	-1,701	-1,689
8	-1,649	-1,639	-1,628
9	1,628	1,639	1,649
10	0,000	0,000	0,000
11	0,902	0,966	1,032
12	0,802	0,863	0,926
13	0,686	0,690	0,694
14	0,686	0,690	0,694
15	0,581	0,636	0,694
16	0,543	0,597	0,654
17	-0,635	-0,578	-0,524
18	0,648	0,651	0,654
19	0,685	0,689	0,693
20	0,685	0,743	0,803
21	0,000	0,054	0,110
22	0,000	0,054	0,110
24	0,000	0,000	0,000



Fortsetzung **Tabelle A.35:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) im 15 L-Produktionsprozess während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA1), beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA1 Nr.	Prozess		
	u. G.	gFBA	o.G.
25	0,000	0,000	0,000
26	0,000	0,000	0,000
27	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,054	0,110
29	0,000	0,000	0,000
30	0,000	0,000	0,000
32	0,021	0,021	0,022
33	-0,022	-0,021	-0,021
36	0,000	0,000	0,000
37	0,000	0,000	0,000
38	0,000	0,000	0,000
39	0,000	0,000	0,000
40	-0,127	-0,126	-0,126
41	-0,126	-0,125	-0,124
42	0,091	0,091	0,092
43	0,091	0,091	0,092
44	-0,218	-0,217	-0,216
45	0,307	0,308	0,310
46	0,307	0,308	0,310
47	0,307	0,308	0,310
48	0,307	0,308	0,310
49	0,307	0,308	0,310
50	0,307	0,308	0,310
51	0,307	0,308	0,310
52	0,305	0,306	0,307
53	0,305	0,306	0,307
54	-0,307	-0,306	-0,305
55	0,299	0,300	0,301
56	0,000	0,000	0,000
57	0,000	0,000	0,000
58	-0,005	-0,005	-0,005
59	-0,002	-0,002	-0,002
60	0,000	0,000	0,000
61	0,000	1,717	0,000
62	5,542	5,574	5,605
63	6,203	6,237	6,272
64	10,268	10,324	10,380
65	2,034	2,046	2,059
66	2,163	2,176	2,189
67	2,168	2,181	2,194
68	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000
70	-2,194	-2,181	-2,168
71	0,000	0,000	0,000
$\mu$	0,035	0,036	0,037





Fortsetzung **Tabelle A.37:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA2) auf der Kohlenstoffquelle Glucose, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell iAF1260 (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA2 Nr.	GLUC A			GLUC B			GLUC C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,000	0,001	0,000	0,029	0,058	0,009	0,136	0,151
29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001
32	0,000	0,000	0,000	0,011	0,011	0,012	0,029	0,030	0,030
33	0,000	0,000	0,000	-0,012	-0,011	-0,011	-0,030	-0,030	-0,029
36	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
37	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
39	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
40	0,000	0,000	0,000	-0,024	-0,024	-0,023	-0,060	-0,060	-0,060
41	0,000	0,000	0,000	-0,023	-0,023	-0,023	-0,058	-0,058	-0,058
42	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004	0,005	0,010	0,011	0,011
43	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004	0,005	0,010	0,011	0,011
44	0,000	0,000	0,000	-0,028	-0,028	-0,028	-0,070	-0,070	-0,070
45	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	0,033	0,081	0,081	0,081
46	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	0,033	0,081	0,081	0,081
47	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	0,033	0,081	0,081	0,081
48	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	0,033	0,081	0,081	0,081
49	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	0,033	0,081	0,081	0,081
50	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	0,033	0,081	0,081	0,081
51	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	0,033	0,081	0,081	0,081
52	0,000	0,000	0,000	0,031	0,031	0,031	0,078	0,078	0,078
53	0,000	0,000	0,000	0,031	0,031	0,031	0,078	0,078	0,078
54	0,000	0,000	0,000	-0,031	-0,031	-0,031	-0,078	-0,078	-0,078
55	0,000	0,000	0,000	0,028	0,028	0,028	0,069	0,069	0,069
56	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
57	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
58	0,000	0,000	0,000	-0,003	-0,003	-0,003	-0,007	-0,007	-0,007
59	0,000	0,000	0,000	-0,001	-0,001	-0,001	-0,003	-0,003	-0,003
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
61	0,612	0,662	0,712	0,410	0,460	0,510	0,079	0,129	0,179
62	3,579	3,579	3,580	4,210	4,211	4,211	5,220	5,221	5,221
63	4,295	4,295	4,295	5,044	5,044	5,044	6,243	6,244	6,244
64	6,979	6,979	6,979	8,151	8,151	8,152	10,028	10,028	10,028
65	0,360	0,360	0,360	0,576	0,576	0,576	0,917	0,917	0,917
66	0,000	0,000	0,000	-0,003	-0,003	-0,003	-0,007	-0,007	-0,007
67	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
68	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
70	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
71	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$\mu$	0,000	0,000	0,000	0,020	0,020	0,020	0,051	0,051	0,051



Fortsetzung **Tabelle A.38:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol gBTM}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA2) auf der Kohlenstoffquelle Succinat, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist et al., 2007) beschrieben.

MA2 Nr.	SUC A			SUC B			SUC C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
57	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
58	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001	-0,001	-0,001
59	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,001	-0,001	0,000
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
61	0,388	0,438	0,488	0,360	0,410	0,460	0,317	0,367	0,417
62	2,455	2,455	2,455	2,484	2,485	2,485	2,684	2,684	2,684
63	3,580	3,580	3,580	3,748	3,748	3,748	4,239	4,240	4,240
64	7,921	7,921	7,921	8,105	8,105	8,105	8,726	8,726	8,726
65	-0,001	-0,001	-0,001	-0,003	-0,003	-0,003	-0,011	-0,010	-0,010
66	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,001	-0,001
67	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
68	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
70	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
71	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$\mu$	0,000	0,000	0,000	0,003	0,003	0,003	0,011	0,011	0,011

**Tabelle A.39:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol gBTM}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA2) auf der Kohlenstoffquelle Glycerin, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist et al., 2007) beschrieben.

MA2 Nr.	GLYC A			GLYC B			GLYC C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,015	0,015	0,015	0,068	0,068	0,068	0,122	0,122	0,122
5	-0,015	-0,015	-0,015	-0,068	-0,068	-0,068	-0,122	-0,122	-0,122
6	0,872	0,872	0,872	1,781	1,781	1,781	2,682	2,682	2,682
7	-0,872	-0,872	-0,872	-1,781	-1,781	-1,781	-2,682	-2,682	-2,682
8	-0,845	-0,845	-0,845	-1,657	-1,657	-1,657	-2,509	-2,509	-2,509
9	0,845	0,845	0,845	1,657	1,657	1,657	2,509	2,509	2,509
10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	0,778	0,801	0,825	1,351	1,459	1,566	1,923	2,072	2,221
12	0,734	0,757	0,780	1,145	1,253	1,360	1,248	1,397	1,546
13	0,683	0,683	0,683	0,908	0,908	0,908	0,918	0,918	0,918
14	0,683	0,683	0,683	0,908	0,908	0,908	0,918	0,918	0,918
15	0,637	0,660	0,683	0,693	0,800	0,908	0,620	0,769	0,918
16	0,620	0,643	0,666	0,615	0,722	0,830	0,512	0,661	0,810
17	-0,658	-0,635	-0,612	-0,792	-0,684	-0,577	-0,757	-0,608	-0,459
18	0,666	0,666	0,666	0,830	0,830	0,830	0,810	0,810	0,811
19	0,682	0,682	0,682	0,905	0,905	0,905	0,915	0,915	0,915
20	0,682	0,705	0,729	0,905	1,013	1,120	0,915	1,064	1,213
21	0,000	0,023	0,046	0,000	0,107	0,215	0,000	0,149	0,298
22	0,000	0,023	0,046	0,000	0,107	0,215	0,000	0,149	0,298
24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,389	-0,389	-0,389
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,389	0,389	0,389

Fortsetzung **Tabelle A.39:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA2) auf der Kohlenstoffquelle Glycerin, beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA2 Nr.	GLYC A			GLYC B			GLYC C		
	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.	u. G.	gFBA	o.G.
28	0,000	0,023	0,046	0,000	0,107	0,215	0,000	0,149	0,298
29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
32	0,009	0,009	0,009	0,042	0,042	0,042	0,058	0,059	0,059
33	-0,009	-0,009	-0,009	-0,042	-0,042	-0,042	-0,059	-0,059	-0,058
36	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
37	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
39	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
40	-0,013	-0,013	-0,013	-0,061	-0,061	-0,061	-0,112	-0,112	-0,112
41	-0,013	-0,013	-0,013	-0,058	-0,058	-0,058	-0,108	-0,108	-0,108
42	-0,002	-0,002	-0,002	-0,009	-0,009	-0,009	0,014	0,014	0,014
43	-0,002	-0,002	-0,002	-0,009	-0,009	-0,009	0,014	0,014	0,014
44	-0,011	-0,011	-0,011	-0,052	-0,052	-0,052	-0,126	-0,126	-0,126
45	0,010	0,010	0,010	0,043	0,043	0,043	0,141	0,141	0,141
46	0,010	0,010	0,010	0,043	0,043	0,043	0,141	0,141	0,141
47	0,010	0,010	0,010	0,043	0,043	0,043	0,141	0,141	0,141
48	0,010	0,010	0,010	0,043	0,043	0,043	0,141	0,141	0,141
49	0,010	0,010	0,010	0,043	0,043	0,043	0,141	0,141	0,141
50	0,010	0,010	0,010	0,043	0,043	0,043	0,141	0,141	0,141
51	0,010	0,010	0,010	0,043	0,043	0,043	0,141	0,141	0,141
52	0,009	0,009	0,009	0,039	0,039	0,039	0,135	0,135	0,135
53	0,009	0,009	0,009	0,039	0,039	0,039	0,135	0,135	0,135
54	-0,009	-0,009	-0,009	-0,039	-0,039	-0,039	-0,135	-0,135	-0,135
55	0,006	0,006	0,006	0,026	0,026	0,026	0,117	0,117	0,117
56	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
57	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
58	-0,002	-0,002	-0,002	-0,010	-0,010	-0,010	-0,014	-0,014	-0,014
59	-0,001	-0,001	-0,001	-0,004	-0,004	-0,004	-0,006	-0,006	-0,006
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
61	1,255	1,305	1,355	1,643	1,693	1,743	2,138	2,188	2,238
62	4,304	4,304	4,304	6,398	6,399	6,399	7,492	7,492	7,492
63	4,975	4,975	4,975	7,252	7,252	7,252	8,335	8,336	8,336
64	8,163	8,163	8,163	11,864	11,864	11,864	13,695	13,695	13,695
65	0,897	0,897	0,897	1,898	1,898	1,898	2,924	2,924	2,924
66	0,912	0,912	0,912	1,966	1,966	1,966	3,046	3,046	3,046
67	0,914	0,914	0,914	1,976	1,976	1,976	3,060	3,060	3,060
68	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
70	-0,914	-0,914	-0,914	-1,976	-1,976	-1,976	-3,060	-3,060	-3,060
71	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$\mu$	0,016	0,016	0,016	0,073	0,073	0,073	0,101	0,101	0,101

**Tabelle A.40:** Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) im 15 L-Produktionsprozess während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA2), beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA2 Nr.	Prozess		
	u. G.	gFBA	o.G.
1	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000
4	0,028	0,029	0,031
5	-0,031	-0,029	-0,028
6	1,048	1,059	1,068
7	-1,068	-1,059	-1,048
8	-1,025	-1,018	-1,009
9	1,009	1,018	1,025
10	0,000	0,000	0,000
11	0,863	0,913	0,964
12	0,797	0,844	0,892
13	0,686	0,693	0,698
14	0,686	0,693	0,698
15	0,618	0,657	0,698
16	0,593	0,631	0,671
17	-0,658	-0,618	-0,580
18	0,661	0,667	0,671
19	0,685	0,692	0,697
20	0,685	0,728	0,772
21	0,000	0,036	0,075
22	0,000	0,036	0,075
24	0,000	0,000	0,000
25	0,000	0,000	0,000
26	0,000	0,000	0,000
27	0,000	0,000	0,000
28	0,000	0,036	0,075
29	0,000	0,000	0,000
30	0,000	0,000	0,001
32	-0,024	-0,022	-0,021
33	0,021	0,022	0,024
36	0,036	0,036	0,037
37	0,000	0,000	0,000
38	0,000	0,000	0,000
39	0,000	0,000	0,000
40	-0,028	-0,027	-0,026
41	-0,027	-0,026	-0,025
42	0,002	0,003	0,005
43	0,002	0,003	0,005
44	-0,033	-0,030	-0,028
45	0,030	0,034	0,039
46	0,030	0,034	0,039
47	0,030	0,034	0,039
48	0,030	0,034	0,039
49	0,030	0,034	0,039
50	0,030	0,034	0,039
51	0,030	0,034	0,039
52	0,028	0,032	0,037
53	0,028	0,032	0,037
54	-0,037	-0,032	-0,028
55	0,024	0,028	0,033
56	0,000	0,000	0,000



Fortsetzung **Tabelle A.40**: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse ( $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Ausnahme Biomassebildung:  $\text{h}^{-1}$ ) im 15 L-Produktionsprozess während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb (MA2), beschrieben durch die Reaktionsnummer (siehe Abbildung 3.3). Lösungen der Flussvarianz-Analyse (obere Grenze: o. G.; untere Grenze: u. G.) und geometrischen Flussbilanz-Analyse (gFBA). Die Reaktionsrichtungen sind durch Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) beschrieben.

MA2 Nr.	Prozess		
	u. G.	gFBA	u. G.
57	0,000	0,000	0,000
58	-0,003	-0,003	-0,003
59	-0,001	-0,001	-0,001
60	0,000	0,000	0,000
61	1,317	1,367	1,417
62	4,608	4,647	4,678
63	5,277	5,322	5,357
64	8,675	8,745	8,800
65	1,110	1,117	1,124
66	1,139	1,147	1,153
67	1,143	1,150	1,156
68	0,000	0,000	0,000
69	0,000	0,000	0,000
70	-1,156	-1,150	-1,143
71	0,000	0,000	0,000
$\mu$	0,023	0,024	0,025

## A.7 MCA-Modell

**Tabelle A.41:** Im MCA-Modell berücksichtigte Reaktionen und die dabei vorliegende Stöchiometrie. Die rechte Spalte beschreibt die Unterscheidung zwischen Reaktionen am thermodynamischen Gleichgewicht (Equilibrium) und Reaktionen fern des thermodynamischen Gleichgewichtes mit den gewählten Effektoren.

Abkürzung nach Abb. 3.3		Reaktion	Effektor
<b>Glycerin-Metabolismus, Glykolyse und Gluconeogenese</b>			
1	glyck	$\text{GLYC} + \text{ATP} \rightarrow \text{GLY3P} + \text{ADP}$	ATP, FBP
2	glyc3pd	$\text{GLY3P} + \text{Q8} \leftrightarrow \text{DHAP} + \text{Q8H}_2$	GAP, PEP, DHAP, 2PG, 3PG
3	fbp	$\text{FBP} \rightarrow \text{F6P}$	FBP
4	fba	$\text{GAP} + \text{DHAP} \leftrightarrow \text{FBP}$	GLY3P, PEP, DHAP, CIT
5	tpi	$\text{DHAP} \leftrightarrow \text{GAP}$	Equilibrium
6	gapd	$\text{GAP} + \text{NAD} \leftrightarrow \text{13DPG} + \text{NADH}$	Equilibrium
7	pgk	$\text{13DPG} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{3PG} + \text{ATP}$	Equilibrium
8	pgm	$\text{3PG} \leftrightarrow \text{2PG}$	Equilibrium
9	eno	$\text{2PG} \leftrightarrow \text{PEP}$	Equilibrium
10	pyk	$\text{ADP} + \text{PEP} \rightarrow \text{ATP} + \text{PYR}$	ATP, PEP, PYR, FBP
11	pdh	$\text{PYR} + \text{NAD} + \text{CoA} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{NADH}$	AcCoA, PYR
<b>Citrat-Zyklus</b>			
12	cs	$\text{AcCoA} + \text{OAA} \rightarrow \text{CIT} + \text{CoA}$	AcCoA, OAA, NADH
13	acont	$\text{CIT} \leftrightarrow \text{ICIT}$	Equilibrium
14	icdh	$\text{ICIT} + \text{NADP} \leftrightarrow \text{AKG} + \text{NADPH}$	ICIT
15	akgdh	$\text{AKG} + \text{CoA} + \text{NAD} \rightarrow \text{NADH} + \text{SucCoA}$	AKG, OAA
16	sucoas	$\text{ADP} + \text{SucCoA} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{CoA} + \text{SUC}$	Equilibrium
17	sdh	$\text{SUC} + \text{Q8} \rightarrow \text{FUM} + \text{Q8H}_2$	SUC, Q8
18	fum	$\text{FUM} \leftrightarrow \text{MAL}$	Equilibrium
19	mdh	$\text{MAL} + \text{NAD} \leftrightarrow \text{NADH} + \text{OAA}$	Equilibrium
<b>Pentose-Phosphat-Stoffwechsel</b>			
20	rpe	$\text{Ru5P} \leftrightarrow \text{X5P}$	Equilibrium
21	rpi	$\text{Ru5P} \leftrightarrow \text{R5P}$	Equilibrium
22	tkt1	$\text{R5P} + \text{X5P} \leftrightarrow \text{GAP} + \text{S7P}$	Equilibrium
23	tkt2	$\text{E4P} + \text{X5P} \leftrightarrow \text{GAP} + \text{F6P}$	Equilibrium
24	tala	$\text{GAP} + \text{S7P} \leftrightarrow \text{E4P} + \text{F6P}$	Equilibrium
<b>Aromatenbiosyntheseweg</b>			
25	dahs	$\text{E4P} + \text{PEP} \rightarrow \text{DAH P}$	2PG, 13DPG, DAHP, L-Phe
26	dhqs	$\text{DAH P} \rightarrow \text{3DHQ}$	DAH P
27	dhqd	$\text{3DHQ} \leftrightarrow \text{3DHS}$	Equilibrium
28	3dhsdh	$\text{3DHS} + \text{NADPH} \leftrightarrow \text{SHK} + \text{NADP}$	Equilibrium
29	shkk	$\text{SHK} + \text{ATP} \rightarrow \text{SHK3P} + \text{ADP}$	SHK3P
30	psevt	$\text{SHK3P} + \text{PEP} \leftrightarrow \text{3PSME}$	PEP, 3PSME
31	chors	$\text{3PSME} \rightarrow \text{CHOR}$	3PSME
32	chorm	$\text{CHOR} \rightarrow \text{PPHN}$	CIT, PPHN, L-Phe
33	ppndh	$\text{PPHN} \rightarrow \text{PHPYR}$	CHOR
34	pheta	$\text{L-Glut} + \text{PHPYR} \leftrightarrow \text{AKG} + \text{L-Phe}$	PHPYR, AKG
<b>Energie-Metabolismus</b>			
35	cytbo	$\text{ADP} + \text{Q8H}_2 \rightarrow \text{Q8} + \text{ATP}$	Q8H <sub>2</sub>
36	nadh6	$\text{ADP} + 1,33 \text{ NADH} + 1,33 \text{ Q8} \rightarrow$ $\text{ATP} + 1,33 \text{ NAD} + 1,33 \text{ Q8H}_2$	NADH
37	thd2	$\text{NADPH} + \text{NAD} \rightarrow \text{NADP} + \text{NADH}$	NADPH
38	ATPase	$\text{ATP} \leftrightarrow \text{ADP}$	ATP

## **A.8 Proteomanalyse**

### **A.8.1 Methode**

#### **Zellaufschluss**

Der Zellaufschluss der in 2 mL Lyse-Puffer (40 mM Tris, 8 M Harnstoff, 4 % (v/v) CHAPS, 65 mM DTT) gelösten Zellsuspension erfolgte mittels Ultraschall. Anschließend wurde das Zellhomogenisat zentrifugiert (4 °C, 14.000 min<sup>-1</sup>, 30 min). Der daraus resultierende Überstand wurde bei -70 °C bis zur Proteom-Analyse gelagert.

#### **Protein-Quantifizierung**

Die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Proteinmenge erfolgte mittels Bradford-Bestimmung. Dabei wurde jede Probe im Doppelansatz vermessen.

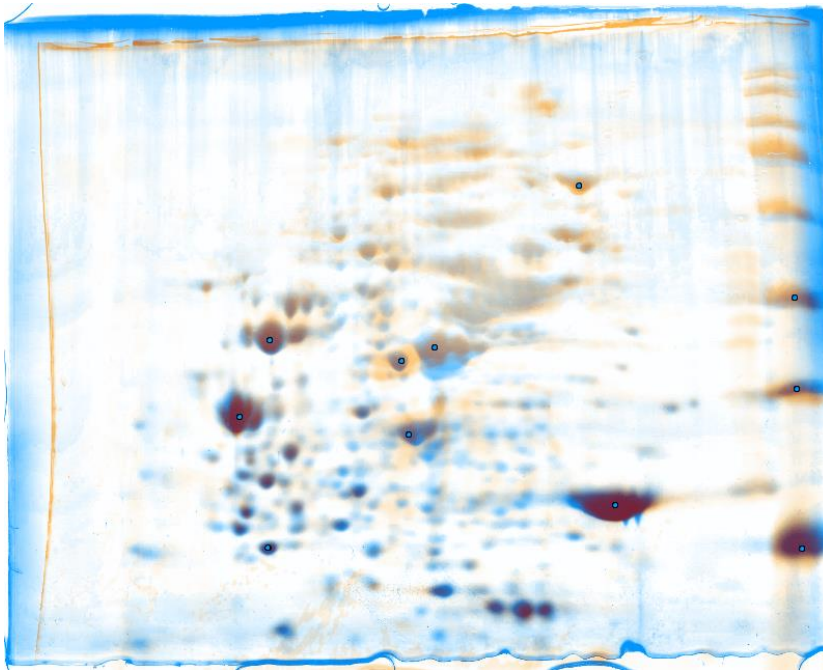
#### **Fokussieren des isoelektrischen Punktes (erste Dimension)**

50 µg Protein wurden in eine Rehydrierungs-Lösung (7 M Harnstoff, 2 M Thiourea, 2 % CHHAPS, 0,002 % bromo-phenol-Blau, 10 mM DTT und 2 % Pharmalyte pH 3–10) mit einem Endvolumen von 125 µL überführt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden auf ‚Immobiline DryStrip‘ (7 cm, pH 3–10) überführt und für mindestens 10 h in Mineralöl inkubiert. Nach Aufquellen der Gele erfolgte die Elektrophorese mit folgenden Gradienten: 200 V 10 mA 5 W 0:01 h, 3500 V 30 mA 25 W 1:30 h, 3500 V 30 mA 25 W 1:00 h.

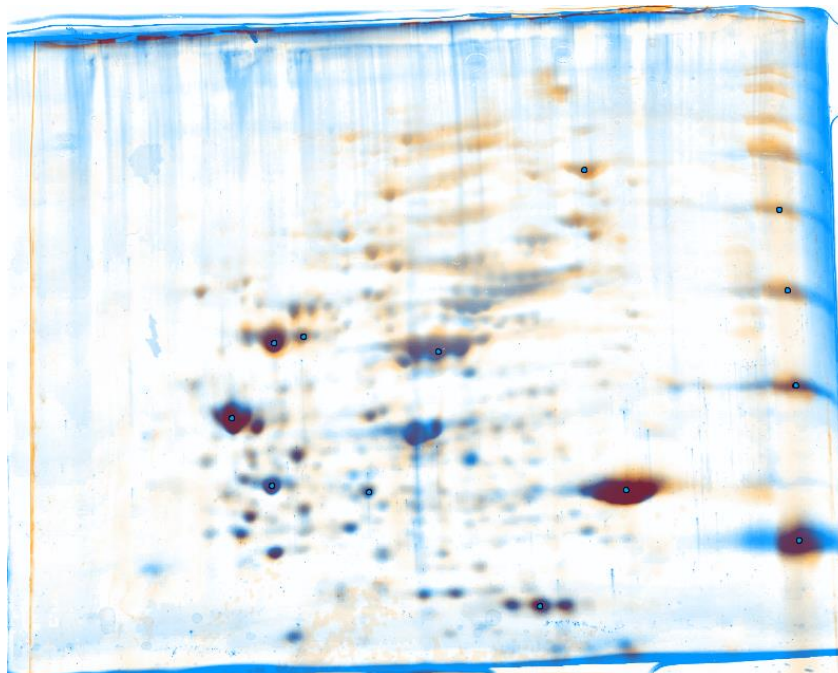
#### **SDS-PAGE (zweite Dimension)**

Die erhaltenden Streifen wurden für 15 min in 7 mL SDS-Äquilibrierungs-Puffer (4 % (w/v) SDS, 50 mM Tris, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 0,002 % bromo-phenol-Blau, 2 % (w/v) DTT, pH 8,8 mit HCl) eingelegt. Anschließend wurde jeder Streifen auf einem 12 %igen SDS-Gel mit Agaraose (0,5 %) fixiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die Färbung der SDS-Gele erfolgte über Nacht mit Coomassie (40 g Ammoniumsulfat in 400 mL 2 % (v/v) Phosphorsäure, 8 mL Coomassie G250 (5 % in Wasser), 100ml Methanol). Die Entfärbung erfolgte über Nacht in Wasser. Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit der Software Delta2D.

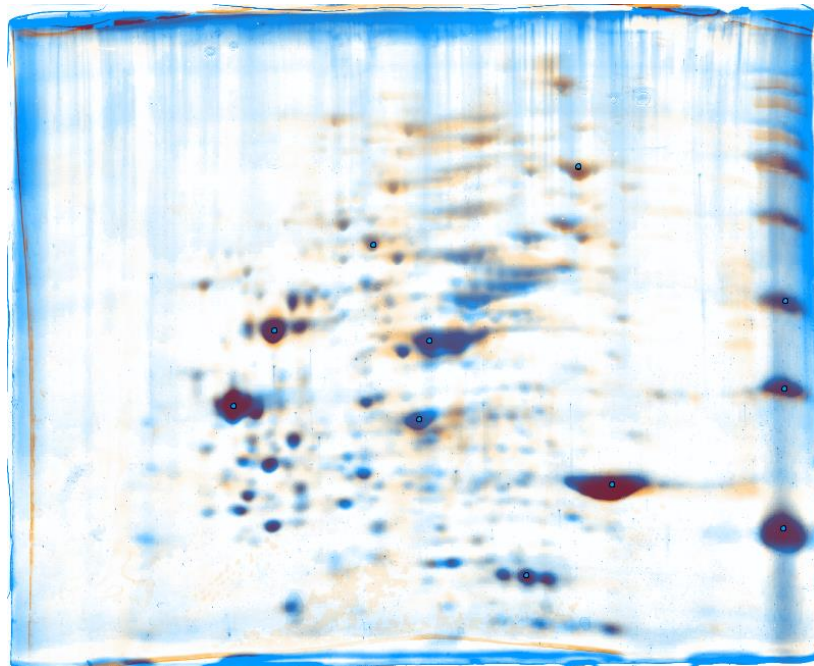
### A.8.2 Vergleich des Proteomhaushaltes von Zellen während der metabolischen Kurzzeitanalysen



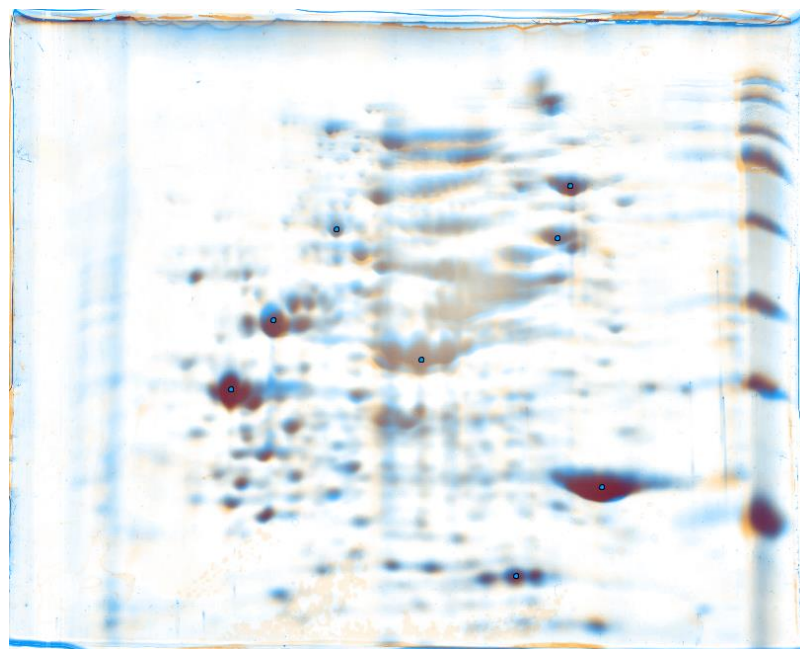
**Abbildung A.1:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Pyruvat (Zeitpunkt: MA1).



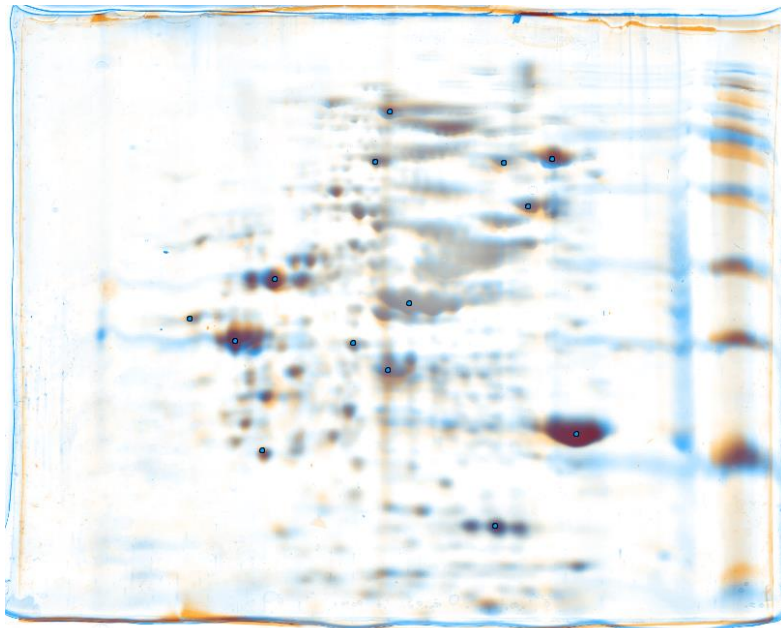
**Abbildung A.2:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glucose (Zeitpunkt: MA1).



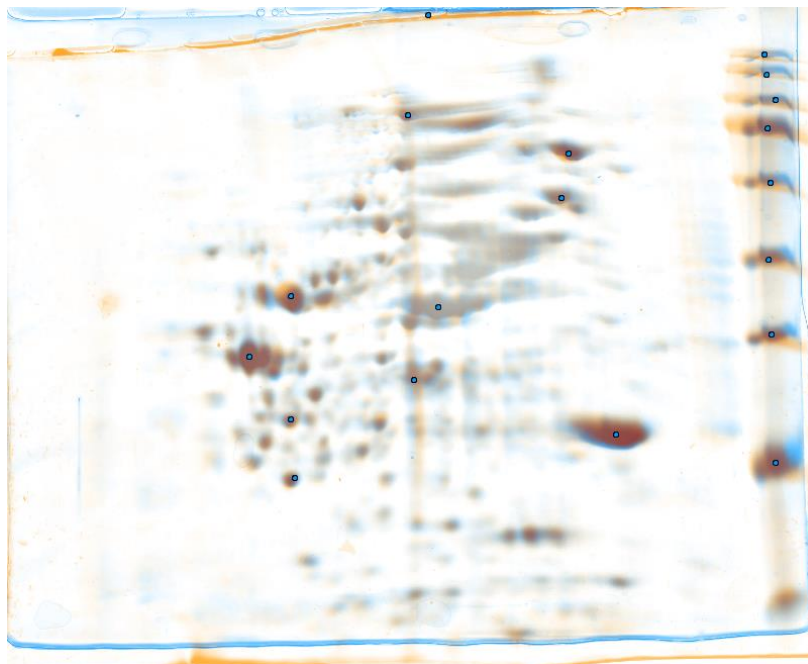
**Abbildung A.3:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Succinat (Zeitpunkt: MA1).



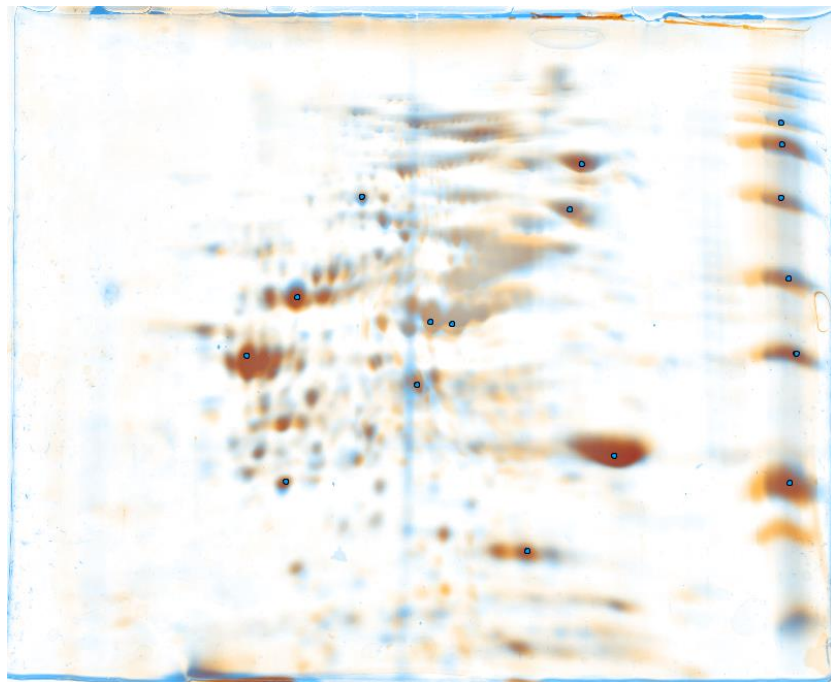
**Abbildung A.4:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glycerin (Zeitpunkt: MA1).



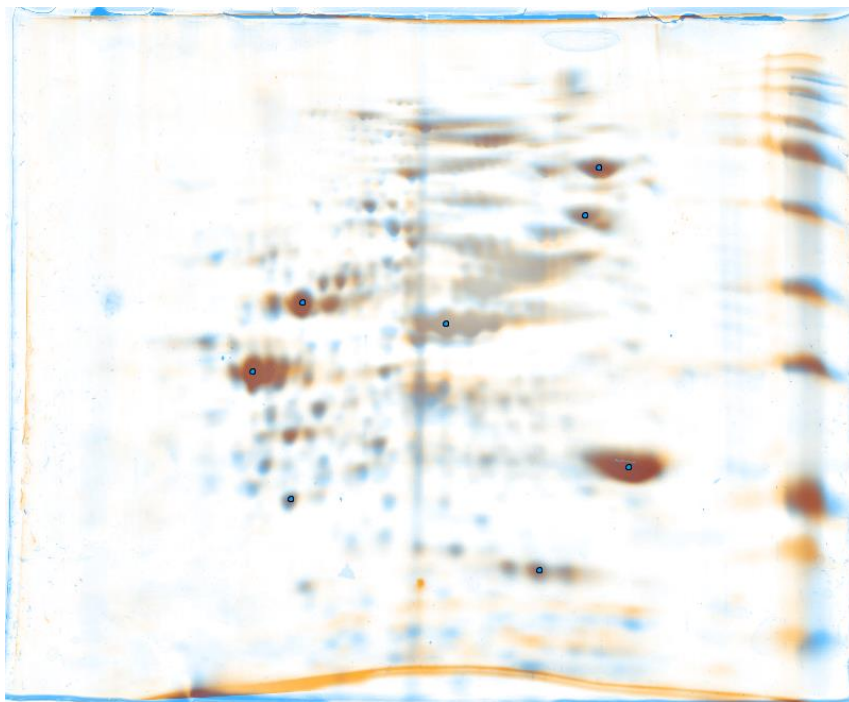
**Abbildung A.5:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Pyruvat (Zeitpunkt: MA2).



**Abbildung A.6:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glucose (Zeitpunkt: MA2).

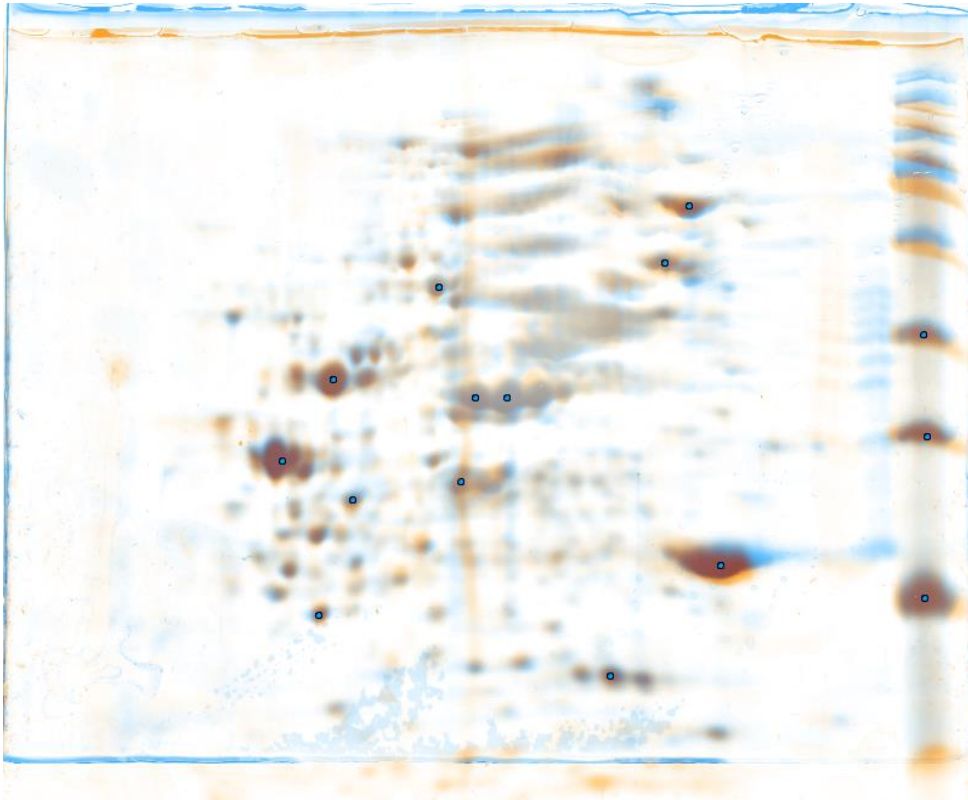


**Abbildung A.7:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Succinat (Zeitpunkt: MA2).



**Abbildung A.8:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glycerin (Zeitpunkt: MA2).

### A.8.3 Vergleich des Proteomhaushaltes von Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Produktionsprozesses



**Abbildung A.9:** Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (Zeitpunkt: MA1) und kurz vor Produktionsabbruch (MA2).



# A.9 Miniaturisiertes Probenahmesystem zur schnellen Probenahme

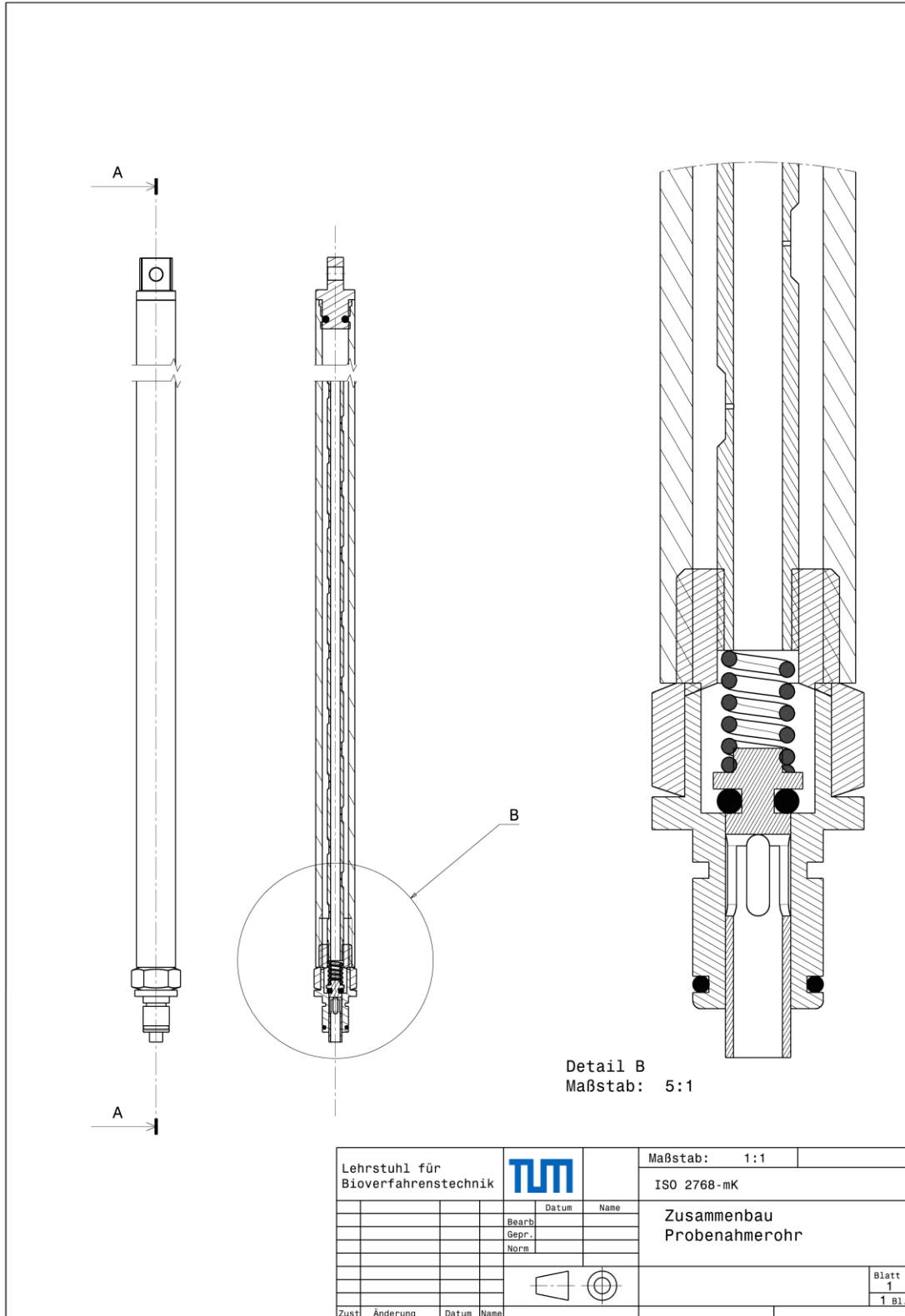


Abbildung A.10: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr zusammengebaut.

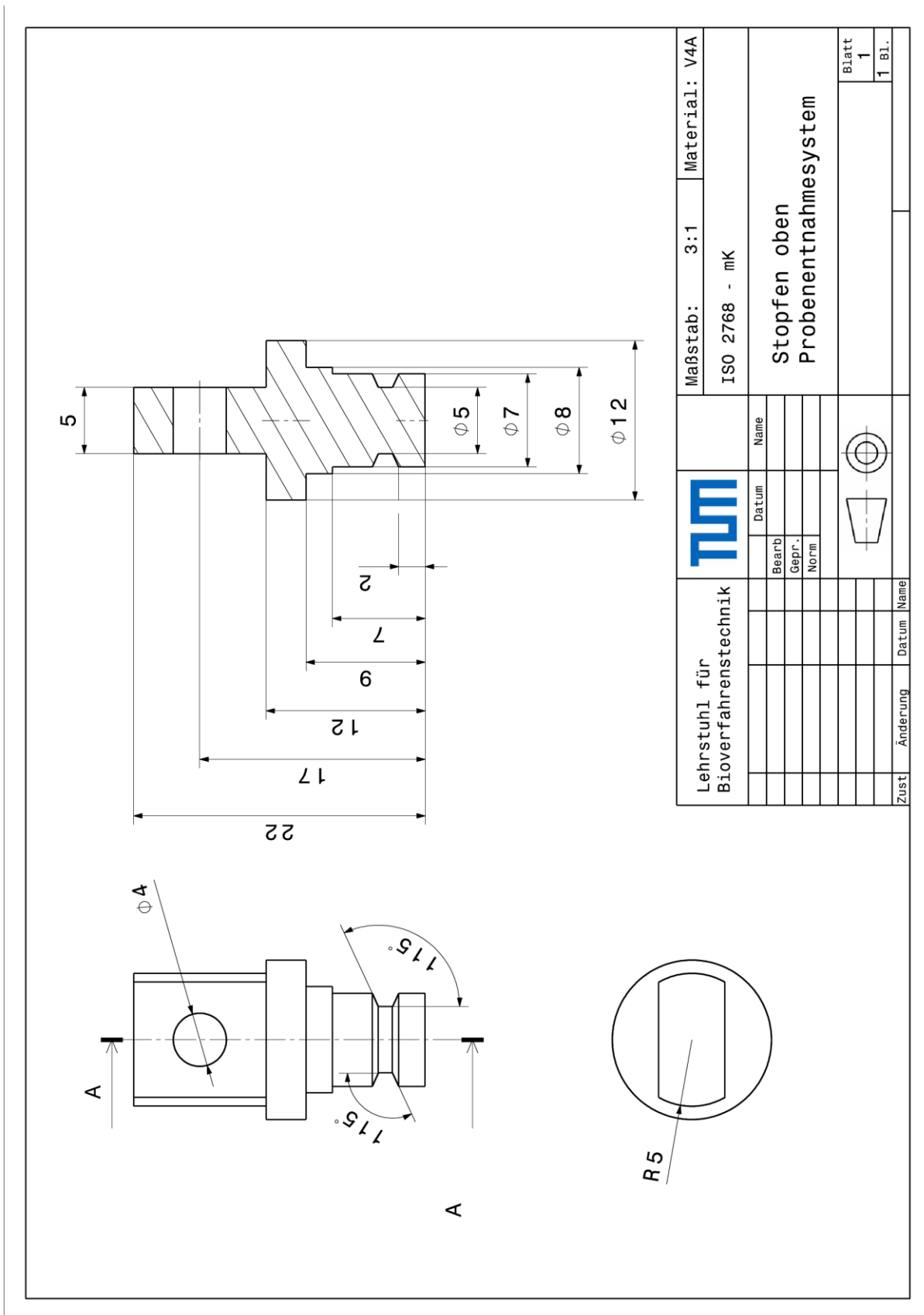


Abbildung A.11: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr - Stopfen.

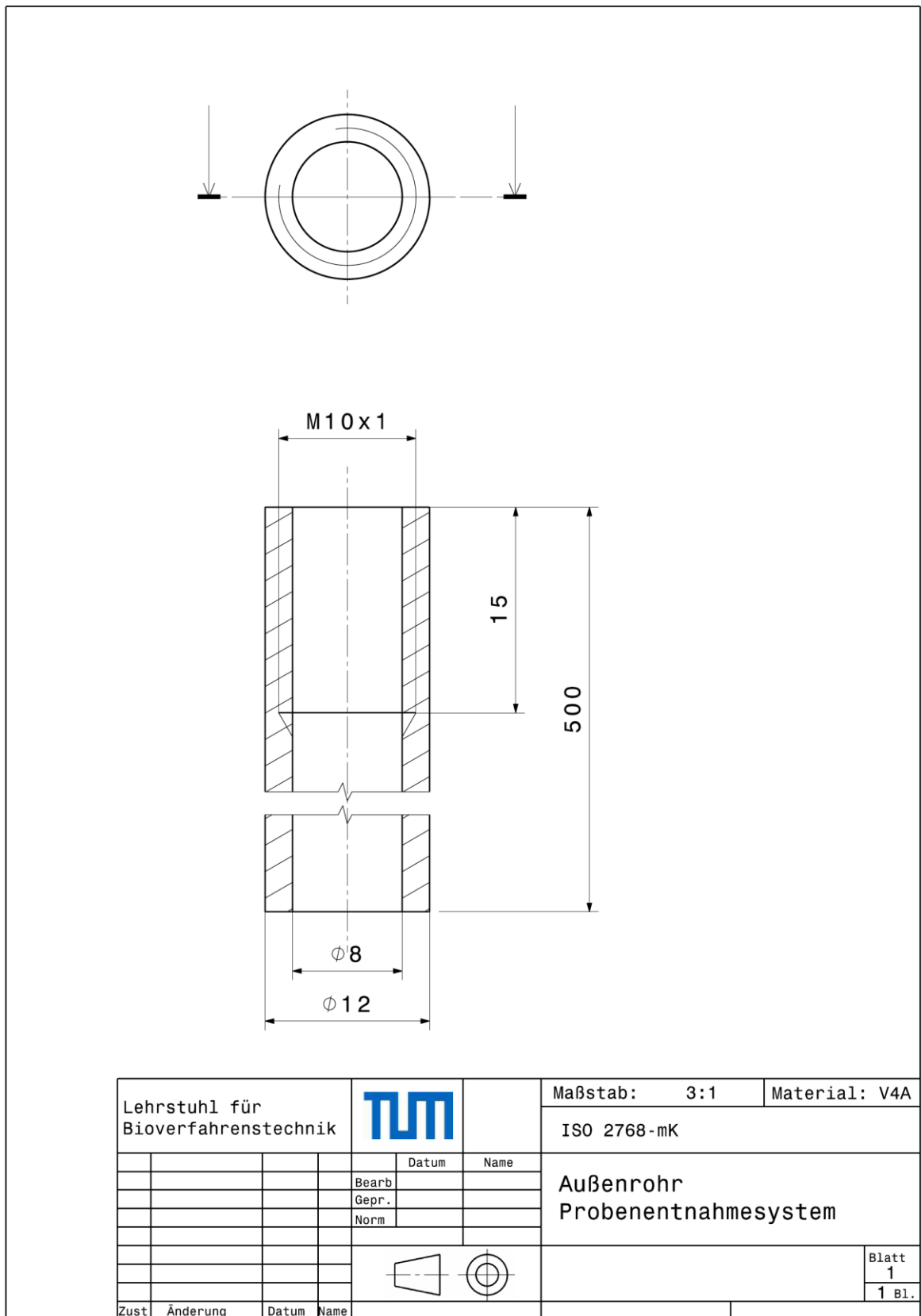


Abbildung A.12: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr - Außenrohr.

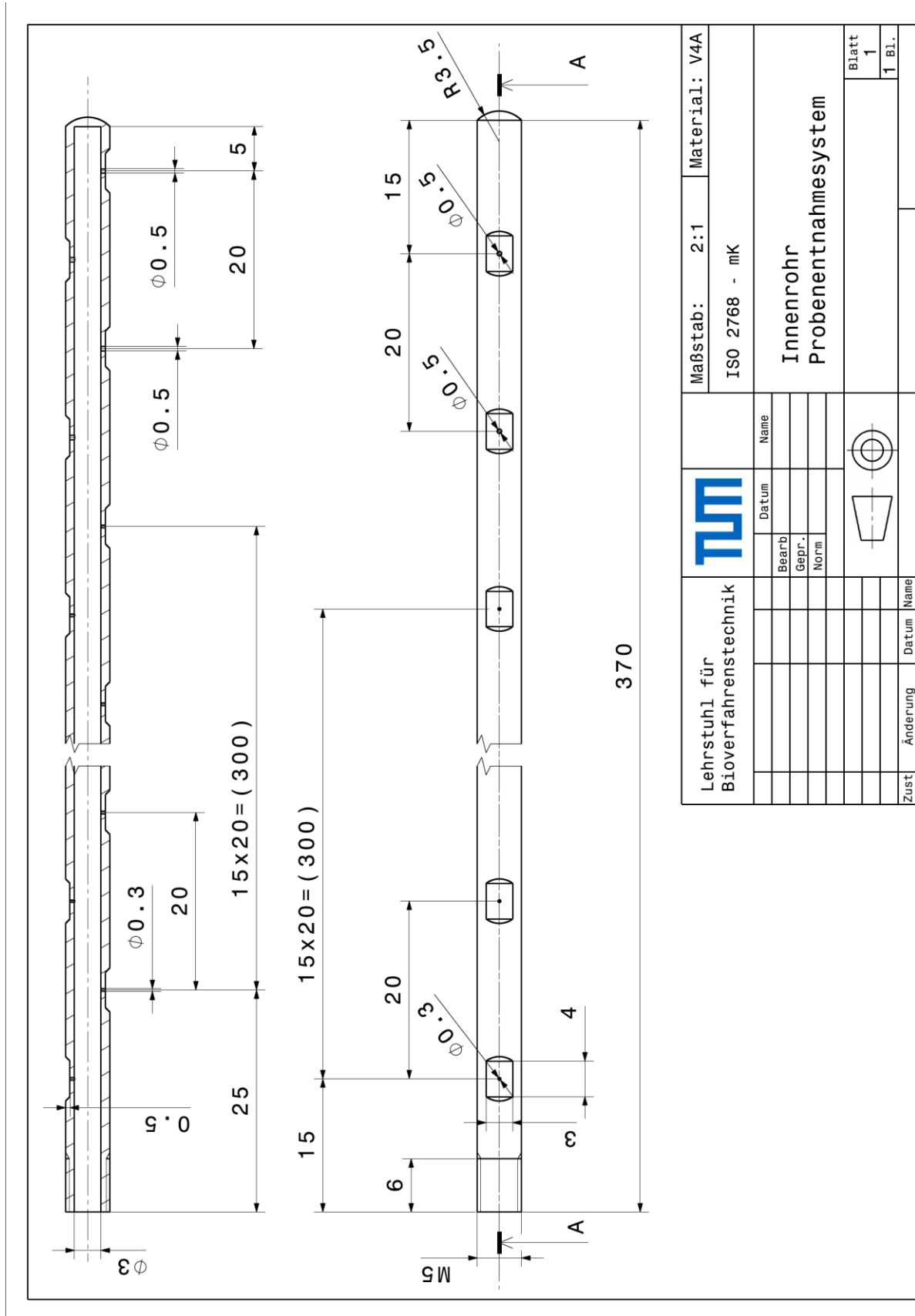


Abbildung A.13: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr - Innenrohr.

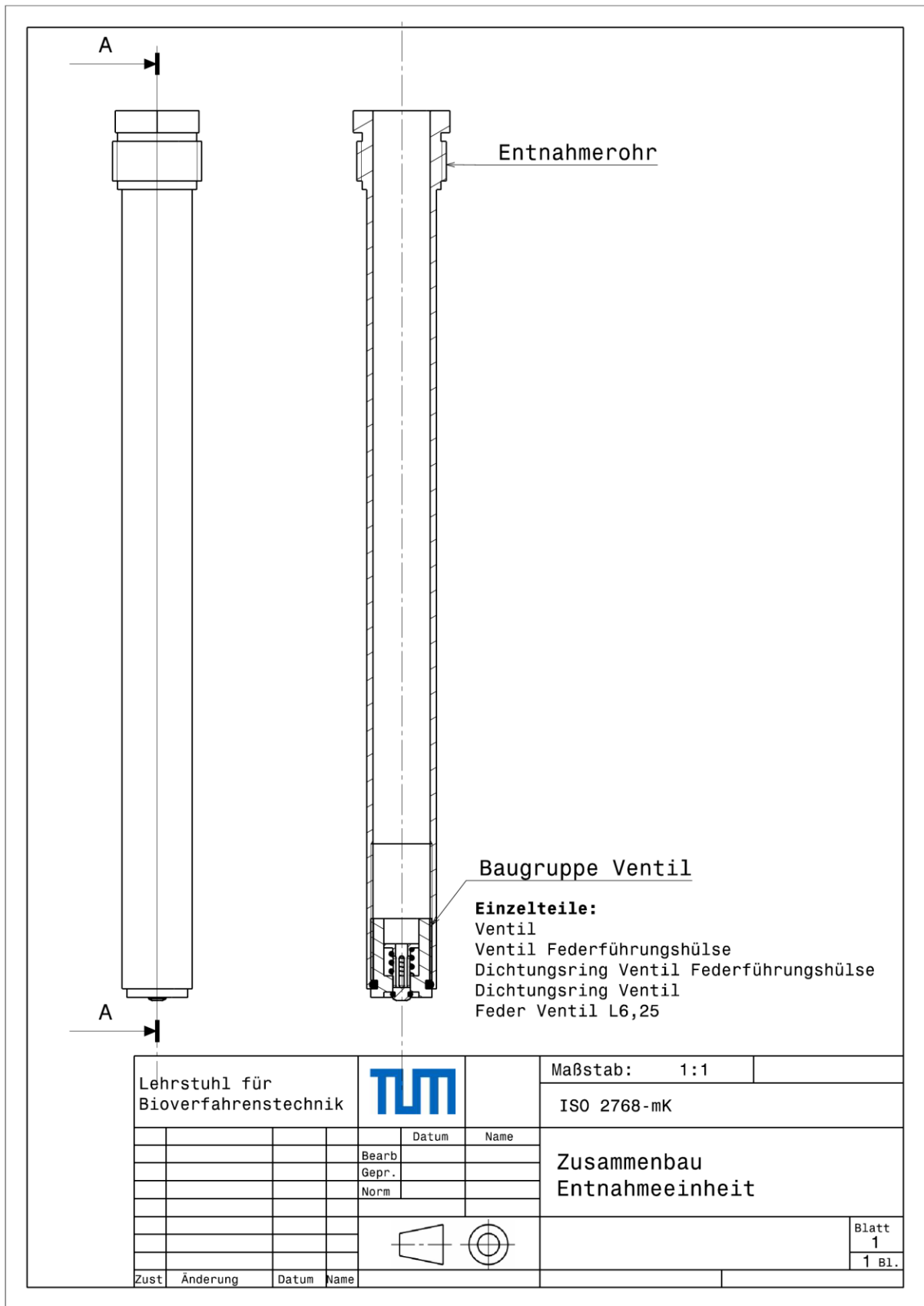
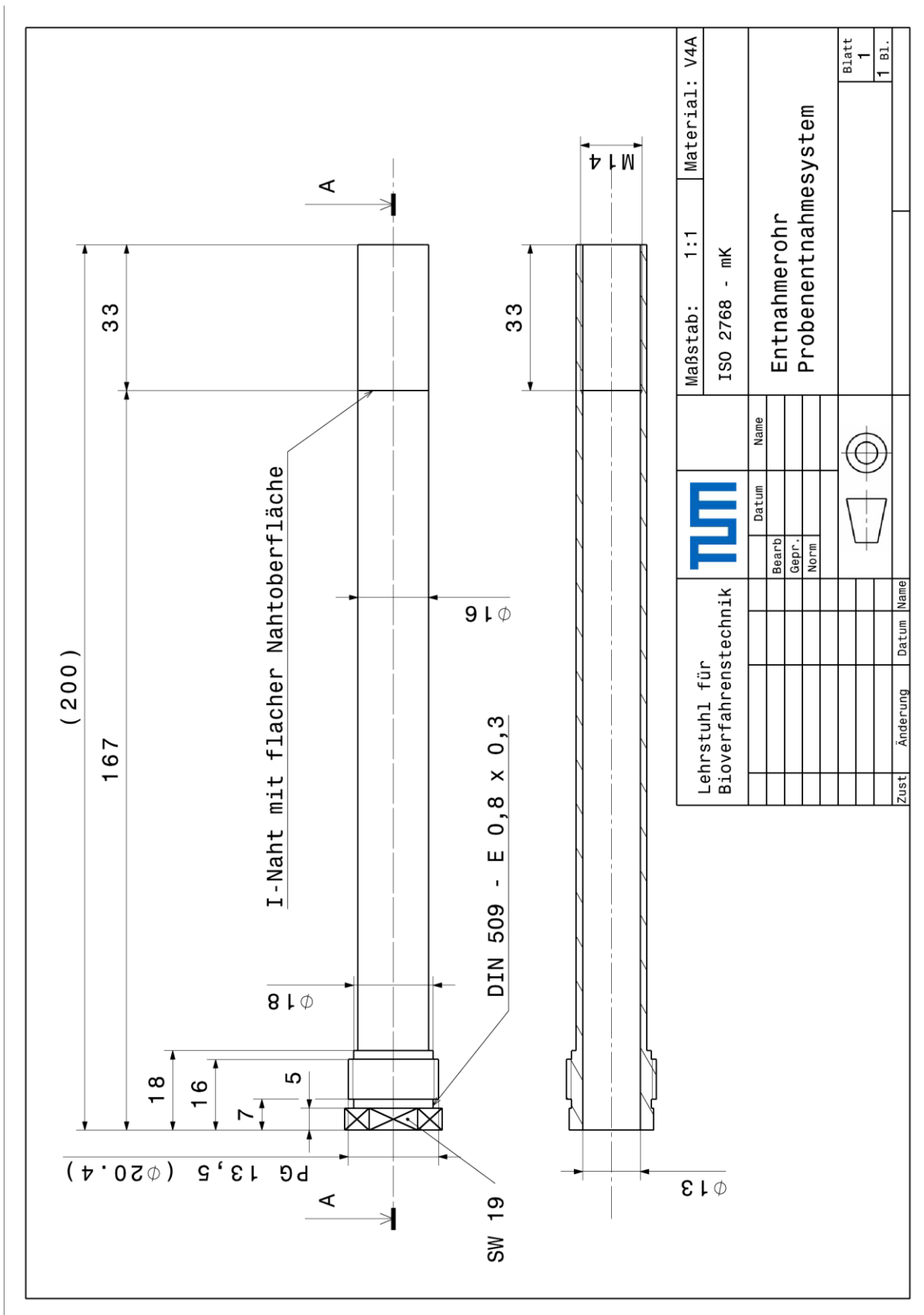


Abbildung A.14: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Reaktorseitiges Entnahmesystem zusammgebaut.



Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik		TUM		Maßstab: 1:1	Material: V4A
Bearb.	Datum	Name		ISO 2768 - mK	
Gepr.					
Norm					
Zust	Änderung	Datum	Name	Entnahmerohr Probenentnahmesystem	
				Blatt 1	
				1 Bl.	

Abbildung A.15: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Reaktorseitiges Entnahmesystem - Außenrohr.

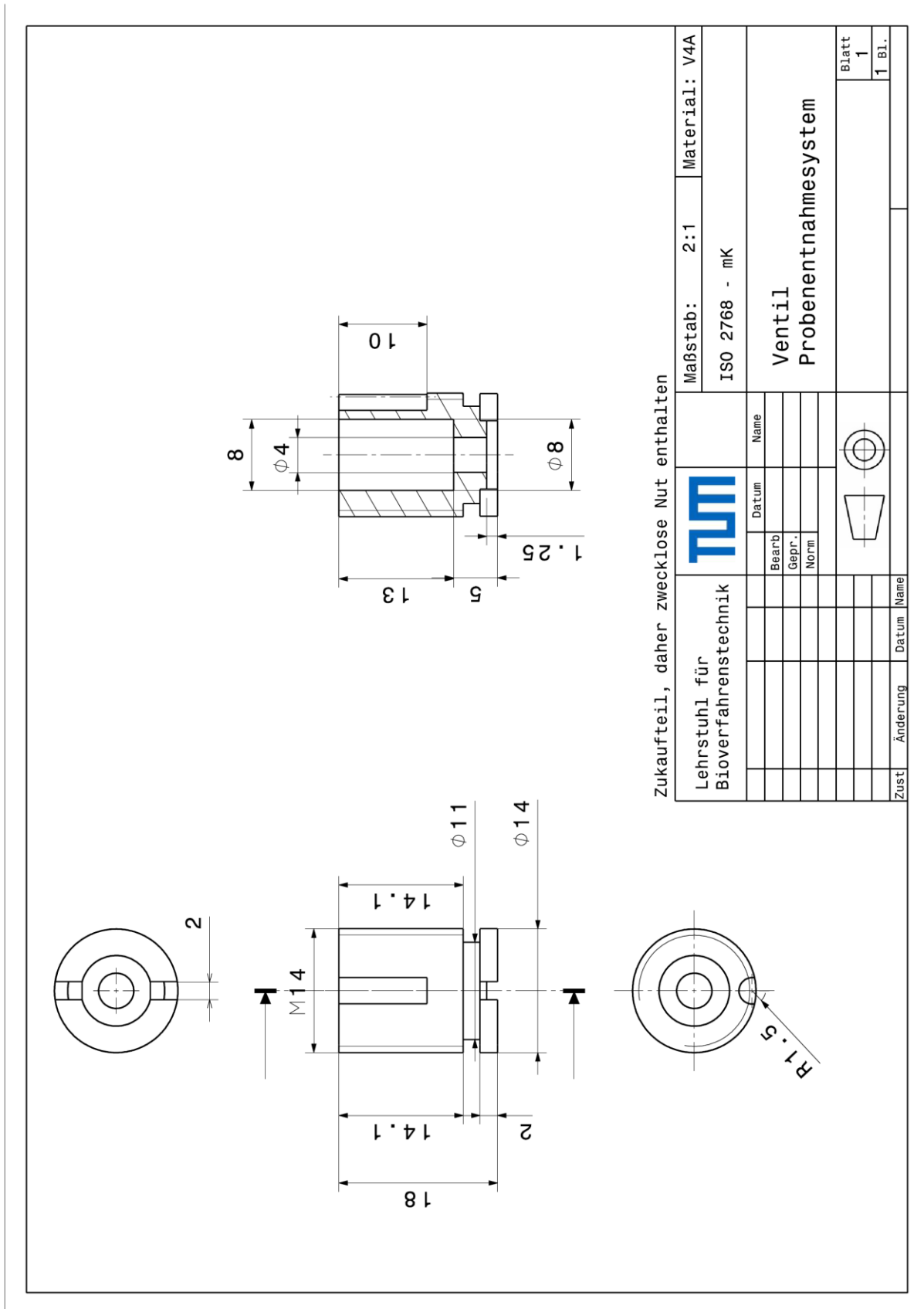


Abbildung A.16: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Reaktorseitiges Entnahmesystem - Ventilblock.

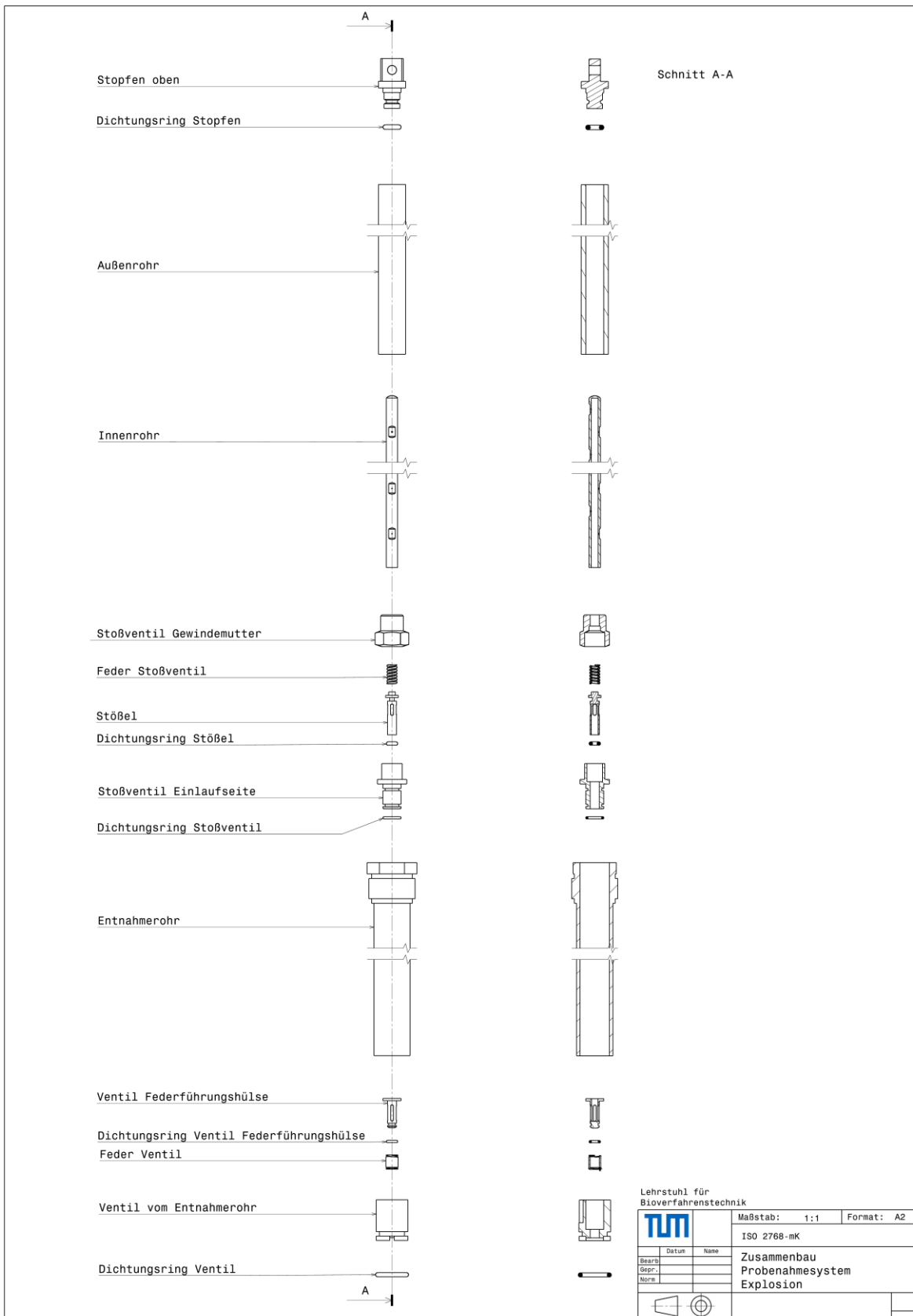


Abbildung A.17: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Explosionszeichnung von Probenahmerohr und Entnahmesystem.



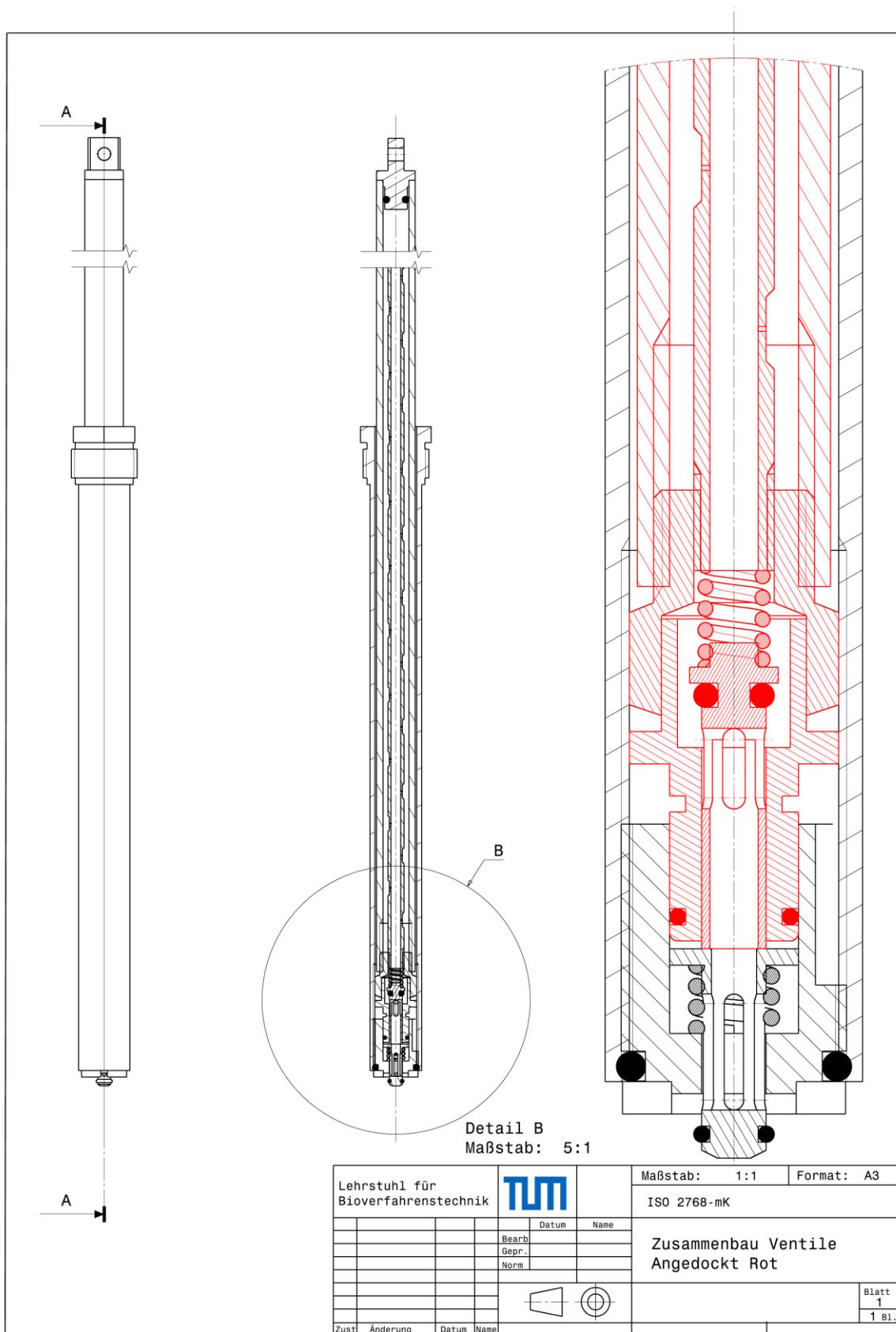
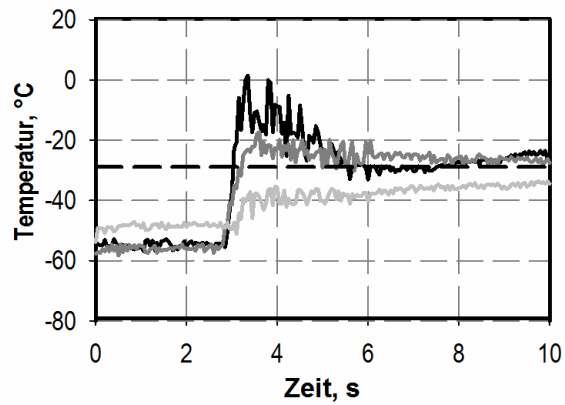


Abbildung A.18: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Funktionsprinzip.



**Abbildung A.19:** Temperaturverlauf an drei Positionen (schwarz: 2,0 cm vom Einlass entfernt, dunkelgrau: 15,5 cm vom Einlass entfernt, grau: 32,0 cm vom Einlass entfernt) des Probenahmerohres während des Probenahmeverganges (ab ca. 3 s) mit dem miniaturisierten Probenahmesystem unter Vorlage von 22,5 mL einer vorgekühlten (-60 °C) Methanol-Lösung (60 % 30 mM TEA). Die unterbrochene schwarze Linie beschreibt die Mischtemperatur der Gesamtlösung am Ende des Probenahmeverganges.

## Tabellenverzeichnis

4.1: In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide. . . . .	49
4.2: Zusammensetzung des TfbI-Puffers. . . . .	52
4.3: Zusammensetzung des TfbII-Puffers. . . . .	53
4.4: Zulaufmedien und Förderraten während der im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen. . . . .	63
5.1: Metabolit-Konzentrationen in zwei verschiedenen U- <sup>13</sup> C-markierten Zellextrakten. ....	79
5.2: Vergleichende Zusammenfassung der ermittelten Prozesskenngrößen während der Kultivierung von Malat-Enzym-Deletions-Mutanten. . . . .	92
5.3: Experimentell bestimmte extrazelluläre Stoffflüsse während der Kultivierung von Malat-Enzym-Deletions-Mutanten zur intrazellulären Stoffflussabschätzung. . . . .	93
5.4: Vergleich der experimentell und theoretisch bestimmten zellspezifischen Raten im 15 L-Produktionsprozess im Zeitraum der beiden metabolischen Kurzzeitanalysen. . . . .	122
5.5: Vergleich der experimentell und theoretisch bestimmten zellspezifischen Raten der vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zu zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten. . . . .	132
5.6: Vergleich der experimentell und theoretisch bestimmten zellspezifischen Raten im 15 L-Produktionsprozess im Zeitraum der beiden im Zulaufverfahren durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen. . . . .	148
5.7: Vergleich der experimentell und theoretisch bestimmten zellspezifischen Raten während der zwei im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle. . . . .	153
5.8: Vergleich der experimentell und theoretisch bestimmten zellspezifischen Raten während der zwei im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Glucose als Kohlenstoffquelle. . . . .	155
5.9: Vergleich der experimentell und theoretisch bestimmten zellspezifischen Raten während der zwei im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Succinat als Kohlenstoffquelle. . . . .	156
5.10: Vergleich der experimentell und theoretisch bestimmten zellspezifischen Raten während der zwei im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen mit Glycerin als Kohlenstoffquelle. . . . .	157

5.11: Gewählte Lösungsbereiche der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien $\Delta_r G$ für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht.....	177
A.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien. ....	232
A.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Gerätschaften.....	234
A.3: Zusammensetzung LB-Medium. ....	235
A.4: Minimal-Medium zur L-Phenylalanin-Produktion.....	235
A.5: Spurenelementlösung für Minimal-Medium zur L-Phenylalanin-Produktion. ....	236
A.6: Minimal-Medium zur U- <sup>13</sup> C-Extrakt-Herstellung.....	236
A.7: Spurenelementlösung für Minimal-Medium zur U- <sup>13</sup> C-Extrakt-Herstellung.....	237
A.8: Phosphat-Puffer (PBS) zur OD-Bestimmung und Zellüberführung.....	237
A.9: Kalium-Phosphat-Puffer zur U- <sup>13</sup> C-Extrakt-Herstellung. ....	237
A.10: Zulaufmedium zur parallelel Kultivierung im 0,5 L-Maßstab. ....	237
A.11: Zulaufmedien zur Kultivierung im 15 L-Maßstab Teil 1.....	238
A.12: Zulaufmedien zur Kultivierung im 15 L-Maßstab Teil 2.....	238
A.13: Bauteile und Software des 42 L-Reaktorsystems.....	239
A.14: Bauteile und Software des 0,5 L-Parallelbioreaktorsystems.....	239
A.15: Bauteile und Software des 48x-Parallelbioreaktorsystems. ....	240
A.16: Bauteile und Software der LC-MS-(Ionenfalle)-Anlage.....	240
A.17: Bauteile und Software der UHPLC-MS-(Triple-Quadrupole)-Anlage.....	240
A.18: Gradienten-Profile der Massenspektrometrie-Methoden. ....	241
A.19: HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Glycerin und organischen Säuren. ....	241
A.20: HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Aminosäuren.....	241
A.21: Zusammensetzung der Mercaptopropionsäure-Bicin-Lösung. ....	242
A.22: Zusammensetzung des Ziel-Probengefäßes zur Aminosäure-Derivatisierung. ....	242
A.23: Zusammensetzung der Iodessigsäurelösung. ....	242
A.24: Zusammensetzung der ortho-Phtaldialdehyd-Lösung.....	242
A.25: Derivatisierungs-Methode zur Quantifizierung von Aminosäuren. ....	242
A.26: Gradient Profil zur Quantifizierung von Aminosäure. ....	243
A.27: Bauteile, Lösungen, Software und Einstellungen des Durchflusszytometers.....	244
A.28: Enzymatische Nachweismethoden. ....	244
A.29: Kohlenstoffflüsse mit <i>E. coli</i> FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub> .....	245
A.30: Kohlenstoffflüsse mit <i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta maeA \Delta maeB$ pF81 <sub>kan</sub> .....	247
A.31: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA1) Pyruvat.....	248

---

A.32: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA1) Glucose. ....	250
A.33: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA1) Succinat. ....	251
A.34: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA1) Glycerin. ....	253
A.35: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA1) Prozess .....	254
A.36: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA2) Pyruvat.....	256
A.37: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA2) Glucose. ....	257
A.38: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA2) Succinat. ....	259
A.39: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA2) Glycerin. ....	260
A.40: Theoretisch berechnete Kohlenstoffflüsse (MA2) Prozess.....	262
A.41: MCA-Modell.....	264

## Abbildungsverzeichnis

3.1: Wachstumsphasen im Satzverfahren. ....	7
3.2: Schematische Darstellung der mittels Methoden der genomweiten Metabolit-Bilanzierung bestimmbarer Lösungen. ....	28
3.3: Darstellung des Zentralstoffwechsels, des Glycerin-Metabolismus und des Syntheseweges für aromatische Aminosäuren in <i>E. coli</i> . ....	37
3.4: Darstellung des Glycogen- und Trehalose- Speicherstoffwechsels in <i>E. coli</i> . ....	43
3.3: Chemische Strukturformel von L-Phenylalanin. ....	44
4.1: Versuchsaufbau zur parallelen Zulauf-Kultivierung im 0,5 L-Maßstab. ....	55
4.2: Versuchsaufbau zur Zulauf-Kultivierung im 15 L-Maßstab. ....	57
4.3: Prozessphasen und Zulaufprofile während des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses im 15 L-Maßstab. ....	58
4.4: Schematischer Überblick über die Methodik der parallelisierten Kurzzeitanalysen nach schnellem Medienwechsel. ....	61
4.5: Zulaufprofil während der metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb. ....	63
4.6: Protokoll zur Probenahme und Probenaufarbeitung zur intrazellulären Metabolom-Analyse mit und ohne Verwendung von U- <sup>13</sup> C-markiertem Zellextrakt. ....	69
5.1: Schematische Darstellung des Herstellungsprotokolls zur Gewinnung von U- <sup>13</sup> C-markiertem Zellextrakt. ....	76
5.2: Lineare Regression zur Quantifizierung von Metaboliten im U- <sup>13</sup> C-Zellextrakt. ....	78
5.3: Phosphoenolpyruvat (PEP)-Konzentration in zwei verschiedenen U- <sup>13</sup> C-Zellextrakten. ....	81
5.4: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4.11 <sub>kan</sub> pF81 <sub>amp</sub> im 15 L-Maßstab aus Glycerin und Ammoniak. ....	84
5.5: Parallelansatz im Halbliter-Maßstab zur Charakterisierung der Stabilität des Vektors pF81 <sub>amp</sub> . ....	86
5.6: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Maßstab aus Glycerin und Ammoniak. ....	88
5.7: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub> , <i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta$ <i>maeA</i> pF81 <sub>kan</sub> und <i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta$ <i>maeA</i> $\Delta$ <i>maeB</i> pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. ....	91

5.8: Theoretisch abgeschätzte Lösungsräume der intrazellulären Stoffflussverteilungen während der L-Phenylalanin-Produktion aus Glycerin mit <i>E. coli</i> FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub> und <i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta$ maeA $\Delta$ maeB pF81 <sub>kan</sub> .....	94
5.9: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4.11 $\Delta$ maeA pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor.. .....	97
5.10: Charakterisierung der Lebendzellzahl während der L-Phenylalanin-Produktionsphase mittels Durchflusszytometrie.....	98
5.11: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4.11 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. ....	99
5.12: Glucose-Konzentration während der Biomasse-Überführung vom 15 L-Produktionsprozess in den Analysenmaßstab zur metabolischen Analyse. ....	100
5.13: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4.15 $\Delta$ glg pF81 <sub>kan</sub> und <i>E. coli</i> FUS4.15 $\Delta$ glg $\Delta$ ots pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor.. .....	103
5.14: Glucose-Ausfluss aus verschiedenen rekombinanten L-Phenylalanin-Produktionsstämmen während der Zellüberführung aus dem 15 L-Produktionsprozess in den 0,5 L-Analysenmaßstab zur metabolischen Analyse. ....	105
5.15: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor unter Variation der eingesetzten Kohlenstoffquelle.. .....	110
5.16: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor mit Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle.....	112
5.17: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor mit Glycerin als Kohlenstoffquelle.....	115
5.18: Integrale Kohlenstoffbilanz zu verschiedenen Zeitpunkten des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses mit <i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor mit Glycerin als Kohlenstoffquelle.. .....	117
5.19: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. ....	121
5.20: Zellspezifische Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsrate im 15 L-Produktionsprozess während des Zeitraumes der beiden metabolischen Kurzzeitanalysen.....	123
5.21: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im 15 L-Produktionsprozess zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (MA1). ....	124

5.22: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im 15 L-Produktionsprozess zum Zeitpunkt kurz vor Produktionsabbruch (MA2).....	126
5.23: Prozentuale Änderung der theoretischen intrazellulären Stoffflussverteilung im 15 L-Produktionsprozess zum Zeitpunkt kurz vor Produktionsabbruch (MA2) bezogen auf den Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (MA1). .....	128
5.24: Biomassespezifische Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsrate in den vier im Satzbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zum ersten Prozesszeitpunkt (MA1). .....	130
5.25: Substratkonzentrationen während der vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zum ersten Prozesszeitpunkt (MA1). .....	131
5.26: Biomassespezifische Raten für Substrataufnahme, L-Phenylalanin-Bildung, Nebenproduktbildung und Atmung in den vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zu den zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten.....	135
5.27: Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Pyruvat. ....	137
5.28: Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Glucose.....	139
5.29: Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Succinat. ....	141
5.30: Intrazelluläre Stoffflussverteilung während der ersten metabolischen Kurzzeitanalyse (MA1) mit dem Satzsubstrat Glycerin.....	143
5.31: L-Phenylalanin-Produktionsprozess mit <i>E. coli</i> FUS4 pF81 <sub>kan</sub> im 15 L-Rührkesselreaktor. ....	147
5.32: Zellspezifische Sauerstoffaufnahme- und Kohlendioxidbildungsrate in den vier im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zum ersten Prozesszeitpunkt (MA1). .....	150
5.33: Biomassespezifische Raten während der vier parallel durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen zu den zwei verschiedenen Prozesszeitpunkten (MA1 und MA2). ..	152
5.34: Vergleichende Flusskarte der theoretisch bestimmten intrazellulären Stoffflussverteilungen während der unter Zulaufbedingungen durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalysen (MA1 und MA2). .....	159
5.35: Intrazelluläre Konzentrationen der Glykolyse-Intermediate während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb.....	162



---

5.36: Intrazelluläre Konzentrationen der Zentralstoffwechsel-Intermediate während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb.....	164
5.37: Intrazelluläre Konzentrationen der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel-Intermediate während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb.....	165
5.38: Intrazelluläre Konzentrationen der Aminosäurestoffwechsel-Intermediate während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen im Zulaufbetrieb.....	167
5.39: Mögliche freie Gibbs'sche Reaktionsenergien des Stoffwechselnetzwerkes zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Bildung (MA1).....	170
5.40: Theoretisch mögliche intrazelluläre Konzentrationsbereiche von nicht-experimentell bestimmten Metaboliten, abgeschätzt mittels thermodynamischer Analyse des Stoffwechselnetzwerkes. ....	172
5.41: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Glycerinkinase. ....	179
5.42: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase. ....	179
5.43: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Fructose-1,6-bisphosphatase. ....	180
5.44: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Fructosebisphosphat-Aldolase. ....	181
5.45: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Pyruvatkinase. ....	181
5.46: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Pyruvat-Dehydrogenase. ....	182
5.47: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Citrat-Synthase.....	183
5.48: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase. ....	184
5.49: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der Shikimatkinase.....	184
5.50: Verteilung der zu zwei metabolischen Analysen (MA1 und MA2) bestimmten Elastizitätskoeffizienten der 5-Enolpyruvoylshikimat-3-phosphat-Synthase.....	185
5.51: Fluss-Kontrollkoeffizienten zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion.....	190
5.52: Fluss-Kontrollkoeffizienten kurz vor Abbruch der L-Phenylalanin-Produktion.....	193

5.53: Vergleich der zu zwei Produktionszeitpunkten bestimmten Fluss-Kontrollkoeffizienten.....	198
5.54: Fluss-Kontrollkoeffizienten der Stoffflüsse im Aromatenbiosyntheseweg bei den zu zwei Produktionszeitpunkten durchgeführten metabolischen Analysen (MA1 und MA2).....	207
A.1: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Pyruvat (Zeitpunkt: MA1). ....	266
A.2: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glucose (Zeitpunkt: MA1). ....	266
A.3: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Succinat (Zeitpunkt: MA1). ....	267
A.4: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der ersten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glycerin (Zeitpunkt: MA1). ....	267
A.5: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Pyruvat (Zeitpunkt: MA2). ....	268
A.6: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glucose (Zeitpunkt: MA2). ....	268
A.7: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Succinat (Zeitpunkt: MA2). ....	269
A.8: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion und nach der zweiten im Zulaufbetrieb durchgeführten metabolischen Kurzzeitanalyse auf der Kohlenstoffquelle Glycerin (Zeitpunkt: MA2). ....	269
A.9: Vergleichende Proteomanalyse von Zellen aus der L-Phenylalanin-Produktion vor der Entnahme aus dem 15 L-Prozess zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion (Zeitpunkt: MA1) und kurz vor Produktionsabbruch (MA2). ....	270
A.10: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr zusammengebaut. ....	271

---

A.11: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr - Stopfen.....	272
A.12: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr - Außenrohr. ....	273
A.13: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Probenahmerohr - Innenrohr.....	274
A.14: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Reaktorseitiges Entnahmesystem gesamt. ....	275
A.15: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Reaktorseitiges Entnahmesystem - Außenrohr. ....	276
A.16: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Reaktorseitiges Entnahmesystem - Ventil. ....	277
A.17: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Explosionszeichnung gesamt.....	278
A.18: Miniaturisiertes Probenahmesystem: Funktionsprinzip. ....	279
A.19: Temperaturverlauf an drei Positionen des Probenahmerohres während des Probenahmeproganges mit dem miniaturisierten Probenahmesystem. ....	280