

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Metabolische Analysen zur Herstellung aromatischer Aminosäuren mit
Escherichia coli im Zulaufverfahren**

Julia Maria Tröndle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. rer. nat. Georg Sprenger

Die Dissertation wurde am 25.02.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen
am 25.06.2019 angenommen.

Geduld ist das Vertrauen darauf,
dass alles kommt,
wenn die Zeit dafür reif ist.

Andreas Tenzer

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München. Viele Menschen haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen und ich bin ihnen Allen zu großem Dank verpflichtet:

Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für das Zutrauen und Zumuten der vielfältigen Themenstellung und das damit in mich gesetzte Vertrauen, für die langfristige Unterstützung des Projektes sowie für die stets offenen Ohren.

Dem Zweitprüfer Prof. Dr. rer. nat. Georg Sprenger (Universität Stuttgart) und dem Vorsitzenden der Prüfungskommission Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling für die Übernahme ihrer jeweiligen Aufgaben.

Den Projektpartnern Prof. Sprenger, Dr. Christoph Albermann und Dr. Natalia Trachtmann am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart für die langjährige unkomplizierte, vertrauensvolle und zuverlässige Zusammenarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der International Graduate School of Science and Engineering für die Finanzierung des Projektes und meiner Arbeit.

Prof. Stephan Hann und seinen Mitarbeitern an der BOKU in Wien für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für drei unvergessliche Monate in ihrer wunderschönen Stadt.

Danielle Dennewald, Felizitas Novotny und Michael Weiner für alles, das ich von ihnen als Studentin lernen durfte.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für die gute Zeit im Labor und überall außenrum, für den Zusammenhalt und für die Zuversicht, dass alles irgendwie klappen wird. Besondere Gefährten in Freud und Leid waren meine Bürokollegen Ilka Sührer, Israh Al-Rowaihi, Karl Behler und Kristin Schoppel. Kristin hat sich auf das Abenteuer meines Projektes eingelassen und war in den letzten eineinhalb Jahren eine unverzichtbare und unermüdliche Unterstützung.

Holger Leutung, dem wohl besten Massenspektrometer-Techniker der Welt, für zahlreiche Einsätze als Retter in der Not.

Kristin Schoppel, Arne Bleidt, Ingmar Polte, Anna-Lena Heins, Karl Behler, Christian Burger und Xenia Priebe für die Unterstützung bei der Durchführung der metabolischen Kurzzeitanalysen. Dabei sind viele helfende Hände und Nerven aus Stahl bei allen Beteiligten die einzige Chance, die es gibt.

Markus Amann, Georg Kojro und Norbert Werth für die Unterstützung bei vielen praktischen Labor- und LRZ-Problemen. Gabi Herbrink, Marlene Schocher und Ellen Truxius für die Hilfe beim Kampf mit der Bürokratie und allen ihren Absurditäten.

Michael Weiner, Kristin Schoppel, Timm Severin, Anna-Lena Heins und meinen Eltern für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Norbert für seinen unerschöpflichen und immer bereitstehenden Vorrat an Cappuccino, Tee und Kreuzworträtseln.

Meiner Familie Rudi, Christine, Tobi, Conny und Lucia für ihre immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen und ihre stete Erinnerung an die wichtigen Dinge im Leben.

Michi für seine Zuverlässigkeit, seine Unterstützung und sein Vertrauen. Danke, dass Du immer für mich da bist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	2
3	Theoretische Grundlagen	7
3.1	Biologische Grundlagen – <i>Escherichia coli</i>	7
3.1.1	Transportprozesse	7
3.1.2	Kohlenstoffmetabolismus	9
3.1.3	Produktion aromatischer Aminosäuren mit <i>Escherichia coli</i>	16
3.2	Bioprozesstechnik	21
3.2.1	Phasen mikrobiellen Wachstums	21
3.2.2	Satzbetrieb von Bioreaktoren	22
3.2.3	Zulaufbetrieb von Bioreaktoren	23
3.2.4	Bestimmung biomassespezifischer Prozessraten	24
3.3	Metabolische Analysen	26
3.3.1	Stationäre metabolische Analysen	26
3.3.2	Dynamische metabolische Analysen	27
3.3.3	¹³ C-basierte metabolische Analysen	28
3.4	Quantifizierung intrazellulärer Metabolite	30
3.4.1	Probenaufarbeitung – Inaktivierung und Extraktion der Zellen	30
3.4.2	Standardisierung und analytische Methoden zur Quantifizierung	32
3.5	Genomweite Stoffflussabschätzungen	35
3.6	Thermodynamische Analysen von Stoffwechselnetzwerken	40
3.7	Metabolische Kontrollanalyse	42
3.7.1	Abschätzung von Elastizitäten	43
3.7.2	Abschätzung von Kontrollkoeffizienten	44
3.8	Metabolische Kontrollanalysen des Metabolismus von <i>Escherichia coli</i>	47

4	Material und Methoden	48
4.1	Mikroorganismen und Plasmide	48
4.2	Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	50
4.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	53
4.3.1	Stammhaltung	53
4.3.2	Kultivierung in Schüttelkolben	53
4.3.3	Gewinnung kompetenter Zellen und Transformation	53
4.3.4	Zulauf-Kultivierung im 15 L-Maßstab	54
4.3.5	Parallelisierte Kurzzeitanalysen im Bioreaktorsystem	56
4.3.6	Gewinnung von U- ¹³ C-markiertem Zellextrakt	60
4.4	Probenahme und Aufarbeitung zur intrazellulären Analytik	61
4.5	Analytische Methoden	62
4.5.1	Bestimmung von optischer Dichte und Biotrockenmasse	62
4.5.2	HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Phosphoenolpyruvat	62
4.5.3	HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Aminosäuren	62
4.5.4	HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Säuren, Alkoholen und Zuckern	63
4.5.5	Enzymatische Quantifizierung von Glucose und Ammoniak	63
4.5.6	Massenspektrometrische Quantifizierung intrazellulärer Metabolite	64
4.6	Toolboxen zur theoretischen Analyse von Stoffwechselnetzwerken	65
5	Ergebnisse und Diskussion	67
5.1	Analyse der L-Phenylalanin-Synthese mittels eines PEP-Transporter-Stammes*	67
5.1.1	Aufnahme von PEP durch L-Phenylalanin-Produktionsstämme	67
5.1.2	15 L-Produktionsprozess mit PEP-Transporter-Stamm	68
5.1.3	Metabolische Analyse der L-Phenylalanin-Produktion mit PEP als Effektor	70
5.1.4	Theoretische Betrachtung des Effekts von PEP auf die L-Phenylalanin-Synthese	75
5.2	Produktion von L-Tryptophan mit <i>E. coli</i> NT367*	78
5.2.1	15 L-Zulaufkultivierung mit <i>E. coli</i> NT367	78
5.2.2	15 L-Zulaufkultivierung mit <i>E. coli</i> NT367 pF112aroFBL _{kan}	83

5.2.3	Einfluss der Substratzulauftrate auf die Nebenproduktbildung bei der L-Tryptophan-Produktion	86
5.3	Charakterisierung von <i>E. coli</i> Stämmen für die L-Tryptophan-Produktion	90
5.3.1	15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a pF112aroFBL _{kan}	90
5.3.2	15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA</i> pF112aroFBL _{kan}	93
5.3.3	15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan}	95
5.4	Metabolische Kurzzeitanalyse der L-Tryptophan-Produktion mit <i>E. coli</i> im Satzbetrieb	99
5.4.1	Referenzprozess im 15 L-Maßstab	99
5.4.2	Parallelisierte Kurzzeitanalyse im Satzbetrieb	106
5.4.3	Theoretische Stoffflussabschätzungen	112
5.5	Metabolische Analyse der L-Tryptophan-Produktion mit <i>E. coli</i> im Zulaufbetrieb	122
5.5.1	Referenzprozess im 15 L-Maßstab	123
5.5.2	Parallelisierte Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb	127
5.5.3	Theoretische Stoffflussabschätzungen	134
5.5.4	Vergleichende Proteomanalysen	138
5.5.5	Quantifizierung intrazellulärer Metabolite	140
5.6	Thermodynamische Betrachtung des Stoffwechsel-Netzwerkes	154
5.6.1	Abschätzung intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen	154
5.6.2	Abschätzung von Reaktionsenergien und Klassifizierung von Reaktionen	158
5.7	Metabolische Kontrollanalyse der L-Tryptophan-Produktion	162
5.7.1	Abschätzung von Elastizitäten	163
5.7.2	Abschätzung von Fluss-Kontroll-Koeffizienten	177
6	Zusammenfassung	188
7	Ausblick	195
8	Literaturverzeichnis	196
9	Abkürzungsverzeichnis	215

10	Anhang	219
10.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	219
10.2	Stoffflussberechnungen	225
10.3	Vergleichende Proteomanalysen	235
10.4	MCA-Modell	245
11	Tabellenverzeichnis	247
12	Abbildungsverzeichnis	250

1 Einleitung

Die gezielte Verwendung von Mikroorganismen oder ihren Bestandteilen zur Herstellung gewünschter Produkte ist das Grundprinzip aller Bereiche der Biotechnologie. Im Lauf der Zeit wurden dabei unterschiedliche Ansätze für die Entwicklung biotechnologischer Prozesse zugänglich. Nach der ursprünglichen Verwendung von Wildtyp-Organismen wurden ihre zufällige genetische Veränderung mittels Mutagenese und die anschließende Charakterisierung der Auswirkungen auf die Eigenschaften der Stämme möglich (Rowlands, 1984). Heutzutage wird zusätzlich ein zunehmend gezieltes Vorgehen bei der Herstellung mikrobieller Produktionsstämme angestrebt. Bedingungen hierfür sind das stetig erweiterte Wissen über die Stoffwechselforgänge in Mikroorganismen und eine steigende Verfügbarkeit von Methoden für gerichtete genetische Veränderungen. Dies umfasst auch die Möglichkeit zum parallelen Deletieren und Einfügen mehrerer Gene (Cong *et al.*, 2013). Aufgrund der zahlreichen komplexen Ebenen der Regulation und Reaktion im mikrobiellen Stoffwechsel ist die Wahl der richtigen Angriffspunkte für die Optimierung aller Arten biotechnologischer Prozesse eine große Herausforderung (Stephanopoulos, 1999). Während die Verwendung Organismus-fremder Gene die Produktion nicht-natürlicher Produkte ermöglicht, sind klassische biotechnologische Produkte wie organische Säuren oder Aminosäuren Stoffwechselbestandteile des Produktionsorganismus. Für ihre Produktion ist eine Verstärkung oder Abschwächung natürlicher Stoffwechselwege ausreichend. Die entstehenden biotechnologischen Produkte sind bis heute von großem industriellem Interesse (D'Este *et al.*, 2017).

Die zelluläre Komplexität muss bei allen genetischen Veränderungen von Produktionsstämmen berücksichtigt werden. Dazu kommen häufig Stoffwechselmodelle zum Einsatz, die aber bis heute noch keine mechanistische mathematische Beschreibung eines gesamten Metabolismus ermöglichen (Bordbar *et al.*, 2014). Während stark vereinfachte, rein stöchiometrische Modelle einen Stoffwechsel genomweit beschreiben können, ist die kinetische Beschreibung aller Zusammenhänge nur in ausgewählten Teilmodellen möglich (King *et al.*, 2015).

Modelle mit steigendem Komplexitätsgrad leisten einen zunehmenden Beitrag zur Optimierung biotechnologischer Prozesse. Sie werden eingesetzt, um die in jedem Produktionsstamm und –prozess vorliegenden limitierenden Schritte zu identifizieren, die die Produktionskapazität begrenzen. Da diese spezifisch von den vorliegenden Prozessbedingungen abhängen, müssen die Daten zu ihrer Ermittlung möglichst direkt aus dem Produktionsprozess gewonnen werden. Dies geschieht durch sogenannte metabolische Analysen, die auf der Auslenkung eines metabolischen Fließgleichgewichtes beruhen (Antoniewicz, 2015). Eine mathematische Methode, die basierend auf diesen Analysen die Ermittlung von limitierenden Schritten im Metabolismus des Referenzzustandes erlaubt, ist die metabolische Kontrollanalyse (*metabolic control analysis* 'MCA) (Burns *et al.*, 1985).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Verwendung ganzer Zellen für mehrschrittige enzymatische Umsetzungen bietet verschiedene Vorteile, vor allem den Verzicht auf Proteinreinigung und die integrierte Bereitstellung von Redoxäquivalenten. Schwierigkeiten entstehen durch die Einbettung der für die Produktbildung nötigen Schritte in den Gesamtstoffwechsel. So wird aufgrund der metabolischen Aktivitäten der Zellen in der Regel nur ein kleiner Teil des Substrats in das gewünschte Produkt umgesetzt. Gleichzeitig treten durch die zahlreichen im Stoffwechsel vorhandenen Enzyme verschiedenste Nebenprodukte auf. Die Optimierung von Produktionsstämmen wird durch die komplexen Zusammenhänge zwischen diesen konkurrierenden Stoffwechselrouten zu einer großen Herausforderung (Kuhn *et al.*, 2010).

Die immer detailliertere Betrachtung von Stoffwechselforgängen leistet einen zunehmenden Beitrag, um dieser Herausforderung zu begegnen. Dazu werden Metabolom, Fluxom, Transkriptom und Proteom erfasst, also die Gesamtheit aller vorliegenden intrazellulären Metabolite, Stoffflüsse, RNA-Moleküle und Proteine. Die dadurch erzielte umfassende Beschreibung des zellulären Metabolismus macht vielfältige Zusammenhänge zwischen den Ebenen des Stoffwechsels und eine große Abhängigkeit von Umweltbedingungen offensichtlich. Daraus folgt, dass klassische *in vitro* gewonnene Daten der Enzymcharakterisierung für die Beschreibung von Ganzzell-Prozessen nur geringe Relevanz haben. Eine Nutzung dieser Daten als Grundlage für die Auswahl von Angriffspunkten zur Stammoptimierung ist somit nicht möglich (Chassagnole *et al.*, 2002). Stattdessen bedarf es detaillierter und möglichst umfassender Informationen über den metabolischen Zustand der Zellen unter definierten Prozessbedingungen. Diese können metabolische Analysen zugänglich machen, bei denen das Fließgleichgewicht der Stoffwechselforgänge in den Zellen ausgelenkt und die Reaktion darauf anhand von Metabolom und Fluxom analysiert wird. Im Fokus steht entweder die dynamische Messung der unmittelbaren Folge der Auslenkung oder ein im Anschluss neu ausgebildetes Fließgleichgewicht (Nöh *et al.*, 2007). In beiden Fällen sollte nach Möglichkeit der Prozessablauf durch die Auslenkung (Prozessbefragung) nicht gestört werden (Aboka *et al.*, 2006).

Dies kann durch eine räumliche Trennung von Prozess- und Analysenreaktor sichergestellt werden, wofür zum Beispiel Zellsuspension aus dem Produktionsreaktor in einen separaten Reaktor überführt wird über einen schnellen Wechsel des Mediums (*‘rapid media transition‘* RMT). Dabei können einzelne oder parallelisierte metabolische Analysen durchgeführt werden (Link *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2016). Auf diese Weise wird eine große Datenmenge zur Charakterisierung des Referenzzustandes zum Zeitpunkt der Entnahme von Zellsuspension aus dem Produktionsprozess gewonnen. Die Wahl der Substrate zur Auslenkung des Stoffwechsels, in den meisten Fällen unterschiedliche Kohlenstoffquellen, ist dabei von entscheidender Bedeutung. Um unmittelbar eine messbare

Auslenkung des Stoffwechsels zu bewirken, muss das jeweilige Substrat zur Auslenkung des Stoffwechsels von den Zellen spontan mit hoher Rate aufgenommen und verstoffwechselt werden. Da sich der Effekt der Auslenkung der Stoffwechselreaktionen mit zunehmendem Abstand zu ihrem Ursprung durch Verzweigungen im Stoffwechsel verringert, hat jede Auslenkung eine begrenzte Reichweite (Oldiges und Takors, 2005).

Die in metabolischen Analysen gewonnenen Daten zu intra- und extrazellulären Metabolitkonzentrationen müssen mithilfe theoretischer Stoffwechselmodelle ausgewertet werden. Neben der Abschätzung intrazellulärer Kohlenstoffflussverteilungen ist auf diese Weise auch eine thermodynamische Betrachtung des metabolischen Netzwerks möglich. Eine mathematische Methode, die auf Grundlage von Daten aus metabolischen Analysen die Ermittlung limitierender Schritte im Stoffwechsel erlaubt, ist die sogenannte metabolische Kontrollanalyse (*‘metabolic control analysis‘* MCA) (Burns *et al.*, 1985). Ein Vorteil dieser Methode ist die umfassende Betrachtung eines metabolischen Netzwerks, ohne auf die mechanistische Beschreibung einzelner Reaktionen angewiesen zu sein.

Ein Beispiel für mikrobielle Produktionsprozesse sind Verfahren zur Herstellung aromatischer Aminosäuren mit *Escherichia coli* (Sprenger, 2007). Diese umfassen die drei essentiellen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin, die in der Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie eine wichtige Rolle spielen. Für jede der Aminosäuren ist eine Vielzahl verschiedener Produktionsprozesse beschrieben, bei denen meistens Glucose als Kohlenstoffquelle zum Einsatz kommt und die zu maximalen Produktkonzentrationen von bis zu 50 g L^{-1} führen (Backman *et al.*, 1990). Die mikrobielle Herstellung von L-Phenylalanin wurde mehrfach auch ausgehend von Glycerin beschrieben, wobei eine deutlich niedrigere maximale Produktkonzentration von 22 g L^{-1} erreicht wurde (Weiner *et al.*, 2014b). Glycerin bietet gegenüber Glucose jedoch eine Reihe von Vorteilen als Kohlenstoffquelle für die Produktion von Aromaten, unter anderem einen erhöhten Reduktionsgrad (Sprenger, 2017). Um Gründe für die reduzierte Produktbildung ausgehend von Glycerin zu ermitteln und gezielte Ansätze für eine Verbesserung zu finden, wurde auf Basis des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses eine detaillierte Charakterisierung der Stoffwechselleistungen des Produktionsstammes im Prozess beschrieben. Dazu wurden parallelisierte metabolische Kurzzeitanalysen im Zulaufverfahren durchgeführt, welche die Berechnung von metabolischen Kontrollanalysen ermöglichten. Deren Ergebnisse zeigen Reaktionsschritte auf, die den Stofffluss zum Produkt L-Phenylalanin im Prozessverlauf kontrollieren, unter anderem eine gleichbleibende positive Kontrolle der Produktbildung über die Prozesszeit durch die Reaktionen des Glycerin-Metabolismus. Weiterhin weisen verschiedene energieliefernde Reaktionen der Glykolyse eine durchgehend positive Kontrolle auf. Besonders auffallend ist die Bedeutung der Reaktionen unter Beteiligung von Phosphoenolpyruvat (PEP) in Zentralstoffwechsel und Aromatenbiosynthese, die sich teilweise während des Prozesses ändern. Die Eingangsreaktion des Aromatenbiosyntheseweges, eine PEP-

verbrauchende Reaktion, übt nur bei hoher Produktbildung eine Kontrolle auf die Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges aus. Im Gegensatz dazu hält die kontrollierende Funktion der zweiten PEP-verbrauchenden Reaktion, die Umsetzung von Shikimat-3-Phosphat, über die Prozesszeit an. Dabei ändert sich im Zentralstoffwechsel die Kontrolle des PEP-verbrauchenden Enzyms Pyruvatkinase auf die Produktbildung von positiv zu negativ und der umgekehrte Fall tritt für die PEP-bildende Reaktion der Enolase auf. Die Arbeit bestätigt damit die wichtige Rolle der Bereitstellung von PEP für die Bildung von L-Phenylalanin, zuvor beschrieben bei Verwendung von Glucose (Oldiges *et al.*, 2004), auch für die Kohlenstoffquelle Glycerin.

Eine Möglichkeit, die Bedeutung einzelner Metabolite für biotechnologische Produktionsprozesse spezifisch zu hinterfragen, ist ihre Verwendung als Substrat zur gezielten Auslenkung des Stoffwechsels während metabolischer Analysen. Viele Moleküle von Interesse werden hierfür jedoch natürlicherweise mit einer zu geringen Rate von den Zellen aufgenommen. Dies gilt unter anderem für PEP, sodass es nicht als Substrat für die metabolische Analyse der L-Phenylalanin-Produktion verwendet werden kann. Ziel dieser Arbeit ist es, das Spektrum der für metabolische Analysen verfügbaren Substrate zu erweitern durch Produktionsstämme mit spezifischen Transportern. Diese werden vom Projektpartner an der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt und beruhen auf dem für Vorarbeiten verwendeten L-Phenylalanin-Produktionsstamm. Das Prozessverhalten von Produktionsstämmen mit Transporter muss charakterisiert und eine Strategie zur Verwendung der neuen Substrate während metabolischer Analysen etabliert werden.

Da die Biosynthese der drei aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan über einen weiten Teil identisch verläuft, sind auch die genetischen Eingriffe bei der Konstruktion von Produktionsstämmen für die drei Produkte ähnlich. Neben der Überexpression von Enzymen aus der Aromatenbiosynthese stehen Maßnahmen zur Umgehung regulatorischer Funktionen, beispielsweise der Rückkopplungsinhibition der Eingangsreaktion durch die Endprodukte, und eine optimierte Bereitstellung von Vorläufermetaboliten im Vordergrund (Berry, 1996). Die Biosynthese von L-Tryptophan ist dabei komplexer als die Bildung von L-Phenylalanin und L-Tyrosin aufgrund einer größeren Anzahl an biosynthetischen Schritten und Vorläufermetaboliten. Außerdem ist sie wegen der höheren energetischen Anforderungen sowie des seltenen Auftretens in Proteinen besonders streng reguliert. Aufgrund dessen wurde die Biosynthese von L-Tryptophan bereits mehrfach in rein theoretischen Arbeiten als Beispiel für Regulationsmodelle betrachtet (Schmid *et al.*, 2004), es sind jedoch nur wenige experimentelle Vorarbeiten zur Charakterisierung der Stoffwechselfvorgänge verfügbar.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit, Limitationen im Stoffwechsel während eines mikrobiellen L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit der Kohlenstoffquelle Glycerin aufzuzeigen und

Ansatzpunkte zur weiteren genetischen Stammverbesserung zu identifizieren. Dies geschieht datenbasiert anhand der Durchführung metabolischer Analysen während Zulaufprozessen mit *Escherichia coli*.

Da die mikrobielle Herstellung von L-Tryptophan bisher vor allem ausgehend von Glucose beschrieben ist, muss zunächst ein Referenzprozess mit Glycerin als Kohlenstoffquelle im Labormaßstab erarbeitet werden. Der Prozess soll im weiteren Verlauf als Grundlage für metabolische Analysen dienen, sodass ein ausreichendes Prozessvolumen und eine hohe Produktkonzentration sowie eine hohe biomassespezifische Produktbildungsrate wichtige Anforderungen sind.

Nach Identifikation eines geeigneten Prozesses ist der Vergleich mehrerer Produktionsstämme anhand des standardisierten Prozesses notwendig, um eine geeignete Kombination aus Prozess und rekombinantem Stamm für das weitere Vorgehen festzulegen. Der Vergleich von Stämmen mit jeweils einzelnen neuen genetischen Veränderungen ermöglicht es dabei, den Einfluss dieser Veränderungen auf das Prozessverhalten und die Produktbildung im Detail zu charakterisieren

Auf Grundlage einer ausgewählten Kombination aus Prozess und Produktionsstamm sind im Folgenden metabolische Kurzzeitanalysen zielführend. Sie erfolgen im Zeitraum bis zu 30 min nach Entnahme der Zellen aus dem Prozess und gewährleisten somit ein unverändertes Proteom (Link, 2009; Weiner *et al.*, 2017). Um Erkenntnisse über die Produktbildung zu gewinnen, sind eine ausreichende Biomassekonzentration und eine hohe spezifische Produktbildungsrate Bedingungen für den zu wählenden Prozesszeitpunkt. Basierend auf den Ergebnissen einer Analyse im Satzverfahren sollen geeignete Substrate ausgewählt werden, die von den Zellen unmittelbar mit hoher Aufnahmerate aufgenommen werden und bei ihrer Verstoffwechslung zu einer Auslenkung des metabolischen Fließgleichgewichtes führen. Weiterhin ist die Etablierung neuer metabolischer Fließgleichgewichte innerhalb weniger Minuten im Rahmen der Analyse notwendig. Die ermittelten extrazellulären Raten während der metabolischen Analyse sollen als Ausgangspunkt theoretischer intrazellulärer Stoffflussabschätzungen dienen, die gleichzeitig die Überprüfung der Auslenkung des Stoffwechsels erlauben.

Der nächste Schritt ist die Verwendung der ausgewählten Substrate zur Auslenkung des Stoffwechsels für metabolische Analysen im Zulaufverfahren. Auf diese Weise kann eine größere Anzahl metabolischer Fließgleichgewichte während der Kurzzeitanalyse erzielt werden, da im Rahmen einer einzelnen Kurzzeitanalyse die Zuführung der Substrate mit verschiedenen Zulaufraten möglich ist. Voraussetzung hierfür ist die sequentielle Einstellung metabolischer Fließgleichgewichte jeweils innerhalb weniger Minuten (Link, 2009; Weiner *et al.*, 2017). Somit wird die gewonnene Menge an Informationen über den metabolischen Zustand der Zellen erhöht. Besonders detaillierte Informationen können durch die zusätzliche Quantifizierung intrazellulärer Metabolite in jedem der Gleichgewichtszustände gewonnen werden.

Auf Basis der gewonnenen Metabolomdaten und der theoretisch abgeschätzten Stoffflussverteilungen in den unterschiedlichen metabolischen Gleichgewichtszuständen soll eine thermodynamische Analyse des Reaktionsnetzwerkes durchgeführt werden. Auf diese Weise werden Metabolitkonzentrationen validiert und Reaktionen bezüglich ihrer Nähe zum thermodynamischen Gleichgewicht klassifiziert.

Im Folgenden können Metabolom, Fluxom und thermodynamische Informationen gemeinsam zur Durchführung einer metabolischen Kontrollanalyse genutzt werden. Hierfür ist die Erstellung eines Modells, das alle enzymatischen Reaktionen der L-Tryptophan-Biosynthese umfasst, notwendig. Der erste Schritt der metabolischen Kontrollanalyse ist die Abschätzung von Elastizitäten, die die Flexibilität einzelner Reaktionen und somit den Zusammenhang zwischen Metabolit-Konzentrationen und Reaktionsraten beschreiben. Anschließend werden Kontrollkoeffizienten bestimmt, welche die Auswirkung von veränderten Enzymaktivitäten auf die vorhandenen Stoffflüsse darstellen. Sie gewährleisten die Identifikation limitierender und kontrollierender Reaktionsschritte im gesamten berücksichtigten Reaktionsnetzwerk. Das Ziel der Betrachtung ist dabei die Ermittlung von Stoffwechsel-Limitationen der L-Tryptophan-Produktion und darauffolgend die Ableitung von Ansatzpunkten für eine genetische Stammverbesserung.

Die einzelnen geplanten Arbeitsschritte sind im Folgenden nochmals zusammengefasst:

- Etablierung neuer Substrate zur Auslenkung des Stoffwechsels
 - Prozesscharakterisierung mit Transporterstämmen
 - Parallelisierte metabolische Analysen mit neuen Substraten
- Charakterisierung von *E. coli* Stämmen zur Produktion von L-Tryptophan aus Glycerin mit standardisierter Prozessführung im 15 L-Maßstab
- Parallelisierte metabolische Analyse im Satzverfahren
 - Auswahl von Substraten für Kurzzeitexperimente
 - Validierung der Einstellung von Fließgleichgewichten
- Parallelisierte metabolische Analysen im Zulaufverfahren
 - Gezielte Gleichgewichtsauslenkungen durch angepasste Zulaufprofile
 - Quantifizierung intrazellulärer Metabolite
 - Abschätzung intrazellulärer Kohlenstoffflüsse
- Thermodynamische Analyse des Reaktionsnetzwerkes
- Metabolische Kontrollanalyse
 - Definition des betrachteten Netzwerkes und Auswahl von Effektoren
 - Abschätzung von Elastizitäten
 - Ermittlung und Interpretation von Kontrollkoeffizienten

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen – *Escherichia coli*

Das fakultativ-anaerobe, gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zur Gruppe der stäbchenförmigen peritrich begeißelten Enterobakterien und wurde nach seinem Entdecker benannt, dem Kinderarzt Theodor Escherich. Natürlicherweise tritt *E. coli* im Intestinaltrakt von Säugetieren auf, wo es einen wichtigen Beitrag zu Verdauungsvorgängen und zur Immunabwehr leistet. Aufgrund dieses Habitats wird es häufig auch als Indikator für fäkale Verunreinigungen verwendet. In ihrem natürlichen Lebensraum sind die meisten *E. coli* Stämme keine Krankheitserreger, pathogene Stämme können jedoch zu Erkrankungen von Intestinal- und Urogenitaltrakt führen (Donnenberg, 2002).

Über kaum einen anderen Organismus wurden im Laufe der Zeit so viele Erkenntnisse gesammelt wie über *E. coli*, wodurch sich stets auch viele neue Fragestellungen ergeben (Adamczyk und Reed, 2017). Ein Grund für seine häufige Verwendung als Modellorganismus und Forschungsobjekt ist seine hohe Anpassungsfähigkeit an unterschiedlichste Umweltbedingungen, die die Handhabung im Labor einfach und vielseitig macht. Die Kultivierung von *E. coli* ist in komplexen und definierten Medien möglich, auf Agarplatten und in Flüssigkulturen sowie mit und ohne Sauerstoffzufuhr. Die langfristige Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen anhand dieses Organismus ermöglichte einen detaillierten Einblick in die Stoffwechselwege und die Mechanismen der Enzymregulation und Signaltransduktion (Kayser, 1999). *E. coli* gehört zu den ersten Organismen, deren Genom vollständig sequenziert wurde, und mittlerweile liegen die Genome verschiedenster Stämme vor (Blattner *et al.*, 1997; Perna *et al.*, 2002). Weitere vielfältige Informationen wurden beispielsweise anhand der gezielten einzelnen chromosomalen Deletion aller Gene des Organismus gewonnen (Baba *et al.*, 2006). Das detaillierte Wissen über *E. coli* ermöglichte die Entwicklung zahlreicher Methoden, die eine gerichtete genetische Veränderung des Organismus zugänglich machen. Somit ist *E. coli* beliebt für biotechnologische Anwendungen, wobei die genetischen Eingriffe sowohl eine verstärkte Produktion natürlicher Stoffwechselprodukte als auch die Herstellung Organismus-fremder Produkte ermöglichen können. Hierbei ist neben der Produktion kleiner Moleküle, zum Beispiel nicht-proteinogener Aminosäuren, die Bildung komplexer Strukturen in Form von Proteinen etabliert. Ein bekanntes historisches Beispiel für diese aus Aminosäuren aufgebauten Produkte ist Insulin (Ladisch und Kohlmann, 1992).

3.1.1 Transportprozesse

Jede *E. coli* Zelle umfasst einen durch zwei Membranen und eine dazwischen liegende Zellwand von der Umgebung getrennten Raum, in dem die biochemischen Prozesse des Metabolismus ablaufen. Zur Aufrechterhaltung dieser Prozesse und eines intrazellulären Milieus, das die nötigen physikalisch-

chemischen Bedingungen aufweist und auch unter sich ändernden extrazellulären Bedingungen beibehält, ist der ständige Austausch von Metaboliten verschiedener Größe sowie Ionen unterschiedlicher Ladung zwischen intra- und extrazellulärem Raum nötig (Sikkema *et al.*, 1995). Dies beinhaltet sowohl die spezifische Aufnahme gewünschter als auch das Ausschleusen unerwünschter Spezies. Beide Aspekte kommen auch bei der Entwicklung von Produktionsstämmen zum Einsatz, um die Substrataufnahme und die Abgabe des Produktes ins Medium zu optimieren (Burkovski und Kramer, 2002; Liu *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). Insgesamt müssen die Membranen eine selektive Permeabilität aufweisen, wobei die Membranen an sich kaum durchlässig für Ionen und die meisten polaren Moleküle mit Ausnahme von Wasser sind. Lipophile Moleküle passieren die Membranen hingegen diffusiv entlang des vorliegenden Konzentrationsgradienten. Für die spezifische Permeabilität gegenüber allen anderen Molekülen sind in der Phospholipid-Doppelstruktur der Membranen Proteine zur Bildung von Kanälen und Pumpen vorhanden, durch die aktive und passive Transportprozesse ermöglicht werden (Stryer *et al.*, 2007).

Passiver Transport erfolgt wie die Diffusion entlang des vorliegenden Konzentrationsgradienten zwischen intra- und extrazellulärem Raum, sodass prinzipiell ein Transport in beide Richtungen möglich ist. Da auf diese Weise Spezies transportiert werden, die nicht durch die Membran diffundieren können, wird dies auch als erleichterte Diffusion bezeichnet. Diese Art des Transports betrifft Ionen und kleine Moleküle wie beispielsweise Glycerin (Heller *et al.*, 1980; Stroud *et al.*, 2003). Durch spezifisch angepasste Interaktionen in einem Ionenkanal an mehreren Bindungsstellen ist der hochselektive schnelle Transport von Kalium-Ionen bei gleichzeitigem Ausschluss der kleineren Natrium-Ionen konserviert (Sauer *et al.*, 2013). Der Transport von Ionen ist auch für den Erhalt des Membranpotentials von großer Bedeutung.

Aktive Transportprozesse durch sogenannte Pumpen ermöglichen im Gegensatz dazu die Verschiebung von Ionen und Molekülen entgegen der durch den Konzentrationsgradienten vorgegebenen thermodynamischen Triebkraft. Anders als bei passiven Transportern muss also nicht nur die Überwindung der Membran ermöglicht, sondern auch die für den Transport nötige freie Energie bereitgestellt werden. Die erste Bedingung wird in der Regel durch eine Konformationsänderung der beteiligten Transporterproteine erfüllt, durch die das zu transportierende Molekül auf der einen Seite der Membran gebunden und auf der anderen Seite wieder freigesetzt wird. Für die Bereitstellung der Energie kann ein energiereiches Molekül in der Zelle gespalten werden, beispielsweise ATP. Im Fall der häufigen ABC („ATP binding cassette“)-Transporter ist diese Hydrolyse mit der oben genannten Konformationsänderung verknüpft (Moussatova *et al.*, 2008). Ein weiterer spezieller Fall dieser Transportmethode ist das Phosphotransferase-System (pts), das PEP zu Pyruvat umsetzt und gleichzeitig durch einen mehrschrittigen Phosphorylierungsmechanismus von

Glucose ihren Verbleib in der Zelle sicherstellt. Hier wird also der Transport mit einer chemischen Modifikation des transportierten Moleküls verbunden (Postma *et al.*, 1993).

Eine weitere Möglichkeit für die Bereitstellung der Energie für den Transport ist die Verwendung des Konzentrationsgradienten einer anderen Spezies. Eine thermodynamisch nicht-begünstigte Flussrichtung wird hierfür mit einem Transport entlang eines Gradienten kombiniert. Dies bedeutet, dass stets nicht nur das eigentliche Zielmolekül, sondern auch ein weiteres Ion oder Molekül transportiert wird. Aus diesem Grund werden die entsprechenden Transporter als sekundäre Transporter bezeichnet. Symporter transportieren dabei beide Spezies in dieselbe Richtung, Antiporter tauschen hingegen zwei Spezies gegeneinander aus (Yan, 2015). In *E. coli* erfolgt der Transport von Lactose in die Zellen durch den Symporter Lactose-Permease unter Nutzung des Protonengradienten (Abramson *et al.*, 2003). Ein Beispiel für einen Antiporter ist der Zuckerphosphat-Transporter uhpT, der den elektroneutralen Austausch von Glucose-6-Phosphat und Phosphat ermöglicht (Ambudkar *et al.*, 1990). Für diesen Transporter ist ein starker Einfluss von Mutationen im Transmembransegment auf die Substratspezifität beschrieben. So führt der Austausch einer einzelnen Aminosäure innerhalb einer Salzbrücke zu einer Verschiebung der Selektivität zu Phosphoenolpyruvat (Hall *et al.*, 1999; Hall und Maloney, 2001).

3.1.2 Kohlenstoffmetabolismus

Die für diese Arbeit relevanten Bereiche des Kohlenstoffmetabolismus von *E. coli* umfassen den Zentralstoffwechsel mit Glykolyse, Gluconeogenese, Citratzyklus und Pentose-Phosphat-Weg sowie die Stoffwechselwege für die Aufnahme von Glycerin und die Bildung der aromatischen Aminosäuren. Hinzu kommen die Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung und Synthesewege für Nebenprodukte. Alle beteiligten Enzyme und Metabolite sind in Abbildung 3.1 dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Soweit nicht anders angegeben, stammen die Informationen aus allgemeiner Biochemie-Literatur (Stryer *et al.*, 2007), der *E. coli* Datenbank EcoCyc (Keseler *et al.*, 2017) oder dem genomweiten *E. coli* Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007).

Glykolyse und Gluconeogenese

Die Glykolyse tritt als hochkonservierter Stoffwechsel in der Mehrheit aller Organismen auf. Ziel der Glykolyse ist die Umwandlung eines Glucose-Moleküls in zwei Moleküle Pyruvat (PYR) bei gleichzeitiger Bildung von zwei Molekülen ATP. Dies macht die Glykolyse zu einem wichtigen Bestandteil des Energiestoffwechsels. Glucose als Ausgangspunkt der Glykolyse wird über das Phosphotransferasesystem (pts) in die Zellen transportiert und gleichzeitig phosphoryliert, wobei Phosphoenolpyruvat (PEP) die Phosphatgruppe liefert und somit zu PYR umgewandelt wird (Liao *et al.*, 1996). Da das entstehende Glucose-6-Phosphat (G6P) kein Substrat für den Transporter ist, ist der Rückfluss unterbunden und der Verbleib in der Zelle sichergestellt.

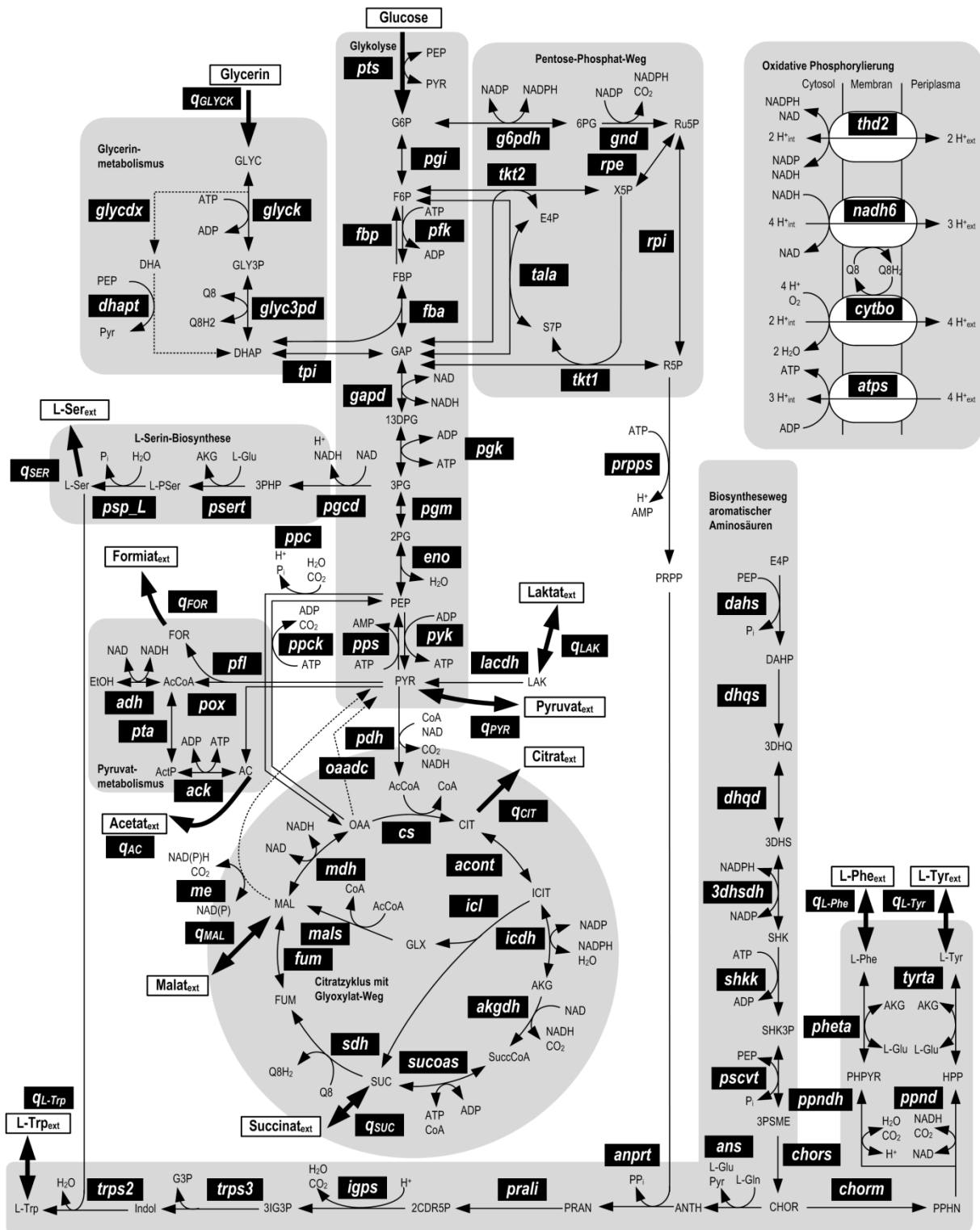


Abbildung 3.1: Vereinfachter Kohlenstoffmetabolismus von *E. coli* mit Zentralstoffwechsel aus Glykolyse, Gluconeogenese, Citratzyklus und Pentose-Phosphat-Weg sowie mit Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren und oxidativer Phosphorylierung. Die Abkürzungen der Enzyme sind dem genomweiten *E. coli* Modell *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) entnommen. Die Pfeilrichtungen geben Reaktionsrichtungen an, Doppelpfeile symbolisieren reversible Reaktionen.

Es folgt als nächster Schritt eine Isomerisierung zu Fructose-6-Phosphat (F6P) durch die Phosphoglucose-Isomerase (pgi) und sogleich eine weitere irreversible Phosphorylierung mit der Phosphofruktokinase (pfk) als Katalysator, bei der ATP verbraucht und Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) gebildet wird. FBP wird durch die Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (fba) in die Triosen Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gespalten. Da die weiteren Schritte der Glykolyse von GAP ausgehen, ist die Isomerisierung von DHAP zu GAP durch die Triosephosphat-Isomerase (tpi) notwendig, um den gesamten Kohlenstoff weiter verwerten zu können. Dies erfolgt zunächst durch die Umsetzung von GAP - zwei Moleküle pro ursprünglichem Molekül Glucose - zu 1,3-Bisphosphoglycerat (13DPG) von der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (gapd). Dabei wird NAD zu NADH umgewandelt. Der hohe Energiegehalt von 13DPG ermöglicht im nächsten Schritt die Phosphorylierung von ADP zu ATP. Dieser Schritt umfasst außerdem die Bildung von 3-Phosphoglycerat (3PG) und wird von der Phosphoglycerat-Kinase (pgk) katalysiert. Darauf folgen eine weitere Isomerisierung zu 2-Phosphoglycerat (2PG) durch die Phosphoglycerat-Mutase (pgm) und anschließend eine Dehydrierung zu PEP durch die Enolase (eno). Im letzten Schritt der Glykolyse erfolgt eine irreversible Umwandlung von PEP zu PYR. Bei dieser Reaktion, die von der Pyruvat-Kinase (pyk) katalysiert wird, wird ein weiteres Molekül ADP phosphoryliert und somit ATP gewonnen. Abhängig von den vorliegenden Bedingungen ist eine unterschiedliche folgende Verstoffwechslung von PYR möglich, die im weiteren Verlauf des Kapitels erläutert wird.

Bei Verwendung anderer Kohlenstoffquellen als Glucose müssen die Reaktionen der Glykolyse ganz oder teilweise in umgekehrter Richtung ablaufen, um beispielsweise den Zugang zum Pentose-Phosphat-Weg oder der L-Serin-Biosynthese zu ermöglichen. Dies wird als Gluconeogenese bezeichnet. Dabei erfolgt die Umsetzung von FBP zu F6P durch die Fructose-Bisphosphatase (fbp) und die Umwandlung von PYR zu PEP durch die PEP-Synthase (pps). Alle weiteren Reaktionen der Glykolyse sind reversibel, sodass die Umkehrung keine zusätzlichen Enzyme benötigt.

Citratzyklus und Glyoxylat-Bypass

Im Fall einer aeroben Kultivierung von *E. coli* wird PYR im Citratzyklus weiter verstoffwechselt. Dies ermöglicht eine vollständige Oxidierung und die maximale Ausbeute an ATP. Der erste Schritt hierzu ist die irreversible oxidative Decarboxylierung von PYR durch die Pyruvat-Dehydrogenase (pdh) unter Bildung von Acetyl-CoenzymA (AcCoA), NADH und CO₂, die die Verbindung zwischen Glykolyse und Citratzyklus herstellt. Die erste Reaktion im Zyklus selbst wird durch die Citrat-Synthase (cs) katalysiert und ist die Kondensation von AcCoA und Oxalacetat (OAA) zu Citrat (CIT), wobei CoA freigesetzt wird. Es folgen eine Isomerisierung von CIT zu Isocitrat (ICIT) durch die Aconitase (acon) sowie zwei weitere Decarboxylierungs-Schritte, bei denen durch die Enzyme Isocitrat-Dehydrogenase (icdh) und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (akgdh) in Folge α -Ketoglutarat (AKG) und Succinyl-CoA (SuccCoA) gebildet werden. Letzteres wird von der Succinyl-CoA-

Synthase (sucos) unter Bildung von ATP zu Succinat (SUC) umgesetzt. Es folgt eine Umwandlung von SUC zu Fumarat (FUM) durch die Succinat-Dehydrogenase (sdh), bei der außerdem energiereiches $Q8H_2$ aus Q8 gewonnen wird. Der nächste Schritt ist die Hydrierung von FUM zu Malat (MAL) durch die Fumarase (fum), worauf eine Oxidation des MAL zu OAA folgt, die durch die Malat-Dehydrogenase (mdh) katalysiert wird und den Zyklus schließt. Eine alternative Verwendung von MAL ist die Umsetzung zu PYR durch das Malat-Enzym (me) mit NAD oder NADP als Co-Substrat, abhängig vom Isoenzym (Sauer und Eikmanns, 2005). Die Citrat-Zyklus-Metabolite OAA, SuccCoA und AKG sind wichtige Vorläufer für verschiedene Biosynthesewege, sodass sie auch außerhalb des Zyklus verstoffwechselt werden. Für einen ständigen Ablauf des Zyklus ist somit das Auffüllen dieser Metabolite nötig. Dies geschieht durch die sogenannten anaplerotischen Reaktionen. Hier sind die Decarboxylierung von PEP zu OAA durch die PEP-Carboxylase (ppc), die umgekehrte Umsetzung von OAA zu PEP durch die PEP-Carboxykinase (ppck) (Sauer und Eikmanns, 2005) und die Umwandlung von OAA zu PYR durch die Oxalacetat-Decarboxylase (oaadc) (Kornberg und Sadler, 1961) zu nennen. Diese Reaktionen ermöglichen zudem das Wachstum auf Kohlenstoffquellen wie Succinat und Malat.

Eine Variante des Citrat-Zyklus ist der Glyoxylat-Zyklus. Dabei werden die decarboxylierenden Reaktionen des Citrat-Zyklus umgangen und ein zusätzliches AcCoA verbraucht, wodurch das Wachstum ausgehend von beispielsweise Acetat oder Pyruvat möglich wird. Dazu wird ICIT durch die Isocitrat-Lyase (icl) in SUC und Glyoxylat (GLX) gespalten, welches dann durch die Malat-Synthase (mals) unter AcCoA-Verbrauch zu MAL umgewandelt wird. MAL und SUC durchlaufen im Anschluss die weiteren oben genannten Reaktionen des Citratzyklus.

Oxidative Phosphorylierung und Energiestoffwechsel

Die Bildung von ATP durch den Transfer von Elektronen von NADH oder $FADH_2$ auf O_2 unter Bildung von H_2O wird oxidative Phosphorylierung genannt und läuft unter aeroben Bedingungen ab. Dabei dient ein Protonen-Gradient an der Cytoplasma-Membran als treibende Kraft. Die Protonenpumpen NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (nadh6), NAD-Transhydrogenase (thd2) und Cytochrom-Terminal-Oxidase (cytbo3) halten den Gradienten aufrecht und übertragen die Elektronen auf den Sauerstoff. Der Gradient wird von der ATP-Synthase (atps) für die Bildung von ATP aus ADP genutzt. Dabei fließen die Protonen zurück ins Periplasma.

Aufgrund der großen Bedeutung der Konzentrationen der Energieäquivalente AMP, ADP und ATP in einer Zelle werden sie zur Bewertung des metabolischen Zustandes herangezogen. Dazu wird der sogenannte *energy charge* berechnet (Chapman *et al.*, 1971), der in Gleichung 3.1 gegeben ist.

$$EC = \frac{1}{2} \frac{[ATP] + [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \quad 3.1$$

Bei Wachstum liegt der *energy charge* oberhalb 0,8. Vitale nicht-wachsende Zellen weisen Werte zwischen 0,8 und 0,5 auf, bei niedrigeren Werten des *energy charge* sterben die Zellen ab.

Lactat-Metabolismus

Wird Lactat (LAK) als Substrat in die Zellen aufgenommen, erfolgt in einem Schritt die Umwandlung zu PYR durch die Lactat-Dehydrogenase (lacdh). Ausgehend von dort können Reaktionen des Citratzyklus und der Gluconeogenese ablaufen. Außerdem kann LAK auch als extrazelluläres Nebenprodukt auftreten.

Pyruvat-Metabolismus

Unter sauerstofflimitierten oder anaeroben Bedingungen ist PYR der Ausgangspunkt der gemischten Säuregärung. Hierbei entstehen die Produkte Acetat (AC), Formiat (FOR) und Ethanol (EtOH), deren Bildung auf verschiedenen Wegen möglich ist. Die Pyruvat-Formiat-Lyase (pfl) wandelt PYR unter Verbrauch von CoA in FOR und AcCoA um. Die weitere Umsetzung von AcCoA kann durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase (adh) erfolgen, wobei NADH verbraucht und EtOH gebildet wird. Eine Alternative sind zwei weitere enzymatische Schritte durch die Phosphat-Acetyl-Transferase (pta) und die Acetat-Kinase (ack), wobei zunächst Acetyl-Phosphat (ActP) und dann AC und ATP entstehen. Eine Alternative ist eine direkte Umsetzung von PYR zu AC durch eine Decarboxylierung, die durch die Pyruvat-Oxidase (pox) katalysiert wird.

Glycerin-Metabolismus

Im Gegensatz zu Glucose ist für Glycerin (GLYC) eine diffusive Aufnahme in die Zelle möglich, die zudem durch die Permease GlpF („*glycerol facilitator*“) erleichtert werden kann (Heller *et al.*, 1980). Der weitere Stoffwechselweg hängt davon ab, ob aerobe oder anaerobe Bedingungen vorliegen. Im anaeroben Fall folgt eine Umsetzung zu Dihydroxyaceton (DHA) durch die Glycerin-Dehydrogenase (glycdx) und anschließend eine Phosphorylierung zu DHAP, wobei die Phosphatgruppe von einem PEP übertragen und somit PYR gebildet wird. Dies wird von der Dihydroxyaceton-Phosphat-Transferase (dhapt) katalysiert. Im Gegensatz dazu wird unter aeroben Bedingungen DHAP über Glycerin-3-Phosphat (GLY3P) gewonnen. Dieses wird aus GLYC unter Verbrauch von ATP von der Glycerin-Kinase (glyk) gebildet und dann von der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (glyc3pd) umgesetzt. In beiden Fällen bildet DHAP den Ausgangspunkt für glykolytische und gluconeogenetische Reaktionen.

Pentose-Phosphat-Weg

Der Pentose-Phosphat-Weg ist unterteilt in einen oxidativen Teil, der der Bereitstellung von NADPH dient, und einen nicht-oxidativen Teil, in dem Zuckermoleküle mit unterschiedlicher

Kohlenstoffanzahl ineinander umgewandelt werden. Beide Teile sind miteinander verknüpft und haben Metabolite aus dem oberen Bereich der Glykolyse als Ausgangspunkt. Zum oxidativen Teil gehören die Umsetzung von G6P zu 6-Phosphogluconat (6PG) durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (g6pdh) und die folgende Reaktion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (gnd), bei der durch eine Decarboxylierung irreversibel Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) entsteht. Bei diesen beiden Reaktionen wird jeweils ein Molekül NADPH gebildet. Die weitere Verstoffwechslung von Ru5P erfolgt im nicht-oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges durch zwei verschiedene enzymatische Umsetzungen: Die Bildung von Xylose-5-Phosphat (X5P) durch die Ribulose-5-Phosphat-Epimerase (rpe) oder die Bildung von Ribose-5-Phosphat (R5P) durch die Ribulose-5-Phosphat-Isomerase (rpi). Weiterhin laufen mehrere Reaktionen ab, bei denen C₂-Körper zwischen Zuckermolekülen übertragen werden. Somit entstehen katalysiert durch die Transketolase aus den Substraten X5P und R5P die Produkte GAP und Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P) oder aus X5P und Erythrose-4-Phosphat (E4P) F6P und GAP (tkt1 und tkt2). Hier werden die zahlreichen Verknüpfungen zwischen Pentose-Phosphat-Weg und Glykolyse deutlich. Dies gilt auch für die Umsetzung von GAP und S7P zu E4P und F6P durch die Transaldolase (tala).

Eine weitere mögliche Verwendung von R5P ist die Umwandlung in das aktivierte Molekül Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) durch die Übertragung einer Pyrophosphat-Gruppe von ATP durch die Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase (prpps). PRPP wird in verschiedenen Stoffwechselwegen verbraucht, darunter Aminosäure- und Purin-Biosynthese.

L-Serin-Biosynthese

Den Ausgangspunkt der dreischrittigen L-Serin-Biosynthese bildet der Glykolyse-Metabolit 3PG. Zunächst erfolgt eine Umsetzung zu 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP) durch die D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (pgcd) unter Verbrauch von NAD. Anschließend überträgt die 3-Phosphoserin-Aminotransferase (psert) eine Aminogruppe von L-Glutamat (L-Glu) auf 3PHP, wodurch AKG und 3-Phospho-L-Serin (L-PSer) entstehen. Für diese Reaktion wird Pyridoxal-5-Phosphat als Cofaktor benötigt, gleichzeitig ist das Enzym nötig für die Biosynthese von Pyridoxal-5-Phosphat. Zur Bildung der nicht-essentiellen Aminosäure L-Serin (L-Ser) ist noch eine Dephosphorylierung von L-PSer durch die Phosphoserin-Phosphatase (psp_L) nötig. Neben der direkten Verwendung zum Aufbau von Proteinen dient L-Ser als Vorläufer der Aminosäuren L-Tryptophan, L-Glycin und L-Cystein sowie für Phospholipide, sodass bei Wachstum eine große Menge L-Ser gebildet wird. Der wichtigste Mechanismus zur Regulation dieser Biosynthese ist eine Rückkopplungsinhibierung der pgcd durch das Endprodukt L-Ser. Außerdem kann L-Ser als Quelle für C1-Einheiten dienen, die in verschiedenen anabolischen Vorgängen verbraucht werden (Gu *et al.*, 2014). Für den Abbau von L-Ser zu Pyruvat und Ammonium sind drei verschiedene L-Serin-Deaminasen vorhanden, von denen zwei nur in Abwesenheit von Glucose exprimiert werden und

somit den Zugang zu L-Ser als Kohlenstoffquelle ermöglichen. Die Aufnahme von extrazellulärem L-Ser kann dabei durch einen Protonen-Symporter erfolgen.

Biosynthese der aromatischen Aminosäuren

Die drei aromatischen proteinogenen Aminosäuren sind L-Phenylalanin (L-Phe), L-Tyrosin (L-Tyr) und L-Tryptophan (L-Trp). Der allgemeine Teil der Aromatenbiosynthese ist für alle drei Aminosäuren identisch, bevor sich die Stoffwechselwege aufteilen. Im ersten Schritt des allgemeinen Teils erfolgt eine Kondensation von E4P aus dem Pentose-Phosphat-Weg und PEP aus der Glykolyse zu 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP). Für diese Reaktion sind drei Isoenzyme der DAHP-Synthase (dahs) zuständig, deren Rückkopplungsinhibierung durch jeweils eines der drei Endprodukte L-Phe, L-Tyr und L-Trp wichtig für die Regulation des Stoffwechsels ist. Die 3-Dehydroquinat-Synthase (dhqs) oxidiert und zyklisiert DAHP zu 3-Dehydroquinat (3DHQ), das im Anschluss von der 3-Dehydroquinat-Dehydratase (dhqd) zu 3-Dehydroshikimat (3DHS) dehydriert wird. Bei der folgenden Umsetzung zu Shikimat (SHK) durch die 3-Dehydroshikimat-Dehydrogenase (3dhsdh) wird NADPH verbraucht. Die anschließende Phosphorylierung zu Shikimat-3-Phosphat (SHK3P) unter ATP-Verbrauch wird von der Shikimat-Kinase (shkk) katalysiert. Die beiden letzten Schritte des allgemeinen Teils der Aromatenbiosynthese sind die Bildung von 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat (3PSME) aus SHK3P und einem zweiten Molekül PEP durch die 3-Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyl-Transferase (pscvt) und die Umsetzung von 3PSME zu Chorismat (CHOR). Hierfür findet eine Dephosphorylierung durch die Chorismat-Synthase (chors) statt. CHOR ist der erste Verzweigungspunkt der Biosynthesewege der aromatischen Aminosäuren.

Für die Biosynthese von L-Tyr und L-Phe wird CHOR zunächst zu Prephenat (PPHN) umgesetzt. Dies erfolgt durch die Chorismat-Mutase (chorm) und bildet den letzten gemeinsamen Schritt der Biosynthese von L-Tyr und L-Phe. Für die Bildung von L-Tyr ist eine oxidative Decarboxylierung von PPHN zu 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) durch die Prephenat-Dehydrogenase (ppnd) und die anschließende Transaminierung zu L-Tyr durch die Tyrosin-Transaminase (tyrta) nötig. Die Aminogruppe wird dabei von L-Glu übertragen, sodass AKG entsteht. Der Unterschied in der Bildung von L-Phe und L-Tyr ist der erste der jeweils zwei Schritte, der bei L-Phe eine Dehydrierung und Decarboxylierung durch die Prephenat-Dehydratase (ppndh) darstellt. Dabei entsteht Phenylpyruvat (PHPYR), welches dann analog zur L-Tyr-Biosynthese durch eine Transaminierung zu L-Phe umgesetzt wird. Das zuständige Enzym ist die Phenylalanin-Transaminase (pheta). Zwischen den Endprodukten L-Phe und L-Tyr und dem jeweils ersten spezifischen Schritt der Biosynthese bestehen inhibierende Rückkopplungsschleifen.

Eine solche Rückkopplungsschleife existiert auch zwischen der dritten aromatischen Aminosäure L-Trp und dem ersten Schritt ihres spezifischen Biosyntheseweges. Dieser beginnt bei CHOR, und der

erste Schritt ist die Bildung von Anthranilat (ANTH) durch die Anthranilat-Synthase (ans) bei gleichzeitiger Umsetzung von L-Glutamin (L-Gln) zu L-Glu und Bildung von PYR. Bei der folgenden Umsetzung von ANTH zu N-5-Phosphoribosyl-Anthranilat (PRAN) wird von der Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase (anprt) eine Verknüpfung zu PRPP hergestellt, wobei das Pyrophosphat abgespalten wird. Die Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase (prali) ermöglicht die folgende Umwandlung zu 1-o-Carboxyphenylamino-1-deoxyribulose-5-Phosphat (2CDR5P), das im nächsten Schritt von der Indol-3-Glycerin-Phosphat-Synthase (igps) dehydratisiert und decarboxyliert wird. Dies ermöglicht den Ringschluss zu Indol-3-Glycerin-Phosphat (3IG3P). Die noch folgenden letzten beiden Schritte der L-Trp-Biosynthese laufen in einem Enzymkomplex ab. Dieser umfasst die Reaktion der Indol-Glycerin-Phosphat-Aldolase (trps3), bei der durch Abspaltung von GAP aus 3IG3P Indol entsteht, und die finale Umsetzung von Indol zu L-Trp unter Verbrauch von L-Serin durch die Tryptophan-Synthase (trps2). Für die Biosynthese von L-Trp liegt ein vielschichtiges Regulationsnetzwerk vor, das in Kapitel 3.1.3 erläutert wird.

3.1.3 Produktion aromatischer Aminosäuren mit *Escherichia coli*

Die proteinogenen aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan sind natürliche Stoffwechselprodukte von *E. coli*, deren Strukturformeln in Abbildung 3.2 dargestellt sind. Das industrielle Interesse an diesen Produkten begründet sich durch ihre Verwendung in Nahrungsmittel-, Futter- und Pharmaindustrie. Da alle drei aromatischen Aminosäuren essentielle Aminosäuren sind, werden sie als Nahrungs- und Futterergänzungsmittel eingesetzt (Leuchtenberger *et al.*, 2005). Bei L-Phenylalanin kommt ein großer Bedarf durch den Einsatz als Grundstoff des Süßstoffes Aspartam hinzu (Sprenger, 2007; Liu *et al.*, 2013), wodurch sich eine Produktionsmenge von über 38.000 t pro Jahr ergibt (Sprenger, 2006). L-Tryptophan findet weitere Verwendung in der Pharmaindustrie entweder direkt als Schlafmittel und Antidepressivum oder als Vorstufe von Hormonen wie Serotonin (Ikeda, 2006; Panichkin *et al.*, 2016). Für L-Tryptophan ist ein steigendes Marktvolumen von über 14.000 t pro Jahr beschrieben (Rodriguez *et al.*, 2014). L-Tyrosin dient als Ausgangspunkt der Synthese verschiedener Sekundärmetabolite und Medikamente (Kim *et al.*, 2018).

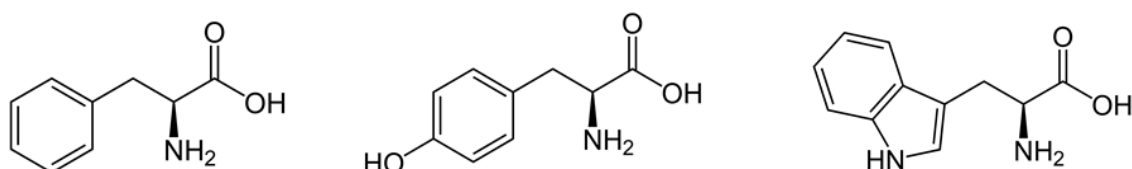


Abbildung 3.2: Strukturformeln der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (links), L-Tyrosin (Mitte) und L-Tryptophan (rechts).

Da die Aminosäuren natürlicherweise im Stoffwechsel von *E. coli* auftreten, beruht die biotechnologische Produktion dieser Stoffe auf der Verstärkung und Anpassung bestehender Stoffwechselwege (Sprenger, 2007). Dabei werden in der Regel verschiedene der unten genannten

genetischen Veränderungen kombiniert. Ein weiterer verbreiteter Organismus zur Produktion aromatischer und anderer Aminosäuren ist *Corynebacterium glutamicum* (Ikeda, 2006; D'Este *et al.*, 2017).

Der teilweise identische Biosyntheseweg der drei aromatischen Aminosäuren führt dazu, dass einige genetische Eingriffe während der Stammentwicklung von Produktionsstämmen für die drei Produkte gleichermaßen zum Einsatz kommen. Ein wichtiger Knotenpunkt für die Produktion aller aromatischen Aminosäuren ist die Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese, die durch die DAHP-Synthase katalysiert wird (siehe Abbildung 3.1). Von diesem Enzym liegen drei Isoformen vor, die von den Genen *aroFGH* codiert werden. Jedes der drei Enzyme wird von einem der aromatischen Endprodukte inhibiert: *aroF* durch L-Tyrosin (Schoner und Herrmann, 1976), *aroG* durch L-Phenylalanin (McCandliss *et al.*, 1978) und *aroH* durch L-Tryptophan. Dabei ist eine Konzentration von 0,1 mM ausreichend für einen stark inhibierenden Effekt (Sprenger, 2007). Die Anteile der drei Enzyme liegen bei 20 %, 80 % und 1 % (Ikeda, 2006), sodass die Verwendung rückkopplungsresistenter Enzymvarianten für die Produktion der drei Aromaten von unterschiedlicher Bedeutung ist (Tribe und Pittard, 1979; Choi und Tribe, 1982; Park und Rogers, 1985; Berry, 1996; Gerigk *et al.*, 2002a; Báez-Viveros *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2011). Hierbei können auch entstehende aromatische Nebenprodukte eine große Rolle spielen (Forberg und Haggstrom, 1988). Weitere Rückkopplungsinhibierungen, die für eine Überproduktion umgangen werden können, sind für alle drei aromatischen Aminosäuren im jeweils ersten für dieses Produkt spezifischen Schritt vorhanden (Tribe und Pittard, 1979; Aiba *et al.*, 1982; Berry, 1996; Sprenger, 2007; Zhou *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2012). Außerdem sind Überexpressionen von Genen des allgemeinen Teils der Aromatenbiosynthese ein übliches Mittel zur Verbesserung des Kohlenstoffflusses zu den gewünschten Produkten. Hierbei werden in der Regel Gene gewählt, deren zugehöriger enzymatischer Schritt zuvor als limitierend identifiziert wurde (Backman *et al.*, 1990; Oldiges *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2016).

Die enge Verknüpfung der drei Stoffwechselwege führt zur Möglichkeit, die Bildung des jeweils gewünschten Produktes durch Deletion von Genen der anderen Stoffwechselwege zu verbessern, indem die konkurrierenden Nebenprodukte verhindert werden (Tribe und Pittard, 1979; Zhao *et al.*, 2011). Den entstehenden auxotrophen Stämmen müssen in der Folge jedoch die entsprechenden Aminosäuren zur Verfügung gestellt werden, um Biomasse bilden zu können (Backman *et al.*, 1990; Gerigk *et al.*, 2002a; Sprenger, 2007). Weiterhin ist die Verbesserung der Produktbildung auch durch die Reduzierung von Nebenprodukten aus dem Zentralstoffwechsel beschrieben (Konstantinov *et al.*, 1991; Dodge und Gerstner, 2002), wobei vor allem ein Zusammenhang zwischen der Bildung von L-Tryptophan und Acetat genannt wird. Diesem kann genetisch oder prozesstechnisch begegnet

werden (Cheng *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016a; Lu *et al.*, 2017; Jing *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018b).

Auch im Zentralstoffwechsel finden sich zahlreiche Angriffspunkte für genetische Eingriffe, die eng mit der Aromatenbiosynthese verknüpft sind. Im Fokus stehen dabei Reaktionen, die mit der Verfügbarkeit der nötigen Vorläufermoleküle zusammenhängen (Dodge und Gerstner, 2002; Ikeda, 2006). In allen Fällen ist dabei von großer Bedeutung, dass die Veränderungen im Zentralstoffwechsel nicht zu einem Ungleichgewicht im Stoffwechsel führen, welche dann allgemein inhibierende Effekte haben (Berry, 1996; Ikeda, 2006). Für alle aromatischen Aminosäuren gleichermaßen notwendig sind jeweils ein Molekül Erythrose-4-Phosphat (E4P) aus dem Pentose-Phosphat-Weg und zwei Moleküle Phosphoenolpyruvat (PEP) aus der Glykolyse. Eine verbesserte Verfügbarkeit kann entweder mittels einer erhöhten Bildung des Moleküls oder eines reduzierten Verbrauchs durch konkurrierende Reaktionen erreicht werden. Konkret wird dies durch die Verstärkung der Transketolase im Pentose-Phosphat-Weg für E4P erzielt (Berry, 1996; Báez-Viveros *et al.*, 2007; Yakandawala *et al.*, 2008; Gottlieb *et al.*, 2014), im Fall von PEP ist beispielsweise die Deletion der PEP-abbauenden Pyruvatkinase (Berry, 1996; Weiner *et al.*, 2014c; Liu *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018b) oder die Anpassung des Expressionsniveaus der PEP-Synthase (Berry, 1996; Shen *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015) beschrieben. Aufgrund der zentralen Bedeutung von PEP ist auch ein Eingriff über globale Regulationsfaktoren wie *csrA* (Tatarko und Romeo, 2001; Yakandawala *et al.*, 2008) oder *fruR* (Liu *et al.*, 2016b) möglich.

Bei Verwendung der üblichen Kohlenstoffquelle Glucose stellt ihre Aufnahme über das *pts* einen großen Verbraucher von PEP dar (Berry, 1996; Chen *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2017). Dies kann durch den Einsatz anderer Glucose-Transporter (Báez-Viveros *et al.*, 2004; Báez-Viveros *et al.*, 2007) oder einer alternativen Kohlenstoffquelle wie Glycerin umgangen werden. Glycerin bietet durch eine gute und günstige Verfügbarkeit sowie durch einen höheren Reduktionsgrad κ im Vergleich zu Glucose (Glycerin: $\kappa = 4,67$; Glucose: $\kappa = 4,00$) weitere Vorteile (Yazdani und Gonzalez, 2007), die mehrfach für die Produktion von L-Phenylalanin beschrieben sind (Khamduang *et al.*, 2009; Thongchuang *et al.*, 2012; Gottlieb *et al.*, 2014; Weiner *et al.*, 2014b; Sprenger, 2017).

Für die Produktion von L-Tryptophan sind PRPP, L-Glutamin und L-Serin (Dodge und Gerstner, 2002; Gu *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012) als zusätzliche Vorläufermoleküle nötig, deren Verfügbarkeit jedoch seltener durch genetische Veränderungen beeinflusst wird. Eine Limitierung durch die Bereitstellung von L-Glutamin wird vermutet (Chen und Zeng, 2017). Da PRPP ebenfalls ein Metabolit aus dem Pentose-Phosphat-Weg ist, kann eine Konkurrenzsituation mit E4P entstehen. Im Biosyntheseweg der Aminosäure L-Serin ist wiederum eine Rückkopplungsinhibierung der Eingangsreaktion beschrieben, die bei einer angestrebten Überproduktion zur Limitierung der L-Tryptophan-Bildung durch diesen Vorläufer führen kann. L-Serin-abbauende Reaktionen stellen weitere Ansatzpunkte für eine erhöhte Verfügbarkeit dar (Ikeda *et al.*, 1994; Panichkin *et al.*, 2016).

Die in *E. coli* vorhandenen Transporter für die Aufnahme und für den Export von Aminosäuren bilden weitere mögliche Ziele für genetische Eingriffe zur Produktionsverbesserung. Dies soll die Abgabe des Produkts in das Medium durch Überexpression von Exportern optimieren (Liu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2018) und die Wiederaufnahme des gebildeten Produkts durch Deletion von Importern verhindern (Zhao *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2013). Beides kann hohe intrazelluläre Konzentration vermeiden, wodurch toxische und regulatorische Effekte reduziert werden. Weiterhin können Transporter auch dazu dienen, die Aufnahme des verwendeten Substrates zu erhöhen und auf diese Weise mehr Kohlenstoff für die Produktbildung zur Verfügung zu stellen (Thongchuang *et al.*, 2012).

Da die Herstellung der Aminosäure L-Tryptophan von den Zellen viel Energie und weitere Ressourcen benötigt, ist ihre Produktion natürlicherweise auf mehreren Ebenen besonders streng reguliert (Yanofsky, 2003; Panichkin *et al.*, 2016; Niu *et al.*, 2018). Oben bereits erwähnt sind die Rückkopplungsinhibierungen auf Enzym-Ebene, die die Eingangsreaktionen in die allgemeine Aromatenbiosynthese und in den L-Tryptophan-Stoffwechsel betreffen. Dies wird ergänzt durch Regulationsmechanismen auf transkriptioneller und translationeller Ebene. Dabei führt eine hohe intrazelluläre L-Tryptophan-Konzentration zu einer Schleifenbildung der entsprechenden mRNA, die die Transkription und Translation abschwächt. Weiterhin wirkt L-Tryptophan als Co-Repressor des vollständigen *trp*-Operons (*trpLEDCBA*) durch die Aktivierung des Repressors TrpR. Deletionen der dafür zuständigen Gene *trpL* und *trpR* sind häufige Maßnahmen bei der Stammentwicklung von L-Tryptophan-Produzenten (Aiba *et al.*, 1980; Azuma *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 2012; Jing *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018b). Da L-Tryptophan von *E. coli* zu Pyruvat und Ammonium abgebaut und somit als Kohlenstoffquelle zur Bildung von Biomasse genutzt werden kann (Fildes, 1956), ist auch die Deletion des entsprechenden Gens (*tnaA*) wichtig für die Herstellung von Produktionsstämmen (Aiba *et al.*, 1982; Dodge und Gerstner, 2002; Zhao *et al.*, 2015). Aufgrund des längeren spezifischen Stoffwechselweges für L-Tryptophan im Vergleich zu L-Phenylalanin und L-Tyrosin bietet sich eine größere Vielfalt genetischer Angriffspunkte. Häufig ist die Amplifizierung des vollständigen *trp* Operons beschrieben, entweder im Genom oder auf Plasmiden (Nagahari *et al.*, 1977; Tribe und Pittard, 1979; Berry, 1996; Chan *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2018b; Jing *et al.*, 2018). Erst kürzlich wurde eine vorwärtsgekoppelte Inhibierung der *igps* innerhalb des Stoffwechsels durch Anthranilat beschrieben, die durch Verwendung eines heterologen Gens umgangen wurde (Chen *et al.*, 2018a).

Für jede der drei aromatischen Aminosäuren sind zahlreiche Produktionsprozesse beschrieben. Dabei wird meistens Glucose als Kohlenstoff verwendet, und die Stämme tragen eine Kombination mehrerer der oben erläuterten genetischen Veränderungen. Bei Zulaufverfahren in unterschiedlichen Maßstäben werden für L-Tryptophan hohe Produktkonzentrationen von beispielsweise 35 g L^{-1} (Wang *et al.*,

2013) oder 40 g L^{-1} (Shen *et al.*, 2012) erzielt. Der Einfluss allgemeiner Prozessgrößen wie pH (Cheng *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2017) oder Gelöstsauerstoffkonzentration (Wang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2015; Jing *et al.*, 2018) wurde für die L-Tryptophan Produktion charakterisiert. Weiterhin ist eine große Auswirkung der gewählten Zulaufstrategie auf die Produktkonzentration beschrieben (Dodge und Gerstner, 2002). Auch für die Produktion von L-Phenylalanin mit der Kohlenstoffquelle Glucose wurden hohe Produktkonzentrationen bis zu 50 g L^{-1} erreicht (Backman *et al.*, 1990), für L-Tyrosin sind maximale Konzentrationen um 40 g L^{-1} beschrieben (Kim *et al.*, 2018). Zulaufprozesse zur Produktion von L-Phenylalanin ausgehend von Glycerin sind etabliert, erreichen jedoch geringere maximale Produktkonzentrationen von 22 g L^{-1} (Weiner *et al.*, 2014b). Spezielle Ansätze zur Produktion aromatischer Aminosäuren umfassen eine integrierte Reaktivextraktion von L-Phenylalanin (Gerigk *et al.*, 2002b; Ruffer *et al.*, 2004), einen kontinuierlichen Prozess zur Herstellung von L-Tryptophan aus den direkten Vorläufern Indol und L-Serin mit ruhenden Zellen (Bang *et al.*, 1983) und L-Tryptophan-Produktion mit Produktkristallisation im Reaktor (Azuma *et al.*, 1993). Auf diese Weise ergeben sich rechnerisch höhere Produktkonzentrationen, die jedoch nicht mit den Ergebnissen eines üblichen Zulaufprozesses vergleichbar sind.

3.2 Bioprozesstechnik

Für die Kultivierung von Mikroorganismen im Labor sind verschiedene Techniken etabliert, mit deren Hilfe Einfluss auf das Verhalten von Mikroorganismen und Prozessen genommen wird. Die hierfür notwendigen biologischen Grundlagen und die in dieser Arbeit verwendeten Techniken werden im Folgenden erläutert.

3.2.1 Phasen mikrobiellen Wachstums

Die verschiedenen Phasen mikrobiellen Wachstums treten im Verlauf eines Satzprozesses deutlich auf und sind in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt (Monod, 1949). Dabei liegen unlimitierte, aber begrenzte Wachstumsbedingungen vor. Nach dem Überführen von Zellen in frisches Medium findet in der Verzögerungsphase (I) zunächst eine Anpassung an die neuen Umweltbedingungen statt. Währenddessen wird noch keine neue Biomasse gebildet, sodass eine konstante Biotrockenmassekonzentration vorliegt. In der Übergangsphase (II) setzt das Wachstum ein und ist während der exponentiellen Wachstumsphase (III) maximal. Eine Reduzierung der Wachstumsrate erfolgt in der Limitierungsphase (IV). Ausschlaggebende Faktoren für die Limitierung können der Verbrauch des Substrates, die Akkumulation toxischer Stoffe oder das Erreichen einer kritischen Zellkonzentration sein. In der folgenden stationären Phase (V) ist die Biomassekonzentration konstant, da Wachstums- und Sterberate ausgeglichen sind. Die Sterberate überwiegt in der anschließenden Absterbephase (VI), während der die Konzentration der Biomasse abnimmt.

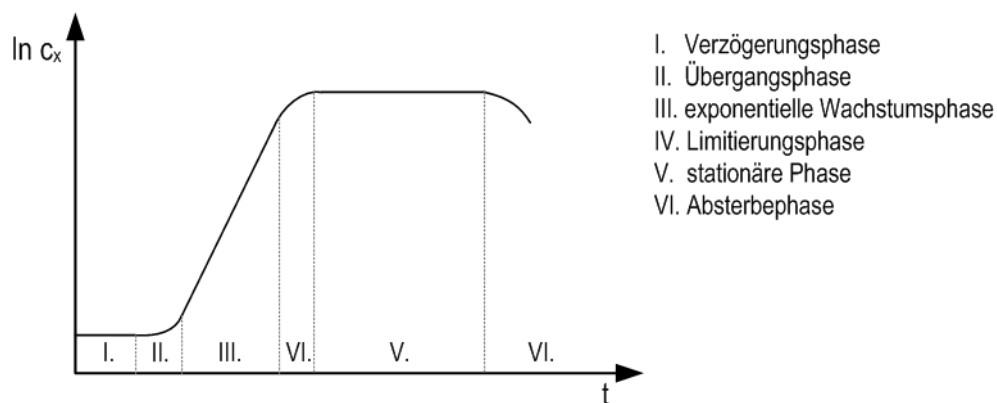


Abbildung 3.3: Phasen mikrobiellen Wachstums während eines Satzprozesses. Schematische Darstellung des Verlaufs der logarithmisch aufgetragenen Biomassekonzentration über die Zeit.

Die einfache kinetische Beschreibung des Wachstums ist anhand eines unstrukturierten unsegregierten Modells möglich. Die Zellen werden dabei als nicht-unterteilte Einheiten mit identischen Eigenschaften betrachtet. Dies führt zu einer Wachstumsrate r_x , die den Verlauf der Biomassekonzentration c_x über die Zeit t beschreibt. Unter unlimitierten Bedingungen ergibt sich ein proportionaler Zusammenhang:

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad 3.2$$

mit	r_X	Wachstumsrate	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
	c_X	Biomassekonzentration	g L^{-1}
	t	Zeit	h
	μ	spezifische Wachstumsrate	h^{-1}

Daraus folgt die Definition der spezifischen Wachstumsrate μ :

$$\mu \equiv \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad 3.3$$

Durch Integration ist die Beschreibung der exponentiellen Wachstumskinetik möglich:

$$c_X = c_X^0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad 3.4$$

mit c_X^0 initiale Biomassekonzentration g L^{-1}

Analog zur Definition der spezifischen Wachstumsrate werden auch die Aufnahme- oder Bildungsrate aller anderen Komponenten i anhand der zeitlichen Änderung ihrer Konzentration beschrieben.

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

Aus den ermittelten Raten können Ausbeutekoeffizienten berechnet werden, indem die Raten ins Verhältnis gesetzt werden. $Y_{i/j}$ beschreibt den Ausbeutekoeffizienten der Komponente i bezüglich der Komponente j .

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

Ein Beispiel ist der Biomasseausbeutekoeffizient, der sich aus den Konzentrationsänderungen von Biomasse und Substrat ergibt.

3.2.2 Satzbetrieb von Bioreaktoren

Bei biotechnologischen Anwendungen werden zumeist Rührkesselreaktoren verwendet. Für die mathematische Beschreibung als idealen Reaktor wird von einer vollständigen Durchmischung ausgegangen, und es werden räumlich konstante Bedingungen bezüglich Temperatur, Druck, Konzentrationen und Reaktionsbedingungen angenommen. Mit diesen Annahmen lässt sich die allgemeine Stoffbilanz des idealen Rührkesselreaktors mit der folgenden Gleichung beschreiben (Schügerl, 1985):

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} - F_{aus} \cdot c_{i,aus} + r_i \cdot V_R \quad 3.7$$

mit	F_{ein}	Zulaufstrom	$L \cdot h^{-1}$
	F_{aus}	Ablaufstrom	$L \cdot h^{-1}$
	c_i	Konzentration von i im Reaktor	$g \cdot L^{-1}$
	$c_{i,ein}$	Konzentration von i im Zulauf	$g \cdot L^{-1}$
	$c_{i,aus}$	Konzentration von i im Ablauf	$g \cdot L^{-1}$
	r_i	Reaktionsgeschwindigkeit von i	$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$
	V_R	Volumen des Reaktionsansatzes	L

Ein Satzprozess stellt die einfachste Möglichkeit der Kultivierung in einem Rührkesselreaktor dar. Dazu wird zu Prozessbeginn das Medium mit allen Komponenten vorgelegt, während des Prozesses erfolgt lediglich bei Bedarf die Zugabe von Titrationsmitteln. Die zu Beginn hohe Substratkonzentration kann zur Bildung von Nebenprodukten und Inhibitionen führen. Durch das Wegfallen von Zu- und Ablauf sowie das konstante Volumen V_R vereinfacht sich Gleichung 3.7 für die Beschreibung von Satzprozessen zu:

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad 3.8$$

3.2.3 Zulaufbetrieb von Bioreaktoren

Beim Betrieb eines Rührkesselreaktors im Zulaufverfahren wird dem Reaktor über die Prozesszeit kontinuierlich Medium zugeführt, das neben einer Kohlenstoffquelle auch weitere Nährstoffe, wie Stickstoffquellen oder Spurenelemente, enthalten kann. Auf diese Weise kann der Prozess substratlimitiert durchgeführt werden, wodurch keine Substratüberschuss-Inhibitionen auftreten und der Prozess einfacher zu kontrollieren ist. Im Vergleich zu Satzprozessen können so längere Prozesszeiten und höhere Biomasse- sowie Produktkonzentrationen erreicht werden. Da in diesem Fall ein Zulauf, aber kein Ablauf vorliegt, wird Gleichung 3.7 angepasst zu:

$$\frac{d(V_R \cdot c_i)}{dt} = F_{ein} \cdot c_{i,ein} + r_i \cdot V_R \quad 3.9$$

Die stetige Zufuhr von Medium führt zu einer Erhöhung des Volumens des Reaktionsansatzes V_R um F_{ein} , wodurch c_i und V_R zu zeitlich variablen Prozessgrößen werden. Die Beschreibung der Konzentrationsänderung einer Komponente i über die Zeit ergibt sich somit durch folgende Gleichung:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F_{ein}}{V_R} \cdot (c_{i,ein} - c_i) + r_i \quad 3.10$$

Bei einem substratlimitierten Zulaufverfahren wird eine limitierende Substratkonzentration im Reaktor angestrebt, die sich über die Prozessdauer nicht ändert ($dc/dt = 0$). Für den Zulaufvolumenstrom F_{ein} folgt damit:

$$F_{ein} = \frac{-V_R \cdot r_S}{c_{S,ein} - c_S} \quad \text{mit} \quad -r_S = q_S \cdot c_X \quad 3.11$$

wobei q_S die biomassespezifische Substrataufnahmerate darstellt.

Mithilfe der Biomasseausbeute $Y_{X/S}$ und unter Vernachlässigung des Erhaltungstoffwechsels lässt sich Gleichung 3.11 ausdrücken als:

$$F_{ein} = \frac{V_R \cdot c_X}{(c_{S,ein} - c_S) \cdot Y_{X/S}} \cdot \mu_{soll} \quad 3.12$$

mit μ_{soll} angestrebte Wachstumsrate h^{-1}

Die Zeitabhängigkeit der Biomassekonzentration kann durch Gleichung 3.4 berücksichtigt werden, sodass sich für die Zeitabhängigkeit des Zulaufstroms ergibt:

$$F_{ein}(t) = \frac{V_R^0 \cdot c_X^0 \cdot \mu_{soll}}{(c_{S,ein} - c_S) \cdot Y_{X/S}} \cdot e^{\mu_{soll} \cdot t} \quad 3.13$$

mit V_R^0 initiales Reaktorvolumen L

Jenzsch *et al.* (2006) beschreiben, dass mit der exponentiellen Substratzufuhr (Gleichung 3.13) in einem Zulaufverfahren das Erzielen einer gewünschten Wachstumsrate unterhalb der maximalen möglich ist (μ_{soll}). Dazu muss das Wachstum allein durch das Substrat S limitiert sein, und es dürfen keine inhibierenden Stoffe vorliegen.

3.2.4 Bestimmung biomassespezifischer Prozessraten

Die Abschätzung von Reaktionsraten erfolgt ausgehend von Konzentrationsänderungen im Bioprozess. Bei vorliegendem metabolischem Fließgleichgewicht können experimentelle Daten durch eine Regressionsanalyse linearisiert werden. Im Fall von kurzen Beobachtungszeiträumen kann die Beschreibung außerdem anhand gemittelter Biomassekonzentrationen \bar{c}_X erfolgen, da eine entsprechende Konzentrationsänderung nicht auflösbar ist (Link, 2009). Somit folgt aus Gleichung 3.5:

$$c_i(t) = c_i^0 + q_i \cdot \bar{c}_X \cdot t \quad 3.14$$

Zusätzlich ermöglichen die Analyse der Zusammensetzung des Abgases aus dem Bioreaktor und eine Bilanzierung gegenüber der Zusammensetzung des zugeführten Gasstroms die Ermittlung von Aufnahme- und Bildungsraten gasförmiger Stoffe. Bei aeroben Kultivierungen sind die wichtigsten

dieser Raten die Sauerstoffaufnahme OUR (*oxygen uptake rate*) und die Kohlenstoffdioxidbildungsrate CPR (*CO₂ production rate*). Ausgangspunkt der Bilanzierung ist der Sauerstoffeintrag ins Medium OTR (*oxygen transfer rate*):

$$OTR = \frac{\dot{V}_{Gas}^{ein} \cdot x_{O_2}^{ein} - \dot{V}_{Gas}^{aus} \cdot x_{O_2}^{aus}}{V_R \cdot V_M} \quad 3.15$$

mit	\dot{V}_{Gas}^{ein}	Gasvolumenstrom im Einlass	$L h^{-1}$
	\dot{V}_{Gas}^{aus}	Gasvolumenstrom im Auslass	$L h^{-1}$
	$x_{O_2}^{ein}$	Molanteil Sauerstoff im Einlass	-
	$x_{O_2}^{aus}$	Molanteil Sauerstoff im Auslass	-
	V_M	ideales molares Gasvolumen	$22,414 L mol^{-1}$

Der Eingangsvolumenstrom und die Bilanzierung der inerten Gasanteile erlauben die Beschreibung des Ausgangsvolumenstroms:

$$\dot{V}_{Gas}^{ein} \cdot x_{Inert}^{ein} = \dot{V}_{Gas}^{aus} \cdot x_{Inert}^{aus} \quad \text{mit} \quad x_{Inert} + x_{O_2} + x_{CO_2} = 1 \quad 3.16$$

Dies lässt sich umformen zu:

$$\dot{V}_{Gas}^{ein} \cdot \kappa = \dot{V}_{Gas}^{aus} \quad \text{mit} \quad \kappa = \frac{1 - x_{O_2}^{ein} - x_{CO_2}^{ein}}{1 - x_{O_2}^{aus} - x_{CO_2}^{aus}} \quad 3.17$$

Mit der Annahme $OUR=OTR$ folgt für die Sauerstoffaufnahme:

$$OUR = \frac{\dot{V}_{Gas}^{ein}}{V_R \cdot V_M} \cdot (x_{O_2}^{ein} - \kappa \cdot x_{O_2}^{aus}) \quad 3.18$$

und analog für die Kohlenstoffdioxidbildungsrate:

$$CPR = \frac{\dot{V}_{Gas}^{ein}}{V_R \cdot V_M} \cdot (\kappa \cdot x_{CO_2}^{aus} - x_{CO_2}^{ein}) \quad 3.19$$

Biomassespezifische Raten ergeben sich aus der Division von OUR und CPR (3.18 und 3.19) durch die jeweils vorliegenden Biomassekonzentrationen (Link, 2009). Der Respirationskoeffizient (RQ) gibt das Verhältnis von gebildetem CO_2 zu verbrauchtem O_2 an und berechnet sich durch Division des CPR durch den OUR .

3.3 Metabolische Analysen

Die Gewinnung von genetisch veränderten Mikroorganismen für biotechnologische Produktionsprozesse kann durch zwei unterschiedliche Ansätze erfolgen. Die ursprünglichen Methoden sind dabei durch die sogenannte Zufallsmutagenese beschrieben. Diese beruht auf der zufälligen Mutation der Erbinformation, beispielsweise durch UV-Strahlung, und anschließender Selektion von Stämmen mit den gewünschten Eigenschaften. Das mehrfache Durchlaufen von Zyklen aus Mutagenese und Selektion ermöglicht in vielen Fällen die Auswahl von Stämmen mit verbesserten Produktionseigenschaften. Ein häufiger Nachteil dieser Methode ist das parallele Auftreten von unerwünschten zusätzlichen Mutationen, die die Produktbildung einschränken, Nebenproduktbildung fördern oder generell nachteilige Auswirkungen auf das Stammverhalten haben können, zum Beispiel ein verlangsamtes Wachstum (Foster *et al.*, 1982).

Die Kombination aus einem stets zunehmenden Wissen über die im Stoffwechsel ablaufenden Vorgänge und einer immer größeren Auswahl an Werkzeugen für spezifische genetische Eingriffe erlaubt heutzutage als zweite Methode eine hochrationale Stammentwicklung auf Grundlage gezielter genetischer Veränderungen (Stephanopoulos, 1999; Woolston *et al.*, 2013). Um die richtigen Angriffspunkte für die genetischen Eingriffe zu definieren und die Eignung eines so entwickelten Stammes für einen Bioprozess zu evaluieren, sind detaillierte Informationen über die metabolischen Vorgänge nötig (Feist *et al.*, 2010; Adamczyk und Reed, 2017). Eine prozessnahe Generierung der metabolischen Informationen ist dabei wünschenswert, da beispielsweise Enzym-Eigenschaften, die *in vitro* ermittelt wurden, nicht mit denen während eines biotechnologischen Prozesses übereinstimmen müssen (Blank und Ebert, 2013; Davidi und Milo, 2017). Um den Zugang zu solchen Informationen zu ermöglichen, wurde eine Vielzahl an Methoden entwickelt, die unter dem Begriff „Metabolische Analysen“ zusammengefasst werden (Weiner *et al.*, 2016). Die Mehrheit der Methoden beruht dabei auf der Auslenkung eines vorliegenden metabolischen Fließgleichgewichtes durch die plötzliche Änderung einer Substratverfügbarkeit und der Beobachtung der resultierenden Reaktion der Zellen. Eine Auswahl verschiedener Methoden soll im folgenden Kapitel beschrieben werden.

3.3.1 Stationäre metabolische Analysen

Bei stationären metabolischen Analysen werden verschiedene metabolische Fließgleichgewichte ausgehend von einem Referenzzustand durch Auslenkung desselbigen erzeugt und charakterisiert. Hierzu sind andauernde Auslenkungen des Fließgleichgewichtes nötig. Als Referenzzustand wird üblicherweise ein kontinuierlicher oder halb-kontinuierlicher Zulaufprozess eingesetzt. Die Auslenkung beruht auf der Änderung der Substrate oder der Substratverfügbarkeit (Nasution *et al.*, 2008; Link *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2017). Zur Charakterisierung der neuen Gleichgewichte werden extra- und intrazelluläre Konzentrationen ermittelt und als Grundlage einer detaillierten

Datenauswertung, auch basierend auf theoretischen Stoffwechselmodellen, genutzt. Da die Gleichgewichtseinstellung im Zeitraum von Minuten erfolgt, ist eine hochfrequente Probenahme zur Datengewinnung nicht notwendig (Link *et al.*, 2010). Für die Vergleichbarkeit der Daten zwischen Referenzzustand und ausgelenktem Zustand ist es erforderlich, dass ein unverändertes Proteom der Zellen über die Dauer der Analysen vorliegt. Für *E. coli* konnte dies für eine Dauer von 30 min gezeigt werden (Link *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2017). Um den Referenzprozess möglichst unbeeinflusst von den metabolischen Analysen zu lassen, wird diese Art der metabolischen Analyse häufig in einem separaten Analysenreaktor durchgeführt (Aboka *et al.*, 2006). Dieser kann mit dem Prozessreaktor verbunden sein, sodass eine direkte Überführung der Zellen aus dem Prozess in die Analyse möglich ist. Ein Beispiel für solch einen Analysenaufbau ist der *Biocurve* Reaktor. Bei diesem Reaktortyp, der auf einem Rohrreaktor beruht, wird eine Gleichgewichtseinstellung durch eine starke Rückvermischung möglich (Aboka *et al.*, 2006).

Eine Alternative für eine stationäre Analyse ist die Überführung der Zellen in einen separaten Reaktor mit einem schnellen Wechsel des Mediums (RMT, ‚*rapid media transition*‘) (Link *et al.*, 2010). Da Prozess- und Analysenreaktor unabhängig voneinander betrieben werden, ist hierfür die Verwendung von Standard-Laborausstattung ausreichend. Im Falle eines über einen langen Zeitraum stationären Referenzprozesses ist die sequentielle Durchführung mehrerer Analysen möglich (Link *et al.*, 2010). Bei instationären Prozessbedingungen sind gleichzeitige Analysen in einem parallelisierten Reaktorsystem für die Erhebung einer großen Informationsmenge notwendig (Weiner *et al.*, 2016). In diesem Fall ermöglicht eine sequentielle Durchführung mehrerer parallelisierter Analysen den Vergleich des metabolischen Zustandes der Zellen zu verschiedenen Prozesszeitpunkten. Auf diese Weise können Änderungen der Produktionseigenschaften während eines industriellen Prozesses charakterisiert werden (Weiner *et al.*, 2017).

3.3.2 Dynamische metabolische Analysen

Im Unterschied zur stationären Analyse ist bei einer dynamischen metabolischen Analyse gerade der Zeitraum unmittelbar nach Auslenkung des Stoffwechsels vor der Rückkehr zum Ausgangszustand oder dem Ausbilden eines neuen Gleichgewichtes von Interesse. Dieser oft kurze Zeitraum macht eine hohe Frequenz an Probenahmen notwendig, um die dynamischen Vorgänge zeitlich auflösen zu können. Auf diese Weise wird die Ermittlung von *in vivo* Enzymkinetiken möglich (Oldiges und Takors, 2005; Magnus *et al.*, 2006). Die Auslenkung des Stoffwechsels wird auch hierbei durch eine plötzliche Änderung der Umweltbedingungen, am häufigsten der Substratverfügbarkeit oder des Substrates an sich, verursacht. Da keine neue Gleichgewichtseinstellung für die Analyse nötig ist, erfolgt die Auslenkung durch eine kurzzeitige Änderung in Form eines Pulses (Visser *et al.*, 2004; Nasution *et al.*, 2006; Mashego *et al.*, 2007b). Der zu analysierende Referenzzustand ist häufig ein kontinuierlicher Zulaufprozess, und die metabolische Analyse wird direkt im Prozessreaktor

durchgeführt (Wu *et al.*, 2006; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2011). Dadurch ergibt sich jedoch eine Störung des Prozesses, die mitunter nur die Durchführung einer einzelnen Analyse pro Prozess erlaubt (Aboka *et al.*, 2006). Auch für dynamische Analysen sind aus diesem Grund Anwendungen mit einem separaten Reaktor beschrieben, der jedoch in aller Regel direkt mit dem Prozessreaktor verbunden ist. Ein Beispiel ist der *Bioscope* Reaktor, ein mit einem Produktionsreaktor verbundener Rohrreaktor. Am Einlass wird hierbei durch Zugabe von Substrat die Auslenkung erzielt. Probenahmen an verschiedenen Positionen erlauben die zeitliche Verfolgung der dynamischen Reaktion. Die Verwendung dieses Systems wurde für die Analyse von Prozessen mit verschiedenen Organismen gezeigt (Visser *et al.*, 2004; Mashego *et al.*, 2006; Nasution *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2009).

Bei der Durchführung stationärer und dynamischer metabolischer Analysen ist gleichermaßen zu berücksichtigen, dass ein hoher Informationsgewinn nur für den Teil des Stoffwechsels möglich ist, der durch die verwendeten Substrate ausgelenkt wird. Dafür ist zunächst eine ausreichend hohe Aufnahme des Substrates durch die Zellen nötig, sodass vor allem natürliche Kohlenstoffquellen in Betracht kommen (Oldiges und Takors, 2005). Da sich die Auslenkung bei jeder Verzweigung im Stoffwechsel verteilt, nimmt die Störung mit zunehmendem Abstand zum Signal ab (Schmitz *et al.*, 2002). Somit ist eine Auslenkung von Stoffwechselbereichen abseits des Zentralmetabolismus nur begrenzt möglich. Oldiges *et al.* (2004) beschreiben die Verfolgbarkeit eines Glucosepulses bis zur fünften Reaktion des Aromatenbiosyntheseweges innerhalb von 30 Sekunden nach dem Puls.

3.3.3 ¹³C-basierte metabolische Analysen

Vollständig oder teilweise ¹³C-markierte Substanzen können sowohl bei stationären als auch bei dynamischen metabolischen Analysen als Markierungssubstrat zum Einsatz kommen. Sie ermöglichen eine präzise Verfolgung des Stoffflusses ausgehend der Auslenkung durch den Stoffwechsel anhand der Markierungsmuster der auftretenden Metabolite (Wiechert, 2001). Der höhere Informationsgehalt macht komplexere spezielle Methoden zur Quantifizierung von Metaboliten und zur theoretischen Datenauswertung nötig (Quek *et al.*, 2009). Wird eine stationäre neue Verteilung der Markierungsmuster angestrebt, muss das markierte Substrat über einen langen Zeitraum zur Verfügung gestellt werden, wodurch die Methodik sehr kostspielig wird (Wiechert und Nöh, 2013). Die langfristig entstehenden Markierungsmuster der Aminosäuren in Proteinen lassen jedoch Rückschlüsse auf Flussverteilungen im Zentralstoffwechsel ohne direkte Messungen zu (Zamboni *et al.*, 2009). Auf diese Weise wurden die ersten Markierungsexperimente analysiert. Da die Zellen nicht zwischen verschiedenen Isotopen unterscheiden, ermöglicht der Einsatz markierter Substrate einen detaillierten Einblick in Stoffflussverteilungen, ohne den Metabolismus für die Zellen merklich auszulenkten. Dazu wird abrupt von einem ¹²C-Substrat auf ein ganz oder teilweise ¹³C-markiertes Substrat gewechselt. Die Analyse der zellulären Reaktion auf eine solche Auslenkung benötigt eine besonders hochfrequente Probenahme und sensitive spezifische Analysemethoden (Antoniewicz *et al.*,

2007; Noack *et al.*, 2011). Für die Datenauswertung solcher instationären Markierungsexperimente sind komplexe mathematische Modelle mit mehrdimensionalen Differentialgleichungen (Nöh *et al.*, 2007) sowie spezielle Datenbanken notwendig (Cho *et al.*, 2014).

Da nur wenige Substanzen zu relativ erschwinglichen Preisen isotopenmarkiert erhältlich sind, beschränkt sich die Anwendung dieser Methoden vor allem auf verschiedene Formen von Glucose. Dies gilt in speziellem Maße für spezifische Markierungen einzelner Positionen. Der Einsatz unterschiedlich markierter Substanzen in parallelen Ansätzen ermöglicht einen besonders detaillierten Einblick in den Stoffwechsel (Crown und Antoniewicz, 2013).

3.4 Quantifizierung intrazellulärer Metabolite

Das Metabolom, also die Gesamtheit aller vorliegenden Metabolite (< 1500 Da), ist die Ebene des Stoffwechsels, auf der die direkteste zelluläre Reaktion auf die Änderung von Umweltbedingungen erfolgt (Bergdahl *et al.*, 2012). Dabei können sich Metabolitkonzentrationen in Sekundenbruchteilen ändern (Goodacre *et al.*, 2004). Für die Verfolgung aller metabolischen Vorgänge, die in kurzem zeitlichem Rahmen ablaufen, ist die möglichst umfassende Quantifizierung intrazellulärer Metabolite daher von entscheidender Bedeutung. Dies betrifft unter anderem alle in Kapitel 3.3 aufgeführten Methoden zur metabolischen Analyse.

Mehrere Gegebenheiten machen die intrazelluläre Metabolitquantifizierung zu einer großen analytischen Herausforderung. Der beschriebene Stoffwechsel von *E. coli* umfasst ~2700 Metabolite (Keseler *et al.*, 2017), die zu unterschiedlichsten Stoffgruppen gehören und somit stark variierende physikalisch-chemische Eigenschaften bezüglich Masse, Polarität, Ladung und Stabilität aufweisen (Wu *et al.*, 2005). Zusätzlich laufen enzymatische Reaktionen, die die Metabolite ineinander umwandeln, mitunter sehr schnell (mM s^{-1}) im Bereich von Millisekunden ab (van Gulik, 2010). Eine weitere Herausforderung entsteht durch die Konzentrationsbereiche, in denen die Metabolite vorliegen, und die mehrere Größenordnungen zwischen pico- und millimolar abdecken (Dunn *et al.*, 2005). Diese Unterschiede in allen Bereichen und die schnelle Umsetzung machen spezifische Methoden für die Aufarbeitung der Proben und die anschließende Analytik notwendig. Eine ideale Methode sollte die Erfassung aller Metabolite in einer Messung erlauben, dies ist jedoch bisher bei weitem nicht erreicht (Mashego *et al.*, 2007a; Büscher *et al.*, 2009; Noack und Wiechert, 2014; Marcellin und Nielsen, 2018). Verschiedene Ansätze, um diesem Ziel möglichst nahe zu kommen, sind im folgenden Kapitel dargestellt, wobei in allen Fällen eine starke gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Schritte auftritt (van Gulik *et al.*, 2013).

3.4.1 Probenaufarbeitung – Inaktivierung und Extraktion der Zellen

Das Ziel der intrazellulären Metabolitquantifizierung ist die Aufnahme eines metabolischen Schnappschusses, der den aktuellen Zustand der Zellen abbildet. Das schnelle Ablaufen enzymatischer Umsetzungen erfordert hierfür eine unmittelbare vollständige Inaktivierung aller zellulären Vorgänge zum Zeitpunkt der Probenahme (de Koning und van Dam, 1992). Dazu werden die Zellen schlagartig Bedingungen ausgesetzt, die weitere metabolische Aktivitäten verhindern. In den meisten Fällen sind dies extreme Temperaturen, wobei sowohl Kälte als auch Hitze möglich sind, oder extreme pHs (Mashego *et al.*, 2007a). Eine häufige Methode ist feines Dispergieren von Zellsuspension in einer -60 °C kalten Methanol-Puffer-Mischung (Winder *et al.*, 2008). Ein speziell entwickeltes Probenahmerohr ermöglicht diesen Vorgang direkt bei der Entnahme von Proben aus dem Reaktor (Hiller *et al.*, 2007a), ein Aufbau mit Fließband und mehreren Probegefäßen führt zu einer hohen

Beprobungsfrequenz (Buchholz *et al.*, 2002). Verschiedene Ventilsysteme an Reaktoren aus Edelstahl erlauben die Kombination aus Zellentnahme und –inaktivierung, entweder durch eine Inaktivierungslösung (Lange *et al.*, 2001), ein kontinuierliches Probenahmesystem (Weuster-Botz, 1997) oder einen Wärmetauscher (Schaub *et al.*, 2006). Auch der in Kapitel 3.3.2 erwähnte *Bioscope* Reaktor hat Mechanismen zur Probenahme integriert (Visser *et al.*, 2002).

Ist der Zellstoffwechsel dauerhaft gestoppt, müssen im nächsten Schritt die Zellmembranen zerstört werden, um den Austritt der Metabolite aus den Zellen in das Medium zu gewährleisten. Hierfür werden ebenfalls häufig extreme Temperatur- oder pH-Bedingungen gewählt (Hiller *et al.*, 2007b), wobei auch Temperaturprofile wie Tau-Frier-Zyklen zum Einsatz kommen (Winder *et al.*, 2008). Weiterhin sind für diesen Schritt der Einsatz von Lösemitteln oder mechanische Methoden beschrieben (Jaki *et al.*, 2006; Rabinowitz und Kimball, 2007). Aufgrund der mehrfachen Verdünnung der Proben im Laufe der Aufarbeitung kann eine Konzentration durch Gefriertrocknung und Resuspension die Quantifizierung von Metaboliten erleichtern (Link, 2009). Sinkende Nachweisgrenzen aufgrund sensitiverer Messgeräte machen dies jedoch zunehmend überflüssig.

Die Verwendung der benannten extremen Bedingungen birgt die Gefahr der Modifikation oder Zerstörung von Metaboliten (Winder *et al.*, 2008). Teilweise können diese Effekte durch Verwendung interner Standards berücksichtigt werden (siehe Kapitel 3.4.2). Eine weitere Schwierigkeit für die Probenaufarbeitung und folgende Analytik stellt das sogenannte ‚leakage‘ dar. Damit wird der vor allem bei Bakterienzellen häufig beobachtete Effekt beschrieben, dass bereits bei der Inaktivierung der Zellen Metabolite aus den Zellen austreten (Link *et al.*, 2008; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2009; Schädel *et al.*, 2011). Dies führt zu einer erheblichen Verfälschung der Messergebnisse, wenn Zellen und Medium nach der Inaktivierung getrennt werden, da intrazelluläre Metabolite verloren gehen. Aus diesem Grund müssen stattdessen Medium und Zellen in einer sogenannten ‚whole broth‘ Extraktion gemeinsam extrahiert werden (Bolten *et al.*, 2007; Link *et al.*, 2012). Dies macht wiederum eine separate Quantifizierung extrazellulärer Metabolite und eine anschließende Bilanzierung von intra- und extrazellulären Konzentrationen unumgänglich, um intrazelluläre Metabolitkonzentrationen nicht zu überschätzen. Eine hieraus folgende Problematik ist die Maskierung intrazellulärer Metabolite durch hohe extrazelluläre Konzentrationen aufgrund des um ein Vielfaches größeren extra- als intrazellulären Volumens (Taymaz-Nikerel *et al.*, 2009).

Leakage und die Folgeprobleme können umgangen werden, indem Zellen und Medium bereits vor der Inaktivierung voneinander getrennt werden. Dies geschieht üblicherweise über einen möglichst schnellen Filtrationsschritt (Link *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; da Luz *et al.*, 2014; McCloskey *et al.*, 2015), der jedoch in allen Fällen Zeit benötigt und somit eine neue Quelle für die Verfälschung der intrazellulären Konzentration beinhaltet. Weiterhin ist diese Art der Trennung auf niedrige Zellkonzentrationen begrenzt, da hohe Zelldichten ein unmittelbares Verblocken von Filtern zur Folge

haben (Link *et al.*, 2012). Bei Organismen mit Zellwand, wie zum Beispiel Hefen, werden reduzierte oder keine *leakage* Effekte beobachtet, sodass eine Trennung von Zellen und Medium nach der Inaktivierung beispielsweise durch Zentrifugation möglich ist (van Gulik, 2010). Ein weiterer Vorteil der Trennung von Zellen und Medium während der Aufarbeitung ist der dadurch reduzierte Salzgehalt der Proben, der massenspektrometrische Methoden erleichtert (Mairinger *et al.*, 2017).

3.4.2 Standardisierung und analytische Methoden zur Quantifizierung

Da die intrazellulären Konzentrationen vieler Metabolite niedrig sind und die Schritte der Probenaufarbeitung diese weiter verdünnen, sind hochsensitive Messmethoden mit niedrigen Detektionsgrenzen für eine erfolgreiche Quantifizierung notwendig (Büscher *et al.*, 2009). In Kombination mit dem oben erwähnten Variantenreichtum der Metabolite werden NMR (*nuclear magnetic resonance*) und vor allem massenspektrometrische Methoden zum Mittel der Wahl, da diese eine niedrigere Nachweisgrenze erlauben (Moco *et al.*, 2007; Bingol und Brüschweiler, 2013).

Einer massenspektrometrischen Analyse geht häufig eine chromatographische Auftrennung voran. Dies ermöglicht eine spezifischere Erfassung einzelner Analyten und erleichtert die Quantifizierung. Dabei können sowohl Gas- (GC) als auch Flüssigkeitschromatographische (LC) Methoden zum Einsatz kommen, die abhängig von den Analyten und der gewählten Aufarbeitungsmethode verschiedene Vorteile bieten (Büscher *et al.*, 2009). Da Metabolomproben zunächst immer wässrige Proben sind, ist für die Anwendung von GC-Methoden generell eine aufwändigere Probenaufarbeitung nötig (Dunn *et al.*, 2005). Jede chromatographische Methode ermöglicht die Trennung bestimmter Moleküle aufgrund der vorliegenden Interaktionen zwischen den einzelnen Phasen und Analyten, analog begünstigen verschiedene massenspektrometrische Methoden die Erfassung unterschiedlicher Stoffe (Garcia *et al.*, 2008). Unterschiede hierbei sind die Ionisierungsmethode, wobei für die Metabolitquantifizierung meistens sanfte Methoden wie *electrospray ionisation* verwendet werden (Mashego *et al.*, 2007a), die gewählte Polarität, also die Erfassung negativ oder positiv geladener Moleküle, und der vorhandene Massenanalysator. Diese sich gegenseitig beeinflussenden Variablen verhindern die Quantifizierung aller Metabolite mit einer Methode, sodass für eine umfassende Analytik die Verwendung einer Kombination mehrerer Methoden kaum umgänglich ist (Ortmayr *et al.*, 2015).

Eine vergleichsweise umfassende Methodik wird durch die Verwendung eines Ionenpaarreagens ermöglicht, das die chromatographische Trennung vieler ähnlicher Stoffe erlaubt, beispielsweise Isomere wie Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat, und darüber hinaus die Ionisierung durch eine Stabilisierung der entstehenden Ionen erleichtert. Für diese Methode ist die Quantifizierung von 138 zentralen Metaboliten in unterschiedlichen Matrices gezeigt (Büscher *et al.*, 2010). Ein Nachteil

dieser Methode ist eine starke Verunreinigung des verwendeten Massenspektrometers durch das Ionenpaarreagenz, das vor allem Messungen mit positiver Ionisierung behindert.

Zunehmend kommen auch Hochdurchsatzmethoden zum Einsatz, bei der für Messzeiten von wenigen Minuten Proben direkt ohne Chromatographie aus Mikrotiter- oder Agarplatten injiziert werden. Eine exakte Quantifizierung ist hierbei jedoch nicht möglich (Fuhrer *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2013; Link *et al.*, 2015). Damit verwandte neue Anwendungen sind ‚*untargeted*‘ Methoden, um beispielsweise neue Enzymfunktionen zu identifizieren. Dabei erfolgt im Vorhinein keine Vorgabe der zu identifizierenden Massensignale.

Eine weitere Herausforderung für die massenspektrometrische Analyse ist die starke Abhängigkeit der Signalstärke von der Zusammensetzung der Probe, der sogenannten Probenmatrix. Besonders wichtig für die Metabolom-Analytik ist dabei der mitunter hohe Salzgehalt der Proben, wenn Zellen und Medium während der Aufarbeitung nicht getrennt werden können (siehe Kapitel 3.4.1) (Noack und Wiechert, 2014; Mairinger *et al.*, 2017). Die sogenannte Ionensuppression beschreibt das Phänomen, dass nicht-flüchtige Komponenten, die in salzigen Lösungen in großer Menge enthalten sind, die Ionisierung anderer Moleküle erschweren. Dadurch werden deren Signale verringert oder sind im Extremfall bei gleichbleibender Konzentration in der Probe nicht mehr nachweisbar (Annesley, 2003). Somit ist ein externer Standard aufgrund der hohen Fehlerwahrscheinlichkeit nur im Fall fehlender Alternativen zu verwenden.

Die Effekte der Ionensuppression können durch die Verwendung eines internen Standards bei der Quantifizierung berücksichtigt werden. Dazu wird der Probe eine Substanz, die dem Analyten chemisch möglichst ähnlich ist, mit bekannter Konzentration zugesetzt. Dabei muss die analytische Unterscheidung zwischen Analyt und Standard möglich sein, um von der bekannten Konzentration des Standards auf die unbekannte Konzentration des Analyten schließen zu können. Diese Bedingungen sind in idealer Weise erfüllt, wenn ^{13}C -markierte Varianten der Analyten als Standards verwendet werden (‚*isotope dilution mass spectrometry*‘, IDMS) (Wu *et al.*, 2005; Link *et al.*, 2012). Durch die Herstellung eines vollständig ^{13}C -markierten Zellextrakts aus ^{13}C -Glucose mithilfe eines ausgewählten Stammes können diese Standards für eine Vielzahl interessanter Metabolite zur Verfügung gestellt werden. Durch eine dreistufige Kultivierungsmethode kann dabei der Salzgehalt der internen Standardlösung soweit möglich reduziert werden, um eine verstärkte Ionensuppression zu verhindern (Weiner *et al.*, 2015). Ein weiterer Vorteil dieses internen Standards ist die Möglichkeit der Berücksichtigung von Metabolitverlusten während der Probenaufarbeitung (Bennett *et al.*, 2008; Mashego *et al.*, 2004). Wird die Standardlösung während der Aufarbeitungsprozedur mit definierter Menge zugesetzt, führen alle im weiteren Verlauf auftretenden Verluste nicht mehr zu verfälschten Ergebnissen. Ein Zusatz ganz zu Beginn der Aufarbeitung würde jedoch in der Regel eine große Menge internen Standards notwendig machen und dadurch hohe Kosten verursachen.

Eine weitere Möglichkeit eines internen Standards zur Berücksichtigung der Ionensuppression ist die Standardaddition (DIN322633, 1998). Dabei wird eine Probe in mehrere Proben aufgeteilt und jeder Teilprobe wird eine definierte Menge des Analyten hinzugefügt. Durch lineare Regression der verschiedenen Signalstärken kann die ursprüngliche Konzentration des Analyten ermittelt werden. Die Anwendbarkeit ist begrenzt auf Metabolite, die in reiner Form als Standard erhältlich sind. Ein weiterer Nachteil ist die starke Erhöhung der zu analysierenden Probenanzahl. Standardaddition wird beispielsweise verwendet, um die Konzentrationen der Metabolite im ^{13}C -markierten Zellextrakt zu ermitteln.

3.5 Genomweite Stoffflussabschätzungen

Theoretische Stoffwechselmodelle spielen bei der Entwicklung und Optimierung biotechnologischer Anwendungen eine zunehmende Rolle. Aufgrund der großen Komplexität biologischer Systeme besteht ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Größe und Detailliertheit der verwendeten Modelle. Während genaue kinetische Beschreibungen auf ausgewählte kleine Bereiche des Stoffwechsels begrenzt sind, ist die Betrachtung des gesamten bekannten Stoffwechselnetzwerkes möglich, wenn der Metabolismus rein stöchiometrisch beschrieben wird (Schilling, 2001). Eine wichtige Grundlage aller mathematischen Beschreibungen von Stoffwechseln ist, dass intrazelluläre Stoffflüsse nicht messbar sind und somit immer ausgehend von analytisch erfassbaren Größen, wie extrazellulären Stoffflüssen oder intrazellulären Konzentrationen, ermittelt werden müssen (Sauer, 2006; Zamboni und Sauer, 2009). Die größte Annäherung ist möglich bei Verwendung von ^{13}C -basierten Methoden zur metabolischen Analyse (siehe Kapitel 3.3.3), die jedoch erheblichen experimentellen und analytischen Aufwand mit sich bringen und komplexe mathematische Methoden zur Auswertung benötigen (Wiechert, 2001).

Für die stöchiometrische Beschreibung eines Stoffwechselnetzwerkes wird jede ablaufende Reaktion als lineare Gleichung dargestellt und die Stöchiometrie des Netzwerkes in der Matrix N ($m \times n$) zusammengefasst, die für jede Reaktion eine Zeile (n) und für jeden Metaboliten eine Spalte (m) enthält. Die Einträge in der Matrix sind dabei die stöchiometrischen Koeffizienten der Reaktionsgleichungen. Die Reaktionsraten für alle Reaktionen sind im Vektor v repräsentiert. Im Falle eines metabolischen Gleichgewichtes gilt die Annahme eines Fließgleichgewichtes (Schilling, 2001). Dies bedeutet, dass alle Reaktionsraten konstant bleiben und kein Metabolit akkumuliert. Mathematisch ergibt sich:

$$N \cdot v = 0 \quad 3.20$$

Dieses lineare Gleichungssystem ist bei der Beschreibung von Stoffwechselnetzwerken meistens unterbestimmt, da mehr Reaktionen als Metabolite vorliegen (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Um Gleichung 3.20 eindeutig lösen zu können, muss der Freiheitsgrad durch gemessene Größen, zum Beispiel extrazelluläre Flüsse, reduziert werden. Die Unterteilung des Vektors v in gemessene Flüsse v_m und berechnete Flüsse v_c und eine analoge Aufteilung der Matrix N führt zur umformulierten Darstellung von Gleichung 3.20:

$$0 = N_m \cdot v_m + N_c \cdot v_c \quad 3.21$$

Ist das Gleichungssystem bestimmt, ist N_c eine quadratische invertierbare Matrix, und die Lösung der berechneten Stoffflüsse ergibt sich als:

$$v_c = -N_c^{-1} \cdot N_m \cdot v_m \quad 3.22$$

Andernfalls muss für die Lösung des Systems die Moore-Penrose-Pseudo-Inverse herangezogen werden (Stephanopoulos *et al.*, 1998):

$$v_c = -N_c^\# \cdot N_m \cdot v_m \quad 3.23$$

Mithilfe dieser Gleichungen können die Stoffflussverteilungen in kleinen vereinfachten Netzwerken ermittelt werden (Majewski und Domach, 1990).

Für viele Mikroorganismen sind aufgrund jahrelanger wissenschaftlicher Arbeiten und Genomsequenzierungen mittlerweile weitreichende genomweite Stoffwechselnetzwerke bekannt, die eine große Anzahl an Reaktionen und Metaboliten umfassen (Xu *et al.*, 2018). So sind für *E. coli* bis zu 2286 Reaktionen beschrieben (Orth *et al.*, 2011; Weaver *et al.*, 2014; Lakshamanan *et al.*, 2017), und für verschiedene Hefen wie *Saccharomyces cerevisia* und *Pichia pastoris* bestehen Modelle mit rund 1000 Reaktionen (Lopes und Rocha, 2017). Der für die Zellen notwendige Erhaltungsstoffwechsel wird in den Modellen durch einen ATP-verbrauchenden Faktor innerhalb des Biomassevektors berücksichtigt (Feist und Palsson, 2010). Auch für höhere Organismen wie Pilze sind genomweite theoretische Darstellungen verfügbar, im Fall von *Penicillium* sogar Spezies-spezifische Modelle mit rund 2500 Reaktionen (Prigent *et al.*, 2018). Eine ausreichende Einschränkung der Freiheitsgrade durch gemessene Größen ist bei Verwendung dieser Modelle nicht möglich, sodass die Lösbarkeit durch andere Annahmen erreicht werden muss (Reed und Palsson, 2003). Drei Methoden für diese sogenannten genomweiten Stoffflussabschätzungen werden im Folgenden vorgestellt (Simeonidis und Price, 2015).

Flussbilanzanalyse

Für die Flussbilanzanalyse (*FBA*) werden neben der Reaktionsstöchiometrie Randbedingungen bezüglich Thermodynamik, also Reaktionsrichtungen, und bezüglich Enzymkapazitäten, also maximale Reaktionsraten, in das Modell integriert (Price *et al.*, 2004). Die Genauigkeit der Vorgaben kann dabei individuell an die vorhandenen Informationen über jede einzelne Reaktion angepasst werden. Die Ermittlung einer eindeutigen Lösung innerhalb des dadurch vorgegebenen Lösungsraumes erfolgt über die Lösung eines linearen Optimierungsproblems (Palsson, 2000; Reed und Palsson, 2003; Orth *et al.*, 2010). Als Optimierungskriterium ist dabei prinzipiell die Minimierung oder Maximierung jedes Stoffflusses im Modell möglich. Biologisch plausibel und somit häufig als Zielfunktion f gewählt sind die Maximierung der Biomassebildung oder die Bildung von ATP (Feist und Palsson, 2010; Maarleveld *et al.*, 2015). Auch die Bildung eines bestimmten Metaboliten kann für

die Beantwortung spezifischer Fragestellungen optimiert werden. Das Optimierungsproblem wird beschrieben durch:

$$\begin{aligned}
 & \text{Max } f^T v \\
 & \text{s. t. } N \cdot v = 0 \\
 & \quad 0 \leq v \leq v_{\max}
 \end{aligned}
 \tag{3.24}$$

Aufgrund der mathematisch einfachen Darstellung des Stoffwechselnetzwerkes ist die Lösung dieses Optimierungsproblems auch für große Netzwerke und ohne Detailwissen einfach zugänglich (Schilling *et al.*, 2001).

Flussvarianzanalyse

Das Ergebnis einer *FBA* ist eine eindeutige Lösung, die im Stoffwechsel vorhandene Redundanzen und alternative Wege nicht abbilden kann. Da Mikroorganismen in vielen Bereichen des Stoffwechsels auf verschiedene Wege zurückgreifen können und somit eine hohe Flexibilität gegenüber sich ändernden Umweltbedingungen erreicht wird, stellt dies eine starke Vereinfachung dar (San Román *et al.*, 2014). Eine Einbeziehung dieser Variabilität wird jedoch möglich durch die Berechnung einer Flussvarianzanalyse (*FVA*) (Mahadevan und Schilling, 2003; Gudmundsson und Thiele, 2010). Dabei wird zusätzlich zu den Randbedingungen und dem Optimierungskriterium der *FBA* ein Varianzkriterium k vorgegeben. Anschließend wird für jede Reaktion im Netzwerk einzeln ermittelt, für welche Werte der durch das Varianzkriterium vorgegebene Anteil der optimalen Lösung noch erreicht werden kann. Je nach Wahl des Varianzkriteriums wird die optimale Lösung vollständig oder annähernd erfüllt. Das Optimierungsproblem wird wie folgt formuliert:

$$\begin{aligned}
 & \text{Max } v_i & \text{Min } v_i \\
 & \text{s. t. } N \cdot v = 0 & \text{s. t. } N \cdot v = 0 \\
 & f^t v \geq k \cdot Z_{obj} \text{ für } k \in [0; 1] & f^t v \geq k \cdot Z_{obj} \text{ für } k \in [0; 1] \\
 & 0 \leq v \leq v_{\max} \text{ für } i = 1 \dots n & 0 \leq v \leq v_{\max} \text{ für } i = 1 \dots n
 \end{aligned}
 \tag{3.25}$$

Anders als bei der *FBA* ergibt sich somit für jeden Fluss keine eindeutige Lösung, sondern ein Lösungsbereich. Insgesamt wird ein Lösungsraum aufgespannt durch die Berechnung vieler einzelner linearer Optimierungsprobleme (Mahadevan und Schilling, 2003). Da auf die genaue Bestimmung einzelner Gesamtlösungen verzichtet wird, bleibt der Rechenaufwand auch für große Modelle gering. Die ermittelten Lösungsbereiche können auch als Unsicherheiten der Ergebnisse einer *FBA* betrachtet werden.

Geometrische Flussbilanzanalyse

Sowohl in den Lösungen von Flussbilanz- als auch von Flussvarianzanalysen treten häufig Schleifen aus zwei oder mehr Reaktionen mit sehr hohen Stoffflüssen auf. Diese Lösungen sind mathematisch korrekt, aber biologisch nicht plausibel und somit für die Beschreibung biologischer Stoffflussverteilungen irrelevant. Der Grund ist der große Verbrauch von Ressourcen für die Zelle durch diese Flüsse, die jedoch zu keinem vorteilhaften Nettofluss führen (Smallbone und Simeonidis, 2009). Sie treten in den Berechnungen auf, weil in den Methoden keine Maschenregeln berücksichtigt werden. Es sind mehrere Ansätze beschrieben, die durch die Verwendung zusätzlicher thermodynamischer Randbedingungen die Identifikation und Eliminierung der Schleifenreaktionen ermöglichen. Diese führen jedoch zu einer deutlichen Erhöhung des Rechenaufwandes und sind somit für genomweite Modelle nur bedingt anwendbar (Schellenberger *et al.*, 2011; Müller und Bockmayr, 2013; de Martino *et al.*, 2013).

Um dies zu umgehen und trotzdem eine Lösung ohne Schleifenreaktionen zu erhalten, kann, ähnlich zur Flussvarianzanalyse, ausgehend von einer Flussbilanzanalyse eine zusätzliche Randbedingung für die Berechnung einer geometrischen Flussbilanzanalyse (*gFBA*) eingeführt werden. Sie beschreibt eine Minimierung des insgesamt im Netzwerk vorhandenen Stoffflusses und wird biologisch mit einer Minimierung der vorhandenen Enzymmenge gleichgesetzt. Somit wird die optimale Lösung mit minimalem Aufwand an Ressourcen erzielt (Smallbone und Simeonidis, 2009). Die mathematische Formulierung lautet:

$$\begin{aligned}
 & \text{Min} \sum_i |v_i| \\
 & \text{s. t. } N \cdot v = 0 \\
 & f^t v = Z_{obj} \\
 & 0 \leq v \leq v_{max} \text{ für } i = 1 \dots n
 \end{aligned}
 \tag{3.26}$$

Das Ergebnis ist wiederum eine eindeutige Lösung, die jedoch den vorhandenen Lösungsraum geometrisch repräsentiert. Der Lösungsraum ist geometrisch betrachtet eine konvexe Hülle und das Ergebnis der *gFBA* das Zentrum dieser Hülle. Die Ermittlung der Lösung erfolgt bei großen Modellen in mehreren iterativen Schritten (Smallbone und Simeonidis, 2009).

Die für die dargestellten Methoden verfügbaren genomweiten Modelle werden ständig an neue Erkenntnisse angepasst und verfeinert (Xu *et al.*, 2018). Neben dem Hinzufügen neuer Metabolite und Reaktionen stehen die Entwicklung in Richtung einer zunehmend mechanistischen Beschreibung des Stoffwechsels (Chakrabarti *et al.*, 2013; Imam *et al.*, 2015; King *et al.*, 2015) sowie die Einbeziehung

von ‚omics‘-Daten, vor allem Proteom und Transkriptom, im Fokus (Yizhak *et al.*, 2010; Gowen und Fong, 2013; Kim und Lun, 2014). Auch die Zusammenführung von ^{13}C -basierten Daten und genomweiter Modellierung ist beschrieben (Martin *et al.*, 2015). Für die konkrete Durchführung der Berechnungen stehen Anwendungen für die MATLAB- (Becker *et al.*, 2007; Schellenberger *et al.*, 2011) oder Python-Umgebung (Ebrahim *et al.*, 2013) zur Verfügung, die ebenfalls laufend erweitert werden.

3.6 Thermodynamische Analysen von Stoffwechselnetzwerken

Die Grundlage aller thermodynamischen Betrachtungen ist das zweite thermodynamische Gesetz. Es besagt, dass eine Reaktion nur in Richtung einer negativen freien Gibbs'schen Reaktionsenergie $\Delta_r G$ ablaufen kann. Diese wird anhand der Gibbs'schen Bildungsenergien der beteiligten Spezies $\Delta_f G$ und der Reaktionsstöchiometrie berechnet:

$$\Delta_r G_j = \sum_i n_{i,j} \cdot \Delta_f G_i \quad 3.27$$

Die Gibbs'sche Bildungsenergie leitet sich aus der Standard Gibbs'schen Bildungsenergie $\Delta_f G^0$ und der universellen Gaskonstanten R ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) ab und ist abhängig von der Reaktionstemperatur T und den Metabolit-Konzentrationen X_i :

$$\Delta_f G_i = \Delta_f G_i^0 + R \cdot T \cdot \ln X_i \quad 3.28$$

Standard Gibbs'sche Bildungsenergien können aus experimentellen Daten ermittelt werden, indem gemessene Bildungsenergien und Gleichgewichtskonstanten auf standardisierte Bedingungen zurückgeführt werden. Sie sind für die vorhandenen Reaktionsbedingungen aus Ionenstärke, pH und Temperatur gültig (Alberty, 1998; Alberty, 2003).

Da die experimentelle Bestimmung herausfordernd und nicht für alle Metabolite möglich ist (Flamholz *et al.*, 2012), wurden Methoden zur theoretischen Ermittlung von Bildungsenergien entwickelt. Diese verbessern die Verfügbarkeit von Daten über die Standard Gibbs'schen Bildungsenergien, die eine notwendige Grundlage für die thermodynamische Analyse von Reaktionsnetzwerken darstellen. Dabei wird die Bildungsenergie eines Metaboliten als Summe der Energien einzelner Molekül-Untereinheiten $\Delta_{gr} G_i^0$ betrachtet („*group contribution method*“):

$$\Delta_f G_{theo}^0 = \sum_{i=1}^{N_{gr}} n_i \cdot \Delta_{gr} G_i^0 \quad 3.29$$

Verfeinerungen der Methode ermöglichen eine deutliche Präzisierung der Vorhersagen (Jankowski *et al.*, 2008; Noor *et al.*, 2013).

Diese thermodynamischen Betrachtungen gelten auch für alle biochemischen Vorgänge in Zellen und können somit als zusätzliche Informationsquellen bezüglich der Eigenschaften metabolischer Netzwerke herangezogen werden. Sie stellen eine mögliche Ergänzung zu experimentell ermittelten Metabolom- oder Fluxomdaten dar und erweitern die Grundlage, auf der stöchiometrische oder kinetische Stoffwechselmodelle basieren (Zamboni *et al.*, 2008).

Häufig werden hierfür sogenannte NET-Analysen (*network-embedded thermodynamic analysis*) durchgeführt, in denen die thermodynamischen Eigenschaften von metabolischen Netzwerken auf ihre Konsistenz geprüft werden. Diese Betrachtung kann zur Einführung neuer Randbedingungen, beispielsweise Reaktionsrichtungen, für das Netzwerk führen (Nielsen, 1997; Henry *et al.*, 2007; Jol *et al.*, 2010; Fleming *et al.*, 2009; Ataman und Hatzimanikatis, 2015) und die im Netzwerk enthaltenen Reaktionen klassifizieren in Bezug auf ihre Lage zum thermodynamischen Gleichgewicht (Kümmel *et al.*, 2006; Canelas *et al.*, 2011). Eine weitere Anwendung ist die Überprüfung gemessener Daten, zum Beispiel intrazellulärer Konzentrationen (Price *et al.*, 2002; Kümmel *et al.*, 2006; Fleming *et al.*, 2009). Bezüglich weiterer Stammentwicklungen können thermodynamische Berechnungen Hinweise auf sinnvolle Angriffspunkte für genetische Veränderungen geben, sowohl für Überexpressionen als auch für Deletionen (Noor *et al.*, 2014; Ataman und Hatzimanikatis, 2015).

Bei der thermodynamischen Betrachtung metabolischer Netzwerke werden die Berechnungen der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien mit der Lösung von Optimierungsproblemen kombiniert (Kümmel *et al.*, 2006), da viele einzelne Reaktionen im Zusammenhang betrachtet werden müssen:

$$\begin{array}{ll}
 \text{Min|Max} & \Delta_r G_k \\
 \text{s. t.} & \Delta_r G_j < 0 \forall v_j > 0 \\
 & \Delta_r G_j > 0 \forall v_j < 0 \\
 & X_i^{\min} \leq X_i \leq X_i^{\max}
 \end{array} \tag{3.30}$$

Dabei werden für jede Reaktion k im Netzwerk die thermodynamisch möglichen minimalen und maximalen Werte der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien ermittelt, wobei die Konsistenz aller weiteren Reaktionen j im Netzwerk bezüglich Reaktionsrichtung und –energien beachtet wird. Neben erlaubten Bereichen der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien werden auf diese Weise auch lösbare Konzentrationsbereiche für alle beteiligten Metabolite ermittelt. Damit können gemessene Konzentrationen überprüft und mit Informationen über nicht-gemessene Metabolite ergänzt werden.

3.7 Metabolische Kontrollanalyse

Die metabolische Kontrollanalyse ist ein mathematischer Ansatz, der ein metabolisches Netzwerk quantitativ betrachtet und auf diese Weise die rationale Ermittlung von sinnvollen Angriffspunkten für Modifikationen erlaubt, ohne Kenntnisse einzelner Reaktionskinetiken zu benötigen. Die grundlegenden mathematischen Zusammenhänge wurden von Kacser und Burns (1973) sowie von Heinrich und Rapoport (1974) dargestellt und anschließend zum Konzept der Metabolischen Kontrollanalyse (MCA ‚*Metabolic Control Analysis*‘) zusammengefasst (Burns *et al.*, 1985). Die MCA beruht auf der Beschreibung der Reaktion von Gleichgewichtsflüssen und –konzentrationen auf Auslenkungen des Systems durch die Veränderung von beeinflussenden Größen. Durch die MCA wird ein Zusammenhang hergestellt zwischen lokalen Eigenschaften des Modells, die sich auf einzelne Enzyme und Reaktionen beziehen, und den globalen Eigenschaften des Gesamtmodells. Dazu werden Koeffizienten definiert, die quantitative Kennzahlen für den Effekt von Auslenkungen darstellen: Elastizitäten beschreiben die lokalen und Kontrollkoeffizienten die globalen Zusammenhänge. Da sie stets auf einen Referenzzustand, den zugehörigen Gleichgewichtszustand, bezogen werden, sind alle Koeffizienten dimensionslos.

Anhand dieser Kontrollkoeffizienten wird das Ergebnis einer Metabolischen Kontrollanalyse dargestellt. Sie drücken aus, in welcher Weise sich die Änderung eines Enzymniveaus (e_i) auf einen intrazellulären Stofffluss (J_i) oder eine Metabolitkonzentration (x_i) auswirkt (Visser und Heijnen, 2002). Auch externe Effektoren (c_i) sind mögliche Einflussfaktoren. Entsprechend sind die Flusskontrollkoeffizienten definiert:

$$C_{ij}^{J_0} = \frac{\frac{dJ_i}{J_i^0}}{\frac{de_j}{e_j^0}} \quad 3.31$$

und analog die Konzentrationskontrollkoeffizienten:

$$C_{ij}^{x_0} = \frac{\frac{dx_i}{x_i^0}}{\frac{de_j}{e_j^0}} \quad 3.32$$

In allen Fällen weist der Index 0 auf den Referenzzustand hin.

Zusammenhänge innerhalb der Kontrollkoeffizienten eines Modells werden durch die sogenannten Summations- und Konnektivitätstheoreme beschrieben (Kacser und Burns, 1973; Heinrich und Rapoport, 1974). Sie besagen, dass die Summe aller Flusskontrollkoeffizienten eines Stoffwechsels 1 und die Summe der Konzentrationskontrollkoeffizienten 0 ergibt. Diese theoretisch abgeleiteten

Beziehungen bedeuten, dass eine identische simultane Änderung aller Enzymaktivitäten die Metabolitkonzentrationen nicht ändert (Heinrich und Rapoport, 1974). Weiterhin beschreiben die Theoreme eine Verteilung der Kontrolle innerhalb eines Stoffwechsels auf die beteiligten Enzyme und ermöglichen die Ableitung von Kontrollkoeffizienten aus Elastizitäten (Visser und Heijnen, 2002).

3.7.1 Abschätzung von Elastizitäten

Die lokalen Elastizitäten beschreiben die Änderung eines Stoffflusses als Reaktion auf eine geänderte Metabolitkonzentration und somit die Flexibilität einer spezifischen Reaktion:

$$\varepsilon_{X_i}^{v_j} = \frac{\frac{\delta v_i}{v_i^0}}{\frac{\delta x_j}{x_j^0}} \quad 3.33$$

Die Möglichkeiten zur Bestimmung von Elastizitäten sind abhängig vom thermodynamischen Zustand der betrachteten Reaktion. Läuft die Reaktion reversibel in der Nähe des thermodynamischen Gleichgewichtes ab, können Elastizitäten direkt aus den Gibbs'schen Bildungsenergien und der Stöchiometrie der Reaktion berechnet werden. Grundlage ist ein thermokinetisches Modell (Nielsen, 1997):

$$\varepsilon_{X_i}^{v_j} = -\frac{n_{i,j} \cdot R \cdot T}{A_j - A_j^\#} \quad 3.34$$

Ist die beschriebene Reaktion reversibel, nimmt $A_j^\#$ den Wert null an und die Affinität A_j wird durch die negative Gibbs'sche Bildungsenergie beschrieben.

Laufen die Reaktionen fern des thermodynamischen Gleichgewichtes ab, beruht die Beschreibung der Elastizitäten auf mechanistischen Modellen zur Beschreibung der Kinetik einzelner Reaktionen. Dies macht eine *in vivo* Bestimmung von kinetischen Parametern in ganzen Zellen notwendig. Der damit verbundene enorme Aufwand und die natürlicherweise begrenzte Auslenkbarkeit machen diesen Ansatz kaum direkt anwendbar (Visser und Heijnen, 2003).

Linear-logarithmische (lin-log) Modelle sind eine Möglichkeit der vereinfachten nicht-mechanistischen Beschreibung von dynamischen komplexen Stoffwechselmodellen (Visser und Heijnen, 2003). Dabei wird die Geschwindigkeit einer Reaktion j beschrieben als:

$$v_j = e_j (a_j + p_{j,1} \ln X_1 + p_{j,2} \ln X_2 + \dots + p_{j,m} \ln X_m) \quad 3.35$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also proportional zur Konzentration des katalysierenden Enzyms e und zu einer Linearkombination der logarithmierten Konzentrationen der Metabolite X_i . Werden

Reaktionsrate, Enzymkonzentration und Metabolit-Konzentrationen auf einen Referenzzustand normiert, ergibt sich:

$$\frac{v_j}{v_j^0} = \frac{e_j}{e_j^0} \left(1 + \varepsilon_{X_1}^{v_j} \ln \frac{X_1}{X_1^0} + \varepsilon_{X_2}^{v_j} \ln \frac{X_2}{X_2^0} + \dots + \varepsilon_{X_m}^{v_j} \ln \frac{X_m}{X_m^0} \right) \quad 3.36$$

Eine Umformung in Matrixschreibweise führt zu:

$$\begin{bmatrix} v & e^0 \\ v^0 & e \end{bmatrix} - 1 = \begin{bmatrix} X \\ X^0 \end{bmatrix} [\varepsilon_X^v] \quad 3.37$$

Es ergibt sich ein direkter Zusammenhang mit Gleichung 3.33, sodass die Elastizitäten die kinetischen Modellparameter p beschreiben und die Auslenkbarkeit der jeweiligen Reaktion darstellen:

$$\varepsilon_{X_i}^{v_j} \equiv \frac{X_i}{v_j} \frac{\delta v_j}{\delta X_i} = \frac{\delta \ln v_j}{\delta \ln X_i} \quad 3.38$$

3.7.2 Abschätzung von Kontrollkoeffizienten

Die Herleitung der Zusammenhänge zur Abschätzung von Kontrollkoeffizienten ist auf vielen unterschiedlichen Wegen beschrieben (Fell, 1992; Hatzimanikatis und Bailey, 1996; Hofmeyr, 2001). Die hier gewählte Darstellung folgt dem Vorschlag von Visser und Heijnen (2002), der auf der Massenbilanz des Gleichgewichtszustandes beruht.

Ausgangspunkt ist die Darstellung des Stoffwechsels als Massenbilanz anhand der stöchiometrischen Matrix N . Im Gleichgewichtsfall kann diese Bilanz gleich null gesetzt werden:

$$\frac{dx}{dt} = N \cdot v \quad 3.39$$

Über die Zeilen-Stufen-Form von N wird der Rang der Matrix bestimmt, wodurch die abhängigen Reaktionen festgelegt sind. Eine Umformung erlaubt die Darstellung rein anhand der unabhängigen Reaktionen (ind) und der Link-Matrix L^x :

$$N = L^x \cdot N_{ind} \quad \text{mit} \quad L^x = N \cdot N_{ind}^\# \quad 3.40$$

Die Normalisierung von Gleichung 3.39 durch Bezugnahme auf den Referenzzustand führt zu:

$$[X^0] \frac{d \frac{x}{x^0}}{dt} = N \cdot [J^0] \cdot \frac{v}{J^0} \quad 3.41$$

Um die Massenbilanz lösen zu können, müssen die vorhandenen Abhängigkeiten entfernt werden. Dies geschieht mithilfe einer modifizierten Link-Matrix, die ebenfalls auf normalisierten Variablen beruht:

$$\left(\frac{x}{x^0} - i \right) = L^x \left(\frac{x_{ind}}{x_{ind}^0} - i \right) \quad \text{mit} \quad L^x = [X^0]^{-1} \cdot N \cdot N_{ind}^\# \cdot [X_{ind}^0] \quad 3.42$$

Gleichung 3.41 wird umformuliert zu:

$$[X_{ind}^0] \frac{d \left(\frac{x}{x^0} \right)_{ind}}{dt} = N_{ind} \cdot [J^0] \cdot \frac{v}{j^0} \quad 3.43$$

Die Reaktionsraten v sind Funktionen der Enzymniveaus e , der Metabolitkonzentrationen x und der extrazellulären Konzentrationen c . Die Berechnung einer MCA basiert auf der Linearisierung dieser Systemgleichungen im Referenzzustand. Werden die Elastizitäten in den Matrizen E^{x0} und E^{c0} zusammengefasst, ergibt sich in der normalisierten Darstellung hierfür:

$$\frac{v}{j^0} = \frac{e}{e^0} + E^{x0} \left(\frac{x}{x^0} - i \right) + E^{c0} \left(\frac{c}{c^0} - i \right) \quad 3.44$$

Die Gleichungen 3.44 und 3.42 werden in Gleichung 3.40 eingesetzt und führen zu:

$$[X_{ind}^0] \frac{d \left(\frac{x}{x^0} \right)_{ind}}{dt} = N_{ind} \cdot [J^0] \cdot \left(\frac{e}{e^0} + E^{x0} \cdot L^x \cdot \left(\frac{x}{x^0} \right)_{ind} - i \right) + E^{c0} \left(\frac{c}{c^0} - i \right) \quad 3.45$$

Im Gleichgewicht wird die linke Seite der Gleichung gleich null gesetzt, wodurch ein lösbares System unabhängiger linearer Gleichungen entsteht. Die Lösung des Systems wird durch erneutes Einsetzen von Gleichung 3.42 erzielt und lautet:

$$\frac{x}{x^0} - i = -\Psi \cdot \frac{e}{e^0} - \Psi \cdot E^{c0} \left(\frac{c}{c^0} - i \right) \quad 3.46$$

$$\text{mit} \quad \Psi = L^x \cdot (N_{ind} \cdot [J^0] \cdot E^{x0} \cdot L^x)^{-1} \cdot N_{ind} \cdot [J^0]$$

Diese Gleichung ist linear bezüglich e/e^0 und $(c/c^0 - i)$. Eine Beschreibung der Konzentrationskontrollkoeffizienten C^{x0} folgt nun direkt aus ihrer Definition in Gleichung 3.32:

$$C^{x0} = \frac{e^0}{x^0} \frac{dx}{de} = \frac{d \left(\frac{x}{x^0} - 1 \right)}{d \frac{e}{e^0}} = -L^x \cdot (N_{ind} \cdot [J^0] \cdot E^{x0} \cdot L^x)^{-1} \cdot N_{ind} \cdot [J^0] \quad 3.47$$

Werden die Lösung der Metabolitkonzentrationen im Gleichgewicht (Gleichung 3.46) und die linearisierte Systemgleichung (Gleichung 3.44) miteinander verknüpft, ergibt sich:

$$\begin{aligned}
\frac{v}{J^0} &= \frac{J}{J^0} = \frac{e}{e^0} + E^{x^0} \left(C^{x^0} \cdot \frac{e}{e^0} + R^{x^0} \left(\frac{c}{c^0} - i \right) \right) + E^{c^0} \left(\frac{c}{c^0} - i \right) \\
&= (E^{x^0} C^{x^0} + i) \cdot \frac{e}{e^0} + (E^{x^0} R^{x^0} + E^{c^0}) \cdot \left(\frac{c}{c^0} - i \right)
\end{aligned}
\tag{3.48}$$

Ausgehend von dieser Gleichung folgt nun aus der Definition der Flusskontrollkoeffizienten C^{J^0} (Gleichung 3.31) unmittelbar:

$$C^{J^0} = \frac{e^0}{J^0} \frac{dJ}{de} = \frac{d \frac{J}{J^0}}{d \frac{e}{e^0}} = E^{x^0} C^{x^0} + i
\tag{3.49}$$

Gleichungen 3.47 und 3.49 erlauben eine direkte Berechnung der globalen Konzentrations- und Flusskontrollkoeffizienten aus den lokalen Elastizitäten und der Stöchiometrie eines metabolischen Netzwerks.

3.8 Metabolische Kontrollanalysen des Metabolismus von *Escherichia coli*

Die Anwendung des mathematischen Konzepts der metabolischen Kontrollanalyse für die Beschreibung eines konkreten metabolischen Zustandes erfordert eine umfangreiche Datengrundlage, vor allem bezüglich intrazellulärer Konzentrationen und Stoffflüsse. Da die Generierung dieser Daten eine große experimentelle und analytische Herausforderung ist, wurden vorwiegend rein theoretische Ansätze durchgeführt. Es sind somit nur wenige umfassende Studien verfügbar, die alle praktischen und theoretischen Schritte zur Datengewinnung und anschließenden Auswertung bis hin zur Kontrollanalyse umfassen. Diese Arbeiten wurden vor allem mit *E. coli* durchgeführt. Zunächst ist die Betrachtung eines Wildtyp-Stammes während der Biomassebildung mit konstanter Wachstumsrate basierend auf metabolischen Analysen nach schnellem Medienwechsel (Link *et al.*, 2010) beschrieben. Diese zeigt eine vorwiegende Kontrolle des Stoffwechsels durch die Reaktionen des Energiemetabolismus und eine lediglich geringe Kontrolle durch den Zentralstoffwechsel (Link, 2009).

Eine weitere Arbeit, die auf einem modifizierten experimentellen Ansatz für parallelisierte metabolische Analysen beruht, erlaubt eine Beschreibung der auftretenden kontrollierenden Schritte während der Produktion von L-Phenylalanin aus Glycerin (Weiner *et al.*, 2017). Die mehrfache Durchführung des parallelisierten Ansatzes macht dabei Veränderungen während des instationären Produktionsprozesses beschreibbar. Während sich auch hier eine deutliche Kontrolle des Energiestoffwechsels auf den gesamten Metabolismus zeigt, werden zusätzlich Reaktionen ersichtlich, die Limitationen der Bildung des Produktes L-Phenylalanin darstellen. Ein Vergleich des Zeitpunktes der maximalen Produktbildung mit dem Ende der Produktionsphase weist dabei sowohl auf gleichbleibende als auch veränderte kontrollierende Funktionen über die Prozesszeit hin. Eine konstante Kontrolle im Zentralstoffwechsel zeigen die Enzyme des Glycerin-Metabolismus und Energie-liefernde Reaktionen der Glykolyse. Innerhalb der Aromatenbiosynthese ist für die PEP-verbrauchende Reaktion der *pscvt* eine gleichbleibend positive Kontrolle beschrieben. Für die Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese und damit die erste PEP-verbrauchende Reaktion wird hingegen eine abnehmende Kontrolle während des Prozesses ermittelt. Auch im Zentralstoffwechsel finden sich Enzyme mit geänderter Kontrolle während des Prozesses, unter anderem die Fructose-Bisphosphatase und Enzyme im Zusammenhang mit der Bildung oder dem Verbrauch von PEP. Die ermittelten Kontrollkoeffizienten geben dabei konkrete Hinweise auf Angriffspunkte für genetische Veränderungen zugunsten einer erhöhten Produktbildung (Weiner *et al.*, 2017).

4 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Einzelgeräte können Tabelle 10.1 und Tabelle 10.2 im Anhang entnommen werden. Alle weiteren Materialien und Methoden, die für diese Arbeit zum Einsatz kamen, sind im folgenden Kapitel dargestellt.

4.1 Mikroorganismen und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und Plasmide wurden vom Projektpartner an der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt. Ihre genetischen Eigenschaften sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

E. coli FUS4 und seine Varianten sind L-Phenylalanin-Produzenten. Sie basieren auf dem Grundstamm W3110 und tragen Deletionen der Gene *pheA*, *tyrA* und *aroF*, wodurch die Stämme auxotroph auf die Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin sind. Im lac-Operon liegen zusätzliche induzierbare Überexpressionen der Gene *aroFBL* aus der Aromatenbiosynthese vor. Die Variante UhpT-D388C verfügt außerdem über eine Überexpression des modifizierten Zuckerphosphat-Transporters.

Alle weiteren Stämme dienen der Produktion von L-Tryptophan. Sie basieren auf dem Grundstamm LJ110. Allen Stämmen gemein als Grundlage ist *E. coli* TRP5a. Er trägt Deletionen der Gene *trpL* und *trpR* zur Regulation der L-Tryptophan-Produktion und Deletionen der Gene *tnaA* und *sdaB* zum Abbau von L-Tryptophan und L-Serin. Weiterhin führen in diesem Stamm vier Punktmutationen im Gen *trpE* zur Codierung einer rückkopplungsresistenten Enzymvariante. Gleichzeitig liegt eine Mutation im *trp*-Promotor vor. Die Stämme tragen Überexpressionen der Gene *aroFBL* im lac-Operon. Die Stämme *E. coli* TRP5a *tktA* und *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* verfügen über zusätzliche Überexpressionen der genannten Gene in verschiedenen Loci, wobei *serA* für eine rückkopplungsresistente Enzymvariante codiert.

Davon unabhängig ist auch *E. coli* NT367 eine Weiterentwicklung von *E. coli* TRP5a welcher über Überexpressionen der Gene *trpEDBA* aus dem *trp*-Operon sowie *serA* verfügt, wobei *trpE* und *serA* gezielte Mutationen zugunsten rückkopplungsresistenter Enzyme tragen. In den überexprimierten Genen *trpE*, *trpD*, *trpB* und *serA* liegen Mutationen vor, die zu inaktiven oder schwach aktiven Enzymprodukten führen.

Zur Produktion von L-Phenylalanin stand das Plasmid pF81_{kan} zur Verfügung, das neben einer Kanamycin-Resistenz induzierbar die Gene *aroF*, *pheA*, *aroB* und *aroL* codiert. Das Plasmid pF112_{aroFBL}_{kan} unterscheidet sich hiervon durch das fehlende Gen *pheA* und wurde zur Transformation von L-Tryptophan-Produzenten verwendet.

Tabelle 4.1: In der vorliegenden Arbeit verwendete *E. coli* Stämme und Plasmide und ihre genetischen Eigenschaften.

Stamm	Grundstamm	Deletionen	Weitere genomische Veränderungen	Induzierbare Überexpressionen
FUS4	W3110	<i>pheA</i> , <i>tyrA</i> , <i>aroF</i>		$\Delta\text{lacIZYA}::P_{\text{tac}}\text{-aroFBL}$
FUS4 <i>UhpT</i> - <i>D388C</i>	W3110	<i>pheA</i> , <i>tyrA</i> , <i>aroF</i>		$\Delta\text{lacIZYA}::P_{\text{tac}}\text{-aroFBL}$ $\Delta\text{fucIK}::P_{\text{tac}}\text{-uhpT-D388C}$
TRP5a	LJ110	<i>trpL</i> , <i>trpR</i> , <i>tnaA</i> , <i>sdaB</i>	<i>trpE</i> ^{FBR} (<i>M293T</i> , <i>N168D</i> , <i>A478T</i> , <i>C237R</i>) Mutation im <i>trp</i> -Promoter	$\Delta\text{lac}::P_{\text{tac}}\text{-aroFBL}$
TRP5a <i>tktA</i>	LJ110	<i>trpL</i> , <i>trpR</i> , <i>tnaA</i> , <i>sdaB</i>	<i>trpE</i> ^{FBR} (<i>M293T</i> , <i>N168D</i> , <i>A478T</i> , <i>C237R</i>) Mutation im <i>trp</i> -Promoter	$\Delta\text{lac}::P_{\text{tac}}\text{-aroFBL}$ $\Delta\text{fuc}::P_{\text{tac}}\text{-tktA}$
TRP5a <i>tktA</i> <i>serA</i> <i>trpBA</i>	LJ110	<i>trpL</i> , <i>trpR</i> , <i>tnaA</i> , <i>sdaB</i>	<i>trpE</i> ^{FBR} (<i>M293T</i> , <i>N168D</i> , <i>A478T</i> , <i>C237R</i>) Mutation im <i>trp</i> -Promoter	$\Delta\text{lac}::P_{\text{tac}}\text{-aroFBL}$ $\Delta\text{fuc}::P_{\text{tac}}\text{-tktA}$ $\Delta\text{rbs}::P_{\text{tac}}\text{-serA}^{\text{FBR}}(\text{T372D})$ $\Delta\text{rib}::P_{\text{tac}}\text{-trpBA}$
NT367	LJ110	<i>trpL</i> , <i>trpR</i> , <i>tnaA</i> , <i>sdaB</i>	<i>trpE</i> ^{FBR} (<i>M293T</i> , <i>N168D</i> , <i>A478T</i> , <i>C237R</i>) Mutation im <i>trp</i> -Promotor	$\Delta\text{lac}::P_{\text{tac}}\text{-aroFBL}$ $\Delta\text{mal}::P_{\text{tac}}\text{-trpE}^{\text{FBR}}(\text{R402H}$, $\text{E244G})\text{-trpD}(\text{Q38R}$, $\text{I41V})$ $\Delta\text{rib}::P_{\text{tac}}\text{-trpB}(\text{Q312R})\text{-trpA}$ $\Delta\text{xyl}::P_{\text{tac}}\text{-serA}^{\text{FBR}}(\text{T372D}$, $\text{E302G})$
Plasmid	Grundplasmid	Induzierbare Gene		Resistenz
pF81 _{kan}	pJF119EH	$P_{\text{tac}}\text{-aroF-pheA-aroB-}$ <i>aroL</i>		Kanamycin
pF112 _{aroFBL-kan}	pJF119EH	$P_{\text{tac}}\text{-aroF-aroB-aroL}$		Kanamycin

4.2 Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Minimalmedium

Für die Kultivierung von *E. coli* in Schüttelkolben und im 42 L-Reaktor, sowie für die metabolischen Analysen im Vierfach-Parallelbioreaktorsystem und für die ersten beiden Kultivierungsschritte bei der Herstellung von U-¹³C-markiertem Zellextrakt wurde ein von Albermann *et al.* (2008) adaptiertes Minimalmedium verwendet. Seine Zusammensetzung und die Sterilisationsmethoden der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Das Grundmedium aus KH₂PO₄, K₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄ und NaCl (mit pH 7 für Kultivierungen in Schüttelkolben) sowie eine Glycerin-Lösung wurden einzeln autoklaviert, die restlichen Komponenten wurden sterilfiltriert und die Medien anschließend zusammengeführt. Glycerin diente, mit Ausnahme der Herstellung von U-¹³C-markiertem Zellextrakt, als alleinige Kohlenstoffquelle für alle Kultivierungen und wurde in Schüttelkolben mit 7 g L⁻¹ und als Substrat der Satzphase im 15 L-Prozess mit 4 g L⁻¹ zugegeben. Keine Zugabe von Kohlenstoffquellen erfolgte im Medium für metabolische Analysen. Die Stocklösung von L-Tyrosin wurde durch Zugabe von 5 M KOH in Lösung gebracht, wobei die Zugabe der Auxotrophiestoffe L-Tyrosin und L-Phenylalanin nur bei Kultivierungen von *E. coli* FUS4 und *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* erfolgte. Für die Kultivierung untransformierter Stämme wurde auf die Zugabe von Kanamycin verzichtet.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Minimalmediums nach Albermann *et al.* (2008).

Komponente	Endkonzentration, g L ⁻¹	Sterilisation	Konzentration Stocklösung, g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	3,00	autoklaviert	-
Di-Kaliumhydrogenphosphat	12,00	autoklaviert	-
Ammoniumsulfat	5,00	autoklaviert	-
Natriumchlorid	0,10	autoklaviert	-
Sterile Zugabe nach Autoklavieren			
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,30	sterilfiltriert	300,00
Calciumchlorid Dihydrat	0,0150	sterilfiltriert	15,00
Eisensulfat-Heptahydrat/ Natriumcitrat	0,1125	sterilfiltriert	22,50/200,00
Thiamin	0,0075	sterilfiltriert	7,50
L-Phenylalanin	0,0750	sterilfiltriert	10,00
L-Tyrosin	0,0750	sterilfiltriert	15,00
Glycerin	4,00 / 7,00	autoklaviert	1000,00
Kanamycin	0,050	sterilfiltriert	50,00

Für Kultivierungen im 15 L-Maßstab wurden dem Medium außerdem 15 mL einer sterilfiltrierten Spurenelementlösung aus 11,20 g L⁻¹ Mangansulfat-Monohydrat, 10,00 g L⁻¹ Aluminium(III)chlorid-Hexahydrat, 7,33 g L⁻¹ Cobaltchlorid-Hexahydrat, 2,00 g L⁻¹ Zinksulfat-Heptahydrat, 2,00 g L⁻¹ Natriummolybdat-Dihydrat, 1,00 g L⁻¹ Kupferchlorid-Dihydrat und 0,50 g L⁻¹ Borsäure hinzugefügt. Der Spurenelementlösung wurde HCl zum Lösen hinzugefügt.

LB-Medium

Für die Kultivierung untransformierter Stämme vor ihrer Transformation und zur Herstellung von Glycerin-Stocks wurde ein LB-Medium aus 10 g L⁻¹ Pepton aus Casein, 5 g L⁻¹ Hefeextrakt und 10 g L⁻¹ NaCl verwendet, dessen pH vor der Sterilisation durch Autoklavieren (120 °C, 20 min) auf 7 eingestellt wurde.

Zulaufmedien

Für die Zulaufkultivierungen im 15 L-Maßstab wurden je nach Prozessstrategie zwei oder drei Zulaufmedien hintereinander verwendet. Diese wurden aus einzeln sterilisierten Stocklösungen (1000 g L⁻¹ Glycerin, 400 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 400 g L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, 10 g L⁻¹ L-Phenylalanin, 15 g L⁻¹ L-Tyrosin und 50 g L⁻¹ Kanamycin) gemischt, wobei das Volumen mit Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle, Auxotrophiestoffe und Antibiotikum aufgefüllt wurde. Für die Kultivierung untransformierter Stämme wurde kein Kanamycin zugegeben.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Zulaufmedien für L-Phenylalanin- und L-Tryptophan-Produktionsprozesse im 15 L-Maßstab. Die Medien wurden exponentiell (exp) oder konstant (konst) zugeführt.

Zulauf-Medium	Volumen, L	Endkonzentration, g L ⁻¹					
		Glycerin	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Kanamycin	L-Phenylalanin	L-Tyrosin
L-Phenylalanin-Produktionsprozess							
1 (exp)	1,0	120,00	60,00	-	0,10	2,50	3,60
2 (exp)	4,5	400,00	25,00	-	0,10	1,11	3,80
3 (konst)	5,0	800,00	8,00	8,00	0,10	-	-
L-Tryptophan-Produktionsprozess Strategie 1							
1 (exp)	1,0	120,00	60,00	-	0,10	-	-
2 (exp)	4,5	400,00	25,00	-	0,10	-	-
3 (konst)	5,0	800,00	8,00	8,00	0,10	-	-
L-Tryptophan-Produktionsprozess Strategie 2							
1 (exp)	2,0	150,00	75,00	-	0,10	-	-
2 (konst)	5,0	800,00	8,00	8,00	0,10	-	-

PBS-Puffer

Für Verdünnungen zur Bestimmung der optischen Dichte und zum Resuspendieren von Zellen vor der Inokulation wurde ein PBS-Puffer aus $8,00 \text{ g L}^{-1}$ NaCl, $0,20 \text{ g L}^{-1}$ KCl, $1,44 \text{ g L}^{-1}$ Na_2HPO_4 und $0,24 \text{ g L}^{-1}$ KH_2HPO_4 verwendet.

Transformationspuffer

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen waren zwei Transformationspuffer nötig, die mit bidestilliertem Wasser angesetzt wurden. Der erste (TfbI) enthielt $2,95 \text{ g L}^{-1}$ Kaliumacetat, $12,10 \text{ g L}^{-1}$ Rubidiumchlorid, $1,45 \text{ g L}^{-1}$ Calciumchlorid, $10,00 \text{ g L}^{-1}$ Manganchlorid-Tetrahydrat und 150 mL L^{-1} Glycerin. pH 5,8 wurde mit 20 % Essigsäure eingestellt. Der zweite Puffer (TfbII) bestand aus $2,10 \text{ g L}^{-1}$ MOPS, $1,20 \text{ g L}^{-1}$ Rubidiumchlorid, $11,00 \text{ g L}^{-1}$ Calciumchlorid und 150 mL L^{-1} Glycerin. pH 6,5 wurde durch Zugabe von 6 M NaOH erreicht.

Kalium-Phosphat-Puffer

Bei der Herstellung von $\text{U-}^{13}\text{C}$ -markiertem Zellextrakt wurde im letzten Schritt zur Reduzierung der Salzkonzentration ein Kalium-Phosphat-Puffer aus $1,36 \text{ g L}^{-1}$ Kalium-Dihydrogenphosphat und $1,74 \text{ g L}^{-1}$ Di-Kalium-Hydrogenphosphat mit pH 7 verwendet.

4.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

4.3.1 Stammhaltung

Langfristig wurden alle *E. coli* Stämme als Kryo-Kulturen gelagert. Für ihre Herstellung wurden die Stämme in 100 mL LB-Medium in einem 500 mL Schüttelkolben kultiviert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde 20 Vol% steriles Glycerin hinzugefügt, die Mischung in sterile 1,5 mL Gefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Für die kurzfristige Lagerung, sowie als Ausgangspunkt für alle Kultivierungen, wurden Einzelkolonie-Ausstriche auf Agarplatten mit LB-Medium oder Minimalmedium verwendet. Dafür wurden die Medien mit 20 g L⁻¹ Agar versetzt, wobei das Minimalmedium erst nach dem Autoklavieren mit einer separat sterilisierten Agarlösung zusammengeführt wurde.

4.3.2 Kultivierung in Schüttelkolben

Kultivierungen in Schüttelkolben wurden in je 100 mL Minimalmedium in 500 mL Kolben bei 37 °C und 200 min⁻¹ durchgeführt. Als Vorkultur wurden 10 mL Medium in einem 100 mL Kolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und 24 h kultiviert (37 °C, 100 min⁻¹). 1 mL der Zellsuspension wurde zum Animpfen eines 500 mL Kolbens verwendet.

Mit dieser Vorgehensweise wurde auch die Vorkultur für Kultivierungen im 15 L-Maßstab gewonnen, wobei zunächst zwei 100 mL Kolben mit je 10 mL Medium inkubiert wurden und anschließend zehn 500 mL Kolben mit je 100 mL Medium, angeimpft aus den 100 mL Kolben. Der resultierende 1 L Zellsuspension wurde nach 28 h Inkubation vollständig als Inokulum für den 42 L-Reaktor verwendet.

4.3.3 Gewinnung kompetenter Zellen und Transformation

Für die Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen wurden die in Kapitel 4.2 beschriebenen Transformationspuffer sterilfiltriert und auf Eis gekühlt verwendet. 10 mL LB-Medium in einem 100 mL Schüttelkolben wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 100 min⁻¹ inkubiert. 1,5 mL der Zellsuspension wurden verwendet für die Inokulation von 100 mL LB-Medium in einem 500 mL Schüttelkolben. Nach weiterer Inkubation bei 37 °C und 250 min⁻¹ bis OD_{600nm}~0,5 wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 3200 g) und in 40 mL TfbI Puffer resuspendiert. Es folgten 15 min Inkubation auf Eis, eine erneute Zentrifugation und Resuspension in 4 mL TfbII Puffer. Die nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis erhaltenen transformationskompetenten Zellen wurden zu je 200 µL in sterile 1,5 mL Gefäße aliquotiert. Erfolgte die Transformation nicht direkt im Anschluss, wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 2 µL Plasmidlösung zu einem 200 µL Aliquot kompetenter Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 s in einem 42 °C Wasserbad

und anschließend wurden 600 μL steriles LB-Medium hinzugefügt. Danach wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C und 600 min^{-1} inkubiert. Je 200 μL der Zellsuspension wurden auf einer LB-Agarplatte mit Kanamycin ausplattiert und 24 h bei 37 °C inkubiert.

4.3.4 Zulauf-Kultivierung im 15 L-Maßstab

Für Zulaufkultivierungen im 15 L-Maßstab zur Produktion von L-Phenylalanin und L-Tryptophan wurde ein Edelstahlreaktor mit einem Absolutvolumen von 42 L und einem maximalen Arbeitsvolumen von 30 L verwendet. Die Bestandteile der Anlage können im Detail dem Anhang entnommen werden (Tabelle 10.9) und sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Die für die Prozesse verwendeten Medien und Zulaufmedien sind in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 aufgeführt, die Prozessstrategie wurde von Weiner *et al.* (2014b) übernommen und adaptiert.

Der Reaktor verfügt über einen Doppelmantel, der zur Temperierung mit Dampf oder Wasser gefüllt wird. Über den Reaktorboden ist eine Rührwelle eingeführt, an der zur Homogenisierung und Gasblasendispergierung drei Sechsstabscheibenrührer befestigt sind. Die Rührwelle sitzt auf einer Kondensat-geschmierten Graphitgleitringdichtung. Ein vom oberen Bereich zum Reaktorboden geführtes Begasungsrohr ermöglicht die Erzeugung von Gasblasen am Reaktorboden. Die Durchmischung des Reaktorinhalts wird weiterhin durch vier äquidistante Strömungsbrecher an der Reaktorwand erleichtert. Mehrere Durchführungen im unteren Reaktorbereich erlauben die Montage von Sonden zur Messung von pH, Temperatur, Gelöstsauerstoff-Konzentration, Permittivität und Konduktivität sowie eines Probenahmesystems nach Hiller *et al.* (2007a). Weiterhin befindet sich am Reaktorboden ein Ventil, das zur Entnahme großer Volumina als Probe oder bei der Entleerung des Reaktors verwendet wird.

Sonden zur Messung des Kopfdrucks und zur Detektion von Schaum sind am Reaktordeckel eingebaut. Neben einem Kondensatrückflusskühler in der Abluftstrecke sind dort auch Sterilsepten montiert. Über diese ist die sterile Zugabe von Medienkomponenten, Inokulum und Zulaufmedien möglich.

Die Regelung und Steuerung von Prozessgrößen kann über eine am Reaktor angeschlossene Steuereinheit oder einen damit verbundenen Computer (Software IRIS V4.0) erfolgen.

Zur Vorbereitung der Prozesse wurde die pH-Sonde vor Einbau auf pH 4,0 und 7,0 kalibriert. In den mit allen Einbauten ausgestatteten Reaktor wurde anschließend ein konzentriertes Grundmedium für das spätere Gesamtvolumen von 15 L gefüllt. Bei der Festlegung des Vorlagevolumens (~13,6 L) wurden die nachträglich hinzuzufügenden Medienkomponenten und das Inokulum berücksichtigt. Das Grundmedium wurde im Reaktor für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Desweiteren erfolgte eine Dampfsterilisation von Gleitringdichtung, Boden- und Seitventil. Anschließend wurde das Medium auf die Kultivierungstemperatur 37 °C gekühlt und die separat sterilisierten Medienzusätze wurden aus einer sterilen Flasche in den Reaktor gepumpt. Die Sonde für die Gelöstsauerstoffkonzentration und

die Abgasanalytik wurden im Anschluss kalibriert. Zur Inokulation wurde 1 L Zellsuspension aus der Schüttelkolben-Vorkultur steril in den Reaktor zugeführt.

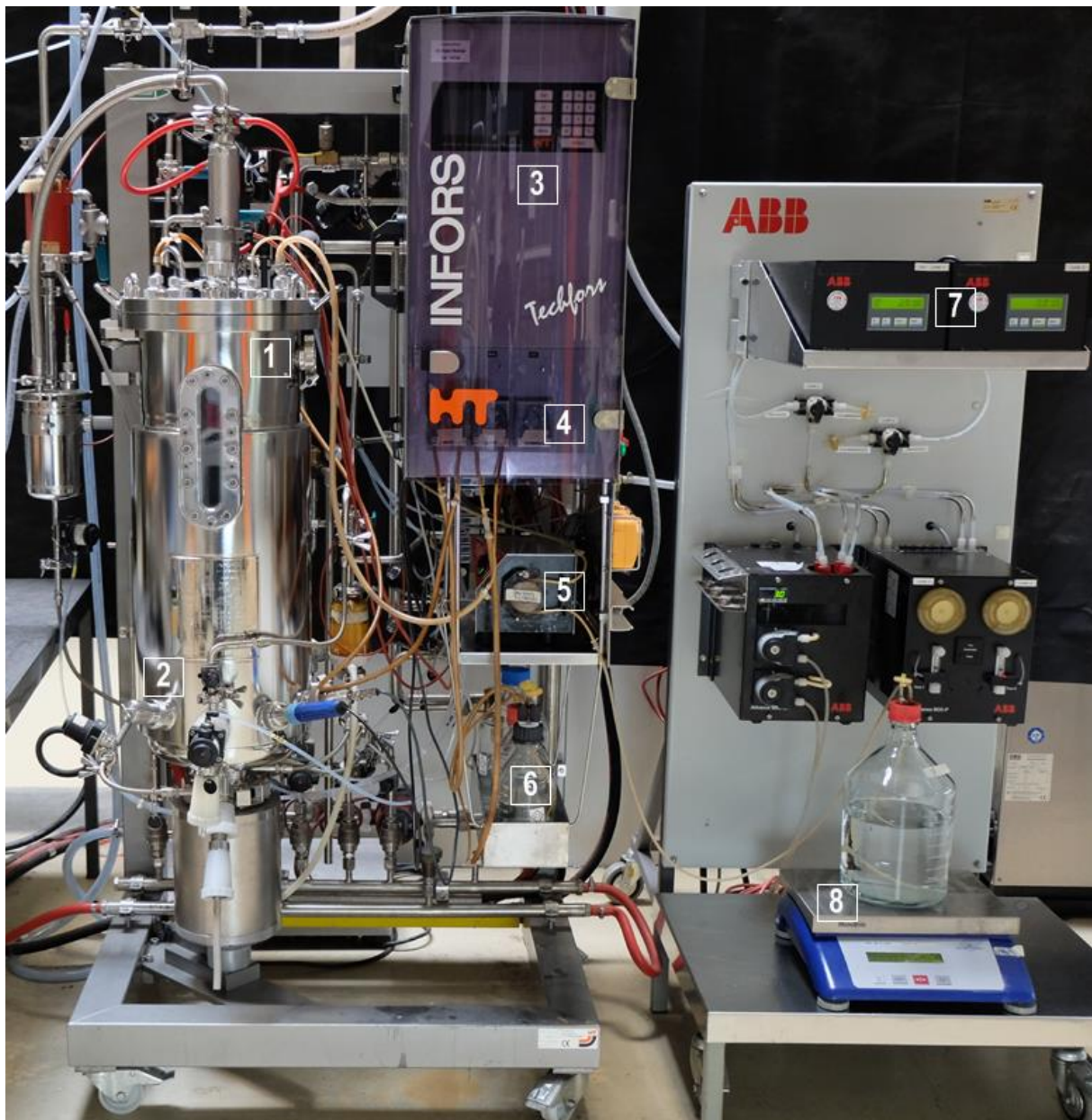


Abbildung 4.1: Versuchsaufbau für Zulaufkultivierungen im 15 L-Maßstab. 1: 42 L-Reaktor, 2: System zur schnellen Probenahme, 3: Steuereinheit, 4: Schlauchpumpen für Titrations- und Antischaummittel, 5: Schlauchpumpe zur Förderung des Zulaufmediums, 6: Vorlageflaschen für Säure, Base und Antischaummittel, 7: Abgasanalytikeinheit, 8: Zulaufmedium auf Analysenwaage.

Während des Prozesses wurde der pH auf 7,0 durch Zugabe von 42 % ortho-Phosphorsäure oder 25 % Ammoniak geregelt. Für die Sauerstoffsättigung wurde ein Minimalwert von 40 % festgelegt, der durch eine schrittweise Erhöhung der Rührerdrehzahl (50 min^{-1}) bis auf 1000 min^{-1} und anschließend eine schrittweise Steigerung der Begasung (5 L min^{-1}) bis auf 40 L min^{-1} erreicht wurde. Zusätzlich konnte eine Steigerung des Reaktor-Kopfdrucks die Sauerstoffsättigung erhöhen. Im Falle starker Schaumbildung, die zu einem Signal der Schaumsonde führte, wurde automatisiert eine 10 %ige

Lösung mit Antischaummittel (AF204) zugeführt. Alle Zulaufmedien standen während ihrer Zuführung auf Waagen, um die Volumenänderung im Detail verfolgen zu können.

Nach Verbrauch des Substrates der Satzphase (4 g L⁻¹ Glycerin) begann die exponentielle Zulaufphase, während der die Zulauftrate nach Gleichung 3.12 gesteuert wurde ($\mu_{\text{set}} = 0,1 \text{ h}^{-1}$). Abhängig von der Prozessstrategie wurden ein oder sequentiell zwei Zulaufmedien exponentiell zugeführt (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.3). Für die folgende konstante Zulaufphase wurde die Zulauftrate des letzten Zulaufmediums an eine anfängliche Substrataufnahmerate von $0,2 \text{ g}_{\text{Gly}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (L-Phenylalanin-Prozess und L-Tryptophan-Prozessstrategie 1) oder $0,4 \text{ g}_{\text{Gly}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (L-Tryptophan-Prozessstrategie 2) angepasst und im Folgenden volumetrisch konstant gehalten. Bei Kultivierung von transformierten Stämmen wurde zu Beginn dieser Zulaufphase 0,3 mM IPTG in das Medium hinzugefügt. In jedem Fall erfolgte zu diesem Zeitpunkt eine erneute Zugabe der zu Prozessbeginn vorliegenden Menge der Zusätze CaCl₂, MgSO₄, Thiamin und FeSO₄.

4.3.5 Parallelisierte Kurzzeitanalysen im Bioreaktorsystem

Für die Durchführung parallelisierter Kurzzeitanalysen im Bioreaktorsystem wurde das in Tabelle 10.10 und Abbildung 4.2 spezifizierte Vierfach-Parallelbioreaktorsystem verwendet. Es besteht aus vier einwandigen Glasreaktoren mit einem maximalen Arbeitsvolumen von jeweils 1 L, die in Vertiefungen in einer Temperiereinheit positioniert werden. Jeder Reaktor verfügt über zwei mit Schraubdeckeln verschlossene Seitenarme, von denen einer ein Septum enthält, über das mit Spritzen und Kanülen Zugaben möglich sind. Am Deckel jedes Reaktors sind über Durchführungen Sonden zur Messung von pH, Gelöstsauerstoff-Konzentration und Temperatur sowie zur Detektion von Schaum montiert. Außerdem stehen Luerlock-Anschlüsse am Reaktordeckel zur Verfügung und zusätzlich pro Reaktor vier Pumpen zur Zuführung von Säure, Base, Antischaummittel und Zulaufmedium. In jedem Reaktor ist ein Probenahmesystem zur schnellen Probenahme nach Hiller *et al.* (2007a) vorhanden. Ein Begasungsrohr führt zur Bildung von Gasblasen knapp über dem Reaktorboden, die über den Rührer mit zwei Sechsblasscheibenrührern dispergiert werden. Die Rührwelle wird von einem Elektromotor auf dem Reaktordeckel angetrieben. Die Ausstattung der vier Reaktoren wird ergänzt durch je eine Gasmischstation, die den Reaktor mit Druckluft, Stickstoff und Sauerstoff in beliebigem Verhältnis versorgt. Je eine Feinwaage dient der Verfolgung der Zulaufmedien-Zufuhr. Für die Steuerung, Regelung und Dokumentation von Prozessgrößen steht die Software DASGIP Control zur Verfügung.

Die pH-Sonden wurden vor dem Einbau in die Reaktoren auf pH 4,0 und 7,0 kalibriert. Die Reaktoren wurden mit je 400 mL Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle, Auxotrophiestoffe und Antibiotikum befüllt und an alle Anschlüsse des Reaktorsystems angeschlossen. Nach Temperierung auf 37 °C wurden die Sonden für die Gelöstsauerstoff-Konzentration und die Abgasanalytik-Einheiten durch Begasung mit Druckluft und Stickstoff kalibriert und der pH wurde auf 7,0 eingestellt. Während der

Kurzzeitanalyse wurden die Reaktoren mit 240 L h^{-1} 24 % O_2 begast und die Rührer mit einer Drehzahl von 1200 min^{-1} betrieben.

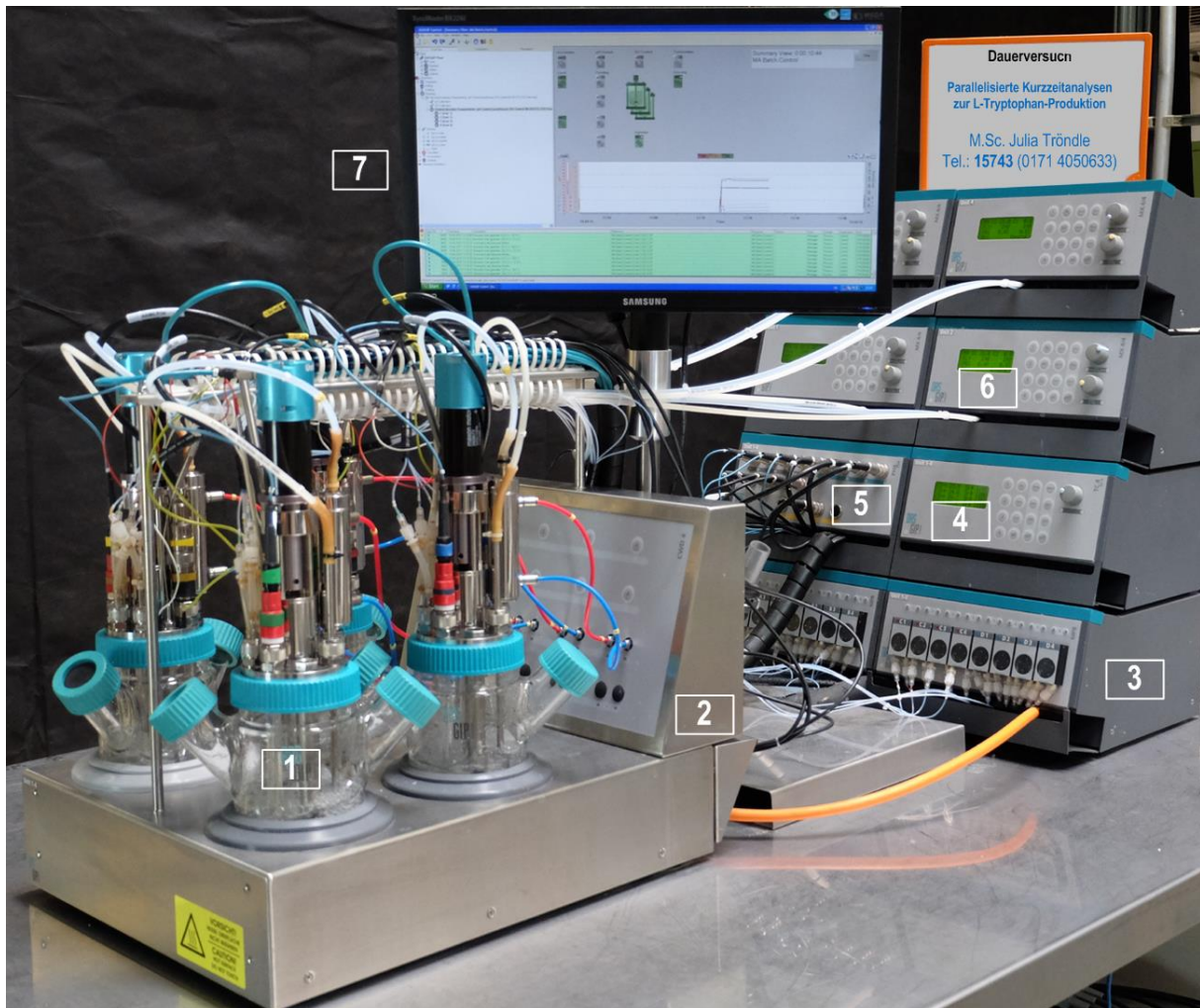


Abbildung 4.2: Versuchsaufbau des Vierfach-Parallelbioreaktorsystems zur metabolischen Analyse. 1: Rührkesselreaktor, 2: Heizblock, 3: Pumpeneinheit mit jeweils vier Schlauchpumpen für Säure, Base, Antischaummittel und Zulaufmedium, 4: Kontrolleinheit für Rührerdrehzahl und Temperatur, 5: Kontrolleinheit für pH und Gelöstsauerstoffkonzentration, 6: Gasmischstationen, 7: Monitor des Prozesscomputers.

Die parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen wurden mit der Methode des schnellen Mediumwechsels durchgeführt (Link *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2016). Die Vorgehensweise ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt. Dabei wurden 3,6 L Zellsuspension aus einem laufenden Produktionsprozess im 15 L-Maßstab während der konstanten Zulaufphase über das Bodenventil entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 3500 g, 7,5 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 400 mL temperiertem Minimalmedium ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig auf die vier vorbereiteten Reaktoren verteilt. Die Kurzzeitanalyse fand in den folgenden 19 min statt.

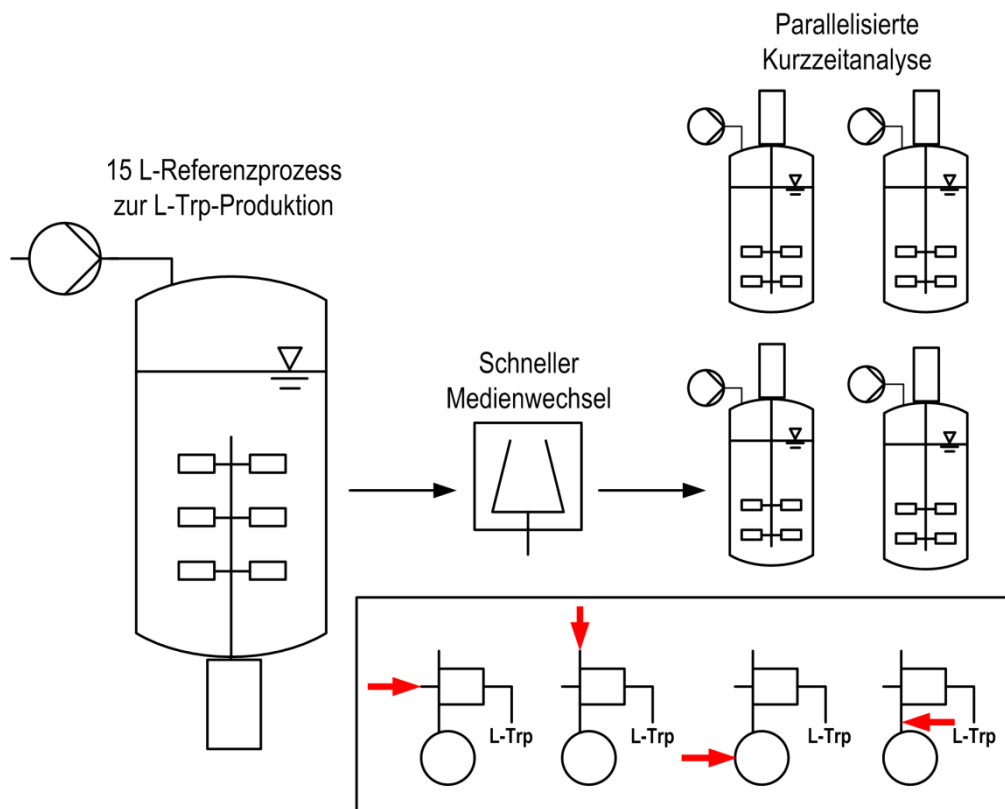


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Vorgehens zur Durchführung parallelierter metabolischer Analysen im Zulaufbetrieb.

In dieser Arbeit wurden Kurzeitanalysen mit drei verschiedenen Strategien durchgeführt:

- Kurzeitanalyse mit Phosphoenolpyruvat als Effektor: Glycerin und Glucose wurden als Zulaufsubstrat in jeweils zwei Reaktoren mit verschiedenen Zulaufraten verwendet, die in Tabelle 4.4 zusammengefasst sind. In alle Reaktoren wurden nach 9 min $\sim 1 \text{ g L}^{-1}$ Phosphoenolpyruvat als zusätzliches Substrat zugefügt. Aus jedem der vier Reaktoren wurden während der 19 min der Analyse sieben Proben mit schneller Probenahme in gleichmäßigen zeitlichen Abständen gewonnen und auf Eis in Gefäßen mit vorgekühlten Glasperlen gelagert.

Tabelle 4.4: Zulaufbedingungen in den vier Analysereaktoren während der parallelierten metabolischen Kurzeitanalyse mit Phosphoenolpyruvat als Effektor.

Analysenreaktor	1	2	3	4
Zulaufsubstrat	Glucose	Glucose	Glycerin	Glycerin
Konzentration im Zulaufmedium, g L^{-1}	54	54	86	86
Zulauftrate, mL h^{-1}	25	50	25	50

- Kurzeitanalyse im Satzbetrieb: Vor Inokulation wurden $3,7 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, $3,5 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin, $4,1 \text{ g L}^{-1}$ Succinat und $5,8 \text{ g L}^{-1}$ Pyruvat in jeweils einem Reaktor als Substrat vorgelegt. Die

Probenahmen erfolgten analog zur oben beschriebenen Analyse mit Phosphoenolpyruvat als Effektor.

- Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb: Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat wurden als Zulaufmedium in jeweils einem Reaktor verwendet. Die Zulaufraten in allen Reaktoren wurden nach jeweils 6 min erhöht, sodass drei verschiedene Zulaufstufen vorlagen. Dies ist schematisch in Abbildung 4.4 dargestellt, die Zulaufbedingungen sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Um für jede Zulaufstufe extrazelluläre Raten ermitteln zu können, wurden nach 1 min, 7 min, 13 min und 19 min parallel Proben aus allen Reaktoren für extrazelluläre Analytik genommen. Diese wurden unmittelbar auf Eis in Gefäßen mit vorgekühlten Glasperlen gelagert. Jeweils am Ende der Zulaufstufen (nach 6 min, 12 min und 18 min) wurden aus allen Reaktoren Proben für die intrazelluläre Metabolitquantifizierung wie in Kapitel 4.4 beschrieben gewonnen. Der Ablauf der Probenahmen ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Während der 19 min der Analyse wurden des Weiteren parallel zwei Proben zur intrazellulären Metabolitquantifizierung aus dem Referenzprozess entnommen.

Tabelle 4.5: Zulaufmedien und Zulaufraten in den vier Analysenreaktoren während der parallelisierten metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb.

Analysenreaktor	1	2	3	4
Zulaufsubstrat	Glucose	Glycerin	Succinat	Pyruvat
Konzentration im Zulaufmedium, g L ⁻¹	90	95	50	100
Zulaufrate 1, mL h ⁻¹	27	30	24	26
Zulaufrate 2, mL h ⁻¹	48	52	33	50
Zulaufrate 3, mL h ⁻¹	67	83	43	64

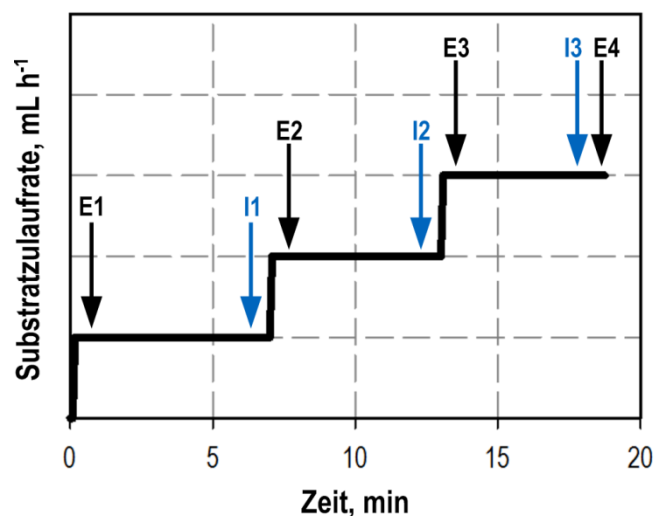


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Zulaufprofils während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb. Mit Pfeilen markiert sind die Zeitpunkte der Probenahmen für extrazelluläre (E1–E4) und intrazelluläre Analytik (I1–I3).

4.3.6 Gewinnung von U-¹³C-markiertem Zellextrakt

Die Gewinnung von U-¹³C-markiertem Zellextrakt erfolgte mit der von Weiner *et al.* (2015) beschriebenen Vorgehensweise, die eine Reduktion der Salzkonzentration im Extrakt erlaubt. Dabei werden die Zellen nacheinander im Schüttelkolben, im Vierfach-Parallelbioreaktorsystem (siehe Tabelle 10.10 und Kapitel 4.3.5) und im 48fach-Parallelbioreaktorsystem kultiviert, dessen Bestandteile in Tabelle 10.11 aufgeführt sind.

Anders als die oben beschriebene metabolische Kurzzeitanalyse wurde die Kultivierung im Vierfach-Parallelbioreaktorsystem hierbei steril durchgeführt. Dazu wurde ein zusammengebauter Reaktor mit Wasser befüllt autoklaviert (121 °C, 20 min) und das Wasser unter der Sterilbank gegen steriles Medium ausgetauscht, bevor der Reaktor angeschlossen wurde. Die Zulaufleitungen für Säure, Base und Antischaummittel wurden zuvor chemisch mit 70 % Ethanol, 2 M NaOH und sterilem VE-Wasser (Boschetti *et al.*, 1990) desinfiziert.

Im 48fach-Parallelbioreaktorsystem können bis zu 48 Einwegreaktoren mit einem Volumen zwischen 8 und 16 mL betrieben werden, wobei die Temperierung über eine umgebende Temperiereinheit erfolgt. In einer Deckeleinheit lagernd befindet sich für jeden Reaktor ein magnetisch betriebener Rührer auf einer Hohlachse, über die Gas eingetragen wird. In der Deckeleinheit ist zudem für jeden Reaktor eine Durchführung vorhanden, die die manuelle Zugabe und Entnahme von Flüssigkeiten erlaubt. Die Einwegreaktoren enthalten am Reaktorboden immobilisierte chemische Sensoren zur Messung von pH und Gelöstsauerstoffkonzentration, deren optische Signale von Sensorriegeln unter den Reaktoren ausgelesen werden.

Als Medium zur Kultivierung in Schüttelkolben und im Vierfach-Parallelbioreaktorsystem wurde Minimalmedium verwendet (Tabelle 4.2), im 48fach-Parallelbioreaktorsystem der in Kapitel 4.2 aufgeführte Kalium-Phosphat-Puffer. Einzige Kohlenstoffquelle während der gesamten Prozedur war U-¹³C-Glucose, die als 330 g L⁻¹ Lösung autoklaviert und jeweils bei Inokulation dem Medium hinzugefügt wurde.

Bei der eigentlichen Durchführung wurden zunächst zwei 500 mL Schüttelkolben mit je 100 mL Minimalmedium und 5 g L⁻¹ U-¹³C-Glucose mit *E. coli* NT367 pF112*aroFBL*_{kan} angeimpft und 14 h bei 37 °C und 250 min⁻¹ inkubiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (10 min, 3200 g), in sterilem PBS resuspendiert und in einen Reaktor des Vierfach-Parallelbioreaktorsystems mit 500 mL Medium und 7 g L⁻¹ U-¹³C-Glucose überführt. Hier wurden die Zellen bei 37 °C bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose kultiviert, wobei durch Erhöhung der Rührerdrehzahl eine Gelöstsauerstoffkonzentration von mindestens 40 % aufrechterhalten wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (10 min, 3200 g), in Kalium-Phosphat-Puffer resuspendiert und gleichmäßig auf acht Reaktoren des 48fach-Parallelbioreaktorsystems aufgeteilt. In jedem Reaktor lagen dabei 10 mL Kalium-Phosphat-Puffer vor und es wurden 200 µL U-¹³C-Glucose-Lösung zugegeben. Die Reaktoren

wurden mit 30 %igem Sauerstoff ($4,8 \text{ L h}^{-1}$) begast, mit 2800 min^{-1} gerührt und auf 37 °C temperiert. Der Kopfraum wurde auf 4 °C gekühlt. Die Zugabe von Säure, Base und Antischaummittel erfolgte mittels Spritzen und Kanülen. Bei vollständigem Substratverbrauch wurde die Zellsuspension unmittelbar extrahiert, wofür der Inhalt jedes Einwegreaktors in jeweils $24 \text{ mL } 95 \text{ °C}$ Extraktionspuffer (30 mM TEA , $\text{pH } 7$) 5 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die Lösung auf Eis abgekühlt und zur Entfernung von Zelltrümmern abzentrifugiert. 6 mL Aliquots des Überstandes wurden 36 h gefriergetrocknet und in hochreinem Wasser resuspendiert. Die Konzentrationen der Metabolite im Extrakt wurden über Standardaddition mit ^{12}C -Standards massenspektrometrisch ermittelt.

4.4 Probenahme und Aufarbeitung zur intrazellulären Analytik

Für Probenahmen zur intrazellulären Metabolitquantifizierung wurden Probenahmerohre mit Innenrohr (Hiller *et al.*, 2007a; Weiner, 2015) verwendet. Sie wurden mit jeweils 25 mL Inaktivierungslösung (30 mM TEA in $\text{MeOH/VE } 60:40 \text{ (v/v)}$) befüllt und im Kryostaten auf -70 °C gekühlt. Direkt vor den Probenahmen wurde mittels einer Vakuumpumpe der Druck in den benötigten Rohren auf $0,15 \text{ bar}$ reduziert. Mit diesem Probenahmesystem werden Zellen bei den Probenahmen in der Inaktivierungslösung fein dispergiert und der Stoffwechsel somit sofort gestoppt. Die Mischungen aus Inaktivierungslösung und Proben wurden unmittelbar in vorgekühlten 50 mL Probengefäßen in -20 °C Ethanol-Eisbädern gelagert. Von jeder dieser Proben wurde eine Extraktion im Dreifachansatz durchgeführt. Dazu wurde je 1 mL Probe in $2 \text{ mL } 95 \text{ °C}$ Extraktionspuffer (30 mM TEA , $\text{pH } 7$) für 5 min extrahiert. Von den drei parallelen Extraktionen einer Probe blieb eine ohne Zusatz, den anderen beiden wurden jeweils $350 \text{ }\mu\text{L}$ $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Zellextrakt in unterschiedlicher Verdünnung (unverdünnt und $1:10$ verdünnt) hinzugefügt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (20 min , 4 °C , 3200 g) und der Überstand bei -60 °C bis zur massenspektrometrischen Vermessung im Doppelansatz gelagert.

4.5 Analytische Methoden

Proben zur Ermittlung von Biotrockenmasse und optischer Dichte, sowie zur Quantifizierung extrazellulärer Metabolite aus dem 15 L-Produktionsprozess und dem Vierfach-Parallelbioreaktorsystem wurden über das System zur schnellen Probenahme (Hiller *et al.*, 2007a) mit Rohren ohne Innenrohr gewonnen (Druck 0,7 bar). Aus Schüttelkolben wurden Proben mit einer Pipette unter der Sterilbank genommen. Alle Proben wurden auf Eis gelagert. Für die Analyse mittels verschiedener HPLC (*high performance liquid chromatography*)-Methoden wurden die Proben abzentrifugiert (43171 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße). Bei allen HPLC-Methoden erfolgte die Quantifizierung über Standardlösungen und den Vergleich von Flächenintegralen.

4.5.1 Bestimmung von optischer Dichte und Biotrockenmasse

Die optische Dichte von Zellsuspensionen wurde im Dreifachansatz bei 600 nm in einem Einstrahlphotometer bestimmt. Die Messung erfolgte in 1 mL Küvetten, und die Zellsuspension wurde bei Bedarf mit PBS-Puffer verdünnt, um Messwerte im linearen Bereich zwischen 0,050 und 0,300 zu erhalten. Zum Nullwert-Abgleich wurde PBS-Puffer verwendet.

Die Ermittlung der Biotrockenmasse (BTM) wurde im Dreifachansatz in 2 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt, die zuvor leer bei 80 °C getrocknet und gewogen wurden. Je 2 mL Probe wurden in einem Gefäß abzentrifugiert (20 min, 13000 min⁻¹) und der Überstand verworfen. Das Gefäß mit Zellpellet wurde erneut getrocknet und gewogen, sodass aus der Differenz zur vorher bestimmten Masse die Biotrockenmasse direkt ermittelt werden konnte.

4.5.2 HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Phosphoenolpyruvat

Extrazelluläre Konzentrationen an Phosphoenolpyruvat wurden in Duplikaten mit der in Tabelle 10.6 aufgeführten HPLC-Anlage von Thermo Finnigan quantifiziert. Als Trennsäule diente eine Hibar 125-4 Purospher STAR (Merck) bei 40 °C. Bei 1 mL min⁻¹ Flussrate wurden 20 µL Probe injiziert und zur Auftrennung folgender Gradient der Laufmittel A (30 mM K₂HPO₄, 5 mM Tetrabutylammonium Hydrogensulfat, pH 6,0) und B (100 % Acetonitril) angewandt: 0–10 min 100% A, 22 min 50% A, 25–30 min 100% A. Die Detektion von Phosphoenolpyruvat während der 30-minütigen Messungen erfolgte im UV-Bereich bei 226 nm.

4.5.3 HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Aminosäuren

Aminosäuren im Medium wurden mit einer HPLC-Anlage von Knauer in Kombination mit einem Fluoreszenzdetektor von Shimadzu über Anregung bei 340 nm und Emission bei 450 nm quantifiziert. Die Anlage ist in Tabelle 10.3 spezifiziert. Für die Fluoreszenzdetektion wurden die Aminosäuren

unmittelbar vor Injektion vom Probengeber, der auf 6 °C temperiert war, derivatisiert. Die Derivatisierung erfolgte mit ortho-Phtaldialdehyd (OPA), Mercaptopropionsäure (MCS) und Iodessigsäure (IES), die zur Stabilisierung in einem 40 mM Bicinpuffer (pH 10,2) vorlagen. Zunächst wurden 10 µL Probe mit 658 µL einer 0,3 mM MCS-Lösung in einem Zielprobengefäß gemischt. Anschließend wurden 20 µL IES-Lösung (3,5 mM) hinzugefügt und durch mehrmaliges Aufziehen und Abgeben gemischt. Es folgte die Zugabe von 70 µL OPA-Lösung (11 mM in Bicin/MeOH/MCS 92,8:7,1:0,1 (v/v/v)) und erneutes Mischen. 20 µL der resultierenden Lösung wurden auf eine Gemini-C18-Säule (Phenomenex) injiziert, auf der die chromatographische Auftrennung bei 40 °C über 43 min Messdauer erfolgte. Bei 1 mL min⁻¹ Flussrate wurde dazu ein Gradient aus Laufmittel A (40 mM NaH₂PO₄, pH 7,6) und Laufmittel B (MeOH/Acetonitril/VE 45:45:10 (v/v/v)) angelegt. Das Profil kann Tabelle 10.4 im Anhang entnommen werden.

4.5.4 HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Säuren, Alkoholen und Zuckern

Organische Säuren, Alkohole und Zucker in Kulturüberständen wurden mit einer HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies, deren Bestandteile in Tabelle 10.5 aufgeführt sind, quantifiziert. Bei einem isokratischen Fluss von 0,7 mL min⁻¹ 5 mM H₂SO₄ wurden die Proben mit einer Aminex HPX-87H Säule (BioRad) bei 60 °C aufgetrennt. Es wurden jeweils 20 µl Probenvolumen injiziert, und über 35 min Messdauer die Komponenten mit einem Brechungsindex-Detektor bei 950 nm detektiert.

4.5.5 Enzymatische Quantifizierung von Glucose und Ammoniak

Der Ammoniakgehalt der Proben aus den 15 L-Produktionsprozessen wurde mit einem Präparat der Firma Boehringer Mannheim (Art.-Nr. 11112732035) bestimmt, dessen Messprinzip auf einer Absorptionsmessung bei 340 nm beruht. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben, jedoch in 10 % des angegebenen Volumens und in Mikrotiterplatten. Dazu wurde die Lösung des Enzyms 1:5 mit dem enthaltenen Triethanolamin-Puffer verdünnt. Zur Quantifizierung wurden bei der Messung eine Verdünnungsreihe der enthaltenen Standardlösung und bidestilliertes Wasser als Leerwert mitgeführt. Alle Proben wurden entsprechend der Konzentrationen in den Standards verdünnt. Standards, Leerwert und Proben wurden jeweils im Zweifach-Ansatz mit einem Mikrotiterplatten-Photometer von Thermo Fisher vermessen.

Analog zur Ammoniakbestimmung erfolgte die enzymatische Quantifizierung von Glucose in den Proben der metabolischen Kurzzeitanalysen mit einem Produkt der Firma Boehringer Mannheim (Art.-Nr. 10716251035) über eine Absorptionsmessung bei 340 nm. Für die Durchführung in Mikrotiterplatten, im gegenüber den Herstellerangaben auf 10 % verkleinerten Maßstab, wurde die Enzym-Suspension vor Verwendung 1:20 mit dem enthaltenen Triethanolamin-Puffer verdünnt. Um eine Quantifizierung von Glucose in den Proben zu ermöglichen, wurde eine Verdünnungsreihe der enthaltenen Standardlösung und VE-H₂O als Leerwert bei der Messung mitgeführt. Außerdem wurden

alle Proben bei Bedarf verdünnt, um Konzentrationen im Bereich der Standard-Reihe zu erhalten. Standards, Leerwert und Proben wurden im Zweifach-Ansatz vermessen.

4.5.6 Massenspektrometrische Quantifizierung intrazellulärer Metabolite

Die Quantifizierung intrazellulärer Metabolite erfolgte mit einer UHPLC-MS/MS-Methode, die nach Büscher *et al.* (2010) adaptiert wurde. Die Komponenten der verwendeten LC-MS-Anlage können Tabelle 10.7 entnommen werden. Vom Probengeber, auf 8 °C temperiert, wurden 20 µL der Probe injiziert und chromatographisch von einer Acquity HSS T3 Säule bei 40 °C mit einem Gradienten aus Laufmittel A (10 mM Tributylamin, 15 mM Essigsäure, 5 % (v/v) MeOH) und Laufmittel B (2-Propanol) aufgetrennt. Alle Bestandteile der Laufmittel wurden in hochreiner MS-Qualität verwendet und das Laufmittel nach Link *et al.* (2012) vorbereitet. Das Gradienten-Profil während der 36minütigen Messung kann Tabelle 10.8 im Anhang entnommen werden. Die Ionisation am Eingang des Massenspektrometers TSQ Vantage erfolgte mittels Elektronenspray bei einer Spray Voltage von 2,0 kV und 400 °C Vaporizer-Temperatur. Die Kapillare wurde auf 380 °C temperiert, der Sheath Gas Pressure betrug 5,0 und der Aux Gas Pressure 20,0. Die für die Messung ausgewählten Amplituden der S-Lens wurden zuvor durch die direkte Injektion einzelner Metabolite und die Optimierung dieser Größe für die jeweiligen m/z-Werte ausgewählt und in zwei Zeitsegmente aufgeteilt. Während der Messung wurden negativ geladene Ionen detektiert. Für Messung und Auswertung wurde die Software Excalibur 2.2 verwendet. Wann immer möglich, erfolgte die Quantifizierung über einen internen ¹³C-markierten Standard. Andernfalls wurde auf eine externe Kalibrierung zurückgegriffen.

4.6 Toolboxen zur theoretischen Analyse von Stoffwechselnetzwerken

Flussbilanzanalysen, Flussvarianzanalysen und geometrische Flussbilanzanalysen zur Abschätzung intrazellulärer Stoffflussverteilungen wurden in MATLAB® 2013b mit der COBRA-Toolbox 2.0 (Schellenberger *et al.*, 2011) auf Grundlage des genomweiten *E. coli* Modells iAF1260 (Feist *et al.*, 2007) aus der BiGG Datenbank (Schellenberger *et al.*, 2010) durchgeführt. Zur Anpassung des Modells an die genetischen Eigenschaften der vorliegenden Stämme wurde die L-Tryptophan-abbauende Reaktion *trps2* als Nullfluss definiert. Der vorliegende aerobe Stoffwechsel rechtfertigte dieselbe Maßnahme für die Reaktion der anaeroben Glycerin-Dehydrogenase. Die im Modell doppelt vorhandene Beschreibung der letzten beiden Schritte der L-Tryptophan-Biosynthese, einmal in zwei Reaktionen (*trps 2* und *trps 3*) und einmal in einer Reaktion (*trps 1*) kombiniert, machte eine Deletion der Einzelreaktion *trps1* notwendig, um scheinbare Varianzen zu verhindern. Weiterhin wurden durch vorgegebene Nullflüsse der Reaktionen Phosphopentomutase, AcetylCoA-Synthetase, Fumarat-Reduktase und L-Aspartase Zyklen mit hohen Flüssen im Bereich der Biosynthese von PRPP und dem Citratzyklus vermieden. Die beschriebene Inaktivität der *f6pa* (Schürmann und Sprenger, 2001) bei Verwendung von Glycerin und der *malic enzymes* bei der Produktion aromatischer Aminosäuren (Weiner *et al.*, 2014a) wurde durch entsprechende Nullflüsse berücksichtigt. Für plausible Übereinstimmungen zwischen Stoffflüssen und Metabolit-Konzentrationen wurde die Reaktionsrichtung der *tkt1* im Pentose-Phosphat-Weg in Richtung des Verbrauchs von R5P mit einem geringen Fluss festgelegt. Als Randbedingungen wurden für jede Berechnung die experimentell bestimmten extrazellulären Raten für Substrataufnahme, Produktbildung und Nebenproduktbildungen vorgegeben. Als Zielfunktion der linearen Optimierung wurde in der Regel die Biomassebildung verwendet, für die Ermittlung theoretischer Produktionsmaxima die Produktbildungsrate. Um durch die Flussvarianzanalysen den gesamten Bereich der experimentell ermittelten Werte mit ihren Unsicherheiten abzudecken, wurden für jede Bedingung mehrere Berechnungen mit allen Kombinationsmöglichkeiten aus den jeweiligen Minimal- und Maximalwerten der gemessenen Raten mit einem Varianzkriterium von 99,9 % durchgeführt. Für die Ermittlung von Respirationskoeffizienten (RQ) für unterschiedliche Kohlenstoffquellen wurde eine hohe Aufnahme rate des jeweiligen Substrates als einziger extrazellulärer Fluss vorgegeben und die Wachstumsrate als Optimierungskriterium gewählt.

Die thermodynamische Analyse des Stoffwechselnetzwerkes erfolgte mit der anNET Toolbox (Zamboni *et al.*, 2008). Im Modell wurden alle relevanten Reaktionen des Zentralstoffwechsels und der Aromatenbiosynthese berücksichtigt (siehe Tabelle 10.21). Der für alle Konzentrationen intrazellulärer Metabolite vorgegebene Ausgangsbereich betrug 0,1 μM –10 mM. Dieser wurde wann immer möglich durch gemessene Werte eingegrenzt. Weiterhin wurden der intrazelluläre pH auf 7,6 und die Ionenstärke auf 0,15 M festgelegt (Kümmel *et al.*, 2006). Die Verhältnisse von NADH/NAD

und NADPH/NADP wurden auf den Bereich zwischen 0,001 und 0,200 beschränkt, der ‚*energy charge*‘ auf Werte von 0,5 bis 1,0. Dies geschah analog zu den Arbeiten von Link (2010) und Weiner (2015). Die Vorgabe der Reaktionsrichtungen erfolgte anhand der mittels Flussbilanzanalysen berechneten Daten. Thermodynamische Informationen über Gibbs’sche Bildungsenergien der beteiligten Metabolite wurden aus der Datenbank eQuilibrator (Flamholz *et al.*, 2012) bezogen.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Analyse der L-Phenylalanin-Synthese mittels eines PEP-Transporter-Stammes*

Üblicherweise beruht die metabolische Analyse von Mikroorganismen auf der Auslenkung des Metabolismus durch ein Substrat und der Beobachtung der darauf folgenden Stoffwechselreaktionen (siehe Kapitel 3.3). Um einen messbaren Effekt der Auslenkung zu erzielen, ist eine hohe Aufnahme des Substrats zur Anregung des Stoffwechsels durch die Zellen nötig. Dadurch wird die Auswahl möglicher Auslenkungsgrößen zunächst auf Substrate begrenzt, die von den Zellen natürlicherweise aufgenommen und verstoffwechselt werden. Um gezielte Auslenkungen im Stoffwechsel abseits des Zentralstoffwechsels zu erzielen, ist jedoch die Verwendung nicht-natürlicher Substrate zur Anregung des Stoffwechsels von Interesse. Hierfür ist die Integration spezifischer Transporter für die gewünschten Substrate in die jeweiligen Stämme notwendig.

Die Anwendung dieses neuen Konzeptes erfolgt am Beispiel der L-Phenylalanin-Herstellung mit *E. coli*. Ein Metabolit von besonderem Interesse ist dabei Phosphoenolpyruvat (PEP), da innerhalb des Biosyntheseweges der aromatischen Aminosäuren für jedes gebildete Molekül L-Phenylalanin zwei Moleküle PEP verbraucht werden. Die potentielle Aufnahme von PEP würde dabei eine direkte Beeinflussung der Biosynthese des Produktes L-Phenylalanin ermöglichen. Vom Projektpartner wurde hierfür ein *E. coli* Stamm zur Verfügung gestellt, der auf dem etablierten Produktionsstamm *E. coli* FUS4 pF81_{kan} beruht (Weiner *et al.*, 2014b) und zusätzlich ein Gen für einen PEP-spezifischen Transporter trägt (*UhpT-D388C*) (Albermann *et al.*, 2014). Der Zuckerphosphat-Transporter UhpT aus *E. coli* wird dabei durch die Änderung einer Aminosäure selektiv für PEP.

5.1.1 Aufnahme von PEP durch L-Phenylalanin-Produktionsstämme

Zunächst wurde die Aufnahme von PEP durch L-Phenylalanin produzierende Zellen ohne (*E. coli* FUS4 pF81_{kan}) und mit PEP-Transporter (*E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan}) anhand paralleler Kultivierungen in Schüttelkolben verglichen (siehe Abbildung 5.1). 500 mL Kolben mit je 100 mL Minimalmedium mit 10 g L⁻¹ Glycerin wurden inokuliert, und nach Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,5 wurde 0,3 mM IPTG hinzugefügt, um die Produktbildung und die Bildung des Transporters zu induzieren. Nach 13 h wurde PEP im Überschuss (~2 g L⁻¹) hinzugegeben. Im Kolben mit den Zellen ohne Transporter (*E. coli* FUS4 pF81_{kan}) nahm die PEP-Konzentration um 0,4 g L⁻¹ leicht ab und erreicht nach 5 h 2,0 g L⁻¹. Im Kolben mit den Zellen mit chromosomal integriertem PEP-Transporter-Gen (*E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan}) war hingegen eine lineare Abnahme der PEP-Konzentration bis auf 0,4 g L⁻¹ in den ersten 2 h nach der PEP-Zugabe zu beobachten. Im Anschluss nahm die Konzentration weiter ab und erreichte nach 5 h 0,2 g L⁻¹. Während der Zeit der

* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Tröndle J, Albermann C, Weiner M, Sprenger GA, Weuster-Botz D (2018): Phosphoenolpyruvate Transporter Enables Targeted Perturbation During Metabolic Analysis of L-Phenylalanin Production with *Escherichia coli*. *Biotechnol J* 13(5):1700611. doi: 10.1002/biot.201700611

PEP-Aufnahme blieb die optische Dichte (600 nm) von *E. coli* FUS4 pF81_{kan} konstant bei 4,5, wohingegen die optische Dichte (600 nm) von *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} von 4,0 auf 4,5 zunahm.

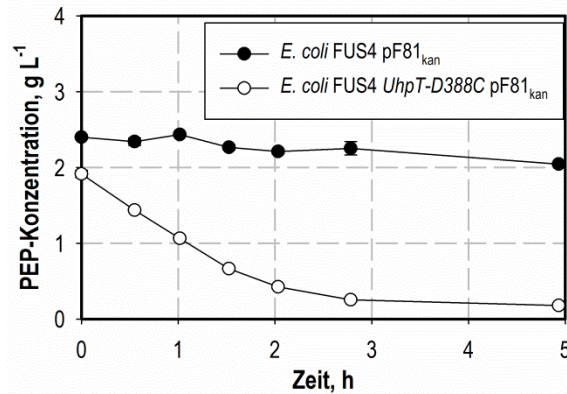


Abbildung 5.1: PEP-Konzentrationen bei Satzkultivierungen von *E. coli* ohne und mit PEP-Transporter in Schüttelkolben. *E. coli* FUS4 pF81_{kan} (●) und *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} (○) mit PEP als Kohlenstoffquelle.

Diese Satzexperimente zeigen, dass die Expression des Transporters *UhpT-D388C* zu einer deutlichen Erhöhung der Aufnahme von extrazellulärem PEP führt und auf diese Weise PEP als extrazelluläre Kohlenstoffquelle verfügbar wird. Dies entspricht früheren Ergebnissen mit anderen *E. coli* Stämmen (Albermann *et al.*, 2014) und bestätigt eine wichtige Voraussetzung für die Anwendbarkeit von PEP als Substrat während metabolischer Analysen.

5.1.2 15 L-Produktionsprozess mit PEP-Transporter-Stamm

Für *E. coli* FUS4 pF81_{kan} ist ein Produktionsprozess im 15 L-Maßstab mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle etabliert und vielfach reproduziert (siehe Kapitel 3.1.3).

Das Prozessverhalten von *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} wurde mit der für den Stamm ohne Transporter etablierten Prozessstrategie charakterisiert. Ein beispielhafter Zulaufprozess mit *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} ist in Abbildung 5.2 anhand der Konzentrationsverläufe von Biotrockenmasse, L-Phenylalanin, Acetat, Ammonium, Glycerin und L-Tyrosin (auxotrophe Aminosäure) dargestellt.

Der exponentielle substratlimitierende Zulauf wurde nach dem Verbrauch der initial zugegebenen Kohlenstoffquelle Glycerin (4,2 g L⁻¹) bei 10,6 h Prozesszeit gestartet. Eine Wachstumsrate von 0,09 h⁻¹ (Zielwert 0,10 h⁻¹) wurde während der folgenden Biomassebildungsphase erreicht, die bis 41,4 h Prozesszeit andauerte und an deren Ende 23,4 g L⁻¹ Biotrockenmasse vorlagen.

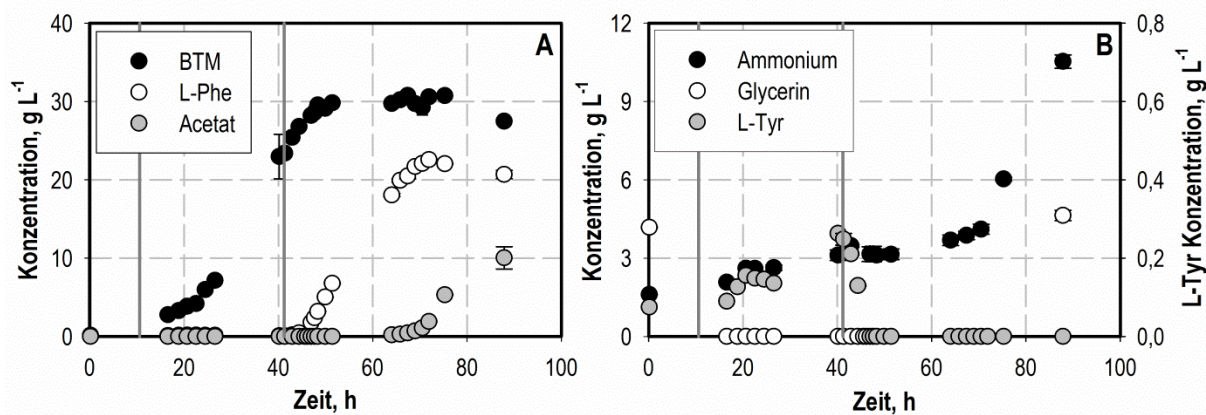


Abbildung 5.2: L-Phenylalanin-Produktionsprozess im 15 L-Maßstab mit *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan}. A: Konzentrationsverläufe von Biotrockenmasse (BTM ●), L-Phenylalanin (L-Phe ○) und Acetat (○). B: Konzentrationsverläufe von Ammonium (●), Glycerin (○) und L-Tyrosin (L-Tyr ○). Die erste vertikale durchgezogene Linie kennzeichnet das Ende der Satzphase (10,6 h), die zweite vertikale durchgezogene Linie markiert den Beginn der Produktbildungsphase durch Zugabe von 0,3 mM IPTG (41,2 h).

Anschließend wurden 0,3 mM IPTG hinzugefügt, um die Proteinexpression für die L-Phenylalanin-Produktion und den PEP-Transporter zu induzieren. Gleichzeitig wurde die konstante Zulaufphase mit einer Rate von $0,2 \text{ g}_{\text{Gly}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ initiiert. Das zum Zeitpunkt der Induktion im Medium vorliegende L-Tyrosin ($0,25 \text{ g L}^{-1}$) ermöglichte dem auxotrophen Stamm eine weitere Steigerung der Biotrockenmasse-Konzentration bis auf $29,5 \text{ g L}^{-1}$ nach 48,4 h Prozesszeit. Mit Induktion begann die Bildung des Produktes L-Phenylalanin, welche bis 71,9 h anhielt und zur maximalen Produktkonzentration $22,6 \text{ g L}^{-1}$ führte. Die höchste Produktbildungsrate $40 \text{ mg}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde dabei aufgrund des inhibierenden Effekts von L-Tyrosin auf die Produktion von L-Phenylalanin nach dem Verbrauch von L-Tyrosin erreicht (48,4 h). Ab dem Ende der Produktbildungsphase (64,0 h) wurde Acetat als Nebenprodukt gebildet, das bei Prozessende (87,9 h) mit $10,1 \text{ g L}^{-1}$ vorlag. Zeitgleich akkumulierte die Stickstoffquelle Ammonium im Medium, da die Zufuhr über das Zulaufmedium konstant blieb und die Zufuhr als Base zunahm, während der Verbrauch durch die Zellen abnahm. Am Ende des Prozesses lagen $10,5 \text{ g L}^{-1}$ Ammonium im Medium vor, und $4,6 \text{ g L}^{-1}$ der Kohlenstoffquelle Glycerin akkumulierten.

Ein Vergleich wichtiger Prozessgrößen der Zulaufprozesse mit *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} (Abbildung 5.2) und *E. coli* FUS4 pF81_{kan} (dargestellt in Weiner *et al.*, 2016) ist in Tabelle 5.1 aufgeführt. Er zeigt, dass die zusätzliche Überexpression des PEP-Transporters im L-Phenylalanin-Produktionsstamm keine signifikante Auswirkung auf das Prozessverhalten hatte: Während der Stamm mit Transporter innerhalb der 30 h Produktbildungsphase die maximale L-Phenylalanin-Konzentration $22,6 \text{ g L}^{-1}$ und die maximale Produktbildungsrate $40 \text{ mg}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreichte, lagen die entsprechenden Werte für den Basisstamm ohne Transporter bei maximal $22,8 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ L}^{-1}$, $34 \text{ mg}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und 31 h Produktbildungsdauer. Die Prozessverläufe waren vergleichbar. Beispielsweise wurde die kürzere Produktbildungsdauer des Stammes mit Transporter durch die

höhere Produktbildungsrate ausgeglichen, sodass nahezu identische Produktkonzentrationen erreicht wurden. Insgesamt konnten keine signifikanten Änderungen des Prozesses durch Verwendung des Stammes mit PEP-Transporter *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} beobachtet werden.

Tabelle 5.1: Vergleich wichtiger Prozessgrößen zur Produktion von L-Phenylalanin im 15 L-Maßstab mit *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} (FUS4 *UhpT-D388C*) und *E. coli* FUS4 pF81_{kan} (FUS4). Mit * markierte Daten stammen von Weiner *et al.* (2016).

	FUS4 <i>UhpT-D388C</i>	FUS4*
max. L-Phe Konzentration, g L ⁻¹	22,6	22,8*
max. L-Phe Bildungsrate, mg g _{BTM} ⁻¹ h ⁻¹	40 ± 2	34 ± 4*
Produktbildungsdauer, h	30	31*
max. Biotrockenmasse, g L ⁻¹	29,5	30,2*

5.1.3 Metabolische Analyse der L-Phenylalanin-Produktion mit PEP als Effektor

Eine Variante der parallelisierten Kurzzeitanalysen mit Phosphoenolpyruvat als Effektor (siehe Kapitel 4.3.5) wurde zur Analyse der L-Phenylalanin-Produktion mit *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} verwendet. 3,6 L Zellsuspension wurden aus dem L-Phenylalanin-Produktionsprozess 6 h nach Induktion entnommen, abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und die Zellen gleichmäßig auf die vier Reaktoren des Parallelbioreaktorsystems verteilt. 86 g L⁻¹ Glycerin und 54 g L⁻¹ Glucose wurden in jeweils zwei Reaktoren als Zulaufmedium verwendet, wobei sich die beiden Reaktoren mit derselben Kohlenstoffquelle in der Zulauftrate unterschieden, sodass in allen vier Reaktoren unterschiedliche Bedingungen vorlagen. Diese sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Die Zulauftraten wurden in allen Ansätzen während der gesamten 19 min der Kurzzeitanalyse konstant gehalten. PEP wurde nach 9 min allen Reaktoren als Substrat mit der Zielkonzentration 1 g L⁻¹ hinzugefügt. Dieses Vorgehen ermöglicht eine direkte Beobachtung des Effekts, den PEP unter den verschiedenen Bedingungen auf den Metabolismus der Zellen ausübt.

Diese metabolische Analyse wurde während eines L-Phenylalanin-Produktionsprozesses analog zu Abschnitt 5.1.2 durchgeführt. Abbildung 5.3 (A und B) zeigt die Verläufe der Atmungsraten, O₂-Aufnahmerate (OUR) und CO₂-Produktionsrate (CPR), die in den vier Reaktoren des Parallel-Bioreaktorsystems während der 19 minütigen metabolischen Analyse gemessen wurden. Wie in Vorarbeiten bereits gezeigt (siehe Kapitel 3.3.1), stellten sich metabolische Fließgleichgewichte nach ca. 6 min ein, was sich in konstanten Werten der Atmungsraten widerspiegelt. Im Ansatz mit niedriger Glucose-Zufuhr wurde nach 5 min eine OUR von 1,8 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ und eine CPR von 1,9 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ erreicht. Bei höherer Glucose-Zufuhr ergaben sich hingegen höhere Atmungsraten (OUR = 3,6 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ und CPR = 3,9 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹) bei einem gleichbleibenden Respirationskoeffizienten (RQ) von 1,1. In den Reaktoren mit Glycerin als Kohlenstoffquelle

(Abbildung 5.3 B) war der $RQ < 1$, und die höhere Zulauftrate verursachte wiederum höhere Atmungsraten ($OUR = 3,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $6,1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $CPR = 2,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $4,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Die Zugabe von PEP in die vier parallelen Reaktoren 9 min nach Beginn der Kurzzeitanalyse ist in Abbildung 5.3 durch einen vertikalen durchgezogenen Strich gekennzeichnet.

Die Zugabe verursachte die Ausbildung neuer metabolischer Fließgleichgewichte nach rund 5 min, also 14 min nach Beginn der metabolischen Analyse. Im Allgemeinen stiegen alle Atmungsraten nach der Zugabe von PEP. Die größten Änderungen wurden im Reaktor mit niedriger Glucose-Zufuhr beobachtet ($\Delta OUR = 0,7 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $\Delta CPR = 1,2 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die Änderungen im Reaktor mit niedriger Glycerin-Zufuhr waren weniger stark ausgeprägt ($\Delta OUR = 0,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $\Delta CPR = 0,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Der Reaktor mit hoher Glucose-Zufuhr zeigte eine kleinere Änderung des OUR als des CPR ($\Delta OUR = 0,3 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $\Delta CPR = 0,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), und nur sehr kleine Effekte wurden im Reaktor mit hoher Glycerin-Zufuhr beobachtet.

Die L-Phenylalanin Konzentrationen stiegen in allen der parallel betriebenen Bioreaktoren (Abbildung 5.3 C, D) ausgehend von $0,18\text{--}0,20 \text{ g L}^{-1}$ nach der Übertragung der Zellen aus dem Produktionsprozess in die Analysen-Reaktoren. Die Ansätze mit hoher Zufuhr-Rate von Glucose und Glycerin führten zu höheren Produktkonzentrationen nach 19 min (Glucose: $0,50 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ L}^{-1}$, Glycerin: $0,67 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ L}^{-1}$) als die Ansätze mit niedriger Substratzufuhr (Glucose: $0,37 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ L}^{-1}$, Glycerin: $0,42 \text{ g}_{\text{L-Phe}} \text{ L}^{-1}$). Glycerin und Glucose wurden während der parallelen Kurzzeitanalyse in keinem der Ansätze nachgewiesen, es lagen also vollständig substratlimitierte Zulaufbedingungen vor.

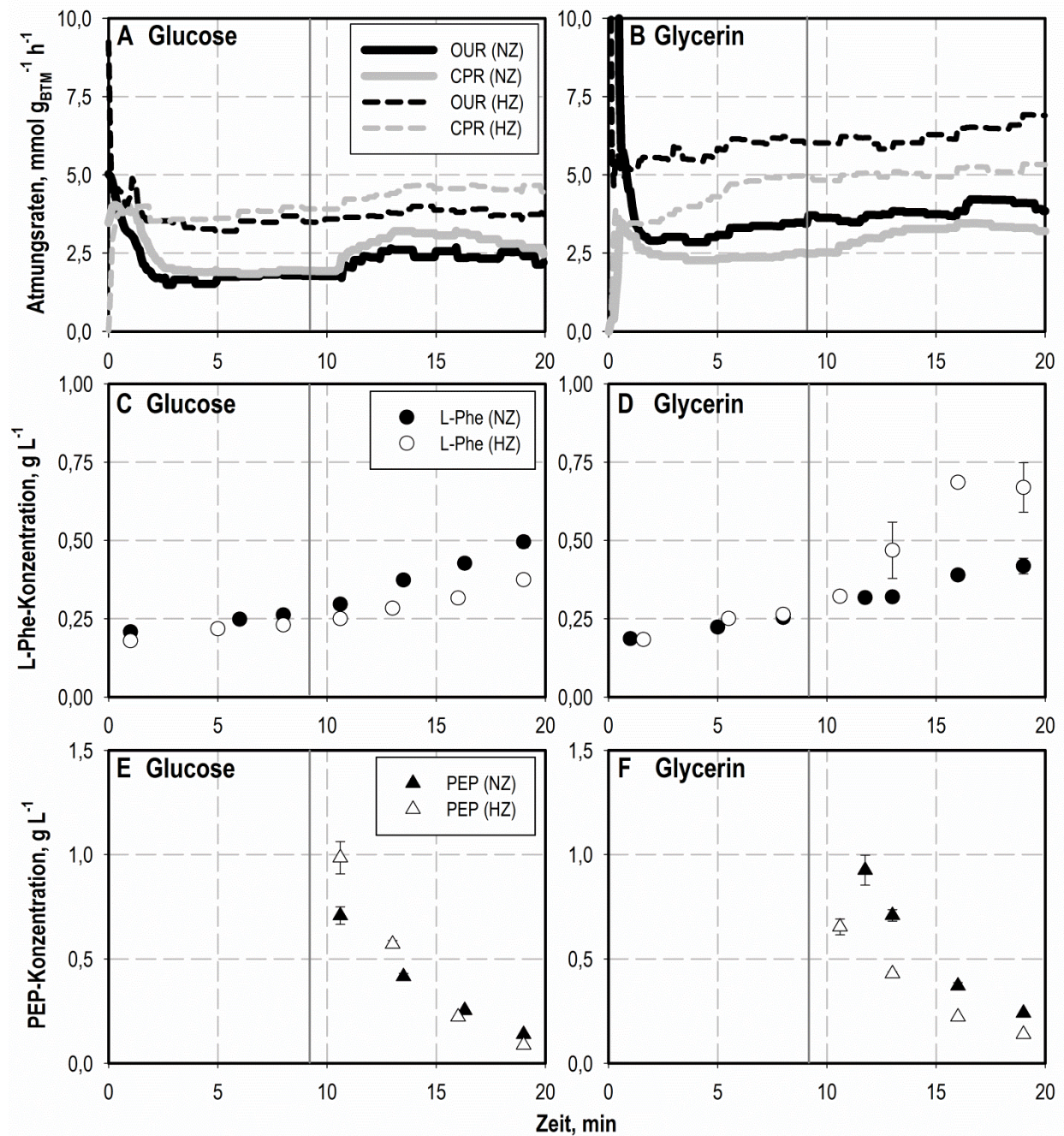


Abbildung 5.3: Parallelierte Kurzzeitanalyse mit PEP als Effektor nach schnellem Medienwechsel mit *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} entnommen aus 15 L-Produktionsprozess 6 h nach Induktion. Die senkrechten durchgezogenen Linien markieren den Zeitpunkt der Zugabe von PEP als zusätzliches Substrat zu allen vier Ansätzen. Die linken Diagramme (A, C, E) beschreiben die Ansätze mit Glucose als Zulaufmedium, die rechten Diagramme (B, D, F) die Ansätze mit Glycerin. Niedrige Zulauftrate (NZ): Zulauftrate von Glucose/Glycerin 25 mL h⁻¹. Hohe Zulauftrate (HZ): Zulauftrate von Glucose/Glycerin 50 mL h⁻¹. A: Atmungsraten mit kontinuierlicher Glucose-Zufuhr; Sauerstoffaufnahme (OUR) und CO₂-Produktionsrate (CPR). B: Atmungsraten mit kontinuierlicher Glycerin-Zufuhr. C: L-Phenylalanin-Konzentrationen bei kontinuierlicher Glucose-Zufuhr. D: L-Phenylalanin-Konzentrationen bei kontinuierlicher Glycerin-Zufuhr. E: PEP-Konzentrationen bei kontinuierlicher Glucose-Zufuhr. F: PEP-Konzentrationen bei kontinuierlicher Glycerin-Zufuhr.

Die Zugabe von PEP nach 9 min in alle Reaktoren führte zu Konzentrationen zwischen $0,65 \text{ g L}^{-1}$ und $0,98 \text{ g L}^{-1}$ PEP in den parallelen Bioreaktoren (Abbildung 5.3 E, F). Diese Konzentrationen nahmen unmittelbar nach der Zugabe in allen Reaktoren ab. Dennoch lag PEP auch am Ende des Kurzzeitexperiments im Medium aller Ansätze vor. Die nicht-lineare Abnahme der PEP-Konzentrationen gegen Ende der metabolischen Analyse stimmt mit dem Ergebnis der Kultivierung in Schüttelkolben überein, das in Kapitel 5.1.1 beschrieben ist, und wurde vermutlich durch die Antiporter-Funktion des überexprimierten PEP-Transporters verursacht. Der abnehmende Konzentrationsgradient zwischen intra- und extrazellulärem Raum verursachte möglicherweise die verringerte Transportrate, da der Transporter ein Phosphat-Antiporter ist, der prinzipiell auch PEP aus den Zellen transportieren kann (Hall *et al.*, 1999).

Abbildung 5.4 zeigt eine Zusammenfassung der metabolischen Analyse anhand aller bestimmten Biomasse-spezifischen Aufnahme- und Bildungsraten in den vier Ansätzen. Diese wurden aus den oben beschriebenen Konzentrationen und den Zufuhrraten für Glucose und Glycerin berechnet. Zusätzlich sind die mittleren Atmungsraten nach Erreichen der metabolischen Fließgleichgewichte zusammengefasst. Die Raten vor und nach der Zugabe von PEP sind für alle Ansätze vergleichend dargestellt.

Die oben diskutierten Auswirkungen der PEP-Zugabe auf OUR und CPR sind auch in Abbildung 5.4 zu erkennen. Beispiele sind die ausgeprägten Änderungen der Atmungsraten im Ansatz mit niedriger Glucose-Zufuhr (A) und im Gegensatz dazu die nahezu konstanten Atmungsraten im Reaktor mit hoher Glycerin-Zufuhr.

Die Aufnahme- und Bildungsraten der Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerin waren vorgegeben durch die Substratzufuhrraten in den Zulaufprozessen der metabolischen Analyse. Da diese Raten über die gesamte Dauer der Kurzzeitanalyse konstant gehalten wurden und die Kohlenstoffquellen nicht im Medium akkumulierten, verursachte die Zugabe von PEP keine Änderung dieser Substrataufnahmeraten. Die Glucose-Aufnahmeraten betragen $0,22 \text{ mmol}_{\text{Gluc}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (A) und $0,46 \text{ mmol}_{\text{Gluc}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (C), die Glycerin-Aufnahmeraten $0,71 \text{ mmol}_{\text{Gly}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (B) und $1,52 \text{ mmol}_{\text{Gly}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (D).

Aufgrund des nicht-linearen Verlaufs der PEP-Aufnahme wurden die initialen PEP-Aufnahmeraten jeweils anhand der ersten drei Messpunkte der PEP-Konzentration nach PEP-Zugabe ermittelt. Ähnliche hohe Aufnahme- und Bildungsraten für PEP wurden für die beiden Reaktoren mit niedriger Substratzufuhr von Glucose (A: $1,52 \text{ mmol}_{\text{PEP}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und Glycerin (B: $1,45 \text{ mmol}_{\text{PEP}} \text{ g}_{\text{CDW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) bestimmt. Dies entspricht einer Steigerung um Faktor 8 gegenüber der höchsten zuvor beschriebenen PEP-Aufnahmerate (Albermann *et al.*, 2014). Die Ansätze mit höherer Substratzufuhr von Glucose und Glycerin führten zu niedrigeren initialen PEP-Aufnahmeraten (Glucose (C): $0,90 \text{ mmol}_{\text{PEP}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$;

Glycerin (D) $0,97 \text{ mmol}_{\text{PEP}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Ein möglicher Grund für diese reduzierten Aufnahmeraten ist eine erhöhte intrazelluläre PEP-Konzentration. Diese kann entstehen aufgrund der größeren Menge an Kohlenstoff, die durch die höheren Zulaufdaten für die Reaktionen der Glykolyse zur Verfügung stand.

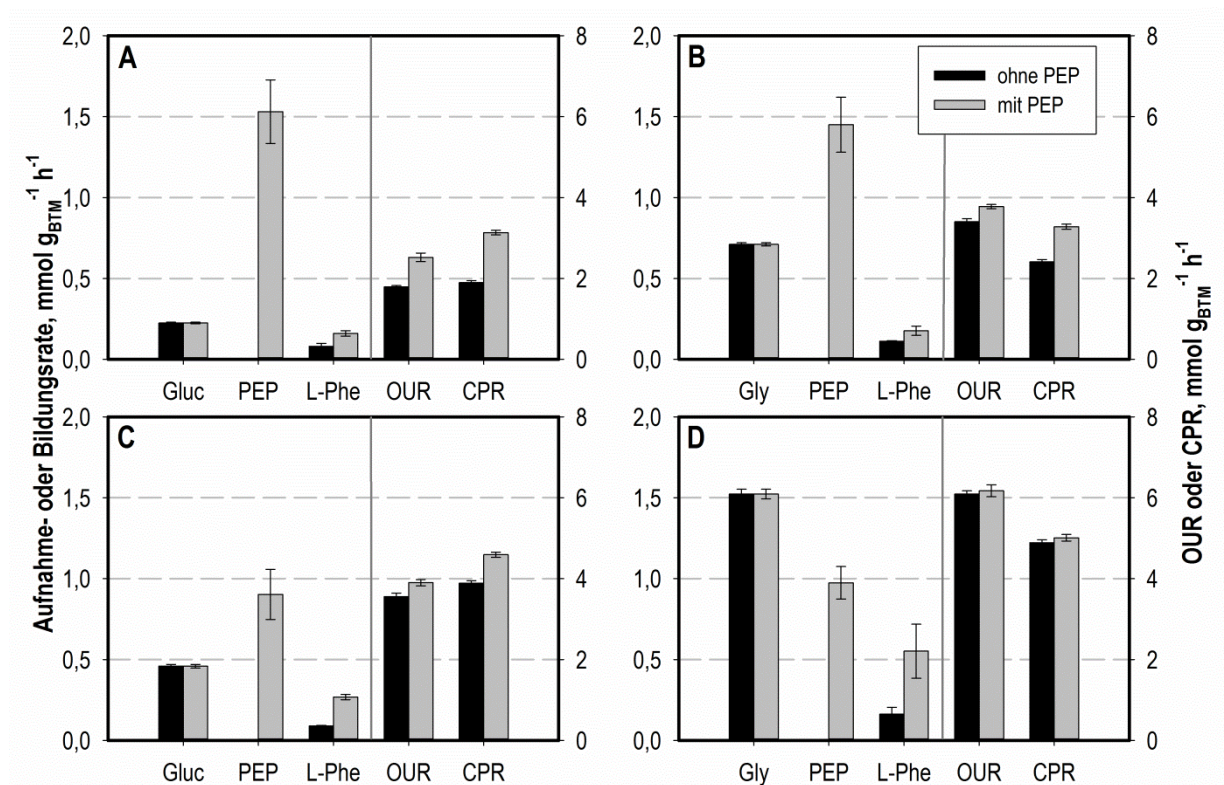


Abbildung 5.4: Biomasse-spezifische Aufnahme- und Bildungsraten während der metabolischen Analyse der L-Phenylalanin-Produktion mit *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan}. Aufnahmeraten für Glucose (Gluc), Glycerin (Gly), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Sauerstoff (OUR); Bildungsdaten für L-Phenylalanin (L-Phe) und CO₂ (CPR). Alle Werte werden verglichen vor und nach der Zugabe von PEP (ohne ■/mit PEP □). A: niedrige Glucose-Zufuhr. B: niedrige Glycerin-Zufuhr. C: hohe Glucose-Zufuhr. D: hohe Glycerin-Zufuhr. Fehlerbalken beschreiben Fehlerfortpflanzung unter Berücksichtigung der Unsicherheiten von Biomasse-Konzentration, der Verläufe extrazellulärer Konzentrationen (L-Phe und PEP), der Konzentrationen in den Zulaufmedien (Gluc und Gly) und Abgasanalyse-Einheiten.

Die stärkste Auswirkung der PEP-Zugabe wurde erwartungsgemäß für die L-Phenylalanin-Bildungsrate beobachtet. Bei niedriger Glucose-Zufuhr (A) steigerte sich die Produktbildungsrate um 100 % von $0,08 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,16 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Bei niedriger Glycerin-Zufuhr (B) ergab sich eine Steigerung um 64 % von $0,11 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,17 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. In den Ansätzen mit hoher Substratzufuhr waren die Änderungen dieser Biomasse-spezifischen Produktbildungsdaten sogar noch stärker ausgeprägt. Bei hoher Glucose-Zufuhr (C) fand nach der Zugabe von PEP eine Zunahme der Produktbildungsrate um 200 % von $0,09 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,27 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ statt. Im Ansatz mit hoher Glycerin-Zufuhr führte die Zugabe von PEP als zusätzliches Satz-Substrat zu einem Anstieg der L-Phenylalanin-Bildungsrate um 240 % von $0,16 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $0,55 \text{ mmol}_{\text{L-Phe}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Zwei Aspekte der beschriebenen Ergebnisse sind von besonderem Interesse: Zunächst ist festzuhalten, dass sich die spezifischen L-Phenylalanin-Produktionsraten bei den verschiedenen Zufuhraten von Glucose und Glycerin vor der Zugabe von PEP um Faktor 1,1 (Glucose) beziehungsweise 1,5 (Glycerin) unterschieden. Dies bedeutet, dass die Erhöhung des Kohlenstoffflusses durch eine Verdopplung der Substrat-Zulauftrate die Produktbildung nur leicht verbesserte und bei weitem nicht zu einer Verdopplung der Produktbildungsrate führte. Nach der Zugabe von PEP lag der Unterschied der initialen Produkt-Bildungsraten bei den verschiedenen Substrat-Zulaufraten bei einem Faktor von 1,7 (Glucose) beziehungsweise 3,2 (Glycerin). Die PEP-Zugabe führte also eindeutig zu einem größeren Unterschied der Produkt-Bildungsraten bei den verschiedenen Substrat-Zulaufraten. Hinzu kommt, dass die PEP-Zugabe in den Reaktoren mit hoher Substrat-Zufuhr zu einer signifikant höheren Steigerung der Produktbildungsrate führte, obwohl die PEP-Aufnahmeraten in diesen Ansätzen niedriger waren. Diese Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, dass in den Zellen, die für die metabolische Analyse aus dem Produktionsprozess entnommen wurden, eine PEP-Limitierung der L-Phenylalanin-Bildung vorlag. Die Verwendung eines Stammes mit einem spezifischen Transporter wurde für die Beantwortung der Frage nach Limitierungen innerhalb des Syntheseweges für L-Phenylalanin somit erfolgreich gezeigt. Dies beruht auf der erstmaligen, besonders gezielten Auslenkung des Stoffwechsels innerhalb des betrachteten Stoffwechselweges abseits des Zentralstoffwechsels.

5.1.4 Theoretische Betrachtung des Effekts von PEP auf die L-Phenylalanin-Synthese

Um einen genaueren Einblick in die intrazelluläre Verwendung des aufgenommenen PEP und seine Auswirkung auf die gesamte Kohlenstoffverteilung zu erlangen, wurden die beschriebenen extrazellulären Aufnahme- und Bildungsraten als Randbedingungen für Flussbilanzanalysen verwendet. Das Einfügen von extrazellulärem PEP in Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges durch Stämme mit dem UhpT-D388C-Transporter wurde zuvor mittels Isotopen-Markierungs-Experimenten gezeigt (Albermann *et al.*, 2014). Abbildung 5.5 zeigt eine Auswahl der mittels Flussbilanzanalyse ermittelten Ergebnisse, ausgehend von den Raten der Ansätze mit hohen Substratzulaufraten: Glucose vor PEP-Zugabe (A), Glucose nach PEP-Zugabe (B), Glycerin vor PEP-Zugabe (C) und Glycerin nach PEP-Zugabe (D). Da sich die Aufnahmeraten von Glucose und Glycerin durch die Zugabe von PEP nicht ändern, sind alle Veränderungen beim Vergleich von A mit B oder C mit D auf PEP zurückzuführen. Offensichtlich führt die erhöhte Verfügbarkeit des zentralen Metaboliten PEP zu einer Verstärkung der meisten Kohlenstoffflüsse im Zentralstoffwechsel. Neben einem höheren Fluss im Aromatenbiosyntheseweg, welcher durch die gegebenen Randbedingungen verursacht wird, ist besonders die Erhöhung der Flüsse im Citratzyklus festzuhalten.

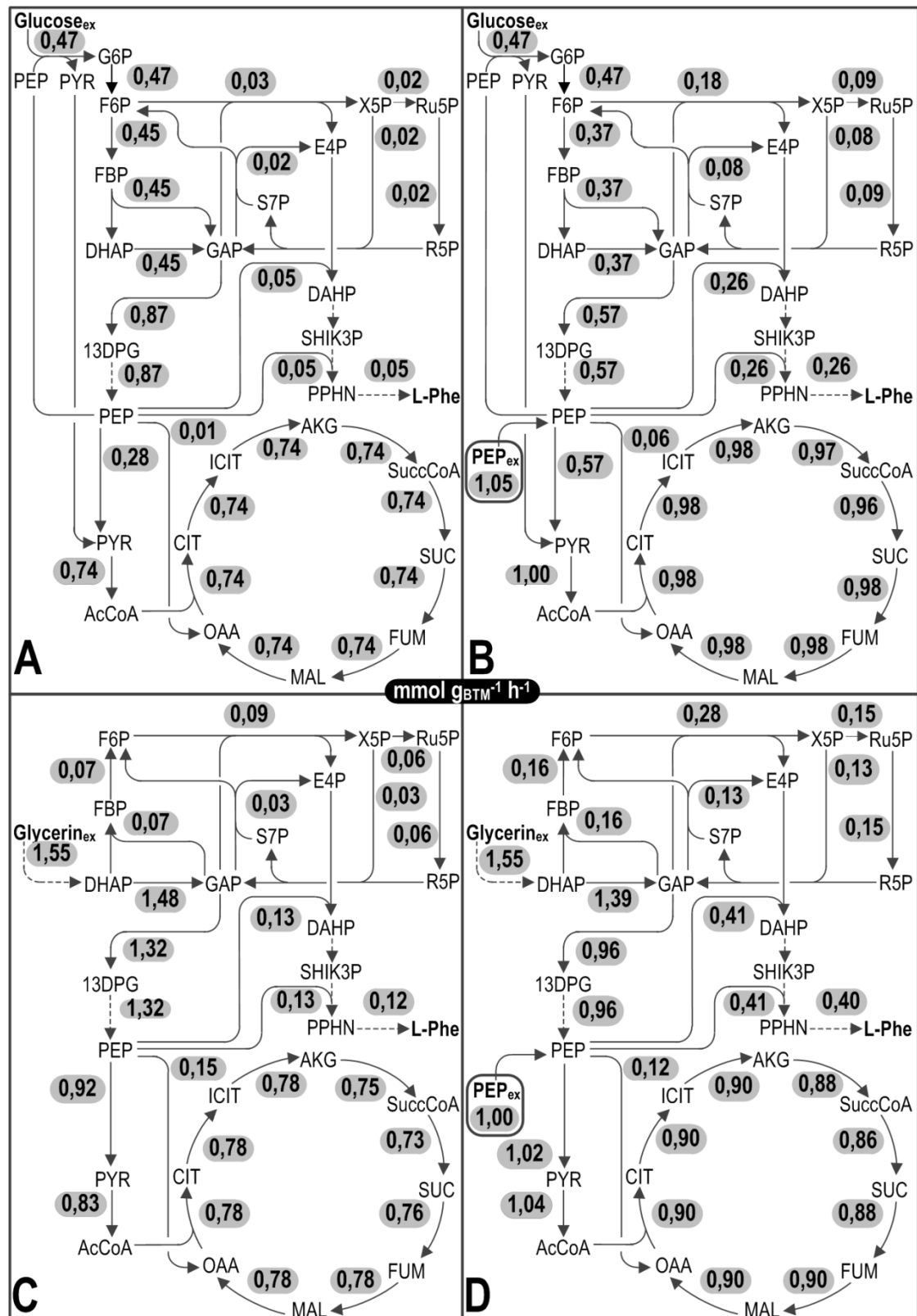


Abbildung 5.5: Intrazelluläre Flussverteilungen abgeschätzt auf Grundlage extrazellulärer Raten, die während der metabolischen Analyse mit PEP als Effektor ermittelt wurden. Randbedingungen waren die Aufnahme- und Bildungsraten für Glucose, Glycerin, PEP und L-Phenylalanin (L-Phe), Zielfunktion die Biomassebildung. A: Hohe Glucose-Zufuhr. B: Hohe Glucose-Zufuhr und Zugabe von PEP. C: Hohe Glycerin-Zufuhr. D: Hohe Glycerin-Zufuhr und Zugabe von PEP. Alle Werte haben die Einheit $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$. Gestrichelte Linien kennzeichnen Folgen mehrerer Reaktionen.

Da der Zyklus Reaktionen enthält, bei deren Ablauf CO_2 freigesetzt wird, erklärt seine Verstärkung die steigende CO_2 -Bildung nach der Zugabe von PEP.

Trotz Unterschieden in den Absolutwerten der gemessenen und berechneten Atmungsraten wird die Steigerung der CO_2 -Bildung nach PEP-Zugabe in allen Fällen bestätigt (Glucose: $2,33 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vor und $2,99 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach PEP-Zugabe; Glycerin: $2,27 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vor und $3,15 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach PEP-Zugabe). Die experimentell beobachtete Steigerung der CO_2 -Bildung nach der Zugabe von PEP während der metabolischen Analyse wird also durch die theoretischen Berechnungen unterstützt, und weiterhin wird der Einfluss von PEP auf den gesamten Metabolismus hervorgehoben.

Diskussion

Die Ergebnisse der theoretischen Abschätzungen ergänzen die Erkenntnisse bezüglich der Limitation der L-Phenylalanin-Bildung durch PEP, welche für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse sind. Diese wurden erstmals durch die Verwendung eines Stammes mit einem spezifischen Transporter gewonnen, der die zielgerichtete Auslenkung des Metabolismus erlaubt. Eine Verallgemeinerung des beschriebenen Ansatzes zur Verwendung eines Transporter-Stammes zu analytischen Zwecken ist die Übertragung auf andere Produktionsstämme und die damit mögliche spezifische Hinterfragung der PEP-Verfügbarkeit im Prozessverlauf. Eine Verbesserung der PEP-Verfügbarkeit zur Produktbildung ist durch genetische Veränderungen des Stammes für eine erhöhte Bildung oder einen reduzierten konkurrierenden Verbrauch von PEP möglich. Wird Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet, kann ein Wechsel zu beispielsweise Glycerin die PEP-Verfügbarkeit erhöhen.

5.2 Produktion von L-Tryptophan mit *E. coli* NT367*

Als Ausgangspunkt zur Etablierung eines Prozesses zur L-Tryptophan-Herstellung wurde die Prozessstrategie für die Produktion von L-Phenylalanin genutzt, welche auch bei dem in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Prozess zum Einsatz kam. Die Prozessentwicklung erfolgte anhand des Stammes *E. coli* NT367, der vom Projektpartner zur Verfügung gestellt wurde. Der Stamm trägt zwei Genkopien einer Rückkopplungs-resistenten Anthranilat-Synthase ($trpE^{fbr}$) sowie eine Rückkopplungs-resistente Genvariante der Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus dem L-Serin-Metabolismus ($serA^{fbr}$). Außerdem wurden zusätzliche Genkopien von $trpD$, $trpB$ und $trpA$ in das Chromosom integriert und die regulierenden Gene $trpR$ und $trpL$, sowie die abbauenden Reaktionen $sdaB$ und $tnaA$ deletiert.

5.2.1 15 L-Zulaufkultivierung mit *E. coli* NT367

Zunächst wurde eine 15 L-Zulaufkultivierung mit *E. coli* NT367 durchgeführt. Notwendige Anpassungen aufgrund von Stammeigenschaften waren der Verzicht auf die Zufuhr auxotropher Aminosäuren, des Antibiotikums und auf die Induktion mittels IPTG im Vergleich zum in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Prozess. Identisch waren die Unterteilung in eine Satzphase, eine exponentielle Zulaufphase ($\mu_{set} = 0,1 \text{ h}^{-1}$) und eine konstante Zulaufphase mit $0,2 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ initialer Zulauftrate (siehe Kapitel 4.3.4 und Tabelle 4.3, L-Tryptophan Produktionsprozess Strategie 1).

Der Verlauf des Prozesses ist in Abbildung 5.6 anhand zentraler Konzentrationsverläufe dargestellt. Die Konzentration der Biotrockenmasse stieg während der Satz- und der exponentiellen Zulaufphase auf $17,2 \text{ g L}^{-1}$ und im Folgenden weiter auf $25,3 \text{ g L}^{-1}$ nach 50,7 h. Zwischen 63,9 h und 73,0 h lag sie bei rund 33 g L^{-1} , und am Ende des Prozesses erreichte sie $36,1 \text{ g L}^{-1}$. Die Biomasseausbeute, die sich aus diesen Konzentrationen ergibt, nahm ab von $0,36 \text{ g g}^{-1}$ während des Beginns der exponentiellen Zulaufphase auf $0,21 \text{ g g}^{-1}$ am Anfang der konstanten Zulaufphase und weiter auf $0,12 \text{ g g}^{-1}$ am Prozessende.

* Teile der Ergebnisse sind bereits publiziert in: Tröndle J, Trachtmann N, Sprenger GA, Weuster-Botz D (2018): Fed-batch Production of L-tryptophan from Glycerol Using Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 115(12):2881–2892. doi: 10.1002/bit.26834

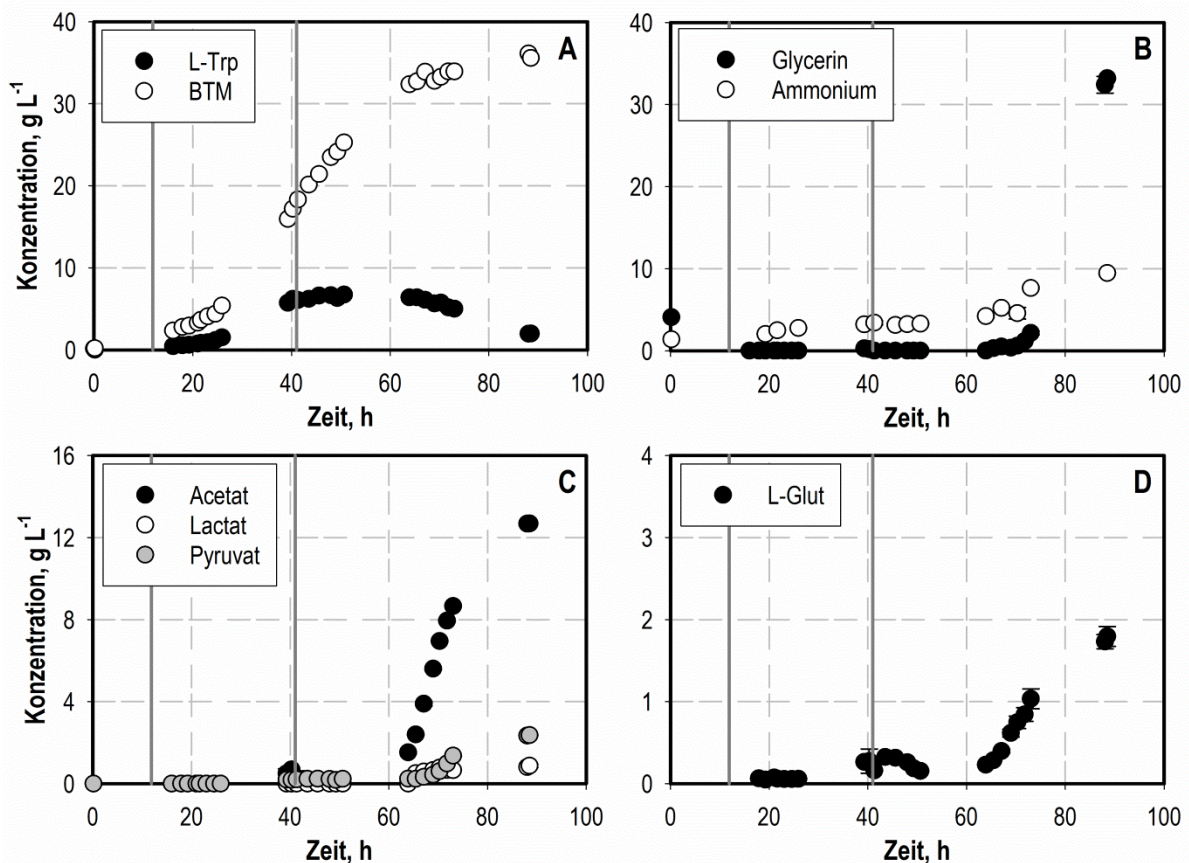


Abbildung 5.6: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* NT367 mit $0,2 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konstanter Zulauftrate. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Lactat (○) und Pyruvat (◐). D: L-Glutamat (L-Glut ●). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (11,9 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase (40,5 h).

L-Tryptophan wurde während der exponentiellen Zulaufphase bis zu einer Konzentration von $6,2 \text{ g L}^{-1}$ gebildet. Dabei wurden hohe Produktbildungsraten von bis zu $40 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht. Anders als bei der Biomassekonzentration, die weiterhin stark stieg, wurde im weiteren Prozessverlauf nur noch eine geringe Zunahme der L-Tryptophan-Konzentration auf $6,7 \text{ g L}^{-1}$ nach 50,7 h beobachtet. Diesem Anstieg folgte eine Abnahme der Produktkonzentration bis auf $2,0 \text{ g L}^{-1}$ bei Prozessende. Die weitere Zufuhr von Zulaufmedium und die daraus resultierende Verdünnung des Mediums konnte diese Abnahme nur teilweise erklären. Andere mögliche Gründe für den Konzentrationsrückgang sind extrazellulär ablaufende Reaktionen zum enzymatischen oder spontanen Abbau von L-Tryptophan, die nach dem Ende der metabolischen Aktivität der Zellen auftraten. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass das Gen der für den Abbau von L-Tryptophan zuständigen Tryptophanase (*tnaA*) im vorliegenden Stamm deletiert ist.

Für dieses Enzym ist neben dem Abbau eine Aktivität zur Bildung von L-Tryptophan beschrieben (Yanofsky *et al.*, 1991). Somit ist auch der umgekehrte Fall, also der Abbau von L-Tryptophan durch das im Stamm vorliegende Enzym L-Tryptophan-Synthase, eventuell möglich. In anderen Bakterienarten ist außerdem ein alternativer Abbauweg für L-Tryptophan über

Kynurenin bekannt (Kurnasov *et al.*, 2003). Weiterhin sind *E. coli* Zellen durch die drei Permeasen Mtr, TnaB und AroP auch zur Aufnahme von extrazellulärem L-Tryptophan fähig (Gu *et al.*, 2013).

Die Änderungen der Produktkonzentration spiegeln sich auch in der Produktausbeute wider ($\text{g}_{\text{L-Trp}} \text{g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$), deren Maximum $0,07 \text{ g g}^{-1}$ nach 40 h erreicht wurde und die anschließend bis auf $0,01 \text{ g g}^{-1}$ bei Prozessende abnahm.

Die Kohlenstoffquelle Glycerin wurde im Prozessverlauf zunächst lediglich am Ende der exponentiellen Zulaufphase im Medium detektiert ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), nach 70 h begann jedoch eine schnelle Akkumulation von Glycerin bis auf $33,2 \text{ g L}^{-1}$ bei Prozessende. Die Stickstoffquelle Ammonium wurde als Bestandteil der Zulaufmedien und für die pH-Kontrolle (NH_4OH) zugeführt und konnte bis zur Laufzeit von 50 h mit rund 3 g L^{-1} nachgewiesen werden, gefolgt von einer Akkumulation auf $9,5 \text{ g L}^{-1}$ am Ende des Prozesses. Eine ausreichende Versorgung mit Ammonium und somit die Vermeidung einer Stickstofflimitierung konnte somit während des gesamten Prozesses sichergestellt werden.

Die Konzentrationen der Nebenprodukte L-Glutamat, Pyruvat, Lactat und Acetat lagen während der exponentiellen Zulaufphase unterhalb der Nachweisgrenze und stiegen nach 60 h Prozesszeit stark an. Dies stimmt mit dem Zeitpunkt überein, an dem die Bildung von Produkt und Biomasse endete beziehungsweise abnahm. Es wurden Endkonzentrationen von $1,8 \text{ g L}^{-1}$ L-Glutamat, $2,4 \text{ g L}^{-1}$ Pyruvat, $12,7 \text{ g L}^{-1}$ Acetat und $0,9 \text{ g L}^{-1}$ Lactat nachgewiesen. Die Bildung dieser Nebenprodukte ist dabei ein deutlicher Hinweis auf einen vorliegenden Überschussmetabolismus. Die Zellen waren also nicht mehr in der Lage, den zugeführten Kohlenstoff in Biomasse oder Produkt umzuwandeln.

Die in Abbildung 5.7 dargestellte integrale Kohlenstoffbilanz des Prozesses erlaubt eine genauere Beurteilung des gesamten Prozessverlaufs. Mit einer Ausnahme betrug die Wiederfindung des Kohlenstoffs zu allen Zeitpunkten mehr als 90 %. Die Bilanz zeigt, dass zwischen 16 h und 48 h rund 10 % des vorhandenen Kohlenstoffs im gewünschten Produkt L-Tryptophan auftraten, wobei der Maximalwert von 12 % nach 40 h erreicht wurde. Im Anschluss nahm der Anteil von L-Tryptophan am Gesamt-Kohlenstoff bis auf 1 % am Prozessende ab. Die Komponenten, die über den gesamten Prozessverlauf die größten Anteile einnahmen, waren Biomasse (rund 25 %) und CO_2 (bis zu 60 %).

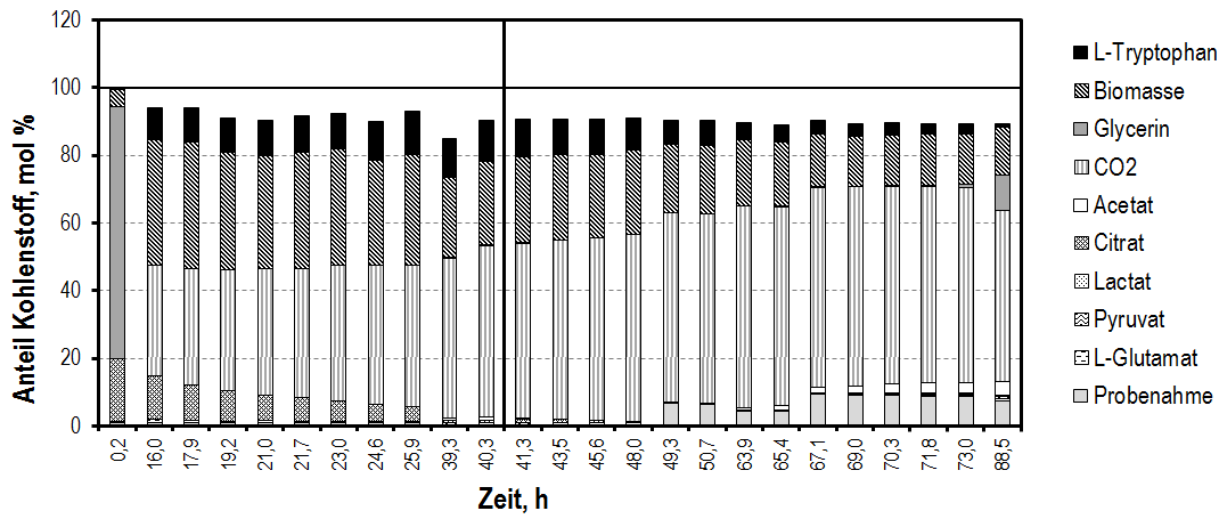


Abbildung 5.7: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit *E. coli* NT367 im 15 L-Maßstab. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die vertikale Linie trennt die Probenahmen vor und nach Induktion.

Im Weiteren wurde der erzielte L-Tryptophan-Ertrag als Anteil des theoretischen Maximums berechnet, dargestellt anhand der schwarzen Balken in Abbildung 5.8. Die theoretischen maximalen Erträge wurden mittels Flussbilanzanalyse ermittelt: die Glycerin-Aufnahmeraten zwischen jeweils zwei Probenahmezeitpunkten und eine niedrige Biomasse-Bildungsrate ($\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$) wurden als Randbedingungen gesetzt und mit einer maximalen L-Tryptophan-Bildung als Zielfunktion kombiniert. Die Ergebnisse für die einzelnen Zeitabschnitte wurden anschließend summiert. In Abbildung 5.8 (schwarze Balken) ist zu erkennen, dass bis zu 50 % der theoretischen L-Tryptophan-Ausbeute während der exponentiellen Zulaufphase erreicht wurden. In der folgenden konstanten Zulaufphase zwischen 40 h und 65 h sank die Ausbeute auf rund 15 %. Am Ende des Prozesses ging die experimentell bestimmte Ausbeute bis auf 4 % des theoretischen Maximalwertes zurück.

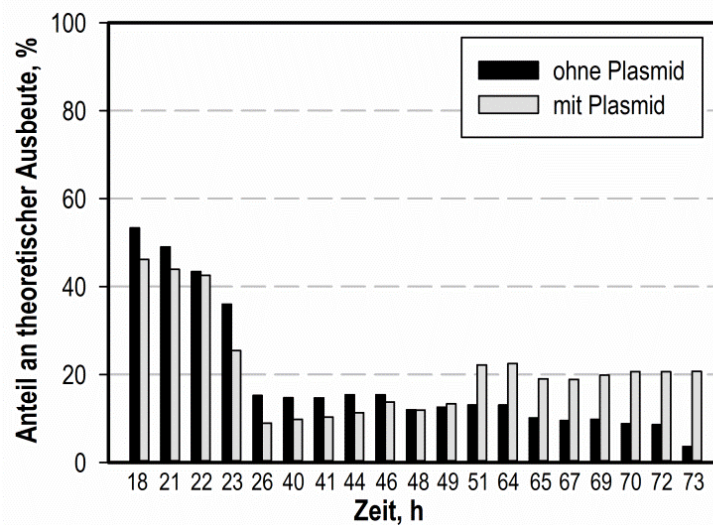


Abbildung 5.8: Erzielte Anteile an theoretischer maximaler L-Tryptophan-Ausbeute während der Produktionsprozesse im 15 L-Maßstab mit der Kohlenstoffquelle Glycerin mit *E. coli* NT367 (ohne Plasmid ■) und *E. coli* NT36 pF112aroFBL_{kan} (mit Plasmid □; siehe Kapitel 5.2.2). Die theoretischen maximalen Ausbeuten wurden mittels Flussbilanzanalyse durch eine Maximierung der Produktbildung bei $\mu = 0,075 \text{ h}^{-1}$ ermittelt.

Die Bildung des gewünschten Produktes L-Tryptophan ausgehend von der Kohlenstoffquelle Glycerin im 15 L-Maßstab konnte somit erfolgreich gezeigt werden. Verschiedene Prozessgrößen, vor allem die niedrige maximale Produktkonzentration und die geringe Produktausbeute, weisen jedoch deutlich auf die Möglichkeit und Notwendigkeit von weiteren Schritten zur Optimierung hin.

Als erster Schritt in Richtung einer verbesserten Produktbildung wurde die Überexpression von Genen des allgemeinen Teils der Aromatenbiosynthese gewählt. Zur Umsetzung wurde ein *multicopy*-Plasmid mit den wichtigen *E. coli*-Wildtyp-Genen *aroFBL* und einem Resistenzgen gegen Kanamycin konstruiert. Die Gene *aroFBL* codieren für die Enzyme DAHP-Synthase, Dehydroquinat-Synthase und Shikimat-Kinase, welche in früheren Arbeiten als limitierende Schritte der Aromatenbiosynthese identifiziert wurden (Dell und Frost, 1993; Oldiges *et al.*, 2004; Snell *et al.*, 1996). Das resultierende Plasmid pF112aroFBL_{kan} wurde in *E. coli* NT367 transformiert.

5.2.2 15 L-Zulaufkultivierung mit *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan}

Zur Kultivierung des transformierten Stammes, der aufgrund des Resistenzgens im Plasmid Kanamycin-resistent ist, wurde Kanamycin allen Medien und Zulaufmedien hinzugefügt. Die zweite Änderung der Prozessstrategie war die Zugabe von 0,3 mM IPTG zu Beginn der konstanten Zulaufphase, um die Expression der Plasmid-codierten Gene zu induzieren. Alle anderen Aspekte der Prozessführung wurden entsprechend Kapitel 5.2.1 beibehalten. Der Verlauf des Prozesses mit *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} ist in Abbildung 5.9 anhand der zentralen Konzentrationsverläufe dargestellt.

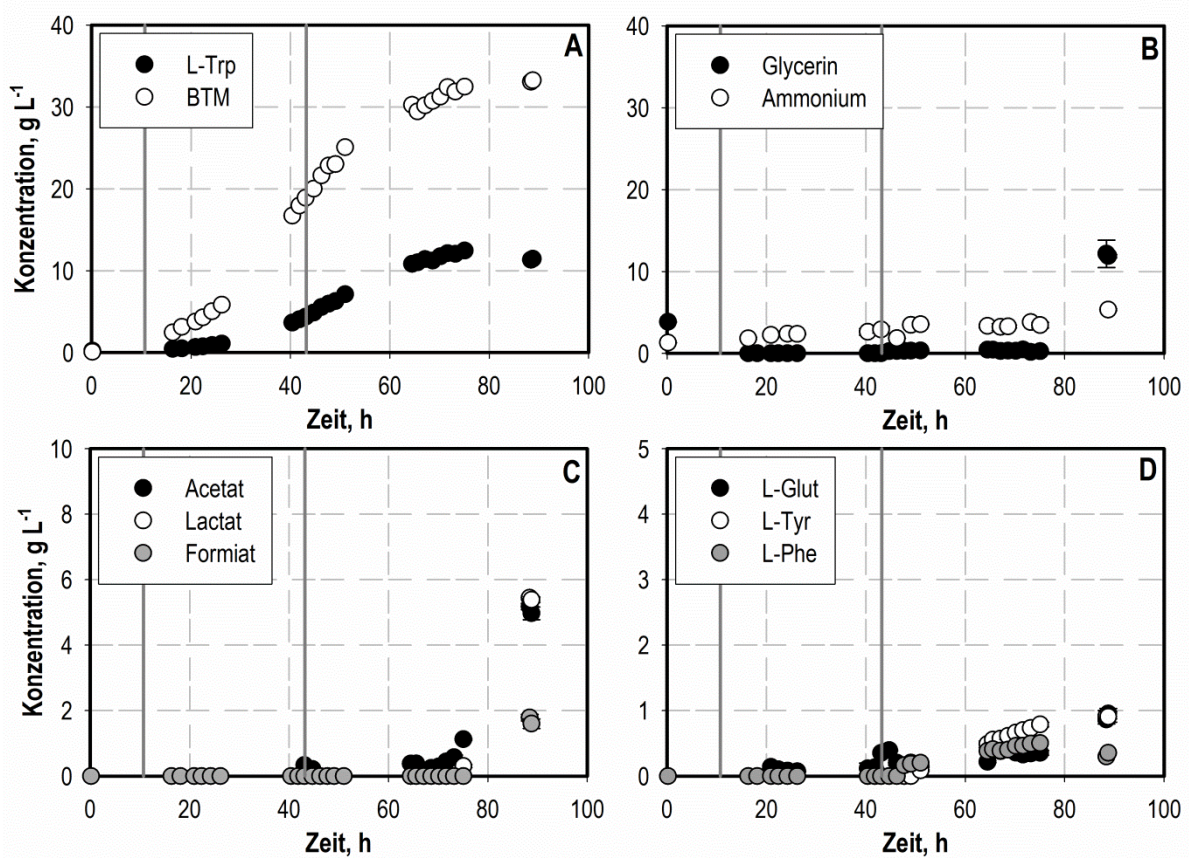


Abbildung 5.9: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} mit $0,2 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konstanter Zulauftrate und Zugabe von 0,3 mM IPTG. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Lactat (○) und Formiat (◐). D: L-Glutamat (L-Glut ●), L-Tyrosin (L-Tyr ○) und L-Phenylalanin (L-Phe ◐). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (10,7 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase (43,2 h).

Die Konzentration der Biotrockenmasse stieg auf $18,9 \text{ g L}^{-1}$ am Ende der exponentiellen Zulaufphase. Nach der Induktion konnte weiteres Wachstum bis auf $33,3 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse am Ende des Prozesses bestimmt werden. Die Biomasseausbeuten dieses Prozesses ($\text{g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{Glycerin}}^{-1}$) ähnelten denen im Prozess mit *E. coli* NT367 (siehe Kapitel 5.2.1): Sie nahmen von $0,37 \text{ g g}^{-1}$ zu Beginn auf $0,23 \text{ g g}^{-1}$

während der konstanten Zulaufphase und $0,13 \text{ g g}^{-1}$ am Prozessende ab. Ein Vergleich ist in Tabelle 5.2 gezeigt.

Tabelle 5.2: Vergleich von Biomasseausbeuten ($g_{\text{BTM}} g_{\text{Glycerin}}^{-1}$) während der L-Tryptophan-Produktion im 15 L-Maßstab mit *E. coli* NT367 und *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan}.

	NT367	NT367 pF112aroFBL _{kan}
Exponentielle Zulaufphase	0,36	0,37
Konstante Zulaufphase	0,21	0,23
Prozessende	0,12	0,13

Die Konzentration des Produktes L-Tryptophan stieg mit einer Produktbildungsrate von $16 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $4,4 \text{ g L}^{-1}$ vor Induktion an. Nach Induktion war die Produktbildungsrate erhöht und lag bei rund $20 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und die L-Tryptophan-Konzentration steigerte sich auf $7,1 \text{ g L}^{-1}$ nach 51 h. Eine reduzierte Produktbildungsrate ($5\text{--}10 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) führte zu einem weiteren Anstieg der L-Tryptophan-Konzentration auf $12,5 \text{ g L}^{-1}$ nach 75 h Prozesszeit. Diese anhaltende Produktbildung führte zu einer Aufrechterhaltung der Produktausbeute ($g_{\text{L-Trp}} g_{\text{Glycerin}}^{-1}$) von rund $0,06 \text{ g g}^{-1}$ über die gesamte Prozesszeit, im Gegensatz zur abnehmenden Ausbeute im Prozess mit *E. coli* NT367.

Die Kohlenstoffquelle Glycerin wurde während der exponentiellen Zulaufphase nicht im Medium nachgewiesen. Dies bedeutet die vollständige Verstoffwechslung der Kohlenstoffquelle durch die Zellen zu jedem Zeitpunkt. Während der konstanten Zulaufphase wurden niedrige Glycerin-Konzentrationen um $0,3 \text{ g L}^{-1}$ bis zu 75 h Prozesszeit nachgewiesen, bevor am Prozessende $12,2 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin akkumulierten. Unlimitierte Ammonium-Konzentrationen ($2\text{--}4 \text{ g L}^{-1}$) lagen während des gesamten Prozesses im Medium vor. Bei Prozessende wurde eine Akkumulation von Ammonium auf $5,3 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt. Eine Stickstofflimitierung war somit ausgeschlossen.

Nach einer Prozesszeit von 70 h wurde die Bildung organischer Säuren beobachtet. Dies entsprach dem Ende der L-Tryptophan-Produktionsphase. Am Prozessende wurden $5,2 \text{ g L}^{-1}$ Acetat, $1,8 \text{ g L}^{-1}$ Formiat und $5,4 \text{ g L}^{-1}$ Lactat nachgewiesen. L-Glutamat lag zwischen $0,2 \text{ g L}^{-1}$ und $0,5 \text{ g L}^{-1}$ während des gesamten Prozesses vor und akkumulierte am Ende auf $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Zusätzlich wurden nach Induktion (43 h) geringe Mengen der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin gebildet. Die L-Phenylalanin-Konzentration stieg auf $0,5 \text{ g L}^{-1}$ nach 75 h und sank anschließend auf $0,4 \text{ g L}^{-1}$ bei Prozessende. Die Konzentration von L-Tyrosin erreichte $0,9 \text{ g L}^{-1}$ am Ende der Kultivierung.

Die Verwendung des *multicopy*-Plasmids pF112aroFBL_{kan} in *E. coli* NT367 führte insgesamt zu einer deutlichen Verbesserung des L-Tryptophan-Produktionsprozesses. Zunächst wurde die Dauer der Produktbildungsphase im Vergleich zum Prozess ohne Plasmid annähernd verdoppelt, wodurch die

maximale Produktkonzentration von $6,7 \text{ g L}^{-1}$ auf $12,5 \text{ g L}^{-1}$ L-Tryptophan gesteigert werden konnte. Der verbesserte Kohlenstofffluss in den Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren verursachte zusätzlich die Bildung der Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin, die zuvor nicht beobachtet wurden und nun nach Induktion parallel zum Produkt L-Tryptophan auftraten.

Die Veränderungen und Verbesserungen des Prozessverlaufes sind auch an der integralen Kohlenstoffbilanz dieses Prozesses, dargestellt in Abbildung 5.10, zu erkennen. Im Vergleich mit der vorherigen Bilanz des Stammes ohne Plasmid (siehe Kapitel 5.2.1 und Abbildung 5.7) zeigte sich ein identischer maximaler Anteil von L-Tryptophan am Gesamtkohlenstoff, der jedoch über die gesamte Prozesszeit erhalten blieb. Die Anteile der neu aufgetretenen Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin blieben unter 1 % des vorhandenen Kohlenstoffs. Wie im vorherigen Prozess (siehe Kapitel 5.2.1) hatten die Biomasse mit bis zu 32 % und CO_2 mit bis zu 64 % die höchsten Anteile am Kohlenstoff.

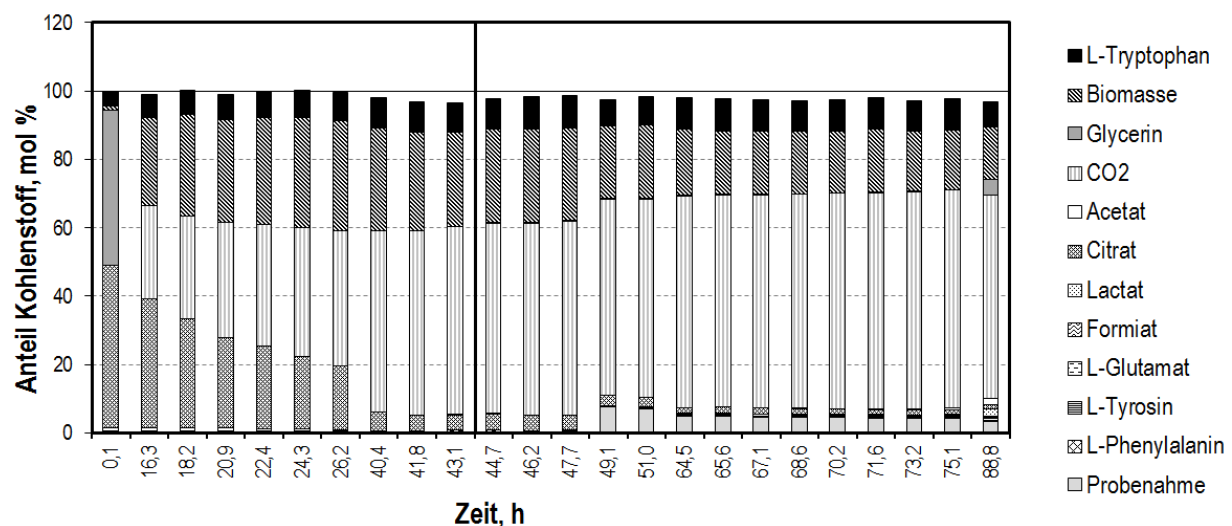


Abbildung 5.10: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} im 15 L-Maßstab. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die vertikale Linie trennt die Probenahmen vor und nach Induktion.

Die Unterschiede im Prozessverlauf zeigten sich auch anhand der Anteile an theoretischer Ausbeute, welche für den Prozess mit *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} in Abbildung 5.8 mit hellgrauen Balken dargestellt sind. Zu Beginn der Prozesse unterschieden sich die Verläufe nur geringfügig, nach 50 % an theoretischer Ausbeute in der exponentiellen Zulaufphase folgte die Abnahme auf unter 20 %. Im Falle des Prozesses mit Plasmid stieg der Anteil jedoch nach 65 h wieder auf rund 20 %. Dieser Wert blieb bis zum Prozessende erhalten, wodurch sich ein signifikanter Unterschied zum Prozessverlauf mit *E. coli* NT367 ohne Plasmid (siehe Kapitel 5.2.1) ergab.

Die zusätzliche enzymatische Kapazität innerhalb des Biosyntheseweges der aromatischen Aminosäuren, die durch die Gene auf dem Plasmid pF112aroFBL_{kan} zur Verfügung gestellt wird,

verbesserte somit die L-Tryptophan-Bildung im Zulaufprozess deutlich (+100 %). Das Auftreten der zusätzlichen Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin deutet nun auf eine Limitierung innerhalb des für L-Tryptophan spezifischen Stoffwechsels hin. Diese verursacht möglicherweise die Nebenproduktbildung, da der Kohlenstofffluss im allgemeinen Teil des Aromatenbiosyntheseweges offenbar die Kapazität des L-Tryptophan-Zweiges übersteigt.

5.2.3 Einfluss der Substratzulauftrate auf die Nebenproduktbildung bei der L-Tryptophan-Produktion

Die Hypothese einer Limitierung innerhalb des L-Tryptophan-Biosyntheseweges sollte im Folgenden prozesstechnisch überprüft werden, indem eine höhere biomassespezifische Zulauftrate in der konstanten Zulaufphase gewählt und die Auswirkung auf die Bildung von Produkt und aromatischen Nebenprodukten beobachtet wird. Wenn bei der zuvor gewählten Zulauftrate ($0,2 \text{ g}_{\text{Gly}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) tatsächlich eine Limitierung im L-Tryptophan-Biosyntheseweg vorlag (siehe Kapitel 5.2.2), kann eine Erhöhung der biomassespezifischen Zulauftrate nicht zu einer Erhöhung der Produktbildung führen. Erwartet wird stattdessen eine verstärkte Bildung der aromatischen Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Als höhere Substratzulauftrate während der konstanten Zulaufphase wurde daraufhin ein initial $0,4 \text{ g}_{\text{Gly}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gewählt, also eine Verdopplung im Vergleich zu den Kultivierungen in Kapitel 5.2.1 und 5.2.2. Um bei der nun höheren biomassespezifischen Zulauftrate die Gesamtmenge an zugeführter Kohlenstoffquelle auszugleichen, wurde die vorgeschaltete exponentielle Zulaufphase verkürzt. Der Prozessverlauf ist anhand ausgewählter Konzentrationsverläufe in Abbildung 5.11 gezeigt.

In diesem Prozess stieg die Biotrockenmasse-Konzentration während der Satzphase auf $1,5 \text{ g L}^{-1}$, während der exponentiellen Zulaufphase bis auf $7,4 \text{ g L}^{-1}$ und weiter auf 26 g L^{-1} nach 74 h. Am Ende nahm sie auf 23 g L^{-1} ab. Das Produkt L-Tryptophan erreichte während Satz- und exponentieller Zulaufphase mit $0,3 \text{ g L}^{-1}$ nur eine geringe Konzentration. Eine deutlichere Zunahme der Produktkonzentration setzte nach Induktion am Beginn der konstanten Zulaufphase ein. Zwischen 40 h und 50 h Prozesszeit stieg die Produktkonzentration von $2,1 \text{ g L}^{-1}$ auf $3,3 \text{ g L}^{-1}$ mit einer Produktbildungsrate von $10 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und blieb anschließend zwischen 65 h und 75 h konstant bei etwa $4,2 \text{ g L}^{-1}$. Bei Prozessende lagen $3,4 \text{ g L}^{-1}$ L-Tryptophan vor.

Die Kohlenstoffquelle Glycerin wurde mit $3,7 \text{ g L}^{-1}$ vorgelegt, welches vollständig verstoffwechselt wurde. Danach wurde Glycerin erst wieder nach 74 h Prozesszeit im Medium nachgewiesen und akkumulierte schließlich auf $24,7 \text{ g L}^{-1}$ bis Prozessende.

Die Bildung organischer Säuren als Nebenprodukte setzte nach dem Ende der eigentlichen Produktbildung bei 65 h ein. Bei Prozessende wurden $8,3 \text{ g L}^{-1}$ Acetat, $3,5 \text{ g L}^{-1}$ Lactat und jeweils rund 2 g L^{-1} Succinat und Pyruvat nachgewiesen. Als weiteres Nebenprodukt trat L-Glutamat auf, von

dem bei Induktion $0,3 \text{ g L}^{-1}$ vorlagen und das ab 65 h bis auf $1,3 \text{ g L}^{-1}$ akkumulierte. Von besonderem Interesse sind bei diesem Prozess wiederum die Konzentrationen der aromatischen Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin, die nach Induktion gleichzeitig zum Hauptprodukt L-Tryptophan gebildet wurden. Zwischen 40 h und 50 h stiegen beide Konzentrationen von rund 1 g L^{-1} auf 2 g L^{-1} und zwischen 65 h und 75 h weiter von $2,6 \text{ g L}^{-1}$ auf $2,8 \text{ g L}^{-1}$ (L-Phenylalanin) beziehungsweise von $2,3 \text{ g L}^{-1}$ auf $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (L-Tyrosin). Bei Prozessende lagen die beiden Nebenprodukte mit einer Konzentration von jeweils $2,8 \text{ g L}^{-1}$ vor.

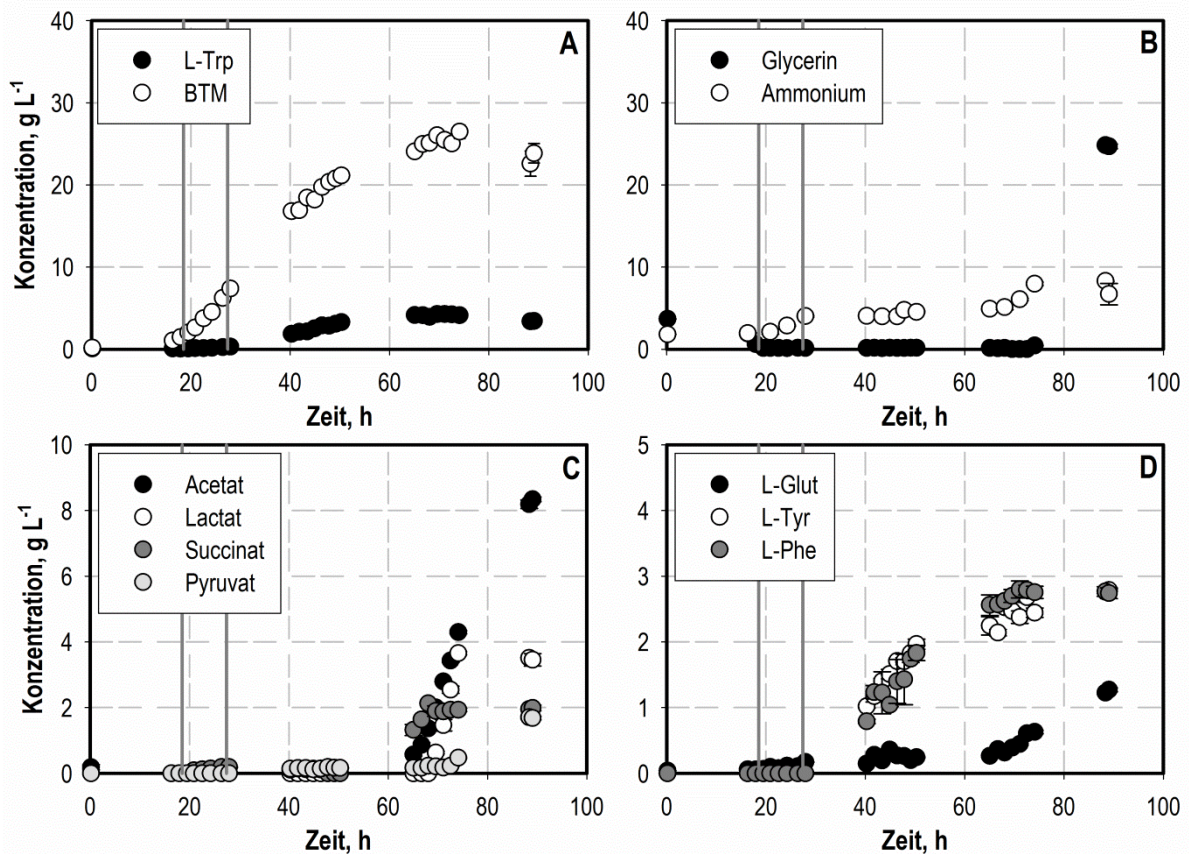


Abbildung 5.11: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} mit $0,4 \text{ gGlycerin gBTM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konstanter Zulauftrate und Zugabe von $0,3 \text{ mM IPTG}$. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Lactat (○), Succinat (●) und Pyruvat (○). D: L-Glutamat (L-Glut ●), L-Tyrosin (L-Tyr ○) und L-Phenylalanin (L-Phe ●). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (18,5 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase (27,4 h).

Diskussion

Die höhere Substratzulauftrate führte im Vergleich zur Prozessführung in Kapitel 5.2.2 zu einer Reduzierung der L-Tryptophan-Bildung auf 34 % und gleichzeitig zu einer starken Erhöhung der Konzentrationen der Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Die erhöhte Substratzufuhr ermöglichte einen stärkeren Kohlenstofffluss in den Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren, der jedoch nicht vorwiegend in das gewünschte Produkt umgewandelt werden konnte. Die hier angewandte Prozessstrategie sowie der Vergleich mit dem Prozess in Abschnitt 5.2.2 machen eine mögliche Limitierung im Stoffwechsel, der für L-Tryptophan spezifisch ist, naheliegend. In diesem Zusammenhang müssen auch inhibierende Effekte von L-Phenylalanin und L-Tyrosin auf die gesamte Aromatenbiosynthese, und damit auch auf die Bildung von L-Tryptophan, berücksichtigt werden. Dies gilt im Besonderen für die Eingangsreaktion, da die drei vorliegenden Isoenzyme durch die drei Endprodukte L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan inhibiert werden. Dabei ist das Isoenzym mit 80 % Anteil am Gesamtzym sensitiv für L-Phenylalanin (Sprenger, 2007). Die Bildung der aromatischen Nebenprodukte kann somit die Produktbildung inhibieren, da keine rückkopplungsresistenten Enzymvarianten vorliegen.

Insgesamt konnte mit der in diesem Kapitel (5.2) gezeigten Vorgehensweise erfolgreich ein Prozess für die Produktion von L-Tryptophan mit *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan}, ausgehend von Glycerin als Kohlenstoffquelle, etabliert werden. Die Schritte der L-Tryptophan-Prozessentwicklung mit Einführung des Plasmids pF112aroFBL_{kan} und Anwendung verschiedener Zulauftraten sind in Tabelle 5.3 anhand der Konzentrationen von Produkt und aromatischen Nebenprodukten zusammengefasst. Die hier gezeigten Prozesse sind die erste beschriebene Verwendung von Glycerin zur L-Tryptophan-Produktion mit *E. coli* und bilden somit die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 5.3: Substratzulauftraten während der konstanten Zulaufphase ($\text{g}_{\text{Gly}} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$) sowie Konzentrationen (g L^{-1}) von Produkt L-Tryptophan und Nebenprodukten L-Phenylalanin und L-Tyrosin bei Kultivierung von *E. coli* NT367 und *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} im 15 L-Maßstab.

	NT367	NT367 pF112aroFBL _{kan}	NT367 pF112aroFBL _{kan}
Substratzulauftrate	0,2	0,2	0,4
L-Tryptophan	6,7	12,5	4,2
L-Phenylalanin	-	0,5	2,8
L-Tyrosin	-	0,9	2,8

Die Verwendung des transformierten Stammes und einer Substratzulauftrate von $0,2 \text{ g}_{\text{Gly}} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ erwies sich als vorteilhaft und erlaubte die Bildung von rund 12 g L^{-1} L-Tryptophan in 90 h Prozessdauer. Das Plasmid pF112aroFBL_{kan} mit Genkopien aus dem allgemeinen Teil der Biosynthese aromatischer Aminosäuren war verantwortlich für einen erhöhten Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese. Es ermöglichte eine höhere Produktbildung, verursachte zusätzlich jedoch die

Bildung der Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Dies macht im vorliegenden Stamm eine Limitation innerhalb der Biosynthese für L-Tryptophan naheliegend. Bei der Prozessentwicklung konnte eine für die L-Phenylalanin-Produktion etablierte Prozessstrategie (Weiner *et al.*, 2016) mit nur kleinen Änderungen auf die L-Tryptophan-Produktion übertragen werden. Obwohl sich die verwendeten Produktionsstämme genetisch deutlich unterscheiden (siehe Tabelle 4.1), war letztendlich der Verzicht auf die Zufuhr auxotropher Aminosäuren ausreichend als Anpassung der Prozessstrategie an das neue Produkt.

5.3 Charakterisierung von *E. coli* Stämmen für die L-Tryptophan-Produktion

Die Auswahl eines geeigneten *E. coli* Stammes für die L-Tryptophan-Produktion im 15 L Maßstab ist von entscheidender Bedeutung für die weiteren Teile dieser Arbeit, da auf Grundlage des Produktionsprozesses metabolische Analysen durchgeführt werden sollen. Zu den daraus resultierenden Anforderungen an das Prozessverhalten gehören eine gute Reproduzierbarkeit, eine hohe Produktbildungsrate und eine hohe Produktkonzentration. Der in Kapitel 5.2.2 dargestellte Produktionsprozess mit *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} erfüllte zwar prinzipiell diese Ansprüche, allerdings setzte die Produktbildung bereits bei niedriger Biomassekonzentration ein und nach Induktion trat nur noch eine kurze Produktionsphase bei gleichzeitig weiterem Wachstum auf. Zusätzlich konnte der Projektpartner an der Universität Stuttgart durch Sequenzierung von *E. coli* NT367 nachweisen, dass die überexprimierten Gene des *trp*-Operons in diesem Stamm leider Punktmutationen aufweisen, die zur Inaktivität der *trpED*-Überexpression und einer sehr schwachen Aktivität der *trpAB*-Überexpression führen. Da ein Austausch der fehlerhaften Genvarianten nicht möglich war, wurde eine Neukonstruktion des Stammes, ausgehend von einem Vorgängerstamm, notwendig. Die einzelnen Stämme aus der neuen Stammentwicklung wurden jeweils im 15 L-Produktionsprozess charakterisiert und die Kultivierungen zur weiteren Etablierung des standardisierten Referenzprozesses im 15 L-Maßstab genutzt. Dazu wurden die Stämme mit dem Plasmid pF112aroFBL_{kan} transformiert und mit der für *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} etablierten Prozessstrategie kultiviert (siehe Abschnitt 5.2.2). Die sich bei diesen Prozessen ergebenden Verläufe werden im folgenden Kapitel dargestellt und diskutiert.

5.3.1 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a pF112aroFBL_{kan}

Der Vorläuferstamm von *E. coli* NT367, der für die Neukonstruktion eines Produktionsstammes verwendet wurde, ist *E. coli* TRP5a. Die Unterschiede der beiden Stämme liegen in den fehlenden zusätzlichen Überexpressionen der Gene des *trp* Operons und *serA* in *E. coli* TRP5a (siehe Tabelle 4.1). Da die *trp*-Überexpressionen in *E. coli* NT367 zu Enzymen mit geringer oder fehlender Aktivität führen, ermöglicht ein Vergleich mit *E. coli* TRP5a zunächst Aussagen über den Effekt der *serA*-Überexpression. Der Verlauf der 15 L-Kultivierung von *E. coli* TRP5a nach Transformation mit pF112aroFBL_{kan} ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Die Prozessstrategie ist der in Kapitel 5.2.2 verwendeten identisch und in Kapitel 4.3.4 und Tabelle 4.3 (L-Tryptophan Produktionsprozess Strategie 1) beschrieben.

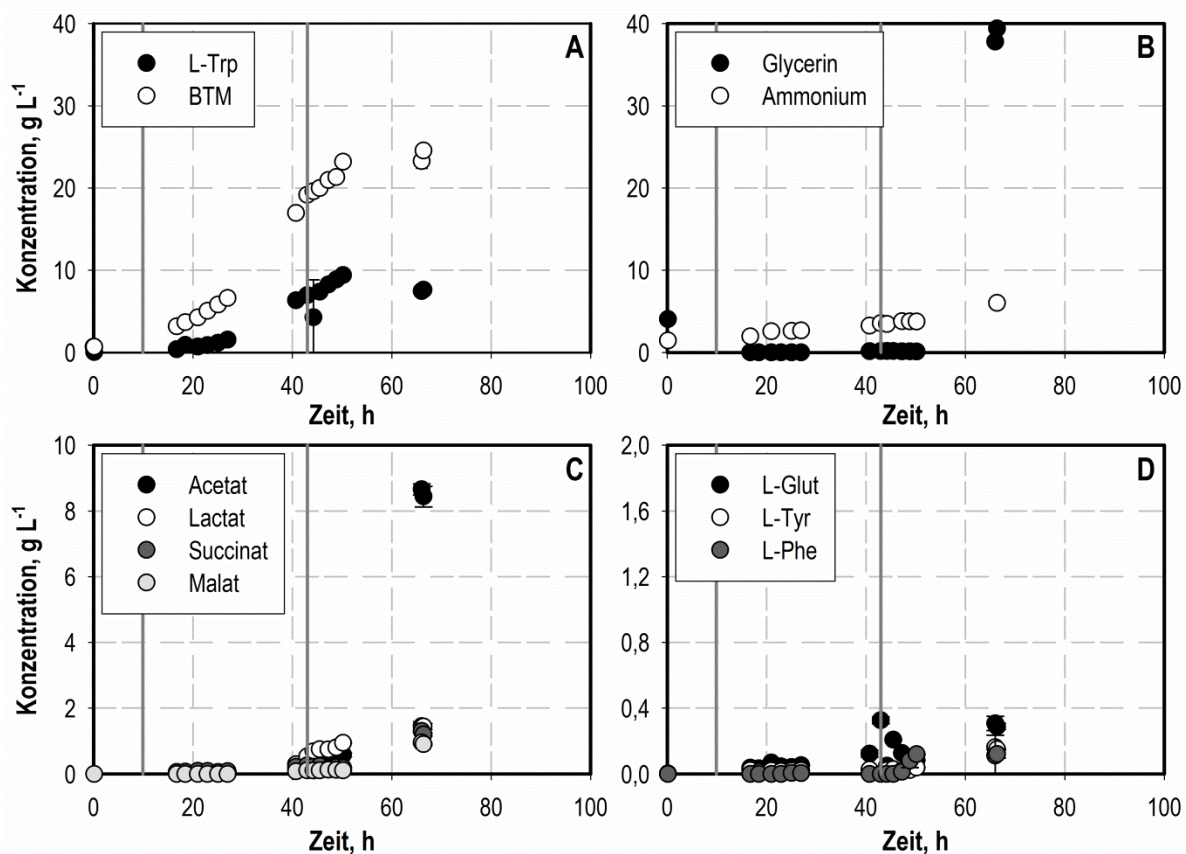


Abbildung 5.12: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a pF112aroFBL_{kan} mit $0,2 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konstanter Zulauftrate und Zugabe von $0,3 \text{ mM}$ IPTG. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Lactat (○), Succinat (●) und Malat (○). D: L-Glutamat (L-Glut ●), L-Tyrosin (L-Tyr ○) und L-Phenylalanin (L-Phe ●). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (9,9 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase sowie die Zugabe von $0,3 \text{ mM}$ IPTG (43,0 h).

Die Konzentration der Biotrockenmasse stieg während der exponentiellen Zulaufphase mit $0,07 \text{ h}^{-1}$ ($\mu_{\text{set}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$) bis auf $19,2 \text{ g L}^{-1}$ und während der konstanten Zulaufphase nach Zugabe des Induktors IPTG weiter bis auf $24,6 \text{ g L}^{-1}$ am Ende des Prozesses, das bereits nach 66 h erreicht war. Gleichzeitig mit der Biotrockenmasse stieg die Produktkonzentration, die zum Zeitpunkt der Induktion bei $7,0 \text{ g L}^{-1}$ lag. Dabei traten Produktbildungsraten von 20 bis $30 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf. Nach Zugabe von IPTG, also während der konstanten Zulaufphase, wurde weiterhin mit 18 bis $24 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Tryptophan gebildet und nach 50,2 h wurde eine maximale Produktkonzentration von $9,4 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt. Am Prozessende lagen $7,6 \text{ g L}^{-1}$ L-Tryptophan vor.

Die Kohlenstoffquelle Glycerin wurde bei Prozessbeginn als Substrat zur Verfügung gestellt ($4,1 \text{ g L}^{-1}$) und zunächst vollständig verbraucht. Anschließend wurde sie über die Zulaufmedien zugeführt, wobei ab dem Ende der exponentiellen Zulaufphase geringe Mengen nahe der Nachweisgrenze ($\sim 0,2 \text{ g L}^{-1}$) im Medium nachgewiesen wurden. Bei Prozessende waren $39,4 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin akkumuliert. Die Konzentration der Stickstoffquelle Ammonium nahm über die Prozesszeit

von $1,4 \text{ g L}^{-1}$ bei Inokulation auf $3,8 \text{ g L}^{-1}$ nach 50,2 h zu. Am Prozessende lagen $6,0 \text{ g L}^{-1}$ Ammonium im Medium vor.

Als Nebenprodukte traten in geringen Konzentrationen die Aminosäuren L-Glutamat, L-Phenylalanin und L-Tyrosin auf. L-Glutamat wurde über die gesamte Prozesszeit mit Konzentrationen bis zu $0,3 \text{ g L}^{-1}$ nachgewiesen, L-Phenylalanin und L-Tyrosin traten erst nach Induktion mit maximalen Konzentrationen von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ beziehungsweise $0,2 \text{ g L}^{-1}$ bei Prozessende auf. Weitere Nebenprodukte waren verschiedene organische Säuren, die ab 40 h Prozesszeit mit zunächst niedrigen Konzentrationen nachgewiesen wurden und deren Bildung zum Prozessende zunahm. Am stärksten wurde dabei Acetat gebildet. Bei Abbruch der Kultivierung lagen $0,9 \text{ g L}^{-1}$ Malat, $1,3 \text{ g L}^{-1}$ Succinat, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ Lactat und $8,5 \text{ g L}^{-1}$ Acetat vor.

Insgesamt zeigte der Stamm *E. coli* TRP5a pF112aroFBL_{kan} ein ungünstigeres Prozessverhalten als die zuvor betrachteten Stämme (siehe Kapitel 5.2) bei gleicher Prozessstrategie. Eine vergleichende Zusammenfassung von Prozessgrößen ist in Tabelle 5.4 gezeigt. Vor allem ist hierbei die niedrigere maximale Produktkonzentration von $9,4 \text{ g L}^{-1}$ im Vergleich zu $12,5 \text{ g L}^{-1}$ zu beachten. Sie lag trotz einer zeitweise höheren maximalen Produktbildungsrate (bis zu $30 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) vor, die bereits im Zeitraum vor Induktion auftrat. Besonders auffällig und ungünstig waren die kurze Gesamtprozessdauer und die kurze Produktbildungsphase nach Induktion, welche rund 24 h früher endete als im Vergleichsprozess. Die verschlechterte Produktbildung im Prozess weist im Umkehrschluss auf einen positiven Effekt der hier fehlenden *serA*-Überexpression hin, wobei auch günstige Auswirkungen der fehlerhaften und teils inaktiven *trp*-Überexpressionen möglich sind.

Tabelle 5.4: Vergleich von Prozessgrößen während L-Tryptophan Produktionsprozessen im 15 L-Maßstab mit *E. coli* NT367, *E. coli* NT367 pF112aroFBL_{kan} und *E. coli* TRP5a pF112aroFBL_{kan}.

	NT367	NT367 pF112aroFBL _{kan}	TRP5a pF112aroFBL _{kan}
max. L-Trp Konzentration, g L^{-1}	6,7	12,5	9,4
max. L-Trp Bildungsrate, $\text{mg}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$	40	20	33
L-Trp Konzentration bei Induktion, g L^{-1}	- (keine Induktion)	4,4	7,0
Produktbildungsdauer nach Induktion, h	- (keine Induktion)	32	7
max. L-Phe Konzentration, g L^{-1}	-	0,5	0,1
max. L-Tyr Konzentration, g L^{-1}	-	0,9	0,2
Prozessdauer, h	89	89	65
max. Biotrockenmasse, g L^{-1}	36,1	33,3	24,6
max. Acetat Konzentration, g L^{-1}	12,7	5,2	8,5

5.3.2 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tktA* pF112aroFBL_{kan}

Der erste Schritt der Weiterentwicklung von *E. coli* TRP5a durch den Projektpartner war eine zusätzliche Überexpression des *tktA* Gens aus dem Pentose-Phosphat-Weg (siehe Kapitel 3.1.2). Diese Änderung ist nicht im ursprünglich verwendeten Stamm *E. coli* NT367 vorhanden. Aufgrund der für die L-Tryptophan-Biosynthese notwendigen Metabolite aus dem Pentose-Phosphat-Weg (E4P und PRPP) wird ein positiver Effekt der Überexpression auf die Produktbildung erwartet, da die *tkt* direkt an der Bildung von E4P und des PRPP-Vorläufers R5P beteiligt ist (Berry, 1996; Shen *et al.*, 2012). Wie die zuvor verwendeten Stämme wurde auch *E. coli* TRP5a *tktA* mit dem Plasmid pF112aroFBL_{kan} transformiert und in einer Kultivierung im 15 L-Maßstab charakterisiert, deren Verlauf in Abbildung 5.13 gezeigt ist.

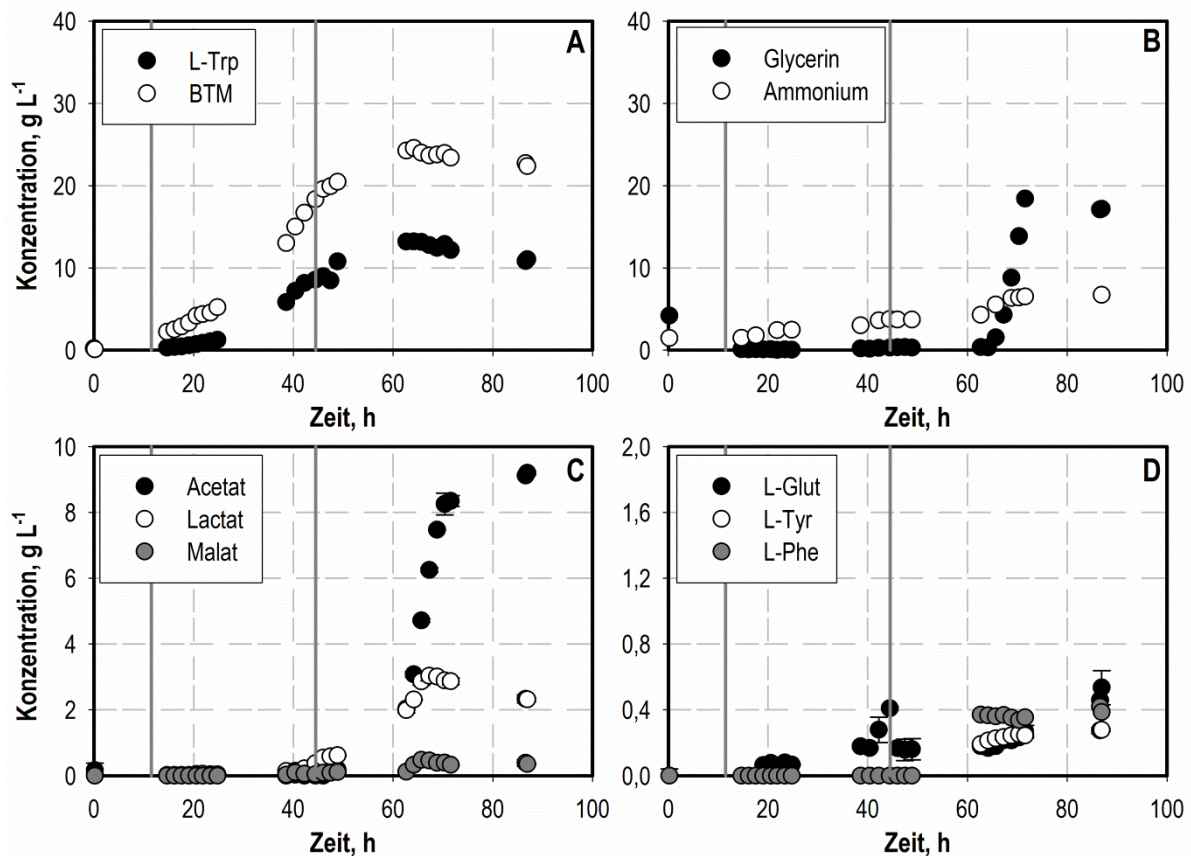


Abbildung 5.13: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tktA* pF112aroFBL_{kan} mit $0,2 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konstanter Zulauftrate und Zugabe von $0,3 \text{ mM}$ IPTG. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Lactat (○) und Malat (◐). D: L-Glutamat (L-Glut ●), L-Tyrosin (L-Tyr ○) und L-Phenylalanin (L-Phe ◐). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (11,5 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase sowie die Zugabe von $0,3 \text{ mM}$ IPTG (44,5 h).

Die Biotrockenmassekonzentration stieg während der exponentiellen Zulaufphase mit einer Wachstumsrate von $0,07 \text{ h}^{-1}$ ($\mu_{\text{set}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$), wobei sich die Abweichung vom Sollwert durch die gleichzeitig zur Biomassebildung auftretende Produktbildung begründen lässt. Zum Zeitpunkt der

Induktion nach 44,5 h Prozesszeit lagen 18,3 g L⁻¹ Biotrockenmasse vor. Ihre Konzentration stieg während der konstanten Zulaufphase weiter auf 24,6 g L⁻¹ nach 64 h und nahm anschließend leicht auf 22,4 g L⁻¹ am Prozessende nach 87 h ab. Das Ende der metabolischen Aktivität der Zellen war nach ca. 70 h Prozesszeit anhand eines steilen Anstiegs der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium festzustellen (Daten nicht gezeigt) und somit rund 10 h später als im Prozess mit *E. coli* TRP5a pF112aroFBL_{kan} (Kapitel 5.3.1).

Aufgrund der chromosomal verankerten genetischen Veränderungen erfolgte die Produktbildung bereits unmittelbar ab Prozessbeginn (Produktbildungsraten zwischen 20 und 30 mg_{L-Trip} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹). So lagen zum Induktionszeitpunkt (44,5 h) bereits 8,6 g L⁻¹ des Produktes vor. Die L-Tryptophan-Konzentration stieg weiter bis auf 13,2 g L⁻¹ nach 62,7 h und reduzierte sich unter anderem aufgrund der Medienverdünnung anschließend wieder auf 11,1 g L⁻¹ am Prozessende.

Die Kohlenstoffquelle Glycerin wurde nach dem Ende der Satzphase zunächst nicht mehr im Medium nachgewiesen, die zugeführte Menge wurde also stets vollständig verbraucht. Ab 39 h Prozesszeit lag eine geringe Glycerin-Konzentration (< 0,4 g L⁻¹) vor, welche ab 64 h zu akkumulieren begann, sodass nach 72 h 18,4 g L⁻¹ Glycerin vorlagen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Zufuhr des Zulaufmediums gestoppt, wodurch keine weitere Akkumulation auftrat. Aufgrund der geringen weiteren Aufnahme durch die Zellen lagen am Prozessende weiterhin 17,2 g L⁻¹ Glycerin vor.

Die Stickstoffquelle Ammonium lag während der Biomassebildungs- sowie zu Beginn der konstanten Zulaufphase zwischen 2,5 g L⁻¹ und 4 g L⁻¹ im Medium vor, sodass eine Stickstofflimitierung ausgeschlossen werden konnte. Nach 63 h wurden 8,6 g L⁻¹ Ammonium nachgewiesen und es fand eine weitere Akkumulation bis auf 12,8 g L⁻¹ bei Prozessende statt.

Das Nebenproduktspektrum umfasste auch bei dieser Kultivierung organische Säuren und Aminosäuren. L-Glutamat akkumulierte am Ende der exponentiellen Zulaufphase auf 0,4 g L⁻¹ sowie nach einem zwischenzeitlichen Verbrauch auf 0,5 g L⁻¹ am Prozessende. L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden ab 60 h im Medium nachgewiesen, mit Endkonzentrationen von 0,3 g L⁻¹ L-Tyrosin und 0,4 g L⁻¹ L-Phenylalanin. Die Bildung der organischen Säuren begann während der exponentiellen Zulaufphase (Malat und Lactat) beziehungsweise kurz nach Induktion des Plasmids (Acetat). Die maximalen Konzentrationen betragen 0,5 g L⁻¹ Malat (65,7 h), 3,0 g L⁻¹ Lactat (67,2 h) und 9,2 g L⁻¹ Acetat (86,9 h). Wie bei den in den Kapiteln 5.2 und 5.3.1 dargestellten Kultivierungen war Acetat das Nebenprodukt mit der höchsten Konzentration.

Bei der hier gezeigten Charakterisierung von *E. coli* TRP5a *tktA* pF112aroFBL_{kan} im 15 L-Maßstab zeigte sich ein positiver Einfluss der zusätzlichen *tktA*-Überexpression auf das Prozessverhalten und die Produktbildung. Die erzielte maximale Produktkonzentration von 13,2 g L⁻¹ lag 3,8 g L⁻¹ höher als mit dem Vergleichsstamm ohne *tktA* Überexpression (Kapitel 5.3.1) und auch über der höchsten mit

E. coli NT367 erzielten L-Tryptophan-Konzentration (Kapitel 5.2). Ein wichtiger Grund für die höhere Produktkonzentration ist die nach Induktion länger anhaltenden Prozess- und somit Produktionsdauer als in den genannten Vergleichsprozessen (Kapiteln 5.2 und 5.3.1). Diese ermöglichte eine längere und somit insgesamt stärkere Produktbildung. Dennoch war die Produktbildung während der konstanten Zulaufphase nach wie vor nicht stark ausgeprägt und nur von geringer Dauer.

5.3.3 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan}

Zur Weiterentwicklung von *E. coli* TRP5a *tktA* wurden zusätzliche Überexpressionen der Gene *serA*, *trpB* und *trpA* eingeführt. Dabei handelt es sich um Veränderungen, die in *E. coli* NT367 in teilweise fehlerhafter Form bereits vorlagen und somit wieder in korrekter Form integriert sind. *trpB* und *trpA* sind Gene aus dem L-Tryptophan-Operon und sollen verstärkte Enzymaktivitäten innerhalb des L-Tryptophan Biosyntheseweges verursachen (siehe Kapitel 3.1.3). *serA* codiert für das erste Enzym der L-Serin-Biosynthese und dient somit einer verbesserten Bereitstellung von L-Tryptophan-Vorläufern (siehe Kapitel 3.1.2). Die hier gewählte Genvariante ist aufgrund einer Punktmutation rückkopplungsresistent gegenüber L-Serin. Nach Transformation mit pF112aroFBL_{kan} wurde auch für diesen Stamm eine Zulaufkultivierung im 15 L-Maßstab durchgeführt. Ihr Verlauf ist in Abbildung 5.14 anhand verschiedener Konzentrationsverläufe zusammengefasst.

Die Konzentration der Biomasse stieg ab Beginn der Kultivierung und lag zum Zeitpunkt der Induktion und dem Beginn des konstanten Zulaufs (44,8 h) bei 20,3 g L⁻¹. Während der konstanten Zulaufphase steigerte sich die Biomassekonzentration weiter bis auf rund 30 g L⁻¹ (65 h) und blieb im Folgenden bis zum Ende des Prozesses nach 89 h konstant.

Die Konzentration des Produktes L-Tryptophan steigerte sich ebenfalls ab Prozessbeginn und lag zum Zeitpunkt der Induktion bereits bei 6,5 g L⁻¹. Während der folgenden konstanten Zulaufphase stieg sie weiter und erreichte 14,4 g L⁻¹ nach 65 h. Der Maximalwert 15,4 g L⁻¹ wurde nach 71 h ermittelt, sodass also noch eine geringe weitere Produktbildung stattfand. Bei Prozessende lagen 12,4 g L⁻¹ des Produktes L-Tryptophan vor, wobei die Gründe für die Abnahme der Konzentration am Ende trotz Deletion des L-Tryptophan abbauenden Enzyms nicht bekannt sind. Die weitere Zufuhr des Zulaufmediums und die daraus resultierende Verdünnung kann den Rückgang teilweise erklären, weitere Faktoren können ein extrazellulärer enzymatischer Abbau oder die Wiederaufnahme des Produktes durch die Zellen sein.

Die Stickstoffquelle Ammonium war über die gesamte Prozessdauer im Medium nachweisbar (3,5–5,5 g L⁻¹), sodass eine Stickstofflimitierung als Begründung für das Produktionsende ausgeschlossen werden konnte. Ammonium akkumulierte am Ende des Prozesses auf 6,7 g L⁻¹. Außerdem reicherte sich die Kohlenstoffquelle Glycerin an, die zuvor nur mit geringen Konzentrationen (0,2 g L⁻¹) am

Ende der exponentiellen Zulaufphase vorlag und bei Prozessende 43 g L^{-1} erreichte. Über die restliche Prozessdauer lag eine vollständige Substratlimitierung vor.

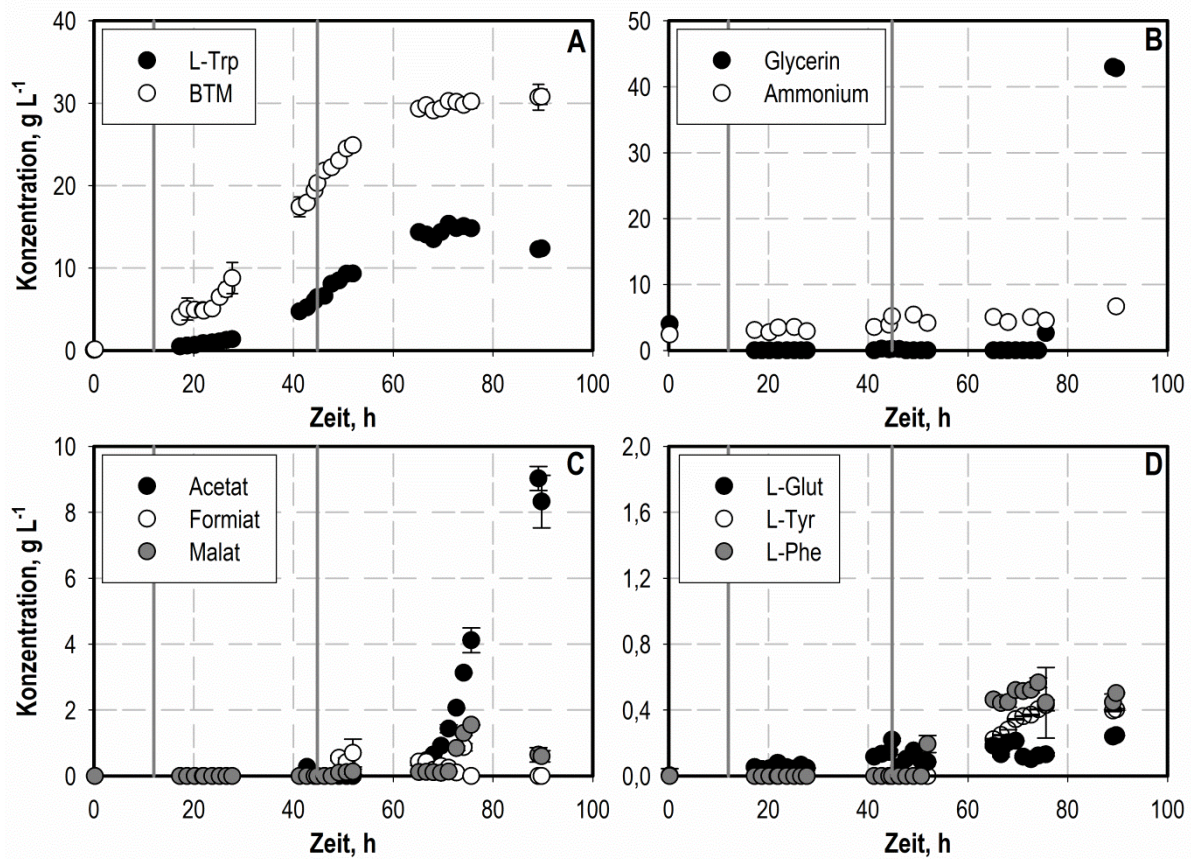


Abbildung 5.14: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} mit $0,2 \text{ g}_{\text{Glycerin}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konstanter Zulauftrate und Zugabe von $0,3 \text{ mM}$ IPTG. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Formiat (○) und Malat (●). D: L-Glutamat (L-Glut ●), L-Tyrosin (L-Tyr ○) und L-Phenylalanin (L-Phe ●). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (12,0 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase sowie die Zugabe von $0,3 \text{ mM}$ IPTG (44,8 h).

Als Nebenprodukte wurden erneut verschiedene Aminosäuren und organische Säuren bestimmt. L-Glutamat lag ab dem Ende der exponentiellen Zulaufphase mit geringen Konzentrationen von bis zu $0,2 \text{ g L}^{-1}$ vor. Die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin wurden ab 50 h als Nebenprodukte im Medium nachgewiesen und erreichten $0,4 \text{ g L}^{-1}$ (L-Tyrosin) beziehungsweise $0,6 \text{ g L}^{-1}$ (L-Phenylalanin). Organische Säuren als Nebenprodukte wurden nach dem Ende der eigentlichen Produktionsphase ab ca. 65 h gebildet. In geringen Konzentrationen traten Malat (max. $1,5 \text{ g L}^{-1}$) und Formiat (max. $0,9 \text{ g L}^{-1}$) auf. Das hauptsächliche Nebenprodukt war Acetat, dessen Konzentration bis auf $9,0 \text{ g L}^{-1}$ bei Prozessende anstieg.

Tabelle 5.5 fasst einen Vergleich von Prozessgrößen aus den in diesem Kapitel (5.3.1, 5.3.2 und 5.3.3) beschriebenen Kultivierungen von *E. coli* TRP5a pF112aroFBL_{kan}, *E. coli* TRP5a *tktA* pF112aroFBL_{kan} und *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} mit identischer Prozessstrategie im 15 L-Maßstab zusammen.

Tabelle 5.5: Vergleich von Prozessgrößen der Kultivierungen verschiedener *E. coli* L-Tryptophan-Produktionsstämme im 15 L-Maßstab. Alle Stämme wurden in transformierter Form mit dem Plasmid pF112aroFBL_{kan} verwendet.

	TRP5a	TRP5a <i>tktA</i>	TRP5a <i>tktA serA trpBA</i>
max. L-Trp Konzentration, g L ⁻¹	9,4	13,2	15,4
max. L-Trp Bildungsrate, mg g _{BTM} ⁻¹ h ⁻¹	33	37	37
L-Trp Konzentration bei Induktion, g L ⁻¹	7,0	8,6	6,5
Produktbildungsdauer nach Induktion, h	7	21	27
Prozessdauer, h	65	89	89
max. Biotrockenmasse, g L ⁻¹	24,6	24,6	30,8

Diskussion

Die Gegenüberstellung macht die Verbesserungen des Prozessverhaltens bei Verwendung von *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} im 15 L-Zulaufprozess deutlich, die auf einen positiven Einfluss der neuen Überexpressionen *serA*, *trpB* und *trpA* auf den Prozessverlauf und die Produktbildung hinweisen. Die erzielte maximale Produktkonzentration von 15,4 g L⁻¹ stellte eine Verbesserung des mit *E. coli* TRP5a *tktA* pF112aroFBL_{kan} erreichten Maximalwertes um 17 % dar. Gleichzeitig ist dies die in allen 15 L-Prozessen, einschließlich der in Kapitel 5.2 dargestellten, höchste bestimmte Produktkonzentration. Diese Verbesserung beruhte dabei nicht auf einer Erhöhung der Produktbildungsrate, sondern auf einer Verlängerung der Produktbildungsphase um 6 h nach Induktion, sodass nun eine Zunahme der Produktkonzentration bis 27 h nach Induktion auftrat. Die außerdem reduzierte L-Tryptophan-Konzentration zum Zeitpunkt der Induktion ermöglichte eine insgesamt deutlich stärker ausgeprägte Produktbildungsphase nach Induktion bei gleichzeitig vorliegender hoher Biomassekonzentration. In dieser Phase trat mehr als eine Verdopplung der Produktkonzentration auf (von 6,5 g L⁻¹ auf 15,4 g L⁻¹). Weiterhin positiv war das günstige Verhältnis zwischen Produkt- und Nebenproduktbildung innerhalb der Aromatenbiosynthese. So lag die Konzentration des Produktes L-Tryptophan stets deutlich über den Nebenprodukt-Konzentrationen von L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Dies wird auch anhand der Kohlenstoffbilanz deutlich, die eine Umsetzung von bis zu 16 % des Kohlenstoffs in das Produkt und maximal 0,8 % in die anderen aromatischen Aminosäuren darstellt (Daten nicht gezeigt). *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} erscheint daher mit der gewählten Prozessstrategie als geeigneter Stamm für die Durchführung von metabolischen Analysen.

Um die wichtige Anforderung der Reproduzierbarkeit von Prozessverhalten und Produktbildung zu überprüfen, wurde mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} ein zweiter Produktionsprozess mit identischem Vorgehen durchgeführt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Abweichungen (Daten nicht gezeigt). Im Verlauf der Kultivierung wurde die maximale Produktkonzentration von

13,0 g L⁻¹ bei einer maximalen spezifischen Rate von bis zu 30 mg_{L-Tp} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ erreicht. Diese maximale Konzentration lag somit leicht unterhalb der zuvor erzielten Konzentration aber innerhalb der Beobachtungsvarianz.

Die Durchführung einer metabolischen Analyse ist dabei vor allem zum Zeitpunkt einer maximal ausgebildeten Produktbildung nach Induktion von Interesse. Anhand dieser Analyse sollen Limitationen der L-Tryptophan-Bildung ermittelt werden. Das offensichtliche Potential für Stammverbesserungen ergibt sich aus dem bisher nur geringen erreichten Anteil im Vergleich zur theoretischen Ausbeute (rund 20 % über die gesamte Prozesszeit, siehe Kapitel 5.2) und auch aus dem Vergleich mit bereits publizierten Produktionsprozessen. Bei diesen werden, ausgehend von Glucose als Kohlenstoffquelle, deutlich höhere Produktmengen bis zu Konzentrationen um 40 g L⁻¹ erreicht (Shen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

5.4 Metabolische Kurzzeitanalyse der L-Tryptophan-Produktion mit *E. coli* im Satzbetrieb

Der in Kapitel 5.3.3 beschriebene Prozess zur Produktion von L-Tryptophan aus Glycerin mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} soll als Grundlage für die Durchführung metabolischer Analysen dienen, die mit der Methodik der parallelen Kurzzeitanalysen nach schnellem Medienwechsel durchgeführt werden. Diese Methodik beruht auf der parallelen Auslenkung eines vorliegenden metabolischen Fließgleichgewichtes durch unterschiedliche Kohlenstoffquellen. Es gelten die folgenden Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Methode:

- Metabolisches Fließgleichgewicht im Referenzzustand
- Geeignete Kohlenstoffquellen zur unmittelbaren starken Auslenkung des Fließgleichgewichtes
- Schnelle Einstellung neuer Gleichgewichtszustände im Kurzzeitexperiment

Anhand einer Kultivierung im 15 L-Maßstab mit paralleler Durchführung einer parallelisierten Kurzzeitanalyse im Satzbetrieb soll die Erfüllung der genannten Voraussetzungen überprüft werden.

5.4.1 Referenzprozess im 15 L-Maßstab

Der Verlauf des L-Tryptophan-Produktionsprozesses im 15 L-Maßstab als Grundlage der metabolischen Analyse im Satzbetrieb ist in Abbildung 5.15 anhand ausgewählter Konzentrationen dargestellt.

Bis zur Induktion (44,3 h) stieg die Konzentration der Biotrockenmasse auf 19,3 g L⁻¹ und im weiteren Verlauf bis auf maximal 28,9 g L⁻¹, wobei zwischen 51 h und 74 h keine deutliche Änderung der Biotrockenmasse-Konzentration mehr nachzuweisen war. Auch die L-Tryptophan-Konzentration zeigte bereits ab Kultivierungsbeginn einen Anstieg auf 8,0 g L⁻¹ bei Induktion. Während der konstanten Zulaufphase wurde eine weitere Zunahme der Produktkonzentration bis auf den Höchstwert von 12,5 g L⁻¹ nach 68 h Prozesszeit ermittelt. Dabei wurde eine maximale Produktbildungsrate von 28 mg_{L-Trp} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ bestimmt. Im Anschluss nahm die L-Tryptophan-Konzentration bis auf 10,3 g L⁻¹ am Prozessende ab, wobei die Medienverdünnung durch das weiterhin zugeführte Zulaufmedium diese Abnahme erneut nur teilweise erklären kann.

Während die Stickstoffquelle Ammoniak über die gesamte Prozessdauer unlimitiert vorlag (~2–4 g L⁻¹) und am Prozessende nur leicht auf 6,5 g L⁻¹ akkumulierte, lag die Kohlenstoffquelle Glycerin mit nur geringen Konzentrationen (< 0,5 g L⁻¹) während des gesamten Prozesses vor. Erst ab ca. 60 h wurde eine deutliche Anreicherung auf bis zu 30,3 g L⁻¹ bei Prozessende beobachtet. All diese Prozessgrößen entsprechen in guter Übereinstimmung dem in Kapitel 5.3.3 gezeigten Prozess mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan}.

Gleiches gilt für das Nebenprodukt-Spektrum und die dabei ermittelten Konzentrationen: L-Glutamat lag über die gesamte Prozessdauer mit geringer Konzentration vor (max. $0,3 \text{ g L}^{-1}$), die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin wurden nach Induktion gebildet und erreichten maximal $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (L-Tyrosin) und $0,4 \text{ g L}^{-1}$ (L-Phenylalanin) nach rund 70 h. Zusätzlich wurden wiederum die organischen Säuren Lactat, Malat und Acetat nach dem Ende der eigentlichen Produktionsphase gebildet und führten zu maximalen Konzentrationen von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ Lactat, $1,0 \text{ g L}^{-1}$ Malat und $8,9 \text{ g L}^{-1}$ Acetat. Eine Ausnahme stellt der Nachweis der organischen Säure Succinat dar. Diese wurde erstmals bestimmt mit einer Konzentration von $1,3 \text{ g L}^{-1}$.

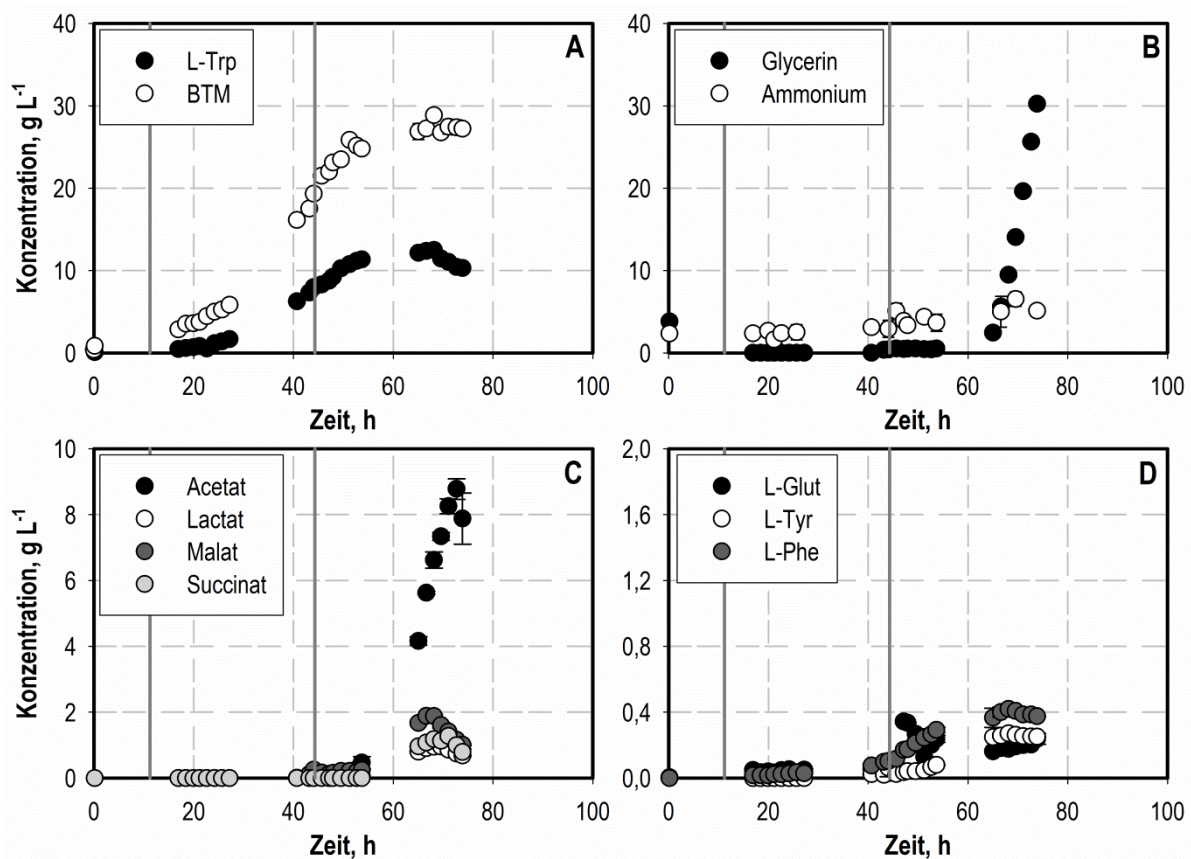


Abbildung 5.15: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Satzverfahren. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Lactat (○), Malat (●) und Succinat (○). D: L-Glutamat (L-Glut ●), L-Tyrosin (L-Tyr ○) und L-Phenylalanin (L-Phe ●). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (11,2 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase sowie die Zugabe von 0,3 mM IPTG (44,3 h).

Für eine weitere Beurteilung des Prozesses wurde eine integrale Kohlenstoffbilanz erstellt, die in Abbildung 5.16 dargestellt ist. Die Bilanz weist zu allen Probenahmezeitpunkten eine gute Geschlossenheit zwischen 92 und 106 % Prozent auf. Hierbei zeigte sich deutlich die konstante Bildung des Produktes L-Tryptophan über die gesamte Prozesszeit, wodurch während der exponentiellen Zulaufphase ein Kohlenstoffanteil von über 10 % auf das Produkt entfiel und der entsprechende Maximalwert 16 % bereits vor Induktion bei 40 h Prozesszeit erreicht wurde. Im

Folgenden, während der konstanten Zulaufphase, blieb der Anteil an Kohlenstoff für L-Tryptophan zwischen 13 und 16 %, bevor er ab 65 h auf 8 % am Prozessende abnahm.

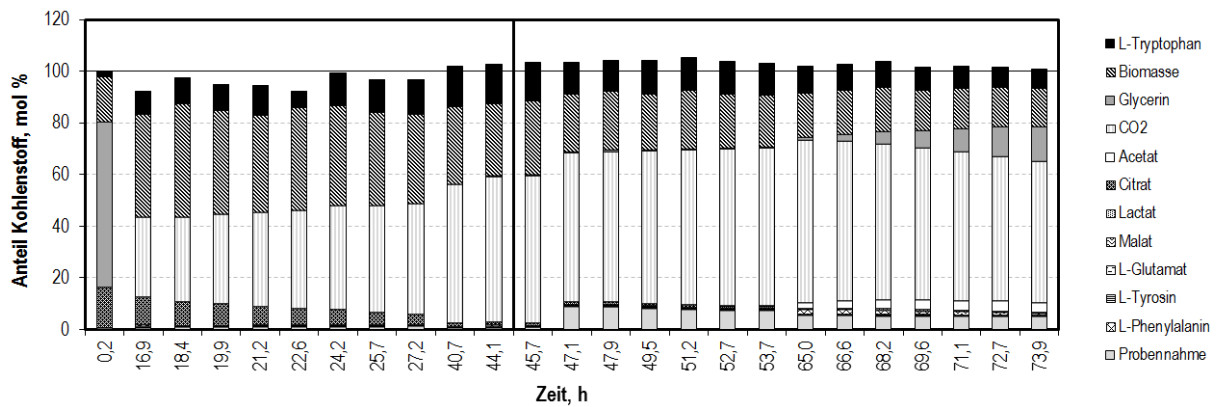


Abbildung 5.16: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} im 15 L-Maßstab als Grundlage einer metabolischen Analyse im Satzbetrieb. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die vertikale Linie trennt die Probenahmen vor und nach Induktionszeitpunkt.

Die Komponenten, auf die der größte Anteil an Kohlenstoff entfiel, waren Biomasse mit bis zu 40 % während der exponentiellen Zulaufphase und vor allem CO₂, das einen maximalen Anteil von 63 % nach 65 h Prozesszeit erreichte. Weiterhin gut zu erkennen sind die Akkumulation der Kohlenstoffquelle Glycerin und die Acetat-Bildung am Prozessende. Die Anteile der weiteren Nebenprodukte waren mit jeweils weniger als 1 % nur gering in Bezug auf den gesamten Kohlenstoff. Der plötzlich große Anteil der Probenahme nach 47 h wurde durch die Entnahme von 3,6 L Zellsuspension für die metabolische Analyse verursacht.

Die ermittelten Prozessgrößen während dieser Kultivierung entsprechen in den ersten 70 h den zuvor mit identischer Strategie durchgeführten Prozessen mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} (siehe Kapitel 5.3.3). Der größte Unterschied zwischen dieser und vorherigen Kultivierungen ist die früher einsetzende Akkumulation der Kohlenstoffquelle Glycerin, bereits ab ca. 60 h anstatt wie zuvor nach 75 h. Ein Grund für das frühere Ende der metabolischen Aktivität der Zellen und somit auch des Prozesses ist nicht bekannt. Da sich die Veränderungen jedoch auf den Zeitraum nach dem Ende der Produktbildung bezogen und ähnliche Produktkonzentrationen wie zuvor erreicht wurden, hatte dies keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Zeitpunktes für die Durchführung der metabolischen Analyse, die 3 h nach Induktion bei einer vorliegenden hohen Biomassekonzentration und einer hohen biomassespezifischen Produktbildungsrate erfolgte.

Referenzzustand während der metabolischen Analyse

Die Entnahme von Zellsuspension für die metabolische Analyse erfolgte 3 h nach Induktion und dem Beginn der konstanten Zulaufphase, also bei 47,1 h Prozesszeit. Die parallelisierte Kurzzeitanalyse wurde im Zeitraum bis zur nächsten Probenahme (47,9 h) durchgeführt. Dieser Zeitraum ist in Abbildung 5.17 grau hinterlegt.

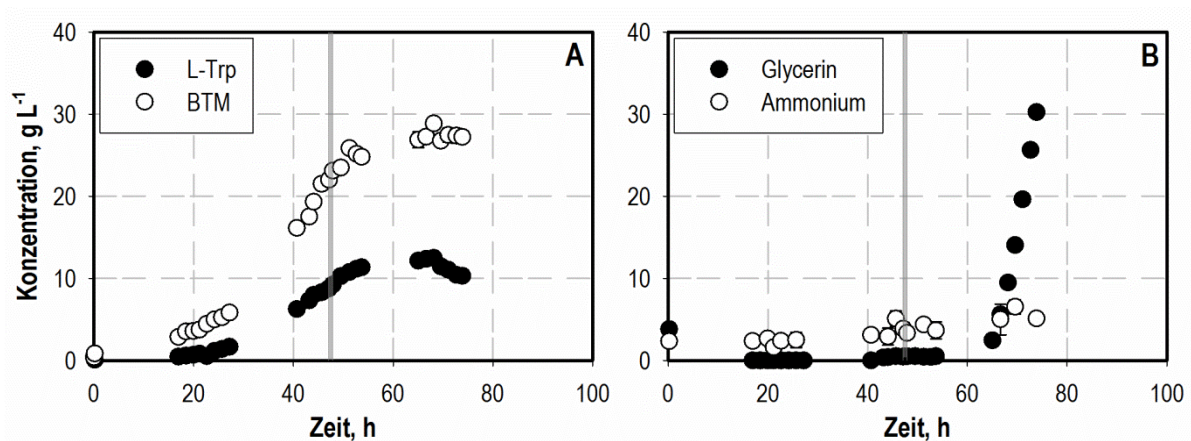


Abbildung 5.17: 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tkta serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Satzverfahren. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). Grau markiert ist der Zeitraum, in dem die parallelisierte metabolische Analyse im Satzbetrieb durchgeführt wurde (47,1 h–47,9 h).

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methodik des schnellen Medienwechsels ist ein metabolisches Fließgleichgewicht im Referenzzustand, das durch die metabolische Analyse ausgelenkt und charakterisiert werden soll. Im vorliegenden Fall war dies der 15 L-Produktionsprozess im Zeitraum der metabolischen Analyse. Das Erreichen metabolischer Gleichgewichtszustände kann anhand konstanter Atmungsraten festgestellt werden. Die im Produktionsprozess im Zeitraum der metabolischen Analyse gemessenen Atmungsraten (O₂-Aufnahme und CO₂-Bildung) sind in Abbildung 5.18 dargestellt.

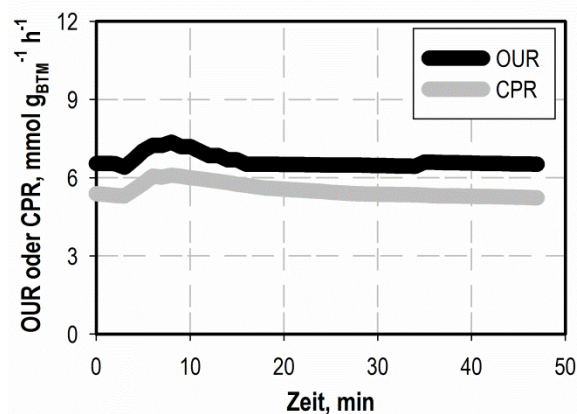


Abbildung 5.18: Atmungsraten (Sauerstoffaufnahme rate OUR ● und CO₂-Bildungsrate CPR ●) im Referenzprozess im Zeitraum der metabolischen Analyse im Satzverfahren.

Im zeitlichen Verlauf der Atmungsraten (siehe Abbildung 5.18) ergab sich zunächst eine Zunahme beider Raten während der Entnahme von 3,6 L Zellsuspension. Dies ist auf die abnehmende Menge an Zellen im Reaktor, die Anpassung der Glycerinzufuhr und die erst zeitversetzt reagierende Abgasanalytik zurückzuführen. Etwa 10 min nach Beginn der Zellentnahme wurden wieder ähnliche Werte der Atmungsraten wie zuvor erreicht, welche dann über die folgenden 30 min konstant bei $6,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ OUR und $5,5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ CPR blieben. Im Referenzprozess änderten sich die gemessenen Atmungsraten im entscheidenden Zeitraum also nur vorübergehend aufgrund der von außen auftretenden Störung durch die Zellentnahme, sodass von einem ausgebildeten metabolischen Fließgleichgewicht ausgegangen werden kann. Gleichzeitig gewährleistete die konstante Substratzufuhr eine prozesstechnische Sicherstellung von vergleichbaren Aufnahmeleistungen in diesem Zeitraum.

Die intrazelluläre Stoffflussverteilung im Referenzzustand wurde durch eine geometrische Flussbilanzanalyse (*gFBA*) (siehe Kapitel 3.5 und 4.6) unter Vorgabe der extrazellulären Raten für Glycerin und L-Tryptophan, sowie mit einer maximalen Wachstumsrate als Optimierungskriterium ermittelt. Die vorgegebenen und berechneten Werte dieser extrazellulären Raten sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

Tabelle 5.6: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Sauerstoffaufnahme, CO₂-Bildung und Biomassebildung im Referenzprozess während der metabolischen Analyse im Satzbetrieb in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Ausnahme Biomassebildung in h^{-1}). Für die Berechnungen (*gFBA* und *FVA*) vorgegebene Werte sind mit * markiert.

Reaktion	Fluss gemessen	Fluss (<i>gFBA</i>)	Min. Fluss (<i>FVA</i>)	Max. Fluss (<i>FVA</i>)
Glycerin-Aufnahme	$2,58 \pm 0,08$	2,58*	2,50*	2,65*
L-Trp-Bildung	$0,12 \pm 0,04$	0,12*	0,09*	0,16*
O ₂ -Aufnahme	$6,57 \pm 0,16$	4,08	3,89	4,23
CO ₂ -Bildung	$5,47 \pm 0,21$	3,03	2,87	3,15
Biomassebildung	0,04	0,08	0,07	0,09

Beim Vergleich von gemessenen und berechneten Raten wurden Abweichungen sowohl für die Sauerstoffaufnahme als auch für die Kohlendioxidbildung von rund $2,5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ermittelt. Der Grund hierfür ist in der Optimierung der Biomassebildung zu sehen, welche für die Berechnungen vorgegeben wird, die den im Prozess vorliegenden Bedingungen jedoch nicht vollständig entspricht. Dies wird durch den Unterschied zwischen experimentell ermittelter und theoretischer Wachstumsrate ersichtlich. Im theoretischen Ansatz wurde eine höhere Wachstumsrate vorhergesagt als experimentell ermittelt (+ 100 %). Diese höhere Biomassebildung bewirkte in der theoretischen Abschätzung einen deutlich höheren Abfluss von Kohlenstoff in die Biomassebildung. Entsprechend stand weniger Kohlenstoff für die Kohlendioxidbildung zur Verfügung. Dennoch wurde ein für Glycerin typischer Respirationskoeffizient < 1 sowohl gemessen als auch theoretisch ermittelt.

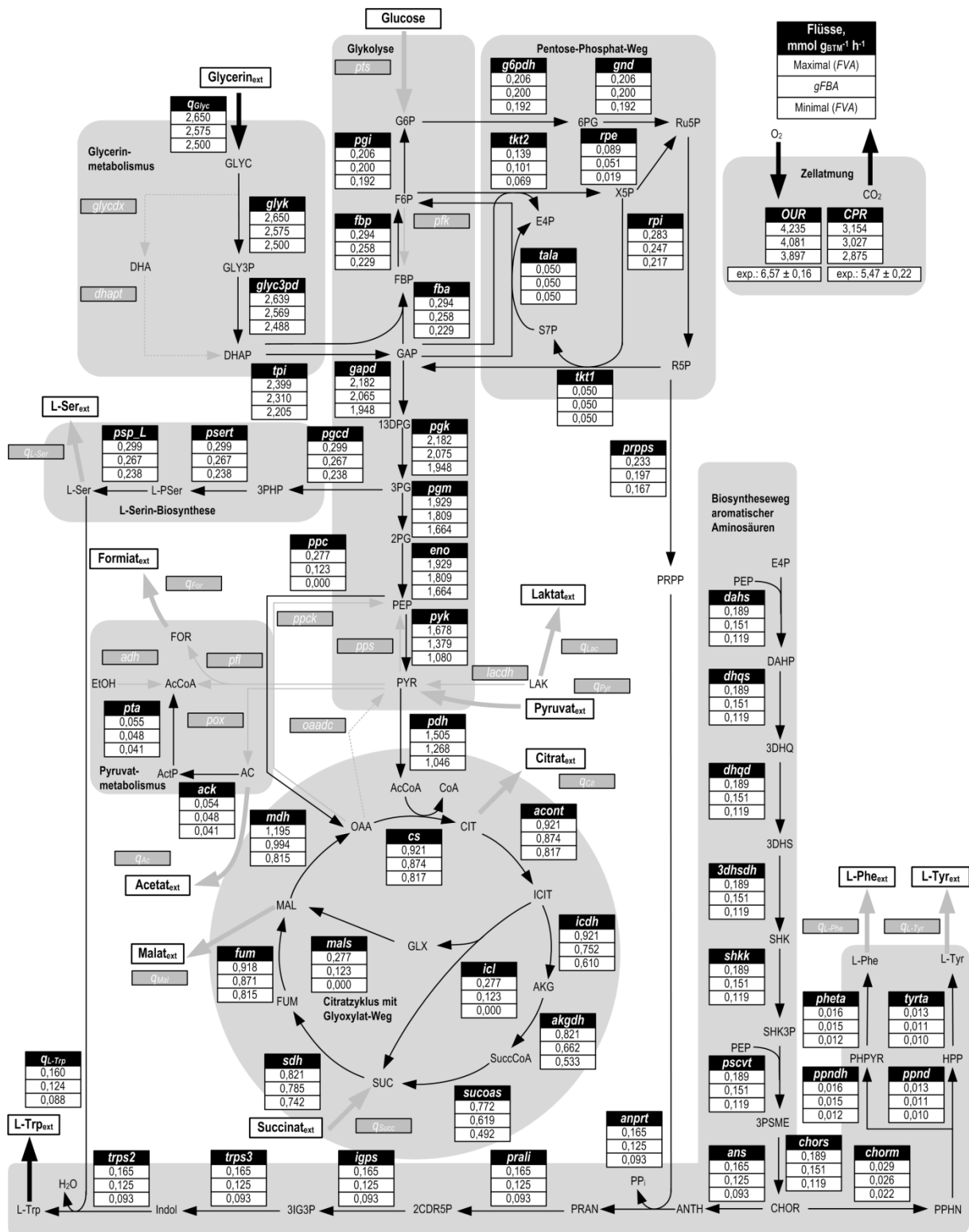


Abbildung 5.19: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im **Referenzzustand** (15 L-Produktionsprozess) für die metabolische Analyse im Satzverfahren. Die gegebenen Werte wurden mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (*FVA*) abgeschätzt auf Grundlage des genomweiten *E. coli* Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die schwarzen Pfeile markieren aktive Stoffflüsse in Pfeilrichtung, inaktive Stoffflüsse sind grau dargestellt. Alle Werte sind in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ angegeben. Obere Zahl: Maximalwert der *FVA*; mittlere Zahl: Ergebnis der *gFBA*; untere Zahl: Minimalwert der *FVA*. Für die Atmungsraten sind zusätzlich die experimentell ermittelten Werte angegeben. Randbedingungen der Berechnung: Glycerin-Aufnahmerate und L-Tryptophan-Bildungsrate.

Die berechneten Stoffflussverteilungen im Zentralstoffwechsel und im Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren im Referenzzustand sind in Abbildung 5.19 dargestellt. In der folgenden Beschreibung der Flussverteilung werden jeweils nur die Werte der *gFBA* genannt. 2,575 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Glycerin werden von den Zellen aufgenommen und aufgrund der vorliegenden aeroben Bedingungen durch die *glyk* und die *glyc3pd* zu DHAP umgesetzt. Dieser Metabolit stellt den Verknüpfungspunkt zwischen Glycerin-Metabolismus und Glykolyse dar, wobei zunächst eine weitere Umsetzung zu GAP stattfindet. Dort verteilt sich der Stofffluss in zwei Richtungen, sodass 11 % des Kohlenstoffs durch gluconeogenetische Reaktionen zu F6P und G6P umgesetzt werden. Ausgehend von GAP, F6P und G6P sind Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges aktiv. Die Stoffflüsse in diesem Teil des Stoffwechsels sind stark durch die vorgegebene Rate der Produktbildung beeinflusst, da E4P sowie das aus R5P gebildete PRPP Vorläufermetabolite von L-Tryptophan sind. Ihre Bildung wird vor allem durch aktive Stoffflüsse der Enzyme *g6pdh*, *gnd*, *rpi* und *tkt2* zwischen 0,1 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und 0,3 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gewährleistet.

Ausgehend von GAP werden die restlichen 89 % des Kohlenstoffs durch Reaktionen der Glykolyse bis zu PEP umgesetzt, von dem 1,796 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gebildet werden. Zuvor zweigt bei 3PG die L-Serin-Biosynthese mit einem Fluss von 0,269 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ab. Auch dieser Stofffluss wird neben der Notwendigkeit von L-Serin für die Biomassebildung stark von der vorgegebenen Produktbildungsrate beeinflusst. 75 % des gebildeten PEP werden von der *pyk* direkt zu Pyruvat umgewandelt, welches zu einem großen Teil weiter über AcCoA im Citratzyklus umgesetzt wird. In diesem liegen Stoffflüsse um 0,8 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vor.

Aktivitäten der Reaktionen *ppc*, also der Umsetzung von PEP zu OAA, sowie *icl* und *mals*, welche zusammen den Glyoxylat-Bypass bilden, werden von der *gFBA* berechnet. Bei den Ergebnissen der *FVA* erscheinen diese Aktivitäten als optional. Alle weiteren Enzymaktivitäten und Flussrichtungen sind klar gegeben und nur mit geringen Unsicherheiten behaftet.

PEP wird neben der Umsetzung zu PYR und OAA in zwei Reaktionen im allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese verbraucht, der hier mit 0,154 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ abläuft. Ab dem Verzweigungspunkt dieses Stoffwechsels, CHOR, fließen 16 % des Kohlenstoffs in Richtung Prephenat, das nach weiterer Verzweigung die Bildung von 0,014 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Phenylalanin und 0,011 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Tyrosin ermöglicht. Auch diese Aminosäuren sind für die Biomassebildung nötig, sodass ihre Biosynthese auch ohne von außen vorgegebene Bildungsrate auftritt. Die Biosynthese des Produktes L-Tryptophan läuft ausgehend von CHOR über ANTH linear ab mit 0,129 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, von denen 0,124 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ als extrazelluläre Rate vorgegeben sind und der Rest für die Bildung von Biomasse nötig ist. Zwischen ANTH und L-Tryptophan werden PRPP und L-Serin stöchiometrisch verbraucht.

5.4.2 Parallelisierte Kurzzeitanalyse im Satzbetrieb

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung metabolischer Analysen mit der Methodik des schnellen Medienwechsels ist die Auswahl geeigneter Substrate, die während der Analyse als Kohlenstoffquelle verwendet werden. Diese müssen von den aus dem Prozess entnommenen Zellen unmittelbar mit hoher biomassespezifischer Aufnahmerate verstoffwechselt werden und somit die Bildung des gewünschten Produkts ermöglichen. Dabei ist die Ausbildung neuer metabolischer Fließgleichgewichte innerhalb weniger Minuten notwendig, um in späteren Analysen mehrere Gleichgewichte während einer Analyse erzielen zu können. Die Charakterisierung möglicher Substrate für die metabolische Analyse der L-Tryptophan-Produktion mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} erfolgte anhand einer Kurzzeitanalyse im Satzbetrieb, wobei das primäre Ziel die Ermittlung der maximalen Aufnahmeraten für die einzelnen Kohlenstoffquellen war. Dies war notwendig, um für spätere Analysen die Zulaufraten der Substrate passend auszulegen. Für die Analyse wurden zum in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Zeitpunkt (3 h nach Induktion) 3,6 L Zellsuspension aus dem laufenden Prozess entnommen, abzentrifugiert, in frischem vortemperierten Medium resuspendiert und gleichmäßig auf das Vierfach-Parallelbioreaktorsystem verteilt (siehe auch Kapitel 4.3.5).

In jedem der Reaktoren lag eine der Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat als Substrat vor. Die Verläufe der Konzentrationen der verwendeten Kohlenstoffquellen sowie des Produktes L-Tryptophan nach Zugabe der Zellen aus dem Produktionsprozess in den vier Reaktoren sind in Abbildung 5.20 dargestellt. Alle eingesetzten Kohlenstoffquellen wurden unmittelbar nach Inokulation mit hoher Aufnahmerate verstoffwechselt, sodass während der 19 minütigen Analyse in allen Reaktoren eine deutliche Abnahme der entsprechenden Konzentration messbar war. Eine konstante Aufnahme der Kohlenstoffquellen, welche die Einstellung metabolischer Gleichgewichte ermöglicht, zeigte sich anhand einer linearen Abnahme der Konzentrationen. Einzige Ausnahme hierbei war der erste Messpunkt im Ansatz mit der Kohlenstoffquelle Glucose, der eine ähnliche Konzentration wie der folgende aufweist und aus diesem Grund nicht für die Berechnung der Aufnahmerate herangezogen wurde. Der Grund für diese Abweichung ist nicht bekannt. In allen Reaktoren war die vorgelegte Kohlenstoffquelle bei der letzten Probenahme noch nicht verbraucht, sodass eine konstante Aufnahme über die gesamte Dauer der Analyse möglich war. Mit der Beobachtung von hohen Aufnahmeraten aller Kohlenstoffquellen wurde eine wichtige Voraussetzung für die weitere Durchführung metabolischer Analysen somit erfolgreich nachgewiesen.

Weiterhin sind in Abbildung 5.20 die Konzentrationsverläufe des Produktes L-Tryptophan dargestellt. Dieses wurde in allen Ansätzen gebildet und konnte innerhalb der 19 minütigen Analyse analytisch erfasst werden. Auch dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Durchführbarkeit metabolischer Analysen. Die höchste Zunahme der Produktkonzentration trat dabei im Ansatz mit der

Kohlenstoffquelle Glucose auf ($\Delta c_{L-Trp} = 0,39 \text{ g L}^{-1}$), die Produktbildung im Reaktor mit Pyruvat war jedoch nur sehr gering ($\Delta c_{L-Trp} = 0,12 \text{ g L}^{-1}$).

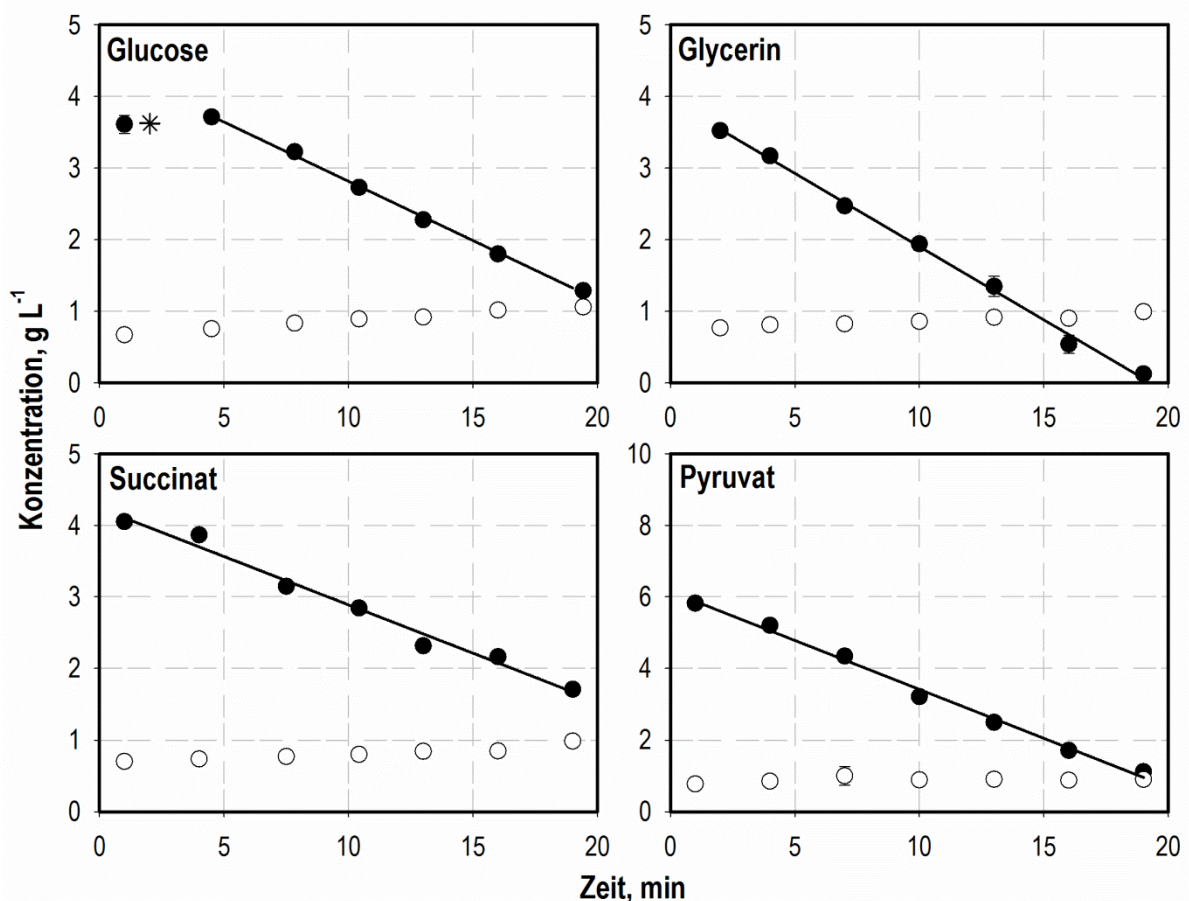


Abbildung 5.20: Konzentrationsverläufe der Kohlenstoffquellen (C-Quelle ● jeweils wie links oben angegeben) und Produkt L-Tryptophan (L-Trp ○) in den vier Reaktoren des Parallel-Bioreaktorsystems während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion im Satzverfahren mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan}. Der mit * markierte Datenpunkt wurde für die Linearisierung nicht berücksichtigt.

Weitere wichtige Zustandsgrößen bei metabolischen Analysen sind die biomassespezifischen Atmungsraten (Sauerstoffaufnahme OUR und Kohlenstoffdioxidbildung CPR), welche über die kontinuierlich aufgezeichneten Abgaskonzentrationen ermittelt werden. Von Interesse ist hierbei das Erreichen von konstanten Raten, da diese als Nachweis für die Ausbildung von metabolischen Fließgleichgewichten dienen. Die Verläufe der während der Analyse im Satzbetrieb ermittelten spezifischen Atmungsraten sind in Abbildung 5.21 dargestellt.

Im Ansatz mit Glucose wurden konstante Werte von $5,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (CPR) und $3,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (OUR) bereits nach 5 min erreicht. Im Reaktor mit der Kohlenstoffquelle Glycerin wurden hohe spezifische Atmungsraten erreicht mit einem $\text{RQ} < 1$. Konstante Werte lagen hier nach rund 6 min vor (CPR $6,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und OUR $9,5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Im Fall der Kohlenstoffquelle Pyruvat wurde eine konstante O_2 -Aufnahmerate nach 5 min erreicht ($7,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), die CO_2 -Bildungsrate stieg weiter bis auf konstant $10,2 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach

einer Analysendauer von 7 min. Die längere Dauer bis zum Erreichen dieses konstanten Wertes konnte durch die absolute Höhe des Wertes und die zeitliche Verzögerung in der analytischen Erfassung begründet sein. Im Falle von Succinat wurden ein konstanter CPR von $6,8 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und ein konstanter OUR von $5,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach rund 10 min erreicht. Im Gegensatz zu Pyruvat konnte der längere Zeitraum bis zum Erreichen der konstanten Werte hier nicht durch die Höhe der Werte begründet werden. Eine mögliche Ursache ist in der hier zu Beginn der Analyse vorliegenden Nebenproduktbildungen von L-Malat und in geringerem Maße auch L-Glutamat zu sehen, welche nach 10 min abflachten und somit eine Instationarität in diesem Ansatz verursachten.

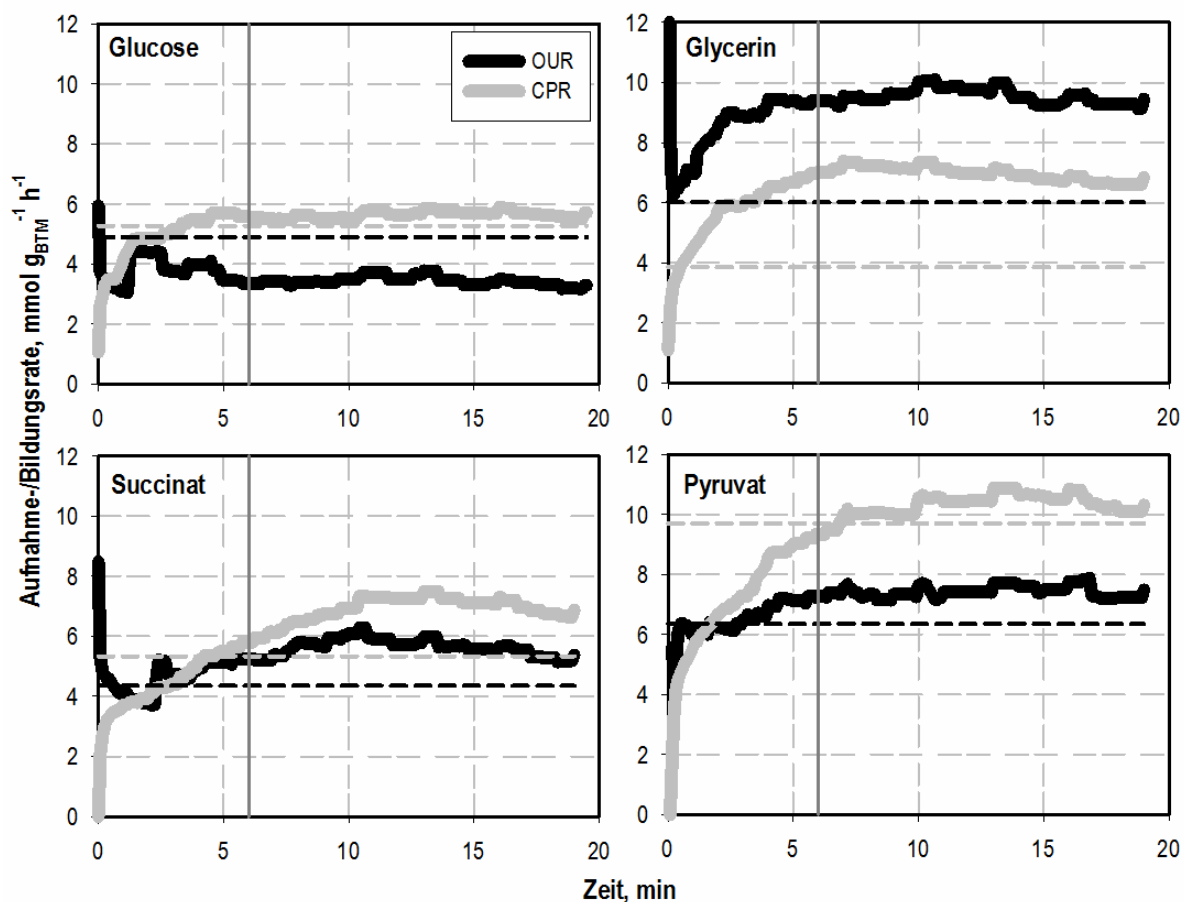


Abbildung 5.21: Atmungsraten (O_2 -Aufnahmerate OUR ● und CO_2 -Bildungsrate CPR ●) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion im Satzverfahren in den vier Reaktoren des Parallelbioreaktorsystems mit den Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat mit *E. coli* TRP5a tktA serA trpBA pF112aroFBL_{kan}. Die vertikale Markierung nach 6 min zeigt den Zeitpunkt, zu dem konstante Atmungsraten erreicht sein sollen (Link *et al.*, 2010). Gestrichelt dargestellt sind die mittels *gFBA* ermittelten Atmungsraten (schwarz: OUR, grau: CPR).

Alle aus Konzentrationsverläufen und Abgasdaten ermittelten biomassespezifischen Aufnahme- und Bildungsraten während der metabolischen Analyse sind in Abbildung 5.22 und Tabelle 5.7 zusammengefasst. OUR und CPR sind dabei jeweils gemittelte Werte nach Erreichen der Gleichgewichtszustände, welche im oberen Abschnitt beschrieben sind. Die so ermittelten Raten sollen für jedes Substrat im Folgenden kurz zusammengefasst werden:

Tabelle 5.7: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Substrat-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, O₂-Aufnahme, CO₂-Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Satzbetrieb mit den Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat in mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ (Ausnahme Biomassebildung in h⁻¹). Für die Berechnungen (*gFBA* und *FVA*) vorgegebene Werte sind mit * markiert. Die zugehörigen Werte des Referenzzustandes sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

Glucose				
Reaktion	Fluss gemessen	Fluss (<i>gFBA</i>)	Min. Fluss (<i>FVA</i>)	Max. Fluss (<i>FVA</i>)
Glucose-Aufnahme	2,12 ± 0,03	2,12*	2,09*	2,15*
L-Trp-Bildung	0,24 ± 0,02	0,24*	0,22*	0,26*
O ₂ -Aufnahme	3,43 ± 0,14	4,78	4,66	5,04
CO ₂ -Bildung	5,65 ± 0,10	5,16	5,05	5,26
Biomassebildung	< 0,05	0,12	0,11	0,13
Glycerin				
Reaktion	Fluss gemessen	Fluss (<i>gFBA</i>)	Min. Fluss (<i>FVA</i>)	Max. Fluss (<i>FVA</i>)
Glycerin-Aufnahme	5,20 ± 0,05	5,20*	5,25*	5,15*
L-Trp-Bildung	0,13 ± 0,02	0,13*	0,11*	0,15*
Lactat-Bildung	1,26 ± 0,31	1,26*	0,95*	1,57*
O ₂ -Aufnahme	9,51 ± 0,25	5,58	6,01	6,03
CO ₂ -Bildung	6,97 ± 0,23	3,41	2,96	3,86
Biomassebildung	< 0,05	0,17	0,15	0,19
Succinat				
Reaktion	Fluss gemessen	Fluss (<i>gFBA</i>)	Min. Fluss (<i>FVA</i>)	Max. Fluss (<i>FVA</i>)
Succinat-Aufnahme	2,53 ± 0,10	2,53*	2,63*	2,43*
L-Trp-Bildung	0,15 ± 0,02	0,15*	0,13*	0,17*
Malat-Bildung	0,48 ± 0,09	0,48*	0,39*	0,57*
O ₂ -Aufnahme	5,58 ± 0,30	4,17	3,89	4,57
CO ₂ -Bildung	6,81 ± 0,51	5,11	4,67	5,55
Biomassebildung	< 0,05	0,04	0,02	0,05
Pyruvat				
Reaktion	Fluss gemessen	Fluss (<i>gFBA</i>)	Min. Fluss (<i>FVA</i>)	Max. Fluss (<i>FVA</i>)
Pyruvat-Aufnahme	6,55 ± 0,13	6,55*	6,68*	6,42*
L-Trp-Bildung	0,04 ± 0,04	0,04*	0,00*	0,08*
Formiat-Bildung	0,82 ± 0,19	0,82*	0,63*	1,01*
Acetat-Bildung	1,89 ± 0,18	1,89*	1,71*	2,07*
O ₂ -Aufnahme	7,43 ± 0,26	6,02	5,67	6,42
CO ₂ -Bildung	10,22 ± 0,46	9,19	8,66	9,72
Biomassebildung	< 0,05	0,13	0,11	0,15

Glucose wurde mit $2,12 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ von den Zellen aufgenommen und führte zu einer Produktbildungsrate von $0,24 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Dies war die höchste ermittelte Produktbildungsrate in dieser Analyse. Nebenprodukte traten in diesem Ansatz nicht auf. Der für die Kohlenstoffquelle Glucose hohe RQ von 1,6 (deutlich oberhalb von $\text{RQ} = 1,0$ bei vollständiger Oxidation) zeigte eine hohe CO_2 -Bildung und somit eine reduzierte Kohlenstoffverwertung an.

Bei Glycerin betrug die Aufnahmerate im Analysenreaktor $5,20 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, was zu einer beinahe vollständigen Verstoffwechslung des Substrats innerhalb der 19 min führte. Neben dem Produkt L-Tryptophan ($0,13 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) wurde Lactat als Nebenprodukt gebildet ($1,26 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Im Referenzprozess betrug die durch die Zulauftrate vorgegebene Aufnahmerate des Substrats Glycerin mit $2,58 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 50 % der Rate aus dem Analysenreaktor. Auch die Atmungsraten lagen im Prozess niedriger bei 69 % (OUR) und 78 % (CPR), die Produktbildungsrate hingegen war mit $0,13 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ identisch. In Prozess und Analyse lag der $\text{RQ} < 1$ ($\text{RQ} = 0,8$ im Prozess und $\text{RQ} = 0,7$ bei der Analyse), wobei der Unterschied mit der Nebenproduktbildung an Lactat im Analysenreaktor zu erklären war.

$2,53 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ der Kohlenstoffquelle Succinat wurden von den Zellen während der Analyse aufgenommen und in $0,15 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Tryptophan umgesetzt. Das wichtigste Nebenprodukt in diesem Ansatz war Malat ($0,48 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), wobei auch eine geringe Bildung von L-Glutamat erfasst wurde ($0,04 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Es ergaben sich also im Rahmen dieser metabolischen Analyse nahezu identische Produktbildungsraten ausgehend von den Kohlenstoffquellen Succinat und Glycerin in Analyse und Referenzprozess. Der in diesem Ansatz ermittelte RQ von 1,2 stellt einen für Succinat typischen Wert dar.

Für Pyruvat ergab sich die höchste molare Aufnahmerate der vier Ansätze ($6,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Diese ermöglichte jedoch nur eine geringe Produktbildungsrate von $0,04 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, die zudem eine hohe analytische Unsicherheit aufwies. Hingegen fand eine deutliche Bildung der Nebenprodukte Formiat ($0,82 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und Acetat ($1,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) statt. Der damit verbundene Verlust an Kohlenstoff führte zu einem für Pyruvat relativ niedrigen RQ von 1,4.

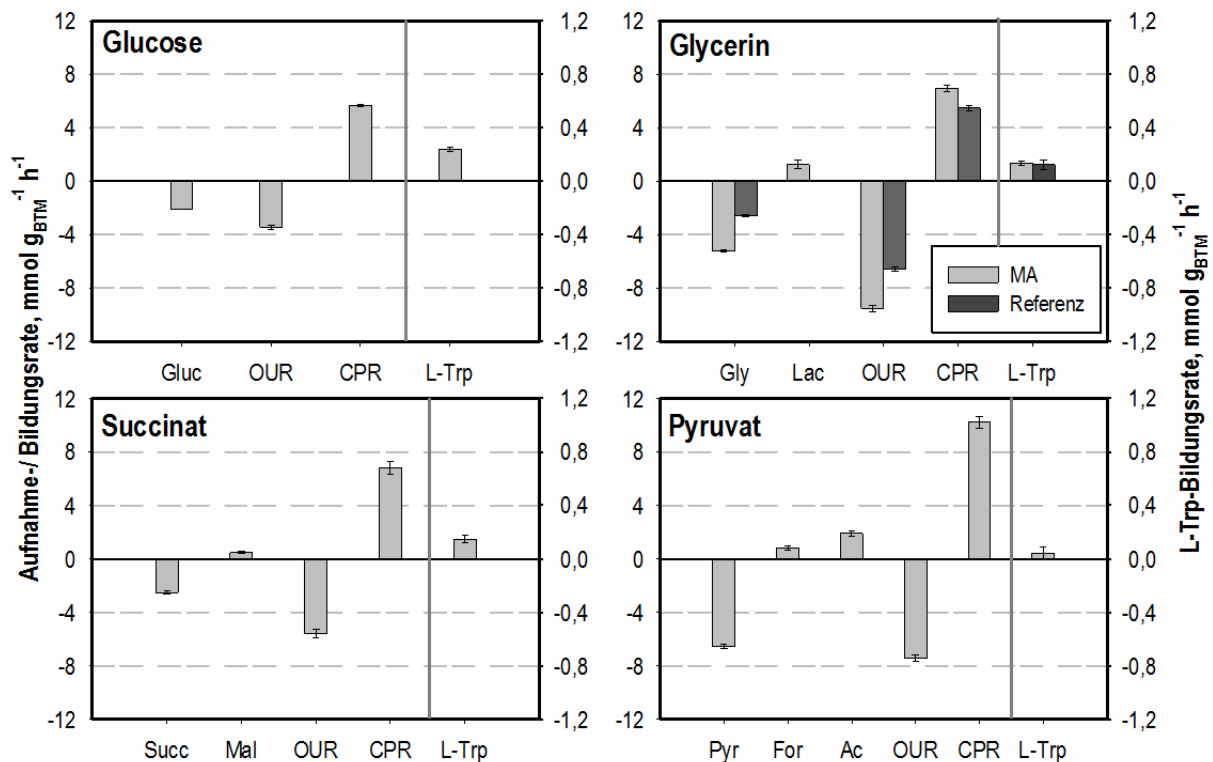


Abbildung 5.22: Experimentell ermittelte extrazelluläre Aufnahme- und Bildungsraten (Substrataufnahme, Produkt- und Nebenproduktbildung sowie Atmungsraten) während der parallelisierten Kurzzeitanalyse im Satzverfahren mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan}. Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc), Glycerin (Gly), Succinat (Succ) und Pyruvat (Pyr); Produkt L-Tryptophan (L-Trp); Nebenprodukte Lactat (Lac), L-Malat (Mal), Formiat (For) und Acetat (Ac); Atmungsraten Sauerstoffaufnahme (OUR) und CO₂-Bildungsrate (CPR). Für die Kohlenstoffquelle Glycerin sind die Raten im Analysenreaktor (MA) und im Referenzprozess angegeben.

Die dargestellte metabolische Analyse der L-Tryptophan-Produktion mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} im Satzbetrieb zeigte, dass bei der gewählten Kombination aus Stamm und Prozess wichtige Voraussetzungen für die Durchführung weiterer Analysen gegeben waren. Neben der hohen Aufnahmeraten der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen sind hier vor allem die messbare Produktbildung innerhalb von 19 min sowie das Erreichen metabolischer Fließgleichgewichtszustände zu nennen, welche jedoch in den Ansätzen mit Succinat und Pyruvat nicht innerhalb des angestrebten Zeitraumes von 6 min auftraten. Da die weiteren metabolischen Analysen im Zulaufbetrieb mit Stufenprofilen durchgeführt werden sollen, wird bei ihnen über den größten Teil der Analysendauer eine Substratlimitierung der Zellen erwartet. Dies verursacht im Vergleich zu den hier gezeigten Satzanalysen geringere Substrataufnahmeraten und darüber hinaus erfahrungsgemäß eine reduzierte Bildung von Nebenprodukten. Beide Änderungen sollten das Einstellen der metabolischen Fließgleichgewichte erleichtern und das Erreichen konstanter Atmungsraten beschleunigen.

5.4.3 Theoretische Stoffflussabschätzungen

Die in Abbildung 5.22 und Tabelle 5.7 dargestellten biomassespezifischen Raten für die Aufnahme von Substraten sowie für die Bildung von Produkten und Nebenprodukten wurden als Randbedingungen für theoretische Stoffflussabschätzungen mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (*FVA*) in der COBRA Toolbox auf Basis des genomweiten *E. coli* Modells *iAF1260* genutzt (siehe Kapitel 3.5 und 4.6). Als Optimierungskriterium diente die Wachstumsrate. Die ermittelten Flussverteilungen für die Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat sind in Abbildung 5.23 bis Abbildung 5.26 dargestellt und werden im Folgenden anhand der mittels *gFBA* abgeschätzten Stoffflüsse erläutert. Wenn nicht anders angegeben, ergab die Flussvarianzanalyse nur kleine Abweichungen der Stoffflüsse und keine Unklarheiten bezüglich Reaktionsrichtungen. Alle Zahlenwerte können den Abbildungen entnommen werden.

Ausgehend von Glucose als Substrat (Abbildung 5.23) werden die glykolytischen Reaktionen bis zu PEP durchlaufen. Ausgehend von G6P, F6P und GAP sind verschiedene Reaktionen des oxidativen und reduktiven Pentose-Phosphat-Weges mit $0,1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis $0,5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aktiv, die unter anderem auch der Bereitstellung der L-Tryptophan-Vorläufermetabolite E4P und PRPP dienen. F6P und GAP stellen dabei sowohl Substrate als auch Reaktionsprodukte dar. Eine weitere wichtige Abzweigung aus der Glykolyse erfolgt bei 3PG, aus dem in drei enzymatischen Schritten $0,45 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ L-Serin entsteht, der nächste Vorläufer des Produktes L-Tryptophan. Bei all diesen Reaktionen hat die als Randbedingung vorgegebene Produktbildung großen Einfluss auf die Größe der Stoffflüsse.

Bei Verwendung von Glucose erfolgt die Umsetzung von PEP zu Pyruvat bei der Glucoseaufnahme, sodass keine Aktivität der *pyk* notwendig ist. 65 % des gebildeten PEPs werden auf diese Weise umgesetzt. 20 % PEP werden in zwei Reaktionen des allgemeinen Teils der Aromatenbiosynthese verbraucht und 13 % in der anaplerotischen Reaktion der *ppc* zu OAA umgewandelt. Pyruvat wird nahezu vollständig zu AcCoA umgesetzt und dann weiter im Citratzyklus verbraucht, der eine Aktivität von rund $1,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aufweist.

Die Reaktionen des allgemeinen Teils der Aromatenbiosynthese weisen Aktivitäten von $0,29 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf, von denen, ausgehend von CHOR, $0,04 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu gleichen Teilen in Richtung der Nebenprodukte L-Tyrosin und L-Phenylalanin fließen. Der lineare Stoffwechselweg über ANTH zu L-Tryptophan läuft mit $0,25 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, was maßgeblich von der vorgegebenen Produktbildungsrate festgelegt wird.

Die berechnete CO₂-Bildungsrate von $5,2 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ stimmt zu 93 % mit den gemessenen $5,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ überein.

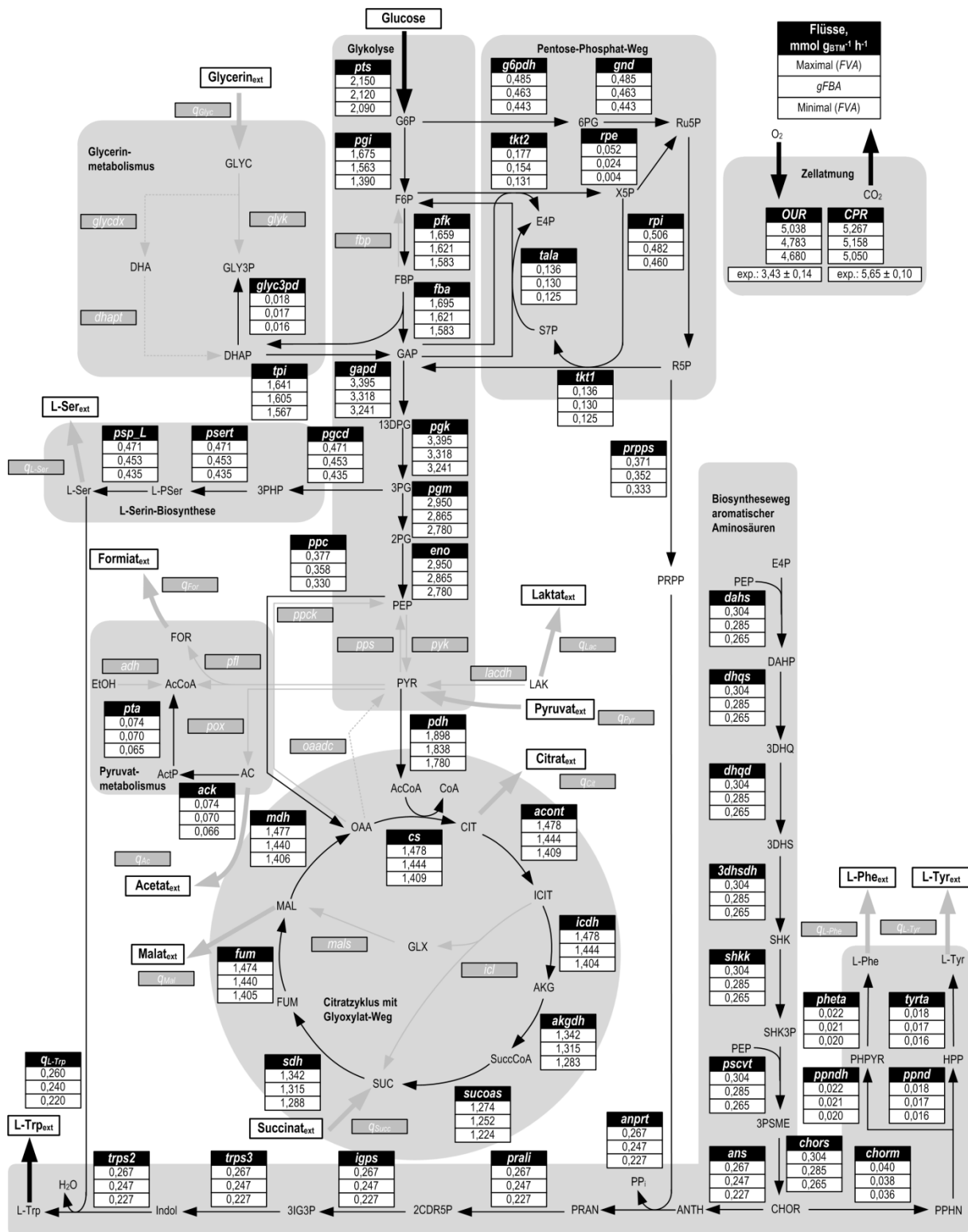


Abbildung 5.23: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit **Glucose** der metabolischen Analyse im Satzverfahren. Die gegebenen Werte wurden mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (*FVA*) abgeschätzt auf Grundlage des genomweiten *E. coli* Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die schwarzen Pfeile markieren aktive Stoffflüsse in Pfeilrichtung, inaktive Stoffflüsse sind grau dargestellt. Alle Werte sind in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ angegeben. Obere Zahl: Maximalwert der *FVA*; mittlere Zahl: Ergebnis der *gFBA*; untere Zahl: Minimalwert der *FVA*. Für die Atmungsraten sind zusätzlich die experimentell ermittelten Werte gegeben. Randbedingungen der Berechnung: Glucose-Aufnahmerate und L-Tryptophan-Bildungsrate.

Die Kohlenstoffquelle Glycerin (Abbildung 5.24) wird nach Aufnahme in die Zellen ($5,2 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über GLY3P zu DHAP umgewandelt. Nach der Umsetzung zu GAP werden 92 % des Kohlenstoffs in glykolytischen Reaktionen weiter bis zu PEP umgesetzt, wobei wiederum bei 3PG die Reaktionen in Richtung L-Serin abzweigen ($0,43 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Für die Aktivität notwendiger Stoffflüsse für Produktbildung und Biomassebildung im Pentose-Phosphat-Weg sind zunächst gluconeogenetische Reaktionen ausgehend von GAP nötig, welche von bis zu 8 % des restlichen Kohlenstoffs durchlaufen werden. Dies bedeutet die Umkehrung der Reaktionsrichtungen von *fba* und *pgi* und die Ersetzung der *pfk* durch *fbp* im Vergleich zur Flussverteilung auf Glucose. Die Flussrichtungen und Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Weg sind wiederum stark beeinflusst durch die Vorgabe der Produktbildungsrate, die die Bildung von E4P und PRPP als Vorläufer notwendig macht. Im Verhältnis zur Verteilung auf Glucose erfolgt die Bildung von Ru5P stärker über *tkt2* und *rpe* als über *g6pdh* und *gnd*.

Ausgehend von PEP sind die Umsetzung zu OAA über die *ppc* als anaplerotische Reaktion, der Verbrauch in der Aromatenbiosynthese und, im Gegensatz zur Verteilung mit Glucose als Kohlenstoffquelle, die Umwandlung zu Pyruvat über die *pyk* aktiv. $1,76 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Pyruvat werden zu AcCoA umgesetzt, welches als Ausgangspunkt des Citratzyklus dient. $1,26 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ werden direkt zu Lactat umgewandelt, das dann als Nebenprodukt ins Medium abgegeben wird. Die Reaktionen im Citratzyklus weisen Stoffflüsse zwischen $0,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $1,2 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf und werden von der Aktivität des Glyoxylat-Bypasses ergänzt. Die beiden Reaktionen des Bypasses werden im Rahmen der *FVA* als optional beschrieben, dasselbe gilt für die Aktivität der *ppc*. Wie zuvor sind die Stoffflüsse im Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren maßgeblich von der gemessenen und für die Berechnungen vorgegebenen Bildungsrate von L-Tryptophan beeinflusst. Durch die Berechnungen werden die für die Biomassebildung nötigen Mengen an L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan ergänzt. In Summe ergeben sich Flüsse von $0,19 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese, $0,05 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ über PPHN zu den Nebenprodukten und $0,14 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ über ANTH zu L-Tryptophan. Auf dem Weg werden E4P, zweimal PEP, PRPP und L-Serin verbraucht.

Bei den Berechnungen werden mit $3,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 50 % des experimentell ermittelten Wertes der CO_2 -Bildung ($6,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) erreicht. Derselbe Anteil gilt für die Sauerstoffaufnahme. Vermutlich liegt eine Abweichung zwischen berechneter und tatsächlicher Biomassebildung vor und führt zu dieser Diskrepanz.

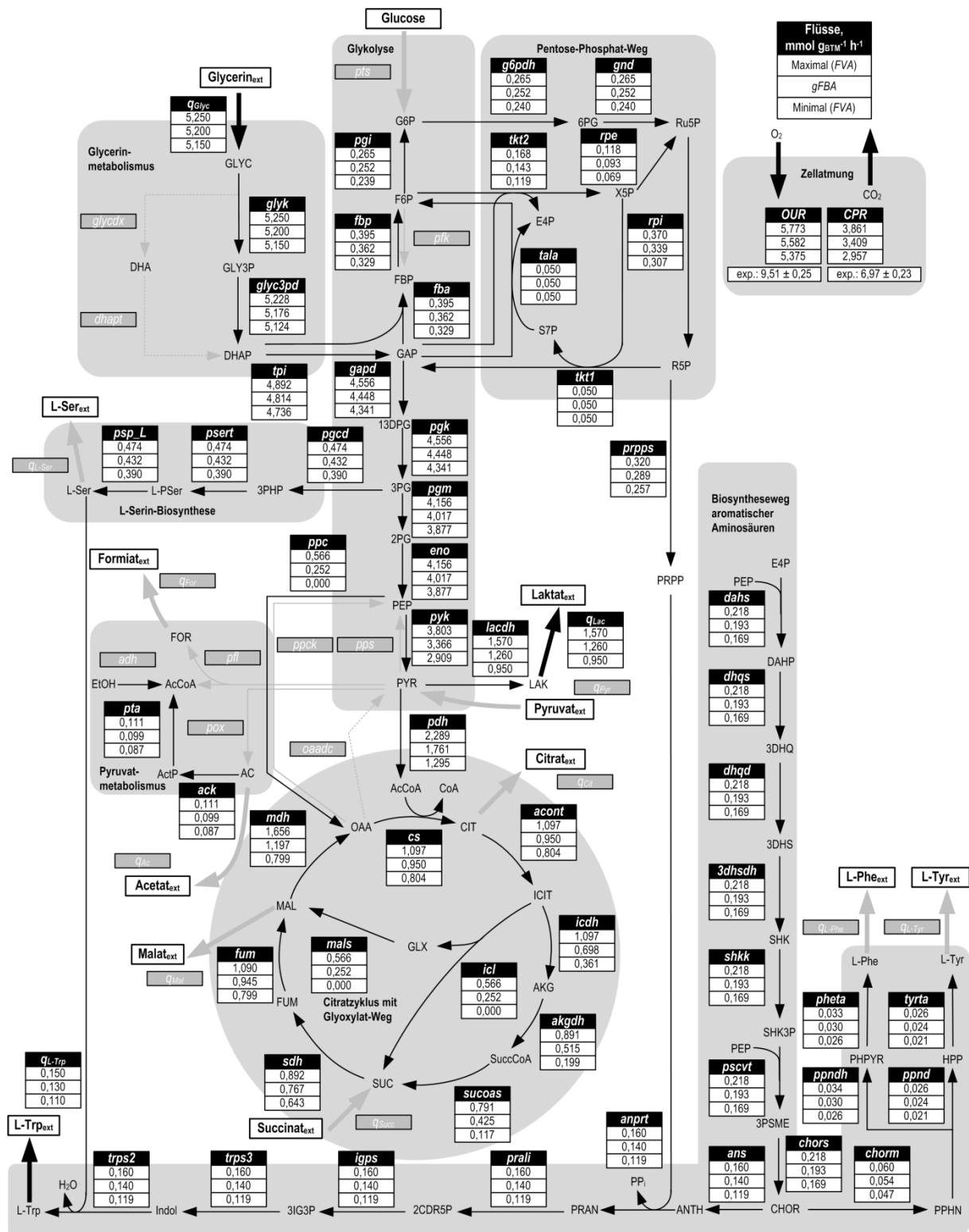


Abbildung 5.24: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit Glycerin der metabolischen Analyse im Satzverfahren. Die gegebenen Werte wurden mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (gFBA) und Flussvarianzanalyse (FVA) abgeschätzt auf Grundlage des genomweiten *E. coli* Modells iAF1260 (Feist et al., 2007). Die schwarzen Pfeile markieren aktive Stoffflüsse in Pfeilrichtung, inaktive Stoffflüsse sind grau dargestellt. Alle Werte sind in mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ angegeben. Obere Zahl: Maximalwert der FVA; mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; untere Zahl: Minimalwert der FVA. Für die Atmungsraten sind zusätzlich die experimentell ermittelten Werte gegeben. Randbedingungen der Berechnung: Glycerin-Aufnahmerate, Lactat-Bildungsrate und L-Tryptophan-Bildungsrate.

Succinat als Kohlenstoffquelle (Abbildung 5.25) wird mit $2,53 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ von den Zellen aufgenommen und direkt weiter im Citratzyklus umgesetzt, sodass hier hohe Enzymaktivitäten und Stoffflüsse von bis zu $3,5 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vorliegen. Allerdings werden $0,48 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Malat als Nebenprodukt nach nur zwei enzymatischen Umsetzungen ausgehend von Succinat wieder ins Medium abgegeben. Die Bildung des zentralen Metaboliten PEP erfolgt ausgehend von OAA über die Reaktion der *ppck*. Die Umsetzung von PEP über Pyruvat zu AcCoA mittels *pyk* und *pdh* ermöglicht ein beständiges Ablaufen des Citratzyklus mit $0,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bis zum Eintreten von Succinat. Alternativ ist auch die direkte Bildung von Pyruvat aus OAA über die *oaadc* und daraus folgend eine inaktive *pyk* sowie ein reduzierter Fluss über die *ppck* in den Berechnungen der *FVA* beschrieben.

Neben der Verwendung als Substrat im Aromatenbiosyntheseweg dient PEP hier nun als Ausgangsmetabolit der Gluconeogenese bis G6P. G6P, F6P und GAP werden als Eingangsmetabolite für den Pentose-Phosphat-Weg verwendet, und bei 3PG zweigt die L-Serin-Biosynthese ab. Alle Reaktionen in diesen Bereichen werden stark beeinflusst durch die Bildung von Vorläufermetaboliten des Produktes L-Tryptophan, dessen Bildungsrate $0,15 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ als Randbedingung für die Berechnung vorgegeben ist.

Auch die Flüsse im Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren beruhen weitgehend auf dieser Vorgabe, werden jedoch durch die notwendige Bildung von L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan für die Generierung von Biomasse ergänzt.

Die berechnete CO_2 -Bildungsrate $5,1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bildet 75 % des gemessenen Wertes ab ($6,8 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Derselbe Anteil gilt für die Sauerstoffaufnahme. Die Abweichung hängt möglicherweise mit der Nebenproduktbildung an Malat zusammen, die bei den Berechnungen vorgegeben wurde, jedoch nicht über die gesamte Analysendauer gleichbleibend vorlag.

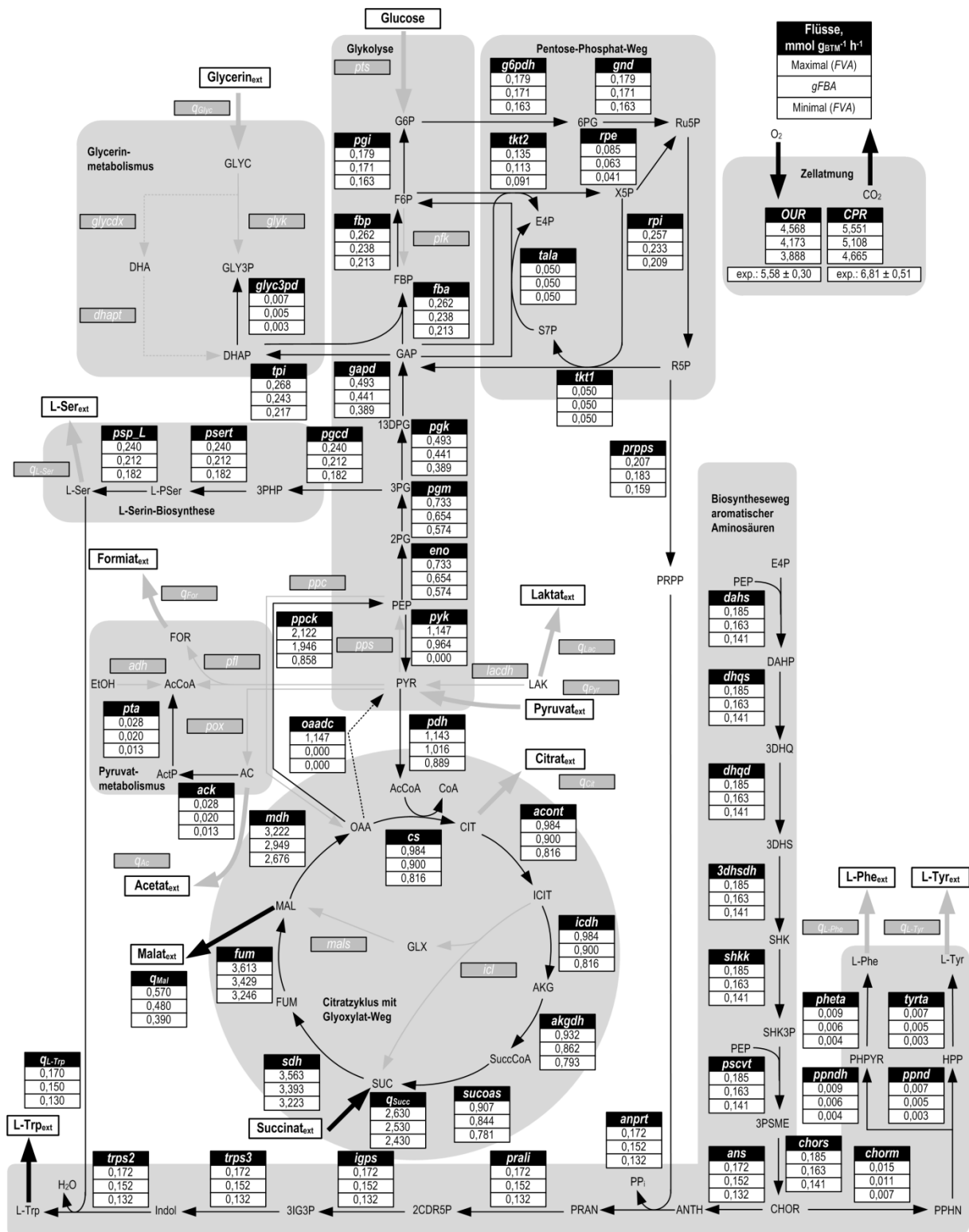


Abbildung 5.25: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit Succinat der metabolischen Analyse im Satzverfahren. Die gegebenen Werte wurden mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (gFBA) und Flussvarianzanalyse (FVA) abgeschätzt auf Grundlage des genomweiten *E. coli* Modells iAF1260 (Feist et al., 2007). Die schwarzen Pfeile markieren aktive Stoffflüsse in Pfeilrichtung, inaktive Stoffflüsse sind grau dargestellt. Alle Werte sind in mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ angegeben. Obere Zahl: Maximalwert der FVA; mittlere Zahl: Ergebnis der gFBA; untere Zahl: Minimalwert der FVA. Für die Atmungsraten sind zusätzlich die experimentell ermittelten Werte angegeben. Randbedingungen der Berechnung: Succinat-Aufnahmerate, Malat-Bildungsrate und L-Tryptophan-Bildungsrate.

Pyruvat (Abbildung 5.26) wird an zentraler Stelle und mit der höchsten molaren Aufnahme­rate ($6,55 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) in den Stoffwechsel aufgenommen. 77 % des Pyruvat werden zu AcCoA umgesetzt, wodurch hohe Stoffflüsse zwischen $1,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $2,4 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ im Citratzyklus vorliegen. Hierbei ist auch der Glyoxylat-Bypass mit $0,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ aktiv. Außerdem wird das Nebenprodukt Acetat mit einer Rate von $1,9 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gebildet, wofür sowohl AcCoA als auch Citrat als Ausgangspunkte dienen können. Als weiteres Nebenprodukt liegen $0,8 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Formiat vor, das direkt aus Pyruvat entsteht.

PEP wird entweder über die pps direkt aus Pyruvat gebildet oder aus OAA, katalysiert durch die ppck. Die *gFBA* berechnet hierbei eine gleichzeitige Aktivität beider Enzyme, laut *FVA* ist jedoch auch die Inaktivität jedes der beiden Enzyme und die Kompensation durch das jeweils andere möglich. Wie auch bei der Flussverteilung ausgehend von Succinat ist PEP ein Substrat in zwei Reaktionen des allgemeinen Teils der Aromatenbiosynthese und Ausgangspunkt der Gluconeogenese. Da im Fall von Pyruvat trotz hoher Substrataufnahmerate experimentell nur eine geringe Produktbildungsrate mit hoher Unsicherheit ermittelt wurde ($0,04 \pm 0,04 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), ist bei der theoretischen Berechnung eine deutlich höhere Wachstumsrate erzielbar als mit Succinat ($0,13 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu $0,04 \text{ h}^{-1}$; siehe Tabelle 5.7). Diese Kombination führt zu teilweise ähnlichen Stoffflüssen wie auf Succinat im Pentose-Phosphat-Weg (rpi, prpps) und höheren Flüssen in Richtung L-Serin, L-Tyrosin und L-Phenylalanin. Im Gegensatz zu den Flussverteilungen mit den anderen Kohlenstoffquellen (Abbildung 5.23 bis Abbildung 5.25) werden diese Flüsse hier also nicht vorrangig durch die Produktbildung, sondern durch die erzielbare Wachstumsrate beeinflusst. Niedrigere Flüsse zeigen sich hingegen beispielsweise für die Reaktionen zur Bildung von E4P (tkt2), da dieses spezifisch für die Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese benötigt wird und der Gesamtfluss hier aufgrund der kleinen Produktbildungsrate geringer ist. Auch im Fall fehlender extrazellulärer Produktbildung ergibt ein Stofffluss in Richtung L-Tryptophan aufgrund der Notwendigkeit von L-Tryptophan für die Biomassebildung. Dies betrifft in der vorliegenden Flussverteilung die unteren Grenzen der Stoffflüsse.

Die bei dieser Flussverteilung berechnete theoretische CO_2 -Bildungsrate ($9,6 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) stimmt zu 90 % und somit gut mit der gemessenen Rate von $10,2 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ überein.

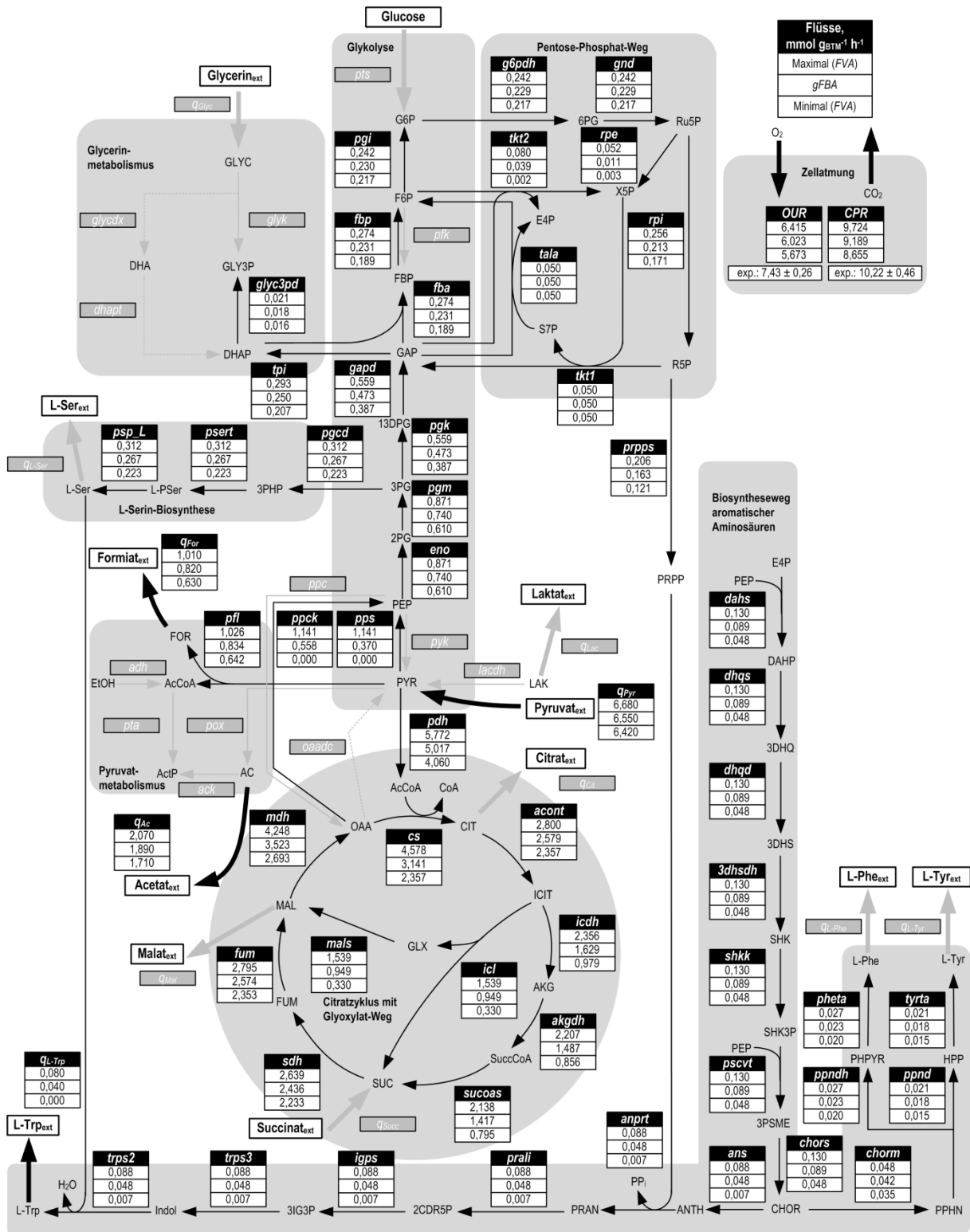


Abbildung 5.26: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit Pyruvat der metabolischen Analyse im Satzverfahren. Die gegebenen Werte wurden mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (*FVA*) abgeschätzt auf Grundlage des genomweiten *E. coli* Modells *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007). Die schwarzen Pfeile markieren aktive Stoffflüsse in Pfeilrichtung, inaktive Stoffflüsse sind grau dargestellt. Alle Werte sind in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ angegeben. Obere Zahl: Maximalwert der *FVA*; mittlere Zahl: Ergebnis der *gFBA*; untere Zahl: Minimalwert der *FVA*. Für die Atmungsraten sind zusätzlich die experimentell ermittelten Werte angegeben. Randbedingungen der Berechnung: Pyruvat-Aufnahmerate, Formiat-Bildungsrate, Acetat-Bildungsrate und L-Tryptophan-Bildungsrate.

Diskussion

Insgesamt wurde die Anwendbarkeit der von Link *et al.* (2010) und Weiner *et al.* (2016) etablierten Methodik zur metabolischen Analyse mikrobieller Prozesse auf die L-Tryptophan-Produktion mit *E. coli* in diesem Kapitel erfolgreich gezeigt. Dies umfasst den dargestellten L-Tryptophan-Produktionsprozess mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} und die währenddessen mittels schnellem Medienwechsels durchgeführte parallelisierte Kurzzeitanalyse im Satzbetrieb. Durch die räumliche Trennung von Prozess und Analyse ermöglicht dies eine detaillierte Charakterisierung des Metabolismus der Zellen im Prozess, ohne den Prozess selbst zu stören. Das Vorhandensein eines metabolischen Fließgleichgewichtes im Referenzprozess während der metabolischen Analyse konnte anhand konstanter Atmungsraten bestätigt werden.

Diese Methodik der metabolischen Analyse beruht auf der Auslenkung des Stoffwechsels durch unterschiedliche Substrate, die den Zellen als Kohlenstoffquellen zur Verfügung gestellt werden. Eine entscheidende Voraussetzung ist daher, dass die Zellen diese Kohlenstoffquellen unmittelbar aufnehmen und verstoffwechseln können. Analog zur Arbeit von Weiner *et al.* (2016) zur Analyse der L-Phenylalanin-Produktion wurden in der vorliegenden Arbeit Glycerin, Glucose, Succinat und Pyruvat als Substrate zur Auslenkung des Stoffwechsels gewählt. Glycerin lag als alleinige Kohlenstoffquelle im Produktionsprozess vor, sodass der Stoffwechsel der Zellen an die Aufnahme von Glycerin adaptiert war. Auch die weiteren Substrate wurden ohne zeitliche Verzögerung in der metabolischen Analyse von den Zellen aufgenommen. Dies wurde auch von Weiner *et al.* (2016) für einen L-Phenylalanin-Produktionsstamm beschrieben. Die Ergebnisse unterstreichen das Vorhandensein von konstitutiven Aufnahmemechanismen in *E. coli* für die weiteren Substrate, die sich deutlich von Glycerin unterscheiden. Für Glucose sind verschiedene Transporter beschrieben, wobei die Kombination aus einem unspezifischen Kanalprotein OmpF in der äußeren Membran und anschließend dem PEP-abhängigen Transport mittels pts als der übliche Weg der Glucose-Aufnahme gilt (Luo *et al.*, 2014). Da Glucose von *E. coli* gegenüber vielen anderen Kohlenstoffquellen bevorzugt wird, ist eine konstitutive Expression naheliegend. Die Aufnahme verschiedener Dicarbonsäuren wie Succinat, Fumarat und Malat erfolgt über zwei Membran-gebundene Proteine zur Bindung von Dicarbonsäuren (*sbp1* und *sbp2*) (Lo und Bewick, 1978). Für die Aufnahme von Monocarbonsäuren, beispielsweise Pyruvat und Lactat, sind in *E. coli* mittlerweile zwei Transporter bekannt, von denen für eines eine konstitutive Expression beschrieben ist (Kreth *et al.*, 2013).

Weiterhin beruht die angewandte Methodik der stationären metabolischen Analyse auf der Ausbildung neuer metabolischer Fließgleichgewichte innerhalb der Beobachtungsdauer. In früheren Arbeiten von Link *et al.* (2010) und Weiner *et al.* (2016) wird dies für einen Zeitraum von 6 min beschrieben und anhand konstanter Atmungsraten identifiziert. Während in der vorliegenden Arbeit konstante Aufnahmeraten für alle verwendeten Kohlenstoffquellen durch eine lineare Abnahme der

Konzentration bestätigt wurden, wurden in der beschriebenen kurzen Zeit konstante Atmungsraten nur für Glucose und Glycerin beobachtet. Die längere Dauer (8–10 min) bis zum Erreichen konstanter Werte bei Pyruvat und Succinat war jedoch mit hohen Absolutwerten (+ 50 % im Vergleich zu Weiner, 2015) und einer zeitweisen Bildung des Nebenproduktes Malat mit einer resultierenden Instationarität zu begründen.

Die unterschiedliche Auslenkung des Metabolismus, die bereits an den extrazellulären Raten erkennbar ist, wurde durch theoretische Abschätzungen intrazellulärer Stoffflussverteilungen weiter bestätigt. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Referenzprozess teilweise deutlich abweichende Stoffflüsse berechnet wurden. In der Glykolyse verstärkten sich die Flüsse mit Glycerin als Substrat um 110 %, während sie mit Succinat und Pyruvat auf rund 20 % sanken. Diese beiden Kohlenstoffquellen verursachten hingegen eine Steigerung der Flüsse im Citratzyklus um 180 % (Pyruvat) und 230 % (Succinat). Diese sehr stark ausgeprägten Stoffflüsse zeigen zwar eindeutig, dass wie angestrebt eine Auslenkung des Metabolismus erzielt wurde, es wurden dabei jedoch auch die Grenzen der metabolischen Kapazität der Zellen erreicht. Dies zeigte sich deutlich durch die auftretenden Nebenprodukte bei allen Kohlenstoffquellen außer Glucose. Diese maximale Auslenkung von Enzymkapazitäten ist nicht geeignet, um Aussagen über die Flexibilität des Stoffwechsels zu treffen, da somit Bedingungen außerhalb des kinetischen Bereiches vorliegen. Ein weiterer Nachteil sind die im Medium vorliegenden Nebenprodukte, die die für das weitere Vorgehen notwendige Quantifizierung intrazellulärer Metabolite erschweren oder verhindern können. Um diese Problematik im Folgenden möglichst zu umgehen, wird eine metabolische Analyse im Zulaufbetrieb angestrebt.

5.5 Metabolische Analyse der L-Tryptophan-Produktion mit *E. coli* im Zulaufbetrieb

Ausgehend von den maximalen Substrataufnahmeraten, die in der vorherigen metabolischen Satzanalyse ermittelt wurden, wurden dreistufige Zulaufprofile festgelegt. Diese ermöglichen für jedes der Substrate drei unterschiedliche Substrataufnahmeraten während der metabolischen Analyse, wobei die ersten beiden Zulaufraten vollständig substratlimitierten Bedingungen entsprechen und die letzte Zulaufrate eine annähernd maximale Substrataufnahme ermöglicht. Dies wird in Abbildung 5.27 veranschaulicht. Die somit bewusst gewählten reduzierten Substrataufnahmeraten während der Analyse sollen eine gezieltere Auslenkung des Metabolismus ermöglichen. Neben einer besseren Abdeckung des Bereichs kinetischer Flexibilität innerhalb des Stoffwechsels wird dadurch eine reduzierte Bildung von Nebenprodukten möglich. Darüber hinaus führt diese Vorgehensweise zur Ausbildung einer größeren Anzahl an verschiedenen Fließgleichgewichten während der Analyse, sodass mehr Informationen über den metabolischen Zustand der Zellen zugänglich sind.

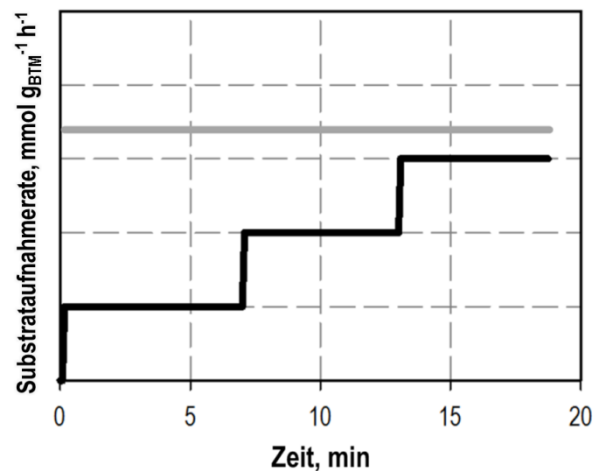


Abbildung 5.27: Während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb angestrebter Verlauf der Substrataufnahmeraten. Schwarz: Im Zulaufbetrieb durch die gewählten Zulaufraten vorgegebenes Profil. Grau: Während der metabolischen Analyse im Satzbetrieb ermittelte maximale Substrataufnahmerate.

5.5.1 Referenzprozess im 15 L-Maßstab

Als Grundlage der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren wurde erneut ein 15 L-Zulaufprozess mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} zur L-Tryptophan-Produktion durchgeführt. Der Verlauf des Prozesses ist anhand ausgewählter Konzentrationen in Abbildung 5.28 dargestellt.

Der Ablauf des Prozesses ähnelt in allen wichtigen Prozessgrößen den vorherigen Ergebnissen (siehe Abbildung 5.14 und Abbildung 5.15), sodass erneut von einem vergleichbaren Prozessverlauf auszugehen ist und die Ergebnisse hier nur kurz zusammengefasst werden.

Während der Satz- und der exponentiellen Zulaufphase stieg die Konzentration der Biotrockenmasse auf $19,7 \text{ g L}^{-1}$ ($\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$). Nach Induktion des Plasmids steigerte sich die Biotrockenmassekonzentration weiter bis auf rund 30 g L^{-1} nach 69,6 h und lag bei Prozessende (89,6 h) bei $31,8 \text{ g L}^{-1}$.

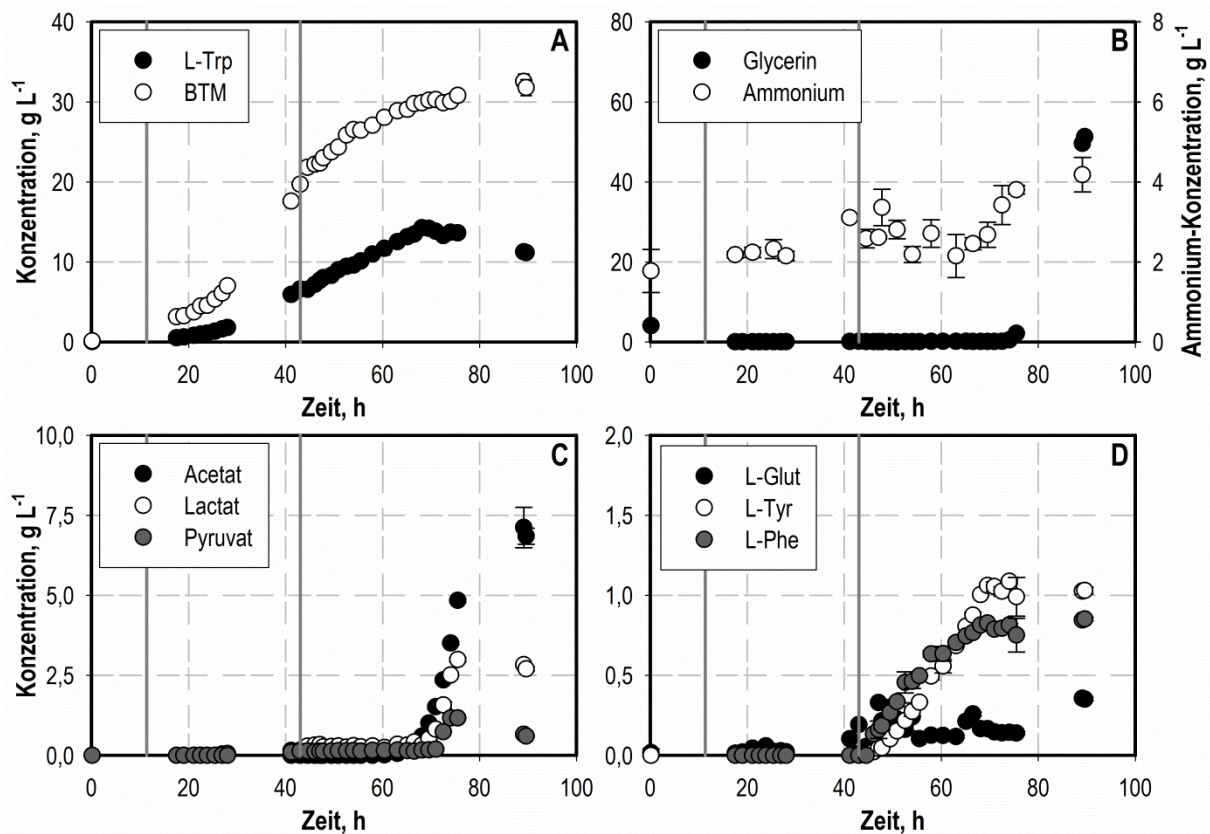


Abbildung 5.28: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). C: Acetat (●), Lactat (○) und Pyruvat (●). D: L-Glutamat (L-Glut ●), L-Tyrosin (L-Tyr ○) und L-Phenylalanin (L-Phe ●). Die durchgezogenen vertikalen Linien kennzeichnen das Ende der Satzphase (11,3 h) und den Beginn der konstanten Zulaufphase sowie die Zugabe von 0,3 mM IPTG (43,0 h).

Auch die Bildung des Produktes L-Tryptophan setzte am Prozessbeginn ein, sodass bei Induktion $6,6 \text{ g L}^{-1}$ L-Tryptophan im Medium vorlagen. In der anschließenden konstanten Zulaufphase ab 43 h Prozesszeit erhöhte sich die Produktkonzentration weiter bis auf maximal $14,3 \text{ g L}^{-1}$ nach 68,1 h. Dabei traten Produktbildungsraten von bis zu $23 \text{ mg}_{\text{L-Trp}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf. Nach dem Ende der Produktbildung nahm die L-Tryptophan-Konzentration bis auf $11,2 \text{ g L}^{-1}$ ab. Dies kann unter anderem durch das weiterhin zugeführte Zulaufmedium und Titrationsmittel erklärt werden, wobei die Bilanzierung von Volumen und Konzentration eine 88 %ige Wiederfindung zeigte. Der Abbau des Produktes zu Ammonium und Pyruvat ist aufgrund einer entsprechenden Gendeletion ($\Delta tnaA$) im vorliegenden Stamm unwahrscheinlich. Trotzdem sind extrazelluläre enzymatische oder spontane Abbaureaktionen denkbar. Außerdem ist auch die Wiederaufnahme des gebildeten Produktes durch die Zellen möglich.

Ausgehend von $4,1 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin lag nach dem vollständigen Verbrauch der vorgelegten Kohlenstoffquelle während der exponentiellen und konstanten Zulaufphase eine Konzentration von $< 0,2 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin im Medium vor, sodass eine vollständige Substratlimitierung erreicht wurde. Die Akkumulation von Glycerin am Prozessende aufgrund der weiteren Zufuhr bei abnehmendem Verbrauch begann nach 74,0 h und führte zu $51,3 \text{ g L}^{-1}$ Glycerin bei Prozessabbruch. Die Stickstoffquelle Ammonium wurde mit $2\text{--}3 \text{ g L}^{-1}$ während der gesamten Prozesszeit im Medium nachgewiesen und akkumulierte ab 72,5 h bis auf $4,2 \text{ g L}^{-1}$. Eine Stickstofflimitierung konnte somit auch hier ausgeschlossen werden.

Die auftretenden Nebenprodukte gehörten erneut den Stoffklassen der organischen Säuren und Aminosäuren an. L-Glutamat lag über den gesamten Prozess mit niedrigen Konzentrationen zwischen $0,1$ und $0,2 \text{ g L}^{-1}$ im Medium vor und akkumulierte am Ende auf $0,4 \text{ g L}^{-1}$. Die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin traten nach Induktion auf und wurden parallel zum eigentlichen Produkt L-Tryptophan gebildet. Die erreichten Maximalkonzentrationen waren $1,1 \text{ g L}^{-1}$ L-Tyrosin und $0,9 \text{ g L}^{-1}$ L-Phenylalanin. Am Ende der eigentlichen Produktionsphase wurde ab 65 h Acetat gebildet und ab 70 h zusätzlich Lactat und Pyruvat. Bei Prozessende lagen $6,8 \text{ g L}^{-1}$ Acetat, $2,7 \text{ g L}^{-1}$ Lactat und $0,7 \text{ g L}^{-1}$ Pyruvat vor.

Der Prozessverlauf ist des Weiteren anhand der in Abbildung 5.29 dargestellten integralen Kohlenstoffbilanz nachvollziehbar. Der Kohlenstoffanteil des Produktes L-Tryptophan lag nach 17,5 h bei 9,8 % und stieg auf maximal 13,7 % nach 41 h. Im weiteren Verlauf schwankte der Anteil zwischen 12,5 % und 10,6 %. Ab 71 h nahm er bis auf 7,0 % am Ende der Kultivierung ab. Die höchsten Anteile an Kohlenstoff entfielen auf Biomasse mit 30–20 % während der konstanten Zulaufphase und auf CO_2 mit maximal 65,5 % nach 71 h. Am Prozessende erkennbar sind die Akkumulation von Glycerin sowie die Bildung organischer Säuren. Der plötzliche Anstieg des Anteils

der Probenahme bei 47,1 h wurde durch die Entnahme von 3,6 L Zellsuspension für die Analyse verursacht.

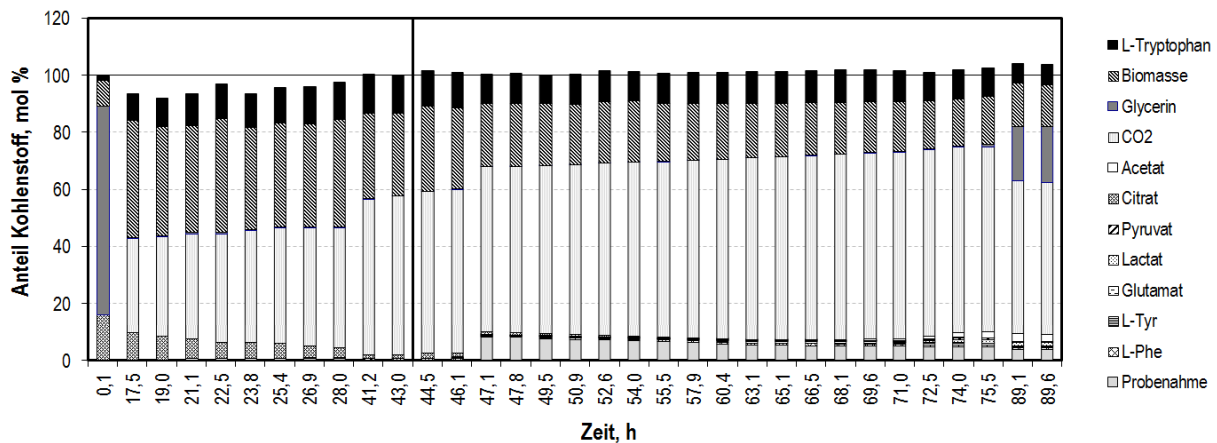


Abbildung 5.29: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} im 15 L-Maßstab als Grundlage einer metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb. Die Balken stellen die Anteile an Gesamtkohlenstoff dar, die im Prozessverlauf zu den gegebenen Probenahme-Zeitpunkten in Form der jeweiligen Komponenten vorlagen. Die vertikale Linie trennt die Probenahmen vor und nach Induktionszeitpunkt.

Während des beschriebenen Prozesses wurde 4 h nach Induktion und somit bei hoher Biomassekonzentration und Produktbildungsrate die Analyse im Zulaufbetrieb durchgeführt. Der Zeitraum zwischen den Probenahmen direkt vor und nach der Analyse (47,1–47,8 h) ist in Abbildung 5.30 hervorgehoben.

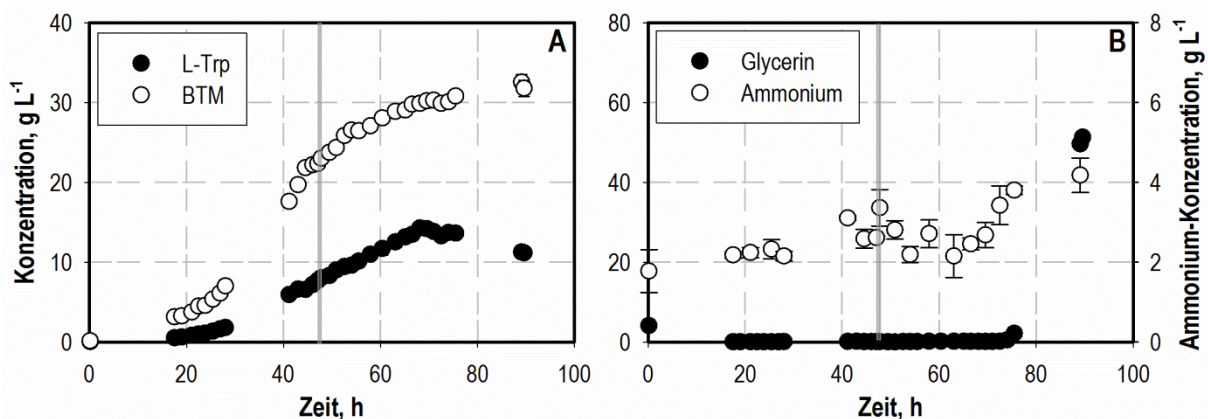


Abbildung 5.30: 15 L-Zulaufkultivierung von *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren. A: L-Tryptophan (L-Trp ●) und Biotrockenmasse (BTM ○). B: Glycerin (●) und Ammonium (○). Grau markiert ist der Zeitraum, in dem die metabolische Analyse durchgeführt wurde (47,1 h–47,8 h).

Die für den Zeitraum der Analyse im Prozess ermittelten extrazellulären Raten für Substrataufnahme, O₂-Aufnahme sowie Bildung von Produkt, Biomasse und CO₂ sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst.

Tabelle 5.8: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Sauerstoffaufnahme, CO₂-Bildung und Biomassebildung im Referenzprozess während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb in mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ (Ausnahme Biomassebildung in h⁻¹). Für die Berechnungen (*gFBA* und *FVA*) vorgegebene Werte sind mit * markiert.

Reaktion	Fluss gemessen	Fluss (<i>gFBA</i>)	Min. Fluss (<i>FVA</i>)	Max. Fluss (<i>FVA</i>)
Glycerin-Aufnahme	2,12 ± 0,06	2,12*	2,06*	2,18*
L-Trp-Bildung	0,11 ± 0,04	0,11*	0,07*	0,15*
O ₂ -Aufnahme	6,11 ± 0,07	5,47	3,45	7,51
CO ₂ -Bildung	4,93 ± 0,04	2,73	2,59	2,87
Biomassebildung	0,02	0,06	0,05	0,07

Diese gemessenen Raten unterscheiden sich nur geringfügig von den im Referenzprozess der Satzanalyse bestimmten Raten (siehe Tabelle 5.6). Während die Produktbildungsrate fast identisch war, betrug Substrataufnahme und Atmungsraten jeweils rund 90 % des Wertes aus dem vorherigen Prozess. Diese Unterschiede ergaben sich aufgrund von geringfügigen Abweichungen in der jeweiligen Biomassekonzentration. Die Verläufe der Atmungsraten (siehe Abbildung 5.31) zeigten, wie schon für die Satzanalyse beschrieben (siehe Abbildung 5.18), bereits wenige Minuten nach Entnahme der Zellsuspension für die Analyse erneut konstante Werte und somit ein vorhandenes metabolisches Fließgleichgewicht in den Zellen.

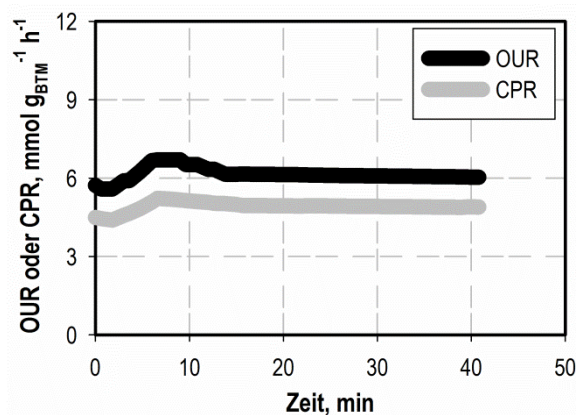


Abbildung 5.31: Atmungsraten (O₂-Aufnahmerate OUR ● und CO₂-Bildungsrate CPR ●) im Referenzprozess im Zeitraum der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren

In Tabelle 5.8 sind des Weiteren die über geometrische Flussbilanzanalyse und Flussvarianzanalyse ermittelten theoretischen Werte der extrazellulären Flüsse dargestellt, wobei Substrataufnahme und Produktbildung als Randbedingungen vorgegeben wurden. Aufgrund der vergleichbaren Randbedingungen zeigten sich nur geringe Unterschiede zur in Abbildung 5.19 dargestellten abgeschätzten Flussverteilung, sodass an dieser Stelle auf eine erneute Darstellung und Beschreibung der Verteilung verzichtet wird.

5.5.2 Parallelisierte Kurzzeitanalyse im Zulaufbetrieb

Nach Entnahme der Zellen aus dem Produktionsprozess, Abtrennung mittels Zentrifugation und Resuspension in frischem Medium erfolgte die gleichmäßige Aufteilung in das Vierfach-Parallelbioreaktorsystem. Dort stand in jedem der Reaktoren eine der vier Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat zur Verfügung, die als Zulaufmedien den Reaktoren zugeführt wurden. Alle Zulaufströme wurden nach 7 min und 13 min Analysendauer erhöht, sodass jede der Zulaufströme für 6 min während der 19 minütigen Analyse vorlag und sich insgesamt zwölf verschiedene metabolische Zustände der Zellen ergeben konnten. Die gewählten Zulaufmedien und Zulaufströme können Kapitel 4.3.5 und Tabelle 4.5 entnommen werden.

Die in den vier Reaktoren beobachteten Atmungsraten der O₂-Aufnahme (OUR) und CO₂-Bildung (CPR) sind in Abbildung 5.32 abgebildet und werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

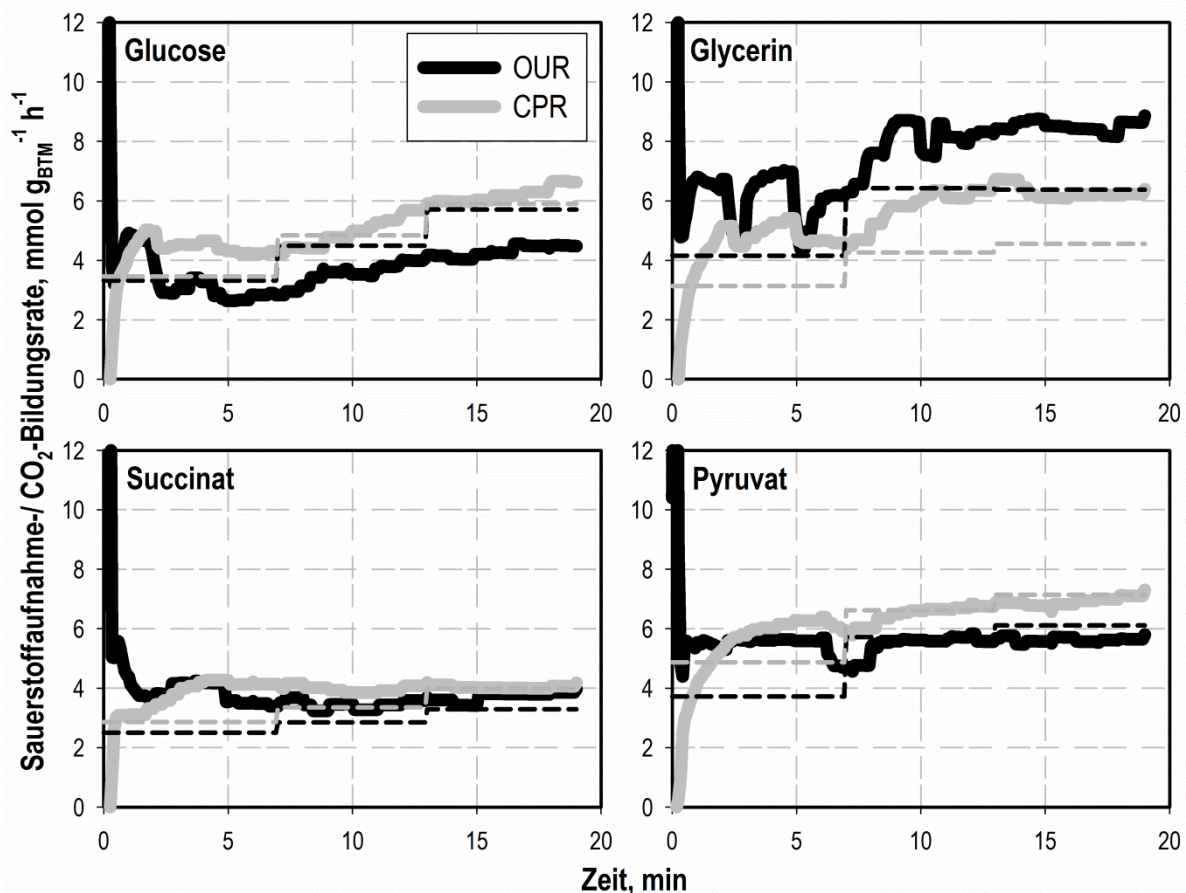


Abbildung 5.32: Atmungsraten (Sauerstoffaufnahme- und CO₂-Bildungsrate) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion im Zulaufverfahren in den vier Reaktoren des Parallelbioreaktorsystems mit den Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan}. Die gestrichelten Linien stellen die mittels gFBA ermittelten Werte dar. Die Erhöhung der Zulaufströme erfolgte nach 7 min und 13 min Analysendauer.

Im Ansatz mit Glucose als Kohlenstoffquelle stellte sich ein erstes Fließgleichgewicht nach 5 min ein (OUR 2,9 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und CPR 4,2 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die erste Erhöhung der Zulauftrate führte zur Erhöhung der beiden Atmungsraten, die wiederum nach rund 5 min konstante Werte erreichten (OUR 4,0 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und CPR 5,7 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die zweite Anpassung der Zulauftrate verursachte mit 5 min Zeitverzögerung eine weitere Steigerung des CPR auf 6,7 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und eine geringe Erhöhung des OUR auf 4,5 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Im Analysenreaktor mit der Kohlenstoffquelle Glycerin wurde das erste Fließgleichgewicht nach 6 min erreicht (OUR 6,2 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und CPR 4,6 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die erste Anpassung der Zulauftrate löste eine deutliche Erhöhung der Atmungsraten aus, die nach 3 min bei nahezu konstant 8,3 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ OUR und 6,4 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ CPR lagen. Die zweite Steigerung der Glycerin-Zulauftrate verursachte keine signifikante weitere Zunahme der Atmungsraten, sodass OUR und CPR bis zum Analysenende annähernd konstant blieben. Die Kohlenstoffquelle Glycerin ist die einzige der für die Analyse gewählten Substrate, die zu einem $\text{RQ} < 1$ führte.

Succinat als Kohlenstoffquelle führte zu nur sehr geringen Unterschieden der Atmungsraten während der unterschiedlichen Zulaufstufen. So lag der CPR während der gesamten Analysendauer im Mittel bei 4,1 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Beim OUR ließ sich eine leichte Steigerung von 3,5 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf 3,9 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beobachten, wobei keine eindeutige Ausbildung von Stufen auftrat. Ein Grund für die geringen Abstufungen der Atmungsraten im Vergleich zu den Analysenansätzen mit Glucose und Glycerin ist der kleinere Unterschied der durch das Zulaufprofil vorgegebenen Substrataufnahmeraten bei Succinat.

Im Pyruvat-Ansatz wurde bereits 5 min nach Beginn der Analyse das erste stabile Fließgleichgewicht erreicht, welches sich in einem OUR von 5,6 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und einem CPR von 6,2 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ widerspiegelt. Die erste Erhöhung der Zulauftrate nach 7 min verursachte eine leichte, aber eindeutige Steigerung des CPR auf stabile 6,8 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nach 5 min bei nahezu gleichbleibendem OUR. Der zweite Schritt des Zulaufprofils zeigte eine ähnliche Auswirkung: Der CPR stieg wiederum etwas auf einen neuen Gleichgewichtswert von 7,4 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei weiterhin nahezu stabilem OUR (5,8 mmol $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Abbildung 5.33 zeigt eine graphische Zusammenfassung aller für die Analyse im Zulaufverfahren experimentell ermittelten extrazellulären biomassespezifischen Raten. Für jeden der vier Analysenreaktoren sind die drei steigenden Zulaufstufen A, B und C dargestellt und im Fall von Glycerin zusätzlich die entsprechenden Raten aus dem Referenzprozess während der Analyse. Die Atmungsraten OUR und CPR sind Mittelwerte der gemessenen Raten nach Erreichen der Gleichgewichtsstufen. Die Werte der Analysenreaktoren sind außerdem in Tabelle 5.9 bis Tabelle 5.12 aufgeführt.

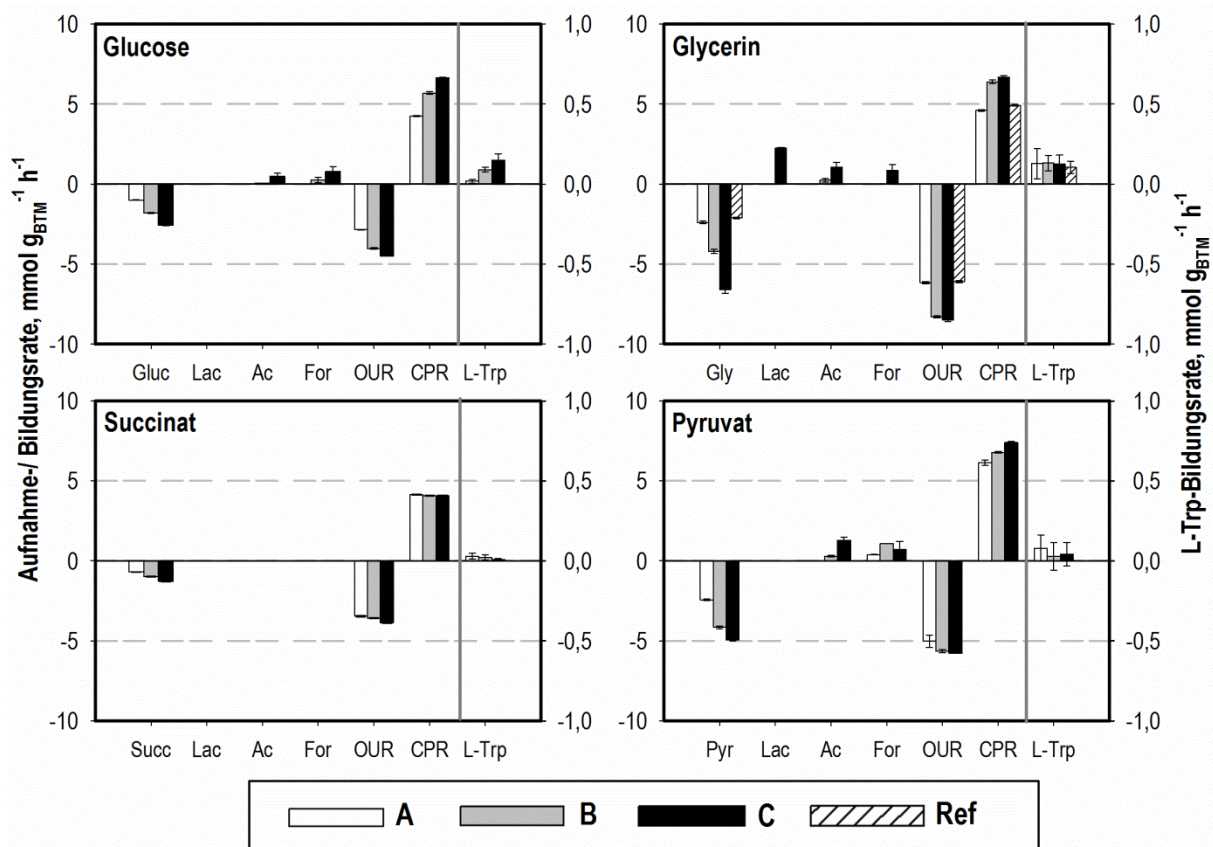


Abbildung 5.33: Experimentell ermittelte extrazelluläre Aufnahme- und Bildungsraten (Substrataufnahme, Produkt- und Nebenproduktbildung sowie Atmungsraten) während der parallelisierten Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan}. Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc), Glycerin (Gly), Succinat (Succ) und Pyruvat (Pyr); Produkt L-Tryptophan (L-Trp); Nebenprodukte Lactat (Lac), Acetat (Ac) und Formiat (For); Atmungsraten Sauerstoffaufnahme (OUR) und CO₂-Bildungsrate (CPR). Für die Kohlenstoffquelle Glycerin sind die Raten im Analysenreaktor (Zulaufstufen A □, B □ und C ■) und im Referenzprozess (Ref, schraffiert) gegeben.

Im Reaktor mit der Kohlenstoffquelle Glucose (Tabelle 5.9 und Abbildung 5.33) wurden drei Substrat-Zulaufstufen mit einem Abstand von jeweils $0,8 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt, welche sich in den ebenfalls klar getrennten Niveaus der Atmungsraten abzeichneten. Glucose akkumulierte dabei zu keinem Zeitpunkt im Medium. Es ergaben sich auch für die Bildung des Produktes L-Tryptophan drei unterschiedliche Raten zwischen $0,02 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $0,15 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, die mit der Substrataufnahmerate stiegen. Ab der zweiten Zulaufstufen wurden die Nebenprodukte Acetat und Formiat beobachtet, wobei beide Bildungsrate mit der Substratzulaufstufenrate zunahm und Formiat stärker als Acetat gebildet wurde.

Tabelle 5.9: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glucose-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, Sauerstoffaufnahme, CO₂-Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb mit der Kohlenstoffquelle Glucose während drei Zulaufzuständen A, B und C in mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ (Ausnahme Biomassebildung in h⁻¹). Für die Berechnungen (*gFBA*) vorgegebene Werte sind mit * markiert.

Glucose	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)
Substrat	1,00 ± 0,02	1,00*	1,80 ± 0,03	1,80*	2,56 ± 0,05	2,56*
L-Trp	0,02 ± 0,01	0,02*	0,09 ± 0,01	0,09*	0,15 ± 0,04	0,15*
Acetat	-	0,00	0,07 ± 0,00	0,07*	0,48 ± 0,20	0,48*
Formiat	-	0,00	0,26 ± 0,18	0,26*	0,80 ± 0,30	0,80*
O ₂	2,85 ± 0,03	3,32	4,02 ± 0,05	4,49	4,50 ± 0,01	5,71
CO ₂	4,24 ± 0,03	3,46	5,70 ± 0,07	4,84	6,65 ± 0,02	5,90
Biomasse	< 0,05	0,06	< 0,05	0,12	< 0,05	0,16

Bei Glycerin als Kohlenstoffquelle (Tabelle 5.10 und Abbildung 5.33) wurde ebenfalls eine vollständige Substratlimitierung über die gesamte Analysendauer erzielt. Der Unterschied der beiden ersten Zulaufstufen (1,8 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹) war dabei kleiner als die zweite Steigerung (2,4 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹). Dennoch ist wieder der oben beschriebene Effekt zu erkennen, dass sich die Atmungsraten im Anschluss an die zweite Zulaufstufen nur noch geringfügig steigern. Die nun zusätzlich dargestellte deutliche Bildung der Nebenprodukte Lactat, Acetat und Formiat, die in der höchsten Zulaufstufe auftrat, ist eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Auswirkung auf die CO₂-Bildung, da der Kohlenstoff in die Nebenprodukte umgesetzt wurde. Die Bildung von Acetat wurde in geringer Menge bereits während der mittleren Zulaufstufe beobachtet. Acetat und Lactat sind Nebenprodukte, die zu einem späteren Zeitpunkt auch im Prozess auftraten. Im Gegensatz zu Glucose führten die verschiedenen Substratzulaufstufen bei Glycerin nicht zu unterschiedlichen Produktbildungsraten. Stattdessen wurde eine nahezu konstante L-Tryptophan-Bildung mit 0,13 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ beobachtet. Der Vergleich der Glycerin-Raten der Analyse mit dem Referenzprozess zeigt eine gute Übereinstimmung der extrazellulären Raten der Referenz und der ersten Zulaufstufe in der Analyse bezüglich Substrataufnahme, Atmungsraten und Produktbildung. In beiden Fällen wurden darüber hinaus keine Nebenprodukte beobachtet.

Tabelle 5.10: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, Sauerstoffaufnahme, CO₂-Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb mit der Kohlenstoffquelle Glycerin während drei Zulaufzuständen A, B und C in mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ (Ausnahme Biomassebildung in h⁻¹). Für die Berechnungen (*gFBA*) vorgegebene Werte sind mit * markiert.

Glycerin	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)
Substrat	2,39 ± 0,08	2,39*	4,20 ± 0,13	4,20*	6,61 ± 0,21	6,61*
L-Trp	0,13 ± 0,09	0,13*	0,13 ± 0,05	0,13*	0,13 ± 0,05	0,13*
Lactat	-	0,00	-	0,00	2,26 ± 0,04	2,26*
Acetat	-	0,00	0,25 ± 0,11	0,25*	1,06 ± 0,29	1,06*
Formiat	-	0,00	-	0,00	0,87 ± 0,36	0,87*
O ₂	6,16 ± 0,06	4,16	8,30 ± 0,06	6,43	8,49 ± 0,10	6,38
CO ₂	4,61 ± 0,05	3,14	6,40 ± 0,11	4,26	6,70 ± 0,07	4,56
Biomasse	< 0,05	0,07	< 0,05	0,16	< 0,05	0,17

Im Ansatz mit Succinat (Tabelle 5.11 und Abbildung 5.33) sind die weniger weit gefächerten Substrataufnahmeraten erkennbar, die sich jeweils um nur 0,3 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ unterschieden. Eine niedrige maximale Substrataufnahmerate einerseits (siehe Kapitel 5.4.2 und Abbildung 5.22) und die Notwendigkeit von messbaren Raten in allen Zulaufstufen andererseits machte die getroffene Auswahl der Zulaufraten jedoch erforderlich. In diesem Ansatz wurde weder eine Akkumulation der Kohlenstoffquelle noch die Bildung von Nebenprodukten beobachtet. Weiterhin werden die nahezu konstanten Werte des CPR und die leichte Zunahme des OUR mit der Substrataufnahme wiederum deutlich. Die Bildung des Produktes wurde nur während der ersten Zulaufstufe mit kleiner Rate (0,03 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹) bei gleichzeitiger großer analytischer Unsicherheit (0,02 mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹) ermittelt.

Tabelle 5.11: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Succinat-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Sauerstoffaufnahme, CO₂-Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb mit der Kohlenstoffquelle Succinat während drei Zulaufzuständen A, B und C in mmol g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ (Ausnahme Biomassebildung in h⁻¹). Für die Berechnungen (*gFBA*) vorgegebene Werte sind mit * markiert.

Succinat	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)
Substrat	0,69 ± 0,02	0,72*	0,99 ± 0,03	0,99*	1,29 ± 0,03	1,29*
L-Trp	0,03 ± 0,02	0,001*	0,02 ± 0,02	0,02*	-0,08 ± 0,01	0,00*
O ₂	3,46 ± 0,05	2,50	3,59 ± 0,04	2,85	3,89 ± 0,03	3,29
CO ₂	4,14 ± 0,02	2,86	4,08 ± 0,04	3,35	4,07 ± 0,03	3,99
Biomasse	< 0,05	0,00	< 0,05	0,01	< 0,05	0,03

Im Pyruvat-Ansatz (Tabelle 5.12 und Abbildung 5.33) ergaben sich deutlich abgestufte Substrataufnahmeraten, wobei der Unterschied zwischen den Stufen B und C ($0,8 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) kleiner ausfiel als zwischen A und B ($1,8 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Dies steht in Zusammenhang mit einer Akkumulation von Pyruvat, die während der letzten Zulaufstufe auftrat. Das bedeutet, dass die zugeführte Kohlenstoffquelle Pyruvat in Stufe C von den Zellen nicht vollständig aufgenommen wurde. Somit lag die letzte Substrataufnahmerate unterhalb der durch das Zulaufprofil angestrebten, wodurch sich die gleichmäßige Abstufung des Zulaufprofils nicht in einer entsprechenden Verteilung der Aufnahmeraten widerspiegelte. Wie oben bereits diskutiert, sind kleine, aber deutliche Zunahmen der CO_2 -Bildungsrate zu erkennen, bei gleichzeitig kaum vorhandener Änderung der O_2 -Aufnahme. Mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle ergab sich für keine Zulaufstufe eine eindeutige extrazelluläre Bildung von L-Tryptophan, wobei alle Produktbildungsraten mit hohen analytischen Unsicherheiten behaftet waren. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Bildung von Nebenprodukten bestimmt werden. So wurde Acetat mit geringer Rate ($0,29 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) bereits während der mittleren Zulaufstufe und deutlich bei der höchsten Zulauftrate produziert ($1,40 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Die Bildung des Nebenprodukts Formiat wurde ausgehend von Pyruvat in allen Zulaufstufen beobachtet (Bildungsraten zwischen $0,4$ und $1,1 \text{ mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Tabelle 5.12: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Pyruvat-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, Sauerstoffaufnahme, CO_2 -Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb mit der Kohlenstoffquelle Pyruvat während drei Zulaufzuständen A, B und C in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Ausnahme Biomassebildung in h^{-1}). Für die Berechnungen (*gFBA*) vorgegebene Werte sind mit * markiert.

Pyruvat	A		B		C	
	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)	Fluss (gemessen)	Fluss (<i>gFBA</i>)
Substrat	$2,43 \pm 0,04$	2,43*	$4,16 \pm 0,07$	4,16*	$4,93 \pm 0,09$	4,93*
L-Trp	$0,08 \pm 0,08$	0,08*	$0,03 \pm 0,09$	0,06*	$0,04 \pm 0,07$	0,06*
Acetat	-	0,00	$0,29 \pm 0,05$	0,29*	$1,40 \pm 0,17$	1,40*
Formiat	$0,39 \pm 0,01$	0,39*	$1,08 \pm 0,02$	1,08*	$0,72 \pm 0,50$	0,72*
O_2	$5,61 \pm 0,40$	3,72	$5,64 \pm 0,11$	5,72	$5,76 \pm 0,03$	6,11
CO_2	$6,24 \pm 0,17$	4,87	$6,78 \pm 0,05$	6,62	$7,40 \pm 0,05$	7,14
Biomasse	< 0,05	0,03	< 0,05	0,09	< 0,05	0,09

Diskussion

Insgesamt wurden durch die Verwendung von jeweils drei Zulaufstufen in jedem der vier Analysenreaktoren wie geplant insgesamt zwölf verschiedene metabolische Zustände der Zellen erreicht, die an den unterschiedlichen ermittelten extrazellulären Raten erkennbar sind. Neben den klar abgestuften Werten der Substrataufnahmeraten in allen Ansätzen ergaben sich Stufenprofile der Atmungsraten, an denen sich die erfolgreiche Ausbildung der metabolischen Fließgleichgewichte ablesen ließ.

Trotz der im Vergleich zur Analyse im Satzbetrieb niedrigeren Substrataufnahmeraten wurden teilweise hohe Bildungsraten an Nebenprodukten bestimmt, sodass ein Überschussmetabolismus nicht vollständig vermieden werden konnte. Dies galt vor allem für die Zulaufstufen mit hoher Zulauftrate, da diese nur geringfügig unterhalb der maximalen Aufnahmeraten in der Satzanalyse gewählt wurden, um möglichst hohe Produktbildungsraten zu ermöglichen.

Eine klare Abstufung der Produktbildungsraten konnte nur im Fall von Glucose erreicht werden. Mit Glycerin als Kohlenstoffquelle war die Produktbildung bei allen Zulaufraten konstant. Dies ist bereits ein klarer Hinweis auf eine Limitierung der Produktbildung innerhalb des Syntheseweges von L-Tryptophan, da eine höhere Menge an verfügbarem Kohlenstoff nicht in das Produkt umgesetzt werden konnte. Die gleiche Beobachtung wurde auch im Rahmen der Arbeiten zur Prozessetablierung im 15 L-Maßstab gemacht (siehe Kapitel 5.2.3), wodurch die beschriebenen Ergebnisse weiter unterstützt werden. Ausgehend von Succinat und Pyruvat wurden nur sehr geringe L-Tryptophan-Bildungsraten erzielt. Diese geringe Produktbildung entspricht im Fall von Pyruvat den Ergebnissen der Satzanalyse. Im Gegensatz dazu lag die Produktbildungsrate in der Satzanalyse auf Succinat ähnlich zum Ansatz mit Glycerin und somit höher als während der Zulaufanalyse. Ein Grund für die hier beobachteten geringen Produktbildungsraten mit Succinat und Pyruvat ist der Abstand zwischen den Kohlenstoffquellen und der für die L-Tryptophan Bildung notwendigen Vorläufermetabolite im Stoffwechsel. Dieser ist deutlich größer als bei den anderen Substraten Glucose und Glycerin, besonders bezüglich der Vorläufer E4P und PRPP aus dem Pentose-Phosphat-Weg. Ein weiterer Grund ist die Ausrichtung des Stoffwechsels der Zellen auf die Kohlenstoffquelle Glycerin im Prozess, der sich stärker von den für die Verstoffwechslung von Succinat und Pyruvat nötigen Vorgängen unterscheidet als von den für Glucose notwendigen. So müssen für die Verstoffwechslung von Succinat und Pyruvat fünf Reaktionen der Glykolyse/Gluconeogenese zwischen Pyruvat und GAP in umgekehrter Richtung ablaufen wie bei Verwendung von Glycerin. Glucose als Kohlenstoffquelle erfordert hingegen im Vergleich mit Glycerin die Umkehr von nur drei Reaktionen zwischen GAP und G6P im oberen Teil der Glykolyse/Gluconeogenese.

5.5.3 Theoretische Stoffflussabschätzungen

Die in Tabelle 5.9 bis Tabelle 5.12 aufgeführten extrazellulären Raten wurden für eine theoretische Abschätzung der intrazellulären Stoffflussverteilungen mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (*FVA*), basierend auf dem genomweiten *E. coli* Modell *iAF1260* verwendet (siehe Kapitel 3.5 und 4.6). Dabei wurden für jeden der zwölf metabolischen Zustände die jeweilige Substrataufnahme, die Produktbildung und gegebenenfalls Nebenproduktbildungen als Randbedingungen vorgegeben und die Wachstumsrate als Optimierungskriterium gewählt. Keine Vorgabe erfolgte hingegen für die Atmungsraten OUR und CPR, deren abgeschätzte Werte ebenfalls in Tabelle 5.9 bis Tabelle 5.12 aufgeführt und in Abbildung 5.32 markiert sind. Bei Glucose werden 80–88 % der experimentell bestimmten CO₂-Bildungsraten berechnet, wobei die Abstufung dem experimentellen Verlauf entspricht. Dabei ist der theoretisch ermittelte Abstand zwischen CPR und OUR in allen Fällen kleiner als der gemessene und führt zu einem RQ näher bei einem Wert von 1, der bei einer vollständigen Oxidation von Glucose erzielt wird. Die experimentell ermittelten RQ zwischen RQ = 1,4–1,5 in den drei Zulaufstufen weisen somit auf eine unvollständige Oxidation der Kohlenstoffquelle beziehungsweise einen ungewöhnlich niedrigen Sauerstoffverbrauch hin.

Wie bereits für Referenzprozess und Satzanalyse beschrieben, liegen die theoretisch ermittelten Werte der Atmungsraten bei Glycerin als Kohlenstoffquelle unterhalb der experimentell ermittelten Raten (rund 65 % CPR). Dabei treten sowohl im Experiment als auch in den theoretischen Abschätzungen nahezu gleichbleibende Atmungsraten während der mittleren und der hohen Zulaufstufen auf. Bei der Darstellung der experimentellen Ergebnisse wurde ein Zusammenhang zwischen diesen konstanten Atmungsraten und der in der hohen Zulaufstufe auftretenden starken Nebenproduktbildung vermutet. Die theoretischen Abschätzungen unterstützen diese Erklärung, da die vorgegebenen Kombinationen aus Substrataufnahmerate und Bildungsraten von Produkten und Nebenprodukten in den beiden Zuständen zu identischen Atmungsraten führen. In allen Zulaufstufen der Analyse und im Referenzprozess lagen übereinstimmende RQ zwischen RQ = 0,7–0,8 vor.

Im Unterschied zu den in Abbildung 5.33 beschriebenen annähernd konstanten Atmungsraten bei Verwendung von Succinat als Kohlenstoffquelle ergeben sich bei der theoretischen Abschätzung drei leicht unterschiedliche Niveaus. Entsprechend variieren die RQ nur leicht zwischen RQ = 1,0–1,2 und ermöglichen eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und theoretischen Werten. Auch bei Pyruvat ergibt sich eine Abstufung der Atmungsraten mit steigender Substrataufnahme, wobei in der ersten Stufe 70 % der experimentellen Rate theoretisch abgeschätzt werden und bei den beiden weiteren Stufen Messung und Abschätzung mit über 95 % sehr gut übereinstimmen. Dies verursacht eine Verschiebung des RQ von RQ = 1,1 während der ersten Zulaufstufe auf RQ = 1,3 während der letzten Stufe. Dieses Verhalten zeigt einen gleichbleibenden Sauerstoffbedarf trotz zunehmender Verstoffwechslung von Pyruvat und somit vermehrter Kohlenstoff-Verfügbarkeit. Die Bildung von Nebenprodukten führt dabei zu für Pyruvat niedrigen RQ.

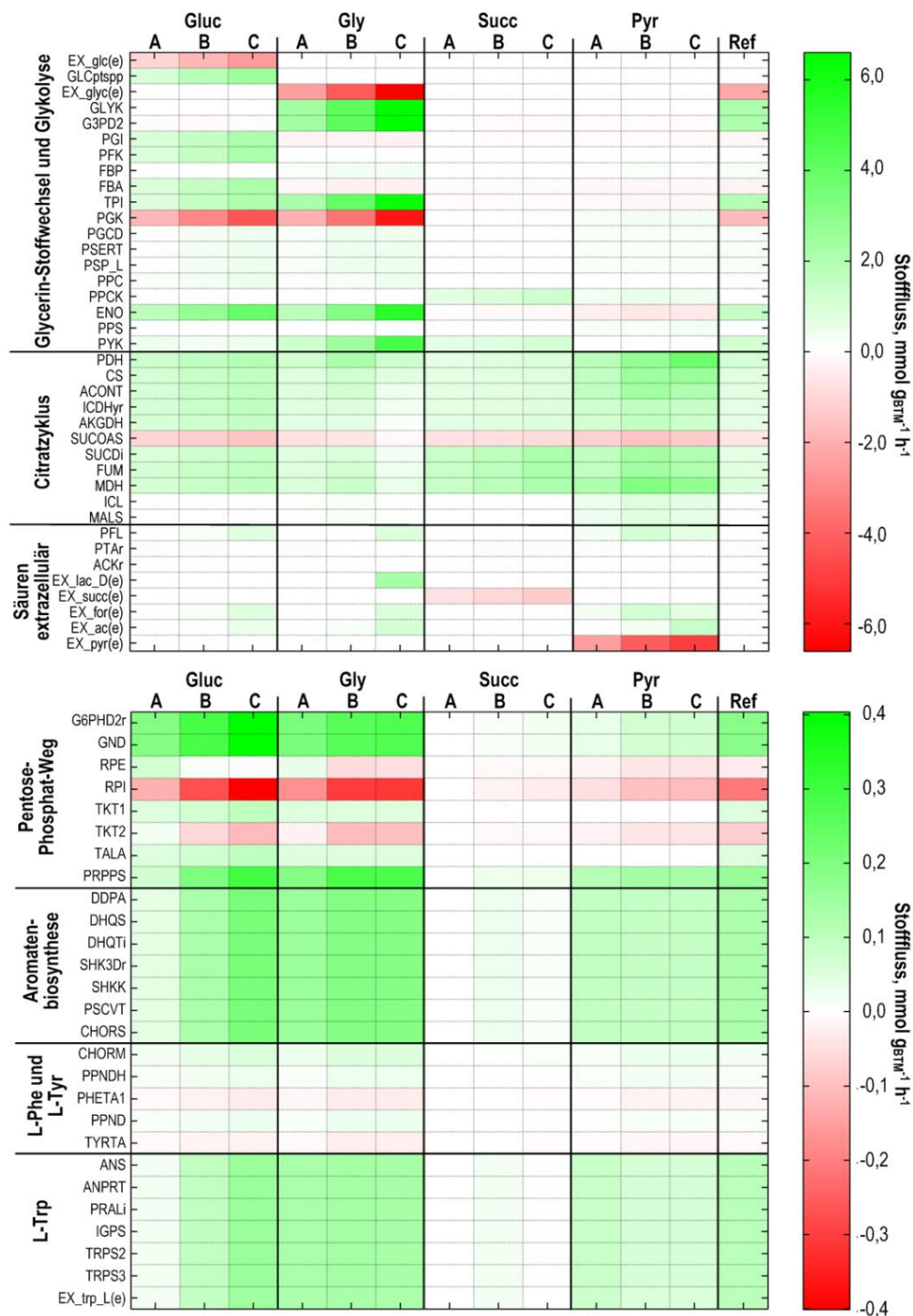


Abbildung 5.34: Hitzediagramme der mittels geometrischer Flussbilanzanalyse abgeschätzten intrazellulären Flussverteilungen während der Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren in Analysenreaktoren und im Referenzprozess. Kohlenstoffquellen in der Analyse Glucose (Gluc), Glycerin (Gly), Succinat (Succ) und Pyruvat (Pyr); A, B und C steigende Zulaufstufen in allen vier Analysenreaktoren. Im Referenzprozess (Ref) lag die Kohlenstoffquelle Glycerin vor. Flussrichtungen sind auf die im Modell *iAF1260* vorgegebenen bezogen. Oberes Diagramm: Reaktionen, die auch mit hohen Stoffflüssen auftreten (Glycerin-Stoffwechsel, Glykolyse, L-Serin-Biosynthese, Citratzyklus, Säure-Metabolismus und Austausch-Reaktionen von organischen Säuren; Skala von -6 bis 6 $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$). Unteres Diagramm: Reaktionen mit stets niedrigen Flüssen (Pentose-Phosphat-Weg, allgemeiner Teil der Aromatenbiosynthese, spezifische Reaktionen für die Bildung von L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan; Skala von -0,4 bis 0,4 $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Die für jede der vier Kohlenstoffquellen abgeschätzten Verteilungen der intrazellulären Stoffflüsse entsprechen bezüglich aktiven Enzymen und Reaktionen sowie hinsichtlich der Flussrichtungen den Verteilungen der Satzanalyse, die in Kapitel 5.4.3 beschrieben sind. Auf eine erneute Beschreibung der sich ergebenden prinzipiellen Flussverteilungen wird aus diesem Grund an dieser Stelle verzichtet. Im Gegenzug ist in Abbildung 5.34 eine gemeinsame Darstellung aller Ergebnisse der *gFBA* in Form von Hitzediagrammen erfolgt, um die Daten gegenüber zu stellen. Aufgrund der großen absoluten Unterschiede der Stoffflüsse in den verschiedenen Bereichen des Stoffwechsels sind für die bessere Darstellbarkeit zwei Hitzediagramme mit unterschiedlichen Skalen beschrieben. Im oberen Hitzediagramm sind Reaktionen des Zentralstoffwechsels mit Glycerin-Metabolismus, Glykolyse, Gluconeogenese, Citratzyklus und Säuremetabolismus aufgeführt. Im unteren Hitzediagramm erscheinen die Teile der relevanten Stoffwechselwege mit geringen Stoffflüssen. Dies umfasst den Pentose-Phosphat-Weg und den Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren. Im Folgenden werden die Ergebnisse kurz zusammengefasst sowie Unterschiede und Besonderheiten hervorgehoben.

Während die Aufnahmereaktionen für Glucose und Glycerin nur bei der jeweiligen Kohlenstoffquelle aktiv sind, zeigen sich deutlich unterschiedliche Aktivitäten und auch Reaktionsrichtungen in der Glykolyse und Gluconeogenese bei den verschiedenen Kohlenstoffquellen. Unterschiede zwischen Glucose und Glycerin ergeben sich im oberen Teil der Glykolyse (*fba* und *pgi*). Diese Reaktionen werden ausgehend von Glycerin in gluconeogenetischer Richtung bedient und weisen eine geringere Aktivität auf, da im Gegensatz zu Glucose nicht der gesamte Stofffluss über diese Reaktionen verläuft. Unterschiede in der prinzipiellen Aktivität bestehen für *pfk* und *fbp*, da diese beiden Enzyme zwei Richtungen der gleichen Reaktion katalysieren. Weiterhin auffällig ist die höhere Aktivität der *pyk* bei Verwendung von Glycerin, da die entsprechende Stoffumsetzung von PEP zu Pyruvat bei der Aufnahme von Glucose abläuft und somit bei dieser Kohlenstoffquelle keine zusätzliche Aktivität der *pyk* nötig ist.

Die Stoffflüsse in der Glykolyse/Gluconeogenese sind ausgehend von Succinat und Pyruvat viel geringer und in gegengesetzter Richtung aktiv als bei Verwendung von Glucose und Glycerin, wobei die Reaktionsrichtungen in der oberen Glykolyse mit Glycerin übereinstimmen. Enzymaktivitäten bei Succinat und Pyruvat, die für Glucose und Glycerin nicht notwendig sind und nicht beobachtet werden, sind *ppck* und *pps*. Die Reaktionen des Citratzyklus sind bei allen Kohlenstoffquellen mit gleicher Reaktionsrichtung aktiv, wobei die höchsten Stoffflüsse im Gesamtzyklus mit Pyruvat vorliegen. Bei Succinat als Substrat treten solch hohe Aktivitäten bei den Reaktionen nach Eintritt von Succinat in den Zyklus auf. Die höchste Aktivität des Glyoxylat-Bypasses ist bei der Kohlenstoffquelle Pyruvat zu beobachten, mit Succinat und Glucose sind diese Reaktionen nicht aktiv. Auffallend ist die verringerte Aktivität des Citratzyklus bei der höchsten Glycerin-Aufnahmerate im Vergleich zu den niedrigeren Raten. Der Grund hierfür ist die starke auftretende Nebenproduktbildung in dieser Zulaufstufe, die eine geringere Menge an Kohlenstoff für den Citratzyklus zur Folge hat. Die

Stoffflüsse und Aktivitäten im Säuremetabolismus werden maßgeblich durch die gemessenen Aufnahmeraten von Succinat und Pyruvat, sowie die Bildungsraten der verschiedenen Nebenprodukte beeinflusst.

Für die meisten Reaktionen, die im unteren Hitzediagramm aufgeführt werden, sind die Flussrichtungen durch äußere Vorgaben festgelegt. Verschiedene Flussrichtungen sind somit nur für wenige Reaktionen möglich, zum Beispiel *rpe* und *tkt2* im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel. Abgesehen von diesen Änderungen, die beim Vergleich der Verteilungen auf Glucose und Glycerin auffallen, sind die großen relativen Unterschiede der absoluten Flüsse in diesen Teilen des Stoffwechsels offensichtlich. Diese werden vor allem durch die Vorgabe der gemessenen Produktbildungsraten verursacht. So führen die nur sehr geringen L-Tryptophan-Bildungsraten, ausgehend von Succinat und Pyruvat, zu kaum aktiven Stoffflüssen im Aromatenbiosyntheseweg. Dies ist anhand der dargestellten Ergebnisse der *gFBA* bei Pyruvat nicht direkt zu sehen, da die für diese Kohlenstoffquelle hohe Unsicherheit der Produktbildung (siehe Abbildung 5.33) nicht zum Tragen kommt. Deutlich zu erkennen sind hingegen die klaren Abstufungen der Produktbildungsraten bei Verwendung von Glucose, sowie die konstante Produktbildung ausgehend von Glycerin bei allen Zulaufstufen. Zu beachten ist weiterhin für beide Hitzediagramme die große Ähnlichkeit der Flussverteilungen bei der geringsten Glycerin-Aufnahmerate in der Analyse und im Referenzprozess.

Die Zahlenwerte, die den Hitzediagrammen zugrunde liegen, und die Ergebnisse der zugehörigen Flussvarianzanalysen, sind dem Anhang (Tabelle 10.12 bis Tabelle 10.16) zu entnehmen. Die Berechnungen der *FVA* führten in keinem Fall zu unerwartet großen Varianzen. Auftretende Abweichungen beruhen entweder auf alternativen aktiven Stoffwechselwegen, wie beispielsweise der möglichen, aber nicht notwendigen Aktivität des Glyoxylat-Bypasses bei Glycerin als Kohlenstoffquelle, oder Unsicherheiten der gemessenen Produktbildungsraten. Dies trifft in besonderem Maße auf die Verteilungen ausgehend von Succinat und Pyruvat zu. All diese Effekte sind im Kapitel der Analyse im Satzverfahren (5.4.3) bei der Beschreibung von Abbildung 5.23 bis Abbildung 5.26 ausführlich erläutert.

Die Betrachtung der abgeschätzten Flussverteilungen zeigt, dass die Anwendung von Zulaufverfahren bei der metabolischen Analyse zu einer großen Anzahl metabolischer Fließgleichgewichte innerhalb der Analysendauer führte. Dabei wurde der Stoffwechsel erfolgreich verschiedentlich ausgelenkt. Die größten Unterschiede in Stoffflüssen und Reaktionsrichtungen konnten dabei innerhalb der Reaktionen des Zentralstoffwechsels bestimmt werden.

5.5.4 Vergleichende Proteomanalysen

Damit die Daten aus den parallelisierten metabolischen Analysen eine Aussagekraft über den zugrunde liegenden Referenzzustand besitzen, ist ein unverändertes Proteom während der Analysendauer erforderlich. In Vorarbeiten wurde anhand von 2D-Elektrophorese-Gelen gezeigt, dass dies für *E. coli* innerhalb der nötigen 30 min gegeben ist (siehe Kapitel 3.3.1).

Aufgrund von verfügbaren verbesserten massenspektrometrischen Analytikmethoden sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Validierung dieser Annahme durchgeführt werden. Die nötigen Messungen mittels nanoLC-ESI-MS/MS und Auswertungen zur Betrachtung von ~2200 Proteinen bei vergleichenden Proteomquantifizierungen wurden vom Projektpartner an einen externen Dienstleister an der Universität Hohenheim vergeben (Core Facility Hohenheim, Modul Massenspektrometrie, Dr. Jens Pfannstiel). Die Vorgehensweise zur Probenaufarbeitung und Analyse kann Toulouse *et al.* (2018) entnommen werden. Als Kriterium für einen Konzentrationsunterschied in zwei Vergleichsproben wurde ein Regulationsfaktor von zwei und als Grenzwert für statistische Signifikanz ein Signifikanzwert $\leq 0,05$ festgelegt. Die Vergleiche werden in sogenannten *Volcano Plots* dargestellt, deren Achsen Signifikanzwerte und Differenz der Proteinmenge logarithmiert wiedergeben. Die festgelegten Kriterien bezüglich der beiden Größen sind in dieser Art von Diagrammen als schwarze Linien dargestellt.

In der hier beschriebenen Arbeit wurde ein Vergleich des Proteoms in einer Probe aus dem Referenzprozess unmittelbar vor der Analyse und in Proben aus allen vier Analysenreaktoren am Ende der Analyse durchgeführt. Dabei wurde der Referenzzustand einzeln mit allen Analysenreaktoren verglichen. Die *Volcano Plots* dieser vier Vergleiche finden sich im Anhang (Abbildung 10.1 bis Abbildung 10.4). Von den jeweils betrachteten ~2200 Proteinen erfüllten in den Reaktoren mit Glucose, Succinat und Pyruvat jeweils rund 40 die genannten Kriterien für eine signifikante Änderung der Proteinmenge, im Reaktor mit Glycerin 101. Diese sind im Anhang (Tabelle 10.17 bis Tabelle 10.20) mit ihren Konzentrationsänderungen und Signifikanzwerten spezifiziert. Die hier angewandte sensitivere Messmethode zeigte im Unterschied zu früheren Ergebnissen also Unterschiede auf, die sich im Lauf der metabolischen Analyse im Proteom ergeben. Sie betrafen jedoch nur einen geringen Anteil der vorhandenen Proteine (2–5 %). Insgesamt waren 128 Proteine in einem oder mehreren Ansätzen von den Änderungen betroffen. Jeweils rund 10 % von ihnen gehörten zum Metabolismus einer Stressreaktion, zu Transportproteinen und zur Gruppe der Proteine mit unbekannter Funktion. 20 % der Proteine waren mit Vorgängen der Transkription assoziiert. Die restlichen Proteine stammten aus verschiedenen Bereichen des Metabolismus, hatten jedoch ebenfalls keinen direkten Bezug zu den Stoffwechselwegen, die für diese Arbeit von Interesse sind. Somit bestärkten die neuen Quantifizierungen die Annahme eines konstanten Proteoms während der metabolischen Analyse

bezüglich der betrachteten Stoffwechselwege und rechtfertigen somit die angesetzte Vergleichbarkeit der Daten aus Referenzprozess und Analyse.

5.5.5 Quantifizierung intrazellulärer Metabolite

Um weitere detaillierte Informationen über den metabolischen Zustand der Zellen während der verschiedenen Zulaufstufen der metabolischen Analyse zu erhalten, erfolgten separate Probenahmen zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite (Vorgehensweise siehe Kapitel 4.4). Das Metabolom, also die Gesamtheit aller Metabolite, enthält bei kurzfristigen Änderungen von Umweltbedingungen besonders viele Informationen über die zelluläre Reaktion, da diese Ebene des Stoffwechsels am schnellsten auf geänderte Bedingungen reagiert. Die hier verwendete Methodik zur intrazellulären Metabolitquantifizierung berücksichtigt die Korrektur gemessener Konzentrationen um extrazellulär vorliegende Mengen, wobei alle Werte auf ein Zellvolumen von $1,3 \mu\text{L g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Link, 2009) bezogen wurden. Vergleichswerte für Literaturdaten intrazellulärer Konzentrationen sind in der Datenbank *ECMDB* (Guo *et al.*, 2013) für einige Metabolite zu finden, die jedoch häufig unter deutlich anderen Prozessbedingungen gewonnen wurden.

Die Auswirkungen der verschiedenen Bedingungen während der parallelisierten metabolischen Analyse auf ausgewählte intrazelluläre Metabolitkonzentrationen sind in Abbildung 5.35 bis Abbildung 5.41 dargestellt. Neben den Proben aus den vier Analysenreaktoren während jeder der drei Zulaufstufen wurden im Zeitraum der metabolischen Analyse auch zwei Proben für intrazelluläre Metabolitquantifizierung aus dem Referenzprozess gewonnen. Aufgrund von technischen Schwierigkeiten bei der Probenahme während der letzten Zulaufstufe aus dem Ansatz mit der Kohlenstoffquelle Pyruvat liegen hierzu keine Metabolom-Daten vor.

In Abbildung 5.35 sind Metabolite mit Bedeutung für den Energiestoffwechsel zusammengefasst (ATP, ADP, AMP und FAD). Insgesamt ließen sich für die Konzentrationen der Metabolite in den unterschiedlichen Proben keine deutlichen Unterschiede oder Tendenzen feststellen. Die geringste Variation lag für FAD vor, das in allen Proben mit 0,2 mM ermittelt wurde. Für die Konzentrationen von ATP, ADP und AMP ergaben sich Schwankungen der Messwerte, dennoch hatte stets ATP die höchste Konzentration, gefolgt von ADP und AMP. Es erscheint plausibel, dass sich die Konzentrationen dieser Metabolite, die entscheidend für die gesamten Stoffwechselvorgänge und an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt sind, durch die verschiedenen Bedingungen während der Analyse nicht grundlegend verändern ließen. Die Plausibilität dieser Daten ergibt sich weiterhin über die Berechnung des *energy charge* (Chapman *et al.*, 1971), der für alle Proben zwischen 0,65 und 0,79 lag und damit im Bereich vitaler, aber nicht exponentiell wachsender Zellen.

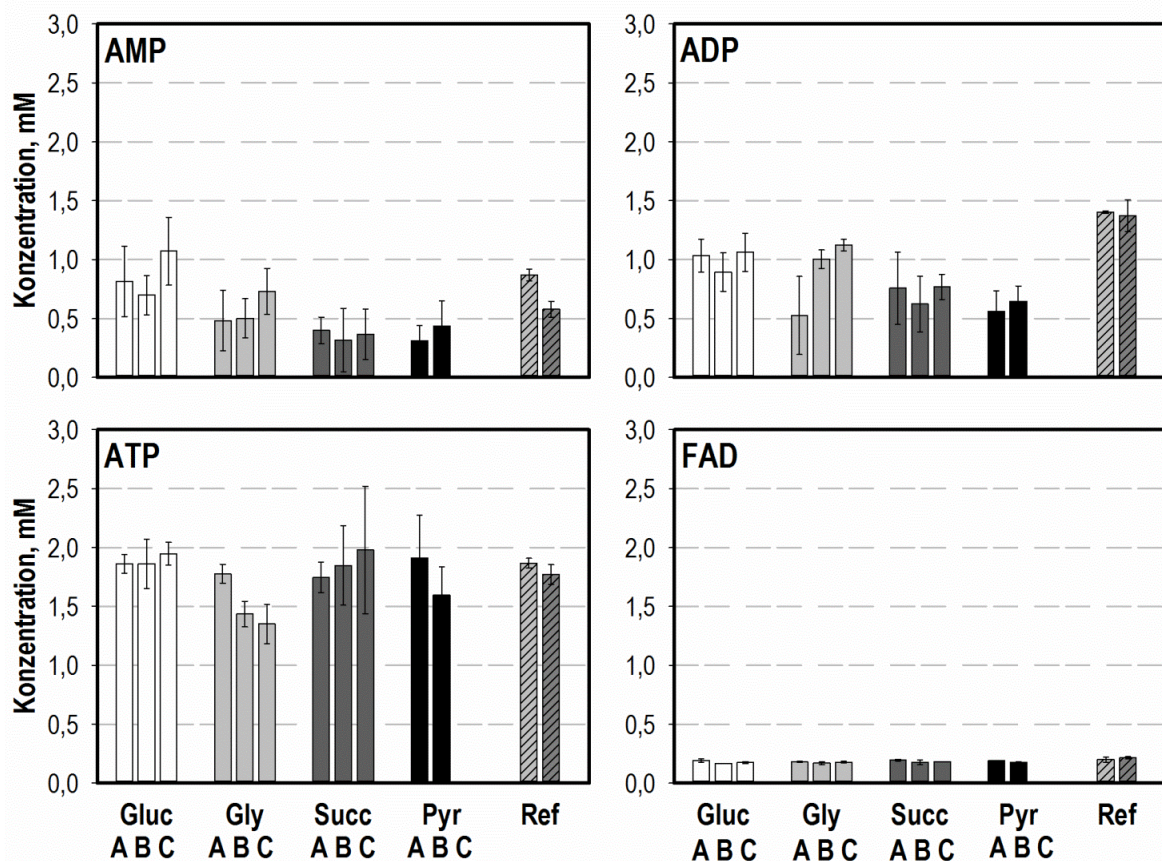


Abbildung 5.35: Intrazelluläre Konzentrationen der Energieäquivalente Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren (Zulaufstufen A, B und C) mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc □), Glycerin (Gly ▣), Succinat (Succ ■) und Pyruvat (Pyr ■). Außerdem dargestellt (schraffiert) sind die intrazellulären Konzentrationen der Proben aus dem Referenzprozess (Ref) während der Analyse.

Weitere Metabolite mit hoher allgemeiner Bedeutung für den Gesamtstoffwechsel sind die Redox-Cofaktoren NAD, NADH, NADP und NADPH, deren ermittelte intrazelluläre Konzentrationen in Abbildung 5.36 dargestellt sind. Auch hier zeigten sich nur geringfügige Konzentrationsunterschiede in den verschiedenen Proben, was wiederum aufgrund der Verwendung als Cofaktor in vielen Reaktionen des gesamten Metabolismus plausibel ist. NAD und NADH treten dabei vor allem im Katabolismus auf. In der Literatur sind intrazelluläre Konzentrationen bis zu 4 mM beschrieben (Bennett *et al.*, 2009). Die hier ermittelten Konzentrationen lagen darunter, aber in derselben Größenordnung. Durch die Verwendung als Oxidationsmittel begründet ist die stets höhere Konzentration von NAD als NADH. Für letzteres sind Konzentrationen um 0,1 mM beschrieben, die mit den hier vorliegenden Konzentrationen übereinstimmen (Ishii *et al.*, 2007). Die katabole Reduktionskraft, die sich aus dem Verhältnis der Konzentration von NADH zur Summe der Konzentrationen von NAD und NADH berechnet, lag in allen Proben bei einem plausiblen Wert von rund 0,06. In der Literatur werden Konzentrationen von ~0,3 mM NADPH und ~0,1 mM NADP aufgeführt, welche in guter Übereinstimmung mit den gezeigten Daten stehen (Park *et al.*, 2011).

Außerdem übereinstimmend ist eine in jeder Probe höhere Konzentration von NADPH als NADP. Der Grund hierfür liegt in der überwiegenden Verwendung als Reduktionsmittel im Rahmen von anabolen Reaktionen. Die anabole Reduktionskraft, also das Verhältnis der NADPH-Konzentration zur Summe der Konzentrationen von NADP und NADPH, ergab sich hier in allen Proben zu einem plausiblen Wert von rund 0,55.

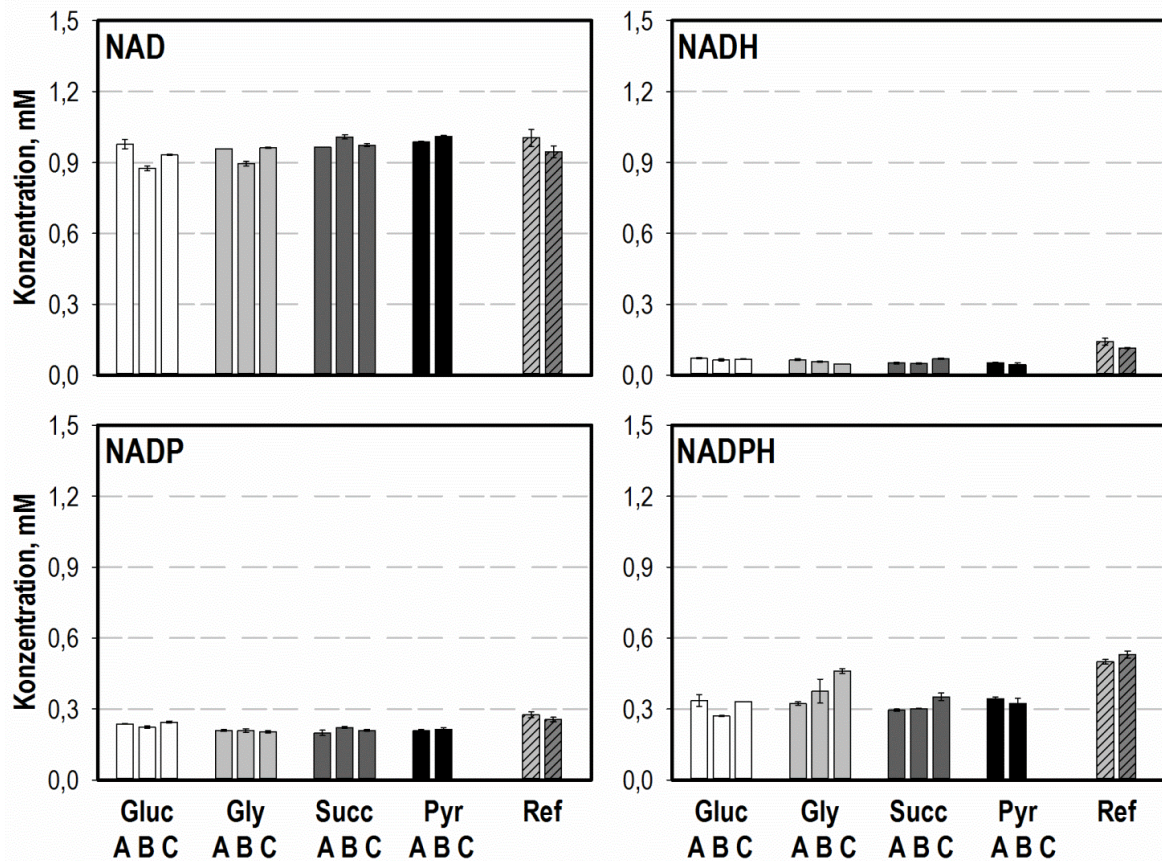


Abbildung 5.36: Intrazelluläre Konzentrationen der Cofaktoren oxidiertes Nicotinamadenindinukleotid (NAD), reduziertes Nicotinamadenindinukleotid (NADH), oxidiertes Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADP) und reduziertes Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren (Zulaufstufen A, B und C) mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc □), Glycerin (Gly ▒), Succinat (Succ ■) und Pyruvat (Pyr ■). Außerdem dargestellt (schraffiert) sind die intrazellulären Konzentrationen der Proben aus dem Referenzprozess (Ref) während der Analyse.

Alle weiteren betrachteten Metabolite haben eine eindeutige Zuordnung zu wenigen Reaktionen im Stoffwechsel, sodass eine deutlichere Auswirkung der verschiedenen Auslenkungen auf die intrazellulären Konzentrationen erwartet wird. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist aufgrund der jeweils sehr speziellen Bedingungen, unter denen die Proben gewonnen wurden, und der teilweise ungewöhnlichen betrachteten Stoffwechselwege abseits des Zentralstoffwechsels jedoch nur bedingt möglich. Die beste Möglichkeit zum Vergleich bietet sich in den metabolischen Analysen der L-Phenylalanin-Produktion mit *E. coli*, die unter ähnlichen experimentellen Bedingungen zu zwei Zeitpunkten während eines Produktionsprozesses durchgeführt wurden (Weiner *et al.*, 2017).

In Abbildung 5.37 sind die intrazellulären Konzentrationen ausgewählter Metabolite der Glykolyse dargestellt. Für Glucose-6-Phosphat (G6P), den ersten Metaboliten nach der Aufnahme von Glucose in die Zellen, ergab bei zunehmender Glucose-Zufuhr eine steigende Konzentration. Auch ausgehend von allen anderen Kohlenstoffquellen war dieser Metabolit mit geringeren Konzentrationen nachweisbar, was für eine Aktivität des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges spricht, der bei diesem Metaboliten beginnt. Die Konzentration nahm mit steigender Zufuhr von Glycerin ab, für Succinat und Pyruvat ergab sich keine Tendenz. Die Konzentrationen der Referenzproben entsprachen analog der Substratzufuhr dem Wert der niedrigsten Stufe der Glycerinzufuhr (Gly A).

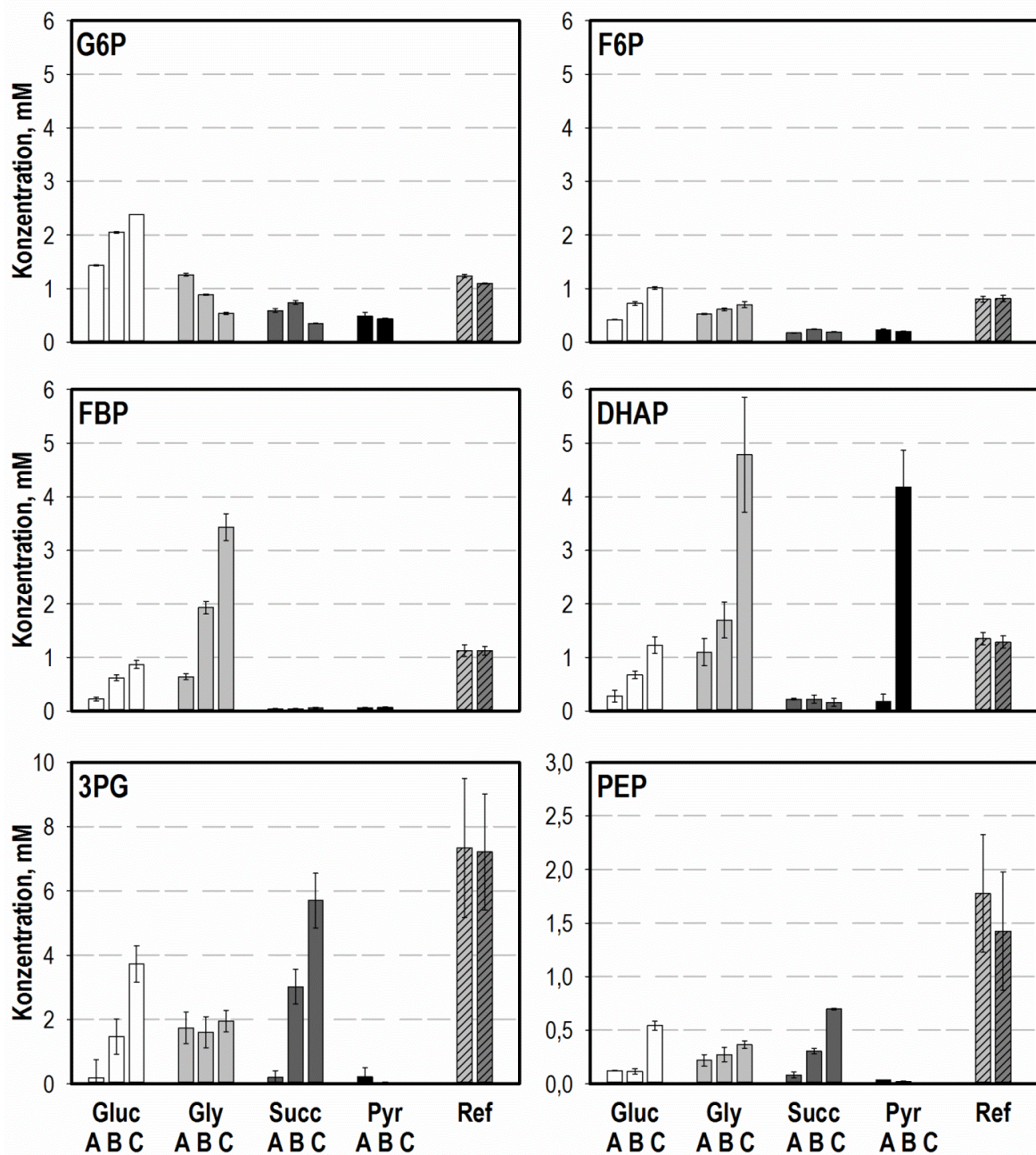


Abbildung 5.37: Intrazelluläre Konzentrationen der Glykolyse-Metabolite Glucose-6-Phosphat (G6P), Fructose-6-Phosphat (F6P), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), 3-Phosphoglycerat (3PG) und Phosphoenolpyruvat (PEP) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren (Zulaufstufen A, B und C) mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc □), Glycerin (Gly ■), Succinat (Succ ■) und Pyruvat (Pyr ■). Außerdem dargestellt (schraffiert) sind die intrazellulären Konzentrationen der Proben aus dem Referenzprozess (Ref) während der Analyse.

Der nächste Metabolit der Glykolyse ist Fructose-6-Phosphat (F6P), das ebenfalls in allen Proben und mit niedrigeren Konzentrationen als G6P ermittelt wurde. Eine steigende Tendenz zeigte sich hier ausgehend von Glucose und Glycerin als Kohlenstoffquelle, analog zu den Ergebnissen von Weiner *et al.* (2017). Es ergab sich außerdem eine gleichbleibend niedrige Konzentration in den Ansätzen mit

Succinat und Pyruvat und eine leicht höhere Konzentration im Referenzprozess als im Analysenreaktor mit Glycerin.

Deutlich höhere intrazelluläre Konzentrationen wurden teilweise für den folgenden Metabolit der Glykolyse, Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), ermittelt. Die Stufenprofile der Substratzufuhr spiegelten sich hierbei in den Ansätzen mit Glucose und Glycerin wider, wobei Glycerin eine deutlich höhere Änderung verursachte. Dies entspricht den Beobachtungen von Weiner *et al.* (2017). Nur sehr geringe Konzentrationen wurden in den Reaktoren mit Succinat und Pyruvat ermittelt, die Konzentrationen der Referenzproben lagen zwischen der unteren und mittleren Glycerin-Zufuhrstufe.

Noch größere Unterschiede der Konzentrationen in den Proben lagen für Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) vor. Dieser Metabolit ist der Verknüpfungspunkt zwischen Glycerin-Metabolismus und Glykolyse, sodass die beobachteten steigenden Konzentrationen bei zunehmender Verfügbarkeit von Glucose und Glycerin plausibel sind. Mit Glycerin wurden dabei deutlich höhere Konzentrationen erreicht. Während mit Succinat eine konstante niedrige Konzentration vorlag, erscheint der plötzliche starke Anstieg der intrazellulären Konzentration in der mittleren Zulaufstufe von Pyruvat erstaunlich. Ein deutlicher Anstieg von DHAP, ausgehend von Pyruvat, wurde auch von Weiner *et al.* (2017) beobachtet, jedoch während einer metabolischen Analyse zum Zeitpunkt abnehmender L-Phenylalanin-Produktion.

Ein weiterer Metabolit der Glykolyse mit besonderer Bedeutung für die Biosynthese von L-Tryptophan ist 3-Phosphoglycerat (3PG), da an dieser Stelle der L-Serin-Metabolismus beginnt, der einen Vorläufer für L-Tryptophan liefert. Steigende intrazelluläre Konzentrationen bei zunehmender Substratzufuhr ergaben sich bei 3PG für die Kohlenstoffquellen Glucose und Succinat. Im Pyruvat-Ansatz lagen niedrige Konzentrationen vor oder es war kein Nachweis möglich. Bei Verwendung von Glycerin blieb die 3PG-Konzentration konstant, jedoch wurde in den Referenzproben eine rund dreifache Konzentration im Vergleich zum Glycerin-Analysenreaktor ermittelt.

Auch Phosphoenolpyruvat (PEP) am Ende der Glykolyse ist als Vorläufermetabolit der Aromatenbiosynthese von hohem Interesse für die L-Tryptophan-Produktion. Für PEP ergaben sich steigende Profile in den Ansätzen mit Glucose, Glycerin und Succinat. Dies steht im Unterschied zu den Ergebnissen von Weiner *et al.* (2017), die abnehmende oder konstante Konzentrationen beobachteten und dies in Zusammenhang mit dem für die Glucose-Aufnahme nötigen PEP brachten. Auch bezüglich der Konzentrationen im Pyruvat-Ansatz ergaben sich Unterschiede, da in der vorliegenden Arbeit in diesen Proben nur sehr geringe Konzentrationen ermittelt wurden. Aufgrund der Nähe von Pyruvat und PEP im Stoffwechsel ist dies erstaunlich, jedoch aufgrund der nicht-notwendigen Umsetzung in diese Richtung bei Verwendung von Glycerin, und somit im

Referenzprozess, zu erklären. Auch im Falle von PEP lagen im Referenzprozess deutlich höhere Konzentrationen im Prozess als in den Analysenreaktoren vor.

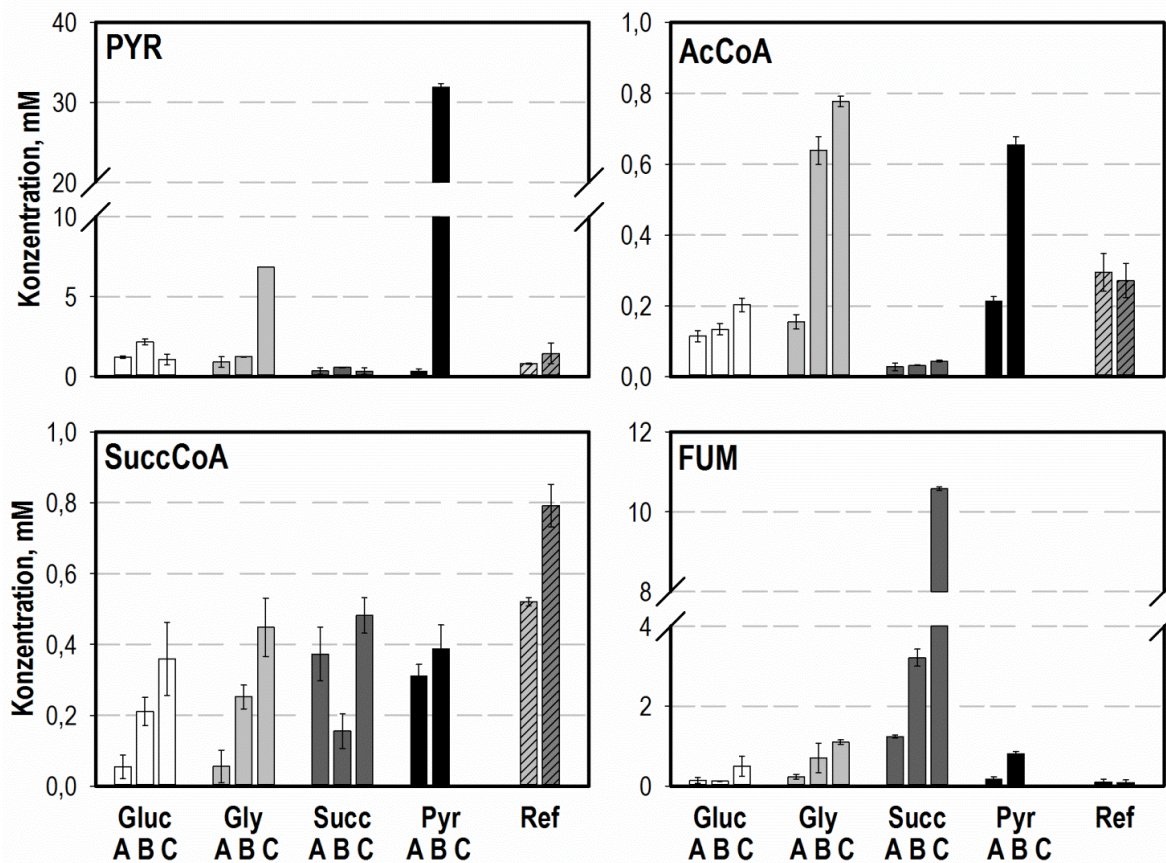


Abbildung 5.38: Intrazelluläre Konzentrationen der Zentralstoffwechsel-Metabolite Pyruvat (PYR), AcetylCoA (AcCoA), SuccinylCoA (SuccCoA), und Fumarat (FUM) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren (Zulaufstufen A, B und C) mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc □), Glycerin (Gly □), Succinat (Succ ■) und Pyruvat (Pyr ■). Außerdem dargestellt (schraffiert) sind die intrazellulären Konzentrationen der Proben aus dem Referenzprozess (Ref) während der Analyse.

Eine Darstellung der ermittelten intrazellulären Konzentrationen verschiedener Metabolite aus dem Zentralstoffwechsel um den Citratzyklus kann Abbildung 5.38 entnommen werden. Für Pyruvat (PYR), das als Kohlenstoffquelle verwendet wurde und gleichzeitig ein Metabolit des Zentralstoffwechsels ist, wurde eine naheliegende, sehr starke Erhöhung der Konzentration im Ansatz mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle ermittelt. Dabei lag PYR auch extrazellulär vor, die Bilanzierung war jedoch trotzdem möglich. Außerdem ergab sich eine Konzentrationssteigerung in der letzten Zulaufstufe von Glycerin, weitere starke Auswirkungen der verschiedenen Bedingungen auf die PYR-Konzentration waren nicht erkennbar.

AcetylCoA (AcCoA) ist ein Metabolit, der in einem enzymatischen Schritt aus PYR gewonnen und bei der Bildung von Citrat verbraucht wird. Für die steigenden Zulaufstufen von Glucose wurde für AcCoA eine Verdopplung der intrazellulären Konzentration ermittelt, für Glycerin eine Vervierfachung. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der zu AcCoA nächstgelegenen Kohlenstoffquelle

Pyruvat ermittelt. Die deutlich niedrigeren Konzentrationen in den Proben aus dem Succinat-Ansatz stehen möglicherweise in Zusammenhang mit dem weniger direkten Stoffwechselweg von Succinat zu AcCoA, der über anaplerotische Reaktionen abläuft. Insgesamt lagen die AcCoA-Konzentrationen in einem ähnlichen Bereich wie während der Analyse der L-Phenylalanin-Produktion (Weiner *et al.*, 2017). Für die Referenzproben ergaben sich wiederum Konzentrationen ähnlich der niedrigsten Glycerin-Zulaufstufe.

Für den Metaboliten SuccinylCoA (SuccCoA) wurden weniger eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen Kohlenstoffquellen ermittelt. Während die Konzentrationen in den Ansätzen mit Glucose und Glycerin stiegen, ergaben sich ausgehend von Succinat schwankende Werte und nur eine geringe Änderung durch die verschiedenen Pyruvat-Zulaufstufen. Darüber hinaus wurde eine große Abweichung der beiden Referenzproben untereinander ermittelt, die außerdem deutlich über dem Wert aus den anderen Proben mit Glycerin lagen.

Auch Fumarat (FUM) wurde in den Proben mit sehr unterschiedlich hohen Konzentrationen nachgewiesen. Den größten Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration hatte die Erhöhung der Zufuhr von Succinat, sodass in diesem Ansatz während der metabolischen Analyse eine Verzehnfachung der FUM-Konzentration auftrat. Der Grund hierfür ist die direkte Umsetzung von Succinat zu FUM innerhalb des Citratzyklus. Dieser Effekt trat auch bei Weiner *et al.* (2017) auf. Die Verwendung der anderen Kohlenstoffquellen führte ebenfalls zu einer Erhöhung dieser intrazellulären Konzentration bei steigender Substratzufuhr, jedoch deutlich weniger stark ausgeprägt. Im Referenzprozess wurden die niedrigsten Konzentrationen ermittelt.

Weitere Metabolite des Citratzyklus, die mit der verwendeten Messmethode erfasst werden, sind Citrat, Isocitrat, α -Ketoglutarat, Succinat und Malat. Bei diesen Metaboliten trat jedoch eine Maskierung der intrazellulären Konzentrationen durch extrazellulär vorhandene Konzentrationen auf, sodass eine Bilanzierung nicht möglich war.

Die Konzentrationen, die für zwei Metabolite aus Glycerin- und L-Serin-Stoffwechsel ermittelt wurden, sind in Abbildung 5.39 aufgezeigt. Glycerin-3-Phosphat (Gly3P) tritt als erster Metabolit nach der Aufnahme von Glycerin in die Zellen bei aerobem Stoffwechsel auf. Somit sind die deutlich höheren Konzentrationen in den Proben aus dem Analysenreaktor mit Glycerin und aus dem Referenzprozess im Vergleich zu allen anderen Proben plausibel, ebenso die steigende Konzentration bei steigender Glycerinzufuhr. Bei der Probe aus Zulaufstufe C trat jedoch eine hohe Messunsicherheit auf. Die Konzentrationen im Prozess lagen zwischen den Konzentrationen bei unterer und mittlerer Zulaufstufe von Glycerin. Nur geringe Konzentrationsunterschiede ergaben sich für Phospho-L-Serin (pser-L), dem Vorläufer von L-Serin. Hierbei wurden im Prozess etwas höhere Konzentrationen

ermittelt als in den anderen Proben, die sich jedoch nur geringfügig unterschieden und bei keiner Kohlenstoffquelle eine eindeutige Tendenz aufwiesen.

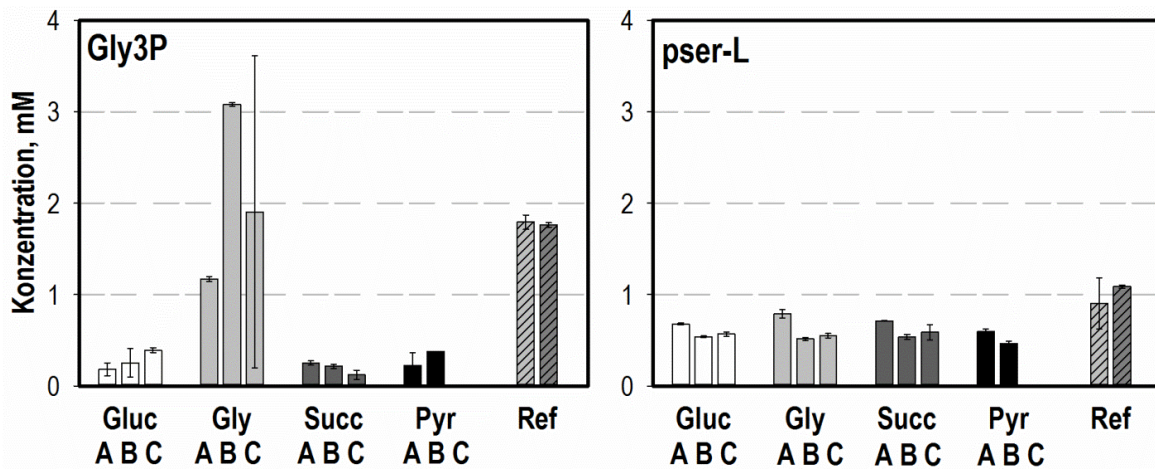


Abbildung 5.39: Intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite aus Glycerin- und L-Serin-Stoffwechsel Glycerin-3-Phosphat (Gly3P) und L-Phospho-Serin (pser-L) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren (Zulaufstufen A, B und C) mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc □), Glycerin (Gly ◻), Succinat (Succ ◼) und Pyruvat (Pyr ◼). Außerdem dargestellt (schraffiert) sind die intrazellulären Konzentrationen der Proben aus dem Referenzprozess (Ref) während der Analyse.

Abbildung 5.40 zeigt die intrazellulären Konzentrationen verschiedener Metabolite des Pentose-Phosphat-Weges. Dieser Teil des Stoffwechsels ist für die L-Tryptophan-Biosynthese von großer Bedeutung, da Erythrose-4-Phosphat direkt und das in einem Schritt aus Ribose-5-Phosphat gebildete Phosphoribosyl-Pyrophosphat als Vorläufermetabolite benötigt werden. Dies führt auch zu einer möglichen Konkurrenzsituation innerhalb des Stoffwechselweges. Die Nachweisbarkeit von 6-Phosphogluconat (6PG) in allen Proben deutet, wie oben beschrieben, gemeinsam mit dem Auftreten von G6P auf die Aktivität des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges hin. Der Metabolit wurde im Ansatz mit Glucose mit deutlich steigender Konzentration beobachtet, ebenso trat eine weniger stark ausgeprägte Steigerung im Glycerin-Ansatz auf. Die höchsten Konzentrationen aller Proben wurden für den Referenzprozess ermittelt. Niedrigere Konzentrationen und keine deutlichen Änderungen ergaben sich während der Analyse für die Kohlenstoffquellen Succinat und Pyruvat. Diese Beobachtung gilt für diese beiden Kohlenstoffquellen auch für alle weiteren aufgeführten Metabolite des Pentose-Phosphat-Weges.

Im Fall von Sedoheptulose-7-Phosphat lagen die höchsten Konzentrationen in den Proben aus dem Glucose-Ansatz der Analyse vor, wobei sie sich außerdem mit steigender Glucose-Zufuhr erhöhten. Von Weiner *et al.* (2017) wurde ebenfalls die höchste S7P-Konzentration mit Glucose als Kohlenstoffquelle ermittelt, allerdings mit fallender Tendenz und insgesamt annähernd doppelten Konzentrationen. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich eine Abnahme der S7P-Konzentration im Glycerin-Ansatz und eine gute Übereinstimmung der Konzentrationen bei niedrigster Glycerin-Zufuhr und im Referenzprozess.

Eine steigende Konzentration bei Erhöhung der Zufuhr von Glucose ergab sich auch für den Metaboliten Ribose-5-Phosphat (R5P). Eine deutlichere Steigerung und höhere intrazelluläre Konzentrationen lagen hierbei jedoch für die Kohlenstoffquelle Glycerin vor. Da die Konzentrationen im Referenzprozess zwischen den Konzentrationen bei mittlerer und hoher Glycerin-Zufuhr lagen, ergab sich die höchste R5P-Konzentration bei Glycerin-Zufuhrstufe C. In diesem Fall lagen die ermittelten Konzentrationen um bis zu Faktor 5 oberhalb der für die L-Phenylalanin-Produktion gemessenen (Weiner *et al.*, 2017).

Wie bei S7P ergab sich auch für Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) eine steigende Tendenz im Reaktor mit Glucose und eine abnehmende im Reaktor mit Glycerin. Die höchste Konzentration im Glucose-Ansatz und die Konzentrationen im Referenzprozess lagen dabei auf dem gleichen Niveau.

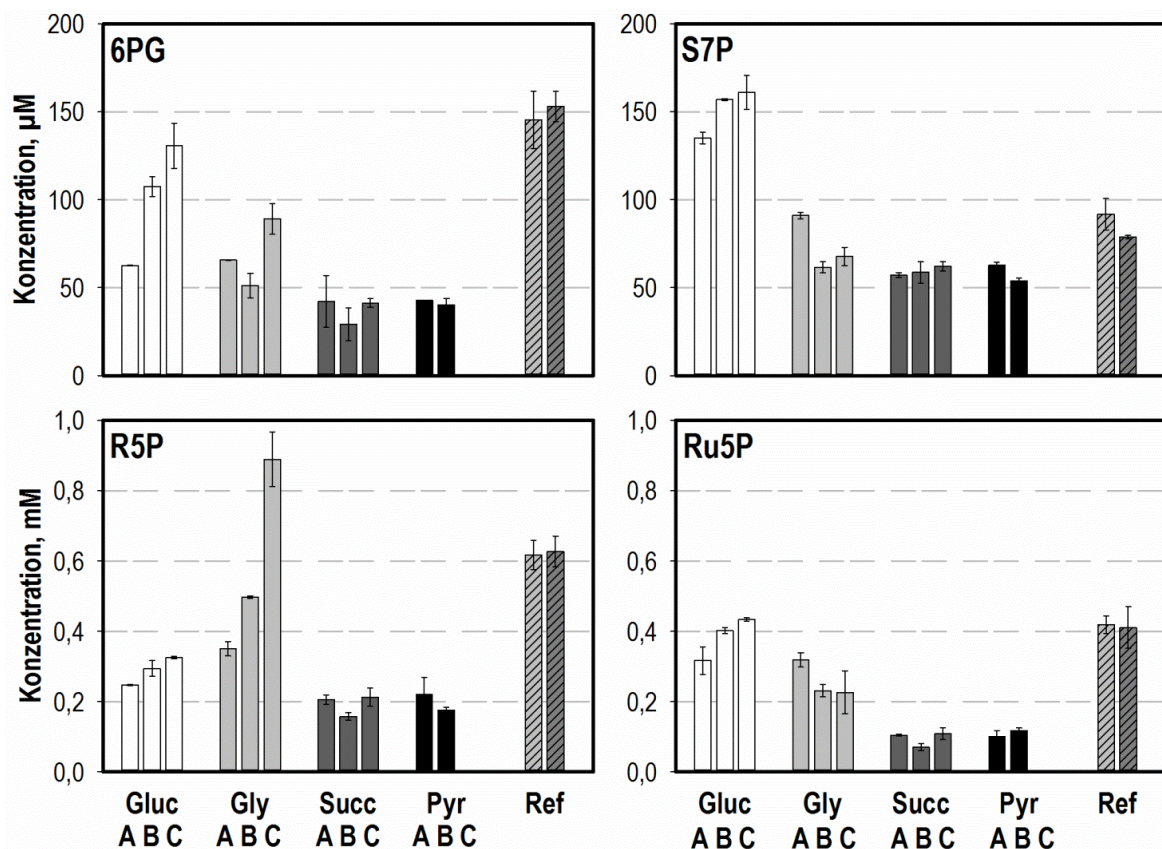


Abbildung 5.40: Intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite des Pentose-Phosphat-Weges 6-Phosphogluconat (6PG), Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P), Ribose-5-Phosphat (R5P) und Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren (Zulaufstufen A, B und C) mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc □), Glycerin (Gly ▣), Succinat (Succ ■) und Pyruvat (Pyr ■). Außerdem dargestellt (schraffiert) sind die intrazellulären Konzentrationen der Proben aus dem Referenzprozess (Ref) während der Analyse.

Abbildung 5.41 zeigt abschließend die intrazellulären Konzentrationen der analytisch erfassten Metabolite aus der Biosynthese aromatischer Aminosäuren. Die drei Metabolite 3-Dehydroshikimat (3DHS), Shikimat-3-Phosphat (S3P) und Chorismat (CHOR) stammen dabei aus dem ersten Teil der

Aromatenbiosynthese, der für L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan identisch ist. Im Fall von Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde eine starke Zunahme der intrazellulären Konzentration von 3DHS mit steigender Substratzufuhr beobachtet, während in allen anderen Proben gleichbleibend niedrige Konzentrationen ermittelt wurden. Dieser Effekt ist auch von Weiner *et al.* (2017) in noch stärkerer Ausprägung beschrieben, allerdings für eine metabolische Analyse zum Zeitpunkt abnehmender L-Phenylalanin-Produktion. Für die Metabolite S3P und CHOR ergab sich ein ähnliches Bild mit steigenden Konzentrationen in den Ansätzen mit Glucose und Glycerin, nur geringen Variationen bei Succinat und Pyruvat, sowie den höchsten Konzentrationen im Referenzprozess. Dabei war die Konzentration von CHOR in jedem Fall deutlich größer (Faktor 2–3) als die Konzentration von S3P.

Zwei Metabolite des Stoffwechselweges von CHOR zu L-Phenylalanin, nämlich Prephenat (PPHN) und Phenylpyruvat (PhePyr), repräsentieren die Bildung der aromatischen Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Für PPHN ergab sich eine steigende Tendenz der Konzentration in allen Analysen-Ansätzen und eine um ein Vielfaches höhere Konzentration im Referenzprozess (~Faktor 8). Die Konzentrationszunahmen mit steigender Substratzufuhr stimmen ebenso mit Beobachtungen von Weiner *et al.* (2017) überein wie das Erreichen hoher intrazellulärer Konzentrationen dieses Metaboliten. Auch für PhePyr wurden die mit Abstand höchsten Konzentrationen im Referenzprozess ermittelt. In allen Proben der Analysenreaktoren lagen geringere Konzentrationen mit nur kleinen Unterschieden und teilweise hohen Unsicherheiten vor.

Darüber hinaus wurden mit Anthranilat (ANTH), Carboxyphenylamino-Desoxyribulose-5-Phosphat (2CDR5P) und Indol-3-Glycerinphosphat (3IG3P) drei Metabolite des für L-Tryptophan spezifischen Stoffwechselweges quantifiziert. Insgesamt wurden für ANTH und 2CDR5P um bis zu Faktor 10 geringere Konzentrationen als für 3IG3P ermittelt. Bei ANTH, dem ersten Metaboliten des L-Tryptophan-Stoffwechsels, wurde eine Steigerung der Konzentration während der Analysendauer nur im Ansatz mit der Kohlenstoffquelle Glycerin beobachtet. Die Konzentration im Referenzprozess konnte dabei aufgrund von Unterschieden in den beiden Proben und Unsicherheiten keinem Gleichgewichtszustand zugeordnet werden, lag jedoch in derselben Größenordnung. Der übernächste Metabolit im Stoffwechsel ist 2CDR5P, für den im Prozess eine 1,5–3fache Konzentration im Vergleich zu den Proben aus den Analysenreaktoren bestimmt wurde. Keiner der Gleichgewichtszustände mit den vier unterschiedlichen Kohlenstoffquellen ermöglichte eine deutliche Auslenkung der 2CDR5P-Konzentration, sodass sich kaum Unterschiede erkennen lassen. Insgesamt waren die Konzentrationen mit Succinat und Pyruvat etwas geringer als mit Glucose und Glycerin.

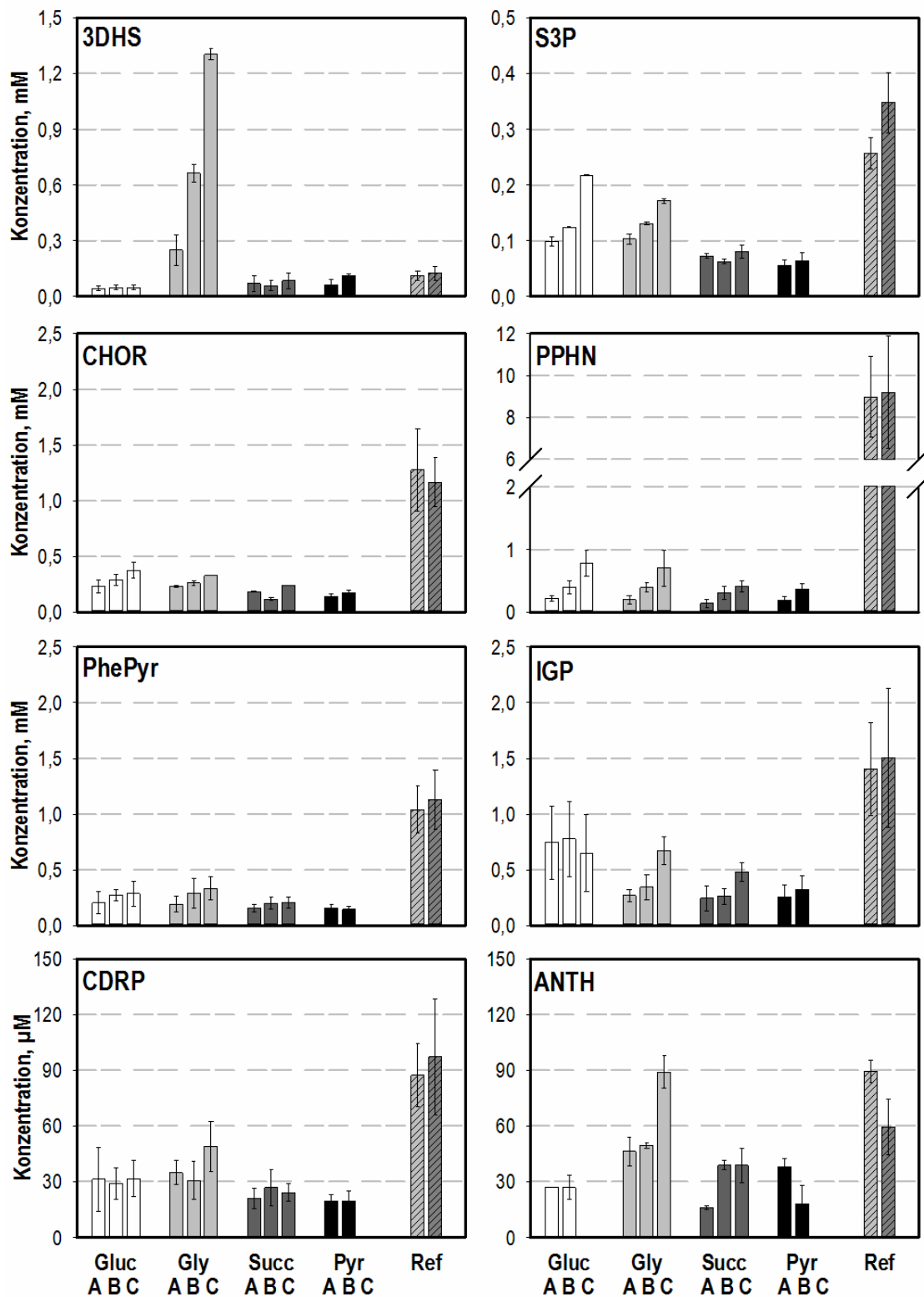


Abbildung 5.41: Intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges 3-Dehydroshikimat (3DHS), Shikimat-3-Phosphat (S3P), Chorimat (CHOR), Prephenat (PPHN), Phenylpyruvat (PhePyr), Anthranilat (ANTH), Carboxyphenylamino-Desoxyribulose-5-Phosphat (2CDR5P) und Indol-3-Glycerinphosphat (3IG3P) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren (Zulaufstufen A, B und C) mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc □), Glycerin (Gly ▣), Succinat (Succ ▤) und Pyruvat (Pyr ■). Außerdem dargestellt (schraffiert) sind die intrazellulären Konzentrationen der Proben aus dem Referenzprozess (Ref) während der Analyse.

3IG3P, der vorletzte Metabolit vor L-Tryptophan, lag ebenfalls im Referenzprozess mit den höchsten Konzentrationen vor, wobei hier sehr große Messunsicherheiten auftraten. Auch hier wurden ausgehend von Glucose und Glycerin höhere Konzentrationen in den Analysenreaktoren erreicht als mit Succinat und Pyruvat. Außerdem ergaben sich Konzentrationserhöhungen für 3IG3P mit steigender Zufuhr von Glycerin und Succinat.

Diskussion

Insgesamt wurde bei der Betrachtung der Metabolomdaten aus der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren die Plausibilität der Daten anhand der Konzentrationen allgemeiner Cofaktoren wie ATP, NAD und FAD gezeigt. Viele weitere der analytisch erfassbaren Metabolite lagen mit deutlich unterschiedlichen Konzentrationen in den verschiedenen Proben der metabolischen Analyse vor. Die variierenden extrazellulären Bedingungen während der Kurzzeitanalyse führten somit erfolgreich zu einer deutlichen Auslenkung des metabolischen Fließgleichgewichtes der Zellen in verschiedene Richtungen. Dabei zeigten sich sehr große Unterschiede in den intrazellulären Konzentrationen vor allem bei Metaboliten, die in der Nähe einer der Kohlenstoffquellen auftreten. Beispiele hierfür sind Gly3P bei Verwendung von Glycerin und FUM bei Succinat als Kohlenstoffquelle. Innerhalb des Zentralstoffwechsels traten auch bei weiteren Metaboliten große Auslenkungen auf, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Substrataufnahme stehen, beispielsweise AcCoA bei Glycerin und DHAP bei Pyruvat. Weniger ausgeprägt erschien hingegen die Auslenkung des Stoffwechsels innerhalb der Aromatenbiosynthese, mit Ausnahme des Metaboliten 3DHS aus dem allgemeinen Teil, dessen Konzentration mit zunehmender Glycerin-Zufuhr stark stieg. Diese reduzierten Effekte der Auslenkungen sind mit der größeren Distanz zu den aufgenommenen Substraten im Stoffwechsel zu begründen. Auffallend war für die Metabolite der Aromatenbiosynthese eine häufig auftretende höhere Konzentration im Referenzprozess als in allen Analysenreaktoren. Abgesehen davon konnten meistens nur geringe Konzentrationsunterschiede bei den verschiedenen Bedingungen für die Metabolite bestimmt werden.

Zusammenfassend zeigte sich die erfolgreiche Durchführung der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit den Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat während der L-Tryptophan-Produktion mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112 $aroFBL_{kan}$ an einer Vielzahl ermittelter Daten. Das Ziel der Analyse war die Etablierung und Charakterisierung von zwölf verschiedenen metabolischen Zuständen im Rahmen der 19minütigen metabolischen Analyse. Die Fließgleichgewichte zur Beschreibung dieser Zustände konnten anhand konstanter Atmungsraten identifiziert werden, die sich analog der vorgegebenen Zulaufprofile in den Abgasdaten abzeichneten. Zusätzlich wurden für jeden der Zustände unterschiedliche extrazelluläre Raten der Substrataufnahme sowie der Bildung von Produkt und Nebenprodukten ermittelt. Diese ermöglichten die Abschätzung

intrazellulärer Stoffflussverteilungen, die die Unterschiede der verschiedenen Gleichgewichtszustände verdeutlichten. Weiterhin zeigten vielfältige intrazelluläre Metabolitkonzentration ebenfalls die stark variierenden Auslenkungen des Stoffwechsels durch die Störbedingungen während der Analyse. Ergänzend zu diesen Größen, die die erfolgreich im Rahmen der Analyse ausgebildeten verschiedenen Fließgleichgewichte beschreiben, wurde durch vergleichende Proteomanalysen ein kaum verändertes Proteom über die Analysendauer bestätigt. Dies stellt die Vergleichbarkeit der Daten aus Analyse und Referenzzustand sicher. In Kombination mit den erzielten Auslenkungen von Metabolom und Fluxom sind somit alle Anforderungen an die metabolische Analyse erfüllt. Das bedeutet, dass die im vorliegenden Kapitel gezeigten Daten der Analyse im Zulaufbetrieb als Grundlage einer tiefgehenden Betrachtung der L-Tryptophan Produktion geeignet sind. Dies ist in den weiteren Abschnitten dieser Arbeit ausgeführt.

5.6 Thermodynamische Betrachtung des Stoffwechsel-Netzwerkes

Das zweite Gesetz der Thermodynamik besagt, dass für eine ablaufende Reaktion die Änderung der freien Gibbs'schen Reaktionsenergie kleiner null sein muss. Dies gilt aufgrund der Allgemeingültigkeit des Gesetzes auch für alle metabolischen Abläufe in Zellen. In die Berechnung der Reaktionsenergien gehen neben konstanten Werten, wie den Gibbs'schen Bildungsenergien der beteiligten Metabolite und der Reaktionsstöchiometrie, auch mehrere Variablen ein. Neben der Temperatur und dem intrazellulären pH sind hierbei vor allem die Konzentrationen der beteiligten Stoffe wichtige Einflussfaktoren. Die thermodynamische Betrachtung eines Stoffwechsel-Netzwerkes ermöglicht die Berücksichtigung dieser physikalischen Grundregeln bei der Analyse des Netzwerkes und bietet zusätzliche Informationen über den vorliegenden metabolischen Zustand. Aufgrund der Komplexität der thermodynamischen Fragestellungen in metabolischen Netzwerken erfolgt die Analyse mithilfe der MATLAB-basierten Toolbox anNET. Für die Berechnung vorgegeben werden das Stoffwechselnetzwerk, das betrachtet werden soll, und die Bildungsenergien aller beteiligten Reaktionspartner. Diese können experimentell ermittelt oder theoretisch abgeschätzt werden. Mittlerweile ist eine Vielzahl dieser Daten über die Datenbank „eQuilibrator“ verfügbar (siehe Kapitel 3.6 und 4.6). Zusätzlich ist für die Analyse mittels anNET die Vorgabe von einzelnen gemessenen Metabolit-Konzentrationen, von Gesamtkonzentrationen analytisch nicht unterscheidbarer Metabolite und von Verhältnissen einzelner Metabolite zueinander möglich. Eine weitere entscheidende Nutzervorgabe ist die Richtung, in die jede der beteiligten Reaktionen abläuft. In dieser Arbeit wurden dazu die mittels *gFBA* und *FVA* ermittelten Reaktionsrichtungen herangezogen.

Bei der eigentlichen anNET-Analyse wird zunächst die Lösbarkeit des Modells unter den gegebenen Bedingungen geprüft. Das Ergebnis der anschließenden Analyse umfasst die thermodynamisch möglichen Konzentrationsbereiche aller beteiligten Metabolite und die Lösungsbereiche der Gibbs'schen Reaktionsenergien aller betrachteten Reaktionen.

5.6.1 Abschätzung intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen

Die Überprüfung der Lösbarkeit des vorgegebenen Modells und die Berechnung thermodynamisch möglicher Metabolit-Konzentrationen ermöglichen auf zwei Wegen eine genauere weiterführende Beschreibung des betrachteten Stoffwechsel-Netzwerkes. So ergibt sich sowohl eine Plausibilitätsprüfung gemessener Konzentrationen als auch eine Ergänzung des Datensatzes um Konzentrationen von Metaboliten, deren analytische Erfassung nicht möglich ist.

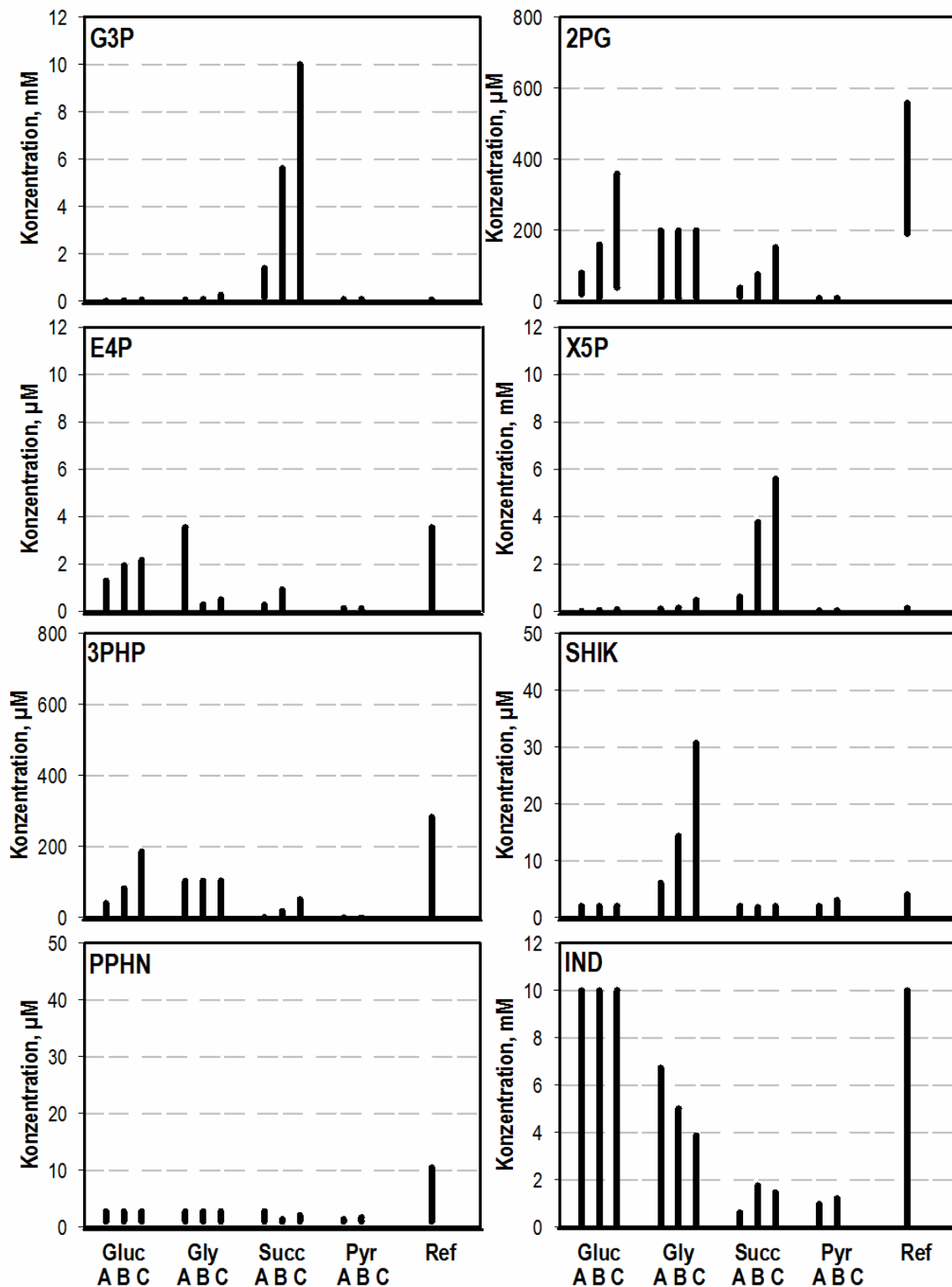


Abbildung 5.42: Thermodynamische Abschätzung möglicher Konzentrationsbereiche der Metabolite Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P), 2-Phosphoglycerat (2PG), Erythrose-4-Phosphat (E4P), Xylulose-5-Phosphat (X5P), 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP), Shikimat (SHIK), Prephenat (PPHN) und Indol (IND) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren mit den Kohlenstoffquellen Glucose (Gluc), Glycerin (Gly), Succinat (Succ) und Pyruvat (Pyr) mit drei Zulaufstufen A, B und C sowie im Referenzprozess. Die Abschätzung erfolgte ausgehend von Stoffdaten, Reaktionsrichtungen und gemessenen Konzentrationen mit der anNET Toolbox.

Die in Abbildung 5.42 dargestellten Metabolite umfassen Beispiele für beide Fälle. Eine Eingrenzung der Konzentrationsbereiche war nicht für alle analytisch nicht erfassten Metabolite möglich, Beispiele hierfür sind die Metabolite Succinat und 3PSME (Daten nicht gezeigt). Für diese Metabolite konnte keine Einschränkung des Ausgangsbereiches (0,001–10 mM) erzielt werden.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) ist ein Metabolit aus der Glykolyse, dessen schwierige analytische Erfassung in der Literatur beschrieben ist (Büscher *et al.*, 2010). Da in keiner Probe ein entsprechendes Messsignal erfasst wurde, war eine Angabe von Konzentrationen nur anhand der thermodynamischen Abschätzung möglich. Diese ergab für die Kohlenstoffquelle Succinat einen deutlich erweiterten Lösungsraum im Vergleich zu den anderen Substraten, für die nur ein kleiner möglicher Konzentrationsbereich ermittelt wurde (siehe Abbildung 5.42). Der dargestellte Metabolit 2-Phosphoglycerat (2PG) ist ebenfalls ein Glykolyse-Metabolit und ein Beispiel für die Aufteilung gemessener Metabolit-Pools durch die thermodynamische Analyse, da analytisch keine Unterscheidung von 2PG und dem Folgemetaboliten 3PG möglich ist.

Erythrose-4-Phosphat (E4P) aus dem Pentose-Phosphat-Weg ist ein Eingangsmetabolit der Aromatenbiosynthese und ein weiteres Beispiel eines analytisch kaum erfassbaren Stoffes. Gründe hierfür sind sehr niedrige intrazelluläre Konzentrationen aufgrund von Dimerisierung und Instabilität (Williams *et al.*, 1980; Oldiges *et al.*, 2004). Die thermodynamische Betrachtung ermöglichte die Eingrenzung der Konzentrationen auf sehr enge Bereiche niedriger Konzentrationen (0,1–3,6 μM) in allen Gleichgewichtszuständen (siehe Abbildung 5.42). Auch im Fall des Pentose-Phosphat-Weg-Metaboliten Xylulose-5-Phosphat war eine analytische Erfassung nicht möglich. In den meisten Proben ist eine Erklärung hierfür durch nur niedrige thermodynamisch mögliche Konzentrationen gegeben; für die Kohlenstoffquelle Succinat ergaben sich hingegen größere theoretische Lösungsbereiche der Konzentration bis zu 6 mM (siehe Abbildung 5.42).

3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP) ist der erste Schritt von 3PG in Richtung L-Serin und aufgrund fehlender Standard-Substanzen nicht analytisch erfassbar. Die Thermodynamik erlaubte hier eine deutliche Eingrenzung des Konzentrationsbereiches (siehe Abbildung 5.42). Shikimat (SHIK) ist ein weiteres Beispiel eines Metaboliten, dessen Quantifizierung trotz verfügbarer Standards nicht gelang und bei dem dies durch geringe thermodynamisch mögliche Konzentrationsbereiche von zumeist weniger als 5 μM erklärt werden konnte. Eine Ausnahme bildeten erneut die Gleichgewichtszustände mit Succinat als Kohlenstoffquelle. Hierbei waren größere Konzentrationen bis 30 μM möglich (siehe Abbildung 5.42).

Bei Indol (IND) liegen zwei Hürden für eine analytische Quantifizierung vor. Neben einer schwierigen Ionisierung, die bereits die massenspektrometrische Erfassung der Standardsubstanz verhindert, ist eine nur geringe thermodynamische Wahrscheinlichkeit für Indol als freier Metabolit innerhalb einer

Zelle ein weiteres Hindernis. Der Grund hierfür ist das Ablaufen der beiden Reaktionen mit Beteiligung von Indol (trps3 und trps2) innerhalb eines Enzymkomplexes ohne Freisetzung des Intermediates Indol (Yanofsky, 2003). Eine thermodynamische Einschränkung des Konzentrationsbereiches von Indol war möglich, mit Ausnahme des Analysenreaktors mit Glucose und des Referenzprozesse (siehe Abbildung 5.42).

Ein anderer Aspekt kommt im Fall von Prephenat (PPHN) zum Tragen. Dieser Metabolit wurde im Gegensatz zu den anderen hier genannten analytisch erfasst, und es wurden vor allem im Referenzprozess hohe intrazelluläre Konzentrationen ermittelt (siehe Kapitel 5.5.4 und Abbildung 5.41). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der thermodynamischen Analyse, die nur geringe Konzentrationen von maximal 10 μM als thermodynamisch möglich ausgab. Die Ursache für diese Diskrepanz konnte nicht abschließend ermittelt werden, es wird jedoch eine Schwierigkeit bei der Bilanzierung von intra- und extrazellulären Konzentrationen bei der analytischen Bestimmung des Metaboliten vermutet. Diese kann durch hohe extrazelluläre Konzentrationen und die unterschiedliche Behandlung der Proben für intra- und extrazelluläre Metabolitquantifizierung entstehen, die möglicherweise die Stabilität des Metaboliten beeinflusste. Für alle weiteren Berechnungen wurden im Folgenden die über die thermodynamische Analyse ermittelten Konzentrationen von PPHN angesetzt.

Eine deutliche Abweichung zwischen gemessenen und thermodynamisch abgeschätzten Konzentrationen trat zunächst auch für die Metabolite Ribose-5-Phosphat (R5P) und Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) bei allen Kohlenstoffquellen mit Ausnahme von Glucose auf. Die thermodynamisch möglichen Konzentrationen lagen, ähnlich zu Prephenat, deutlich unterhalb der analytisch quantifizierten. Die Ursache hierfür wurde in der Reaktionsrichtung der tkt1 gefunden, die bei Glycerin als Kohlenstoffquelle zunächst in Richtung der Bildung von R5P berechnet wurde, und der damit zusammenhängenden Inaktivität des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges. Eine Festlegung der tkt1 in Richtung des Verbrauchs von R5P für alle Stoffflussberechnungen führte zur thermodynamischen Lösbarkeit der gemessenen R5P- und Ru5P-Konzentrationen. Eine weitere Folge dieser Vorgabe waren aktive Stoffflüsse im oxidativen Teil des Pentose-Phosphat-Weges. Ein Vergleich der jeweils thermodynamisch möglichen Konzentrationsbereiche und der zugrunde liegenden Stoffflussrichtungen und Enzymaktivitäten ist in Abbildung 5.43 dargestellt. Die Aktivität des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges, die sich bei Vorgabe der tkt1 als R5P-verbrauchende Reaktion ergibt, ist auch aufgrund der nachgewiesenen Metabolite G6P und 6PG von hoher Plausibilität (siehe Abbildung 5.37 und Abbildung 5.40 in Kapitel 5.5.4). Alle in Kapitel 5.4.3 und 5.5.3 dargestellten Stoffflussverteilungen wurden unter der hier beschriebenen Annahme der Reaktionsrichtung der tkt1 abgeschätzt.

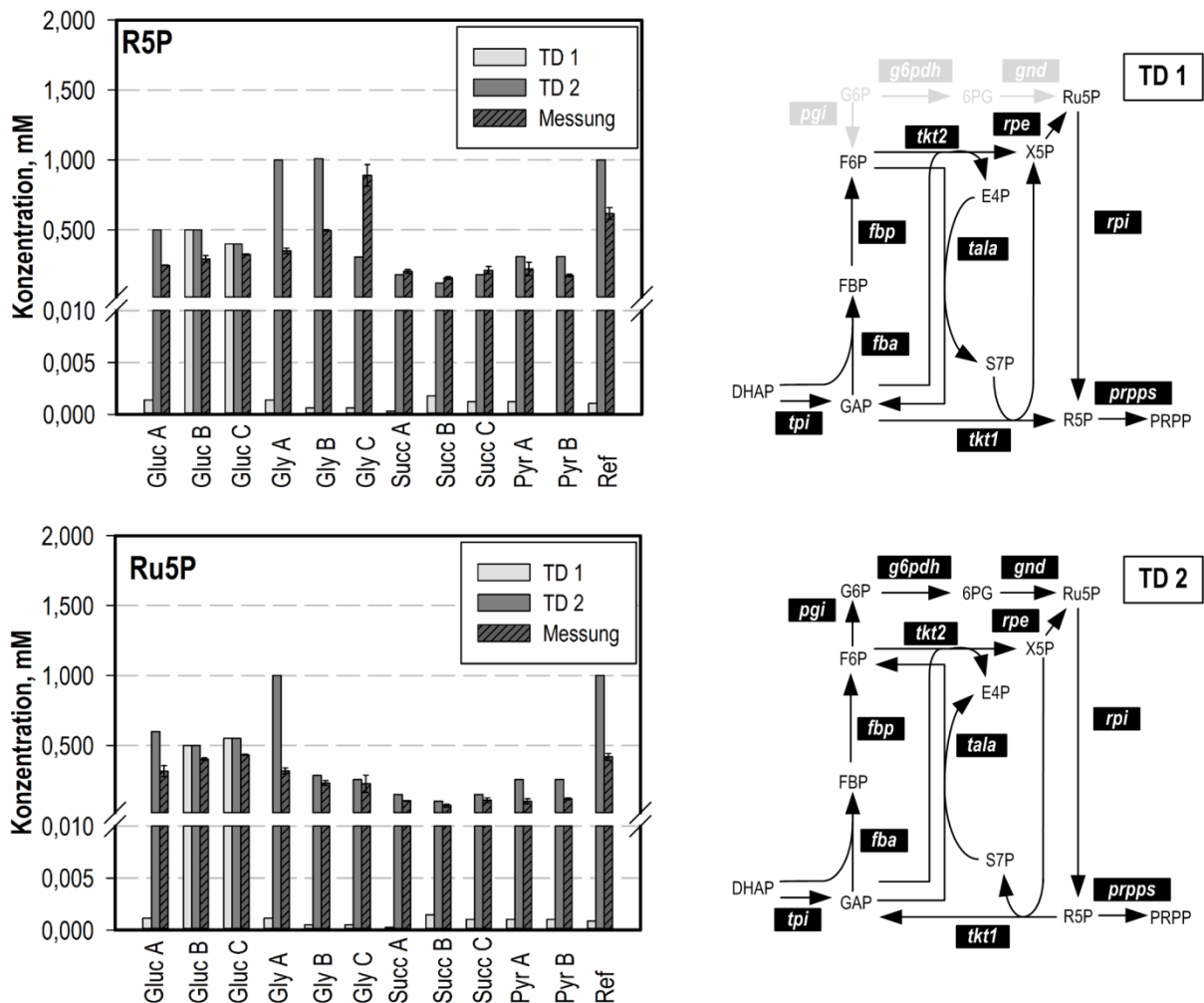


Abbildung 5.43: Vergleich zwischen den mittels thermodynamischer Analyse als möglich ermittelten Konzentrationsbereiche von R5P und Ru5P bei unterschiedlichen Flussrichtungen der Reaktion *tkt1* im Pentose-Phosphat-Weg und den experimentell ermittelten Konzentrationen dieser Metabolite. TD 1 □: thermodynamisch maximal mögliche Konzentration mit *tkt1* in Richtung Bildung von R5P. TD 2 ■: thermodynamisch maximal mögliche Konzentration mit *tkt1* in Richtung Verbrauch von R5P. Rechts sind die jeweiligen Flussrichtungen unter den beiden Bedingungen im Pentose-Phosphat-Weg gezeigt, graue Pfeile markieren inaktive Reaktionen.

5.6.2 Abschätzung von Reaktionsenergien und Klassifizierung von Reaktionen

Das zweite Ergebnis der thermodynamischen Analyse ist eine Angabe für die möglichen Bereiche der Gibbs'schen Reaktionsenergien für alle Reaktionen im betrachteten Reaktionsnetzwerk. Für die hier betrachtete Biosynthese von L-Tryptophan, ausgehend von Glycerin, sind die erzielten Ergebnisse in Abbildung 5.44 dargestellt. Diese beruhen auf den Ergebnissen im Referenzprozess.

Die erzielte Lösbarkeit des gesamten Systems setzt voraus, dass für alle Reaktionen eine Reaktionsenergie von kleiner null oder nahezu null ermittelt wird. Dies ist anhand Abbildung 5.44 erkennbar. Weiterhin erlaubt die Reaktionsenergie eine Klassifizierung der Reaktionen bezüglich ihrer Nähe zum thermodynamischen Gleichgewicht. Üblicherweise wird hierfür eine Grenze bei

-10 kJ mol⁻¹ (Zamboni *et al.*, 2008) oder -6 kJ mol⁻¹ (Canelas *et al.*, 2011) gesetzt, und Reaktionen mit Reaktionsenergien zwischen -10/-6 und 0 kJ mol⁻¹ werden als am thermodynamischen Gleichgewicht ablaufend definiert. Wie in Abbildung 5.44 ersichtlich ist, wurde für die Reaktionen des Glycerin-Metabolismus sowie im oberen Bereich der Gluconeogenese (fbp) diese Grenze überschritten, und die Reaktionen wurden somit als fern des Gleichgewichtes betrachtet. Dies geschah analog zu den Ergebnissen von Weiner *et al.* (2017). Am thermodynamischen Gleichgewicht fanden hingegen die meisten Reaktionen der Glykolyse statt, mit Ausnahme der pyk und der Verknüpfung zum Citratzyklus über die pdh. Dies stimmt mit früheren Berechnungen von Weiner *et al.* (2017) und Link (2009) überein. Die hier ermittelte Nähe der fba zum thermodynamischen Gleichgewicht konnte von Weiner *et al.* (2017) nicht bestimmt werden.

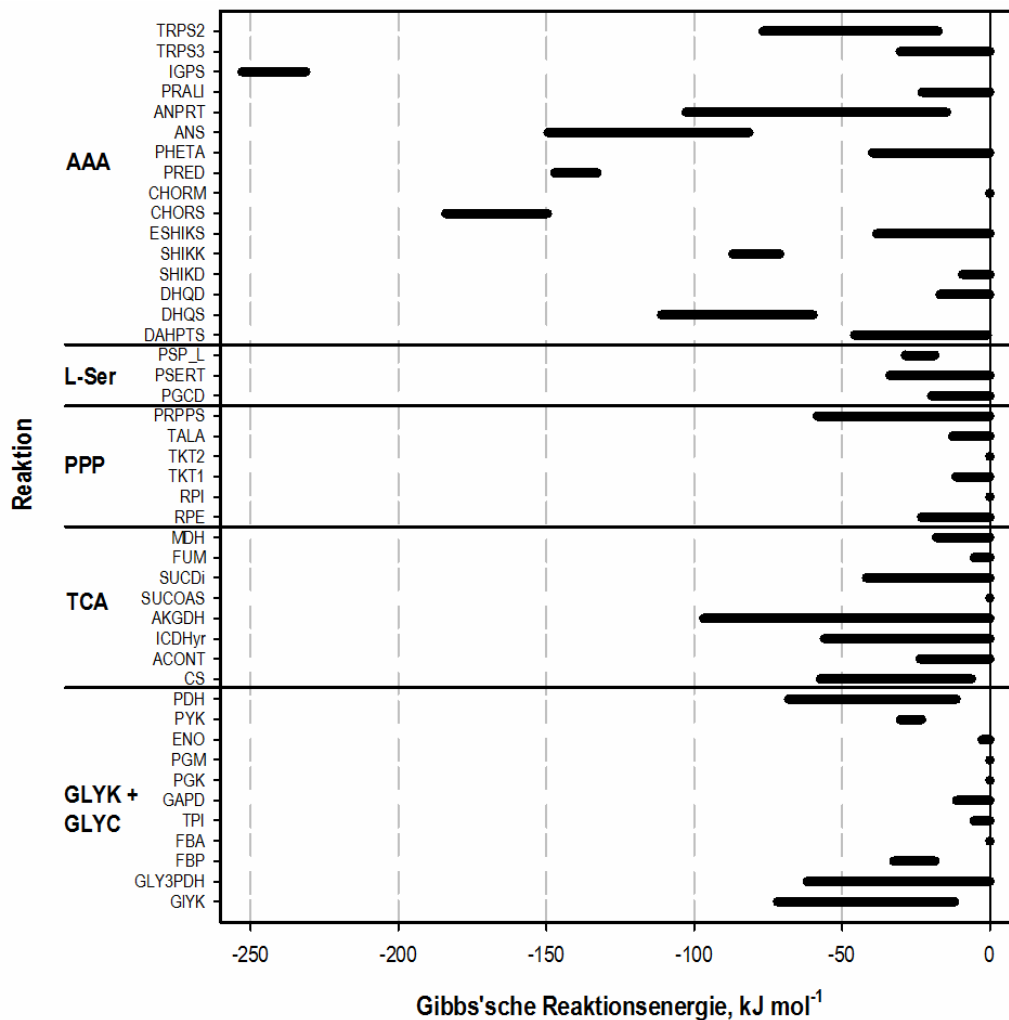


Abbildung 5.44: Mittels anNET Analyse abgeschätzte Bereiche der möglichen Gibbs'schen Reaktionsenergien für die L-Tryptophan-Produktion im Referenzprozess. Berücksichtigt sind Reaktionen der Aromatenbiosynthese (AAA), der L-Serin-Biosynthese (L-Ser), des Pentose-Phosphat-Weges (PPP), des Citratzyklus (TCA) und der Glykolyse sowie des Glycerin-Metabolismus (GLYK+GLYC). Reaktionsnamen sind angegeben entsprechend der Stoffflussabschätzungen im Modell *iAF1260*.

Innerhalb des Citratzyklus konnten die Reaktionen der *sucoas* und der *fum* der Nähe zum thermodynamischen Gleichgewicht zugeordnet werden. Während die Reaktionsenergien der *mdh* keine eindeutige Klassifizierung dieser Reaktion erlaubten, wurden für alle anderen Reaktionen des Citratzyklus Reaktionsenergien fern des thermodynamischen Gleichgewichts berechnet. Mit Ausnahme der *cs* näherten sich die Lösungsbereiche jedoch auch stets dem Wert null an. Auch hier fanden sich gute Übereinstimmungen mit früheren Berechnungen (Link, 2009; Weiner *et al.*, 2017).

Bezüglich des Pentose-Phosphat-Weges wurden für alle Reaktionen Reaktionsenergien beschrieben, die die eindeutige Zuordnung nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht erlaubten. Dies wurde auch mehrfach anhand theoretischer und datenbasierter Betrachtungen von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Kümmel *et al.*, 2006; Canelas *et al.*, 2011; Chassagnole *et al.*, 2011). Werte von nahezu null wurden im vorliegenden Fall für die Reaktionsenergien der *rpi* und *tkt2* ermittelt. Für die Reaktion der *prpps*, die nicht zum klassischen Pentose-Phosphat-Weg gehört, ergab sich ein größerer Bereich der Reaktionsenergie und somit die Klassifizierung fern des Gleichgewichtes. Dasselbe galt für alle Reaktionen des L-Serin-Biosyntheseweges ausgehend von 3PG.

Innerhalb des Biosyntheseweges der aromatischen Aminosäuren fand sich ein großer Variantenreichtum verschiedener Bereiche möglicher Reaktionsenergien. Eine eindeutige Zuordnung nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht war möglich für die Reaktionen der *shkd* und *chorm*. Breite Bereiche der Reaktionsenergien, ausgehend von Werten nahe null, wurden abgedeckt von den Reaktionen *dahpts*, *eshiks* und *pheta*. Für den Stoffwechselweg spezifisch für L-Tryptophan galt dies für die Reaktionen *prali* und *trps3*. Außerdem wurden für eine Reihe von Reaktionen ausschließlich Reaktionsenergien im stark negativen Bereich ermittelt. Für diese Art von Reaktionen ist eine aktive Regulation als wahrscheinlich beschrieben (Henry *et al.*, 2007). Beispiele hierfür waren *shkk*, *pred* und *ans*. Die am stärksten negativen Werte der Gibbs'schen Reaktionsenergien lagen für die Reaktionen *chors* aus dem allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese und *igps* aus der L-Tryptophan-Biosynthese vor. Hierbei ergaben sich für die thermodynamische Einordnung der Reaktionen *chors* und *chorm* Unterschiede zur Betrachtung der L-Phenylalanin-Synthese von Weiner *et al.* (2017). Während die Reaktionsenergien der *chors* stärker ins Negative rückten, operierte die *chorm* nun am thermodynamischen Gleichgewicht. Erklärungen hierfür sind der zusätzliche Verzweigungspunkt im Stoffwechsel bei Chorismat sowie die erhöhten Konzentrationen der Metabolite und die somit stärkere Triebkraft des Kohlenstoffflusses in Richtung L-Tryptophan.

Diskussion

Insgesamt konnten alle Anforderungen an die thermodynamische Analyse des Reaktionsnetzwerkes erfüllt werden: die Ergänzung von Informationen über intrazelluläre Metabolitkonzentrationen und die thermodynamische Klassifizierung der Reaktionen. Die somit theoretisch ermittelten Konzentrationsbereiche intrazellulärer Metabolite ergänzten die experimentellen Werte um analytisch nicht-erfassbare Metabolite. Außerdem konnten einzelne gemessene Konzentrationen korrigiert werden und innerhalb des Pentose-Phosphat-Weges wurde eine scheinbare Inkonsistenz zwischen Konzentrationen und Flussrichtungen berichtigt. Dazu war die Änderung der Reaktionsrichtung der tkt1 nötig. Weiterhin erschien das betrachtete stöchiometrische Modell unter allen zuvor ermittelten Vorgaben thermodynamisch lösbar. Gleichzeitig war die Klassifizierung aller Reaktionen bezüglich ihrer Nähe zum thermodynamischen Gleichgewicht möglich. Diese Arbeiten lieferten somit eine essentielle Grundlage für die Durchführung einer metabolischen Kontrollanalyse.

5.7 Metabolische Kontrollanalyse der L-Tryptophan-Produktion

Die während der metabolischen Analyse erhobenen Daten über Metabolitkonzentrationen, Stoffflüsse und Thermodynamik des Reaktionsnetzwerks ermöglichen die Durchführung einer metabolischen Kontrollanalyse. Diese mathematische Methode erlaubt die Identifizierung von limitierenden Schritten im Stoffwechselnetzwerk und kann somit Hinweise auf weitere gerichtete genetische Modifizierungen geben, die eine verbesserte Produktbildung ermöglichen (siehe Kapitel 3.7).

Für eine metabolische Kontrollanalyse werden die Daten über ausgelenkte Konzentrationen und Stoffflüsse auf den Referenzzustand normiert, da der Ansatz von einer Linearisierung um einen Referenzzustand ausgeht (siehe Kapitel 3.7). Dieser Referenzzustand ist im vorliegenden Fall der L-Tryptophan-Produktionsprozess im 15 L-Maßstab, der durch die verschiedenen Bedingungen der parallel stattfindenden metabolischen Analyse ausgelenkt wird. Die Normierung hat zur Folge, dass nur Reaktionen und Stoffflüsse berücksichtigt werden können, die im Referenzzustand aktiv beziehungsweise ungleich null sind. Dies schließt im Vergleich zu den oben beschriebenen Ergebnissen der theoretischen Stoffflussabschätzungen alle Nebenproduktbildungen und die Reaktionen der gemischten Säuregärung von der weiteren Betrachtung aus. Weitere ausgeschlossene Reaktionen sind die PEP-verbrauchende Reaktion *ppck* und die PEP-bildende Reaktion *ppc* sowie die Reaktionen des Glyoxylat-Bypasses. Wie in den Kapiteln zu Flussverteilungen und Metabolitkonzentrationen thematisiert wurde (siehe Kapitel 5.4.3, 5.5.3 und 5.5.5), erscheinen die Aktivität der *pgi* in der oberen Glykolyse beziehungsweise Gluconeogenese plausibel und damit auch die Enzymaktivitäten des oxidativen Teils des Pentose-Phosphat-Weges. Sie wurden daher für die Berechnung der Stoffflussverteilungen angenommen (siehe Abbildung 5.43). Da die Berücksichtigung dieser Reaktionen bei der metabolischen Kontrollanalyse nicht zu sinnvollen Ergebnissen der Flusskontrollkoeffizienten führte (Werte > 10 und < -10), konnte der oxidative Pentose-Phosphat-Weg in die noch folgenden Darstellungen nicht mit einbezogen werden. Somit entsprach die Darstellung des Zentralstoffwechsels dem von Weiner *et al.* (2017) beschriebenen stöchiometrischen Netzwerk. Weiterhin identisch mit der genannten Vorarbeit war die Betrachtung der Glycerin-Aufnahme durch Diffusion oder erleichterte Diffusion, die, anders als die aktive Aufnahme von Glucose in die Zellen, keine Kontrolle auf andere intrazelluläre Reaktionen ausübt und somit nicht im MCA-Modell berücksichtigt wurde. Außerdem wurde die vereinfachte Darstellung des Energie-Stoffwechsels anhand mehrerer Reaktionen, die die Umwandlung verschiedener Energie-Metabolite ineinander beschreiben, in Kombination mit einer ATP-verbrauchenden Reaktion aus früheren Arbeiten übernommen (Link, 2009; Weiner *et al.*, 2017).

Das sich ergebende Stoffwechsel-Netzwerk für die Berechnung der MCA ist in Tabelle 10.21 im Anhang aufgeführt. Die Stöchiometrie wurde aus dem für die Stoffflussberechnungen verwendeten genomweiten *E. coli* Modell *iAF1260* übernommen (Feist *et al.*, 2007). Das Modell umfasst 48

Reaktionen und 56 Metabolite, sodass die stöchiometrische Matrix N die Dimension (56×48) besitzt. Der Rang der Matrix ergibt sich zu 47, sodass die Metabolite in $m_i = 47$ unabhängige und $m_d = 9$ abhängige Metabolite unterteilt werden mussten. Als abhängige Metabolite wurden die Cofaktoren CoA, ADP, AMP, NADH, NADPH und FADH₂ sowie die Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Glutamat und L-Glutamin gewählt. Die restlichen, als unabhängig definierten Metabolite ergaben die reduzierte stöchiometrische Matrix N_{ind} mit der Dimension (47×48), welche die Festlegung der normierten Link-Matrix L^x ermöglichte.

5.7.1 Abschätzung von Elastizitäten

Für die Berechnung der metabolischen Kontrollanalyse ist zunächst die Ermittlung von Elastizitäten ε_x^v der Reaktionen im betrachteten Netzwerk notwendig. Dabei handelt es sich um lokale Parameter, die jeweils die Sensitivität einer einzelnen Reaktion gegenüber einer Metabolitkonzentration beschreiben. Diese Darstellung der kinetischen Eigenschaften des metabolischen Netzwerks wird für die weiteren Berechnungen in der Matrix E zusammengefasst. Ein positiver Wert der Elastizität bedeutet einen aktivierenden Effekt des Metaboliten auf die Reaktion, ein negativer Wert weist entsprechend auf einen inhibierenden Effekt hin.

Der Weg zur Berechnung der Elastizitäten ist vom vorliegenden thermodynamischen Zustand der betrachteten Reaktion abhängig. Läuft die Reaktion nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht ab, kann die Elastizität laut Nielsen (1997) direkt aus der Gibbs'schen Reaktionsenergie berechnet werden. Dies traf in der vorliegenden Arbeit auf 20 Reaktionen zu, die in Tabelle 5.13 gemeinsam mit den jeweiligen Lösungsbereichen der Reaktionsenergien aufgeführt sind. Da Reaktionsenergien zwischen -1 und 0 kJ mol⁻¹ zu unrealistischen Elastizitäten führen, wurde wie von Link (2009) und Weiner *et al.* (2017) stets ein Maximalwert von -1,00 für $\Delta_r G$ angenommen. Sofern die NET-Analysen keine exakteren Werte lieferten, wurde der Minimalwert auf -10,00 kJ mol⁻¹ gesetzt (Zamboni *et al.*, 2008). Für Reaktionen mit sehr kleinem Lösungsbereich der Reaktionsenergie erfolgte eine Eingrenzung auf -3 bis -1 kJ mol⁻¹.

Tabelle 5.13: Lösungsbereiche der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien $\Delta_r G$ für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht. Die Reaktionen wurden durch NET-Analyse des L-Tryptophan-Produktionsprozesses während der metabolischen Analyse ausgewählt. Sofern keine genaueren Werte vorlagen, wurde der Bereich von -10 bis -1 kJ mol⁻¹ festgelegt beziehungsweise auf -3 bis -1 kJ mol⁻¹ im Falle sehr kleiner Lösungsbereiche.

Reaktion	$\Delta_r G_{\min}$, kJ mol ⁻¹	$\Delta_r G_{\max}$, kJ mol ⁻¹
fba	-3,00	-1,00
tpi	-5,32	-1,00
gapd	-10,00	-1,00
pgk	-3,00	-1,00
pgm	-3,00	-1,00
eno	-2,67	-1,00
acont	-10,00	-1,00
sucoas	-3,00	-1,00
fum	-5,32	-1,00
mdh	-10,00	-1,00
rpe	-10,00	-1,00
rpi	-3,00	-1,00
tkt1	-10,00	-1,00
tkt2	-3,00	-1,00
tala	-10,00	-1,00
dhqd	-10,00	-1,00
3dhsdh	-9,20	-1,00
chorm	-3,00	-1,00
prali	-10,00	-1,00
trps3	-10,00	-1,00

Für die restlichen 28 Reaktionen des MCA-Modells, die fern dem thermodynamischen Gleichgewicht ablaufen, erfolgte die Berechnung der Elastizitäten mit dem lin-log Ansatz (Wu *et al.*, 2004). Hierfür ist für jede Reaktion die Vorgabe der Effektoren notwendig, die die Reaktionsrate beeinflussen können.

Die intrazellulären Metabolitkonzentrationen, die theoretischen Flüsse und die abgeschätzten Reaktionsenergien, die den Berechnungen der Elastizitäten zugrunde liegen, sind aufgrund von experimentellen Fehlern, analytischen Varianzen und theoretischen Lösungsbereichen mit Unsicherheiten behaftet. Somit war die Bestimmung von eindeutigen Werten der Elastizitäten nicht möglich. Stattdessen wurden die genannten Unsicherheiten durch den Ansatz einer Monte-Carlo-Simulation mit 10.000 Berechnungszyklen für die weiteren Betrachtungen berücksichtigt. Dies bedeutet, dass insgesamt 10.000 Datensätze für alle Elastizitäten ausgehend von den gemessenen Metabolit-Konzentrationen sowie den abgeschätzten Lösungsbereichen für Stoffflüsse und Reaktionsenergien berechnet wurden. Für jede Berechnung wurden dabei Werte aus den vorgegebenen Bereichen stochastisch ausgewählt. Im Folgenden werden diese Daten für die Reaktionen fern des thermodynamischen Gleichgewichts diskutiert. Die Datensätze werden dabei als Box-Plots dargestellt.

Dies bedeutet, dass ein grauer Balken den Bereich von 50 % der Lösungen markiert und der innenliegende schwarze Strich den Median. Zusätzlich sind die 10 % und 90 % Quantile durch Fehlerbalken und die 5 % und 95 % Quantile durch schwarze Punkte markiert.

Glycerin-Metabolismus

Für die erste Reaktion des aeroben Glycerin-Stoffwechsels, die Reaktion der Glycerinkinase (glyk), wurde eine positive Elastizität mit sehr enger Verteilung für den Metaboliten Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) aus den vorliegenden Daten ermittelt (siehe Abbildung 5.45). Die in der Literatur (Thorner und Paulus, 1973) schon früh beschriebene *in vitro* Inhibierung der glyk durch FBP konnte also nicht bestätigt werden. Dies ist insbesondere interessant, da der Konzentrationsbereich der Untersuchung von Thorner und Paulus (1973) von 0,1–2,0 mM gut mit dem für FBP vorliegenden Konzentrationsbereich übereinstimmt. Eine positive Wirkung von FBP auf die glyk wird auch von Weiner *et al.* (2017) während einer metabolischen Analyse zum Zeitpunkt des Produktionsabbruchs in einem L-Phenylalanin-Produktionsprozess beschrieben. Dies geschieht allerdings ausgehend von deutlich geringeren FBP-Konzentrationen.

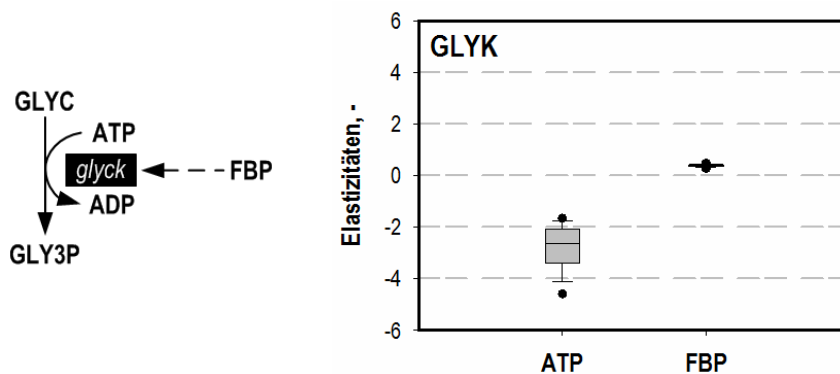


Abbildung 5.45: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Glycerinkinase (glyk) bezüglich der Effektoren ATP und Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Die dargestellte negative Elastizität von ATP für die glyk widerspricht hingegen sowohl der von Pettigrew *et al.* (1990) aufgezeigten Aktivierung der glyk durch ATP als auch den Ergebnissen von Weiner *et al.* (2017) zur L-Phenylalanin-Produktion.

Der zweite Schritt im Glycerin-Stoffwechsel wird von der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (gly3pdh) katalysiert. Hierfür sind eine Reihe inhibierender Substanzen von Schryvers *et al.* (1978) beschrieben: Das Reaktionsprodukt Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und die Struktur-Analogs Glyceraldehyd-3-Phosphat (GAP), 2/3-Phosphoglycerat (2/3PG) und Phosphoenolpyruvat (PEP). Anhand des vorliegenden Datensatzes konnte eine eindeutig inhibierende Wirkung für keinen der genannten Stoffe ermittelt werden (siehe Abbildung 5.46). Für GAP und DHAP lagen die ermittelten

Elastizitäten überwiegend im Positiven und deckten einen großen Wertebereich ab. Von Weiner *et al.* (2017) kann die früher beschriebene Inhibierung durch DHAP bestätigt werden, für die weiteren Metabolite liegt ebenfalls keine oder keine eindeutige Übereinstimmung vor.

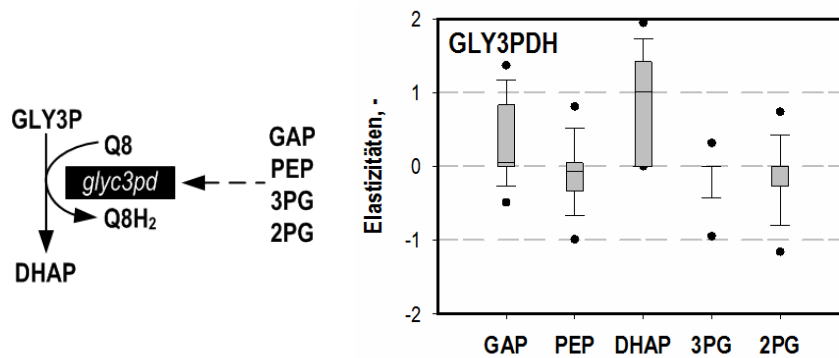


Abbildung 5.46: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (gly3pdh) bezüglich der Effektoren Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), Phosphoenolpyruvat (PEP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und 2/3-Phosphoglycerat (2/3PG) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Glykolyse und Gluconeogenese

Die Fructose-1,6-Bisphosphatase (fbp) katalysiert die gluconeogenetische Reaktion zur Bildung von Fructose-6-Phosphat. Reznik *et al.* (2017) beschreiben Citrat (CIT) und Phosphoenolpyruvat (PEP) als aktivierende regulatorische Metabolite für dieses Enzym. Außerdem werden von den Autoren Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), ATP und AMP als inhibierende Effektoren genannt. Mit Ausnahme von FBP spiegeln die in dieser Arbeit ermittelten Elastizitäten die beschriebenen Effekte der Metabolite auf die Reaktion wider (siehe Abbildung 5.47). Für FBP lagen die am stärksten positiven Werte der Elastizitäten vor. Die Elastizitäten von ATP und AMP bezüglich fbp waren eindeutig negativ, deckten jedoch einen großen Wertebereich ab.

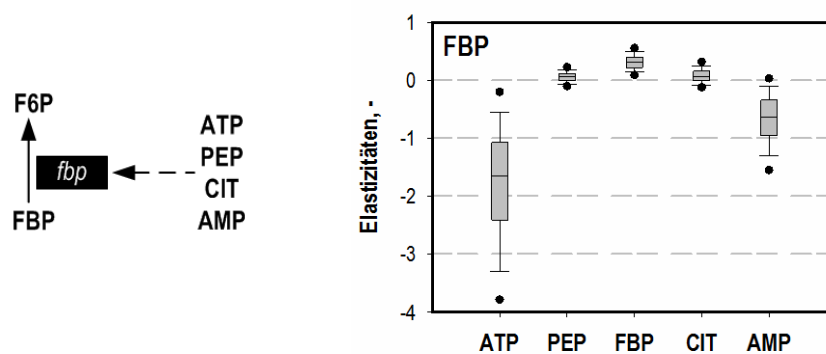


Abbildung 5.47: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Fructose-1,6-Bisphosphatase (fbp) bezüglich der Effektoren ATP, Phosphoenolpyruvat (PEP), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), Citrat (CIT) und AMP während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Die zentrale Reaktion der Pyruvatkinase (pyk) am Ende der Glykolyse hat eine wichtige Funktion als regulierendes Element der Glykolyse und interagiert aus diesem Grund mit einer Vielzahl unterschiedlicher Metabolite. Die ermittelten Elastizitäten einiger dieser Metabolite hinsichtlich der pyk sind in Abbildung 5.48 dargestellt. Von Reznik *et al.* (2017) ist eine Aktivierung des Enzyms durch Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) und Phosphoenolpyruvat (PEP) beschrieben. Beides wurde durch kleine, aber eindeutig positive Werte der Elastizität in den vorliegenden Daten bestätigt. Einen inhibierenden Effekt auf die pyk beschreiben Reznik *et al.* (2017) für SuccCoA und ATP. Auch diese Effekte wurden von den in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützt, wobei für ATP wieder ein großer negativer Wertebereich abgedeckt wurde. Cotten und Reed (2013) beschreiben neben der Inhibition durch ATP auch eine Aktivierung durch ADP. Eine eindeutige Aussage hierzu ließen die ermittelten Elastizitäten nicht zu. Auch bezüglich des Reaktionsproduktes PYR war keine Aussage über Aktivierung oder Inhibition möglich. Weiner *et al.* (2017) ermitteln für diesen Metaboliten wechselnde Auswirkungen auf die pyk-Aktivität im Laufe des L-Phenylalanin-Produktionsprozesses.

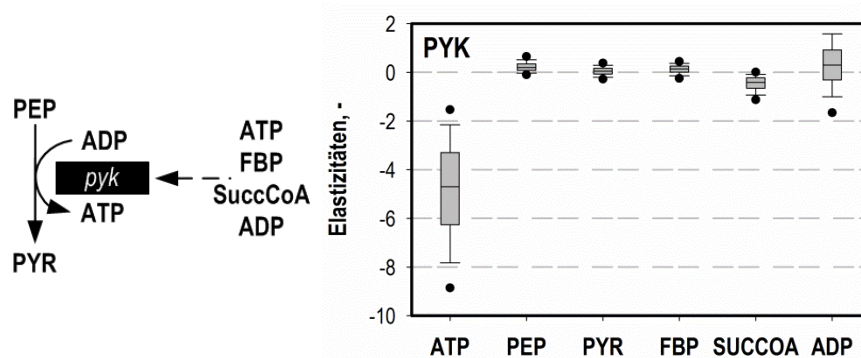


Abbildung 5.48: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Pyruvatkinase (pyk) bezüglich der Effektoren ATP, Phosphoenolpyruvat (PEP), Pyruvat (PYR), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), SuccinylCoA (SUCCOA) und ADP während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Pyruvat wird durch die Pyruvat-Dehydrogenase (pdh) zu AcetylCoA abgebaut. Die bezüglich dieses Enzyms ermittelten Elastizitäten sind in Abbildung 5.49 dargestellt. Die in der Literatur beschriebene aktivierende Wirkung des Eduktes Pyruvat (PYR) auf das Enzym (Chassagnole *et al.*, 2002; Link *et al.*, 2013; Weiner *et al.*, 2017) wurde durch die hier ermittelten Elastizitäten nicht bestätigt. Die vorliegende positive Elastizität von AcetylCoA (AcCoA) hinsichtlich der pdh entsprach dem von Weiner *et al.* (2017) zum Ende der L-Phenylalanin-Bildung ermittelten Effekt. Die von Sun *et al.* (2012) aufgeführte Inhibition der pdh durch den Metaboliten NADH wurde auch anhand des vorliegenden Datensatzes bestimmt.

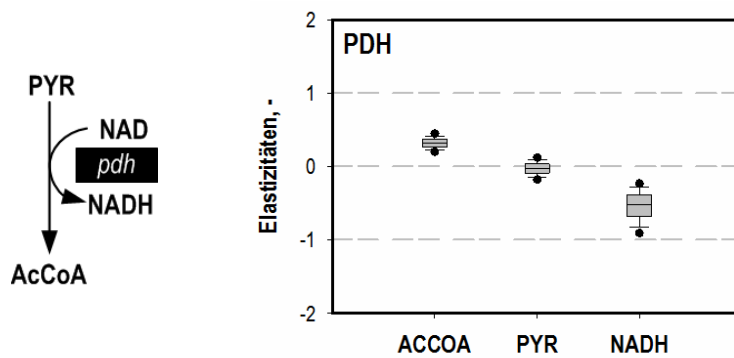


Abbildung 5.49: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Pyruvatdehydrogenase (pdh) bezüglich der Effektoren AcetylCoA (ACCOA), Pyruvat (PYR) und NADH während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Citratzyklus

Die Citratsynthase (cs) katalysiert mit der Umsetzung von Oxalacetat (OAA) und AcetylCoA (AcCoA) zu Citrat die erste Reaktion im Citratzyklus nach der Glykolyse. Für dieses Enzym wurde schon früh eine Regulation durch OAA und AcCoA beschrieben (Robinson *et al.*, 1983). Neue Arbeiten bestätigen diese Einflussfaktoren und ergänzen eine Aktivierung des Enzyms durch AcCoA sowie eine Inhibierung durch OAA (Reznik *et al.*, 2017). Weiterhin wird den Metaboliten NADH und AKG eine inhibierende Wirkung auf die cs zugeschrieben. Die in dieser Arbeit ermittelten Elastizitäten für die cs (siehe Abbildung 5.50) stimmten bezüglich AcCoA und AKG mit diesen Angaben überein, für OAA ergaben sich jedoch durchweg positive Elastizitäten. Dies steht auch im Widerspruch zu den von Weiner *et al.* (2017) ermittelten Werten während der L-Phenylalanin-Produktion. Hierbei ist zu beachten, dass OAA zu den nicht analytisch erfassten Metaboliten gehört und die Konzentrationen somit nur auf thermodynamischen Abschätzungen beruhen. Die Inhibierung der cs durch NADH wurde in dieser Arbeit, wie auch bereits von Link (2009) und Weiner *et al.* (2017), durch eine Monte-Carlo-Simulation der Elastizitäten im Wertebereich zwischen -0,1 und -1,0 berücksichtigt.

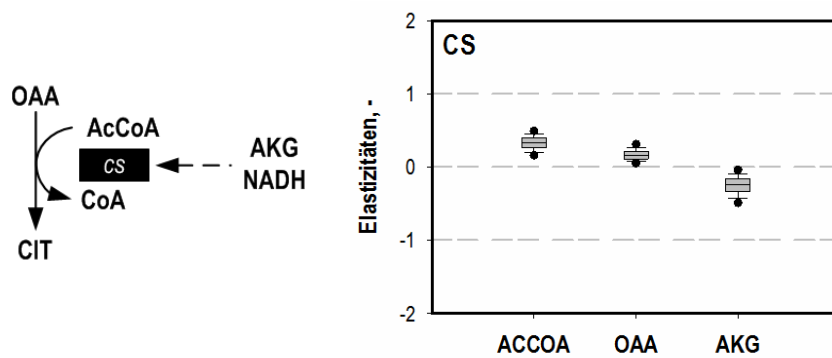


Abbildung 5.50: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Citratsynthese (cs) bezüglich der Effektoren AcetylCoA (ACCOA), Oxalacetat (OAA), α -Ketoglutarat (AKG) und NADH während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Für das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase (icdh) ist eine Vielzahl von Effektoren beschrieben: Phosphoenolpyruvat (PEP) und Oxalacetat (OAA) als Inhibitoren (Reznik *et al.*, 2017), sowie Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), Citrat (CIT) und L-Phenylalanin (L-Phe) als mit dem Enzym interagierende Metabolite ohne Angabe der genauen Auswirkung der Interaktion (Piazza *et al.*, 2018). Isocitrat (ICIT) als Effektor wurde von Link (2009) und Weiner *et al.* (2017) angenommen. ICIT, CIT und L-Phe gehörten zu den Metaboliten, deren genaue intrazelluläre Quantifizierung durch hohe extrazelluläre Konzentrationen in dieser Arbeit verhindert wurde. Da auch eine thermodynamische Eingrenzung der Konzentrationen nicht möglich war, führten die fehlenden Informationen über die entsprechenden intrazellulären Metabolitkonzentrationen zu den in Abbildung 5.51 dargestellten Elastizitäten bezüglich dieser Metabolite. Diese ließen keine Aussage über Aktivierung oder Inhibition zu. Während die in der Literatur angegebene Inhibition des Enzyms durch PEP in den vorliegenden Daten auftrat, traf dies für OAA nicht zu. Für FBP wurde eine leicht positive Elastizität bezüglich der icdh ermittelt.

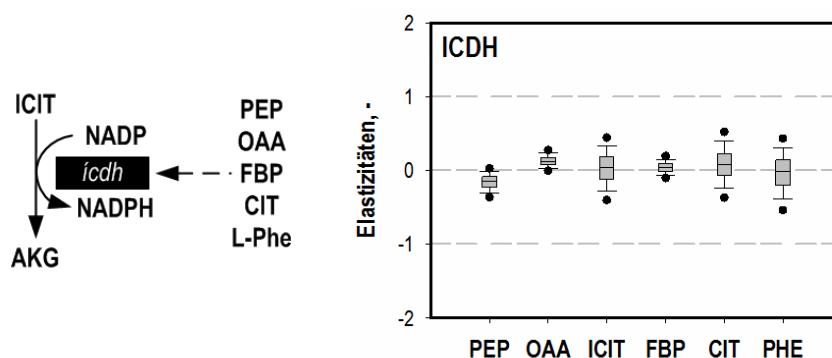


Abbildung 5.51: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Isocitratdehydrogenase (icdh) bezüglich der Effektoren Phosphoenolpyruvat (PEP), Oxalacetat (OAA), Isocitrat (ICIT), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), Citrat (CIT) und L-Phenylalanin (PHE) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Analog zu den Arbeiten von Link (2009) und Weiner *et al.* (2017) wurde für das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase eine Inhibition durch das Reaktionsprodukt OAA, die von Frank *et al.* (2007) beschrieben ist, durch Monte-Carlo-Simulation der Elastizitäten im Wertebereich zwischen -0,1 und -1,0 berücksichtigt. Eine entsprechende Herangehensweise wurde mit dem Wertebereich 0,1 bis 1,0 für den Metaboliten AKG gewählt, um eine aktivierende Wirkung zu beschreiben. Auch dies entspricht dem Vorgehen in den genannten früheren Arbeiten.

Für die Reaktion der Succinat-Dehydrogenase (*sucdh*) wurden entsprechend der Arbeiten von Link (2009) und Weiner *et al.* (2017) Succinat (SUCC) und FAD als Effektoren gewählt. Die hierzu ermittelten Elastizitäten sind in Abbildung 5.52 dargestellt. Während die Ergebnisse für SUCC nicht eindeutig für eine Aktivierung oder Inhibierung sprachen, decken die Elastizitäten zu FAD einen großen, überwiegend negativen Bereich ab. Link (2009) ermittelte hingegen positive Elastizitäten für FAD und leicht negative Werte für SUCC.

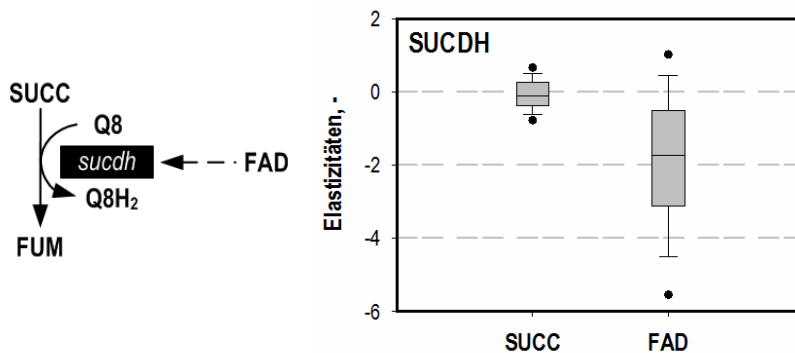


Abbildung 5.52: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Succinatdehydrogenase (*sucdh*) bezüglich der Effektoren Succinat (SUCC) und FAD während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

L-Serin-Biosynthese

Der erste Schritt der L-Serin-Biosynthese, ausgehend von der Glykolyse, wird durch das Enzym 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (pgcd) katalysiert. Für diese Reaktion ist eine Inhibierung durch das Substrat 3-Phosphoglycerat (3PG) und das Produkt 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP) beschrieben (Zhao und Winkler, 1996). Die vorliegenden Daten erlaubten für keinen der beiden Metabolite eine Aussage über eine starke regulatorische Wirkung, für 3PG war eine eher aktivierende Funktion zu vermuten.

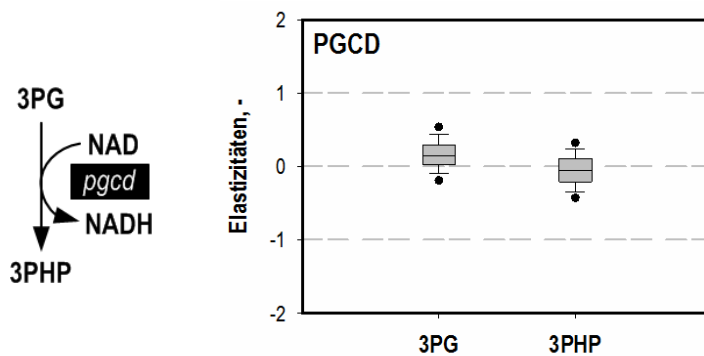


Abbildung 5.53: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (pgcd) bezüglich der Effektoren 3-Phosphoglycerat (3PG) und 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Für den zweiten Schritt der L-Serin-Biosynthese, der Umsetzung zu L-Phosphoserin (PSER_L) katalysiert durch die Phosphoserinaminotransferase (psert), ist eine Produktinhibierung beschrieben (Basurko *et al.*, 1999). Diese wurde durch die in dieser Arbeit ermittelten negativen Elastizitäten, die in Abbildung 5.54 dargestellt sind, bestätigt.

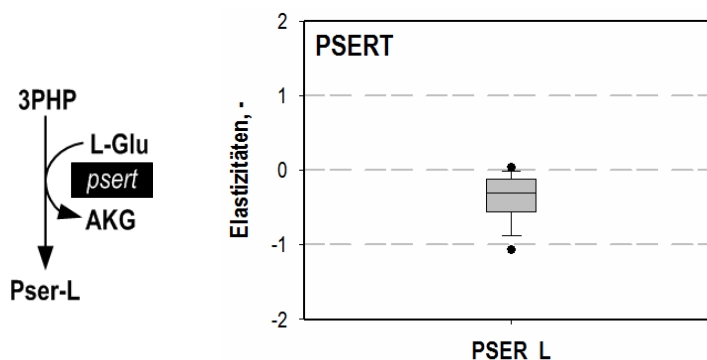


Abbildung 5.54: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Phosphoserinaminotransferase (psert) bezüglich des Effektors Phospho-L-Serin (PSER_L) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Biosynthese der aromatischen Aminosäuren

Die Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese ist die Umsetzung von Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP). Sie wird katalysiert durch drei Isoenzyme der 3-Deoxy-7-Phosphoheptulonat-Synthase (dahs), die durch die drei Endprodukte des Syntheseweges L-Tryptophan (L-Trp), L-Phenylalanin (L-Phe) und L-Tyrosin (L-Tyr) inhibiert werden (Sprenger, 2007). Da die genannten Aminosäuren aufgrund von Maskierung durch hohe extrazelluläre Konzentrationen intrazellulär nicht quantifiziert werden konnten und auch eine thermodynamische Eingrenzung nicht möglich war, konnte dieser Effekt in den ermittelten Elastizitäten nicht dargestellt werden. Dies ist beispielhaft für L-Trp in Abbildung 5.55 gezeigt.

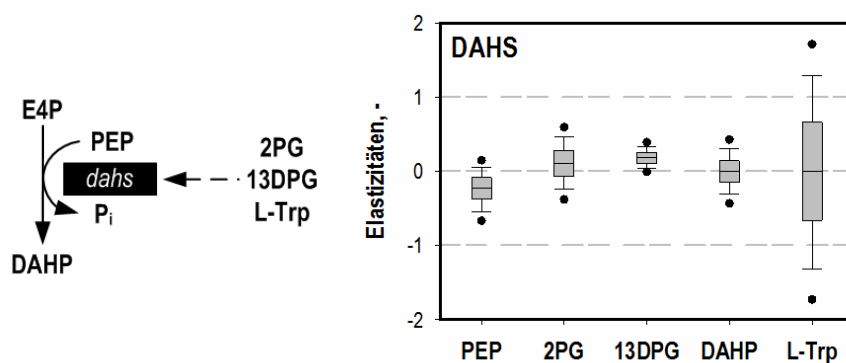


Abbildung 5.55: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion 3-Deoxy-7-Phosphoheptulonat-Synthase (dahs) bezüglich der Effektoren Phosphoenolpyruvat (PEP), 2-Phosphoglycerat (2PG), 1,3-Bisphosphoglycerat (13DPG), 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) und L-Tryptophan (L-Trp) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Dies entspricht auch den von Weiner *et al.* (2017) gezeigten Elastizitäten aus der L-Phenylalanin-Produktion. Eine weitere Übereinstimmung mit dieser früheren Arbeit ist die fehlende Information über die intrazelluläre DAHP-Konzentration, sodass auch für diesen Metaboliten keine Aussage über Inhibition oder Aktivierung getroffen werden konnte. Weiterhin waren die hier gezeigten überwiegend positiven Elastizitäten für 2-Phosphoglycerat (2PG) und die leicht positiven Werte bezüglich 1,3-Bisphosphoglycerat (13DPG) auch in den Daten zur ersten metabolischen Analyse von Weiner *et al.* (2017) zu finden. Eine außerdem beschriebene Interaktion zwischen dem Enzym und Phosphoenolpyruvat (PEP) (Nikolaev *et al.*, 2016) ergab negative Elastizitäten und somit einen Hinweis auf eine inhibierende Wirkung.

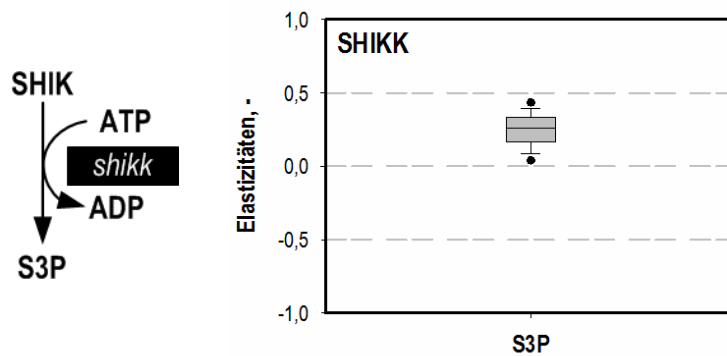


Abbildung 5.56: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Shikimat-Kinase (shikk) bezüglich des Effektors Shikimat-3-Phosphat (S3P) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Die Umsetzung von Shikimat zu Shikimat-3-Phosphat (S3P) erfolgt durch die Shikimat-Kinase (shikk). Für diese Reaktion wurde analog zur Arbeit von Weiner *et al.* (2017) S3P als Effektor gewählt. Die hier ermittelten positiven Elastizitäten, die auf eine Aktivierung hinweisen und in Abbildung 5.56 dargestellt sind, entsprachen den Werten, die in der früheren Arbeit bei einer metabolischen Analyse zum Zeitpunkt hoher L-Phenylalanin-Produktion aufgeführt werden. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit ein größerer Wertebereich abgedeckt.

Bei der Umsetzung von Shikimat-3-Phosphat (S3P) zu 5-Enolpyrovoyl-Shikimat-3-Phosphat (3PSME) wird zum zweiten Mal im Aromatenbiosyntheseweg Phosphoenolpyruvat (PEP) verbraucht. Die vermutete Regulation dieser Reaktion durch PEP (Duncan *et al.*, 1984) wurde durch die vorliegenden Daten anhand positiver Elastizitäten bestätigt (siehe Abbildung 5.57). Eine weiterhin beschriebene Inhibierung des Enzyms durch das Produkt 3PSME (Gruys *et al.*, 1992) wurde im Datensatz nicht widerspiegelt, wobei dies wiederum ein Beispiel für einen nicht-quantifizierten Metaboliten ist. Die Kombination aus aktivierender Wirkung von PEP und nicht-eindeutiger Ergebnisse bezüglich 3PSME entspricht den Ergebnissen, die von Weiner *et al.* (2017) für eine metabolische Analyse zum Zeitpunkt abbrechender Produktbildung in einem L-Phenylalanin-Produktionsprozess beschrieben sind.

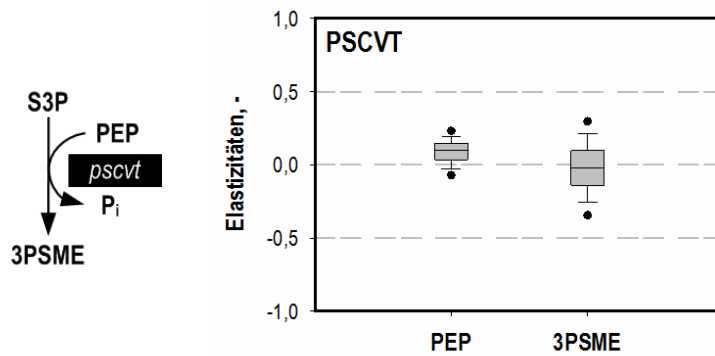


Abbildung 5.57: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion 3-Phosphoshikimat-1-carboxyvinyltransferase (*pscvt*) bezüglich der Effektoren Phosphoenolpyruvat (PEP) und 5-Enolpyrovoyl-Shikimat-3-Phosphat (3PSME) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Die Reaktion der Prephenat-Dehydrogenase (*ppndh*) katalysiert einen Schritt in Richtung des Nebenproduktes der L-Tryptophan-Produktion, L-Phenylalanin. Analog zur Arbeit von Weiner *et al.* (2017) wurde für diese Reaktion Chorismat (CHOR) als Effektor angenommen. Für diesen Metaboliten, der der Verzweigungspunkt zwischen L-Tryptophan und L-Phenylalanin sowie L-Tyrosin ist, wurden in der vorliegenden Arbeit negative Elastizitäten beschrieben (siehe Abbildung 5.58).

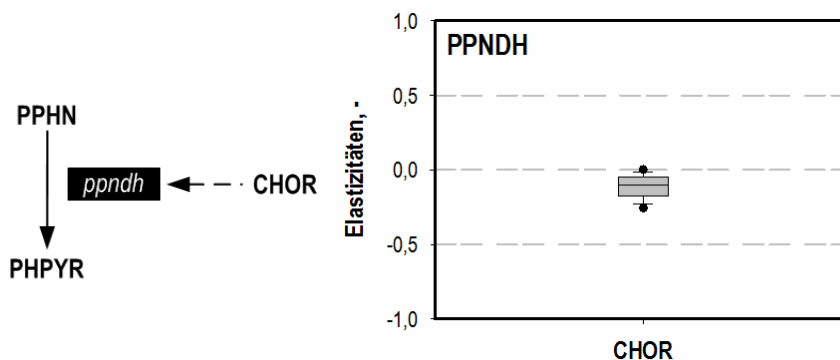


Abbildung 5.58: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Prephenat-Dehydrogenase (*ppndh*) bezüglich des Effektors Chorismat (CHOR) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Anthranilat (ANTH) ist der erste Metabolit des für L-Tryptophan spezifischen Stoffwechselweges und wird aus Chorismat (CHOR) durch die Anthranilat-Synthase (*ans*) gebildet. Da für ein solches Enzym die Inhibierung durch das Produkt ANTH beschrieben ist (Francis *et al.*, 1978), wurde ANTH als Effektor gewählt. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Elastizitäten (siehe Abbildung 5.59) wiesen im Widerspruch dazu jedoch auf einen aktivierenden Effekt von ANTH auf die *ans* hin.

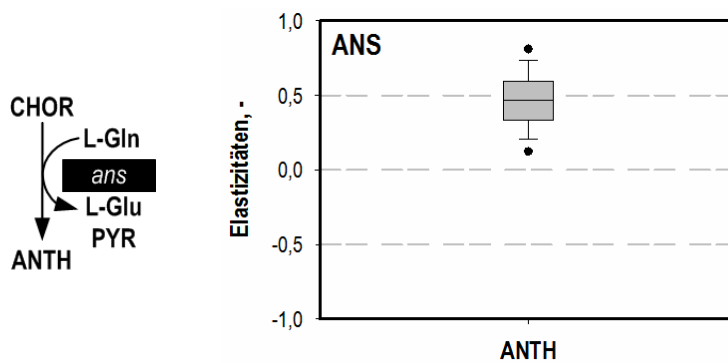


Abbildung 5.59: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Anthranilat-Synthase (ans) bezüglich des Effektors Anthranilat (ANTH) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Ein ähnlicher Einfluss von Anthranilat (ANTH) ergab sich auch anhand der Elastizitäten bezüglich der Reaktion der Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (anprt), die in Abbildung 5.60 dargestellt sind. Auch hier besteht ein Widerspruch zu der in der Literatur dargestellten Substratinhibierung einer anprt (Cookson *et al.*, 2014). Für *E. coli* ist weiterhin eine kompetitive Inhibierung der anprt durch L-Tryptophan bezüglich des Cosubstrates Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) beschrieben (Gonzalez und Somerville, 1986). Zur Berücksichtigung dieses Effekts wurde PRPP als zusätzlicher Effektor gewählt. Fehlende Informationen über die vorliegenden Konzentrationen dieses Metaboliten erlaubten jedoch keine eindeutigen Aussagen über positive oder negative Elastizitäten.

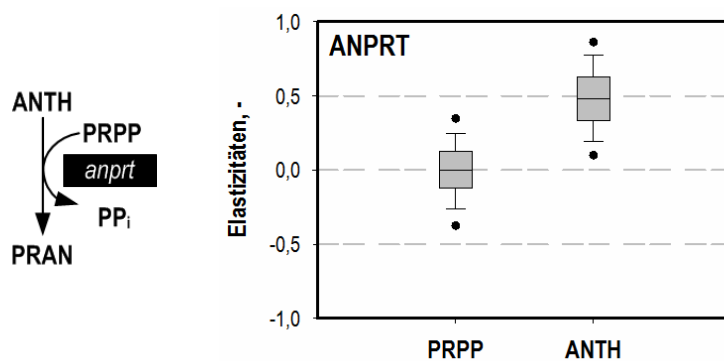


Abbildung 5.60: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Anthranilat-Phosphoribosyltransferase (anprt) bezüglich der Effektoren Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) und Anthranilat (ANTH) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Ein weiterer Schritt der L-Tryptophan-Biosynthese ist die Umsetzung von Carboxyphenylamino-Desoxyribulose-5-Phosphat (2CDR5P) zu Indol-3-Glycerinphosphat (3IG3P), die vom Enzym Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase (igps) katalysiert wird. Für dieses Enzym ist eine Vorwärtsinhibierung durch den ersten Metaboliten der L-Tryptophan-Biosynthese, Anthranilat (ANTH), beschrieben (Panichkin *et al.*; 2017; Chen *et al.*, 2018a). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten positiven Elastizitäten (siehe Abbildung 5.61) konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Im Falle des

außerdem als Effektor angenommenen Metabolite L-Tryptophan (L-Trp) führten die fehlenden intrazellulären Informationen wieder zu einer breiten Verteilung der Elastizitäten.

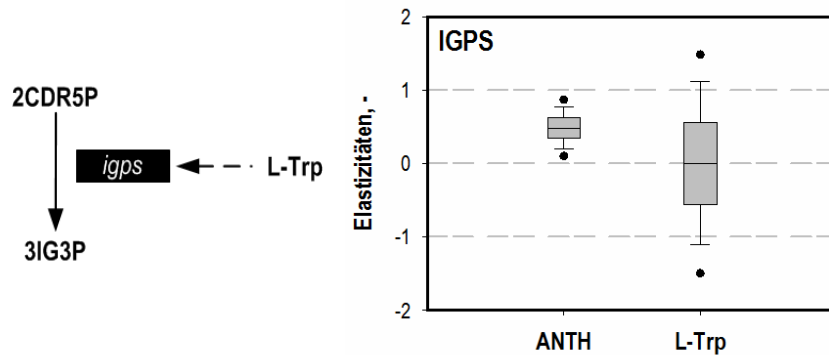


Abbildung 5.61: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase (*igps*) bezüglich der Effektoren Anthranilat (ANTH) und L-Tryptophan (L-Trp) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion.

Energiestoffwechsel

Die Ermittlung von Elastizitäten für die Reaktionen des Energiestoffwechsels wurde in dieser Arbeit analog zu den früheren Arbeiten von Link (2009) und Weiner *et al.* (2017) durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung durch die Reaktionen *cytbo*, *thd2* und *nadh6* beschrieben wurde, welche die Metabolite NADH, NADPH und $FADH_2$ verbrauchen und ATP bilden. Außerdem wurde, ebenfalls wie zuvor (Link, 2009; Weiner *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2004), zur Darstellung des Energiestoffwechsels die ATPase Reaktion für den Verbrauch von ATP verwendet. Für alle genannten Reaktionen wurde eine irreversible Reaktion erster Ordnung angenommen, sodass die Elastizitäten bezüglich der Reaktionssubstrate den Wert 1 annahmen.

5.7.2 Abschätzung von Fluss-Kontroll-Koeffizienten

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten und diskutierten Daten der parallelisierten metabolischen Analyse dienen als Grundlage einer metabolischen Kontrollanalyse. Dazu zählen zunächst die für alle zwölf Gleichgewichtszustände der metabolischen Analyse vorliegenden theoretisch abgeschätzten Stoffflüsse und experimentell ermittelten Metabolitkonzentrationen. Letztere wurden, wenn nötig und möglich, durch thermodynamisch basierte Abschätzungen weiter eingegrenzt. Weiterhin sind die in Kapitel 5.7.1 erläuterten Elastizitäten direkte Grundlage der Kontrollanalyse. Für die Berechnung der Kontrollanalyse werden die Elastizitäten in der Matrix E zusammengefasst (siehe Kapitel 3.7.2). Durch die Elastizitäten gehen indirekt auch die thermodynamischen Betrachtungen des Stoffwechselnetzwerkes in die Berechnung ein.

Das Ergebnis der Kontrollanalyse wird in Form von Fluss-Kontroll-Koeffizienten dargestellt, welche für diese Arbeit in Abbildung 5.62 als Hitzediagramm dargestellt sind. Dabei handelt es sich um Mittelwerte der aus 10.000 Berechnungszyklen mittels Monte-Carlo-Simulation erzielten Koeffizienten. Ein Fluss-Kontroll-Koeffizient gibt dabei an, wie sich eine einprozentige Erhöhung einer einzelnen Enzymaktivität prozentual auf einen im Netzwerk repräsentierten Stofffluss auswirkt. Hierdurch ergeben sich Zusammenhänge zwischen allen Enzymen und Flüssen im Netzwerk. Aufgrund dieses theoretischen Zusammenhanges erscheinen nur Werte zwischen -1,0 und 1,0 als plausible Ergebnisse für die Kontrollkoeffizienten. Die für die L-Tryptophan-Produktion ermittelten Zusammenhänge werden im Folgenden im Einzelnen diskutiert. Die nacheinander dargestellten Bereiche sind im Diagramm mit A–I markiert.

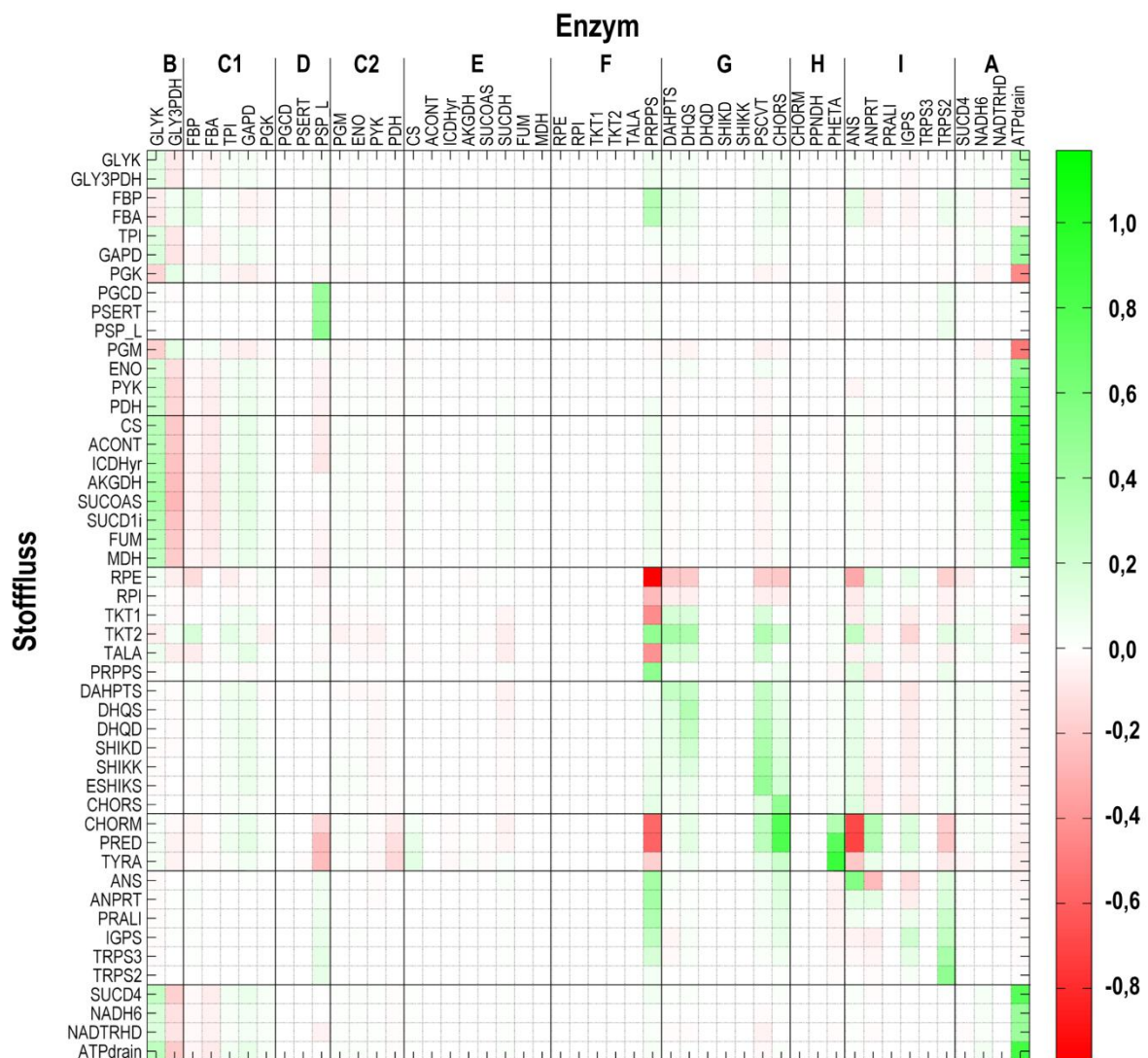


Abbildung 5.62: Fluss-Kontrollkoeffizienten ermittelt durch metabolische Kontrollanalyse der L-Tryptophan-Produktion im Zulaufverfahren. Die Analyse basiert auf dem in Tabelle 10.21 dargestellten stöchiometrischen Modell. Die Spalten repräsentieren jeweils ein Enzym, das durch die metabolische Analyse ausgelenkt wird, und die Zeilen beziehen sich auf die entsprechenden resultierenden Stoffflüsse. Dargestellt sind jeweils die Auswirkungen einer einprozentigen Erhöhung der Enzymaktivität. Die Bereiche A bis I werden nacheinander im Text dargestellt.

Der Energiestoffwechsel, der im vorliegenden vereinfachten stöchiometrischen Modell durch vier Reaktionen repräsentiert wird, ist mit vielen Reaktionen des Modells durch den Verbrauch oder die Bildung von Cofaktoren direkt verknüpft. Dieser weitreichende Einfluss zeigte sich auch anhand der Kontrollkoeffizienten, die einen starken kontrollierenden Effekt des Energiemetabolismus auf etwa die Hälfte der Modellreaktionen anzeigten (siehe Abbildung 5.62 A). Dabei wurde die mit Abstand deutlichste Kontrolle durch die ATP-verbrauchende ATPase-Reaktion ausgeübt. Die stärkste Kontrolle des Energiemetabolismus insgesamt fand sich für die Reaktionen des Zentralstoffwechsels, insbesondere Glykolyse und Citratzyklus. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Kontrolle des Energiemetabolismus auf die Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges nur gering war und sich leicht

negative Kontrollkoeffizienten für den allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese sowie für die Reaktionen zum Nebenprodukt L-Phenylalanin ergaben. Ein Zusammenhang mit den Reaktionen des L-Tryptophan-Stoffwechsels ließ sich hingegen kaum feststellen. Eine Erhöhung der Enzymaktivitäten im Energiestoffwechsel würde also zu verstärkten Stoffflüssen im Zentralstoffwechsel führen, bezüglich der Bildung von Produkt und aromatischen Nebenprodukten jedoch negative Effekte haben. Der beobachtete starke Einfluss auf viele Reaktionen im gesamten Netzwerk sowie die negative Kontrolle des Energiemetabolismus auf die Aromatenbiosynthese stimmen dabei mit den Ergebnissen früherer Arbeiten von Link (2009) und Weiner *et al.* (2017) überein. Im Fall der nur schwach negativen Kontrolle auf die Reaktionen des Aromatenbiosyntheseweges ähnelt die vorliegende Arbeit dabei stärker den Ergebnissen, die am Ende der L-Phenylalanin-Produktionsphase ermittelt werden, als den Ergebnissen zum Zeitpunkt hoher Produktbildung (Weiner *et al.*, 2017).

Die beiden im Modell aufgeführten Reaktionen des Glycerin-Metabolismus *glyk* und *gly3pdh*, die also direkt mit der Aufnahme des Substrates zusammenhängen, hatten eine mittel ausgeprägte Kontrolle auf die Reaktionen des Zentralstoffwechsels, insbesondere Glykolyse und Citratzyklus, sowie auf den Energiestoffwechsel (siehe Abbildung 5.62 B). Nur kleine positive und negative Werte der Kontrollkoeffizienten lagen für die Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges und die Bildung des Nebenproduktes L-Phenylalanin vor. Keine Auswirkung hatte die Erhöhung der Enzymaktivitäten im Glycerin-Stoffwechsel hingegen auf die Reaktionen im allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese sowie auf den für L-Tryptophan spezifischen Stoffwechsel. Das bedeutet, dass eine Erhöhung der Substrataufnahme im Prozess nicht zu einer erhöhten Produktbildung, sondern zu erhöhten Stoffwechselaktivitäten im Zentralstoffwechsel sowie zu einer Verstärkung der Nebenproduktbildung führt. Dies stimmt überein mit den direkt aus der metabolischen Analyse ablesbaren Ergebnissen, die bei Verwendung von Glycerin eine gleichbleibende Produktbildung zeigten, unabhängig von einer erhöhten Substratzufuhr (siehe Kapitel 5.5.2). Eine weitere Übereinstimmung besteht mit Ergebnissen der Prozessentwicklung, bei denen eine verstärkte Nebenproduktbildung bei erhöhter Glycerinzufuhr auftrat (siehe Kapitel 5.2.3). Hier besteht ein Unterschied zu der Arbeit von Weiner *et al.* (2017), die für die Produktion von L-Phenylalanin unabhängig vom Prozesszeitpunkt eine positive Kontrolle des Glycerin-Metabolismus auf die Produktbildung zeigen. Insgesamt ist dies ein deutlicher Hinweis auf eine für diesen Stamm vorliegende starke Limitation der Produktbildung innerhalb des L-Tryptophan-Stoffwechsels.

Die im Zentralstoffwechsel folgenden Reaktionen der Glykolyse und Gluconeogenese zeigten eine Vielzahl unterschiedlicher kontrollierender Funktionen untereinander und auf den restlichen Stoffwechsel (siehe Abbildung 5.62 C1+C2). Die gluconeogenetischen Reaktionen *fba* und *fbp* hatten eine naheliegende negative Kontrolle auf die Reaktionen der Glykolyse, die in der notwendigen Verzweigung des Kohlenstoffflusses zwischen Glykolyse und Gluconeogenese begründet liegt, im

Falle von Glycerin als Kohlenstoffquelle beim Metaboliten GAP. Umgekehrt wiesen auch die Reaktionen der Glykolyse eine negative Kontrolle auf die Gluconeogenese auf, wobei sich dieser Effekt mit zunehmendem Abstand zum Verzweigungspunkt abschwächte. Ebenso hatten die gluconeogenetischen Reaktionen eine negative und die glykolytischen Reaktionen eine positive Kontrolle auf die Reaktionen des Citratzyklus. Kontrollierende Zusammenhänge mit den Reaktionen im Pentose-Phosphat-Weg ergaben sich für alle Reaktionen der oberen Glykolyse und Gluconeogenese, mit Ausnahme der *fba*, obwohl diese mit GAP einen Eingangsmetaboliten des Pentose-Phosphat-Weges verbraucht. Diese ausbleibende kontrollierende Funktion wird auch von Weiner *et al.* (2017) beobachtet. Ebenfalls in Übereinstimmung mit der genannten Arbeit waren die ermittelten Fluss-Kontroll-Koeffizienten von Enzymen der Glykolyse bezüglich der Reaktionen im allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese. Dies umfasste die stärkste Kontrolle durch die Enzyme *tpi* und *gapd* sowie eine geringere Kontrolle durch die *pgk*. Außerdem ergab sich eine leicht negative Kontrolle der *pyk* auf die allgemeine Aromatenbiosynthese, welche durch die Konkurrenz um den Metaboliten PEP begründet ist. Dieser Effekt ist im Datensatz von Weiner *et al.* (2017) in einem L-Phenylalanin-Produktionsprozess am Ende der L-Phenylalanin-Produktionsphase, jedoch nicht zu einem Zeitpunkt hoher Produktbildung, zu erkennen. Die kontrollierenden Funktionen der Glykolyse und Gluconeogenese auf die Bildung des Nebenproduktes L-Phenylalanin entsprachen denen des allgemeinen Teils der Biosynthese aromatischer Aminosäuren. Hinzu kam für diese Reaktionen jedoch eine negative Kontrolle der *pdh*, die die Umsetzung von PYR zu AcCoA unter Bildung von NADH katalysiert. Keine der Reaktionen der Glykolyse oder Gluconeogenese wies eine kontrollierende Funktion bezüglich der für die Produktbildung spezifischen Reaktion auf, sodass bei genetischen Veränderungen in diesem Bereich des Stoffwechsels nicht von einer verbesserten L-Tryptophan-Bildung auszugehen ist.

Eine Abzweigung aus der Glykolyse bei 3PG ermöglicht in drei enzymatischen Schritten die Bildung von L-Serin, welches als Substrat im letzten Schritt der L-Tryptophan-Biosynthese benötigt wird. Da die Bildung von Biomasse ebenfalls L-Serin benötigt, die Biomassebildung jedoch im Modell der Kontrollanalyse nicht berücksichtigt wurde, ist an dieser Stelle von einer starken Vereinfachung auszugehen. Eine geringere Vereinfachung wäre an dieser Stelle bei einem auxotrophen Stamm gegeben, dessen Biomasse während der Produktionsphase nicht zunimmt. Das letzte der Enzyme in der L-Serin-Biosynthese, die *psp_L*, zeigte eine hohe positive Kontrolle auf die vorhergehenden Schritte der L-Serin-Bildung (siehe Abbildung 5.62 D). Außerdem wurde für dieses Enzym eine leicht negative Kontrolle auf die 3PG-folgenden Schritte der Glykolyse und auf die Reaktionen des Citratzyklus ermittelt. Dies lässt sich wiederum mit der im Stoffwechsel vorliegenden Verzweigung begründen. Weiterhin zeigte sich keinerlei kontrollierende Funktion der L-Serin-Biosynthese bezüglich der allgemeinen Aromatenbiosynthese. Deutliche Einflüsse ergaben sich hingegen für alle Reaktionen, die der Aufspaltung des Kohlenstoffflusses zwischen Produkt und aromatischen

Nebenprodukten folgen. In diesem Bereich zeigte sich eine positive Kontrolle auf alle Reaktionen des L-Tryptophan-spezifischen Stoffwechsels und noch deutlicher eine negative Kontrolle auf die Schritte zwischen Chorismat und dem Nebenprodukt L-Phenylalanin. Das Modell sagt also im Falle einer verbesserten Bereitstellung von L-Serin sowohl eine verstärkte Produkt- als auch eine reduzierte Nebenproduktbildung voraus, wobei diese Effekte durch eine Erhöhung der Aktivität des letzten Enzyms der L-Serin-Biosynthese erreicht werden.

Alle Enzymaktivitäten im Citratzyklus übten nur eine geringe kontrollierende Funktion auf andere Reaktionen im Stoffwechselnetzwerk und untereinander aus (siehe Abbildung 5.62 E). Es ergaben sich jedoch zwei Ausnahmen: Zunächst wurde eine positive Kontrolle der Eingangsreaktion des Citratzyklus, der *cs*, auf die für die L-Phenylalanin-Bildung spezifischen Reaktionen ermittelt. Im Zusammenhang mit der zuvor beschriebenen negativen Kontrolle durch die *pdh* lässt sich eine Konkurrenz um CoA vermuten, die jedoch nicht unmittelbar plausibel erscheint. Außerdem ergibt sich hier ein Widerspruch zu den Ergebnissen von Weiner *et al.* (2017), die eine stets negative Kontrolle der *cs* auf die Aromatenbiosynthese beschreiben und sie mit einer Konkurrenz um Kohlenstoff zwischen Zentralstoffwechsel und Aromatenbiosynthese begründen. Die zweite Ausnahme innerhalb des Citratzyklus war die Reaktion der *sucdh*, welche einerseits die stärkste kontrollierende positive Funktion im Citratzyklus erfüllte und andererseits eine negative Kontrolle auf alle Reaktionen der allgemeinen Aromatenbiosynthese sowie auf die für L-Phenylalanin spezifischen Reaktionen ausübte. Diese vielseitigen Auswirkungen einer Erhöhung der entsprechenden Enzymaktivität können in Zusammenhang stehen mit dem Verbrauch von FAD und der Bildung von FADH₂ bei dieser Reaktion und einer somit direkten Verbindung zum Energiestoffwechsel. Die negative Kontrolle auf die Reaktionen der Aromatenbiosynthese kann wiederum analog zu Weiner *et al.* (2017) unter anderem mit der Konkurrenz um Kohlenstoff zwischen Zentralstoffwechsel und Aromatenbiosynthese begründet werden. Sie bedeutet jedoch eine Verschiebung der Kontrolle von der *cs* zur *sucdh*, abhängig vom gebildeten aromatischen Produkt.

Die Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges zeigten für keine Reaktion des gesamten betrachteten Stoffwechsels eine kontrollierende Funktion (siehe Abbildung 5.62 F). Dies hängt auch mit dem thermodynamischen Zustand der Reaktionen zusammen, die alle nahe am Gleichgewicht operieren. Ein anderes Bild ergab sich hingegen für das Enzym *prpps*, das die Umsetzung von R5P zum L-Tryptophan-Vorläufer PRPP katalysiert und eine starke Kontrolle auf verschiedene andere Stoffflüsse aufwies. Wie in den Kapiteln zu Metabolitquantifizierung (Kapitel 5.5.4) und Stoffflussabschätzung (Kapitel 5.5.3) erläutert, lag die Bereitstellung von Ru5P über G6P und 6PG nahe. Da, wie eingangs erwähnt, die Einbeziehung der entsprechenden Reaktionen zur Berechnung der Kontrollanalyse nicht möglich war, war für deren Ergebnisse die Bildung von Ru5P und weiter R5P auf den Weg über X5P festgesetzt. Der Grund hierfür ist, dass die thermodynamische Analyse unter

den gegebenen Bedingungen die Reaktionsrichtung der *tkt1* als R5P-verbrauchend festlegte (siehe Abbildung 5.43). Dies hatte somit großen Einfluss auf die ermittelten Kontrollkoeffizienten der *prpps* auf den Pentose-Phosphat-Weg. Die *prpps* wies in den dargestellten Ergebnissen (siehe Abbildung 5.62 F) eine negative Kontrolle auf die Stoffflüsse der *tala* und *tkt1* auf, da unter den gegebenen Bedingungen eine Konkurrenz um Kohlenstoff bestand. Die stark negative Kontrolle auf die *rpe* ist ebenfalls mit der Definition der Reaktionsrichtung dieses Enzyms in Richtung des Verbrauchs von Ru5P in Zusammenhang zu bringen. Während die *tkt2* unter diesen Bedingungen mit X5P einen Vorläufer für Ru5P liefert und aus diesem Grund eine positive Kontrolle der *prpps* auf die *tkt2* vorlag, erschien die ermittelte negative Kontrolle von *prpps* auf *rpi* nicht plausibel, da diese Reaktion das Substrat der *prpps* liefert.

Von großem Interesse waren hingegen die weiteren ermittelten kontrollierenden Funktionen der *prpps*. Neben einer leicht positiven Kontrolle auf die Reaktionen des Citratzyklus, welche auf eine notwendige erhöhte allgemeine Zellaktivität hinweisen kann, ergab sich auch eine leicht positive Kontrolle auf den allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese. Zudem trat, ähnlich zum letzten Enzym der L-Serin-Biosynthese (*psp_L*), jedoch deutlich stärker ausgeprägt, eine negative Kontrolle auf die Reaktionen der L-Phenylalanin-Bildung und eine positive Kontrolle auf die Schritte in Richtung der L-Tryptophan-Bildung auf. Dies deutet auf einen Mangel an diesem Vorläufer-Metaboliten hin, der zu einem Abfluss von verfügbarem Kohlenstoff zum Nebenprodukt führte. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass PRPP in verschiedenen Reaktionen im Stoffwechsel verbraucht wird und ein intrazellulärer Nachweis in den Metabolomproben trotz verfügbaren analytischen Standards nicht möglich war, was eine niedrige Konzentration dieses Metaboliten plausibel erscheinen lässt.

Die nächsten aufgeführten Reaktionen sind die enzymatischen Schritte im allgemeinen Teil der Aromatenbiosynthese, also bis zur Bildung von Chorismat. Hier wurden nur geringe kontrollierende Funktionen der Enzymaktivitäten auf die Stoffflüsse im Zentralstoffwechsel mit Glykolyse und Citratzyklus (siehe Abbildung 5.62 G) ermittelt. Ausnahmen bildeten die beiden PEP-verbrauchenden Reaktionen *dahpts* und *pscvt*, die unter anderem auf die um PEP konkurrierende Reaktion der *pyk* und im Folgenden auch auf die Aktivitäten im Citratzyklus eine negative Kontrolle ausübten. Während die ersten und die letzten beiden Reaktionen der allgemeinen Aromatenbiosynthese eine deutliche Kontrolle auf verschiedene Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges hatten, ging von den mittleren Reaktionen keine Kontrolle auf den gesamten restlichen Stoffwechsel aus. Die Verknüpfung der Eingangsreaktion der Aromatenbiosynthese mit dem Pentose-Phosphat-Weg erklärt sich unmittelbar durch den Bedarf an E4P. Es kann durch die *tkt1*, die *tkt2* und die *tala* bereitgestellt werden, wodurch sich die gezeigte positive Kontrolle ergab. Entsprechend wurden für die konkurrierenden Reaktionen *rpe* und *rpi* negative Kontrollkoeffizienten berechnet. Innerhalb des allgemeinen Teils der Biosynthese aromatischer Aminosäuren führte dies zu einer geteilten Kontrolle durch die genannten ersten und letzten beiden Reaktionen. Dabei nahm der Einfluss der Eingangsreaktion entlang des metabolischen

Weges ab und die Kontrolle der letzten Reaktionen entsprechend zu. Während der erste der beiden Effekte von Weiner *et al.* (2017) für den Zeitpunkt einer hohen L-Phenylalanin-Produktion beschrieben wird, tritt der zweite Effekt erst bei Produktionsabbruch auf. Weiterhin zeigte sich, dass die letzten beiden enzymatischen Reaktionen vor Chorismat eine stark positive Kontrolle auf die Biosyntheseschritte für L-Phenylalanin hatten, sich jedoch nur eine leicht positive Kontrolle auf die Reaktionen in Richtung L-Tryptophan beobachten ließ. Als Folge der Erhöhung von Enzymaktivitäten im allgemeinen Aromatenbiosyntheseweg wird somit eine verstärkte Bildung des Nebenproduktes bevorzugt und nur zu einem sehr geringen Teil eine stärkere Produktbildung gefördert.

Die drei für L-Phenylalanin spezifischen Schritte wiesen keine kontrollierende Funktion bezüglich der Stoffflüsse im Zentralstoffwechsel auf (siehe Abbildung 5.62 H). Es ergab sich eine stark positive Kontrolle der letzten Reaktion auf die beiden vorhergehenden und eine leicht negative Kontrolle auf die Stoffflüsse in Richtung L-Tryptophan, was wiederum aus der direkten Konkurrenz um den vorhandenen Kohlenstoff folgt.

Auch die für das Produkt L-Tryptophan spezifischen Reaktionsschritte wiesen, mit Ausnahme von *prali* und *trps3*, kontrollierende Funktionen in verschiedenen Bereichen des Stoffwechsels auf. Dabei ergaben sich analog zum umgekehrten Fall kaum direkte Zusammenhänge zwischen der L-Tryptophan-Biosynthese und den Reaktionen in Glykolyse und Citratzyklus (siehe Abbildung 5.62 I). Deutlich positive und negative Werte der Flusskontrollkoeffizienten wurden hingegen für die Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Weg ermittelt. Diese waren mit dem Bedarf an den Vorläufermetaboliten E4P und PRPP in Zusammenhang zu bringen, welche auch für eine Konkurrenzsituation innerhalb des Pentose-Phosphat-Weges sorgen und somit zu einem breiten Spektrum an unterschiedlichen Werten der Kontrollkoeffizienten führten.

Ein deutlich einheitlicheres Bild ergab sich hingegen für die Kontrolle der Enzyme der L-Tryptophan-Biosynthese auf die allgemeine Aromatenbiosynthese. Während die erste Reaktion *ans* und die letzte Reaktion *trps2* eine positive Kontrolle auf alle diese Stoffflüsse ausübten, waren die Kontrollkoeffizienten für *anprt* und *igps* durchgehend negativ. Für die *anprt* muss der in diesem Schritt auftretende Verbrauch von PRPP bedacht werden, der möglicherweise eine interne Konkurrenz um Kohlenstoff verursacht und eine weitergehende Änderung der Flussverteilung für erhöhte Enzymaktivität notwendig macht. Im Fall der *igps*, die kein Cosubstrat benötigt, war der gewählte Effektor ANTH ein Erklärungsansatz für die negativen Kontrollkoeffizienten, da für diesen eine Vorwärtsinhibierung beschrieben ist (Chen *et al.*, 2018). Somit steht ein reduzierter Stofffluss in den vorhergehenden Reaktionen mit einer erhöhten Enzymaktivität in Einklang. Die Erklärung der ermittelten positiven Kontrollkoeffizienten für *anprt* und *igps* hinsichtlich der Reaktionen zur Bildung von L-Phenylalanin ergab sich analog, aufgrund der somit reduzierten Stoffflüsse in Richtung L-Tryptophan. Unmittelbar plausibel erschien hingegen wieder die stark negative Kontrolle der

Enzyme *ans* und *trps2* auf die Reaktionen zur Bildung von L-Phenylalanin aufgrund der Konkurrenz um Kohlenstoff.

Innerhalb der Kontrollkoeffizienten der L-Tryptophan-Reaktionen untereinander setzten sich zunächst die Beobachtungen aus der allgemeinen Aromatenbiosynthese fort. Während die erste L-Tryptophan-spezifische Reaktion eine leicht positive Kontrolle auf die folgenden Schritte hatte, traten im Folgenden negative Kontrollkoeffizienten auf, die möglicherweise auf einen Inhibitionseffekt durch L-Tryptophan zurückzuführen sind. Dasselbe galt für die folgende Reaktion der *anprt*, wobei sich hier wiederum eine negative Kontrolle auf die vorhergehende Reaktion zeigte. Eine Erhöhung der *igps*-Aktivität verursacht eine Reduzierung der Stoffflüsse im Zusammenhang mit dem Effektor ANTH und eine Steigerung der folgenden Reaktionen bis zum Produkt. Der letzte Schritt der L-Tryptophan-Biosynthese hingegen wies eine durchgehend zunehmend positive Kontrolle auf alle Reaktionen des für L-Tryptophan spezifischen Stoffwechselweges auf.

Diskussion

Zusammenfassend beschreiben die über die metabolische Kontrollanalyse der L-Tryptophan-Produktion ermittelten Flusskontrollkoeffizienten eine breit über den Stoffwechsel verteilte Kontrolle durch mehrere Enzymaktivitäten. Dies widerspricht der klassischen Vorstellung eines einzelnen limitierenden Schritts und ist durch die Konnektivitäts- und Summationstheoreme im Konzept der metabolischen Kontrollanalyse nach Kacser und Burns (1973) verankert. Von besonderem Interesse in der vorliegenden Arbeit sind die kontrollierenden Funktionen der verschiedenen Enzyme bezüglich des Biosyntheseweges von L-Tryptophan, die im Folgenden kurz zusammengefasst werden:

Im Zentralstoffwechsel mit Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und Citratzyklus fanden sich keine Reaktionen, deren Veränderungen einen deutlichen Einfluss auf den Stofffluss in der L-Tryptophan-Biosynthese haben. Eine positive Auswirkung auf die Produktbildung wurde hingegen für die jeweils letzte Reaktion im Biosyntheseweg der Vorläufermetabolite L-Ser und PRPP vorhergesagt, *psp_L* und *prpps*. Ein leicht positiver Effekt ergab sich auch durch die Aktivität des letzten Enzyms der allgemeinen Aromatenbiosynthese (*chors*) und ein umgekehrt leicht negativer Einfluss der L-Phenylalanin-Biosynthese. Innerhalb der Reaktionen der L-Tryptophan-Biosynthese hatten alle Schritte, mit Ausnahme der *prali* und der *trps3*, eine Auswirkung auf alle anderen Reaktionen. Aus diesen Beobachtungen ergeben sich direkt mehrere Handlungsanweisungen für die nächsten gezielten Schritte zur Optimierung des vorliegenden L-Tryptophan-Produktionsstammes:

- *Genetische Veränderungen zur verbesserten Bereitstellung des Vorläufermetaboliten L-Serin.* Hierbei ist zu beachten, dass im verwendeten Stamm das Enzym der Eingangreaktion in die L-Serin-Biosynthese bereits in Rückkopplungs-resistenter Form überexprimiert vorliegt. Die MCA beschreibt entsprechend eine positive Kontrolle des letzten Schrittes der L-Serin-

Biosynthese auf die Produktbildung, sodass für eine Überexpression des katalysierenden Enzyms *psp_L* ein verstärkender Effekt auf die Produktbildung erwartet wird.

- *Genetische Veränderungen zur verbesserten Bereitstellung des Vorläufermetabolits PRPP.* Die vorliegenden genetischen Veränderungen des Produktionsstammes haben keinen direkten Einfluss auf die Bereitstellung von PRPP, die vorhandene Überexpression der *tktA* steht jedoch in Zusammenhang mit dem PRPP-Vorläufer R5P, da sie für dessen reversible Bildung verantwortlich ist. Wie L-Ser wird auch PRPP an verschiedenen Stellen im Stoffwechsel verbraucht, PRPP konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch trotz vorhandener Standard-Substanz nicht analytisch erfasst werden. Hierfür ist eine geringe intrazelluläre Konzentration eine mögliche Erklärung, sodass eine Limitierung durch diesen Metaboliten plausibel erscheint. In der Literatur ist dieser Vorläufer-Metabolit bisher nicht als Angriffspunkt für die Optimierung von *E. coli* zur Produktion von L-Tryptophan beschrieben. Eine naheliegende Maßnahme zur erhöhten Produktbildung ist somit eine Verstärkung der *prpps*, die R5P zu PRPP umsetzt. Neben einer Überexpression ist auch die Wahl eines geeigneten Promotors denkbar. Eventuell ist auch eine Deletion von konkurrierenden Verbrauchsreaktionen für PRPP möglich. Hierzu gehören die Bildungsreaktionen von 1-(5-Phosphoribosyl)-ATP, 5-Phospho-beta-D-ribosylamin und Orotidin-5-Phosphat.
- *Einführung von Auxotrophien für die aromatischen Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin.* Der direkte Zusammenhang zwischen Produkt- und Nebenproduktbildung an dieser Stelle wird anhand vieler Flusskontrollkoeffizienten deutlich. So haben fast alle Enzyme mit positiver Kontrolle auf die L-Tryptophan-Bildung einen negativen Einfluss auf die L-Phenylalanin-Bildung und umgekehrt. Beispiele sind die bereits erwähnten Reaktionen zur Bereitstellung der Vorläufermetabolite L-Ser und PRPP. Da die L-Tyrosin-Biosynthese nicht im betrachteten MCA-Modell enthalten ist, steht L-Phenylalanin stellvertretend für die beiden Nebenprodukte. Eine Verhinderung von Stoffflüssen in Richtung dieser Nebenprodukte stellt unmittelbar mehr Kohlenstoff für die Produktbildung zur Verfügung. Diese Maßnahme wird jedoch nur in Kombination mit weiteren Eingriffen zielführend sein, die die bestehenden Limitationen innerhalb der L-Tryptophan-Biosynthese beseitigen. Zusätzlich würde in einem Stamm, der aufgrund der Auxotrophie während der Produktbildung gezielt am Wachstum gehindert werden kann, auch die weitere als Vorläufer nötige Aminosäure L-Serin verstärkt für die Produktbildung zur Verfügung stehen.
- *Verstärkung von Reaktionsschritten innerhalb der L-Tryptophan-Biosynthese.* Als Reaktionen innerhalb des Biosyntheseweges mit dem größten positiven Einfluss auf die Produktbildung beschreibt die MCA die *igps* und die *trps2*. Eine Überexpression der entsprechenden Gene *trpC* und *trpB* könnte somit zu einer erhöhten Produktbildung führen. Dabei muss beachtet werden, dass im verwendeten Stamm bereits eine zusätzliche Überexpression von *trpB*

vorliegt. Dennoch ist eine positive Auswirkung einer weiteren Überexpression des Gens im Genom, oder alternativ der Verwendung eines Plasmids mit diesem Gen, auf das Expressionsniveau möglich. Ein alternativer Ansatz zu einer einfachen Überexpression bezüglich der *igps* ist von Chen *et al.* (2018) gezeigt, die durch den Einsatz eines heterologen Gens die Vorwärtsinhibierung des Enzyms durch ANTH umgehen und dadurch die L-Tryptophan-Bildung verbessern.

Es wird für jede einzelne der genannten Modifikationen ein positiver Einfluss auf die Produktbildung erwartet, die sich in Kombination verstärken können.

Die ermittelten Flusskontrollkoeffizienten zeigen weiterhin eine Vielzahl an Zusammenhängen zwischen den Enzymaktivitäten in der allgemeinen Aromatenbiosynthese sowie der L-Tryptophan-Biosynthese und dem Pentose-Phosphat-Weg auf. In diesem Kontext ist die bereits mehrfach erwähnte thermodynamisch widersprüchliche Datenlage bezüglich Metabolitkonzentrationen und Flussrichtungen der reversiblen Reaktionen zu bedenken, die zunächst durch zusätzliche Annahmen geklärt werden konnte. Es ist dabei kritisch zu sehen, dass die Reaktionen des oxidativen Pentose-Phosphat-Weges in den Berechnungen der MCA nicht berücksichtigt werden konnten. Der sich dadurch ergebende Widerspruch konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig aufgelöst werden. Dies hat zur Folge, dass möglicherweise nicht alle Zusammenhänge zwischen Pentose-Phosphat-Weg und Aromatenbiosyntheseweg korrekt dargestellt werden konnten. Die große Bedeutung der Reaktionsrichtung reversibler Reaktionen für die Ergebnisse einer metabolischen Kontrollanalyse und gleichzeitig die Schwierigkeiten bei ihrer Festlegung wurden kürzlich beschrieben (Hameri *et al.*, 2019). Einen Lösungsansatz stellen ¹³C-Markierungsexperimente dar, die jedoch mit großem experimentellem und analytischem Aufwand verbunden sind. Die Notwendigkeit der Vorgabe aller Reaktionsrichtungen bei der thermodynamischen Abschätzung mittels anNET wird in der Literatur ebenfalls als starke Einschränkung gesehen (Ataman und Hatzimanikatis, 2015).

Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Betrachtung eines Stoffwechselweges, über den noch wenig Detailwissen bezüglich kontrollierender Reaktionen in einem Produktionsprozess vorliegt. Während dies den Gewinn vieler neuer Erkenntnisse ermöglicht, bergen die begrenzt verfügbaren Daten auch Schwierigkeiten für die Durchführbarkeit einer metabolischen Kontrollanalyse. In Stoffwechselwegen abseits des Zentralstoffwechsels treten häufig Metabolite auf, die aus verschiedenen Gründen analytisch schwer erfassbar sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Projektpartner zwei Metabolite (2CDR5P und 3IG3P) durch Kombination aus chemischer Synthese und enzymatischer Umsetzung synthetisieren und zur Verfügung stellen, sodass die analytische Abdeckung des betrachteten Stoffwechsels erheblich ausgeweitet werden konnte. Die Verfügbarkeit thermodynamischer Stoffdaten verbessert sich durch die eQuilibrator-Datenbank stark (Flamholz *et al.*, 2012), Informationen über relevante Effektoren für die verschiedenen Reaktionen sind hingegen

teilweise schwer zugänglich. Ihre Auswahl ist jedoch von großer Bedeutung für das Ergebnis der Kontrollanalyse. Während alte Arbeiten zur Beschreibung einzelner Enzyme in der Regel auf *in vitro* Daten beruhen, deren Anwendbarkeit auf *in vivo* Bedingungen häufig fraglich ist, nimmt in den letzten Jahren eine umfassende Beschreibung von Interaktionen zwischen Enzymen und Metaboliten als „Interaktom“ zu (Cotten und Reed, 2013; Nikolaev *et al.*, 2016; Reznik *et al.*, 2017; Piazza *et al.*, 2018). Deren Daten beruhen auf Voraussetzungen, die *in vivo* Bedingungen möglichst nahe kommen. Diese Arbeiten setzen bisher bei Enzymen des Zentralstoffwechsels an, sodass für zusätzliche Reaktionen mit der Verfügbarkeit dieser deutlich verbesserten Informationen nach Erweiterung des untersuchten Bereichs zu rechnen ist.

6 Zusammenfassung

Die mikrobielle Produktion der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan ist aufgrund ihrer Bedeutung für Nahrungsmittel- und Pharmahersteller von großem industriellem Interesse. Dabei wird üblicherweise Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet, wobei die Verwendung alternativer Substrate wie Glycerin verschiedene Vorteile bietet. Neben einer günstigen Verfügbarkeit sind hierbei die einfache Aufnahme in die Zellen durch Diffusion und ein erhöhter Reduktionsgrad zu nennen. Die meisten Arbeiten zur Aminosäureproduktion ausgehend von Glycerin wurden für die Herstellung von L-Phenylalanin durchgeführt. Eine hierfür etablierte Prozessstrategie ermöglicht die Produktion von 22 g L^{-1} L-Phenylalanin (Weiner *et al.*, 2016), was jedoch hinter den für Glucose beschriebenen Produktkonzentrationen von bis zu 50 g L^{-1} zurückbleibt (Backman *et al.*, 1990). Das Auftreten von Stoffwechsellimitationen bei der L-Phenylalanin-Produktion mit Glycerin wird somit offensichtlich. Die Produktion von L-Tyrosin und L-Tryptophan ausgehend von Glucose ermöglicht Produktkonzentrationen um 40 g L^{-1} , Prozesse mit der Kohlenstoffquelle Glycerin sind für diese Aromaten nicht beschrieben.

Metabolische Analysen sind experimentelle Methoden, die Einblicke in die metabolischen Vorgänge während Produktionsprozessen und somit in mögliche Limitationen des Stoffwechsels erlauben. Sie beruhen auf der Auslenkung des Stoffwechsels durch extrazelluläre Substrate, die von den Zellen mit hoher Rate aufgenommen werden. Die Auswertung der dabei gewonnenen Daten, extra- und intrazelluläre Metabolitkonzentrationen und Stoffflüsse, erfolgt in vielen Schritten mittels theoretischer Stoffwechselmodelle. Eine Methode, die hierbei die Ermittlung limitierender Schritte in Stoffwechselnetzwerken ermöglicht, ist die metabolische Kontrollanalyse (*‘metabolic control analysis‘* MCA) (Burns *et al.*, 1985). Aufgrund der Komplexität der dabei notwendigen experimentellen und theoretischen Methoden sind nur wenige Anwendungen der MCA auf industrielle Produktionsprozesse beschrieben. Metabolische Analysen während der Produktion von L-Phenylalanin aus Glycerin ermöglichten die Berechnung metabolischer Kontrollanalysen, die sich verändernde kontrollierende Funktionen über die Prozesszeit und eine besondere Bedeutung des Metaboliten Phosphoenolpyruvat für die Produktbildung aufzeigen (Weiner *et al.*, 2017).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erweiterung des Substratspektrums zur Auslenkung des Stoffwechsels während metabolischer Analysen. Angestrebt wurde die Verfügbarkeit von Metaboliten, deren Aufnahmeraten natürlicherweise zu gering für diese Anwendung sind. Ein weiteres Ziel war die Identifikation von Limitationen im Stoffwechsel während eines Prozesses zur Herstellung der aromatischen Aminosäure L-Tryptophan aus Glycerin, um Ansatzpunkte für genetische Stammverbesserungen aufzuzeigen. Dies sollte durch die Anwendung von Methoden der metabolischen Analyse und metabolischen Kontrollanalyse erfolgen.

Zunächst wurde die Herstellung von L-Phenylalanin mit dem L-Phenylalanin-Produktionsstamm *E. coli* FUS4 *UhpT-D388C* pF81_{kan} charakterisiert. Dieser Stamm trägt neben Veränderungen zur Produktion von L-Phenylalanin eine Überexpression des Zuckerphosphat-Transporters UhpT, der durch eine Punktmutation spezifisch für Phosphoenolpyruvat ist und somit die natürlicherweise kaum mögliche Aufnahme von Phosphoenolpyruvat durch die Zellen zugänglich macht. Es wurde die Übertragbarkeit eines etablierten L-Phenylalanin-Produktionsprozesses auf den Transporterstamm mit identischem Prozessverlauf gezeigt. Die maximale Produktkonzentration betrug 22,6 g L⁻¹. Auf dieser Grundlage wurde eine parallelisierte metabolische Kurzzeitanalyse der L-Phenylalanin-Produktion mit Phosphoenolpyruvat als Effektor mit der Methodik des schnellen Medienwechsels durchgeführt. Dabei werden Zellen aus dem laufenden Prozess in ein paralleles Bioreaktorsystem übertragen, in dem der Stoffwechsel unterschiedlich angeregt wird. Aufgrund des über die Analysendauer (19 min) unveränderten Proteoms enthält die Reaktion der Zellen Informationen über den metabolischen Zustand im Prozess. Während der Analyse kamen Glucose und Glycerin als Zulaufsubstrate mit verschiedenen Zulaufzeiten zum Einsatz und Phosphoenolpyruvat wurde als zusätzliches Substrat einmalig nach der Hälfte der Analysendauer hinzugefügt. Somit konnte seine Auswirkung direkt sichtbar gemacht werden: Die Zugabe von Phosphoenolpyruvat führte in allen Ansätzen zu einer erhöhten Produktbildung, wobei die stärkste Erhöhung (+ 240 %) bei einer hohen Zulaufzeit von Glycerin auftrat. Dies wies eindeutig auf eine Limitierung der Produktbildung durch Phosphoenolpyruvat hin, sodass seine verbesserte Bereitstellung einen gezielten Angriffspunkt zur Stammverbesserung darstellt. Die angewandte Methodik zeigt, dass durch Verwendung von Transporterstämmen die Auswahl an Substraten für metabolische Analysen erweitert und somit ein größerer Teil des Stoffwechsels während der Analyse beeinflusst werden kann. Auf diese Weise können spezifische Fragestellungen bezüglich der Bedeutung einzelner Metabolite für die Produktsynthesen in Zellen aus Produktionsprozessen beantwortet werden.

Für alle weiteren Arbeiten wurde die L-Tryptophansynthese gewählt. Hierfür war zunächst die Etablierung eines Produktionsprozesses im 15 L-Maßstab mit der Kohlenstoffquelle Glycerin notwendig. Als Ausgangspunkt dienten eine für L-Phenylalanin etablierte Prozessstrategie und der L-Tryptophan-Produktionsstamm *E. coli* NT367, der mehrere genetische Veränderungen für eine erhöhte Expression von Enzymen des L-Tryptophan-Biosyntheseweges und für eine verbesserte Bereitstellung von Vorläufermetaboliten trägt. Mit dieser Kombination aus Stamm und Prozess gelang die Bildung von 6,7 g L⁻¹ L-Tryptophan innerhalb von 50 h. Die Verwendung eines Plasmids (pF112*aroFBL*_{kan}) mit Genen der Aromatenbiosynthese in *E. coli* NT367 ermöglichte bei gleichbleibender Prozessstrategie eine Steigerung der Produktkonzentration um 86 % auf 12,5 g L⁻¹. Eine Erhöhung der Substratzulaufzeit im Prozess führte davon ausgehend jedoch lediglich zu einer verstärkten Bildung der Nebenprodukte L-Phenylalanin und L-Tyrosin und reduzierte gleichzeitig die maximale Konzentration von L-Tryptophan signifikant um 66 %. Dieses Ergebnis wies auf eine

Limitierung der Umsetzung von Glycerin in das gewünschte Produkt innerhalb des L-Tryptophan-Stoffwechsels dieses *E. coli* Stammes hin.

Durch Genomsequenzierung wurden in *E. coli* NT367 Punktmutationen nachgewiesen, die zu inaktiven Genprodukten mehrerer Überexpressionen führten. Dies machte die Auswahl eines alternativen Stammes für die weiteren Arbeiten notwendig. Dazu wurden verschiedene Stämme in transformierter Form (pF112aroFBL_{kan}) mit der zuvor festgelegten Prozessstrategie im 15 L-Maßstab charakterisiert. Der hierfür gewählte Ausgangsstamm *E. coli* TRP5a ist ein Vorläufer von *E. coli* NT367 ohne fehlerhafte Überexpressionen. Neben diesem wurden die beiden Stämme *E. coli* TRP5a *tktA* und *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* im Produktionsprozess charakterisiert, die zusätzliche Überexpressionen von Genen aus dem Pentose-Phosphat-Weg (*tktA*), der L-Serin-Biosynthese (*serA*) und dem L-Tryptophan-Biosyntheseweg (*trpBA*) tragen. Dabei zeigte sich jeweils eine positive Auswirkung der zusätzlichen Überexpressionen auf die Produktbildung, und schließlich wurde eine maximale L-Tryptophan-Konzentration von 15,4 g L⁻¹ mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} erzielt.

Dieser Prozess wurde im Folgenden als Grundlage für alle weiteren Arbeitsschritte gewählt. Als wissenschaftlich interessanter Zeitraum für die Durchführung metabolischer Analysen wurde die Prozessphase einige Stunden nach Zugabe des Induktors IPTG definiert, in der bei einer hohen Biotrockenmasse-Konzentration hohe Produktbildungsraten von rund 30 mg_{L-Trp} g_{BTM}⁻¹ h⁻¹ vorlagen.

Zunächst wurde während des L-Tryptophan-Produktionsprozesses im 15 L-Maßstab mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112aroFBL_{kan} eine parallelisierte metabolische Kurzzeitanalyse mit der Methodik des schnellen Medienwechsels im Satzverfahren durchgeführt. Dies bedeutet, dass Zellsuspension aus dem laufenden Prozess entnommen und abzentrifugiert wurde und die Zellen in frischem Medium resuspendiert in ein paralleles Bioreaktorsystem mit vier Reaktoren überführt wurden. Dort wurden Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat als Kohlenstoffquellen zur Verfügung gestellt, die von den Zellen unmittelbar mit hoher Rate verstoffwechselt wurden. Auf diese Weise wurde der Metabolismus der Zellen in unterschiedliche Richtungen ausgelenkt, woraufhin sich innerhalb weniger Minuten neue metabolische Fließgleichgewichte ausbildeten. Diese konnten erfolgreich anhand konstanter Atmungsraten identifiziert werden. Die hohen unmittelbar auftretenden Substrataufnahmeraten, das schnelle Einstellen neuer Fließgleichgewichte und außerdem eine analytisch erfassbare Produktbildung im Zeitrahmen der Analyse (19 min) waren Voraussetzungen für eine weitergehende metabolische Analyse.

Die ermittelten extrazellulären Raten für die Substrataufnahme und die Bildung von Produkt und Nebenprodukten wurden als Randbedingungen für theoretische Stoffflussabschätzungen mittels geometrischer Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (*FVA*) verwendet. Die auf diese

Weise ermittelten Stoffflussverteilungen verdeutlichten die verschiedenen Auslenkungen des Stoffwechsels durch die Substrate. Die größten Unterschiede der Enzymaktivitäten sowie der teilweisen Umkehrungen von Reaktionsrichtungen ergaben sich innerhalb des Zentralstoffwechsels, beispielsweise durch die Aktivität von glykolytischen oder gluconeogenetischen Reaktionen. Die Stoffflüsse zum Produkt wurden vorrangig durch die vorgegebenen Produktbildungsraten beeinflusst. Während somit die Anwendbarkeit der Methodik der metabolischen Kurzzeitanalysen auf die Produktion von L-Tryptophan gezeigt wurde, führten die teilweise großen Auslenkungen der Stoffflüsse zu unerwünschten Nebenprodukten und dem Ausreizen von metabolischen Kapazitäten, sodass die Flexibilität des Stoffwechsels nicht beschrieben werden konnte.

Um die genannten Nachteile der metabolischen Analyse im Satzverfahren zu umgehen und außerdem die Anzahl metabolischer Zustände während der Analyse zu erhöhen, wurde eine Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren durchgeführt. Dabei wurde jede der vier Kohlenstoffquellen Glucose, Glycerin, Succinat und Pyruvat während der Analyse mit drei verschiedenen Zulaufstufen durchgeführt. Diese wurden anhand der zuvor bestimmten maximalen Aufnahmeraten ausgelegt und ermöglichten jeweils zwei vollständig limitierende Zulaufphasen und eine Phase mit annähernd maximaler Aufnahmerate. Während der 19 minütigen Analyse wurden die Zulaufstufen nach 7 min und 13 min erhöht. Die Stufen der Zulaufstufen zeichneten sich in den gemessenen Atmungsraten ab, abhängig von der Kohlenstoffquelle mit unterschiedlicher Ausprägung. Sie zeigten die erfolgreiche Einstellung der erhöhten Anzahl an metabolischen Gleichgewichtszuständen im Vergleich zur Satzanalyse. Die Produktbildungsraten in den drei Zulaufphasen mit der Kohlenstoffquelle Glucose bildeten ein Stufenprofil, während eine nahezu gleichbleibende Bildung des Produktes L-Tryptophan bei den verschiedenen Zulaufstufen von Glycerin bestimmt wurde. Eine erhöhte Verfügbarkeit dieser Kohlenstoffquelle ermöglichte also keine verbesserte Produktbildung.

Die ermittelten extrazellulären Raten wurden analog zur Kurzzeitanalyse im Satzverfahren als Randbedingungen für theoretische Stoffflussabschätzungen verwendet. Die ermittelten Stoffflussrichtungen und Enzymaktivitäten ausgehend von den vier Kohlenstoffquellen entsprachen den jeweiligen Verteilungen ausgehend von den Daten der Analyse im Satzverfahren. Es wurden jedoch veränderte Absolutwerte und drei unterschiedliche Verteilungen für jede Kohlenstoffquelle erzielt. Die Ausbildung von zwölf verschiedenen metabolischen Fließgleichgewichten während der Analyse im Zulaufverfahren wurde somit durch die theoretischen Stoffflüsse bestätigt.

Während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren erfolgte zusätzlich zur Quantifizierung extrazellulärer Metabolite die Quantifizierung intrazellulärer Metabolite am Ende jeder Gleichgewichtsstufe durch schnelle Probenahme und massenspektrometrische Analytik. Somit wurde eine genauere Charakterisierung der metabolischen Zustände der Zellen anhand intrazellulärer Metabolitkonzentrationen möglich. Die Daten zeigten stark variierende intrazelluläre Konzentrationen verschiedener Metabolite in den unterschiedlichen Gleichgewichtszuständen der metabolischen

Analyse. Die große Auslenkung des Stoffwechsels in verschiedene Richtungen im Rahmen der metabolischen Analyse wurde also auch anhand der intrazellulären Konzentrationen ersichtlich. Während die Konzentrationen allgemeiner Cofaktoren wie erwartet nur geringe Variationen aufwiesen, wurden vor allem zahlreiche Metabolite des Zentralstoffwechsels mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationen quantifiziert. Bei den Metaboliten des Aromatenbiosyntheseweges ergaben sich mit wenigen Ausnahmen weniger stark ausgeprägte Unterschiede.

Basierend auf Reaktionsrichtungen, Metabolitkonzentrationen und Stoffdaten wurde im Folgenden eine thermodynamische Betrachtung des relevanten Reaktionsnetzwerkes aus Zentralstoffwechsel und Aromatenbiosynthese mittels der MATLAB-basierten Toolbox anNET durchgeführt, die die Analyse der Thermodynamik von metabolischen Netzwerken ermöglicht. Dadurch wurden thermodynamisch mögliche Bereiche für Metabolitkonzentrationen und Gibbs'sche Reaktionsenergien definiert. Dies ermöglichte die Korrektur einzelner gemessener intrazellulärer Konzentrationen sowie die Eingrenzung der Konzentrationsbereiche für nicht-messbare Metabolite. Weiterhin erlaubten die berechneten Reaktionsenergien eine Klassifizierung der betrachteten Reaktionen bezüglich ihrer Nähe zum thermodynamischen Gleichgewicht. Als nahe am thermodynamischen Gleichgewicht wurden 20 Reaktionen klassifiziert, unter anderem alle Reaktionen des Pentose-Phosphat-Weges und eine große Zahl an Reaktionen der Glykolyse. Die restlichen 28 Reaktionen des betrachteten Netzwerkes liefen fern des thermodynamischen Gleichgewichtes ab, wobei die stärksten negativen Werte der Reaktionsenergien für Reaktionen der Aromatenbiosynthese auftraten.

Die abschließende Betrachtung der L-Tryptophan-Bildung erfolgte durch die Berechnung einer metabolischen Kontrollanalyse, für die mit einem Netzwerk aus 48 Reaktionen und 56 Metaboliten ein Stoffwechselmodell mit Glykolyse, Gluconeogenese, Glycerin-Metabolismus, Citratzyklus, Pentose-Phosphat-Weg, Biosyntheseweg der aromatischen Aminosäuren und Energiemetabolismus erstellt wurde. Im ersten Schritt der Kontrollanalyse erfolgte die Bestimmung von Elastizitäten, die den Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Metaboliten und einer Reaktionsrate darstellen. Dies geschah abhängig vom thermodynamischen Zustand der Reaktion: Während für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht eine Berechnung direkt aus der Gibbs'schen Reaktionsenergie möglich war, war für Reaktionen fern des Gleichgewichtes die Verwendung des Lin-log-Ansatzes nötig. Dieser Ansatz ermöglicht eine nicht-mechanistische Beschreibung von Reaktionen unter Vorgabe von Effektoren, also Metaboliten mit Einfluss auf die jeweilige Reaktionsrate. Die im Anschluss mithilfe der Elastizitäten ermittelten Flusskontrollkoeffizienten gaben Auskunft darüber, auf welche Weise die Enzymaktivitäten und Stoffflüsse im metabolischen Reaktionsnetzwerk miteinander verknüpft sind.

Insgesamt zeigten die Flusskontrollkoeffizienten eine Vielzahl kontrollierender Zusammenhänge zwischen Enzymaktivitäten und Stoffflüssen in allen Bereichen des Stoffwechsels und somit eine Verteilung der Kontrolle auf den gesamten Metabolismus.

Dabei traten im Zentralstoffwechsel (Glycerin-Metabolismus, Glykolyse, Citratzyklus und Pentose-Phosphat-Weg) jedoch keine Enzyme mit Kontrolle auf die L-Tryptophan-Bildung auf, sodass bei genetischen Veränderungen in diesen Stoffwechselbereichen keine Verbesserung der Produktbildung erwartet wird. Die fehlende Kontrolle der Enzyme des Glycerin-Metabolismus auf die Produktbildung bestätigt mehrere Ergebnisse dieser Arbeit, bei denen keine Steigerung der L-Tryptophan-Produktion bei erhöhter Substratverfügbarkeit nachgewiesen werden konnte. Dies betrifft zum einen die Prozessentwicklung im 15 L-Maßstab und zum anderen die Ergebnisse der parallelisierten metabolischen Analyse mit steigender Glycerinzufuhr als Substrat zur Auslenkung des Stoffwechsels. Im Gegensatz dazu konnten mithilfe der metabolischen Kontrollanalyse mehrere Enzyme mit starker direkter Kontrolle auf die Bildung von L-Tryptophan identifiziert werden. Diese Kontrollkoeffizienten sind in der zusammenfassenden Abbildung 6.1 dargestellt. Sie lassen sich folgendermaßen gruppieren:

- *Bereitstellung von Vorläufermetaboliten.*

Für die Bildung der Vorläufermetabolite Phosphoribosyl-Pyrophosphat und L-Serin konnte eine positive Kontrolle auf die Bildung von L-Tryptophan bestimmt werden. Dies deutet auf eine Limitierung der Produktbildung durch ihre Bereitstellung hin, der durch Überexpressionen in ihren Biosynthesewegen begegnet werden kann. Die metabolische Kontrollanalyse beschreibt dafür jeweils vor allem den letzten Schritt der Biosynthese als Angriffspunkt (siehe Abbildung 6.1).

- *Konkurrenzreaktionen in der Aromatenbiosynthese.*

Ein in den Kontrollkoeffizienten wiederholt auftretender gegensätzlicher Zusammenhang zwischen den Reaktionen zur Bildung von L-Tryptophan und L-Phenylalanin legt die Einführung von Auxotrophien, also die Deletion von Bildungsreaktionen, bezüglich L-Phenylalanin und L-Tyrosin als Maßnahme zur Produktionsverbesserung nahe (siehe Abbildung 6.1).

- *Limitierende Schritte innerhalb des L-Tryptophan-spezifischen Stoffwechsels.*

Innerhalb der L-Tryptophan-Biosynthese beschreiben die Kontrollkoeffizienten die enzymatischen Umsetzungen der Indol-3-Glycerin-Phosphat-Synthase und der Tryptophan-Synthase als die Reaktionen mit der stärksten Kontrolle auf die L-Tryptophan-Bildung (siehe Abbildung 6.1). Entsprechend sind Überexpressionen oder Enzyme aus anderen Organismen als Maßnahmen gegen die so beschriebenen Limitationen denkbar.

Höchstwahrscheinlich ist auch eine Verknüpfung mehrerer dieser Maßnahmen zielführend für eine Verbesserung der Produktbildung des vorliegenden Stammes. So wird die Einführung von Auxotrophien zur Verhinderung der Nebenproduktbildung vor allem in Kombination mit der Umgehung der vorliegenden Limitationen in der L-Tryptophan-Biosynthese interessant.

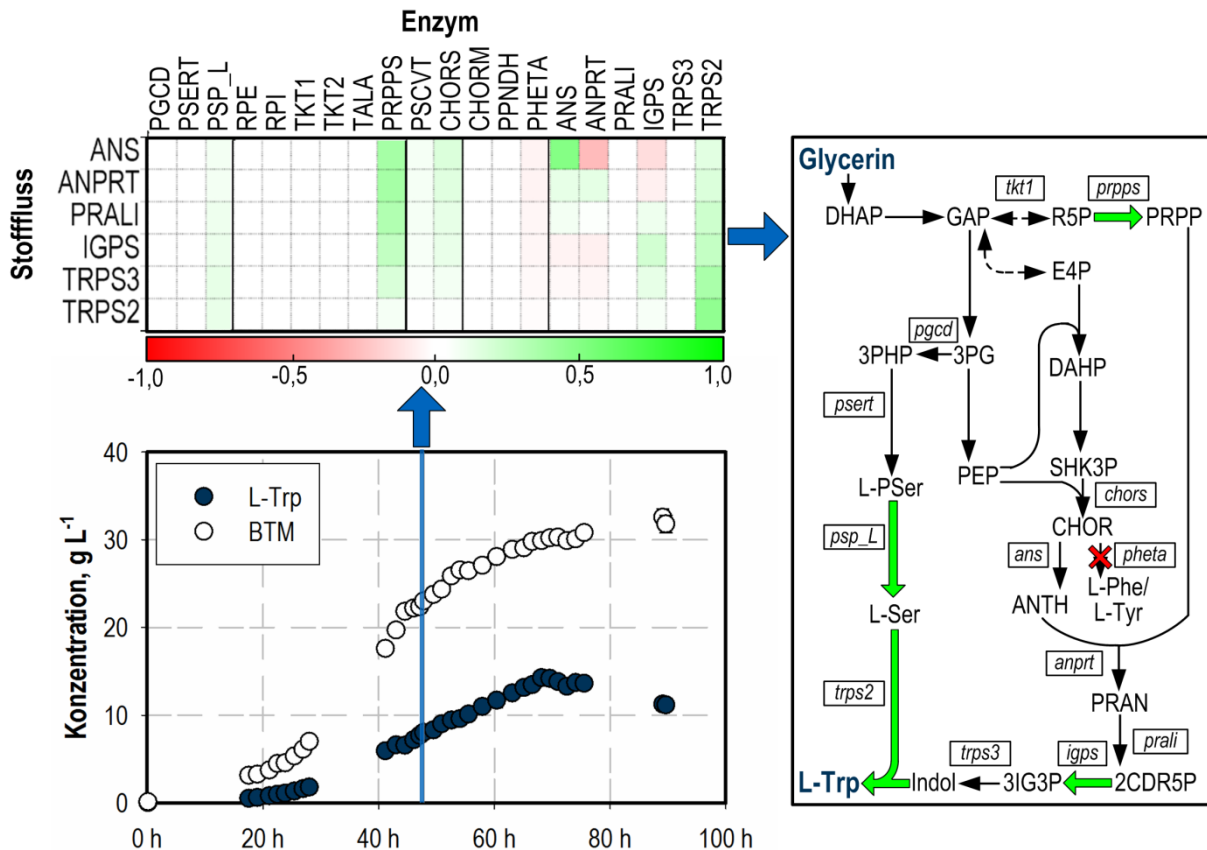


Abbildung 6.1: Zulaufprozess zur Herstellung von L-Tryptophan im 15 L-Maßstab mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112*aroFBL*_{kan}. Blau markiert ist der Zeitraum der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren. Die dabei gewonnenen Daten erlauben die Berechnung einer metabolischen Kontrollanalyse und somit die Abschätzung von Flusskontrollkoeffizienten. Von diesen ist eine Auswahl oben links dargestellt. Sie geben Handlungsanweisungen zur weiteren Stammverbesserung für eine erhöhte Produktbildung, die im Stoffwechselbild rechts gezeigt sind: grün markierte Reaktionen sollen verstärkt und rot markierte deletiert werden.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit die erfolgreiche Anwendung von parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalysen in Kombination mit einer metabolischen Kontrollanalyse. Sie ermöglicht die Identifizierung von Stoffwechsellimitationen während der Produktion von aromatischen Aminosäuren aus Glycerin mit rekombinanten *E. coli* Stämmen in einem skalierbaren Verfahren mit eindeutigen Handlungsanweisungen zur weiteren genetischen Stammverbesserung.

7 Ausblick

Die Auslenkung des Stoffwechsels während der metabolischen Analyse könnte spezifischer im Aromatenbiosyntheseweg und speziell im Biosyntheseweg für L-Tryptophan erfolgen, um auch hier höhere Stoffflussunterschiede und größere Unterschiede der Metabolitkonzentrationen erzielen zu können. Hierzu müssten Metabolite aus metabolischer Nähe zum Produkt als Effektoren für metabolische Analysen durch Anwendung spezifischer Transporter verfügbar gemacht werden. Für L-Tryptophan sind hierfür beispielsweise Shikimat und Anthranilat von Interesse, da diese Metabolite aus dem allgemeinen und L-Tryptophan-spezifischen Teil der Aromatenbiosynthese aufgrund ihrer ausreichend erschwinglichen Verfügbarkeit als Substrate für Kurzzeitanalysen in Frage kommen. Auch eine Übertragung des in dieser Arbeit beschriebenen Phosphoenolpyruvat-Transporters in einen L-Tryptophan-Produzenten könnte geeignet sein, um gegebenenfalls Limitationen in der Aromatenbiosynthese aufzeigen zu können.

Die Abschätzung intrazellulärer Stoffflussverteilungen kann stets durch neue Modelle und verfeinerte Methoden verbessert werden. Dabei ist die Integration neuer Datenebenen, die über den metabolischen Zustand der Zellen Auskunft geben, in genomweite Modelle zunehmend interessant. Dies gilt vor allem für Informationen über Proteom und Transkriptom als Ergänzung von Metabolom und Fluxom (Xu *et al.*, 2018). Diese Daten bieten zusätzliche Einblicke, die Fragestellungen bezüglich Enzymaktivitäten und Reaktionsrichtungen aufklären könnten. Ein weiterer Ansatz hierzu sind ¹³C-Markierungsexperimente, die jedoch die Verfügbarkeit markierter Substrate voraussetzen und eine komplexe Analytik und Datenauswertung erfordern.

Alternative Methoden zur thermodynamischen Betrachtung des Stoffwechselnetzwerkes könnten die für die Berechnung nötigen Vorgaben reduzieren und dadurch eine umfassendere thermodynamische Beschreibung ermöglichen. Weiterhin ist zu erwarten, dass zunehmend Daten über Interaktionen zwischen Metaboliten und Enzymen aufbauend auf den Arbeiten von Nikolaev *et al.* (2016), Reznik *et al.* (2017) und Piazza *et al.* (2018) verfügbar werden. Dies erleichtert zukünftig die Auswahl und Vorgabe von Effektoren bei der Abschätzung von Elastizitäten im Rahmen der metabolischen Kontrollanalyse.

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. doi:10.1002/bit.21003
- Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR und Iwata S (2003): Structure and Mechanism of the Lactose Permease of *Escherichia coli*. *Science* 301(5633):610–615. doi:10.1126/science.1088196
- Adamczyk PA und Reed JL (2017): *Escherichia coli* as a Model Organism for Systems Metabolic Engineering. *Curr Opin Sys Biol* 6:80–88. doi:10.1016/j.coisb.2017.11.001
- Aiba S, Imanaka T und Tsunekawa H (1980): Enhancement of Tryptophan Production by *Escherichia coli* as an Application of Genetic Engineering. *Biotechnol Lett* 2(12):525–530.
- Aiba S, Tsunekawa H und Imanaka T (1982): New Approach to Tryptophan Production by *Escherichia coli* Genetic Manipulation of Composite Plasmids in Vitro. *Appl Env Microbiol* 43(2):289–297.
- 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. doi:10.1002/cbic.200800242
- 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. doi:10.1111/1574-6968.12612
- Alberty (1998): Calculation of Standard Transformed Gibbs Energies and Standard Transformed Enthalpies of Biochemical Reactants. *Arch Biochem Biophys* 353(1):116–130.
- Alberty RA (2003): Thermodynamics of Biochemical Reactions (1. Auflage). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Ambudkar SV, Anantharam V und Maloney PC (1990): Uhpt, the Sugar Phosphate Antiporter of *Escherichia coli*, Functions as a Monomer. *J Biol Chem* 265(21):12287–12292.
- Annesley TM (2003): Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin Chem* 49(7):1041–1044. doi:10.1373/49.7.1041
- Antoniewicz MR (2015): Methods and Advances in Metabolic Flux Analysis: A Mini-Review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42(3): 317–325. doi:10.1007/s10295-015-1585-x
- Antoniewicz MR, Kraynie DF, Laffend LA, Gonzalez-Lergier J, Kelleher JK und Stephanopoulos G (2007): Metabolic Flux Analysis in a Nonstationary System: Fed-Batch Fermentation of a High Yielding Strain of *E. coli* Producing 1,3-Propanediol. *Metab Eng* 9(3):277–292. doi:10.1016/j.jmben.2007.01.003
- Ataman M und Hatzimanikatis V (2015): Heading in the Right Direction: Thermodynamics-Based Network Analysis and Pathway Engineering. *Curr Opin Biotechnol* 36:176–182. doi:10.1016/j.copbio.2015.08.021
- Azuma S, Tsunekawa H, Okabe M, Okamoto R und Aiba S (1993): Hyper-Production of L-Tryptophan via Fermentation with Crystallization. *Appl Microbiol Biot* 39:471–476.

- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL und Mori H (2006): Construction of *Escherichia coli* K-12 in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection. *Mol Syst Biol* 2:1–11. doi:10.1038/msb4100050
- Backman K, Oconnor 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 NY Acad Sci* 589:16–24. doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb24231.x
- Baez-Viveros JL, Flores N, Juarez K, Castillo-Espana P, Bolivar F und Gosset G (2007): Metabolic Transcription Analysis of Engineered *Escherichia coli* Strains That Overproduce L-Phenylalanine. *Microb Cell Fact* 6(30). doi:10.1186/1475-2859-6-30
- Baez-Viveros JL, Osuna J, Hernandez-Chavez G, Soberon X, Bolivar 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. doi:10.1002/bit.20159
- Bang WG, Behrendt U, Lang S und Wagner F (1983): Continuous Production of L-Tryptophan from Indole and L-Serine by Immobilized *Escherichia coli* Cells. *Biotechnol Bioeng* 25:1013–1025.
- Basurko MJ, Marche M, Darriet M und Cassaigne A (1999): Phosphoserine-Transaminase, the Second Step-Catalyzing Enzyme of Serine-Biosynthesis. *Life* 48:525–529.
- Becker SA, Feist AM, Mo ML, Hannum G, Palsson BO und Herrgard MJ (2007): Quantitative Prediction of Cellular Metabolism with Constraint-Based Models: The Cobra Toolbox. *Nat Protoc* 2(3):727–738. doi:10.1038/nprot.2007.99
- 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. doi:10.1038/nprot.2008.107
- Bergdahl B, Heer D, Sauer U, Hahn-Hagerdal B und van Niel EW (2012): Dynamic Metabolomics Differentiates between Carbon and Energy Starvation in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Fermenting Xylose. *Biotechnol Biofuels* 5(34). doi:10.1186/1754-6834-5-34
- Berry A (1996): Improving Production of Aromatic Compounds in *Escherichia coli* by Metabolic Engineering. *Trends Biotechnol* 14(7): 250–256.
- Bingol K und Brueschweiler R (2014): Multidimensional Approaches to NMR-Based Metabolomics. *Anal Chem* 86(1):47–57. doi:10.1021/ac403520j
- Blank LM und Ebert BE (2013): From Measurement to Implementation of Metabolic Fluxes. *Curr Opin Biotechnol* 24(1):13–21. doi:10.1016/j.copbio.2012.10.019
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, ColladoVides 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. doi:10.1126/science.277.5331.1453
- Bolten CJ, Kiefer P, Letisse F, Portais JC und Wittmann C (2007): Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms. *Anal Chem* 79(10):3843–3849. doi:10.1021/ac0623888
- Bordbar A, Monk JM, King ZA und Palsson BO (2014): Constraint-Based Models Predict Metabolic and Associated Cellular Functions. *Nat Rev Genet* 15(2):107–120. doi:10.1038/nrg3643

- Boschetti E, Girot P und Guerrier L (1990): Silica Dextran Sorbent Composites and Their Cleaning in Place. *J Chromatogr* 523:35–42. doi:10.1016/0021-9673(90)85009-k
- Buchholz A, Hurlebaus J, Wandrey C und Takors R (2002): Metabolomics Quantification of Intracellular Metabolite Dynamics. *Biomol Eng* 19:5–15.
- 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. doi:10.1021/ac8022857
- 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. doi:10.1021/ac100101d
- Burkovski A und Kramer R (2002): Bacterial Amino Acid Transport Proteins: Occurrence, Functions, and Significance for Biotechnological Applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58(3):265–274. doi:10.1007/s00253-001-0869-4
- Burns JA, Cornish-Bowden A, Groen AK, Heinrich R, Kacser H, Porteous JW, Rapoport TA, Stucki JW, Tager JM, Wanders RJA und Westerhoff HV (1985): Control Analysis of Metabolic Systems. *Trends Biochem Sci* 10:16.
- 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. doi:10.1016/j.ymben.2011.02.005
- Chakrabarti A, Miskovic L, Soh KC und Hatzimanikatis V (2013): Towards Kinetic Modeling of Genome-Scale Metabolic Networks without Sacrificing Stoichiometric, Thermodynamic and Physiological Constraints. *Biotechnol J* 8(9):1043–1057. doi:10.1002/biot.201300091
- Chan EC, Tsai HL, Chen SL und Mou DG (1993): Amplification of the Tryptophan Operon Gene in *Escherichia coli* Chromosome to Increase L-Tryptophan Biosynthesis. *Appl Microbiol Biot* 40:301–305.
- Chapman AG, Fall L und Atkinson DE (1971): Adenylate Energy Charge in *Escherichia coli* during Growth and Starvation. *J Bacteriol* 108(3):1072–1086.
- 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. doi:10.1002/bit.10288
- Chen L, Chen M, Ma C und Zeng AP (2018a): Discovery of Feed-Forward Regulation in L-Tryptophan Biosynthesis and Its Use in Metabolic Engineering of *E. coli* for Efficient Tryptophan Bioproduction. *Metab Eng* 47:434–444. doi:10.1016/j.ymben.2018.05.001
- Chen L und Zeng AP (2017): Rational Design and Metabolic Analysis of *Escherichia coli* for Effective Production of L-Tryptophan at High Concentration. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(2):559–568. doi:10.1007/s00253-016-7772-5
- Chen RZ, Hatzimanikatis V, Yap W, Postma PW und Bailey JE (1997): Metabolic Consequences of Phosphotransferase (Pts) Mutation in a Phenylalanine-Producing Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 13(6):768–775. doi:10.1021/bp970060h
- Chen Y, Liu Y, Ding D, Cong L und Zhang D (2018b): Rational Design and Analysis of an *Escherichia coli* Strain for High-Efficiency Tryptophan Production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45(5):357–367. doi:10.1007/s10295-018-2020-x

- Cheng LK, Wang J, Xu QY, Xie XX, Zhang YJ, Zhao CG und Chen N (2012): Effect of Feeding Strategy on L-Tryptophan Production by Recombinant *Escherichia coli*. *Ann Microbiol* 62:1625–1634. doi:10.1007/s13213-012-0419-6
- Cheng LK, Wang J, Xu QY, Zhao CG, Shen ZQ, Xie XX und Chen N (2013): Strategy for pH Control and pH Feedback-Controlled Substrate Feeding for High-Level Production of L-Tryptophan by *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol* 29(5):883–890. doi:10.1007/s11274-012-1243-7
- Cho K, Mahieu N, Ivanisevic J, Uritboonthai W, Chen Y, Jr., Siuzdak G und Patti GJ (2014): Isometlin: A Database for Isotope-Based Metabolomics. *Anal Chem* 86(19):9358–9361. doi:10.1021/ac5029177
- Choi YJ und Tribe DE (1982): Continuous Production of Phenylalanine Using an *Escherichia coli* Regulatory Mutant. *Biotechnol Lett* 4(4):223–228. doi:10.1007/bf00132390
- Cintolesi A, Clomburg JM, Rigou V, Zygorakis K und Gonzalez R (2012): Quantitative Analysis of the Fermentative Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 109(1):187–198. doi:10.1002/bit.23309
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA und Zhang F (2013): Multiplex Genome Engineering Using Crispr/Cas Systems. *Science* 339(6121):819–823. doi:10.1126/science.1231143
- Cookson TV, Castell A, Bulloch EM, Evans GL, Short FL, Baker EN, Lott JS und Parker EJ (2014): Alternative Substrates Reveal Catalytic Cycle and Key Binding Events in the Reaction Catalysed by Anthranilate Phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 461(1):87–98. doi:10.1042/BJ20140209
- Cotten C und Reed JL (2013): Mechanistic Analysis of Multi-Omics Datasets to Generate Kinetic Parameters for Constraint-Based Metabolic Models. *BMC Bioinformatics* 14(32). doi:10.1186/1471-2105-14-32
- Crown SB und Antoniewicz MR (2013): Parallel Labeling Experiments and Metabolic Flux Analysis: Past, Present and Future Methodologies. *Metab Eng* 16:21–32. doi:10.1016/j.ymben.2012.11.010
- D'Este M, Alvarado-Morales M und Angelidaki I (2017): Amino Acids Production Focusing on Fermentation Technologies - A Review. *Biotechnol Adv* 36(1):14–25. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.09.001
- 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. doi:10.1002/elsc.201300099
- Davidi D und Milo R (2017): Lessons on Enzyme Kinetics from Quantitative Proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 46:81–89. doi:10.1016/j.copbio.2017.02.007
- 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* 204:118–123.
- De Martino D, Capuani F, Mori M, De Martino A und Marinari E (2013): Counting and Correcting Thermodynamically Infeasible Flux Cycles in Genome-Scale Metabolic Networks. *Metabolites* 3(4):946–966. doi:10.3390/metabo3040946
- Dell KA und Frost JW (1993): Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose: Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *J Am Chem Soc* 115:11581–11589. doi:10.1021/ja00077a065

- DIN (1998): Verfahren der Standardaddition.
- Ding D, Liu Y, Xu Y, Zheng P, Li H, Zhang D und Sun J (2016): Improving the Production of L-Phenylalanine by Identifying Key Enzymes through Multi-Enzyme Reaction System *in vitro*. *Sci Rep* 6(32208). doi:10.1038/srep32208
- Dodge TC und Gerstner JM (2002): Optimization of the Glucose Feed Rate Profile for the Production of Tryptophan from Recombinant *E. coli*. *J Chem Technol Biot* 77:1238–1245. doi:10.1002/jctb.698
- Donnenberg MS (2002): Introduction. In Michael SD (Hrsg.), *Escherichia coli* (pp. xxi-xxvi). San Diego: Academic Press.
- Duncan K, Lewendon A und Coggins JR (1984): The Purification of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase from an Overproducing Strain of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 165(1):121–127.
- Dunn WB, Bailey NJ und Johnson HE (2005): Measuring the Metabolome: Current Analytical Technologies. *Analyst* 130(5):606–625. doi:10.1039/b418288j
- Ebrahim A, Lerman JA, Palsson BO und Hyduke DR (2013): Cobrapy: Constraints-Based Reconstruction and Analysis for Python. *BMC Syst Biol* 7(74). doi:10.1186/1752-0509-7-74
- Feist AM, Henry CS, Reed JL, Krummenacker M, Joyce AR, Karp PD, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V und Palsson BO (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). doi:10.1038/msb4100155
- Feist AM und Palsson BO (2010): The Biomass Objective Function. *Curr Opin Microbiol* 13(3):344–349. doi:10.1016/j.mib.2010.03.003
- Feist AM, Zielinski DC, Orth JD, Schellenberger J, Herrgard MJ und Palsson BO (2010): Model-Driven Evaluation of the Production Potential for Growth-Coupled Products of *Escherichia coli*. *Metab Eng* 12(3):173–186. doi:10.1016/j.ymben.2009.10.003
- Fell DA (1992): Metabolic Control Analysis: A Survey of its Theoretical and Experimental Development. *Biochem J* 286:313–330.
- Fildes P (1956): Production of Tryptophan by *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 15:636–642.
- Flamholz A, Noor E, Bar-Even A und Milo R (2012): Equibrator--the Biochemical Thermodynamics Calculator. *Nucleic Acids Res* 40(Database issue): D770-775. doi:10.1093/nar/gkr874
- Fleming RM, Thiele I und Nasheuer HP (2009): Quantitative Assignment of Reaction Directionality in Constraint-Based Models of Metabolism: Application to *Escherichia coli*. *Biophys Chem* 145(2–3): 47–56. doi:10.1016/j.bpc.2009.08.007
- Forberg C und Haggstrom L (1988): Phenylalanine Production from a Rec *Escherichia coli* Strain in Fed-Batch Culture. *J Biotechnol* 8(4):291–300. doi:10.1016/0168-1656(88)90021-1
- Foster PL, Eisenstadt E und Cairns J (1982): Random Components in Mutagenesis. *Nature* 299(5881):365–367.
- Francis MM, Vining IC und Westlake DWS (1978): Characterization and Regulation of Anthranilate Synthetase from a Chloramphenicol-Producing Streptomycete. *J Bacteriol* 134(1):10–16.

- Frank RA, 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(3):639–651. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.080
- Fuhrer T, Heer D, Begemann B und Zamboni N (2011): High-Throughput, Accurate Mass Metabolome Profiling of Cellular Extracts by Flow Injection-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem* 83(18):7074–7080. doi:10.1021/ac201267k
- Garcia DE, Baidoo EE, Benke PI, Pingitore F, Tang YJ, Villa S und Keasling JD (2008): Separation and Mass Spectrometry in Microbial Metabolomics. *Curr Opin Microbiol* 11(3):233–239. doi:10.1016/j.mib.2008.04.002
- Gerigk M, 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. doi:10.1002/bit.10428
- 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. *Bioproc Biosyst Eng* 25(1):43–52. doi:10.1007/s00449-002-0280-2
- Gonzalez JE und Somerville RL (1986): The Anthranilate Aggregate of *Escherichia coli*: Kinetics of Inhibition by Tryptophan of Phosphoribosyltransferase. *Biochem Cell Biol* 64(7):681–691.
- 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. doi:10.1016/j.tibtech.2004.03.007
- 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). doi:10.1186/s12934-014-0096-1
- Gowen C und Fong S. (2013). Linking RNA Measurements and Proteomics with Genome-Scale Models. In Alper HS (Hrsg.), *Systems Metabolic Engineering* (Vol. 985, pp. 429–445): Humana Press.
- Gruys KJ, Walker MC und Sikorski JA (1992): Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31:5534–5544. doi:10.1021/bi00139a016
- Gu P, Yang F, Kang J, Wang Q und Qi Q (2012): One-Step Tryptophan Attenuator Inactivation and Promoter Swapping to Improve the Production of L-Tryptophan in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 11(30). doi:10.1186/1475-2859-11-30
- Gu P, Yang F, Li F, Liang Q und Qi Q (2013): Knocking out Analysis of Tryptophan Permeases in *Escherichia coli* for Improving L-Tryptophan Production. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(15):6677–6683. doi:10.1007/s00253-013-4988-5
- Gu P, Yang F, Su T, Li F, Li Y und Qi Q (2014): Construction of an L-Serine Producing *Escherichia coli* Via Metabolic Engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41(9):1443–1450. doi:10.1007/s10295-014-1476-6
- Gudmundsson S und Thiele I (2010): Computationally Efficient Flux Variability Analysis. *BMC Bioinformatics* 11(489). doi:10.1186/1471-2105-11-489

- Guo AC, Jewison T, Wilson M, Liu YF, Knox C, Djoumbou Y, Lo P, Mandal R, Krishnamurthy R und Wishart DS (2013): ECMDDB: The *E. coli* Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 41(D1):D625–D630. doi:10.1093/nar/gks992
- Hall JA, Fann MC und Maloney PC (1999): Altered Substrate Selectivity in a Mutant of an Intrahelical Salt Bridge in UhpT the Sugar Phosphate Carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274(10):6148–6153.
- Hall JA und Maloney PC (2001): Transmembrane Segment 11 of UhpT, the Sugar Phosphate Carrier of *Escherichia coli*, is an Alpha-Helix that Carries Determinants of Substrate Selectivity. *J Biol Chem* 276(27):25107–25113. doi:10.1074/jbc.M102017200
- Hameri T, Fengos G, Ataman M, Miskovic L und Hatzimanikatis V (2019): Kinetic Models of Metabolism That Consider Alternative Steady-State Solutions of Intracellular Fluxes and Concentrations. *Metab Eng* 52:29–41. doi:10.1016/j.ymben.2018.10.005
- Hatzimanikatis V und Bailey JE (1996): MCA Has More to Say. *J Theor Biol* 182:233–242.
- Heinrich R und Rapoport TA (1973): A Linear Steady-State Treatment of Enzymatic Chains. General Properties, Control and Effector Strength. *Eur J Biochem* 42:89–95.
- Heller KB, Lin ECC 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. doi:10.1529/biophysj.106.093138
- 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. doi:10.1007/s10529-007-9383-9
- 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. doi:10.1007/s10529-007-9384-8
- Hofmeyr J-HS (2001): Metabolic Control Analysis in a Nutshell. *Proceedings of the 2nd International Conference on Systems Biology*. 291–300.
- Hove-Jensen B, Bentsen AK und Harlow KW (2005): Catalytic Residues Lys197 and Arg199 of *Bacillus subtilis* Phosphoribosyl Diphosphate Synthase. Alanine-Scanning Mutagenesis of the Flexible Catalytic Loop. *FEBS J* 272(14):3631–3639. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04785.x
- Hsu CC, ElNaggar MS, Peng Y, Fang J, Sanchez LM, Mascuch SJ, Moller KA, Alazzeh EK, Pikula J, Quinn RA, Zeng Y, Wolfe BE, Dutton RJ, Gerwick L, Zhang L, Liu X, Mansson M und Dorrestein PC (2013): Real-Time Metabolomics on Living Microorganisms Using Ambient Electrospray Ionization Flow-Probe. *Anal Chem* 85(15):7014–7018. doi:10.1021/ac401613x
- Ikedo M (2006): Towards Bacterial Strains Overproducing L-Tryptophan and Other Aromatics by Metabolic Engineering. *Appl Microbiol Biot* 69(6):615–626. doi:10.1007/s00253-005-0252-y
- Ikedo M, Nakanishi K, Kino K und Katsumata R (1994): Fermentative Production of Tryptophan by a Stable Recombinant Strain of *Corynebacterium glutamicum* with a Modified Serine-Biosynthetic Pathway. *Biosci Biotech Biochem* 58(4):674–678.
- Imam S, Schauble S, Brooks AN, Baliga NS und Price ND (2015): Data-Driven Integration of Genome-Scale Regulatory and Metabolic Network Models. *Front Microbiol* 6(409). doi:10.3389/fmicb.2015.00409

- Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T, Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H und Tomita M (2007): Multiple High-Throughput Analyses Monitor the Response of *E. coli* to Perturbations. *Science* 316:593–597.
- Jaki BU, Franzblau SG, Cho SH und Pauli GF (2006): Development of an Extraction Method for Mycobacterial Metabolome Analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41(1):196–200. doi:10.1016/j.jpba.2005.10.022
- 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. doi:10.1529/biophysj.107.124784
- Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R und Lubbert A (2006): Open-Loop Control of the Biomass Concentration within the Growth Phase of Recombinant Protein Production Processes. *J Biotechnol* 127(1):84–94. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.06.004
- Jing K, Tang Y, Yao C, Del Rio-Chanona EA, Ling X und Zhang D (2018): Overproduction of L-Tryptophan via Simultaneous Feed of Glucose and Anthranilic Acid from Recombinant *Escherichia coli* W3110: Kinetic Modeling and Process Scale-Up. *Biotechnol Bioeng* 115(2):371–381. doi:10.1002/bit.26398
- Jol SJ, Kummel 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. doi:10.1016/j.bpj.2010.09.043
- Kacser H und Burns JA (1973): The Control of Flux. *Symp Soc Exp Biol* 27:65–104.
- Kayser A (1999): Stoffflüsse in *Escherichia coli* Tg1 unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen. Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- Keseler IM, Mackie A, Santos-Zavaleta A, Billington R, Bonavides-Martinez C, Caspi R, Fulcher C, Gama-Castro S, Kothari A, Krummenacker M, Latendresse M, Muniz-Rascado L, Ong Q, Paley S, Peralta-Gil M, Subhraveti P, Velazquez-Ramirez DA, Weaver D, Collado-Vides J, Paulsen I und Karp PD (2017): The EcoCyc Database: Reflecting New Knowledge About *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 45(D1):D543–D550. doi:10.1093/nar/gkw1003
- 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. doi:10.1007/s10295-009-0606-z
- Kim B, Binkley R, Kim HU und Lee SY (2018): Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Enhanced Production of L-Tyrosine. *Biotechnol Bioeng* 115(10):2554–2564. doi:10.1002/bit.26797
- Kim MK und Lun DS (2014): Methods for Integration of Transcriptomic Data in Genome-Scale Metabolic Models. *Comput Struct Biotechnol J* 11(18):59–65. doi:10.1016/j.csbj.2014.08.009
- Kim S, Lee do Y, Wohlgemuth G, Park HS, Fiehn O und Kim KH (2013): Evaluation and Optimization of Metabolome Sample Preparation Methods for *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Chem* 85(4):2169–2176. doi:10.1021/ac302881e
- Kim SC, Min BE, Hwang HG, Seo SW und Jung GY (2015): Pathway Optimization by Re-Design of Untranslated Regions for L-Tyrosine Production in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 5(13853). doi:10.1038/srep13853

- King ZA, Lloyd CJ, Feist AM und Palsson BO (2015): Next-Generation Genome-Scale Models for Metabolic Engineering. *Curr Opin Biotechnol* 35C(23–29). doi:10.1016/j.copbio.2014.12.016
- Konstantinov KB, Nishio N, Seki T und Yoshida T (1991): Physiologically Motivated Strategies for Control of the Fed-Batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* for Phenylalanine Production. *J Ferment Bioeng* 71(5):350–355. doi:10.1016/0922-338x(91)90349-1
- Kornberg HL und Sadler JR (1961): Metabolism of C₂-Compounds in Micro-Organisms. A Dicarboxylic Acid Cycle as a Route for Oxidation of Glycollate by *Escherichia coli*. *Biochem J* 81(3):503–513.
- Kreth J, Lengeler JW und Jahreis K (2013): Characterization of Pyruvate Uptake in *Escherichia coli* K-12. *PLoS One* 8(6):e67125. doi:10.1371/journal.pone.0067125
- Kuhn D, Blank LM, Schmid A und Bühler B (2010): Systems Biotechnology – Rational Whole-Cell Biocatalyst and Bioprocess Design. *Eng Life Sci* 10(5):384–397. doi:10.1002/elsc.201000009
- Kümmel A, Panke S und Heinemann M (2006): Putative Regulatory Sites Unraveled by Network-Embedded Thermodynamic Analysis of Metabolome Data. *Mol Syst Biol* 2. doi:10.1038/msb4100074
- Kurnasov O, Jablonski L, Polanuyer B, Dorrestein P, Begley T und Osterman A (2003): Aerobic Tryptophan Degradation Pathway in Bacteria: Novel Kynurenine Formamidase. *FEMS Microbiol Lett* 227(2): 219–227. doi:10.1016/s0378-1097(03)00684-0
- Ladisch MR und Kohlmann KL (1992): Recombinant Human Insulin. *Biotechnol Prog* 8(6):469–478. doi:10.1021/bp00018a001
- Lakshmanan M, Lee N-R und Lee D-Y (2017): Genome-Scale Metabolic Modeling and *in silico* Strain Design of *Escherichia coli*. *Systems Biol* 6:109–137. doi:10.1002/9783527696130.ch4
- Lange HC, Eman M, van Zuijlen G, Visser D, van Dam J, Frank J, Teixeira de Mattos MJ und Heijnen JJ (2001): Improved Rapid Sampling for *in vivo* Kinetics of Intracellular Metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 75(4):406–415.
- Lara AR, Taymaz-Nikerel H, Mashego MR, van Gulik WM, Heijnen JJ, Ramirez OT und van Winden WA (2009): Fast Dynamic Response of the Fermentative Metabolism of *Escherichia coli* to Aerobic and Anaerobic Glucose Pulses. *Biotechnol Bioeng* 104(6):1153–1161. doi:10.1002/bit.22503
- Leuchtenberger W, Huthmacher K und Drauz K (2005): Biotechnological Production of Amino Acids and Derivatives: Current Status and Prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69(1):1–8. doi:10.1007/s00253-005-0155-y
- Li Z, Xu J, Jiang T, Ge Y, Liu P, Zhang M, Su Z, Gao C, Ma C und Xu P (2016): Overexpression of Transport Proteins Improves the Production of 5-Aminovalerate from L-Lysine in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 6(30884). doi:10.1038/srep30884
- Liao DI, Silverton E, Seok YJ, Lee BR, Peterkofsky A und Davies DR (1996): The First Step in Sugar Transport: Crystal Structure of the Amino Terminal Domain of Enzyme I of the *E. coli* Pep: Sugar Phosphotransferase System and a Model of the Phosphotransfer Complex with Hpr. *Structure* 4(7):861–872. doi:10.1016/s0969-2126(96)00092-5
- Link H (2009): Rapid Media Transition for Metabolic Control Analysis of Fed-Batch Fermentation Processes. Dissertation Technische Universität München.

- 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. doi:10.1007/s11306-008-0114-6
- 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. doi:10.1002/btpr.290
- Link H, Büscher JM und Sauer U. (2012). Targeted and Quantitative Metabolomics in Bacteria. In Wipat A und Harwood C (Hrsg.), *Systems Biology of Bacteria* (Vol. 39, pp. 127–150).
- Link H, Fuhrer T, Gerosa L, Zamboni N und Sauer U (2015): Real-Time Metabolome Profiling of the Metabolic Switch between Starvation and Growth. *Nat Methods* 12(11):1091–1097. doi:10.1038/nmeth.3584
- 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. doi:10.1038/nbt.2489
- Liu L, Chen S und Wu J (2017): Phosphoenolpyruvate:Glucose Phosphotransferase System Modification Increases the Conversion Rate During L-Tryptophan Production in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44(10):1385–1395. doi:10.1007/s10295-017-1959-3
- Liu L, Duan X und Wu J (2016a): L-Tryptophan Production in *Escherichia coli* Improved by Weakening the Pta-AckA Pathway. *PLoS One* 11(6): e0158200. doi:10.1371/journal.pone.0158200
- Liu L, Duan X und Wu J (2016b): Modulating the Direction of Carbon Flow in *Escherichia coli* to Improve L-Tryptophan Production by Inactivating the Global Regulator FruR. *J Biotechnol* 231:141–148. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.06.008
- Liu Q, Cheng Y, Xie X, Xu Q und Chen N (2012): Modification of Tryptophan Transport System and Its Impact on Production of L-Tryptophan in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* 114:549–554. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.088
- Liu S-P, Xiao M-R, Zhang L, Xu J, Ding Z-Y, Gu Z-H und Shi G-Y (2013): Production of L-Phenylalanine from Glucose by Metabolic Engineering of Wild Type *Escherichia coli* W3110. *Proc Biochem* 48(3): 413–419. doi:10.1016/j.procbio.2013.02.016
- Lo TCY und Bewick MA (1978): The Molecular Mechanisms of Dicarboxylic Acid Transport in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 253(21):7826–7831.
- Lopes H und Rocha I (2017): Genome-Scale Modeling of Yeast: Chronology, Applications and Critical Perspectives. *FEMS Yeast Res* 17(5). doi:10.1093/femsyr/fox050
- Lu N, Zhang B, Cheng L, Wang J, Zhang S, Fu S, Xiao Y und Liu H (2017): Gene Modification of *Escherichia coli* and Incorporation of Process Control to Decrease Acetate Accumulation and Increase L-Tryptophan Production. *Ann Microbiol* 67(8):567–576. doi:10.1007/s13213-017-1289-8
- Luo Y, Zhang T und Wu H (2014): The Transport and Mediation Mechanisms of the Common Sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 32(5): 905–919. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.04.009
- Maarleveld TR, Wortel MT, Olivier BG, Teusink B und Bruggeman FJ (2015): Interplay between Constraints, Objectives, and Optimality for Genome-Scale Stoichiometric Models. *PLoS Comput Biol* 11(4). e1004166. doi:10.1371/journal.pcbi.1004166

- 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* 22:1071–1083.
- 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. doi:10.1016/j.ymben.2003.09.002
- Mairinger T, Tröndle J, Hanscho M, Hann S (2017): On-line clean-up and LC-MS analysis of primary metabolites in cell culture supernatants. *Anal Methods* 9:5703–5710.
- Majewski RA und Domach MM (1990): Simple Constrained-Optimization View of Acetate Overflow in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* 35:732–738.
- Marcellin E und Nielsen LK (2018): Advances in Analytical Tools for High Throughput Strain Engineering. *Curr Opin Biotechnol* 54:33–40. doi:10.1016/j.copbio.2018.01.027
- Martin HG, Kumar VS, Weaver D, Ghosh A, Chubukov V, Mukhopadhyay A, Arkin A und Keasling JD (2015): A Method to Constrain Genome-Scale Models with ¹³C Labeling Data. *PLoS Comput Biol* 11(9). e1004363. doi:10.1371/journal.pcbi.1004363
- 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. doi:10.1007/s10529-006-9218-0
- 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. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00144.x
- 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. doi:10.1016/j.ymben.2006.02.002
- 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-¹³C-Labeled Extracts. A New Method for Accurate Quantification of Changes in Concentrations of Intracellular Metabolites. *Biotechnol Bioeng* 85(6):620–628. doi:10.1002/bit.10907
- McCandliss RJ, Poling MD und Herrmann KM (1978): 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate-7-Phosphate Synthase. Purification and Molecular Characterization of the Phenylalanine-Sensitive Isoenzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 253:4259–4265.
- McCloskey D, Utrilla J, Naviaux RK, Palsson BO und Feist AM (2015): Fast Swinnex Filtration (FSF): A Fast and Robust Sampling and Extraction Method Suitable for Metabolomics Analysis of Cultures Grown in Complex Media. *Metabolomics* 11:198–209. doi:10.1007/s11306-014-0686-2
- Moco S, Vervoort J, Moco S, Bino RJ, De Vos RCH und Bino R (2007): Metabolomics Technologies and Metabolite Identification. *Trend Anal Chem* 26(9):855–866. doi:10.1016/j.trac.2007.08.003
- Monod J (1949): The Growth of Bacterial Cultures. *Annu Rev Microbiol* 3:371–394.
- Moussatova A, Kandt C, O'Mara ML und Tieleman DP (2008): ATP-Binding Cassette Transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1778(9):1757–1771. doi:10.1016/j.bbamem.2008.06.009
- Müller AC und Bockmayr A (2013): Fast Thermodynamically Constrained Flux Variability Analysis. *Bioinformatics* 29(7):903–909. doi:10.1093/bioinformatics/btt059

- Nagahari K, Tanaka T, Shishinuma F, Kuroda M und Sakaguchi K (1977): Control of Tryptophan Synthetase Amplified by Varying the Numbers of Composite Plasmids in *Escherichia coli* Cells. *Gene* 1:141–152.
- 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. doi:10.1016/j.ymben.2006.04.002
- 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. doi:10.1016/j.ymben.2007.07.001
- Nielsen J (1997): MCA of Biochemical Pathways Based on a Thermokinetic Description of Reaction Rates. *Biochem J* 321:133–138.
- Nikolaev YV, Kochanowski K, Link H, Sauer U und Allain FH (2016): Systematic Identification of Protein-Metabolite Interactions in Complex Metabolite Mixtures by Ligand-Detected Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* 55(18):2590–2600. doi:10.1021/acs.biochem.5b01291
- Niu H, Li R, Liang Q, Qi Q, Li Q und Gu P (2018): Metabolic Engineering for Improving L-Tryptophan Production in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. doi:10.1007/s10295-018-2106-5
- Noack S, Noh K, Moch M, Oldiges M und Wiechert W (2011): Stationary Versus Non-Stationary (13)C-MFA: A Comparison Using a Consistent Dataset. *J Biotechnol* 154(2–3):179–190. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.008
- Noack S und Wiechert W (2014): Quantitative Metabolomics: A Phantom? *Trends Biotechnol* 32(5):238–244. doi:10.1016/j.tibtech.2014.03.006
- Nöh K, Gronke K, Luo B, Takors R, Oldiges M und Wiechert W (2007): Metabolic Flux Analysis at Ultra Short Time Scale: Isotopically Non-Stationary C-13 Labeling Experiments. *J Biotechnol* 129(2): 49–267. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.11.015
- Noor E, Bar-Even A, Flamholz A, Reznik E, Liebermeister W und Milo R (2014): Pathway Thermodynamics Highlights Kinetic Obstacles in Central Metabolism. *PLoS Comput Biol* 10(2). e1003483. doi:10.1371/journal.pcbi.1003483
- Noor E, Haraldsdottir HS, Milo R und Fleming RM (2013): Consistent Estimation of Gibbs Energy Using Component Contributions. *PLoS Comput Biol* 9(7). e1003098. doi:10.1371/journal.pcbi.1003098
- 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* 20:1623–1633.
- Oldiges M und Takors R. (2005): Applying Metabolic Profiling Techniques for Stimulus-Response Experiments Chances and Pitfalls. In: Scheper, T (Hrsg.) *Technology Transfer in Biotechnology: From Lab to Industry to Production* (Vol. 92, pp. 173-196). Berlin: Springer-Verlag.
- Orth JD, Conrad TM, Na J, Lerman JA, Nam H, Feist AM und Palsson BO (2011): A Comprehensive Genome-Scale Reconstruction of *Escherichia coli* Metabolism. *Mol Syst Biol* 7(535). doi:10.1038/msb.2011.65

- Orth JD, Thiele I und Palsson BO (2010): What Is Flux Balance Analysis? *Nat Biotechnol* 28(3):245–248. doi:10.1038/nbt.1614
- Ortmayr K, Hann S und Koellensperger G (2015): Complementing Reversed-Phase Selectivity with Porous Graphitized Carbon to Increase the Metabolome Coverage in an on-Line Two-Dimensional LC-MS Setup for Metabolomics. *Analyt* 140(10):3465–3473. doi:10.1039/c5an00206k
- Palsson BO (2000): The Challenges of in Silico Biology. *Nat Biotechnol* 18:1147–1150.
- Panichkin VB, Livshits VA, Biryukova IV und Mashko SV (2017): Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for L-Tryptophan Production. *Appl Biochem Microbiol* 52(9):783–809. doi:10.1134/s0003683816090052
- Park NH und Rogers PL (1986): L-Phenylalanine Production in Continuous Culture Using a Hyperproducing Mutant of *Escherichia coli* K12. *Chem Eng Commun* 45(1–6):185–196. doi:10.1080/00986448608911382
- Park C-H, Park C-H, Lee Y-J, Lee S-Y, Oh H-B und Lee J-W (2011): Determination of the Intracellular Concentrations of Metabolites in *Escherichia coli* Collected During the Exponential and Stationary Growth Phases Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Bull Kor Chem Soc* 32(2): 524–530. doi:10.5012/bkcs.2011.32.2.524
- Perna NT, Glasner JD, Burland V und Plunkett Iii G (2002): The Genomes of *Escherichia coli* K-12 and Pathogenic *E. coli*. In Michael SD (Ed.), *Escherichia coli* (pp. 3-IV). San Diego: Academic Press.
- Pettigrew DW, Yu GJ und Liu Y (1990): Nucleotide Regulation of *Escherichia coli* Glycerol Kinase: Initial Velocity and Substrate Binding Studies. *Biochemistry* 29:8620–8627. doi:10.1021/bi00489a018
- Piazza I, Kochanowski K, Cappelletti V, Fuhrer T, Noor E, Sauer U und Picotti P (2018): A Map of Protein-Metabolite Interactions Reveals Principles of Chemical Communication. *Cell* 172(1–2):358–372 e323. doi:10.1016/j.cell.2017.12.006
- Postma PW, Lengeler JW und Jacobson GR (1993): Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. *Microbiol Rev* 57(3):543–594.
- Price ND, Famili I, Beard DA und Palsson BO (2002): Extreme Pathways and Kirchhoff's Second Law. *Biophys J* 83:2879-2882.
- Price ND, Reed JL und Palsson BO (2004): Genome-Scale Models of Microbial Cells: Evaluating the Consequences of Constraints. *Nat Rev Microbiol* 2(11):886–897. doi:10.1038/nrmicro1023
- Prigent S, Nielsen JC, Frisvad JC und Nielsen J (2018): Reconstruction of 24 *Penicillium* Genome-Scale Metabolic Models Shows Diversity Based on Their Secondary Metabolism. *Biotechnol Bioeng* 115(10): 2604–2612. doi:10.1002/bit.26739
- Quek LE, Wittmann C, Nielsen LK und Kromer JO (2009): Openflux: Efficient Modelling Software for ¹³C-Based Metabolic Flux Analysis. *Microb Cell Fact* 8(25). doi:10.1186/1475-2859-8-25
- Rabinowitz JD und Kimball E (2007): Acidic Acetonitrile for Cellular Metabolome Extraction from *Escherichia coli*. *Anal Chem* 79:6167–6173.
- Reed JL und Palsson BO (2003): Thirteen Years of Building Constraint-Based *in silico* Models of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185(9):2692–2699. doi:10.1128/jb.185.9.2692-2699.2003

- Reznik E, Christodoulou D, Goldford JE, Briars E, Sauer U, Segre D und Noor E (2017): Genome-Scale Architecture of Small Molecule Regulatory Networks and the Fundamental Trade-Off between Regulation and Enzymatic Activity. *Cell Rep* 20(11):2666–2677. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.066
- Robinson MS, Easom RA, Danson MJ und Weitzmann PDJ (1983): Citrate Synthase of *Escherichia coli*. Characterisation of the Enzyme from a Plasmid-Cloned Gene and Amplification of the Intracellular Level. *FEBS Letters* 154(1):51–54.
- Rodriguez A, Martinez J, 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). doi:10.1186/s12934-014-0126-z
- Rowlands RT (1984): Industrial Strain Improvement: Mutagenesis and Random Screening Procedures. *Enzyme Microb Technol* 6:3–10.
- 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*. *Bioproc Biosyst Eng* 26(4):239–248. doi:10.1007/s00449-004-0354-4
- San Roman M, Cancela H und Acerenza L (2014): Source and Regulation of Flux Variability in *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol* 8(67). doi:10.1186/1752-0509-8-67
- Sauer DB, Zeng W, Canty J, Lam Y und Jiang Y (2013): Sodium and Potassium Competition in Potassium-Selective and Non-Selective Channels. *Nat Commun* 4(2721). doi:10.1038/ncomms3721
- Sauer U (2006): Metabolic Networks in Motion: ¹³C-Based Flux Analysis. *Mol Syst Biol* 2(62). doi:10.1038/msb4100109
- 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. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.002
- Schädel F, David F und Franco-Lara E (2011): Evaluation of Cell Damage Caused by Cold Sampling and Quenching for Metabolome Analysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 92(6):1261–1274. doi:10.1007/s00253-011-3377-1
- Schaub J, Schiesling C, Reuss M und Dauner M (2006): Integrated Sampling Procedure for Metabolome Analysis. *Biotechnol Prog* 22:1434–1442.
- 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 BO (2011): Quantitative Prediction of Cellular Metabolism with Constraint-Based Models: The Cobra Toolbox v2.0. *Nat Protoc* 6(9):1290–1307. doi:10.1038/nprot.2011.308
- Schilling CH, Edwards JS, Letscher D und Palsson BO (2001): Combining Pathway Analysis with Flux Balance Analysis for the Comprehensive Study of Metabolic Systems. *Biotechnol Bioeng* 71(4):286–306. doi:10.1002/1097-0290(2000)71:4<286::aid-bit1018>3.0.co;2-r
- Schmid JW, Mauch K, Reuss M, Gilles ED und Kremling A (2004): Metabolic Design Based on a Coupled Gene Expression-Metabolic Network Model of Tryptophan Production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 6(4):364–377. doi:10.1016/j.ymben.2004.06.003
- Schmitz M, Hirsch E, Bongaerts J und Takors R (2002): Pulse Experiments as a Prerequisite for the Quantification of *in vivo* Enzyme Kinetics in Aromatic Amino Acid Pathway of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 18:935–941.

- Schoner R und Herrmann KM (1976): 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate-7-Phosphate-Synthase. *J Biol Chem* 251(18):5440–5447.
- 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: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen. Basel: Birkhäuser Verlag.
- 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. doi:10.1074/jbc.M008061200
- 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). doi:10.1155/2012/605219
- Sikkema J, De Bont JAM und Poolman B (1995): Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59(2):201–222.
- Simeonidis E und Price ND (2015): Genome-Scale Modeling for Metabolic Engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42(3):327–338. doi:10.1007/s10295-014-1576-3
- Smallbone K und Simeonidis E (2009): Flux Balance Analysis: A Geometric Perspective. *J Theor Biol* 258(2):311–315. doi:10.1016/j.jtbi.2009.01.027
- Snell KD, Draths KM und Frost JW (1996): Synthetic Modification of the *Escherichia coli* Chromosome: Enhancing the Biocatalytic Conversion of Glucose into Aromatic Chemicals. *J Am Chem Soc* 118:5605–5614.
- Sprenger GA. (2006). Aromatic Amino Acids. In: Wendisch VF (Hrsg.), Amino Acid Biosynthesis - Pathways, Regulation and Metabolic Engineering (pp. 93–127). Springer.
- 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 Biotech* 75(4):739–749. doi:10.1007/s00253-007-0931-y
- Sprenger GA (2017): Glycerol as Carbon Source for Production of Added-Value Compounds. In: Gosset G (Hrsg.), Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources (pp. 93–123). Springer. doi:10.1007/978-3-319-51729-2_4
- Stephanopoulos G (1999): Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering. *Metab Eng* 1(1):1–11. doi:10.1006/mben.1998.0101
- Stephanopoulos GN, Aristidou AA und Nielsen J. (1998): Metabolic Engineering - Principles and Methodologies. San Diego: Academic Press.
- Stroud RM, Nollert P und Miercke L (2003): The Glycerol Facilitator GlpF, Its Aquaporin Family of Channels, and Their Selectivity. *Adv Protein Chem* 63:291–316.
- Stryer L, Tymoczko JL und Berg JM. (2007): Biochemistry (6. Ausgabe). New York: W. H. Freeman and Company.
- Sun Z, Do PM, Rhee MS, Govindasamy L, Wang Q, Ingram LO und Shanmugam KT (2012): Amino Acid Substitutions at Glutamate-354 in Dihydrolipoamide Dehydrogenase of *Escherichia coli* Lower the Sensitivity of Pyruvate Dehydrogenase to NADH. *Microbiology* 158(5):1350–1358. doi:10.1099/mic.0.055590-0

- Tatarko M und Romeo T (2001): Disruption of a Global Regulatory Gene to Enhance Central Carbon Flux into Phenylalanine Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 43(1):26–32. doi:10.1007/s002840010255
- 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. doi:10.1016/j.ab.2008.11.018
- 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. doi:10.1016/j.ymben.2011.03.003
- 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 Microb Biot* 28(10):2937–2943.
- Thorner JW und Paulus H (1973): Catalytic and Allosteric Properties of Glycerol Kinase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 248(11):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 Microb* 38(2):181–190.
- Toulouse C, Metesch K, Pfannstiel J, Steuber J (2018): Metabolic reprogramming of *Vibrio cholerae* impaired in respiratory NADH oxidation is accompanied with increased copper sensitivity. *J Bacteriol* 200(15):JB.00761-17. doi: 10.1128/JB.00761-17
- Tröndle J, Albermann C, Weiner M, Sprenger GA, Weuster-Botz D (2018): Phosphoenolpyruvate Transporter Enables Targeted Perturbation During Metabolic Analysis of L-Phenylalanin Production with *Escherichia coli*. *Biotechnol J* 13(5):1700611. doi: 10.1002/biot.201700611
- Tröndle J, Trachtmann N, Sprenger GA, Weuster-Botz D (2018): Fed-batch Production of L-tryptophan from glycerol using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 115(12):2881–2892. doi: 10.1002/bit.26834
- van Gulik WM (2010): Fast Sampling for Quantitative Microbial Metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* 21(1):27–34. doi:10.1016/j.copbio.2010.01.008
- Van Gulik WM, Canelas AB, Seifar RM und Heijnen JJ. (2013). The Sampling and Sample Preparation Problem in Microbial Metabolomics. In: Lämmerhofer M und Weckwerth W (Hrsg.), *Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data*. (pp. 1–19): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Visser D und Heijnen JJ (2002): The Mathematics of Metabolic Control Analysis Revisited. *Metab Eng* 4(2):114–123. doi:10.1006/mben.2001.0216
- Visser D und Heijnen JJ (2003): Dynamic Simulation and Metabolic Re-Design of a Branched Pathway Using Linlog Kinetics. *Metab Eng* 5:164–176. doi:10.1016/S1096-7176(03)00025-9

- Visser D, van Zuylen GA, van Dam JC, Eman MR, Proll 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. doi:10.1002/bit.20235
- Wahl A, El Mossaoudi M, Schipper D, Wiechert W und Takors R (2004): Serial ¹³C Based Flux Analysis of an L-Phenylalanine-Producing *E. coli* Strain Using the Sensor Reactor. *Biotechnol Progr* 20:706–714.
- Wang J, Cheng LK, Wang J, Liu Q, Shen T und Chen N (2013): Genetic Engineering of *Escherichia coli* to Enhance Production of L-Tryptophan. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(17):7587–7596. doi:10.1007/s00253-013-5026-3
- Wang L, Birol I und Hatzimanikatis V (2004): Metabolic Control Analysis under Uncertainty: Framework Development and Case Studies. *Biophys J* 87(6):3750–3763. doi:10.1529/biophysj.104.048090
- Weaver D, Keseler IM, Mackie A, Paulsen I und Karp PD (2014): A Genome-Scale Metabolic Flux Model of *Escherichia coli* K-12 Derived from the EcoCyc Database. *BMC Syst Biol* 8(79).
- Weiner M (2015): Metabolische Kontrollanalyse der mikrobiellen L-Phenylalanin-Herstellung im Zulaufverfahren. Dissertation Technische Universität München.
- Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014a): Improvement of Constraint-Based Flux Estimation During L-Phenylalanine Production with *Escherichia coli* Using Targeted Knock-out Mutants. *Biotechnol Bioeng* 111(7):1406–1416. doi:10.1002/bit.25195
- Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014b): Carbon Storage in Recombinant *Escherichia coli* During Growth on Glycerol and Lactic Acid. *Biotechnol Bioeng* 111(12):2508–2019. doi:10.1002/bit.25306
- Weiner M, Albermann C, Gottlieb K, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2014c): Fed-Batch Production of L-Phenylalanine from Glycerol and Ammonia with Recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 83:62–69. doi:10.1016/j.bej.2013.12.001
- Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2016): Perturbation Experiments: Approaches for Metabolic Pathway Analysis in Bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 152:91–136. doi:10.1007/10_2015_326
- Weiner M, Tröndle J, Schmideder A, Albermann C, Binder K, Sprenger G und Weuster-Botz D (2015): Parallelized Small-Scale Production of Uniformly ¹³C-Labeled Cell-Extract for Quantitative Metabolome Analysis. *Anal Biochem* 478:134–140. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.008
- Weiner M, Tröndle J, Albermann C, Sprenger GA und Weuster-Botz D (2017): Metabolic Control Analysis of L -Phenylalanine Production from Glycerol with Engineered *E. coli* Using Data from Short-Term Steady-State Perturbation Experiments. *Biochem Eng J* 126:86–100. doi:10.1016/j.bej.2017.06.016
- Weuster-Botz D (1997): Sampling Tube Device for Monitoring Intracellular Metabolite Dynamics. *Anal Chem* 246:225–233.
- Wiechert W (2001): ¹³C Metabolic Flux Analysis. *Metab Eng* 3(3):195–206. doi:10.1006/mben.2001.0187
- Wiechert W und Nöh K (2013): Isotopically Non-Stationary Metabolic Flux Analysis: Complex yet Highly Informative. *Curr Opin Biotechnol* 24(6):979–986. doi:10.1016/j.copbio.2013.03.024

- 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. doi:10.1021/ac7023409
- Woolston BM, Edgar S und Stephanopoulos G (2013): Metabolic Engineering: Past and Future. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 4:259–288. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061312-103312
- 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. doi:10.1016/j.ymben.2005.09.005
- 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 C-13-Labeled Cell Extracts as Internal Standards. *Anal Biochem* 336(2):164–171. doi:10.1016/j.ab.2004.09.001
- Wu L, Wang W, Van Winden WA, Van Gulik WM 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. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04269.x
- Xu N, Ye C und Liu L (2018): Genome-Scale Biological Models for Industrial Microbial Systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(8):3439–3451. doi:10.1007/s00253-018-8803-1
- 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. doi:10.1007/s00253-007-1307-z
- Yan N (2015): Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annu Rev Biophys* 44:257–283. doi:10.1146/annurev-biophys-060414-033901
- Yanofsky C, Horn V und Gollnick P (1991): Physiological Studies of Tryptophan Transport and Tryptophanase Operon Induction in *Escherichia Coli*. *J Bacteriol* 173:6009–6017.
- Yanofsky C (2003): Using Studies on Tryptophan Metabolism to Answer Basic Biological Questions. *J Biol Chem* 278(13):10859–10878. doi:10.1074/jbc.X200012200
- Yazdani SS und Gonzalez R (2007): Anaerobic Fermentation of Glycerol: A Path to Economic Viability for the Biofuels Industry. *Curr Opin Biotechnol* 18(3):213–219. doi:10.1016/j.copbio.2007.05.002
- Yizhak K, Benyamini T, Liebermeister W, Ruppin E und Shlomi T (2010): Integrating Quantitative Proteomics and Metabolomics with a Genome-Scale Metabolic Network Model. *Bioinformatics* 26(12):255–260. doi:10.1093/bioinformatics/btq183
- Zamboni N, Fendt SM, Ruhl M und Sauer U (2009): (13)C-Based Metabolic Flux Analysis. *Nat Protoc* 4(6):878–892. doi:10.1038/nprot.2009.58
- Zamboni N, Kuemmel A und Heinemann M (2008): anNET: A Tool for Network-Embedded Thermodynamic Analysis of Quantitative Metabolome Data. *BMC Bioinformatics* 9(199). doi:10.1186/1471-2105-9-199

- Zamboni N und Sauer U (2009): Novel Biological Insights through Metabolomics and ^{13}C -Flux Analysis. *Curr Opin Microbiol* 12(5):553–558. doi:10.1016/j.mib.2009.08.003
- Zhao C, Cheng L, Xu Q, Wang J, Shen Z und Chen N (2015): Improvement of the Production of L-Tryptophan in *Escherichia coli* by Application of a Dissolved Oxygen Stage Control Strategy. *Ann Microbiol* 66(2):843–854. doi:10.1007/s13213-015-1172-4
- Zhao GS und Winkler ME (1996): A Novel Alpha-Ketoglutarate Reductase Activity of the SerA-Encoded 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase of *Escherichia coli* K12 and Its Possible Implications for Human 2-Hydroxyglutaric Aciduria. *J Biochem* 178(1):232–239.
- Zhao ZJ, Zou C, Zhu YX, Dai J, Chen S, Wu D, Wu J und Chen J (2011): Development of L-Tryptophan Production Strains by Defined Genetic Modification in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(12):1921–1929. doi:10.1007/s10295-011-0978-8
- 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. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.043

9 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BTM	Biotrockenmasse
CPR	Kohlendioxidbildungsrate , <i>carbon production rate</i> ‘
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBA	Flussbilanzanalyse
FVA	Flussvarianzanalyse
<i>gFBA</i>	Geometrische Flussbilanzanalyse
HPLC	Flüssigkeitschromatographie , <i>high performance liquid chromatography</i> ‘
IDMS	, <i>isotope dilution mass spectrometry</i> ‘
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
GC	Gaschromatographie
kan	Kanamycin
LB	, <i>lysogeny broth</i> ‘ Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie
MCA	Metabolische Kontrollanalyse , <i>metabolic control analysis</i> ‘
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometer
OD	Optische Dichte
OTR	Sauerstoffeintragsrate , <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> ‘
RQ	Respirationskoeffizient
TBA	Tributylamin
TEA	Triethanolamin
Tfb	Transformationspuffer
U- ¹³ C	Uniform ¹³ C-markiert
UHPLC	Flüssigkeitschromatographie , <i>ultrahigh performance liquid chromatography</i> ‘
VE	Vollentsalzt

Metabolite

13DPG	1,3-Bisphosphoglycerat
2CDR5P	Carboxyphenylamino-Desoxyribulose-5-Phosphat
2PG	2-Phosphoglycerat
3DHQ	3-Dehydroquinat
3DHS	3-Dehydroshikimat
3IG3P	Indol-3-Glycerinphosphat
3PG	3-Phosphoglycerat
3PHP	3-Phosphohydroxypyruvat
3PSME	5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat
6PG	6-Phosphogluconat
AC	Acetat
AcCoA	Acetyl-CoenzymA
ActP	Acetyl-Phosphat

AKG	α -Ketoglutarat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANTH	Anthranilat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosinmonophosphat
CHOR	Chorismat
CIT	Citrat
CoA	CoenzymA
DAHP	3-Deoxy-D-Arabino-Heptulose-7-Phosphat
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EtOH	Ethanol
F6P	Fructose-6-Phosphat
FAD	Flavinadeninukleotid oxidiert
FADH ₂	Flavinadeninukleotid reduziert
FBP	Fructose-1,6-Bisphosphat
FOR	Formiat
FUM	Fumarat
G3P	Glycerinaldehydphosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GLX	Glyoxylat
GLY3P	Glycerin-3-Phosphat
GLYC	Glycerin
HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
ICIT	Isocitrat
IND	Indol
LAK	Laktat
L-Gln	L-Glutamin
L-Glut	L-Glutamat
L-Phe	L-Phenylalanin
L-PSer	Phospho-L-Serin
L-Ser	L-Serin
L-Trp	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosin
MAL	L-Malat
NAD	Nikotinamidadeninukleotid oxidiert
NADH	Nikotinamidadeninukleotid reduziert
NADP	Nikotinamidadeninukleotidphosphat oxidiert
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidphosphat reduziert
OAA	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHPYR	Phenylpyruvat
PP _i	Pyrophosphat
PPHN	Prephenat

PRAN	Phosphoribosylanthranilat
PRPP	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
PYR	Pyruvat
Q8	Ubiquinol oxidiert
Q8H ₂	Ubiquinol reduziert
R5P	Ribose-5-Phosphat
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
SHK	Shikimat
SHK3P	Shikimat-3-Phosphat
SUC	Succinat
SuccCoA	Succinyl-CoenzymA
X5P	Xylose-5-Phosphat

Reaktionen/ katalysierende Enzyme

3dhsdh	3-Dehydroshikimat-Dehydrogenase
ack	Acetat-Kinase
aconit	(Iso-)Citrat-Hydrolase-Komplex
adh	Alkohol-Dehydrogenase
akgdh	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
anprt	Anthranilat-Phosphoribosyl-Transferase
ans	Anthranilat-Synthase
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
igps	Indol-3-Glycerin-Phosphat-Synthase
lacdh	Laktat-Dehydrogenase
mals	Malat-Synthase

mdh	Malat-Dehydrogenase
me	Malat-Enzyme ‚ <i>malic enzymes</i> ‘
nadh6	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase
oaadc	Oxalacetat-Dehydrogenase
pdh	Pyruvat-Dehydrogenase
pfk	Phosphofructo-Kinase
pfl	Pyruvat-Formiat-Lyase
pgcd	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase
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
prali	Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase
prpps	Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase
psevt	5-Enolpyruvoylshikimat-3-Phosphat-Synthase
psert	3-Phosphoserin-Aminotransferase
psp_L	Phosphoserin-Phosphatase
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
tkt1	Transketolase 1
tkt2	Transketolase 2
trps2	Tryptophan-Synthase
trps3	Indol-Glycerin-Phosphat-Aldolase
tyrta	L-Tyrosin-Aminotransferase

10 Anhang

10.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Tabelle 10.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
Acetic Acid	49199	Fluka
Acetonitril LC grade	4722.2	Carl Roth
Acetonitril LC-MS grade	34967	Fluka
Acetyl-CoA-Trilithiumsals	10101893001	Roche
Adenosindiphosphat Natriumsalz	A2754	Sigma-Aldrich
Adenosinmonophosphat Natriumsalz	A1752	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat Dinatriumsalz	A2383	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	6494.3	Carl Roth
Aluminium(III)chlorid-Hexahydrat	1.01084.1000	Merck
α -Ketoglutarat	75890	Fluka
Ammoniaklösung 25 %	86941	Labochem
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	0268.3	Carl Roth
Ammoniumsulfat	59BA93A2	Carl Roth
Antifoam 204	A6125	Sigma-Aldrich
Anthranilat	A89855	Sigma-Aldrich
Bernsteinsäure-Dinatriumsalz-Hexahydrat	8.20151.0500	Merck
BICIN (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-glycin	9162.1	Sigma-Aldrich
Borsäure	1.00165.0500	Merck
Brenztraubensäure Natriumsalz	8793.2	Carl Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	1.02382.500	Merck
Carboxyphenylamino-Desoxyribulose-5-Phosphat Bariumsals	-	Universität Stuttgart
Chorismat	C1761	Sigma-Aldrich
DL-Isocitrat Trinatriumsalz	I1252	Sigma-Aldrich
Cobaltchlorid-Hexahydrat	1.02539.0250	Merck
3-Dehydro-Shikimat	05616	Sigma-Aldrich
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	1.03965.0500	Merck
Essigsäure	49199	Fluka
Ethanol 99 %	9065.1	Carl Roth
Triethanolaminhydrochlorid	T1502	Sigma-Aldrich
Fumarat	8.00269.0100	Merck
U- ¹³ C-Glucose	CLM-1396-10	Eurisotop
Glucose-Monohydrat	6887.5	Carl Roth
DL-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Lösung	94124	Sigma-Aldrich
Glycerin 99,5 %	3783.2	Carl Roth
Glycerin-3-Phosphat Lithiumsals	94124	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	2363.3	Carl Roth
Dihydroxyacetonphosphat Dilithiumsals	D7137	Sigma-Aldrich
Indol	I3408	Sigma-Aldrich
Indol-3-Glycerinphosphat	-	Universität Stuttgart
Iodessigsäure	I4386	Sigma-Aldrich
Isopropyl- β -D-thiogalactopyrasonid	I122GR100	neoFroxx
Kaliumacetat	T874.5	Carl Roth

Fortsetzung Tabelle 10.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Kaliumchlorid	6781.2	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	593E89B0	Labochem
Di-Kaliumhydrogenphosphat	P749.3	Carl Roth
Kaliumhydroxid	5800C914	Labochem
Kanamycinsulfat	T832.3	Carl Roth
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	1.02733.0250	Merck
L-Malat	8.00384.0050	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	T888.3	Carl Roth
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat	25222.233	VWR
Mangan(II)sulfat-Monohydrat	4487.1	Carl Roth
Methanol LC grade	8402	J. T. Baker
Methanol LC-MS grade	34966	Fluka
3-Mercaptopropionsäure	63768	Sigma-Aldrich
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure) Natriumsalz	6979.2	Carl Roth
Natriumacetat-Trihydrat	6773.2	Carl Roth
Natriumchlorid	S3014	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	HN13.2	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	A3559	AppliChem
Natrium-DL-Laktat	L1375	Sigma-Aldrich
Di-Natrium-Flavinadenindinukleotid-Hydrat	F6625	Sigma-Aldrich
Natriumformiat	036424	Alka Aesar
Tri-Natrium-Fructose-1,6-Bisphosphat	F6803	Sigma-Aldrich
Di-Natrium-Fructose-6-Phosphat-Hydrat	T3627	Sigma-Aldrich
Natrium-D-Glucose-6-Phosphat	G7879	Sigma-Aldrich
Natrium-L-Glutamat-Monohydrat	1.06445.1000	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	A1372.9010	Applichem
Natriumhydroxid	P031.2	Carl Roth
Natriummolybdat-Dihydrat	1.06521.0250	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
Natriumsulfat	P032.3	Carl Roth
NAD	13814528	Roche
NADH Dinatriumsalz	10107735001	Roche
NADP Dinatriumsalz	10128031001	Roche
NADPH Tetranatriumsalz	10107824001	Roche
Pepton aus Casein	70172	Fluka
L-Phenylalanin	1709.2	Carl Roth
Phosphoenolpyruvat Kaliumsalz	A2271	Applichem
6-Phosphogluconat Trinatriumsalz	P7877	Sigma-Aldrich
3-Phosphoglycerat Dinatriumsalz	P8877	Sigma-Aldrich
ortho-Phosphorsäure 85 %	6366.2	Carl Roth
o-Phospho-L-Serin	P0878	Sigma-Aldrich
ortho-Phtaldialdehyd	5980.1	Carl Roth
Prephenat Bariumsalz	P2384	Sigma-Aldrich
2-Propanol LC grade	34959	Sigma-Aldrich

Fortsetzung Tabelle 10.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

2-Propanol LC-MS grade	AE73.2	Carl Roth
Rubidiumchlorid	4471.1	Carl Roth
Salzsäure 37 %	10314253	Honeywell
Schwefelsäure 95–97 %	LC-7099.1	Labochem
Sedoheptulose-7-phosphat Lithiumsalz	78832	Sigma-Aldrich
L-Serin	S4500	Sigma-Aldrich
Shikimat	S5375	Sigma-Aldrich
Shikimat-3-Phosphat	-	Universität Stuttgart
Succinyl-CoenzymA Natriumsalz	S1129	Sigma-Aldrich
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	101380754	Sigma-Aldrich
Thiamin-Hydrochlorid	T4625	Sigma-Aldrich
Tributylamin	90871	Sigma-Aldrich
TRIS	2449.3	Carl Roth
L-Tryptophan	T0254	Sigma-Aldrich
L-Tyrosin	1741.2	Carl Roth
Wasser LC-MS grade	1608874	LGC Standards
Zinksulfat-Heptahydrat	1.08883.0500	Merck

Tabelle 10.2: Zusammenstellung der verwendeten Einzelgeräte.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Autoklav	Systec GmbH	VX 150
Autoklav	H+P Labortechnik GmbH	Varioklav EC Zyklondampf
Feinwaage	Sartorius AG	Extend
Gefriertrocknungsanlage	Martin Christ GmbH	Alpha 1-2 LD
Inkubator	Infors HT	Multitron AJ119
Inkubator	Binder GmbH	Modell 28
Kryostat	MGW Lauda	Ultra-Kryomat K90W
Magnetrührer	Neolab	D-6010
Mikrotiterplattenphotometer	Thermo Fisher Scientific	Multiscan FC
pH-Meter	Schott Instruments AG	Lab 850
Photometer	Thermo Fisher Scientific	Spectronic Genesys 10S UV-VIS
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific	Herasafe KS
Sterilbank	Waldner Laboreinrichtungen	SWB Klasse 1 FAZ 3
Thermo-Magnetührplatte	witeg	WiseStir SMHS-6
Trockenschrank	Binder GmbH	90100080
Ultraschallbad	Schalltec GmbH	Sonorex Super RK510H
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH	Laboport
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG	Reax Top
Waage	Ohaus GmbH	E1M213 SNR 1120081093
Wasserbad	JULABO Labortechnik GmbH	EH
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Mikro 20
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Rotanta 460R
Zentrifuge	Heraeus	Rotixa 50 RS

Tabelle 10.3: Bestandteile der HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Aminosäuren.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Fluoreszenz-Detektor	Shimadzu	RF-20A
Manager	Knauer GmbH	Smartline 5000
Ofen	Knauer GmbH	Jet Stream
Probengeber	Spark	Midas Cool
Pumpe	Knauer GmbH	Smartline 1000
Software	Knauer GmbH	Chromgate 3.1
Trennsäule	Phenomenex	Gemini® 5 µm C18 110 Å LC Column 150 x 4.6 mm
Vorsäule	Phenomenex	SecurityGuard Cartridges Gemini C18 4 x 3.0 mm

Tabelle 10.4: Laufmittel-Gradient der HPLC-Methode zur Quantifizierung von Aminosäuren.

Zeit, min	Laufmittel A, %	Laufmittel B, %
0,00	100	0
3,00	100	0
8,50	75	25
28,50	60	40
30,00	60	40
30,02	0	100
32,00	0	100
32,02	20	80
34,00	20	80
38,00	100	0
43,00	100	0

Tabelle 10.5: Bestandteile der HPLC-Anlage zur Quantifizierung organischer Säuren, Alkohole und Zucker.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Manager	Agilent Technologies	Agilent 1100 Series
Ofen	Spark-Holland	Mistral
Probengeber	Agilent Technologies	Agilent 1100 Series
Pumpe	Agilent Technologies	Agilent 1100 Series
RI-Detektor	Agilent Technologies	Agilent 1200 Series
Software	Agilent Technologies	ChemStation B.04.03
Trennsäule	Bio-Rad	Aminex HPX-87H Column, 300 x 7,8 mm, 125-0140
Vorsäule	Bio-Rad	Micro-Guard Cation H Cartridge 125-0129

Tabelle 10.6: Bestandteile der HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Phosphoenolpyruvat.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Entgaser	Thermo Finnigan	Spectra System SCM 1000
Ofen	Spark-Holland	Mistral
Probengeber	Thermo Finnigan	Spectra System AS3000
Pumpe	Thermo Finnigan	Spectra System P1100
Software	Thermo Finnigan	Excalibur 1.2
Trennsäule	Merck	Hibar 125-4 Purospher Star RP-18 encapped (5 µm)
UV-Detektor	Thermo Finnigan	TSP UV6000

Tabelle 10.7: Bestandteile der UHPLC-MS (Tripel-Quadrupol) Anlage.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific	TSQ Vantage
Ofen	Mayland	MistraSwitch
Pumpe und Entgaser	Thermo Fisher Scientific	Accella
Probengeber	CTC Analytics	PAL CTC
Software	Thermo Fisher Scientific	LCQ Tune Plus X
Software	Thermo Fisher Scientific	Excalibur 2.2
Trennsäule	Waters Corporation	Acquity HSS T3, 150 mm x 2,1 mm x 1,8 µm
Vorsäule	Waters Corporation	VanGuard 2,1 mm x 5,0 mm

Tabelle 10.8: Laufmittel-Gradient der UHPLC-Methode zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite.

Zeit, min	Gesamt-Flussrate, mL min ⁻¹	Laufmittel A, %	Laufmittel B, %
0	0,40	100	0
5	0,40	100	0
10	0,40	98	2
11	0,35	91	9
16	0,25	91	9
18	0,25	75	25
19	0,15	50	50
25	0,15	50	50
26	0,15	100	0
32	0,40	100	0
36	0,40	100	0

Tabelle 10.9: Bestandteile der 42 L-Rührkesselreaktor-Anlage.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Abgasanalytik	ABB Germany	EasyLine
Abluftfilter	Pall	AB05PFR2PVH4
Drucksonde	Keller	PR-25HT8931A
Gelöstsauerstoff-Elektrode	Mettler Toledo	InPro6820/25/080/1111112
pH-Elektrode	Mettler Toledo	405-DPAS-SC-K8SH50
42 L-Reaktor	Infors HT	Fermenter TV42L K1577
Schlauchpumpe	Ismatec	Ecoline VC-360
Schlauchpumpe	Watson-Marlow	BVP 501U
Software	Infors HT	Iris V4.0
Zulaufwaage	Mettler Toledo	Viper SW 35 IntCal
Zuluftfilter	Pall	EMFLONRII

Tabelle 10.10: Bestandteile des Vierfach-Parallelbioreaktorsystems.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Abgasanalytik (4x)	ABB Germany	EL 2030
Gasmischstation (4x)	Eppendorf	MX4/1
Gelöstsauerstoffsonde (4x)	Hamilton	Visiform DO Sensor
pH-Elektrode (4x)	Mettler Toledo	405-DPAS-SC-K8S/225
Pumpeneinheit (2x)	Eppendorf	DASGIP MP8
1000 mL-Reaktionsgefäß (4x)	Eppendorf	DASGIP GPI-100
Rührmotor (4x)	Eppendorf	DASGIP Overhead Drive Microbiology
Sensoreinheit für pH und DO	Eppendorf	DASGIP PH4 PO4
Software	Eppendorf	DASGIP Control V4.5
Steuereinheit Temperatur und Rührer	Eppendorf	DASGIP TC4 SC4
Zu- und Abluftfilter (8x)	Sartorius Stedim	Midisart 2000

Tabelle 10.11: Bestandteile des 48fach-Parallelbioreaktorsystems.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Bioreaktorblock mit Sterilgasabdeckung und Rührer	2mag AG	bioReactor48
Einwegreaktor	PreSens Precision Sensing GmbH	HTBD
Heizbad	Thermo Fisher Scientific	Haake W15
Optosensorik	PreSens Precision Sensing GmbH	Multichannel Reader for pH and oxygen
Software	DASGIP AG	Fedbatch XP 1.0.213
Gasmischstation	Westphal Mess- und Regeltechnik GmbH	Brooks 5850S

10.2 Stoffflussberechnungen

Tabelle 10.12: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Glucose. Die Werte wurden durch geometrische Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (min: unterste Grenze, max: oberste Grenze) ermittelt. Die Reaktionsnamen und -Richtungen sind dem *E. coli* Modell *iAF1260* entnommen. Alle Werte sind in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ gegeben mit Ausnahme der Wachstumsrate μ in h^{-1} . Gluc A, Gluc B, Gluc C: Zulaufstufen im Analysenreaktor.

	Gluc A			Gluc B			Gluc C		
	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max
EX_glc(e)	-1,016	-0,998	-0,981	-1,832	-1,800	-1,768	-2,604	-2,559	-2,514
GLCptspp	0,980	0,998	1,016	1,767	1,800	1,832	2,513	2,559	2,604
EX_glyc(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GLYK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G3PD2	-0,009	-0,008	-0,008	-0,018	-0,016	-0,015	-0,026	-0,022	-0,020
PGI	0,980	0,998	1,016	1,466	1,510	1,553	1,976	2,155	2,334
PFK	0,905	0,930	0,955	1,466	1,511	1,556	2,014	2,136	2,258
FBP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FBA	0,905	0,930	0,955	1,466	1,511	1,556	2,014	2,136	2,258
TPI	0,897	0,921	0,946	1,451	1,495	1,539	1,992	2,113	2,234
PGK	-1,868	-1,821	-1,774	-3,126	-3,042	-2,958	-4,501	-4,299	-4,098
PGCD	0,112	0,122	0,131	0,280	0,298	0,315	0,386	0,435	0,484
PSERT	0,112	0,122	0,131	0,280	0,298	0,315	0,386	0,435	0,484
PSP_L	0,112	0,122	0,131	0,280	0,298	0,315	0,386	0,435	0,484
PPC	0,000	0,162	0,185	0,323	0,346	0,369	0,415	0,479	0,542
PPCK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ENO	1,649	1,699	1,750	2,654	2,744	2,835	3,629	3,864	4,100
PPS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PYK	0,405	0,456	0,639	0,252	0,323	0,395	0,144	0,399	0,655
PDH	1,262	1,309	1,464	1,421	1,626	1,831	1,388	1,853	2,319
CS	1,083	1,106	1,128	1,379	1,438	1,498	1,455	1,650	1,847
ACONT	1,083	1,106	1,128	1,379	1,438	1,498	1,455	1,650	1,846
ICDHyr	0,921	1,095	1,128	1,378	1,438	1,498	1,454	1,650	1,846
AKGDH	0,862	1,032	1,061	1,257	1,312	1,367	1,298	1,477	1,655
SUCOAS	-1,028	-1,001	-0,834	-1,303	-1,251	-1,199	-1,561	-1,392	-1,222
SUCDi	1,024	1,043	1,061	1,258	1,313	1,367	1,299	1,477	1,655
FUM	1,081	1,104	1,126	1,375	1,434	1,494	1,450	1,645	1,840
MDH	1,081	1,115	1,266	1,375	1,434	1,494	1,450	1,645	1,841
ICL	0,000	0,011	0,162	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001
MALS	0,000	0,011	0,162	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001
PFL	0,000	0,000	0,000	0,084	0,262	0,441	0,501	0,803	1,105
PTAr	-0,036	-0,034	-0,032	-0,006	-0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
ACKr	0,032	0,034	0,036	0,000	0,002	0,006	0,000	0,000	0,000
EX_lac_D(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_succ(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_for(e)	0,000	0,000	0,000	0,085	0,263	0,441	0,502	0,803	1,104
EX_ac(e)	0,000	0,000	0,000	0,066	0,067	0,068	0,274	0,476	0,677

Fortsetzung Tabelle 10.12: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilung mit der Kohlenstoffquelle Glucose.

EX_pyr(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G6PDH2r	0,169	0,192	0,234	0,244	0,290	0,334	0,220	0,404	0,589
GND	0,192	0,192	0,234	0,244	0,290	0,334	0,220	0,404	0,589
RPE	0,066	0,067	0,095	-0,027	0,012	0,051	-0,152	-0,004	0,145
RPI	-0,137	-0,123	-0,123	-0,302	-0,273	-0,244	-0,502	-0,401	-0,301
TKT1	0,050	0,050	0,064	0,059	0,073	0,087	0,045	0,102	0,160
TKT2	0,016	0,017	0,031	-0,087	-0,061	-0,035	-0,197	-0,106	-0,015
TALA	0,050	0,050	0,064	0,059	0,073	0,087	0,045	0,102	0,160
PRPPS	0,073	0,073	0,090	0,183	0,200	0,216	0,254	0,299	0,345
DDPA	0,029	0,039	0,050	0,119	0,134	0,149	0,165	0,208	0,250
DHQS	0,029	0,039	0,050	0,119	0,134	0,149	0,165	0,208	0,250
DHQTi	0,029	0,039	0,050	0,119	0,134	0,149	0,165	0,208	0,250
SHK3Dr	0,029	0,039	0,050	0,119	0,134	0,149	0,165	0,208	0,250
SHKK	0,029	0,039	0,050	0,119	0,134	0,149	0,165	0,208	0,250
PSCVT	0,029	0,039	0,050	0,119	0,134	0,149	0,165	0,208	0,250
CHORS	0,029	0,039	0,050	0,119	0,134	0,149	0,165	0,208	0,250
CHORM	0,017	0,018	0,020	0,034	0,037	0,039	0,044	0,051	0,062
PPNDH	0,010	0,010	0,011	0,019	0,021	0,022	0,025	0,028	0,032
PHETA1	-0,011	-0,010	-0,010	-0,022	-0,021	-0,019	-0,032	-0,028	-0,025
PPND	0,008	0,008	0,009	0,015	0,016	0,017	0,019	0,022	0,025
TYRTA	-0,009	-0,008	-0,008	-0,017	-0,016	-0,015	-0,025	-0,022	-0,019
ANS	0,010	0,021	0,032	0,082	0,097	0,112	0,115	0,157	0,200
ANPRT	0,010	0,021	0,032	0,082	0,097	0,112	0,115	0,157	0,200
PRALi	0,010	0,021	0,032	0,082	0,097	0,112	0,115	0,157	0,200
IGPS	0,010	0,021	0,032	0,082	0,097	0,112	0,115	0,157	0,200
TRPS2	0,010	0,021	0,032	0,082	0,097	0,112	0,115	0,157	0,200
TRPS3	0,010	0,021	0,032	0,082	0,097	0,112	0,115	0,157	0,200
TRPAS2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_trp_L(e)	0,007	0,018	0,028	0,076	0,091	0,105	0,106	0,148	0,190
μ	0,055	0,059	0,063	0,109	0,117	0,124	0,140	0,162	0,183

Tabelle 10.13: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Glycerin. Die Werte wurden durch geometrische Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (min: unterste Grenze, max: oberste Grenze) ermittelt. Die Reaktionsnamen und -Richtungen sind dem *E. coli* Modell *iAF1260* entnommen. Alle Werte sind in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ gegeben mit Ausnahme der Wachstumsrate μ in h^{-1} . Gly A, Gly B, Gly C: Zulaufstufen im Analysenreaktor.

	Gly A			Gly B			Gly C		
	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max
EX_glc(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GLCptspp	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_glyc(e)	-2,468	-2,391	-2,315	-4,335	-4,201	-4,067	-6,821	-6,610	-6,398
GLYK	2,315	2,391	2,468	4,067	4,201	4,336	6,398	6,610	6,821
G3PD2	2,303	2,382	2,460	4,043	4,178	4,313	6,373	6,586	6,799
PGI	-0,238	-0,207	-0,184	-0,320	-0,261	-0,216	-0,338	-0,272	-0,222
PFK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FBP	0,110	0,190	0,270	0,225	0,274	0,323	0,206	0,272	0,339
FBA	-0,270	-0,190	-0,110	-0,323	-0,274	-0,225	-0,339	-0,272	-0,206
TPI	2,046	2,192	2,338	3,736	3,904	4,072	6,058	6,314	6,570
PGK	-2,171	-1,965	-1,758	-3,741	-3,545	-3,349	-6,252	-5,955	-5,658
PGCD	0,188	0,254	0,320	0,373	0,422	0,472	0,324	0,415	0,503
PSERT	0,188	0,254	0,320	0,373	0,422	0,472	0,324	0,415	0,503
PSP_L	0,188	0,254	0,320	0,373	0,422	0,472	0,324	0,415	0,503
PPC	0,000	0,105	0,283	0,000	0,243	0,548	0,128	0,414	0,605
PPCK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ENO	1,453	1,711	1,968	2,904	3,122	3,341	5,197	5,540	5,865
PPS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PYK	0,832	1,291	1,823	1,980	2,483	3,029	4,240	4,736	5,333
PDH	0,922	1,221	1,591	1,742	2,158	2,616	0,557	1,262	1,973
CS	0,768	0,882	0,996	0,986	1,196	1,399	0,209	0,830	1,673
ACONT	0,768	0,882	0,996	0,986	1,130	1,273	0,209	0,446	0,763
ICDHyr	0,629	0,777	0,996	0,563	0,887	1,273	0,209	0,357	0,763
AKGDH	0,578	0,700	0,893	0,408	0,710	1,074	0,069	0,177	0,549
SUCOAS	-0,843	-0,662	-0,549	-0,977	-0,624	-0,325	-0,445	-0,089	0,000
SUCDi	0,717	0,805	0,894	0,833	0,953	1,075	0,069	0,266	0,550
FUM	0,767	0,880	0,993	0,981	1,124	1,267	0,205	0,440	0,756
MDH	0,766	0,985	1,275	0,982	1,367	1,815	0,204	0,529	1,201
ICL	0,000	0,105	0,283	0,000	0,243	0,548	0,000	0,089	0,445
MALS	0,000	0,106	0,283	0,000	0,243	0,548	0,000	0,089	0,445
PFL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,503	0,877	1,252
PTAr	-0,056	-0,041	-0,027	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ACKr	0,027	0,041	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_lac_D(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,215	2,258	2,301
EX_succ(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_for(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,503	0,866	1,230
EX_ac(e)	0,000	0,000	0,000	0,137	0,248	0,359	0,777	1,063	1,349
EX_pyr(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G6PDH2r	0,206	0,207	0,238	0,259	0,261	0,320	0,271	0,272	0,338

Fortsetzung Tabelle 10.13: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilung mit der Kohlenstoffquelle Glycerin.

GND	0,206	0,207	0,238	0,259	0,261	0,320	0,271	0,272	0,338
RPE	0,030	0,031	0,051	-0,053	-0,052	-0,012	-0,049	-0,048	-0,004
RPI	-0,183	-0,173	-0,172	-0,325	-0,306	-0,305	-0,334	-0,312	-0,312
TKT1	0,050	0,050	0,060	0,050	0,050	0,070	0,050	0,050	0,072
TKT2	-0,020	-0,019	-0,009	-0,103	-0,102	-0,082	-0,099	-0,098	-0,076
TALA	0,050	0,050	0,060	0,050	0,050	0,070	0,050	0,050	0,072
PRPPS	0,115	0,194	0,274	0,236	0,285	0,334	0,216	0,283	0,351
DDPA	0,067	0,155	0,243	0,144	0,193	0,241	0,130	0,189	0,249
DHQS	0,067	0,155	0,243	0,144	0,193	0,241	0,130	0,189	0,249
DHQTi	0,067	0,155	0,243	0,144	0,193	0,241	0,130	0,189	0,249
SHK3Dr	0,067	0,155	0,243	0,144	0,193	0,241	0,130	0,189	0,249
SHKK	0,067	0,155	0,243	0,144	0,193	0,241	0,130	0,189	0,249
PSCVT	0,067	0,155	0,243	0,144	0,193	0,241	0,130	0,189	0,249
CHORS	0,067	0,155	0,243	0,144	0,193	0,241	0,130	0,189	0,249
CHORM	0,015	0,022	0,030	0,045	0,052	0,058	0,041	0,053	0,064
PPNDH	0,008	0,013	0,017	0,025	0,029	0,033	0,023	0,029	0,036
PHETA1	-0,017	-0,013	-0,008	-0,033	-0,029	-0,025	-0,036	-0,029	-0,023
PPND	0,007	0,010	0,013	0,020	0,023	0,026	0,018	0,023	0,028
TYRTA	-0,013	-0,010	-0,007	-0,026	-0,023	-0,020	-0,028	-0,023	-0,018
ANS	0,039	0,132	0,225	0,093	0,141	0,189	0,081	0,136	0,192
ANPRT	0,039	0,132	0,225	0,093	0,141	0,189	0,081	0,136	0,192
PRALi	0,039	0,132	0,225	0,093	0,141	0,189	0,081	0,136	0,192
IGPS	0,039	0,132	0,225	0,093	0,141	0,189	0,081	0,136	0,192
TRPS2	0,039	0,132	0,225	0,093	0,141	0,189	0,081	0,136	0,192
TRPS3	0,039	0,132	0,225	0,093	0,141	0,189	0,081	0,136	0,192
TRPAS2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_trp_L(e)	0,034	0,128	0,222	0,084	0,132	0,180	0,072	0,127	0,182
μ	0,047	0,071	0,095	0,143	0,164	0,185	0,131	0,168	0,204

Tabelle 10.14: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Succinat. Die Werte wurden durch geometrische Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (min: unterste Grenze, max: oberste Grenze) ermittelt. Die Reaktionsnamen und -Richtungen sind dem *E. coli* Modell *iAF1260* entnommen. Alle Werte sind in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ gegeben mit Ausnahme der Wachstumsrate μ in h^{-1} . Succ A, Succ B, Succ C: Zulaufstufen im Analysenreaktor.

	Succ A			Succ B			Succ C		
	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max
EX_glc(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GLCptspp	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_glyc(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GLYK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G3PD2	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,001	-0,001	-0,004	-0,004	-0,004
PGI	0,000	0,000	0,000	-0,016	-0,011	-0,008	-0,030	-0,021	-0,014
PFK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FBP	0,001	0,001	0,001	0,013	0,028	0,043	0,023	0,024	0,026
FBA	-0,001	-0,001	-0,001	-0,043	-0,028	-0,013	-0,026	-0,024	-0,023
TPI	-0,001	-0,001	-0,001	-0,044	-0,029	-0,015	-0,030	-0,028	-0,026
PGK	0,001	0,001	0,001	0,034	0,062	0,090	0,063	0,067	0,071
PGCD	0,001	0,001	0,001	0,023	0,036	0,049	0,046	0,050	0,053
PSERT	0,001	0,001	0,001	0,023	0,036	0,049	0,046	0,050	0,053
PSP_L	0,001	0,001	0,001	0,023	0,036	0,049	0,046	0,050	0,053
PPC	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PPCK	0,717	0,717	0,717	0,926	0,959	0,992	1,173	1,202	1,232
ENO	-0,002	-0,002	-0,002	-0,139	-0,098	-0,057	-0,124	-0,116	-0,109
PPS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PYK	0,714	0,714	0,714	0,742	0,813	0,884	1,042	1,063	1,084
PDH	0,714	0,714	0,714	0,768	0,809	0,850	0,968	0,985	1,002
CS	0,714	0,714	0,714	0,754	0,779	0,804	0,883	0,894	0,904
ACONT	0,714	0,714	0,714	0,754	0,779	0,804	0,883	0,894	0,904
ICDHyr	0,714	0,714	0,714	0,754	0,779	0,804	0,882	0,894	0,904
AKGDH	0,714	0,714	0,714	0,750	0,770	0,789	0,854	0,863	0,873
SUCOAS	-0,714	-0,714	-0,714	-0,782	-0,765	-0,748	-0,857	-0,849	-0,840
SUCDi	1,431	1,431	1,431	1,709	1,755	1,801	2,105	2,149	2,192
FUM	1,431	1,431	1,431	1,713	1,764	1,816	2,132	2,178	2,223
MDH	1,431	1,431	1,431	1,713	1,764	1,816	2,132	2,178	2,223
ICL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
MALS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PFL	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001
PTAr	0,000	0,000	0,000	-0,008	-0,005	-0,002	-0,017	-0,016	-0,015
ACKr	0,000	0,000	0,000	0,002	0,005	0,008	0,015	0,016	0,017
EX_lac_D(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_succ(e)	-0,717	-0,717	-0,717	-1,012	-0,985	-0,959	-1,320	-1,285	-1,251
EX_for(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_ac(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_pyr(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G6PDH2r	0,000	0,000	0,000	0,011	0,011	0,016	0,021	0,021	0,030

Fortsetzung Tabelle 10.14: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilung mit der Kohlenstoffquelle Succinat.

GND	0,000	0,000	0,000	0,011	0,011	0,016	0,021	0,021	0,030
RPE	0,000	0,000	0,000	-0,007	-0,007	-0,004	-0,009	-0,009	-0,003
RPI	-0,001	-0,001	-0,001	-0,019	-0,017	-0,017	-0,032	-0,029	-0,029
TKT1	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,004
TKT2	-0,001	-0,001	0,000	-0,008	-0,008	-0,006	-0,010	-0,010	-0,007
TALA	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,004
PRPPS	0,001	0,001	0,001	0,014	0,029	0,043	0,025	0,026	0,028
DDPA	0,001	0,001	0,001	0,008	0,024	0,039	0,010	0,010	0,011
DHQS	0,001	0,001	0,001	0,008	0,024	0,039	0,010	0,010	0,011
DHQTi	0,001	0,001	0,001	0,008	0,024	0,039	0,010	0,010	0,011
SHK3Dr	0,001	0,001	0,001	0,008	0,024	0,039	0,010	0,010	0,011
SHKK	0,001	0,001	0,001	0,008	0,024	0,039	0,010	0,010	0,011
PSCVT	0,001	0,001	0,001	0,008	0,024	0,039	0,010	0,010	0,011
CHORS	0,001	0,001	0,001	0,008	0,024	0,039	0,010	0,010	0,011
CHORM	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,004	0,008	0,009	0,009
PPNDH	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,002	0,005	0,005	0,005
PHETA1	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,002	-0,001	-0,005	-0,005	-0,005
PPND	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,002	0,004	0,004	0,004
TYRTA	0,000	0,000	0,000	-0,002	-0,001	-0,001	-0,004	-0,004	-0,004
ANS	0,001	0,001	0,001	0,004	0,021	0,037	0,001	0,002	0,002
ANPRT	0,001	0,001	0,001	0,004	0,021	0,037	0,001	0,002	0,002
PRALi	0,001	0,001	0,001	0,004	0,021	0,037	0,001	0,002	0,002
IGPS	0,001	0,001	0,001	0,004	0,021	0,037	0,001	0,002	0,002
TRPS2	0,001	0,001	0,001	0,004	0,021	0,037	0,001	0,002	0,002
TRPS3	0,001	0,001	0,001	0,004	0,021	0,037	0,001	0,002	0,002
TRPAS2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_trp_L(e)	0,001	0,001	0,001	0,004	0,020	0,037	0,000	0,000	0,000
μ	0,000	0,000	0,000	0,004	0,009	0,014	0,026	0,028	0,030

Tabelle 10.15: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Pyruvat. Die Werte wurden durch geometrische Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (min: unterste Grenze, max: oberste Grenze) ermittelt. Die Reaktionsnamen und -Richtungen sind dem *E. coli* Modell *iAF1260* entnommen. Alle Werte sind in $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ gegeben mit Ausnahme der Wachstumsrate μ in h^{-1} . Pyr A, Pyr B, Pyr C: Zulaufstufen im Analysenreaktor.

	Pyr A			Pyr B			Pyr C		
	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max	min	<i>gFBA</i>	max
EX_glc(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GLCptspp	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_glyc(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GLYK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
G3PD2	-0,007	-0,005	-0,002	-0,015	-0,012	-0,010	-0,015	-0,012	-0,009
PGI	-0,048	-0,035	-0,021	-0,092	-0,066	-0,040	-0,099	-0,071	-0,043
PFK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FBP	0,043	0,110	0,176	0,083	0,133	0,183	0,078	0,131	0,185
FBA	-0,176	-0,110	-0,043	-0,183	-0,133	-0,083	-0,185	-0,131	-0,078
TPI	-0,178	-0,114	-0,050	-0,194	-0,145	-0,097	-0,197	-0,143	-0,090
PGK	0,119	0,241	0,362	0,230	0,323	0,417	0,215	0,319	0,424
PGCD	0,085	0,137	0,190	0,165	0,207	0,250	0,154	0,204	0,255
PSERT	0,085	0,137	0,190	0,165	0,207	0,250	0,154	0,204	0,255
PSP_L	0,085	0,137	0,190	0,165	0,207	0,250	0,154	0,204	0,255
PPC	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PPCK	0,000	0,346	0,890	0,000	0,545	0,945	0,000	0,421	0,973
ENO	-0,553	-0,378	-0,204	-0,667	-0,530	-0,394	-0,679	-0,524	-0,368
PPS	0,000	0,220	0,890	0,000	0,170	0,960	0,000	0,286	0,973
PYK	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PDH	1,243	1,805	2,206	1,960	2,712	3,065	2,646	3,738	4,691
CS	1,560	1,649	1,737	2,310	2,514	2,763	1,924	2,622	3,623
ACONT	1,560	1,649	1,737	2,310	2,427	2,543	1,924	2,108	2,291
ICDHyr	0,647	1,205	1,581	1,184	1,623	2,234	0,787	1,433	1,996
AKGDH	0,634	1,170	1,540	1,109	1,529	2,134	0,710	1,341	1,901
SUCOAS	-1,532	-1,153	-0,627	-2,093	-1,483	-1,072	-1,863	-1,296	-0,673
SUCDi	1,546	1,613	1,680	2,235	2,333	2,431	1,847	2,016	2,184
FUM	1,559	1,647	1,735	2,308	2,424	2,539	1,921	2,105	2,288
MDH	1,597	2,091	2,538	2,515	3,227	3,622	2,134	2,780	3,347
ICL	0,037	0,443	0,937	0,206	0,804	1,176	0,188	0,675	1,215
MALS	0,037	0,443	0,937	0,206	0,804	1,176	0,188	0,675	1,215
PFL	0,385	0,394	0,402	1,073	1,093	1,112	0,222	0,725	1,227
PTAr	-0,031	-0,019	-0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ACKr	0,007	0,019	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_lac_D(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_succ(e)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_for(e)	0,384	0,390	0,396	1,067	1,083	1,100	0,215	0,715	1,215
EX_ac(e)	0,000	0,000	0,000	0,235	0,289	0,342	1,335	1,400	1,464
EX_pyr(e)	-2,472	-2,430	-2,387	-4,233	-4,160	-4,088	-5,017	-4,931	-4,845
G6PDH2r	0,034	0,035	0,047	0,065	0,066	0,090	0,070	0,071	0,097

Fortsetzung Tabelle 10.15: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilung mit der Kohlenstoffquelle Pyruvat.

GND	0,034	0,035	0,047	0,065	0,066	0,090	0,070	0,071	0,097
RPE	-0,018	-0,018	-0,009	-0,037	-0,037	-0,021	-0,041	-0,040	-0,023
RPI	-0,054	-0,050	-0,050	-0,106	-0,098	-0,098	-0,115	-0,107	-0,107
TKT1	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,009	0,001	0,001	0,010
TKT2	-0,019	-0,019	-0,014	-0,038	-0,038	-0,030	-0,042	-0,041	-0,032
TALA	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,009	0,001	0,001	0,010
PRPPS	0,046	0,112	0,177	0,089	0,139	0,188	0,084	0,137	0,190
DDPA	0,018	0,093	0,168	0,036	0,090	0,144	0,033	0,089	0,145
DHQS	0,018	0,093	0,168	0,036	0,090	0,144	0,033	0,089	0,145
DHQTi	0,018	0,093	0,168	0,036	0,090	0,144	0,033	0,089	0,145
SHK3Dr	0,018	0,093	0,168	0,036	0,090	0,144	0,033	0,089	0,145
SHKK	0,018	0,093	0,168	0,036	0,090	0,144	0,033	0,089	0,145
PSCVT	0,018	0,093	0,168	0,036	0,090	0,144	0,033	0,089	0,145
CHORS	0,018	0,093	0,168	0,036	0,090	0,144	0,033	0,089	0,145
CHORM	0,004	0,010	0,017	0,022	0,027	0,033	0,020	0,027	0,034
PPNDH	0,002	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,011	0,015	0,019
PHETA1	-0,009	-0,006	-0,002	-0,018	-0,015	-0,012	-0,019	-0,015	-0,011
PPND	0,002	0,005	0,007	0,010	0,012	0,014	0,009	0,012	0,015
TYRTA	-0,007	-0,005	-0,002	-0,014	-0,012	-0,010	-0,015	-0,012	-0,009
ANS	0,003	0,083	0,163	0,005	0,062	0,119	0,005	0,062	0,119
ANPRT	0,003	0,083	0,163	0,005	0,062	0,119	0,005	0,062	0,119
PRALi	0,003	0,083	0,163	0,005	0,062	0,119	0,005	0,062	0,119
IGPS	0,003	0,083	0,163	0,005	0,062	0,119	0,005	0,062	0,119
TRPS2	0,003	0,083	0,163	0,005	0,062	0,119	0,005	0,062	0,119
TRPS3	0,003	0,083	0,163	0,005	0,062	0,119	0,005	0,062	0,119
TRPAS2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
EX_trp_L(e)	0,000	0,081	0,162	0,000	0,057	0,115	0,000	0,057	0,114
μ	0,013	0,033	0,053	0,070	0,087	0,105	0,064	0,086	0,108

Tabelle 10.16: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren im Referenzprozess. Die Werte wurden durch geometrische Flussbilanzanalyse (*gFBA*) und Flussvarianzanalyse (min: unterste Grenze, max: oberste Grenze) ermittelt. Die Reaktionsnamen und – Richtungen sind dem *E. coli* Modell *iAF1260* entnommen. Alle Werte sind in $\text{mmol}_{\text{gBTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ gegeben mit Ausnahme der Wachstumsrate μ in h^{-1} .

	Ref		
	min	<i>gFBA</i>	max
EX_glc(e)	0,000	0,000	0,000
GLCptspp	0,000	0,000	0,000
EX_glyc(e)	-2,180	-2,120	-2,060
GLYK	2,060	2,120	2,180
G3PD2	2,051	2,112	2,172
PGI	-0,194	-0,186	-0,179
PFK	0,000	0,000	0,000
FBP	0,185	0,219	0,253
FBA	-0,253	-0,219	-0,185
TPI	1,807	1,893	1,978
PGK	-1,813	-1,704	-1,596
PGCD	0,181	0,212	0,242
PSERT	0,181	0,212	0,242
PSP_L	0,181	0,212	0,242
PPC	0,000	0,090	0,214
PPCK	0,000	0,000	0,000
ENO	1,365	1,493	1,620
PPS	0,000	0,000	0,000
PYK	0,893	1,146	1,432
PDH	0,900	1,081	1,296
CS	0,740	0,792	0,845
ACONT	0,740	0,792	0,845
ICDHyr	0,595	0,703	0,845
AKGDH	0,541	0,637	0,767
SUCOAS	-0,729	-0,605	-0,512
SUCDi	0,688	0,727	0,767
FUM	0,739	0,790	0,842
MDH	0,738	0,880	1,056
ICL	0,000	0,090	0,214
MALS	0,000	0,090	0,214
PFL	0,000	0,000	0,000
PTAr	-0,042	-0,035	-0,028
ACKr	0,028	0,035	0,042
EX_lac_D(e)	0,000	0,000	0,000
EX_succ(e)	0,000	0,000	0,000
EX_for(e)	0,000	0,000	0,000
EX_ac(e)	0,000	0,000	0,000
EX_pyr(e)	0,000	0,000	0,000
G6PDH2r	0,179	0,186	0,194

Fortsetzung Tabelle 10.16: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilung im Referenzprozess.

GND	0,179	0,186	0,194
RPE	-0,064	-0,027	0,011
RPI	-0,245	-0,211	-0,176
TKT1	0,050	0,050	0,050
TKT2	-0,114	-0,077	-0,039
TALA	0,050	0,050	0,050
PRPPS	0,126	0,161	0,195
DDPA	0,089	0,127	0,164
DHQS	0,089	0,127	0,164
DHQTi	0,089	0,127	0,164
SHK3Dr	0,089	0,127	0,164
SHKK	0,089	0,127	0,164
PSCVT	0,089	0,127	0,164
CHORS	0,089	0,127	0,164
CHORM	0,015	0,019	0,023
PPNDH	0,009	0,011	0,013
PHETA1	-0,013	-0,011	-0,009
PPND	0,007	0,008	0,010
TYRTA	-0,010	-0,008	-0,007
ANS	0,068	0,108	0,147
ANPRT	0,068	0,108	0,147
PRALi	0,068	0,108	0,147
IGPS	0,068	0,108	0,147
TRPS2	0,068	0,108	0,147
TRPS3	0,068	0,108	0,147
TRPAS2	0,000	0,000	0,000
EX_trp_L(e)	0,065	0,104	0,144
μ	0,049	0,061	0,072

10.3 Vergleichende Proteomanalysen

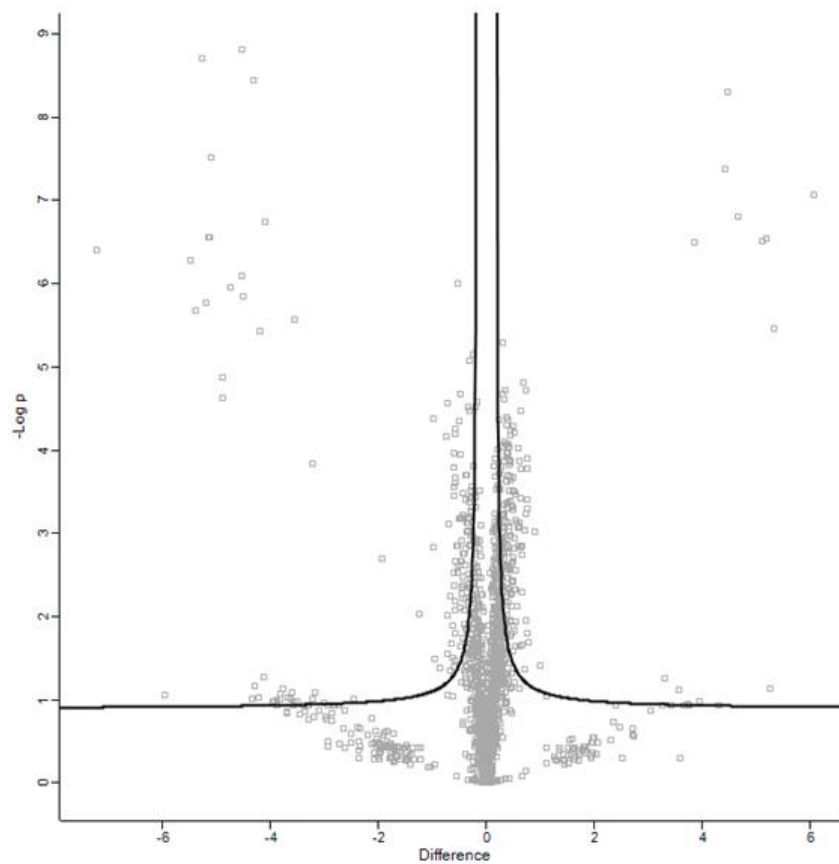


Abbildung 10.1: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit **Glucose** als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. Aufgetragen sind der negative Logarithmus zur Basis 10 des *p-value* über den Logarithmus zur Basis 2 der Differenz der Proteinmengen. Als Kriterien wurden ein *p-value* $\leq 0,05$ und ein Regulationsfaktor ≥ 2 festgelegt, die von den Datenpunkten oberhalb der schwarzen Linie erfüllt werden. Von ~2200 betrachteten Proteinen trifft dies hier auf 43 zu. Punkte auf der linken Seite symbolisieren eine höhere Proteinmenge in der Probe aus dem Analysenreaktor, Punkte auf der rechten Seite eine höhere Proteinmenge in der Prozessprobe.

Tabelle 10.17: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Glucose.

Protein	p-value	Verhältnis Proteinmenge Referenz/Analysenreaktor
Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2	3,91E-07	0,007
Regulator of ribonuclease activity B	0,086	0,016
Probable aminoglycoside efflux pump	5,26E-07	0,022
Phosphopantetheine adenylyltransferase	2,07E-06	0,024
Sec-independent protein translocase protein TatB	1,99E-09	0,026
DNA mismatch repair protein MutL	1,70E-06	0,027
Outer membrane protein W	2,78E-07	0,028
Mechanosensitive channel MscK	2,74E-07	0,029
Lipopolysaccharide export system permease protein LptF	3,03E-08	0,029
Der GTPase-activating protein YihI	1,34E-05	0,034
Uncharacterized tRNA/rRNA methyltransferase LasT	2,35E-05	0,034
Esterase YqiA	1,12E-06	0,037
Ribosome-associated ATPase	7,91E-07	0,043
Nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	1,51E-09	0,044
Ribose-5-phosphate isomerase B	1,40E-06	0,044
Protein YnjB	3,64E-09	0,050
Glutathione import ATP-binding protein GsiA	0,069	0,051
CDP-diacylglycerol pyrophosphatase	3,69E-06	0,054
Apolipoprotein N-acyltransferase	0,053	0,057
Putative lipopolysaccharide biosynthesis O-acetyl transferase WbbJ	1,78E-07	0,058
Acyl-CoA thioester hydrolase YbgC	0,074	0,072
H(+)/Cl(-) exchange transporter ClcA	2,72E-06	0,086
Outer membrane protein assembly factor BamE	0,152	0,091
Non-specific ribonucleoside hydrolase RihC	0,174	0,102
Transcriptional regulator MntR	0,0001	0,107
Acidic protein MsyB	0,002	0,263
Cardiolipin synthase A	0,009	0,419
D-methionine transport system permease protein MetI	0,001	0,506
Acyl-coenzyme A dehydrogenase	4,20E-05	0,507
Murein tetrapeptide carboxypeptidase	0,032	0,513
Uncharacterized protein YccJ	0,038	1,981
5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	0,092	2,146
RNA polymerase sigma factor RpoS	0,055	9,859
Sulfurtransferase TusE	0,075	11,903
Cytoplasmic trehalase	3,20E-07	14,337
Probable transcriptional regulatory protein YeeN	4,27E-08	21,428
Ribonuclease T	5,05E-09	22,229
Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YiaG	1,57E-07	25,475
Transcriptional regulator ModE	3,07E-07	34,360
Uncharacterized protein YobH	2,82E-07	36,407
UPF0345 protein YaiE	0,074	38,273
HTH-type transcriptional regulator TreR	3,41E-06	40,197
Acyl-CoA thioester hydrolase YciA	8,48E-08	67,030

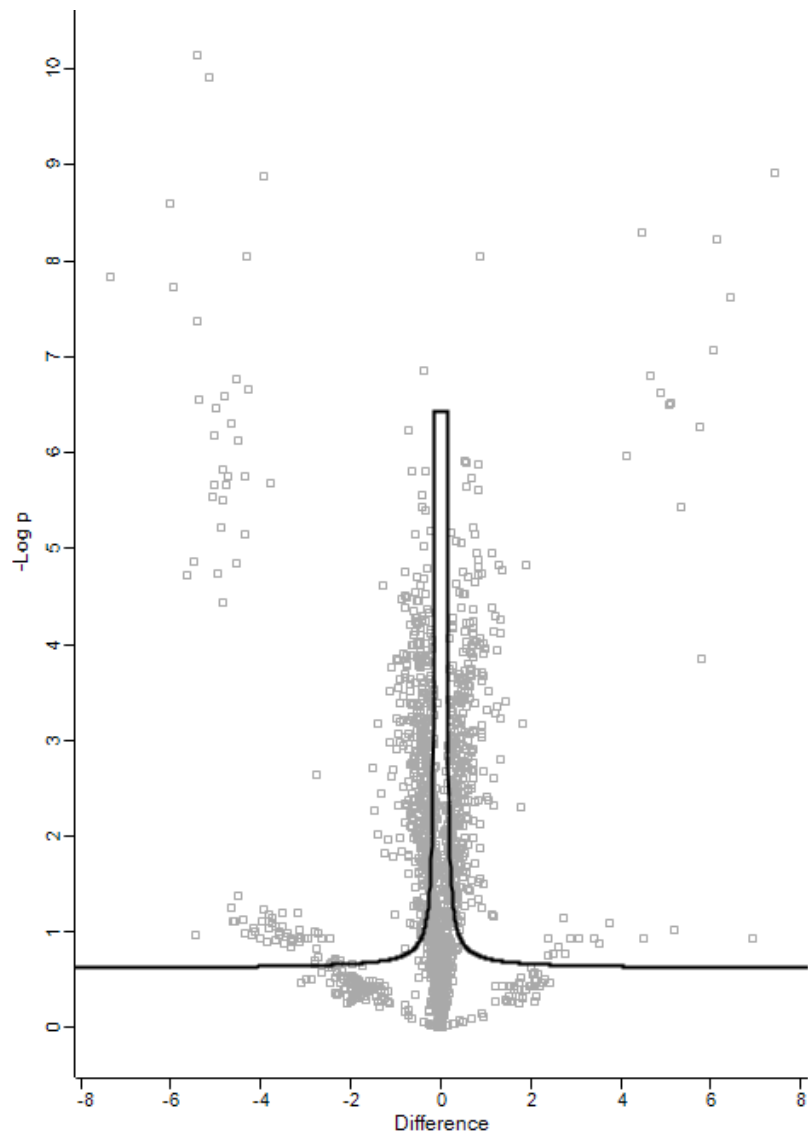


Abbildung 10.2: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit **Glycerin** als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. Aufgetragen sind der negative Logarithmus zur Basis 10 des *p-value* über den Logarithmus zur Basis 2 der Differenz der Proteinmengen. Als Kriterien wurden ein *p-value* $\leq 0,05$ und ein Regulationsfaktor ≥ 2 festgelegt, die von den Datenpunkten oberhalb der schwarzen Linie erfüllt werden. Von ~2200 betrachteten Proteinen trifft dies hier auf 101 zu. Punkte auf der linken Seite symbolisieren eine höhere Proteinmenge in der Probe aus dem Analysenreaktor, Punkte auf der rechten Seite eine höhere Proteinmenge in der Prozessprobe.

Tabelle 10.18: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Glycerin.

Protein Name	p-value	Verhältnis Proteinmenge Referenz/Analysenreaktor
Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2	1,47E-08	0,006
Phosphopantetheine adenylyltransferase	2,56E-09	0,016
Biopolymer transport protein ExbB	1,84E-08	0,016
Recombination protein RecR	1,92E-05	0,020
NADH-quinone oxidoreductase subunit K	1,37E-05	0,022
DNA mismatch repair protein MutL	7,00E-11	0,024
Thiol:disulfide interchange protein DsbD	4,28E-08	0,024
Probable aminoglycoside efflux pump	2,85E-07	0,024
UPF0352 protein YejL	1,21E-10	0,028
UPF0053 inner membrane protein YoaE	2,93E-06	0,030
Mechanosensitive channel MscK	2,14E-06	0,030
Glucose-1-phosphate thymidyltransferase 2	6,53E-07	0,031
Sec-independent protein translocase protein TatB	3,47E-07	0,031
Ribosome-associated ATPase	1,79E-05	0,032
Lipopolysaccharide export system permease protein LptF	6,02E-06	0,034
Uncharacterized symporter YagG	3,19E-06	0,034
Esterase YqiA	3,61E-05	0,035
Glutaminase 2	1,49E-06	0,035
NTE family protein RssA	2,59E-07	0,036
Membrane-bound lysozyme inhibitor of C-type lysozyme	2,20E-06	0,037
Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YeiE	1,77E-06	0,037
Glutathione import ATP-binding protein GsiA	0,056	0,040
Transcription antitermination protein RfaH	4,89E-07	0,040
Outer membrane protein assembly factor BamE	0,078	0,041
Protein YnjB	1,42E-05	0,043
Der GTPase-activating protein YihI	1,72E-07	0,043
Ribose-5-phosphate isomerase B	7,61E-07	0,044
Apolipoprotein N-acyltransferase	0,041	0,044
HTH-type transcriptional regulator EbgR	7,07E-06	0,049
Transcriptional regulator MntR	1,75E-06	0,049
Multidrug resistance protein MdtB	9,02E-09	0,050
Lipopolysaccharide core heptose(I) kinase RfaP	2,15E-07	0,052
UPF0053 protein YegH	1,31E-09	0,065
Non-specific ribonucleoside hydrolase RihC	0,125	0,070
Trehalose-6-phosphate hydrolase	2,07E-06	0,073
Lipid A biosynthesis lauroyltransferase	0,108	0,082
Uncharacterized protein YeiR	0,063	0,088
NADH-quinone oxidoreductase subunit H	0,214	0,145
H(+)/Cl(-) exchange transporter ClcA	0,002	0,146
Lysine--tRNA ligase, heat inducible	0,187	0,153
Ribosomal-protein-serine acetyltransferase	0,229	0,175
UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	0,231	0,188
Aminodeoxychorismate lyase	0,282	0,253
D-methionine transport system permease protein MetI	0,002	0,354

Fortsetzung Tabelle 10.18: Vergleichende Proteomquantifizierung Referenz und Analysenreaktor mit Glycerin.

Cardiolipin synthase A	0,005	0,364
Murein tetrapeptide carboxypeptidase	0,009	0,379
S-formylglutathione hydrolase FrmB	0,0006	0,380
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	0,003	0,395
Acyl-coenzyme A dehydrogenase	2,46E-05	0,408
Glutaminase 1	0,015	0,417
NADH-quinone oxidoreductase subunit L	0,011	0,4464
Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC;Phosphopantothenoylecysteine decarboxylase; Phosphopantothenate--cysteine ligase	0,001	0,459
dTDP-4-amino-4,6-dideoxygalactose transaminase	0,0003	0,462
L-2-hydroxyglutarate oxidase LhgO	0,0021	0,464
Galactose/methyl galactoside import ATP-binding protein MglA	0,0002	0,470
RNA polymerase-associated protein RapA	0,016	0,476
Ferredoxin--NADP reductase	0,002	0,476
Sensor protein PhoQ	0,0023	0,477
RecBCD enzyme subunit RecC	0,066	0,496
Pyridoxamine kinase	0,0006	0,505
HTH-type transcriptional regulator MalT	0,0001	0,506
Probable pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	0,001	0,507
Flavodoxin-1	0,0001	1,959
50S ribosomal protein L31	0,0005	2,018
Glutathione-regulated potassium-efflux system ancillary protein KefF	0,004	2,033
Transcriptional repressor RcnR	0,004	2,063
30S ribosomal protein S21	0,0003	2,071
30S ribosomal protein S12	4,06E-05	2,183
Osmotically-inducible protein Y	1,11E-05	2,228
GTP cyclohydrolase-2	0,003	2,258
Fe/S biogenesis protein NfuA	7,36E-05	2,259
Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C	0,005	2,288
FKBP-type 22 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	4,99E-05	2,294
Periplasmic protein CpxP	0,0005	2,303
Uncharacterized protein YpfJ	0,0004	2,360
Uncharacterized protein YqiC	0,0001	2,372
Protein GlcG	1,49E-05	2,457
Murein hydrolase activator NlpD	0,002	2,490
Protein PhnA	7,49E-05	2,490
Thiol:disulfide interchange protein DsbC	5,40E-05	2,493
Carbon storage regulator	0,0006	2,522
Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	1,71E-05	2,563
Uncharacterized protein YhhA	0,0004	2,685
UPF0482 protein YnfB	0,005	3,396
Protein YciI	0,0007	3,539
50S ribosomal protein L34	1,47E-05	3,731
Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	0,166	5,612
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0,079	13,287

Fortsetzung Tabelle 10.18: Vergleichende Proteomquantifizierung Referenz und Analysenreaktor mit Glycerin.

Uncharacterized sulfatase YdeN	1,08E-06	17,700
Ribonuclease T	5,04E-09	22,229
Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YiaG	1,56E-07	25,475
Uncharacterized protein YfcL	2,35E-07	29,843
Sulfurtransferase TusE	3,14E-07	33,437
Transcriptional regulator ModE	3,07E-07	34,359
UPF0337 protein YjbJ	3,72E-06	40,929
Antitoxin RelB	5,42E-07	53,806
Uncharacterized protein YcgJ	0,0001	55,093
Acyl-CoA thioester hydrolase YciA	8,47E-08	67,030
Protein ElaA	5,94E-09	70,744
Glutaredoxin-1	2,38E-08	85,827
UPF0345 protein YaiE	1,19E-09	173,565

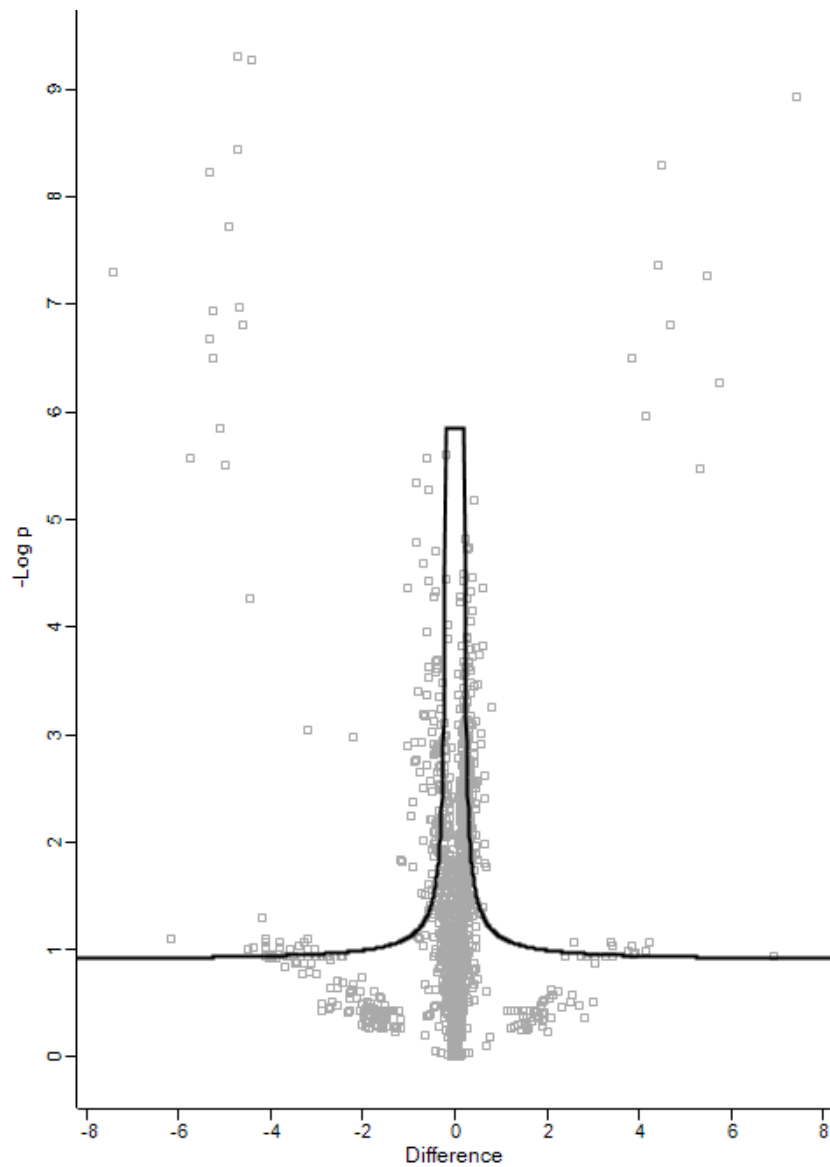


Abbildung 10.3: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit **Succinat** als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. Aufgetragen sind der negative Logarithmus zur Basis 10 des *p-value* über den Logarithmus zur Basis 2 der Differenz der Proteinmengen. Als Kriterien wurden ein *p-value* $\leq 0,05$ und ein Regulationsfaktor ≥ 2 festgelegt, die von den Datenpunkten oberhalb der schwarzen Linie erfüllt werden. Von ~2200 betrachteten Proteinen trifft dies hier auf 35 zu. Punkte auf der linken Seite symbolisieren eine höhere Proteinmenge in der Probe aus dem Analysenreaktor, Punkte auf der rechten Seite eine höhere Proteinmenge in der Prozessprobe.

Tabelle 10.19: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Succinat.

Protein Name	p-value	Verhältnis Proteinmenge Referenz/Analysenreaktor
Cytochrome bd-I ubiquinol oxidase subunit 2	5,01E-08	0,006
Regulator of ribonuclease activity B	0,079	0,014
Probable aminoglycoside efflux pump	2,71E-06	0,019
Lipopolysaccharide export system permease protein LptF	2,10E-07	0,025
Sec-independent protein translocase protein TatB	5,98E-09	0,025
Recombination protein RecR	3,16E-07	0,026
DNA mismatch repair protein MutL	1,15E-07	0,027
Uncharacterized symporter YagG	1,44E-06	0,029
Mechanosensitive channel MscK	3,09E-06	0,031
Der GTPase-activating protein YihI	1,92E-08	0,034
Esterase YqiA	4,86E-10	0,038
Uncharacterized protein YoaF	3,59E-09	0,038
Ribose-5-phosphate isomerase B	1,06E-07	0,038
NTE family protein RssA	1,52E-07	0,041
Regulatory protein AsnC	5,33E-05	0,046
Lipopolysaccharide core heptose(I) kinase RfaP	5,39E-10	0,0470
Apolipoprotein N-acyltransferase	0,051	0,055
Outer membrane protein assembly factor BamE	0,112	0,063
Non-specific ribonucleoside hydrolase RihC	0,171	0,100
Lipid A biosynthesis lauroyltransferase	0,135	0,104
Transcriptional regulator MntR	0,0009	0,108
Acidic protein MsyB	0,001	0,216
Protein CyaY	0,014	0,437
Cardiolipin synthase A	0,015	0,448
Acyl-coenzyme A dehydrogenase	4,27E-05	0,486
D-methionine transport system permease protein MetI	0,001	0,492
Cytoplasmic trehalase	3,20E-07	14,337
Uncharacterized sulfatase YdeN	1,08E-06	17,700
Probable transcriptional regulatory protein YeeN	4,26E-08	21,428
Ribonuclease T	5,04E-09	22,229
Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator YiaG	1,56E-07	25,475
HTH-type transcriptional regulator TreR	3,41E-06	40,197
Large-conductance mechanosensitive channel	5,34E-08	45,019
Antitoxin RelB	5,41E-07	53,806
UPF0345 protein YaiE	1,18E-09	173,565

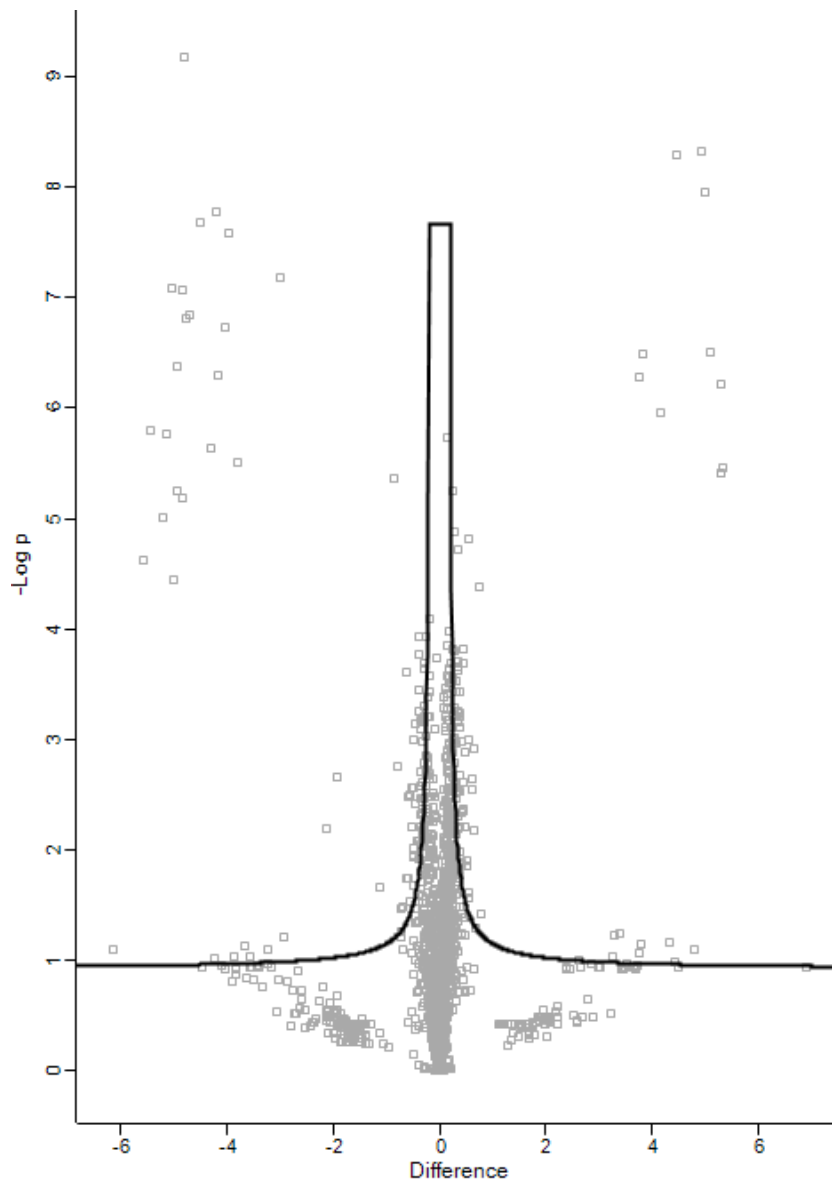


Abbildung 10.4: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit **Pyruvat** als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. Aufgetragen sind der negative Logarithmus zur Basis 10 des *p-value* über den Logarithmus zur Basis 2 der Differenz der Proteinmengen. Als Kriterien wurden ein *p-value* $\leq 0,05$ und ein Regulationsfaktor ≥ 2 festgelegt, die von den Datenpunkten oberhalb der schwarzen Linie erfüllt werden. Von ~2200 betrachteten Proteinen trifft dies hier auf 39 zu. Punkte auf der linken Seite symbolisieren eine höhere Proteinmenge in der Probe aus dem Analysenreaktor, Punkte auf der rechten Seite eine höhere Proteinmenge in der Prozessprobe.

Tabelle 10.20: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Pyruvat.

Protein Name	p-value	Verhältnis Proteinmenge Referenz/Analysenreaktor
Regulator of ribonuclease activity B	0,079	0,014
Biopolymer transport protein ExbB	2,36E-05	0,021
Phosphopantetheine adenylyltransferase	1,59E-06	0,023
Recombination protein RecR	9,88E-06	0,027
Probable aminoglycoside efflux pump	1,68E-06	0,028
DNA mismatch repair protein MutL	8,35E-08	0,031
Lipopolysaccharide export system permease protein LptF	3,56E-05	0,031
Esterase YqiA	5,70E-06	0,032
UPF0352 protein YejL	4,26E-07	0,032
Der GTPase-activating protein YihI	8,46E-08	0,035
Protein YnjB	6,42E-06	0,0350
NTE family protein RssA	6,57E-10	0,036
HTH-type transcriptional regulator FrlR	1,53E-07	0,036
Nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	1,43E-07	0,038
Ribose-5-phosphate isomerase B	2,08E-08	0,044
Regulatory protein AsnC	2,32E-06	0,050
Mannosyl-D-glycerate transport/metabolism system repressor MngR	1,65E-08	0,054
Lipopolysaccharide core heptose(I) kinase RfaP	5,00E-07	0,056
Putative lipopolysaccharide biosynthesis O-acetyl transferase WbbJ	1,86E-07	0,061
HTH-type transcriptional repressor ComR	2,57E-08	0,064
Chaperone protein FimC	3,12E-06	0,072
Outer membrane protein assembly factor BamE	0,148	0,089
Non-specific ribonucleoside hydrolase RihC	0,169	0,099
Uncharacterized protein YeiR	0,078	0,106
Transcriptional regulator MntR	6,50E-08	0,124
Lipid A biosynthesis lauroyltransferase	0,188	0,146
S-formylglutathione hydrolase FrmB	0,006	0,227
Acidic protein MsyB	0,002	0,261
Protein CyaY	0,022	0,454
HTH-type transcriptional repressor BdcR	5,21E-07	13,397
Cytoplasmic trehalase	3,20E-07	14,337
Uncharacterized sulfatase YdeN	1,08E-06	17,700
Ribonuclease T	5,04E-09	22,229
Quinoprotein glucose dehydrogenase	4,74E-09	30,722
2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5-dehydrogenase	1,12E-08	32,032
Transcriptional regulator ModE	3,07E-07	34,359
Uncharacterized protein YbgJ	6,14E-07	39,258
UDP-N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase	3,83E-06	39,540
HTH-type transcriptional regulator TreR	3,41E-06	40,197

10.4 MCA-Modell

Tabelle 10.21: Für die Berechnung der MCA berücksichtigte Reaktionen, ihre Stöchiometrie und Einordnung bezüglich des thermodynamischen Zustandes. Equilibrium: Reaktion operiert am thermodynamischen Gleichgewicht; für Reaktionen fern des thermodynamischen Gleichgewichtes sind die gewählten Effektoren gegeben.

Reaktion	Stöchiometrie	Effektoren
Glykolyse, Gluconeogenese und Glycerin-Metabolismus		
glyk	$\text{GLYC} + \text{ATP} \rightarrow \text{GLY3P} + \text{ADP}$	ATP, FBP
gly3pdh	$\text{GLY3P} + \text{FAD} \rightarrow \text{DHAP} + \text{FADH}_2$	GAP, PEP, DHAP, 2PG, 3PG
fbp	$\text{FBP} \rightarrow \text{F6P}$	ATP, PEP, FBP, CIT, AMP
fba	$\text{GAP} + \text{DHAP} \leftrightarrow \text{FBP}$	Equilibrium
tpi	$\text{DHAP} \leftrightarrow \text{GAP}$	Equilibrium
gapd	$\text{GAP} + \text{NAD} \leftrightarrow \text{13DPG} + \text{NADH}$	Equilibrium
pgk	$\text{13DPG} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{3PG} + \text{ATP}$	Equilibrium
pgm	$\text{3PG} \leftrightarrow \text{2PG}$	Equilibrium
eno	$\text{2PG} \leftrightarrow \text{PEP}$	Equilibrium
pyk	$\text{ADP} + \text{PEP} \rightarrow \text{ATP} + \text{PYR}$	ATP, PEP, PYR, FBP, SuccCoA, ADP
pdh	$\text{PYR} + \text{NAD} + \text{CoA} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{NADH}$	AcCoA, PYR, NADH
L-Serin-Biosynthese		
pgcd	$\text{3PG} + \text{NAD} \leftrightarrow \text{3PHP} + \text{NADH}$	3PG, 3PHP
psert	$\text{3PHP} + \text{L-GLUT} \rightarrow \text{PSER_L} + \text{AKG}$	PSER_L
psp_L	$\text{PSER_L} \rightarrow \text{L-SER}$	L-SER
Citratzyklus		
cs	$\text{AcCoA} + \text{OAA} \rightarrow \text{CIT} + \text{CoA}$	AcCoA, OAA, AKG, NADH
acont	$\text{CIT} \leftrightarrow \text{ICIT}$	Equilibrium
icdh	$\text{ICIT} + \text{NADP} \leftrightarrow \text{AKG} + \text{NADPH}$	PEP, OAA, ICIT, FBP, CIT, L-PHE
akgdh	$\text{AKG} + \text{CoA} + \text{NAD} \rightarrow \text{NADH} + \text{SuccCoA}$	AKG, OAA
sucoas	$\text{ADP} + \text{SuccCoA} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{CoA} + \text{SUC}$	Equilibrium
sucdh	$\text{SUC} + \text{FAD} \rightarrow \text{FUM} + \text{FADH}_2$	SUC, MAL, FAD
fum	$\text{FUM} \leftrightarrow \text{MAL}$	Equilibrium
mdh	$\text{MAL} + \text{NAD} \leftrightarrow \text{NADH} + \text{OAA}$	Equilibrium
Pentose-Phosphat-Weg		
rpe	$\text{Ru5P} \leftrightarrow \text{X5P}$	Equilibrium
rpi	$\text{Ru5P} \leftrightarrow \text{R5P}$	Equilibrium
tk1	$\text{R5P} + \text{X5P} \leftrightarrow \text{GAP} + \text{S7P}$	Equilibrium
tk2	$\text{E4P} + \text{X5P} \leftrightarrow \text{GAP} + \text{F6P}$	Equilibrium
tala	$\text{GAP} + \text{S7P} \leftrightarrow \text{E4P} + \text{F6P}$	Equilibrium
prpps	$\text{R5P} + \text{ATP} \rightarrow \text{PRPP} + \text{AMP}$	PRPP
Biosynthese aromatischer Aminosäuren		
dahs	$\text{E4P} + \text{PEP} \rightarrow \text{DAHP}$	PEP, 2PG, 13DPG, DAHP, L-TRP
dhqs	$\text{DAHP} \rightarrow \text{3DHQ}$	DAHP
dhqd	$\text{3DHQ} \leftrightarrow \text{3DHS}$	Equilibrium
3dhsdh	$\text{3DHS} + \text{NADPH} \leftrightarrow \text{SHK} + \text{NADP}$	Equilibrium

Fortsetzung Tabelle 10.21: Für die MCA berücksichtigte Reaktionen.

shikk	$\text{SHK} + \text{ATP} \rightarrow \text{SHK3P} + \text{ADP}$	SHK3P
pscvt	$\text{SHK3P} + \text{PEP} \leftrightarrow 3\text{PSME}$	PEP, 3PSME
chors	$3\text{PSME} \rightarrow \text{CHOR}$	3PSME
chorm	$\text{CHOR} \rightarrow \text{PPHN}$	Equilibrium
ppndh	$\text{PPHN} \rightarrow \text{PHPYR}$	CHOR
pheta	$\text{L-Glut} + \text{PHPYR} \leftrightarrow \text{AKG} + \text{L-PHE}$	AKG
ans	$\text{CHOR} + \text{L-GLN} \rightarrow \text{ANTH} + \text{PYR} + \text{L-GLU}$	ANTH
anprt	$\text{ANTH} + \text{PRPP} \rightarrow \text{PRAN}$	PRPP, ANTH
prali	$\text{PRAN} \rightarrow 2\text{CDR5P}$	Equilibrium
igps	$2\text{CDR5P} \rightarrow 3\text{IG3P}$	ANTH, L-TRP
trps3	$3\text{IG3P} \rightarrow \text{INDOL} + \text{GAP}$	Equilibrium
trps2	$\text{INDOL} + \text{L-SER} \rightarrow \text{L-TRP}$	L-SER
Energiemetabolismus		
cytbo	$\text{ADP} + \text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD} + \text{ATP}$	FADH ₂
nadh6	$\text{ADP} + 1,33 \text{NADH} + 1,33 \text{FAD} \rightarrow$ $\text{ATP} + 1,33 \text{NAD} + 1,33 \text{FADH}_2$	NADH
thd2	$\text{NADPH} + \text{NAD} \rightarrow \text{NADP} + \text{NADH}$	NADPH
ATPase	$\text{ATP} \leftrightarrow \text{ADP}$	ATP

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: In der vorliegenden Arbeit verwendete <i>E. coli</i> Stämme und Plasmide und ihre genetischen Eigenschaften. _____	49
Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Minimalmediums nach Albermann <i>et al.</i> (2008). _____	50
Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Zulaufmedien für L-Phenylalanin- und L-Tryptophan-Produktionsprozesse im 15 L-Maßstab. _____	51
Tabelle 4.4: Zulaufbedingungen in den vier Analysenreaktoren während der parallelisierten metabolischen Kurzzeitanalyse mit Phosphoenolpyruvat als Effektor. _____	58
Tabelle 4.5: Zulaufmedien und Zulaufraten in den vier Analysenreaktoren während der parallelisierten metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb. _____	59
Tabelle 5.1: Vergleich wichtiger Prozessgrößen zur Produktion von L-Phenylalanin im 15 L-Maßstab mit <i>E. coli</i> FUS4 <i>UhpT-D388C</i> pF81 _{kan} (FUS4 <i>UhpT-D388C</i>) und <i>E. coli</i> FUS4 pF81 _{kan} (FUS4). Mit * markierte Daten stammen von Weiner <i>et al.</i> (2016). _____	70
Tabelle 5.2: Vergleich von Biomasseausbeuten ($g_{\text{BTM}} g_{\text{Glycerin}}^{-1}$) während der L-Tryptophan-Produktion im 15 L-Maßstab mit <i>E. coli</i> NT367 und <i>E. coli</i> NT367 pF112aroFBL _{kan} . _____	84
Tabelle 5.3: Substratzulaufzeiten während der konstanten Zulaufphase ($g_{\text{Gly}} g_{\text{BTM}}^{-1} h^{-1}$) sowie Konzentrationen ($g L^{-1}$) von Produkt L-Tryptophan und Nebenprodukten L-Phenylalanin und L-Tyrosin bei Kultivierung von <i>E. coli</i> NT367 und <i>E. coli</i> NT367 pF112aroFBL _{kan} im 15 L-Maßstab. _____	88
Tabelle 5.4: Vergleich von Prozessgrößen während L-Tryptophan Produktionsprozessen im 15 L-Maßstab mit <i>E. coli</i> NT367, <i>E. coli</i> NT367 pF112aroFBL _{kan} und <i>E. coli</i> TRP5a pF112aroFBL _{kan} . _____	92
Tabelle 5.5: Vergleich von Prozessgrößen der Kultivierungen verschiedener <i>E. coli</i> L-Tryptophan-Produktionsstämme im 15 L-Maßstab. Alle Stämme wurden in transformierter Form mit dem Plasmid pF112aroFBL _{kan} verwendet. _____	97
Tabelle 5.6: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Sauerstoffaufnahme, CO ₂ -Bildung und Biomassebildung im Referenzprozess während der metabolischen Analyse im Satzbetrieb _____	103
Tabelle 5.7: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Substrat-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, O ₂ -Aufnahme, CO ₂ -Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Satzbetrieb _____	109
Tabelle 5.8: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Sauerstoffaufnahme, CO ₂ -Bildung und Biomassebildung im Referenzprozess während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb _____	126

Tabelle 5.9: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glucose-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, Sauerstoffaufnahme, CO ₂ -Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb _____	130
Tabelle 5.10: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Glycerin-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, Sauerstoffaufnahme, CO ₂ -Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb _____	131
Tabelle 5.11: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Succinat-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Sauerstoffaufnahme, CO ₂ -Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb _____	131
Tabelle 5.12: Experimentell und theoretisch ermittelte zellspezifische Raten für Pyruvat-Aufnahme, L-Tryptophan-Bildung, Nebenproduktbildung, Sauerstoffaufnahme, CO ₂ -Bildung und Biomassebildung während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb _____	132
Tabelle 5.13: Lösungsbereiche der freien Gibbs'schen Reaktionsenergien $\Delta_r G$ für Reaktionen nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht. _____	164
Tabelle 10.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien. _____	219
Tabelle 10.2: Zusammenstellung der verwendeten Einzelgeräte. _____	221
Tabelle 10.3: Bestandteile der HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Aminosäuren. _____	222
Tabelle 10.4: Laufmittel-Gradient der HPLC-Methode zur Quantifizierung von Aminosäuren. _____	222
Tabelle 10.5: Bestandteile der HPLC-Anlage zur Quantifizierung organischer Säuren, Alkohole und Zucker. _____	222
Tabelle 10.6: Bestandteile der HPLC-Anlage zur Quantifizierung von Phosphoenolpyruvat. _____	223
Tabelle 10.7: Bestandteile der UHPLC-MS (Tripel-Quadrupol) Anlage. _____	223
Tabelle 10.8: Laufmittel-Gradient der UHPLC-Methode zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite. _____	223
Tabelle 10.9: Bestandteile der 42 L-Rührkesselreaktor-Anlage. _____	224
Tabelle 10.10: Bestandteile des Vierfach-Parallelbioreaktorsystems. _____	224
Tabelle 10.11: Bestandteile des 48fach-Parallelbioreaktorsystems. _____	224
Tabelle 10.12: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Glucose. _____	225
Tabelle 10.13: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Glycerin. _____	227

Tabelle 10.14: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Succinat. _____	229
Tabelle 10.15: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren mit der Kohlenstoffquelle Pyruvat. _____	231
Tabelle 10.16: Theoretisch abgeschätzte Flussverteilungen während der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren im Referenzprozess. _____	233
Tabelle 10.17: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Glucose. _____	236
Tabelle 10.18: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Glycerin. _____	238
Tabelle 10.19: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Succinat. _____	242
Tabelle 10.20: Proteine mit signifikanter Änderung bei vergleichender Proteomquantifizierung von Referenzzustand und Analysenreaktor mit Pyruvat. _____	244
Tabelle 10.21: Für die Berechnung der MCA berücksichtigte Reaktionen, ihre Stöchiometrie und Einordnung bezüglich des thermodynamischen Zustandes. _____	245

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Vereinfachter Kohlenstoffmetabolismus von <i>E. coli</i> _____	10
Abbildung 3.2: Strukturformeln der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (links), L-Tyrosin (Mitte) und L-Tryptophan (rechts). _____	16
Abbildung 3.3: Phasen mikrobiellen Wachstums während eines Satzprozesses. _____	21
Abbildung 4.1: Versuchsaufbau für Zulaufkultivierungen im 15 L-Maßstab. _____	55
Abbildung 4.2: Versuchsaufbau des Vierfach-Parallelbioreaktorsystems zur metabolischen Analyse. _____	57
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Vorgehens zur Durchführung parallelisierter metabolischer Analysen im Zulaufbetrieb. _____	58
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Zulaufprofils während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb. Mit Pfeilen markiert sind die Zeitpunkte der Probenahmen für extrazelluläre (E1–E4) und intrazelluläre Analytik (I1–I3). _____	59
Abbildung 5.1: PEP-Konzentrationen bei Satzkultivierungen von <i>E. coli</i> ohne und mit PEP-Transporter in Schüttelkolben. _____	68
Abbildung 5.2: L-Phenylalanin-Produktionsprozess im 15 L-Maßstab mit <i>E. coli</i> FUS4 <i>UhpT-D388C</i> pF81 _{kan} . _____	69
Abbildung 5.3: Parallelisierte Kurzzeitanalyse mit PEP als Effektor nach schnellem Medienwechsel mit <i>E. coli</i> FUS4 <i>UhpT-D388C</i> pF81 _{kan} entnommen aus 15 L-Produktionsprozess 6 h nach Induktion. _____	72
Abbildung 5.4: Biomasse-spezifische Aufnahme- und Bildungsrate während der metabolischen Analyse der L-Phenylalanin-Produktion mit <i>E. coli</i> FUS4 <i>UhpT-D388C</i> pF81 _{kan} . _____	74
Abbildung 5.5: Intrazelluläre Flussverteilungen abgeschätzt auf Grundlage extrazellulärer Raten, die während der metabolischen Analyse mit PEP als Effektor ermittelt wurden. _____	76
Abbildung 5.6: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> NT367 _____	79
Abbildung 5.7: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit <i>E. coli</i> NT367 im 15 L-Maßstab. _____	81
Abbildung 5.8: Erzielte Anteile an theoretischer maximaler L-Tryptophan-Ausbeute während der Produktionsprozesse im 15 L-Maßstab mit der Kohlenstoffquelle Glycerin _____	82
Abbildung 5.9: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> NT367 pF112 _{aroFBL-kan} mit 0,2 g _{Glycerin} g _{BTM} ⁻¹ h ⁻¹ konstanter Zulauftrate _____	83

Abbildung 5.10: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit <i>E. coli</i> NT367 pF112aroFBL _{kan} im 15 L-Maßstab.	85
Abbildung 5.11: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> NT367 pF112aroFBL _{kan} mit 0,4 g _{Glycerin} g _{BTM} ⁻¹ h ⁻¹ konstanter Zulauftrate	87
Abbildung 5.12: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a pF112aroFBL _{kan}	91
Abbildung 5.13: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA</i> pF112aroFBL _{kan}	93
Abbildung 5.14: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan}	96
Abbildung 5.15: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Satzverfahren.	100
Abbildung 5.16: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan} im 15 L-Maßstab als Grundlage einer metabolischen Analyse im Satzbetrieb.	101
Abbildung 5.17: 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Satzverfahren.	102
Abbildung 5.18: Atmungsraten (Sauerstoffaufnahme OUR ● und CO ₂ -Bildungsrate CPR ●) im Referenzprozess im Zeitraum der metabolischen Analyse im Satzverfahren.	102
Abbildung 5.19: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Referenzzustand (15 L-Produktionsprozess) für die metabolische Analyse im Satzverfahren.	104
Abbildung 5.20: Konzentrationsverläufe der Kohlenstoffquellen (C-Quelle ● jeweils wie links oben angegeben) und Produkt L-Tryptophan (L-Trp ○) in den vier Reaktoren des Parallel-Bioreaktorsystems während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion im Satzverfahren	107
Abbildung 5.21: Atmungsraten (O ₂ -Aufnahmerate OUR ● und CO ₂ -Bildungsrate CPR ●) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion im Satzverfahren in den vier Reaktoren des Parallelbioreaktorsystems	108
Abbildung 5.22: Experimentell ermittelte extrazelluläre Aufnahme- und Bildungsraten (Substrataufnahme, Produkt- und Nebenproduktbildung sowie Atmungsraten) während der parallelisierten Kurzzeitanalyse im Satzverfahren	111

Abbildung 5.23: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit Glucose der metabolischen Analyse im Satzverfahren. _____	113
Abbildung 5.24: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit Glycerin der metabolischen Analyse im Satzverfahren. _____	115
Abbildung 5.25: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit Succinat der metabolischen Analyse im Satzverfahren. _____	117
Abbildung 5.26: Intrazelluläre Stoffflussverteilung im Ansatz mit Pyruvat der metabolischen Analyse im Satzverfahren. _____	119
Abbildung 5.27: Während der metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb angestrebter Verlauf der Substrataufnahmeraten. _____	122
Abbildung 5.28: Konzentrationsverläufe während der 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren. _____	123
Abbildung 5.29: Integrale Kohlenstoffbilanz des L-Tryptophan-Produktionsprozesses mit <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan} im 15 L-Maßstab als Grundlage einer metabolischen Analyse im Zulaufbetrieb. _____	125
Abbildung 5.30: 15 L-Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> TRP5a <i>tktA serA trpBA</i> pF112aroFBL _{kan} als Grundlage der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren. _____	125
Abbildung 5.31: Atmungsraten (O ₂ -Aufnahmerate OUR ● und CO ₂ -Bildungsrate CPR ●) im Referenzprozess im Zeitraum der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren _____	126
Abbildung 5.32: Atmungsraten (Sauerstoffaufnahme OUR ● und CO ₂ -Bildungsrate CPR ●) während der metabolischen Analyse der L-Tryptophan-Produktion im Zulaufverfahren in den vier Reaktoren des Parallelbioreaktorsystems _____	127
Abbildung 5.33: Experimentell ermittelte extrazelluläre Aufnahme- und Bildungsraten (Substrataufnahme, Produkt- und Nebenproduktbildung sowie Atmungsraten) während der parallelisierten Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____	129
Abbildung 5.34: Hitzediagramme der mittels geometrischer Flussbilanzanalyse abgeschätzten intrazellulären Flussverteilungen während der Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren in Analysenreaktoren und im Referenzprozess. _____	135
Abbildung 5.35: Intrazelluläre Konzentrationen der Energieäquivalente Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____	141

- Abbildung 5.36: Intrazelluläre Konzentrationen der Cofaktoren oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid (NAD), reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) und reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____ 142
- Abbildung 5.37: Intrazelluläre Konzentrationen der Glykolyse-Metabolite Glucose-6-Phosphat (G6P), Fructose-6-Phosphat (F6P), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), 3-Phosphoglycerat (3PG) und Phosphoenolpyruvat (PEP) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____ 144
- Abbildung 5.38: Intrazelluläre Konzentrationen der Zentralstoffwechsel-Metabolite Pyruvat (PYR), AcetylCoA (AcCoA), SuccinylCoA (SuccCoA), und Fumarat (FUM) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____ 146
- Abbildung 5.39: Intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite aus Glycerin- und L-Serin-Stoffwechsel Glycerin-3-Phosphat (Gly3P) und L-Phospho-Serin (pser-L) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____ 148
- Abbildung 5.40: Intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite des Pentose-Phosphat-Weges 6-Phosphogluconat (6PG), Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P), Ribose-5-Phosphat (R5P) und Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____ 149
- Abbildung 5.41: Intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite des Aromatenbiosyntheseweges 3-Dehydroshikimat (3DHS), Shikimat-3-Phosphat (S3P), Chorismat (CHOR), Prephenat (PPHN), Phenylpyruvat (PhePyr), Anthranilat (ANTH), Carboxyphenylamino-Desoxyribulose-5-Phosphat (2CDR5P) und Indol-3-Glycerinphosphat (3IG3P) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____ 151
- Abbildung 5.42: Thermodynamische Abschätzung möglicher Konzentrationsbereiche der Metabolite Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P), 2-Phosphoglycerat (2PG), Erythrose-4-Phosphat (E4P), Xylulose-5-Phosphat (X5P), 3-Phosphohydroxypyruvat (3PHP), Shikimat (SHIK), Prephenat (PPHN) und Indol (IND) während der metabolischen Kurzzeitanalyse im Zulaufverfahren _____ 155
- Abbildung 5.43: Vergleich zwischen den mittels thermodynamischer Analyse als möglich ermittelten Konzentrationsbereiche von R5P und Ru5P _____ 158
- Abbildung 5.44: Mittels anNET Analyse abgeschätzte Bereiche der möglichen Gibbs'schen Reaktionsenergien für die L-Tryptophan-Produktion im Referenzprozess. _____ 159
- Abbildung 5.45: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Glycerinkinase 165

Abbildung 5.46: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase _____	166
Abbildung 5.47: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Fructose-1,6-Bisphosphatase _____	166
Abbildung 5.48: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Pyruvatkinase _	167
Abbildung 5.49: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Pyruvatdehydrogenase _____	168
Abbildung 5.50: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Citratsynthase _	169
Abbildung 5.51: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Isocitratdehydrogenase _____	169
Abbildung 5.52: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Succinatdehydrogenase _____	170
Abbildung 5.53: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase _____	171
Abbildung 5.54: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion der Phosphoserinaminotransferase _____	171
Abbildung 5.55: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion 3-Deoxy-7-Phosphoheptulonat-Synthase _____	172
Abbildung 5.56: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Shikimat-Kinase __	173
Abbildung 5.57: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion 3-Phosphoshikimat-1-carboxyvinyltransferase _____	174
Abbildung 5.58: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Prephenat-Dehydrogenase _____	174
Abbildung 5.59: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Anthranilat-Synthase	175
Abbildung 5.60: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Anthranilat-Phosphoribosyltransferase _____	175
Abbildung 5.61: Verteilung von 10.000 Elastizitätskoeffizienten der Reaktion Indol-3-Glycerinphosphat-Synthase _____	176
Abbildung 5.62: Fluss-Kontrollkoeffizienten ermittelt durch metabolische Kontrollanalyse der L-Tryptophan-Produktion im Zulaufverfahren. _____	178

- Abbildung 6.1: Zulaufprozess zur Herstellung von L-Tryptophan im 15 L-Maßstab mit *E. coli* TRP5a *tktA serA trpBA* pF112 $aroFBL_{kan}$. Blau markiert ist der Zeitraum der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren. Die dabei gewonnenen Daten erlauben die Berechnung einer metabolischen Kontrollanalyse und somit die Abschätzung von Flusskontrollkoeffizienten. Von diesen ist eine Auswahl oben links dargestellt. Sie geben Handlungsanweisungen zur weiteren Stammverbesserung für eine erhöhte Produktbildung, die im Stoffwechselbild rechts gezeigt sind: grün markierte Reaktionen sollen verstärkt und rot markierte deletiert werden. _____ 194
- Abbildung 10.1: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit Glucose als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. _____ 235
- Abbildung 10.2: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit Glycerin als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. _____ 237
- Abbildung 10.3: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit Succinat als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. _____ 241
- Abbildung 10.4: *Volcano Plot* der vergleichenden Proteomanalyse von 15 L Prozess vor der metabolischen Analyse im Zulaufverfahren und Analysenreaktor mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle am Ende der Analyse. _____ 243