



Institut für Biotechnologie

***Quantifizierung intrazellulärer
Metabolitdynamiken zur Untersuchung
mikrobieller Stoffwechselnetzwerke***

Arne Karsten Buchholz

***Quantifizierung intrazellulärer
Metabolitdynamiken zur Untersuchung
mikrobieller Stoffwechselnetzwerke***

Arne Karsten Buchholz

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3971
ISSN 0944-2952
Institut für Festkörperforschung Jül-3971
D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung

In der modernen Biotechnologie kann die gezielte, rationale Steigerung der Produktivität zellulärer Systeme grob in zwei Teilbereiche eingeteilt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit über eine Optimierung der biotechnischen Prozeßführung ("bioprocess engineering") eine Steigerung der Produktivität zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit bildet die gezielte Verbesserung des verwendeten zellulären Systems über gentechnische Eingriffe in dessen Stoffwechsel ("metabolic engineering").

Die Entwicklung der molekularbiologischen Techniken eröffnet heutzutage die Möglichkeit, gezielt in den Stoffwechsel der Produktionsorganismen einzugreifen und gestattet somit eine rationale Entwicklung von Produktionsstämmen. Voraussetzung ist jedoch eine quantitative Beschreibung der Dynamik und Regulation von Stoffflüssen in den mikrobiellen Stoffwechselnetzwerken.

In dieser Arbeit erfolgt die Stoffwechselquantifizierung über eine dynamische Methode bei welcher der Mikroorganismus in einem definierten Fließgleichgewichtszustand kultiviert wird, um dann schlagartig aus dieser Gleichgewichtslage ausgelenkt zu werden ("Pulsexperiment"). Über eine schnelle Probenahme und anschließende Analyse der intrazellulären Metabolitkonzentrationen wird die Antwort des Stoffwechsels auf diese Veränderung quantifiziert.

Unter Verwendung eines neuartigen Pulsaufgabesystems und in Kombination mit einer in früheren Arbeiten entwickelten schnellen Probenahme wurden verschiedene dynamische Pulsexperimente durchgeführt. Die Quantifizierung der dynamischen intrazellulären Metabolitkonzentrationen erfolgte über neu entwickelte Analytik-Methoden aus dem Bereich der HPLC-MS, UV-HPLC, CE und der enzymatischen Assays.

Im Bereich der Glucose-Verstoffwechslung fanden Untersuchungen an der Substrataufnahme durch das PEP:PTS sowie der weiteren Verwertung in *Escherichia coli* K12 statt. Anhand eines gentechnisch veränderten Stammes wurden diese Untersuchungen erweitert. An einem PTS-defizientem Stamm (*E. coli* 3pMK7) wurde die veränderte Stoffwechselsituation bei einer Umstellung der Abhängigkeit der Substrataufnahme von PEP auf ATP analysiert. Ebenso wurde an *E. coli* K12 die Verstoffwechslung von Glycerol untersucht. Es konnte mitunter eine starke Abhängigkeit der Glycerolaufnahme von der intrazellulären ATP Konzentration nachgewiesen werden. In einem Experiment zur Substratumstellung von Glycerol auf Glucose konnte die starke Abhängigkeit der Glucoseaufnahme von der verfügbaren PEP Konzentration bestätigt werden.

Die zeitlichen Verläufe der intrazellulären Metabolitkonzentrationen aus solchen Experimenten bilden die Grundlage für die Entwicklung kinetischer (strukturierter) Stoffwechselmodelle. Durch die Modellierung der erhaltenen Daten konnten zahlreiche Stoffwechselphänomene, welche zuvor nur phänomenologisch erklärt wurden, im Rahmen strukturierter Modelle quantifiziert werden.

Abstract

The rational improvement of the productivity of cellular systems is one of the main goals of modern biotechnology and may be accomplished in two ways. One approach is the optimization of the production process ("bioprocess engineering"). Another possibility is the improvement of the cellular system itself by manipulating the metabolic pathways ("metabolic engineering").

A precise manipulation of microbial metabolism, and thereby a rational strain development, is possible today by using the tools of molecular biology. However, a prerequisite of this manipulation is a detailed and quantitative knowledge of the dynamics and regulation of metabolic fluxes in microbial metabolism.

In this work a dynamic method is used for the quantification of microbial metabolism. The microorganism is cultivated in a substrate limited steady state and then rapidly shifted away from this metabolic equilibrium by application of a substrate pulse ("pulse experiment"). Samples are taken using a rapid sampling and quenching technique, which was developed in earlier works. The metabolites are then extracted and analyzed to determine the metabolic response of the microorganism.

Using a novel system for injecting substrate pulses, a number of dynamic pulse experiments were performed. Intracellular metabolite dynamics were quantified using newly developed analytical techniques based on HPLC-MS, UV-HPLC, CE and enzymatic assays. .

Pulse experiments were carried out to investigate the glucose uptake and utilisation via the PEP:PTS in *Escherichia coli* K12. The scope of these investigations was expanded using a genetically modified, PTS-deficient strain *E. coli* 3pMK7 in order to determine the metabolic changes taking place when the substrate uptake depends on ATP instead of PEP. Additionally, the utilisation of glycerol by *E. coli* K12 and the dependency of glycerol uptake on ATP was investigated. In a further experiment, the switch from glycerol to glucose as carbon source during a pulse experiment showed a strong limitation of the available PEP concentration during uptake.

The time courses of intracellular metabolite concentrations from these pulse experiments are the basis for the development of kinetic (structured) metabolic models. The modelling of the experimental data allowed a quantification of metabolic phenomena which up until now could only be explained phenomenologically.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Problemstellung und Zielsetzung	3
3. Theoretische Grundlagen	7
3.1. Biologische Grundlagen	7
3.1.1. Genomische Biologie	7
3.1.2. Charakterisierung von <i>Escherichia coli</i>	9
3.1.3. Glycolyse	11
3.1.4. Gluconeogenese	12
3.1.5. Citratcyclus	13
3.1.6. Pentosephosphatweg	13
3.1.7. Regulation	16
3.2. Verfahrenstechnische Grundlagen	18
3.2.1. Bakterienwachstum in statischer Kultur	18
3.2.2. Bakterienwachstum in kontinuierlicher Kultur	19
4. Verfahrenstechnische Methoden	23
4.1. Biologisches Testsystem	23
4.1.1. Stammbeschreibung	23
4.1.2. Stammhaltung	23
4.2. Apparativer Aufbau und Durchführung der Versuche	23
4.2.1. Bioreaktor	23
4.2.2. Automatisierte Probenahme	24
4.2.3. Pulssteuerung	26
4.2.4. Versuchsdurchführung	26
5. Analytische Methoden	33
5.1. HPLC-MS ⁿ Kopplung	33
5.1.1. Ionisierung	34
5.1.2. Detektion	34
5.1.3. MS/MS Experimente	35
5.1.4. ESI-TOF-Massenspektrometer	37
5.2. Capillarelektrophorese	38
5.3. HPLC-Methoden	40
5.3.1. HPLC-MS ⁿ Methoden	40

5.3.2.	Nucleotide	42
5.3.3.	Pentosephosphate	43
5.3.4.	Organische Säuren	44
5.3.5.	Aminosäuren	44
5.4.	³¹ P-NMR Spektrometrie	44
5.5.	Enzymatische Nachweismethoden	45
5.6.	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
5.7.	Bestimmung der Biomassekonzentration	48
5.7.1.	Bestimmung der optischen Dichte (OD ₆₅₀)	48
5.7.2.	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)	49
5.7.3.	Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens	49
5.8.	Desaktivierung, Extraktion und Analyse der Proben	50
5.8.1.	Extrazelluläre Metabolite	50
5.8.2.	Intrazelluläre Metabolite	50
5.8.3.	Metabolic Modeling Tool (MMT)	54
6.	Ergebnisse und Diskussion	55
6.1.	Pulsaufgabesystem (PAS)	55
6.2.	MeOH-Quenching-Verfahren	56
6.2.1.	Desaktivierung	58
6.2.2.	Zellyse	58
6.2.3.	Permeabilisierung	59
6.3.	Methodische Entwicklung der Extraktionsverfahren	59
6.3.1.	Wahl des Extraktionsverfahrens	60
6.3.2.	Perchlorsäure	61
6.3.3.	Alkalisches Ethanol (KOH/EtOH)	62
6.3.4.	Ethanol/HEPES	63
6.3.5.	Zellaufschluß für Proteine	66
6.3.6.	Stabilitätsuntersuchungen und Nachweisgrenzen	66
6.4.	Entwicklung der Analysemethoden	68
6.4.1.	Capillarelektrophorese	68
6.4.2.	HPLC-Bestimmung für Nucleotide	71
6.4.3.	HPLC-Bestimmung für Pentosezucker	72
6.4.4.	LC-MS ⁿ Optimierung	72
6.4.5.	Vergleich der LC-MS Daten mit enzymatischen Assays	84
6.4.6.	Zellvolumenbestimmung	86
6.4.7.	Bestimmung des Interzellulärvolumens	87
6.5.	Untersuchungen im Batchbetrieb	89
6.6.	Untersuchungen im Fließgleichgewichtszustand	89
6.7.	Untersuchungen des dynamischen Verhaltens	93
6.7.1.	Glucosepulsexperiment <i>E. coli</i> K12 [GLC/GLC pts(+)]	93
6.7.2.	Glucosepulsexperiment <i>E. coli</i> 3pMK7 [GLC/GLC pts(-)]	104
6.7.3.	Glycerolpulsexperiment <i>E. coli</i> K12 [GLY/GLY]	111

6.7.4. Glucosepulsexperiment <i>E. coli</i> K12 [GLY/GLC]	116
6.7.5. Vergleich der Metabolitdynamiken	121
6.8. Modellierung des dynamischen Verhaltens	122
6.8.1. Modellierung des PTS	122
6.8.2. Modellierung der Glucose Verstoffwechslung	124
6.8.3. Modellierung der Glycerol Verstoffwechslung	127
6.8.4. Vergleich von <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Enzymkinetiken	127
7. Zusammenfassung und Ausblick	131
7.1. Zusammenfassung	131
7.1.1. Anlagenoptimierung	131
7.1.2. Analytik	132
7.1.3. Dynamische Pulsexperimente	133
7.1.4. Modellierung	133
7.2. Ausblick	133
8. Anhang	137
8.1. Quenching	137
8.2. Proteinidentifizierung und Quantifizierung	139
8.3. Hauptkomponentenanalyse	144
8.4. Genetische Algorithmen	147
8.5. Fehlerbetrachtung	152
8.6. Berechnung der Kohlenstoffbilanzen	154
8.7. Weiterführende Untersuchungen zum Zellaufschluß	157
8.8. Symbole und Abkürzungen	158
8.9. Verwendete Medien	161
8.9.1. Substratkonzentrationen	161
8.9.2. Synthetisches Medium für die erste und zweite Vorkultur	161
8.9.3. Synthetisches Medium für die Batchfermentation	162
8.9.4. Synthetisches Medium für den Chemostat	162
8.9.5. Stammlösung für Spurenelemente	163
8.10. Verwendete Chemikalien und Enzyme	164
8.11. Verwendete Geräte	165
8.12. Verwendete Software	167
8.13. MS Parameter	167
8.14. Chromatogramme	168
8.15. Pulsaufgabenbesystem (PAS)	170
Literaturverzeichnis	175
Tabellenverzeichnis	193
Abbildungsverzeichnis	195

1. Einleitung

“Wir befinden uns in etwa in der gleichen Lage wie jemand, der sich ein Bild von dem Leben in einer Hausgemeinschaft machen will, indem er genau beobachtet, welche Personen und Dinge in das Haus hinein gelangen beziehungsweise es wieder verlassen; wir zeichnen an der Tür akkurat die Nahrung und die sonstigen Waren auf, nehmen geduldig den Inhalt des Mülleimers unter die Lupe und bemühen uns, aus den Daten die Ereignisse zu rekonstruieren, die sich hinter den verschlossenen Türen abspielen.”

Marjory Stephenson über den mikrobiellen Stoffwechsel, 1930

Die moderne Biotechnologie versteht sich als die integrierte Anwendung von Natur- und Ingenieurwissenschaften zum Zweck der Nutzung von lebenden Organismen oder ihrer zellulären und subzellulären Bestandteile (bzw. ihrer Stoffwechselprozesse) in großtechnischen Anlagen [1].

Wie viele industrielle technische Anwendungen, so sind auch biotechnologische Prozesse dem ständigen Druck der Produktivitätssteigerung unterworfen. Die gezielte, rationale Steigerung der Produktivität zellulärer Systeme kann grob in zwei Teilbereiche eingeteilt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit über eine Optimierung der biotechnischen Prozeßführung (“bioprocess engineering”) eine Steigerung der Produktivität zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit bildet die gezielte Verbesserung des verwendeten zellulären Systems über gentechnische Eingriffe in dessen Stoffwechsel (“metabolic engineering”) [2, 3, 4, 5, 6]. Die Resultate letzterer Methode wären molekularbiologisch optimierte Produktionsstämme mit z.B. erhöhter Produktivität, erhöhter Produkt/Substrat-Selektivität, höherer Toleranz gegen Umwelteinflüsse oder komplett neu konstruierten Stoffwechselwegen [7, 8].

In der Vergangenheit erfolgte das “metabolic engineering” (bzw. “metabolic design”) meist über traditionelle Mutagenese-Screening Verfahren, welche trotz ihres indirekten Ansatzes z.T. erhebliche Erfolge aufweisen konnten (z.B. in der Domestizierung der Brau- und Bäckerhefe *Saccharomyces* oder in der Penicillin-

Produktion [9]).

Die Entwicklung der molekularbiologischen Techniken eröffnet heutzutage jedoch die Möglichkeit, gezielt in den Stoffwechsel der Produktionsorganismen einzugreifen und erlaubt somit erstmals eine rationale Entwicklung von Produktionsstämmen.

Der gezielte gentechnische Eingriff wird jedoch extrem erschwert durch die enorme Komplexität des Stoffwechsels. Während ein fundiertes Wissen über die Stoffwechselwege vieler Organismen existiert, so sind quantitative Erkenntnisse über die Dynamik und Regulation der Stoffflüsse in diesem Netzwerk nicht ausreichend. Eine Quantifizierung des Stoffwechsels ist jedoch eine Grundvoraussetzung für dessen gezielte Manipulation.

Die Stoffwechselquantifizierung, d.h. die Bestimmung der metabolischen Stoffflüsse, erfolgt über stationäre und dynamische Verfahren. In der stationären Stoffflußanalyse wird durch die Kombination von Metabolit-Bilanzierungstechniken und Isotopenmarkierungsmethoden die Stoffflußverteilung in einem definierten Fließgleichgewichtszustand bestimmt ("metabolic flux analysis", MFA: siehe u.a. [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]) Die dadurch erhaltenen stationären Flußanalysen erlauben die Bestimmung sowohl intrazellulärer Nettoflüsse, als auch Austauschflüsse bidirektional ablaufender Reaktionsschritte.

Die vorliegende Arbeit ist im Bereich der dynamischen Stoffflußanalyse angesiedelt. Die dynamische Stoffflußanalyse gestattet über die stationäre Stoffflußanalyse hinaus auch die Untersuchung von Systemen außerhalb des Fließgleichgewichtszustands. Hierbei wird der Mikroorganismus in einem definierten Fließgleichgewichtszustand kultiviert, um dann schlagartig aus dieser Gleichgewichtslage ausgelenkt zu werden ("Pulsexperiment"). Über eine schnelle Probenahme und anschließende Analyse der intrazellulären Metabolitkonzentrationen kann die Antwort des Stoffwechsels auf diese Veränderung quantifiziert werden [17, 18, 19].

Die zeitlichen Verläufe der intrazellulären Metabolitkonzentrationen aus solchen Experimenten bilden die Grundlage für die Entwicklung kinetischer (strukturierter) Stoffwechselmodelle. Solche Modelle stellen die detaillierteste Möglichkeit der intrazellulären Stoffflußanalyse dar [20]. Ziel dieser Arbeit ist es, anhand der Erkenntnisse aus dynamischen Pulsexperimenten sowie der *in vivo* Bestimmung enzymkinetischer Parameter mittels strukturierter Stoffwechselmodelle ein quantitatives Verständnis des mikrobiellen Stoffwechsels zu erlangen.

In einem iterativen Prozeß zwischen dynamischem Pulsexperiment, Stoffwechselmodellierung und gentechnischem Eingriff wird somit nicht nur ein quantitatives Verständnis des Stoffwechsels, sondern auch eine rationale Entwicklung von Produktionsstämmen ermöglicht.

2. Problemstellung und Zielsetzung

“Je weiter sich das Wissen ausbreitet, desto mehr Probleme kommen zum Vorschein”

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Die Kombination von analytischen Methoden zur quantitativen Untersuchung mikrobieller Stoffwechselnetzwerke und deren gezielter Veränderung durch molekularbiologische Techniken ist einer der Hauptbestandteile des “metabolic engineering”. In einem iterativen Prozeß zwischen Stoffwechselanalyse einerseits und molekularbiologischen Eingriffen andererseits sollen dynamische Stoffwechselmodelle erarbeitet werden, welche eine systematische Entwicklung von Mikroorganismen mit gesteigerten Produkt/Substrat-Selektivitäten und erhöhter Produktivität gestatten. Um eine umfangreiche und akkurate Datenbasis für die Entwicklung von Modellen zur Verfügung zu stellen, ist jedoch eine sichere und zuverlässige Messung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen und -konzentrationsverläufe unter definierten Reaktionsbedingungen unumgänglich [20]. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher die Etablierung und Anwendung exakter Analysemethoden für Metabolite des Zentralstoffwechsels.

Analytik

Neben der Weiterentwicklung der bisher verwendeten enzymatischen und UV-HPLC Methoden [21, 22, 23] sollen zusätzlich die Potentiale weiterer Analysemethoden untersucht werden. Da das zur Verfügung stehende Probenvolumen bei der Verwendung von enzymatischen Assays meist limitierend in bezug auf Anzahl und Frequenz der meßbaren Analyte ist, liegt das Augenmerk hierbei hauptsächlich auf Methoden, welche nur sehr geringe Analysevolumina benötigen. Diesem Kriterium entspricht z.B. die Capillarelektrophorese, welche mit Analysevolumina im Nanoliterbereich arbeitet. Im Hinblick auf die Analyse eines sehr breiten Substanzspektrums bei geringem Probenvolumen ist auch die Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie, HPLC-MS, von Interesse. Diese Technik ist für den qualitativen Nachweis einer großen Anzahl unterschiedlicher Substanzen entwickelt worden [24, 25, 26], jedoch fehlt hier der quantitative Zugang zur Analytik von Metaboliten des Zentralstoffwechsels. Fernerhin soll die Verwend-

2. Problemstellung und Zielsetzung

barkeit der ^{31}P -NMR Spektrometrie und, im Bereich der Proteinidentifizierung und -quantifizierung, der 2D-Gelelektrophorese untersucht werden.

Für die Berechnung intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen ist neben den über unterschiedliche analytische Verfahren bestimmten Konzentrationen auch eine präzise Kenntnis des Gesamzellvolumens notwendig. Bisher wurde von einem konstanten, literatur-bekanntem, spezifischen Zellvolumen K_E ausgegangen [22]. Da das Zellvolumen jedoch eine komplexe Variable ist, die nicht nur von Stamm zu Stamm, sondern auch mit den Wachstumsbedingungen (z.B. Substrat, Wachstumsrate, etc. [27, 28]) variiert, muß eine Möglichkeit der direkten experimentellen Bestimmung des Zellvolumens etabliert werden.

Grundsätzlich müssen die oben beschriebenen analytischen Verfahrenstechniken gewährleisten, daß die nach Probenahme und Aufarbeitung gemessenen Metabolitkonzentration der tatsächlichen Metabolitkonzentration zum Probenahmezeitpunkt in den Zellen entsprechen. Hierzu muß der bakterielle Stoffwechsel inaktiviert und die Stoffwechselintermediate (Metabolite, Nucleotide, Cofaktoren) extrahiert werden. Nach einer raschen und quantitativen Inaktivierung des Stoffwechsels zum Zeitpunkt der Probenahme ("Quenching") und einer Abtrennung der Zellen werden daher Aufschlußmethoden benötigt, welche sowohl unter Berücksichtigung der Metabolitstabilität als auch der anzuwendenden Analysemethoden reproduzierbare Ergebnisse liefern [29].

Anlagenoptimierung

Neben der analytischen Erfassung von Metabolitkonzentrationen ist aufgrund der hohen Umsatzraten und geringen intrazellulären Konzentrationen der meisten Stoffwechselmetabolite eine schnelle Probenahme (d.h. eine hohe zeitliche Auflösung) Voraussetzung für Untersuchungen der Stoffwechseldynamik. Typische Umsetzungsgeschwindigkeiten für intrazelluläre Metabolite liegen im Bereich $\leq 1,5 \text{ mM s}^{-1}$ [30, 21]. Bei Metabolitkonzentrationen in der Größenordnung von 1 mM wird deutlich, daß sowohl Inaktivierungszeiten unterhalb einer Sekunde als auch Probenahmefrequenzen $> 1 \text{ s}^{-1}$ notwendig sind, um dynamische Änderungen intrazellulärer Metabolitkonzentrationen verfolgen zu können [20] (siehe hierzu auch Abbildung 2.1). In früheren Arbeiten ist am Institut für Biotechnologie 2 daher ein geeignetes Probenahmesystem konstruiert worden [22] welches in dieser Arbeit Verwendung findet.

Aus den oben genannten Gründen ist bei der Messung von Metabolitdynamiken auch die Gewährleistung eines schnellen Übergangs von einem substratlimitierten zu einem nicht-substratlimitierten Zustand der gesamten Zellpopulation (ohne die Beeinflussung anderer experimenteller Parameter) notwendig. Dies erfordert die Konstruktion eines Pulsaufgabesystems, welches es gestattet bei minimaler Mischzeit dem Reaktionssystem exakte Volumina zuzuführen.

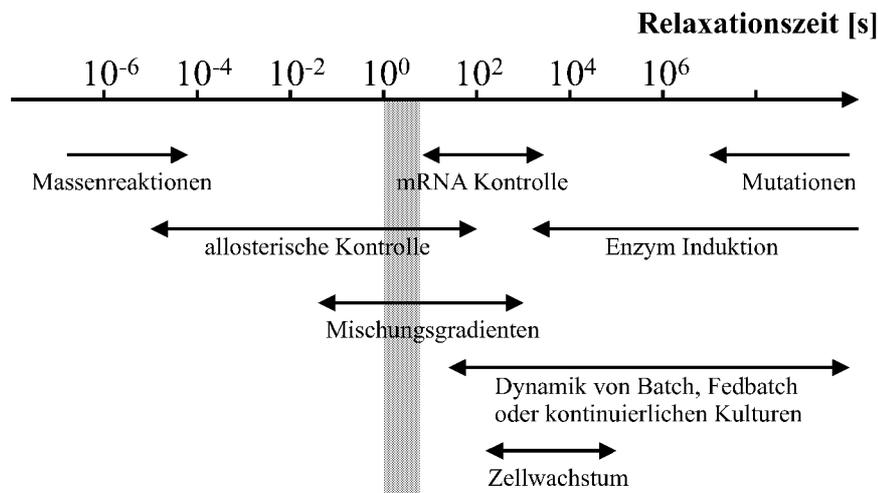


Abbildung 2.1.: Relaxationszeiten unterschiedlicher Prozesse in Mikroorganismen und Bioreaktoren. Der grau schraffierte Bereich kennzeichnet das Zeitfenster der durchgeführten Pulsexperimente.

Pulsexperimente

Unter Berücksichtigung der neuartigen Analysenmethoden ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, dynamische Stoffwechseluntersuchungen an dem Mikroorganismus *Escherichia coli* durchzuführen. Obwohl die analytischen Techniken im Prinzip für jeden Organismus anzuwenden sind, fiel die Wahl auf *E. coli*, da es sich hierbei um einen der physiologisch, genetisch und metabolisch am besten charakterisierten Mikroorganismen handelt [27, 31]. Als Ausgangsbasis für die dynamischen Pulsexperimente wird *E. coli* in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor unter definierten, substrat-limitierten Reaktionsbedingungen kultiviert. Nach dynamischer Auslenkung des Systems aus dem Fließgleichgewichtszustand (steady state) durch einen Substrat-Puls, wird mittels schneller Probenahme und sofortiger Inaktivierung des Stoffwechsels die Veränderung ausgewählter Metabolite, Nucleotide und Cofaktoren mit hoher zeitlicher Auflösung gemessen.

Im Vordergrund der Untersuchungen stehen die Aufnahmesysteme und Stoffwechselwege für die Substrate Glucose und Glycerol.

Modellierung

Die unter Verwendung der oben genannten Techniken durchgeführten dynamischen Pulsexperimente sollen als Basis für die Erstellung dynamischer und strukturierter Stoffwechselmodelle dienen. Unter Verwendung einer am Institut für Biotechnologie 2 entwickelten Modellierungssoftware (MMT, [32]) sollen in Kooperation mit den Stoffwechselmodellierern Dr. J. Hurlebaus und Dipl.-Chem. D. Degenring Stoffwechselmodelle erstellt werden.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Diese Modelle beschränken sich auf den Zentralstoffwechsel von *E. coli*. Beim Zentralstoffwechsel (Glycolyse, Citratcyclus, Pentosephosphatweg) handelt es sich um ein (zumindestens qualitativ) intensiv untersuchtes System (u.a. [33, 10, 34, 35, 36]). Fernerhin ist er für den zellulären Stoffwechsel hinsichtlich der Verteilung des Kohlenstoffflusses für Biosynthese und Energiehaushalt von entscheidender Bedeutung. Da der experimentelle Zeitraum, d.h. das Zeitfenster der schnellen Probenahme, lediglich ca. 40 s umfaßt, findet eine Regulation auf genetischer Ebene während des Versuches nicht statt und kann für die Modellierung vernachlässigt werden (siehe hierzu auch Abbildung 2.1).

In einem iterativen Prozess (siehe Abbildung 2.2) sollen die erstellten Modelle validiert und weiterentwickelt werden, um so ein möglichst quantitatives Verständnis des bakteriellen Stoffwechsels zu erlangen [37].

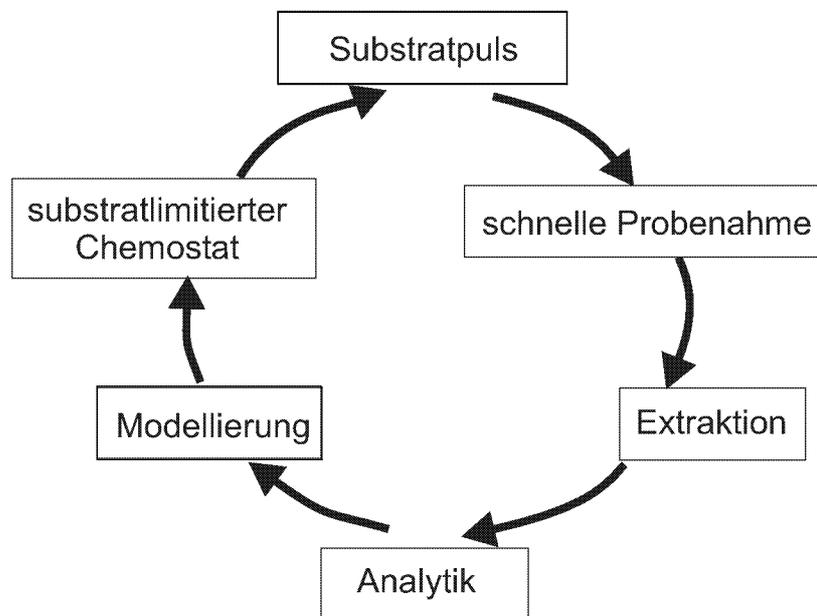


Abbildung 2.2.: Iterative Vorgehensweise zur Stoffwechselquantifizierung. Ausgehend von einem substratlimitierten Chemostat wird ein Puls-experiment durchgeführt. Die hieraus gewonnenen Daten dienen als Basis für die Stoffwechselmodellierung. Anhand der generierten Modelle werden weitere dynamische Pulsexperimente durchgeführt, welche korrekte Modelle identifizieren und validieren sollen.

3. Theoretische Grundlagen

“Der Blick des Forschers fand nicht selten mehr als er zu finden wünschte”

Gotthold Ephraim Lessing (1729-1781)

3.1. Biologische Grundlagen

3.1.1. Genomische Biologie

“Metabolic engineering”, d.h. die gezielte Verbesserung zellulärer Systeme mittels gentechnischer Eingriffe, ist ein Oberbegriff für eine große Anzahl unterschiedlichster Methoden und Techniken. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz, die Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken, läßt sich am besten dem Bereich der “Metabolomics” zuordnen. Zu dem Forschungsgebiet der genomischen Biologie gehören neben Metabolomics und Proteomics auch Genomics und Transcriptomics (siehe Abbildung 3.1).

Die Genomanalyse (Genomics) ist eine gängige, zum Großteil automatisierte Technik, welche Daten über den genetischen Hintergrund eines Organismus liefert. Sie liefert jedoch keine Angaben über die Aktivierung und Expression spezifischer Gene. Diese Daten werden durch mRNA-Transkriptionsprofile (Transcriptomics, DNA Chip Technology) ergänzt. Die Transkriptionsanalyse gestattet Aussagen über die Expression spezifischer Gene unter bestimmten experimentellen Bedingungen.

Die genetische Information eines Organismus ist in seiner DNA gespeichert, welche zunächst in einzelsträngige mRNA (messenger RNA) transkribiert wird. Diese Boten-RNA gibt vor, welche Proteine gebildet werden. Sie überbringt die genetische Information von der DNA zum Ort der Proteinbiosynthese, den Ribosomen. Während der Translation erfolgt die Übersetzung einer linearen Basensequenz in die Folge von Aminosäuren eines Peptids. Es kommt zu spezifischen Wechselwirkungen der mRNA mit der tRNA (transfer RNA). An den tRNA-Triplets hängt je eine Aminosäure, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft werden, so daß eine Polypeptidkette entsteht. Durch ein Stoppsignal endet der Polypeptidfaden und das Proteinprodukt kann daraus entstehen [38]. Trotzdem kann von der mRNA einer Zelle nicht auf die Proteinzusammenset-

zung geschlossen werden, da es z.B. zu posttranslationalen Modifikationen kommen kann. Deshalb ist für eine Funktionsanalyse die Kenntnis der in der Zelle vorhandenen Proteine wichtig [39, 40].

3.1.1.1. Proteomanalyse (Proteomics)

Die Proteomanalyse (Proteomics) [41] beschreibt die Untersuchung der in einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmten Bedingungen vorhandenen Proteine. Hieraus ergibt sich der Phänotyp der Zellen. Es ist die logische Fortsetzung der Genomanalyse und eine Ergänzung der Transkriptionsanalyse.

Die wesentlichen Arbeitsblöcke der Proteomanalyse sind zum einen die Detektion von Proteinen (z. B. durch 2D-Gelelektrophorese), zum anderen die Charakterisierung der einzelnen Proteine. Die zugehörigen Gene werden, soweit sie noch nicht bekannt sind, identifiziert [42].

Ist das Proteom von Bakterien bekannt, können effizientere Produktionsstämme hergestellt werden, indem die Expression der Proteine so beeinflusst wird, daß höhere Produktionsausbeuten und Produktraten erzielt werden [43]. Im Hinblick auf die Stoffwechselmodellierung stellen qualitative Angaben über die Expression eines Enzyms, bzw. quantitative Aussagen über Enzymmengen eine wichtige Information für die Bestimmung der spezifischen Katalysatorkonzentrationen der *in vivo* Kinetiken dar.

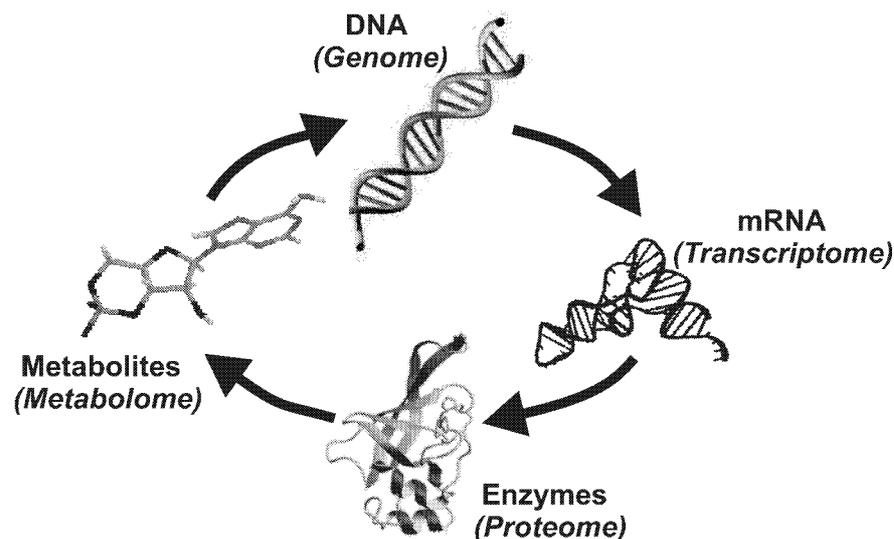


Abbildung 3.1.: Grobe Einteilung der genomischen Biologie in die Bereiche Genomics (DNA-Sequenzanalyse), Transcriptomics (Proteinexpression), Proteomics (Proteinanalyse) und Metabolomics (Analyse niedermolekularer Zellbestandteile)

3.1.1.2. Metabolomanalyse (Metabolomics)

Unter Metabolomics versteht man die Untersuchung der in einer Zelle vorhandenen niedermolekularen Bestandteile in unterschiedlichen Wachstumsphasen und unter variierenden Bedingungen [45, 46]. Hierbei kann es sich um Momentaufnahmen des gesamten Metabolitspektrums (“metabolite fingerprinting”, siehe z.B. [47]) oder um die zeitlichen Verläufe einzelner Metabolite (z.B. [48, 49, 22, 50]) handeln.

Die Daten aus der Metabolomanalyse unter dynamischen Bedingungen dienen der Berechnung von *in vivo* Enzymkinetiken und bieten somit erstmals die Möglichkeit, den Stoffwechsel der untersuchten Organismen zu quantifizieren. Fernerhin können über die intrazelluläre Akkumulation von Stoffwechselprodukten limitierende Schritte (sog. “bottlenecks”) identifiziert und unter Zuhilfenahme iterativer gentechnischer Eingriffe eliminiert werden.

Die Grundvoraussetzung für ein effektives “metabolic engineering” liegt in der interdisziplinären Kooperation dieser unterschiedlichen Wissenschaftsbereiche. Ein quantitatives Verständnis von Stoffwechselnetzwerken erfordert die kombinierte Anwendung von Genomics, Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics und mathematischer Modellierung [51].

3.1.2. Charakterisierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein gram-negatives, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes, prokaryontisches Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae. Diese Bakterien sind gut bewegliche, peritrich begeißelte Stäbchen mit einer Größe von ca. $1,0 \cdot 4,0 \mu\text{m}$. *E. coli* wurde erstmalig im Jahre 1885 vom deutschen Kinderarzt Theodor Escherich (1857-1911) als “Bacterium coli commune” beschrieben [52].

Der Stoffwechsel ist aerob (Sauerstoff-Atmung) oder fakultativ anaerob (Gärung, Nitrat-Atmung) und zum Wachstum reicht eine einfache synthetische Nährlösung bestehend aus Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle und Mineralsalzen. Unter optimalen Bedingungen (Komplexmedium, 37°C , pH-Wert zwischen 6,5-7,3) liegt die Generationszeit bei 20 Minuten [53, 27].

E. coli ist einer der sowohl molekularbiologisch als auch genetisch am detailliertesten untersuchten Organismen. Schon frühzeitig wurde er in der Biotechnologie zur Darstellung von diversen Produkten verwendet, z.B. Enzymen wie Asparaginase und Penicillin-Acylase; durch Umsetzung von Vorstufen auch Asparaginsäure und Tryptophan [54]. Mit dem Einsatz von mikrobiellen Klonierungssystemen in der Gentechnologie und der kompletten Sequenzierung des *E. coli* Genoms im Jahre 1997 [55] entwickelte sich dieser Mikroorganismus zum wichtigsten Wirtsorganismus zur Expression heterologer Proteine, z.B. Insulin, Interferon und Somatostatin. Heutzutage dient *E. coli* in der Forschung vorrangig als Organismus zur Klonierung, Amplifikation und Expression von Gensequenzen,

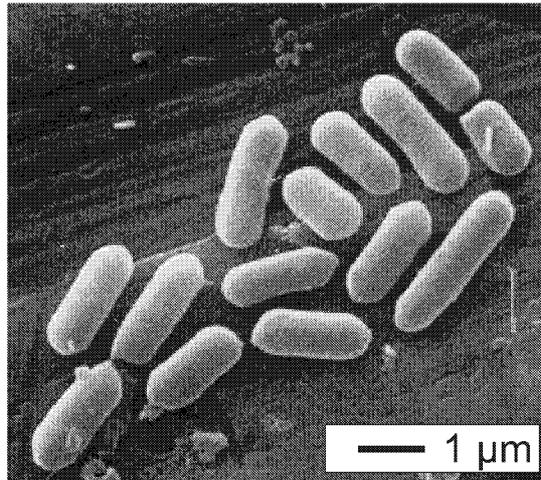


Abbildung 3.2.: *Escherichia coli*

bzw. in der Industrie zur Darstellung einer Vielzahl von Enzymen, Aminosäuren, Vitaminen und Nucleotiden [56]. Sowohl die wirtschaftliche Relevanz, als auch die umfangreichen molekularbiologischen, genetischen und fermentationstechnischen Untersuchungen machen *E. coli* zu einem idealen Modellorganismus für die Stoffwechseluntersuchungen der vorliegenden Arbeit.

3.1.2.1. Phosphotransferase System (PTS)

Der Transport des Substrates in die Zelle erfolgt im Falle eines Zuckers (Glucose, Fructose, Mannit) über das phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase System (PEP:PTS). Durch ein integrales Membranprotein (Enzym II, E_{II}) wird Zucker unter Phosphorylierung in die Zelle geschleust. Die Phosphatgruppe wird nicht direkt vom Phosphoenolpyruvat auf den Zucker, sondern über Enzym I auf das Protein HPr übertragen. Die phosphorylierte Form von HPr reagiert mit einem peripheren Membranprotein (Enzym III, E_{III} , je nach Nomenklatur auch E_{IIA}), von welchem aus das integrale Membranprotein (Enzym II, E_{II}) dann die Phosphatgruppe auf den Zucker überträgt (siehe Abbildung 3.3) [53, 57].

Die Enzyme II und III sind für jeden Zucker unterschiedlich, nur Enzym I und HPr sind am Transport aller Zucker beteiligt. In *E. coli* sind bisher insgesamt 16 Phosphotransferase Systeme bekannt [27]. Sie sind nicht nur für den Transport von Substraten in die Zelle verantwortlich, sondern spielen auch eine große regulatorische Rolle. So hemmen z.B. Zucker, die direkt durch das PTS aufgenommen werden den Transport und die Verwertung gleichzeitig vorhandener Zucker (Katabolit-Repression). Im Zusammenhang mit dem Phosphotransferase System ist Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) zu erwähnen. Während der Verstoffwechslung von Glucose ist nur eine geringe cAMP-Konzentration in der Zelle meßbar. Dies ist bedingt durch die von Adenylat Cyclase katalysierte Reaktion

von ATP zu cAMP (siehe Abbildung 3.3), welche nur dann eine hohe Aktivität zeigt, wenn die Komponenten des Phosphotransferase Systems phosphoryliert sind. Dieser Fall tritt nur dann ein, wenn keine Zucker zwecks Transport durch die Zellmembran phosphoryliert werden. Sobald keine Glucose mehr vorhanden ist, steigt der Phosphorylierungsgrad von PTS-Komponenten und die Adenylat Cyclase wird aktiviert; die zellinterne cAMP-Konzentration steigt stark an. Mit einem Anstieg von cAMP und der Bildung des Komplexes CRP-cAMP (CRP = cAMP Rezeptor Protein) ist nun die Transkription von u.a. dem lac-Operon möglich, welches während des Wachstums auf Glucose nicht exprimiert wird und eine Verstoffwechslung anderer Kohlenstoffquellen gestattet [58].

3.1.3. Glycolyse

Die Glycolyse (Abbildung 3.4), auch bekannt als EMP-Weg nach den an seiner Aufklärung beteiligten Forschern Embden, Meyerhof und Parnas, ist der wichtigste Abbauweg von Glucose zu Pyruvat. Dieser anaerobe, katabolische Stoffwechselweg liefert chemische Energie in Form von Adenosin-5'-triphosphat (ATP); gleichfalls entsteht die reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids (NADH). Die Gesamtreaktion verläuft als Bilanz nach folgender Gleichung:

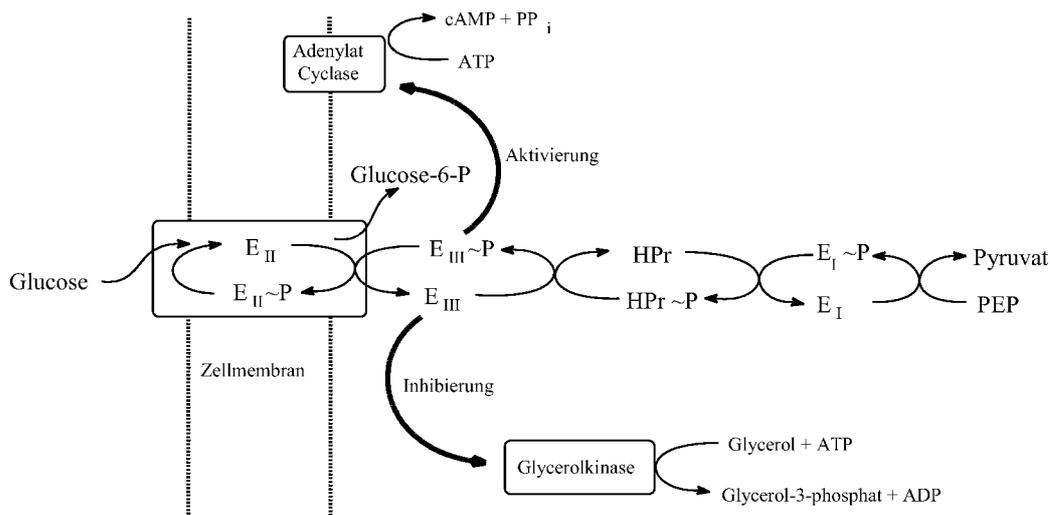
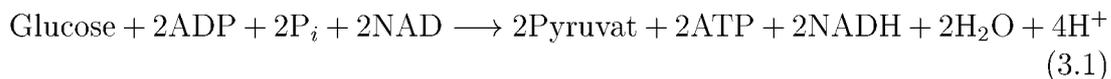


Abbildung 3.3.: PEP-abhängiges Phosphotransferase System am Beispiel Glucose: Die Glucose wird durch das membranständige Enzym II und das phospho-Enzym III zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert und in das Cytoplasma abgegeben.

3. Theoretische Grundlagen

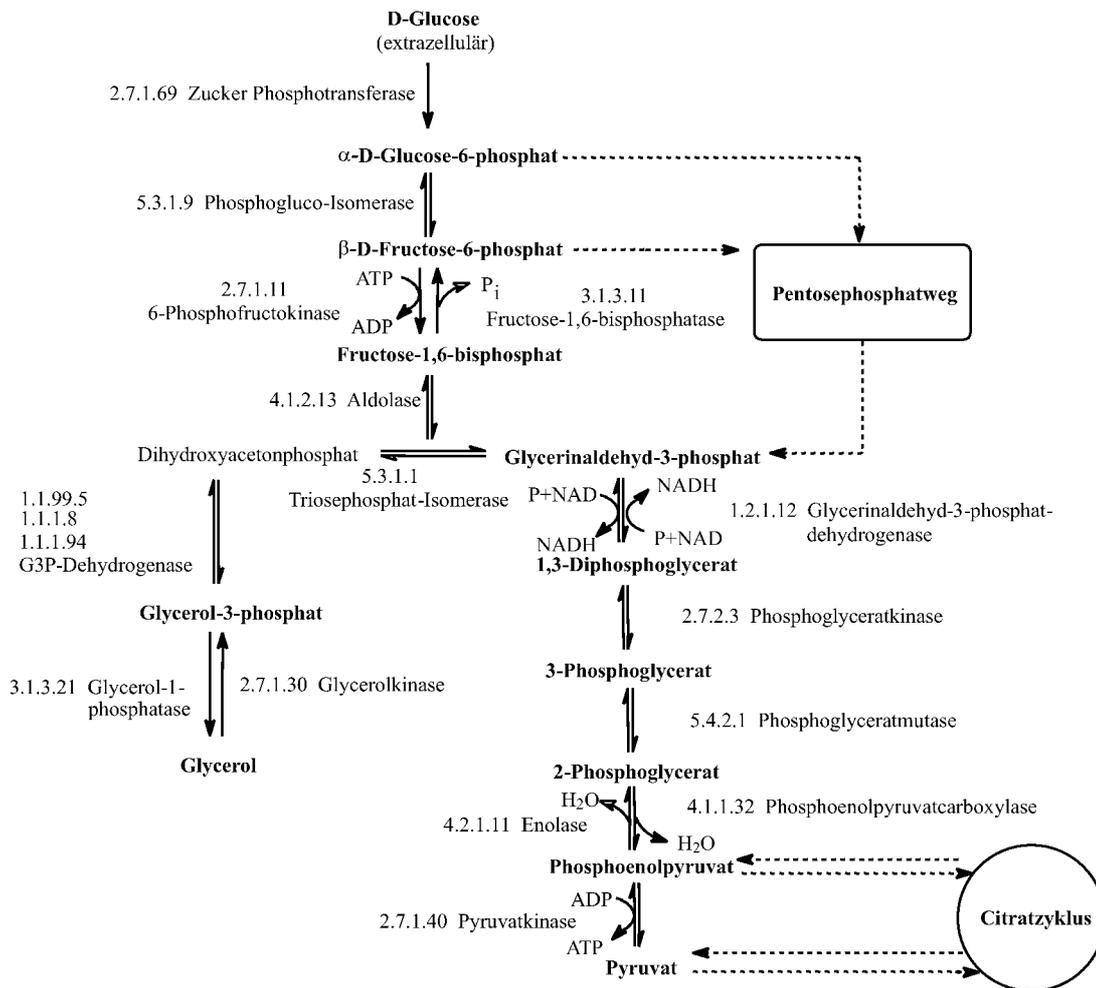


Abbildung 3.4.: Reaktionen der Glycolyse (Pfeile nach unten) und der Gluconeogenese (nach oben weisende Pfeile)

3.1.4. Gluconeogenese

Die Gluconeogenese ist die enzymgesteuerte Neubildung von Kohlenhydraten im Organismus durch Umkehr der Glycolyse, wobei die Gluconeogenese jedoch in einigen Reaktionsschritten von der Glycolyse abweicht. Die Gluconeogenese verbraucht Energie in Form von ATP. Sie bewirkt in bestimmten Mikroorganismen, die in Abwesenheit von D-Glucose wachsen, die Umsetzung von Pyruvat, D- oder L-Lactat, Glycerol oder von bestimmten Aminosäuren. Aus energetischen Gründen und zwecks gezielter Regulation besitzt die Gluconeogenese bei einigen Reaktionsschritten eigene Mechanismen und Enzymsysteme¹. So verläuft z.B. die

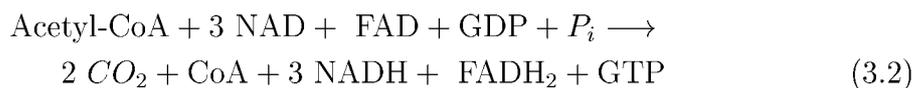
¹vor allem um die irreversiblen Reaktionsschritte der Glycolyse (Glucose \rightarrow G6P, F6P \rightarrow FBP, PEP \rightarrow Pyruvat) zu umgehen

Reaktion vom Phosphoenolpyruvat zum Pyruvat indirekt über den Umweg des Oxaloacetats. Fernerhin katalysiert ein für die Gluconeogenese spezifisches Enzym, die Fructosebisphosphat-Phosphatase, die Reaktion vom Fructosebisphosphat zum Fructose-6-phosphat.

3.1.5. Citratcyclus

Der Citratcyclus (Citronensäure-Cyclus, TCA-Cyclus, Krebs-Cyclus, siehe Abbildung 3.5) stellt das amphibolische Stoffwechsel-Schema des oxidativen Endabbaus der Kohlenstoffquelle (z.B. Glucose, Glycerol) zu Kohlendioxid dar. Ein jeweils zwei Kohlenstoff-Atome umfassendes Bruchstück aus dem Fett-, Eiweiß- und Kohlenhydrat-Abbau, der Acetyl-Rest, tritt nach Aktivierung als Acetyl-CoA in den Citratcyclus ein. Die Energiegewinne äußern sich in der Bildung von Reduktionsäquivalenten, d.h. der reduzierten Formen von Flavin-Adenin-Dinucleotid (FADH_2) und NADH sowie in der Phosphorylierung von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) zu Guanosin-5'-triphosphat (GTP) durch anorganisches Phosphat (P_i) [59]. Der Citratcyclus dient nicht nur als terminaler Oxidationsprozeß der Nährstoffe, sondern ist außerdem Lieferant für Biosynthese-Vorstufen. Die vier, bzw. fünf Kohlenstoff-Atome enthaltenen Oxosäuren bilden durch Transaminierung die Aminosäuren L-Asparaginsäure bzw. L-Glutaminsäure; aus Oxaloacetat können über die Gluconeogenese Zucker, z.B. Ribose, gebildet werden.

Die Gesamtreaktion verläuft als Bilanz nach folgender Gleichung [60] :



3.1.6. Pentosephosphatweg

Im zellulären Stoffwechsel erfüllt der Pentosephosphatweg (PPP, siehe Abbildung 3.6) zwei Hauptaufgaben. Zum einen stellt er Ribose-5-phosphat bereit, welches zur Synthese von Nucleinsäuren und Nucleotiden benötigt wird und zum anderen dient er der Synthese von Reduktionsäquivalenten in der Form von NADPH, welches neben NADH Elektronen für Redoxreaktionen bereitstellt.

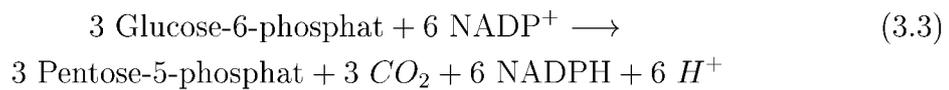
Der oxidative Pentosephosphatweg (PPP) läßt sich in drei Hauptreaktionsgruppen einteilen:

1. Oxidation von Glucose-6-phosphat zu Ribulose-5-phosphat unter der Bildung von NADPH und CO_2 .
2. Enzymatische Reaktionen, die die Umsetzung von Ribulose-5-phosphat in Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat katalysieren.
3. Transaldolase- und Transketolase- Reaktionen die die Synthese von Hexose-6-phosphaten aus Pentose-5-phosphaten katalysieren.

3. Theoretische Grundlagen

Im oxidativen Zweig des Pentosephosphat-Weges wird Glucose-6-phosphat zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt. Die Metabolite und katalysierenden Enzyme sind in Abbildung 3.6 aufgeführt.

Das Verhältnis von gebildetem NADPH zu Pentose-5-phosphat beträgt 2:1.



Ist in der Zelle ein höherer Bedarf an NADPH vorhanden, so muß der gebildete Überschuß an Pentose-5-phosphaten abgebaut werden. Dazu dienen die Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen. Transketolase katalysiert den Transfer einer Glycolaldehyd-Gruppe von Xylulose-5-phosphat auf Ribose-5-phosphat oder Erythrose-4-phosphat. Es entsteht Sedoheptulose-7-phosphat

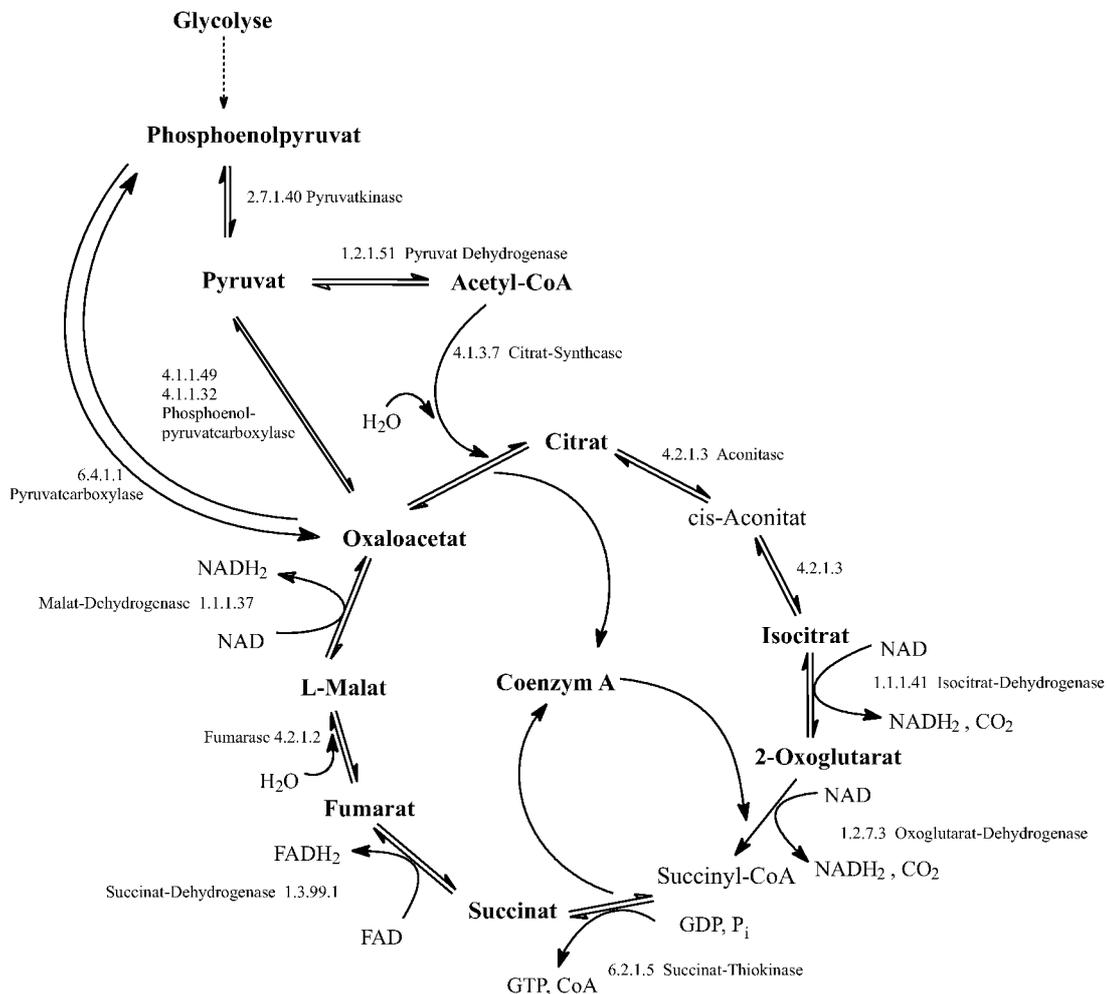
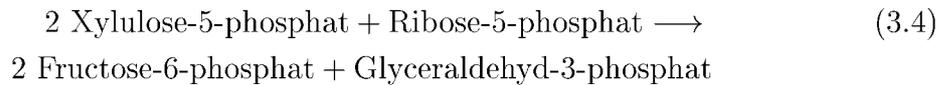


Abbildung 3.5.: Oxidativer Endabbau der Kohlenstoffquelle im Citratcyclus

und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Transaldolase katalysiert den Transfer einer Dihydroxyaceton-Gruppe von Sedoheptulose-7-phosphat auf Glycerinaldehyd-3-phosphat unter der Bildung von Erythrose-4-phosphat und Fructose-6-phosphat. Beide Enzyme zusammen katalysieren die Umwandlung von Pentose-5-phosphaten in Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat.



Somit können alle überschüssigen Pentose-5-phosphate als Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat in den EMP-Weg eingeschleust werden. Da alle Reaktionen reversibel sind, ist die Umkehrung (die Bildung von Pentose-5-phosphaten aus Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat) der Reaktionen möglich. Sie wird genutzt, wenn in der Zelle Pentose-5-phosphate (z.B. Erythrose-4-phosphat zur Bildung aromatischer Aminosäuren) nicht aber NADPH gebraucht wird.

Nach Ergebnissen aus ^{14}C -Glucose Markierungsexperimenten verstoffwechselt *E. coli* bis zu 28 % des Substrates über den Pentosephosphat-Weg [61]. Der Pentosephosphat-Weg ist neben der Glycolyse der wichtigste Stoffwechselweg zum Abbau von Glucose.

Abbildung 3.7 zeigt eine Einordnung des Zentralstoffwechsels (Glycolyse, Glu-

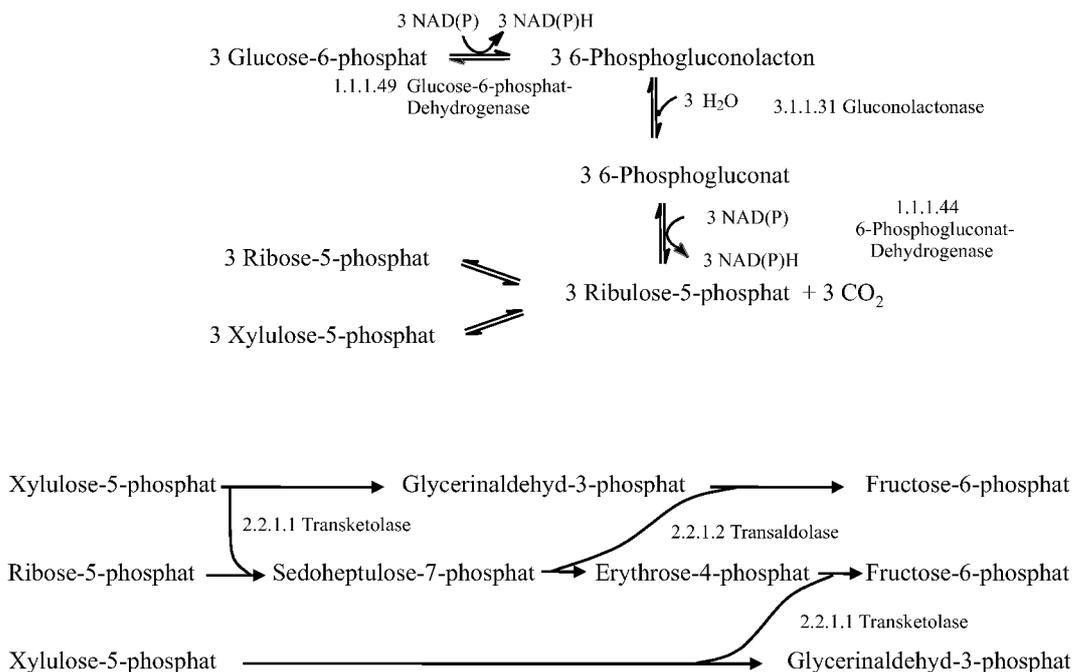


Abbildung 3.6.: Oxidativer Zweig des Pentosephosphat-Weges

coneogenese, Pentosephosphatweg, Citratcyclus) in den Gesamtstoffwechsel der Zelle.

3.1.7. Regulation

Sowohl die Glycolyse als auch die Gluconeogenese laufen bei *E. coli* im Cytoplasma ab, wobei jedoch eine Regulation notwendig ist. Andererseits würde, bei gleichzeitigem Ablauf von Glycolyse und Gluconeogenese, ein ständiger und sinnloser ATP-Verbrauch stattfinden. Eine Regulation, welche den einen Stoffwechselweg ausschaltet, während der andere aktiviert ist, erfolgt

1. durch allosterische Regulation,
2. durch das Ausmaß, in dem den einzelnen Stoffwechselwegen ihre jeweiligen Substrate zur Verfügung stehen,
3. durch eine geregelte Neusynthese von Enzymen zwecks Anpassung an eine veränderte Stoffwechselsituation.

Bei der allosterischen Regulation greifen niedermolekulare Produkte in die Regulation der biologischen Reaktionsketten ein. Dies geschieht, indem sie hemmend (als Inhibitoren) oder fördernd (als Aktivatoren) auf die Enzym-Aktivität wirken. Wenn ein Enzym-Molekül an einer Stelle eine kurzzeitige Kopplung mit einem Effektor eingegangen ist, wird die räumliche Konfiguration im aktiven Zentrum des Enzyms reversibel verändert, so daß das Substrat nicht mehr aufgenommen werden kann. Wichtige Schlüsselenzyme für eine kurzfristige, allosterische Regulation bei der Glycolyse sind Pyruvatkinase, 6-Phosphofructo-1-kinase, und Fructose-1,6-bisphosphatase. Ein bedeutender allosterischer Effektor ist neben ATP und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) das Fructose-2,6-bisphosphat (FBP) [62].

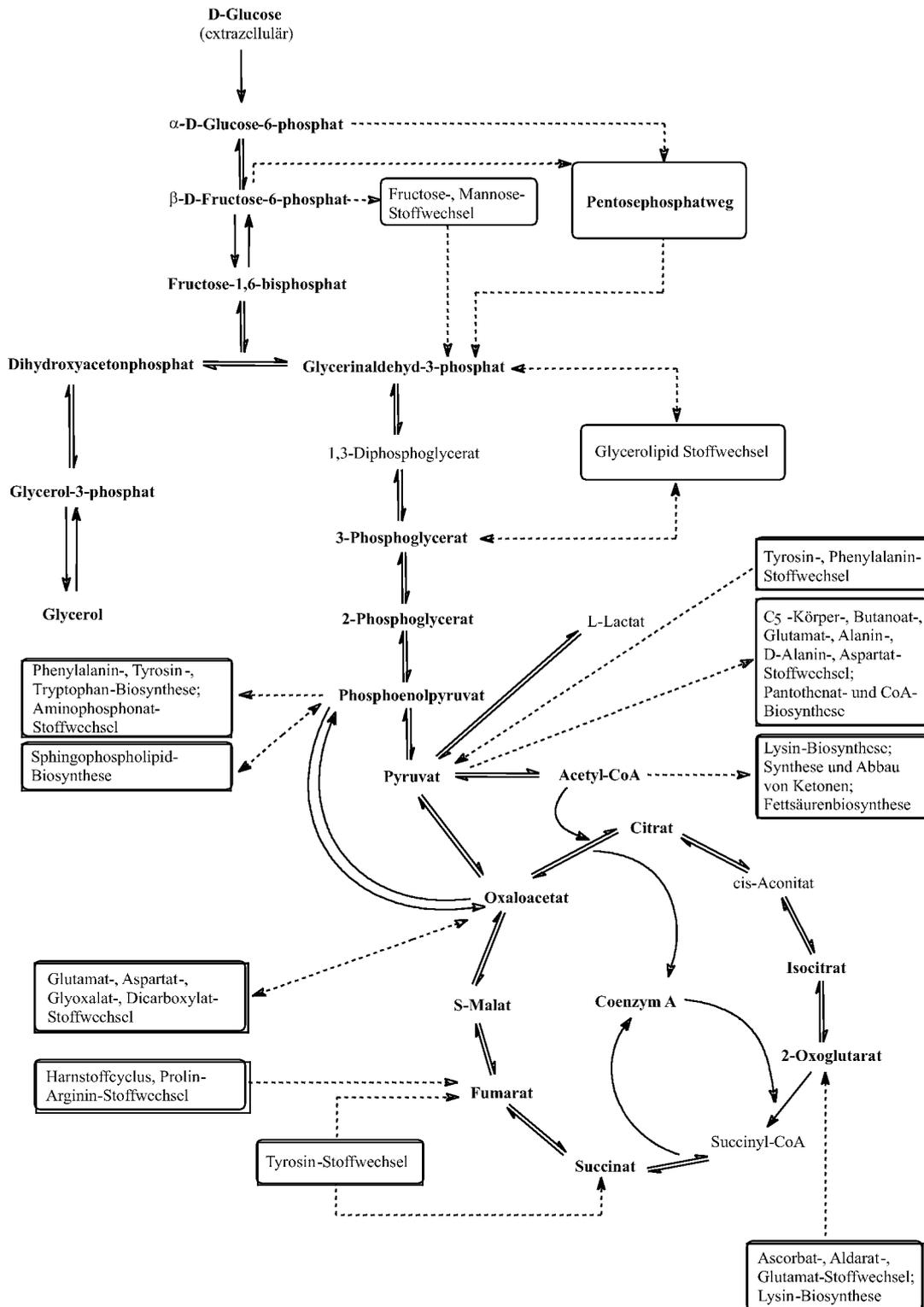


Abbildung 3.7.: Eine Einordnung des Zentralstoffwechsels in den Gesamtstoffwechsel der Zelle verdeutlicht das hohe Maß an Komplexität von Zu- und Abflüssen in diesem System.

3.2. Verfahrenstechnische Grundlagen

3.2.1. Bakterienwachstum in statischer Kultur

Das Bakterienwachstum in statischer Kultur, in einer sogenannten Batchfermentation (stirred tank reactor, STR), stellt eine der einfachsten Methoden der biologischen Prozeßführung dar [63]. Bei einer logarithmischen Auftragung der Zellzahl, bzw. der Biomasse, beobachtet man unter optimalen Bedingungen und nur einer Kohlenstoffquelle eine typische Wachstumskurve (siehe Abbildung 3.8).

Während der exponentiellen Phase folgt das Zellwachstum dem allgemeinen Wachstumsgesetz (siehe Gleichung 3.5), wobei sich die maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} aus der Steigung bei halblogarithmischer Auftragung ergibt.

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max}x \quad (3.5)$$

x \equiv Zelldichte (z.B. als Biotrockenmasse) $[g \cdot L^{-1}]$
 μ_{max} \equiv spezifische Wachstumsgeschwindigkeit $[h^{-1}]$

Zur Beschreibung der spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ in Abhängigkeit von der Substratkonzentration S und einer Sättigungskonstanten K_S dient ein einfacher empirischer Ansatz nach Monod (siehe Gleichung 3.6 und Abbildung 3.9). In realen Systemen, wo zusätzlich noch Substrat- und Produkthemmung in die Gleichung für die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit mit einfließen, sind die Verhältnisse allerdings wesentlich komplizierter.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (3.6)$$

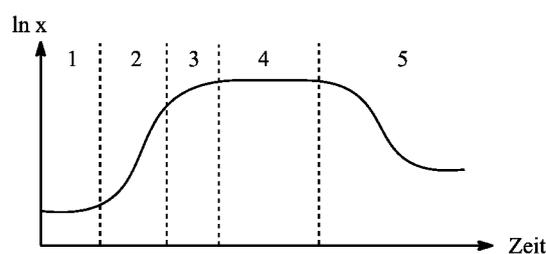


Abbildung 3.8.: Wachstumskurve: Adaptions- oder lag-Phase (1); exponentielles Wachstum (2); Übergangsphase (3); stationäre Phase (4) und Absterbe Phase (5)

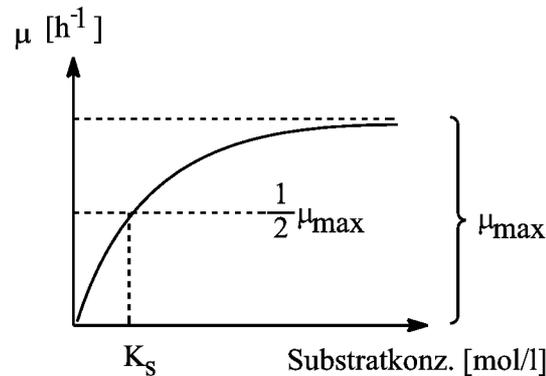


Abbildung 3.9.: Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ von der Substratkonzentration S . Im Bereich geringer Substratkonzentration ist μ stark von S abhängig (extern reguliert), es gilt Gleichung 3.6

3.2.2. Bakterienwachstum in kontinuierlicher Kultur

Bei der kontinuierlichen Kultivierung von Zellen wird sterile Nährlösung dem Bioreaktor kontinuierlich zugegeben und gleichzeitig die gleiche Menge umgesetzte Nährlösung mit Mikroorganismen dem System entnommen (continuous stirred tank reactor, CSTR). Es bestehen mehrere Möglichkeiten der Kultivierung, der Chemostat, der Turbidostat und der Nutristat. In allen wird im homogen gemischten Bioreaktor ein Fließgleichgewicht (steady state) eingestellt. Beim Chemostat wird das Zellwachstum durch die Verfügbarkeit eines Substrats geregelt, d.h. durch die Durchflußrate. Im Turbidostat z.B. wird das Zellwachstum durch Messung der Biomassen-Konzentration und Regelung des Nährlösungs-Zu- und -Abflusses konstant gehalten [63, 6]. Die Verhältnisse in diesem offenen System (mit konstantem Volumen) lassen sich durch das Aufstellen einer Massenbilanz beschreiben (siehe Gleichung 3.7).

$$\text{Akkumulation} = \text{Konvektion} + \text{Reaktion} \quad (3.7)$$

Die molare Änderung einer Komponente i mit der Zeit $V \cdot \frac{dC_i}{dt}$ ist gleich der Summe aus der Menge i , die mit dem Volumenstrom F_V in den Reaktor ein-, bzw. ausgespült wird (Konvektion) und dem Teil der im Reaktor verbraucht oder erzeugt wird (Reaktion):

$$\underbrace{V \cdot \frac{dC_i}{dt}}_{\text{Akkumulation}} = \underbrace{F_V \cdot (C_{i, \text{ein}} - C_i)}_{\text{Konvektion}} + \underbrace{V \cdot \left(\frac{dC_i}{dt} \right)}_{\substack{\text{Metabolismus} \\ \text{Reaktion}}} \quad (3.8)$$

Im Falle einer kontinuierlichen Kultur mit dem limitierenden Substrat C_S und dem Produkt C_P erhält man mit folgenden Randbedingungen,

3. Theoretische Grundlagen

$$C_{X, \text{ein}} = 0 \quad (3.9)$$

$$C_{S, \text{ein}} = C_{S, 0} \quad (3.10)$$

$$C_{P, \text{ein}} = 0 \quad (3.11)$$

$$\frac{V}{F_V} = \tau \quad (3.12)$$

einen Satz von drei Differentialgleichungen:

$$\frac{dC_X}{dt} = \frac{1}{\tau} \cdot (-C_X) + \mu \cdot C_X \quad (3.13)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{1}{\tau} \cdot (C_{S, 0} - C_S) - q_S \cdot C_X \quad (3.14)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{1}{\tau} \cdot (-C_P) - q_P \cdot C_X \quad (3.15)$$

Hierbei ist μ die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Biomasse, q_S ist die spezifische Umsetzungsgeschwindigkeit für das Substrat und q_P die biomasse-spezifische Umsetzungsgeschwindigkeit für das Produkt. Da im stationären Zustand keine Änderung an Biomasse, Substrat oder Produkt statt findet, folgt daraus,

$$0 = \frac{1}{\tau} \cdot (-C_X^{Ggw.}) + \mu \cdot C_X^{Ggw.} \quad (3.16)$$

$$0 = \frac{1}{\tau} \cdot (C_{S, 0} - C_S^{Ggw.}) - q_S \cdot C_X^{Ggw.} \quad (3.17)$$

$$0 = \frac{1}{\tau} \cdot (-C_P^{Ggw.}) - q_P \cdot C_X^{Ggw.} \quad (3.18)$$

Die drei Größen $C_X^{Ggw.}$, $C_S^{Ggw.}$ und $C_P^{Ggw.}$ sind somit für den Gleichgewichtszustand definiert. Soll eine höhere Biomasse bei gleichbleibender Gleichgewichtskonzentration von Substrat und Produkt erreicht werden, so kann die Verweilzeiten der Biomasse $\tau_{Biomasse}$ und des Medium τ_{Medium} entkoppelt werden. Man erhält folgende Bedingungen für den stationären Zustand:

$$0 = \frac{1}{\tau_{Biomasse}} \cdot (-C_X^{Ggw.}) + \mu \cdot C_X^{Ggw.} \quad (3.19)$$

$$0 = \frac{1}{\tau_{Medium}} \cdot (C_{S, 0} - C_S^{Ggw.}) - q_S \cdot C_X^{Ggw.} \quad (3.20)$$

$$0 = \frac{1}{\tau_{Medium}} \cdot (-C_P^{Ggw.}) - q_P \cdot C_X^{Ggw.} \quad (3.21)$$

Wenn man die Gleichungen nach der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ und der spezifischen Umsetzungsgeschwindigkeit für das Substrat q_S und das

Produkt q_P auflöst, erkennt man, daß die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ im stationären Zustand allein von der Biomassenverweilzeit $\tau_{Biomasse}$ abhängt:

$$\mu = \frac{1}{\tau_{Biomasse}} = D \quad (3.22)$$

$$q_S = \frac{1}{\tau_{Medium}} \cdot \frac{C_{S,0} - C_S^{Ggw.}}{C_X^{Ggw.}} \quad (3.23)$$

$$q_P = \frac{1}{\tau_{Medium}} \cdot \frac{C_P^{Ggw.}}{C_X^{Ggw.}} \quad (3.24)$$

3. *Theoretische Grundlagen*

4. Verfahrenstechnische Methoden

“To the ignorant, the great results alone are admirable, to the knowing, rather the infinite device and sleight of hand that made them possible.”

Robert Louis Stevenson (1850-1894)

4.1. Biologisches Testsystem

4.1.1. Stammbeschreibung

In der Regel erfolgten alle Versuche mit dem Prokaryonten *E. coli* K12 DSM 498 (DSM Stammhaltung, D). Untersuchungen zur Glucoseaufnahme wurden mit einem PTS-defizienten *E. coli* 3pMK7 (Genotyp: ptsI::glf, pAC4C tac - glk) durchgeführt. Basierend auf *E. coli* LJ110 wurde hier das PTS I System entfernt; zusätzlich befinden sich auf einem Plasmid neben einer Chloramphenicol-Resistenz ein Glucosefacilitator (glf) und eine Glucokinase (glk) aus *Zymomonas mobilis* [64, 65].

4.1.2. Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgt in Glycerolkryokulturen [66]. Dazu werden die Mikroorganismen in 100 ml Komplexmedium aus Hefeextrakt, Trypton und Glucose bis zu einer optischen Dichte von $OD_{650} = 12$ (entspricht ca. $4,0 \text{ g l}^{-1}$ Bio-trockenmasse) inkubiert. Die Inkubation erfolgt in 1000 ml Schüttelkolben mit vier Schikanen bei 37°C und 140 U min^{-1} . Nach mikroskopischer Kontrolle auf Kontamination wird die Kultur mit 30 ml sterilem 85% Glycerol versetzt und in 2 ml Portionen bei -80°C eingefroren.

4.2. Apparativer Aufbau und Durchführung der Versuche

4.2.1. Bioreaktor

Der Fermentationsprozeß für alle Pulsversuche wird in einem Rührkessel-Bioreaktor des Typs ATGU 503 der Firma Infors AG durchgeführt. Der Bioreaktor besteht aus einem Edelstahlzylinder mit 20 l Arbeitsvolumen sowie ei-

nem Edelstahldeckel, in welchem Vorrichtungen zur Aufnahme verschiedener Meßsonden und Anschlüsse angebracht sind. Das Rührorgan bildet ein Scheibenrührer, dessen Rührwelle von oben angetrieben wird. An der Unterseite befindet sich ein Auslaß zur Entnahme von Proben. Über eine angeschlossene Steuereinheit können die Sollwerte verschiedener Parameter, u.a. Rührergeschwindigkeit, Druck, Zuluft und Temperatur eingestellt und geregelt werden. Fernerhin können die Ist-Werte diverser Meßgrößen durch Erfassung mit einem Siemens-SMP-Interface on-line analysiert werden. Es können die Werte für pH, Temperatur, Rührergeschwindigkeit, Zuluft, pO_2 , CO_2 , Gewicht und Druck in Zeitabständen bis ca. 1 s erfaßt werden. Zur Datenaufnahme dient das Programm Labview (National Instruments Corporation, USA). Zur Messung des pH-Wertes wird eine Gel-pH-Einstabmeßkette verwendet. Der angeschlossene Meßverstärker steuert zur pH-Regelung eine Laugen-Pumpe (NH_3 , 25%). Die Temperaturmessung und Regelung erfolgt über ein Pt-100 Widerstandsthermometer, welches sich im Boden des Bioreaktors befindet. Der CO_2 -Volumenstrom in der Abluft wird über ein Meßgerät (Binos, Leybold-Heraeus, D) verfolgt. Über einen piezoelektronischen Druckaufnehmer wird der Druck im Bioreaktor erfaßt und auf 0,23 bar Überdruck geregelt.

Um definierte Volumenströme an Nährmedium zu erhalten, wird eine Dosierstrecke verwendet. Diese erfaßt den aktuellen Volumenstrom über den Gewichtsverlust eines Medium-Vorratsgefäß, welches sich auf einer Waage befindet. Durch die Regelung der Dosierpumpe lassen sich so die vorgegebenen Volumenströme einhalten. Der Ablauf von Kulturmedium aus dem Bioreaktor wird durch eine zweite Pumpe geregelt, welche an die Gewichtsregelung des Bioreaktors angeschlossen ist.

4.2.2. Automatisierte Probenahme

Um dynamische Stoffwechselforgänge in Zellen analysieren zu können, werden Mikroorganismen in einem Bioreaktor substratlimitiert fermentiert. Durch schnelle Zugabe des limitierenden Substrats in einem Pulsexperiment wird der Metabolismus aus dem Gleichgewicht gebracht. Um dynamische Vorgänge in der Zelle beobachten zu können, müssen dem Bioreaktor sehr schnell Proben entnommen und der Stoffwechsel gestoppt werden. Zu diesem Zweck wurde am Institut für Biotechnologie 2 eine rechnergestützte Abfüllanlage konstruiert, welche eine kontinuierliche Probeentnahme in Abständen unter 230 ms gestattet. Die Automatisierung gestattet sowohl die Entnahme einer großen Anzahl an Proben pro Zeiteinheit, als auch ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit durch exaktes Einhalten vorgegebener Zeiten [67, 22]. Das von H.-B. Cuyper entwickelte und von W. Boos modifizierte Programm QND [68] ermöglicht eine frei konfigurierbare Ansteuerung von Vorschubeinheit, Probenahme- und Pulsventilen.

4.2.2.1. Vorschubeinheit

Die Aufgabe der Vorschubeinheit ist die Aufnahme und der Transport von 160 Probebehältern (50 ml Zentrifugenröhrchen, Corning), welche in 10 Magazinen zu je 16 Stück angeordnet sind. Diese werden mit Hilfe von einem Magazinlader einzeln auf einen Zahnriemen geschoben, unter dem Probenahmeventil vorbeigefahren, und mit einem pneumatischen Magazinauswerfer zurück auf die Ladefläche befördert (siehe hierzu auch Abbildung 4.1).

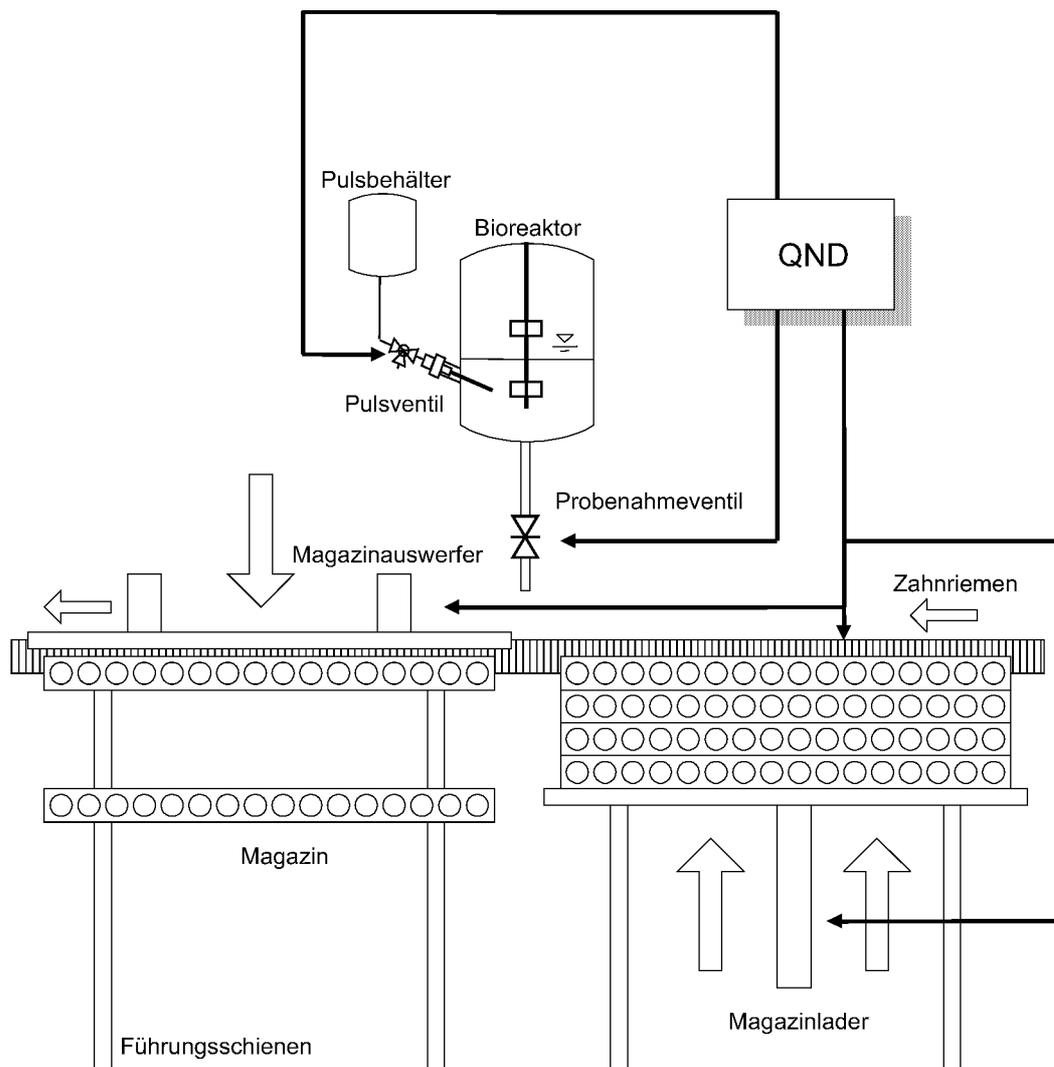


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung der schnellen Probenahme

Zu Beginn des Probenahmeprozesses befinden sich auf der rechten Seite der Vorschubeinheit 10 Magazine mit je 16 Zentrifugenröhrchen mit 15 ml -50°C kalter wässriger 60% Methanol-HEPES (70 mM) Lösung.

4. Verfahrenstechnische Methoden

1. Der Bediener startet den Probenahme-prozeß; die Bezugszeit des Programms wird festgelegt
2. Die Magazinladeeinrichtung schiebt das erste Magazin auf den Zahnriemen.
3. Das Programm wartet auf den Zeitpunkt zur Befüllung des ersten Probebehälters.
4. Das Probenahmeventil öffnet sich und der Zahnriemen transportiert das Probengefäß unter das Probenahmeventil; die Zeit wird protokolliert.
5. Die Anlage verweilt eine entsprechende Zeit (66 ms) unter dem Probenahmeventil.
6. Das Magazin wird zur nächsten Probenahme-position, d.h. zum nächsten Probengefäß, weitertransportiert.
7. Schritt 5 bis 6 werden insgesamt 16 mal wiederholt.
8. Das Magazin wird vom Zahnriemen bis zur Auswurfposition vorgefahren.
9. Der Magazinauswerfer schiebt das befüllte Magazin aus, gleichzeitig wird ein neues Magazin beladen, dabei schließt sich das Probenahmeventil.
10. Schritt 4 bis 9 können bis zu 10 mal wiederholt werden.

4.2.3. Pulssteuerung

Das Pulsexperiment wird durch eine schnelle Zugabe des limitierenden Substrats realisiert. Die Auslösung des Pulses, d.h. die Öffnung des Pulsventils, erfolgt zwischen dem ersten und dem zweiten Magazin und wird von dem Programm QND gesteuert. Damit ist gewährleistet, daß das erste Magazin nur Proben aus dem Fließgleichgewicht (steady state) enthält, welche als Referenzwerte für den steady state in der späteren Analyse dienen.

4.2.4. Versuchsdurchführung

4.2.4.1. Der Fermentationsprozeß

Zur Beimpfung einer Fermentationsanlage muß eine Kultur in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Diese Kultur sollte frei von fremden Mikroorganismen sein und sich in einem stoffwechselaktiven Zustand befinden. Im allgemeinen geht man von einer Stammkultur mit sehr geringem Volumen aus. Um eine ausreichende Menge Inokulum, d.h. mindestens 10 % des Fermentationsvolumens, als Mikroorganismensuspension zum Animpfen des Bioreaktors zu erhalten, sind zwei Vorkulturen notwendig.

4.2.4.1.1. Vorkulturen Die Komponenten des Vorkulturmediums (Zusammensetzung siehe Seite 161) werden in einen Schüttelkolben mit Schikanten dispensiert. Sowohl Schüttelkolben als auch Medienbestandteile werden zuvor bei 121°C und 2 bar für 30 min sterilisiert. Eine in Glycerol tiefgefrorene Bakterien-suspension (siehe Abschnitt 4.1.2) wird aufgetaut und steril in einen Schüttelkolben mit 100 ml Vorkulturmedium überführt. Diese erste Vorkultur wird bei 37°C für 8 Stunden auf einem Rotationsschüttler bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 140 U min⁻¹ inkubiert. Für die zweite Vorkultur werden 700 ml Vorkulturmedium vorgelegt und mit 10 ml Zellsuspension der ersten Vorkultur versetzt. Diese Mischung wird auf 7 Schüttelkolben aliquotiert, und erneut bei 37°C für 8 Stunden auf einem Rotationsschüttler bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 140 U min⁻¹

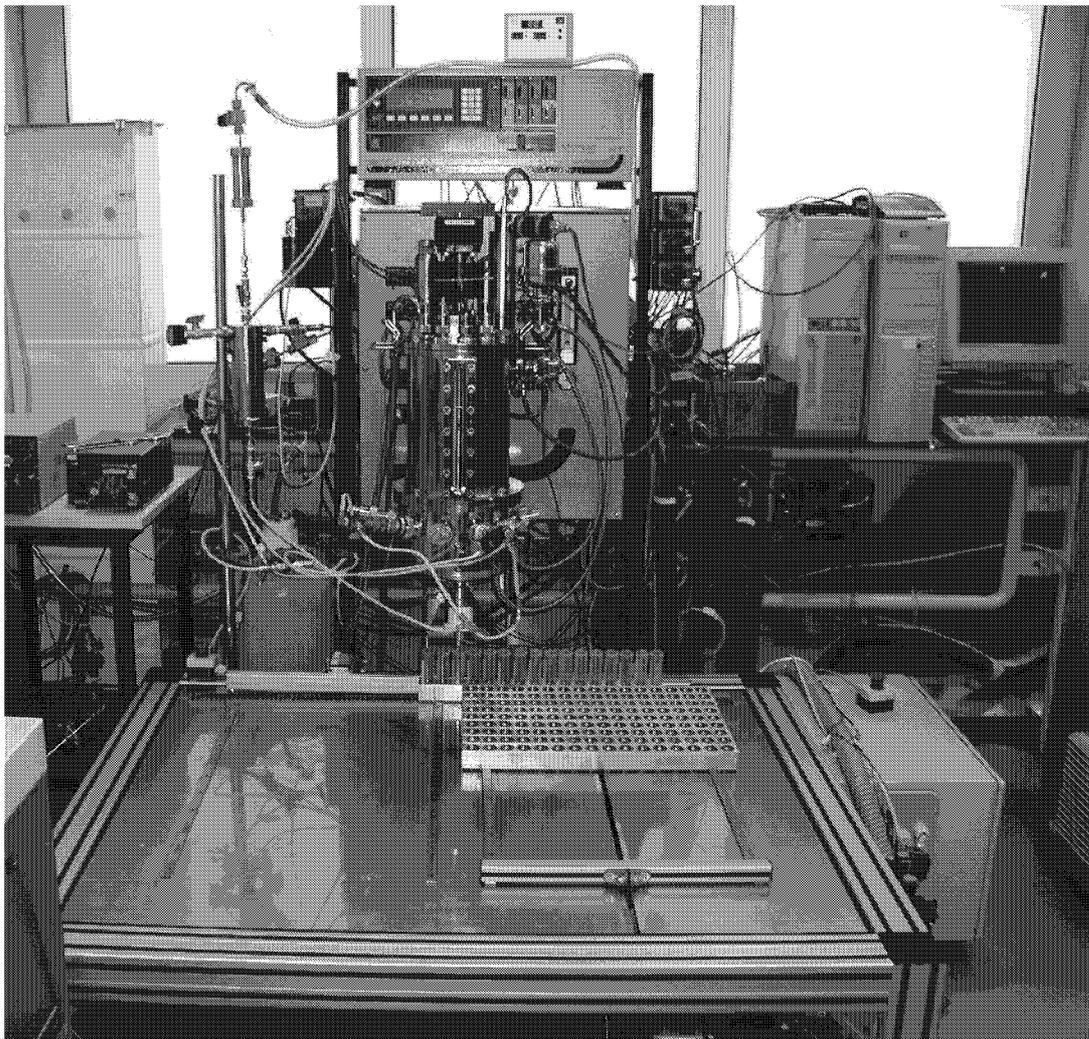


Abbildung 4.2.: Bioreaktor mit Pulsaufgabesystem und schneller Probenahme; im Vordergrund die Vorschubeinheit mit Magazinen

inkubiert.

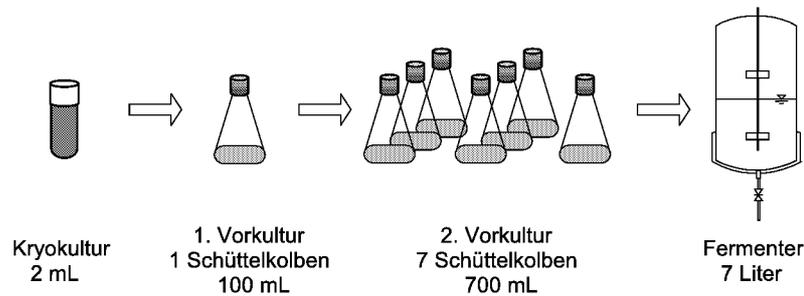


Abbildung 4.3.: Darstellung der sukzessiven Kultivierungsschritte

4.2.4.1.2. Durchführung der Fermentationen Vor Beginn eines jeden Versuchs wird die Peripherie des Bioreaktors sterilisiert, d.h. alle Dosierstrecken, das Probenahmeventil, sämtliche Vorratsbehälter für Lauge, Vorkultur und Fermentationsmedium, etc. Die pH-Elektrode wird mit zwei Pufferlösungen (pH=7 und pH=4) kalibriert und, wie die Sauerstoffelektrode, in die entsprechenden Stutzen am Bioreaktor eingebaut. Anschließend werden 7,0 l voll entsalztes Wasser im Bioreaktor vorgelegt, die Anstechvorrichtungen mit Septen verschlossen und der Bioreaktor bei 121°C für 30 Minuten sterilisiert. Im folgenden wird das Wasser abgelassen und über einen Sterilfilter das vorher sterilisierte Medium (siehe Seite 161) steril zuzufiltriert. Danach wird diese Zulaufstrecke für Medium mit 1,3 l Aqua bidest nachgespült. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 25% Ammoniaklösung auf pH=7 eingestellt. Vor dem Animpfen des Bioreaktors wird der Nullwert der Elektrode für den Sauerstoffpartialdruck bei 1 VVM kalibriert. Dies entspricht bei einem Fermentationsvolumen von 6,3 l einer Stickstoffzufuhr von $6,3 \text{ l min}^{-1}$ und einer Rührergeschwindigkeit von 900 U min^{-1} . Die Einstellung für 100% Sauerstoffsättigung erfolgt ebenfalls drucklos unter Fermentationsbedingungen bei 1 VVM mit Luft. Der Druck im Bioreaktor wird auf 0,23 bar Überdruck geregelt. Nach Abdrehen der Zuluft und Erreichen einer Temperatur von 37°C werden über eine Animpfflasche 700 ml Inokulum aus der zweiten Vorkultur steril in den Bioreaktor überführt. Die Zuluft wird erst aufgedreht, wenn die Sauerstoffsättigung von 100% auf ca. 30% abgesunken ist. Dadurch wird ein Ausstrippen von CO_2 zu Beginn der Fermentation, und somit auch eine längere lag-Phase, verhindert. Während der Fermentation werden in regelmäßigen Abständen ca. 20 ml Probe entnommen, um den pH-Wert, die optische Dichte, die Substrat-Konzentration und die Biotrockenmasse zu bestimmen. Läuft die Fermentation im Batch-Betrieb, so wird nach vollständigem Verbrauch des Substrats abgebrochen. Im Falle einer kontinuierlichen Fermentation wird bei einer optischen Dichte von ca. $\text{OD}_{650}=15$ die Nährstoffzufuhr und der Medienablauf angeschaltet.

4.2.4.2. Der Probenahmeprozess

Die schnelle Probenahme erfolgt über ein magnetisches Schlauchquetschventil mit minimalem Totvolumen, welches am Boden des Bioreaktors angebracht ist (siehe Abbildung 4.5). Die kontinuierliche Probenahme wird gestartet, indem das Probenahmeventil geöffnet wird. Aufgrund des Überdrucks (0,23 bar) im Reaktor fließt die Zellsuspension mit einer Strömungsrate von $33,3 \text{ ml s}^{-1}$ in

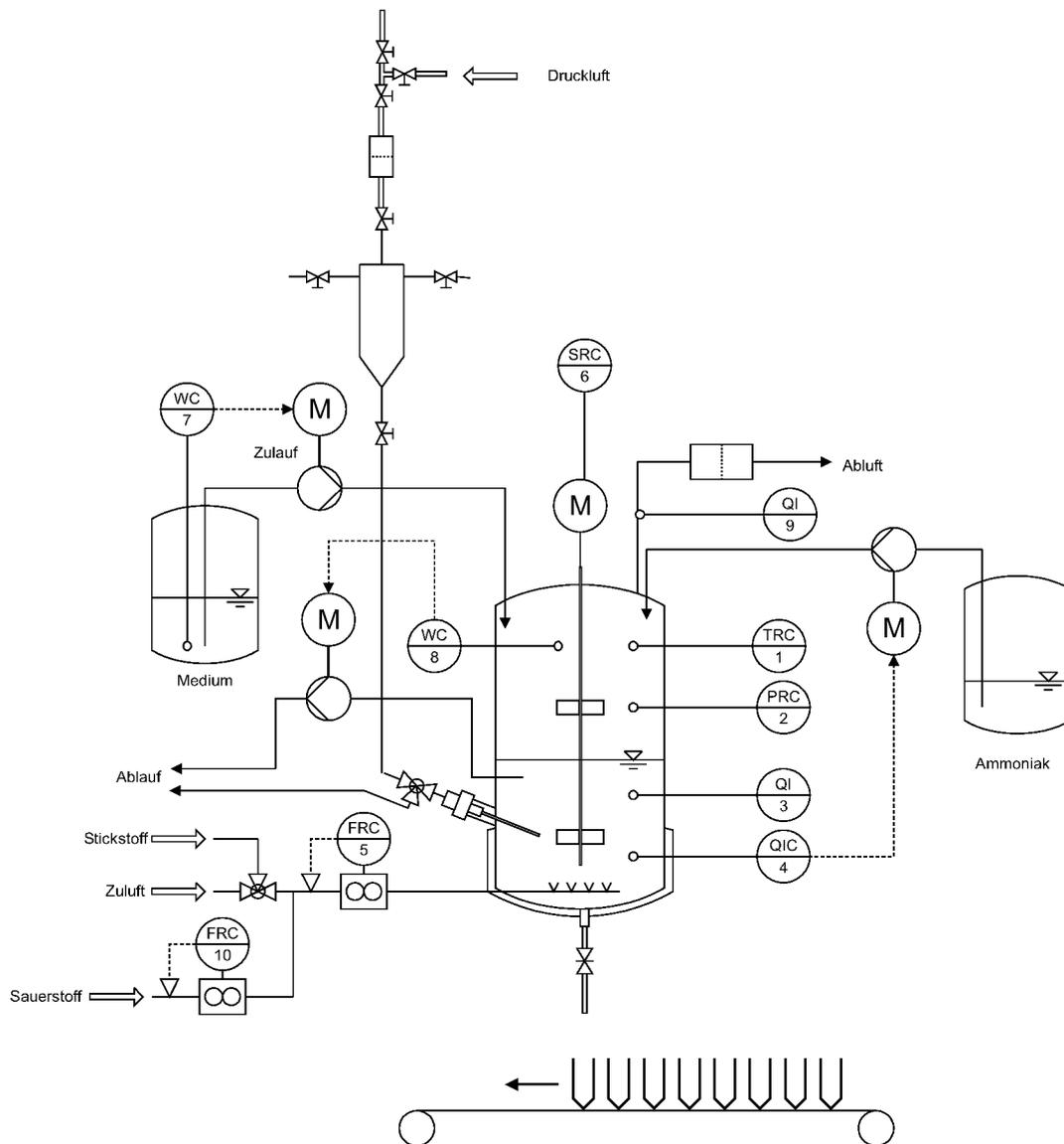


Abbildung 4.4.: Schematische Darstellung der Meß- und Regeleinrichtungen des Bioreaktors, siehe auch Tabelle 4.1

Probenahmegefäße, die in Aluminiummagazinen befestigt sind. Die mit je 16 Probenahmegefäßen befüllten Magazine werden taktweise unter der Öffnung des Probenahmeventils vorbeigeführt, so daß alle 220 ms ein neues Probengefäß unter der Ventilöffnung positioniert ist (4-5 Proben s^{-1}). Die Taktzeit von 220 ms ist aufgeteilt in eine Aufenthaltszeit der Probengefäße unter der Ventilöffnung von 150 ms (Haltezeit 66 ms, An- und Abfahrzeit 90 ms) und einer Positionierzeit (Verschieben der Magazine) von 64 ms. Der schrittweise Transport der Magazine erfolgt über einen zweiseitigen Zahnriemen, der von einem Schrittmotor bewegt wird. Sobald ein Probenmagazin mit Proben befüllt ist, wird dieses pneumatisch von dem Auswerfer auf einen Tisch mit Führungsschienen geschoben. Gleichzeitig erfolgt das Nachschieben von neuen Magazinen (siehe Abbildung 4.1). Das Probenahmeventil wird während der einzelnen Wechsel der Magazine und nach Beendigung der Probenahme geschlossen. Der Anteil des Probenstroms, der beim Positionieren der Zentrifugenröhrchen anfällt, wird beim Abfüllvorgang über eine Ablaufrinne gesammelt und verworfen (Details in [67, 22]).

Die Probenahmegefäße mit einem Gesamtvolumen von 50 ml sind mit 15 ml wäßriger 60% Methanol-HEPES (70 mM) Lösung gefüllt. Bevor die kontinuierliche Probenahme gestartet wird, werden die mit Methanol befüllten Probengefäße auf -80°C gekühlt. 5 min vor Beginn der Probenahme werden die Probenmagazine mit den -80°C kalten Probengefäße befüllt. Durch das Vermischen der 5 ml 37°C warmen Zellsuspension mit der $\leq -50^{\circ}\text{C}$ kalten Methanollösung (Durchmischungstemperatur $\leq -20^{\circ}\text{C}$, siehe hierzu auch Seite 137) wird der Stoffwechsel der Zellen augenblicklich gestoppt [30]. Die befüllten Probenmagazine werden nach der Probenahme manuell verschlossen und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -28°C gelagert. Da das in den Proben befindlichen Methanol die Bildung von Eiskristallen verhindert, bleibt die Integrität der Mikroorganismen erhalten.

Nr.	MSR-Stelle	Funktion
1	TRC	Temperaturregelung mit Registrierung
2	PRC	Druckregelung mit Registrierung
3	QIR	pO ₂ -Wert-Anzeige mit Registrierung
4	QIC	pH-Wert-Anzeige, Regelung
5	FRC	Durchflußregelung mit Registrierung
6	SRC	Drehzahlregelung mit Registrierung
7	WC	Massenregelung Zulauf
8	WC	Massenregelung Ablauf
9	QIR	CO ₂ -Wert-Anzeige mit Registrierung
10	FC	Durchflußregelung O ₂

Tabelle 4.1.: MSR-Stellen (Messen, Steuern, Regeln) des Bioreaktors in Abbildung 4.4

4.2.4.3. Der Zellaufschluß

Die nach der automatisierten Probenahme bei -28°C gelagerten Proben werden bei -20°C und 10.300 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und zur Bestimmung der extrazellulären Metabolite bzw. der Substratkonzentration bei -28°C gelagert. Die noch intakten Zellen werden mit $500\ \mu\text{l}$ wäßriger 60% Methanol-HEPES (70 mM) Lösung resuspendiert und anschließend mit 2 ml -18°C kalter 43,8% (w/v) Perchlorsäure aufgeschlossen. Um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten, werden die Proben sofort nach Zugabe der Perchlorsäure mit einem Vortex-Schüttelgerät (Bender & Hobein, Zürich, CH) homogenisiert und bei -80°C eingefroren. Nach einem Gefrier-Tau-Cyclus werden die Perchlorsäure-Extrakte für 30 Minuten bei 4°C und 42.000 g ultrazentrifugiert, um Zelltrümmer und Proteine abzutrennen (unvollständig denaturierte Phosphatasen könnten bei neutralem pH-Werten reaktiviert werden). Der klare Überstand wird mit Hilfe des Pipettierroboters mit gesättigter K_2CO_3 -Lösung langsam bei -2°C bis zu einem pH-Wert = 7,0 neutralisiert. Das dabei entweichende CO_2 sorgt für eine gute Durchmischung und vermeidet somit lokale Temperatur- und pH-Gradienten während der Neutralisation (siehe Gleichung 4.1). Durch eine erneute Zentrifugation bei 4°C für 5 Minuten und 42.000 g wird das ausfallende Kaliumperchlorat abgetrennt. Während der gesamten Probenvorbereitung wird eine Temperatur von 4°C nicht überschritten. Die klaren, neutralen Zellextrakte werden bis zu ihrer quantitativen Bestimmung bei -28°C gelagert.

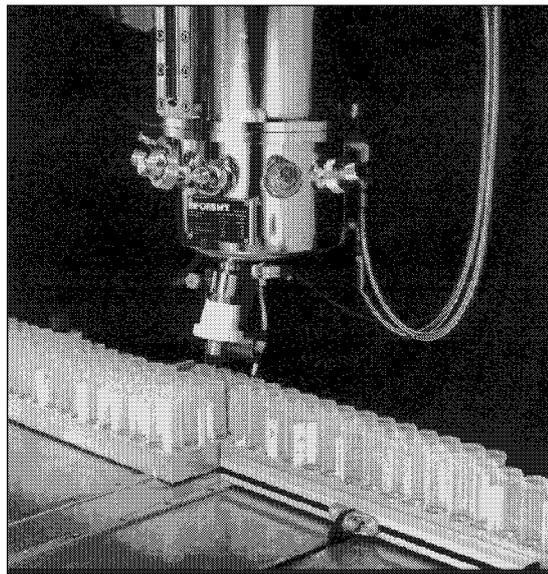
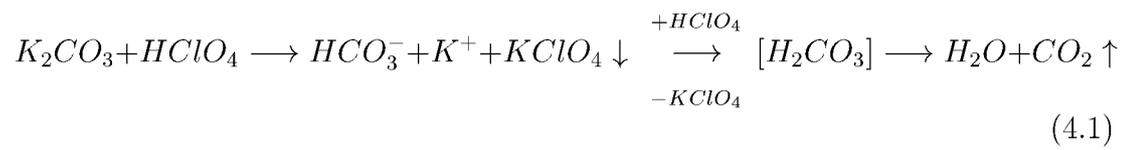


Abbildung 4.5.: Nahaufnahme der schnellen Probenahme, im Vordergrund die Vorschubeinheit mit Magazinen

4. Verfahrenstechnische Methoden



5. Analytische Methoden

“Ohne Mühe lässt sich nachweisen, dass alle großen Fortschritte der Chemie in mehr oder weniger direktem Zusammenhang stehen mit neuen oder verbesserten analytischen Methoden. [...] Die Entwicklung der analytischen Chemie geht daher der Entwicklung der gesamten chemischen Wissenschaft immer voraus, denn wie frisch gebahnte Wege zu neuen Zielen, so führen bessere analytische Mittel zu neuen chemischen Erfolgen.”

Carl Remigius Fresenius (1818-1897)

5.1. HPLC-MSⁿ Kopplung

Ein Massenspektrometer (MS) kann als leistungsfähiger Detektor für chromatographische Auftrennungen verwendet werden. Bei einer (HP)LC-MS Kopplung wird das Eluat der Flüssig-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC) online in das MS eingeführt. Die Vorteile einer massenspezifischen¹ Detektion liegen v.a. in der Auflösung koeluierender Komponenten (sofern sie nicht isobar, d.h. gleicher Masse sind) sowie in der hohen Spezifität bei Verwendung von MS/MS, bzw. MSⁿ Techniken. Die Kopplung mit der HPLC gestattet somit eine 2-dimensionale, d.h. sowohl eine chromatographische (LC) als auch eine massenspezifische (MS) Fraktionierung der zu analysierenden Probe. Nachteile der LC-MS Kopplung sind u.a. die Limitierung in der Wahl des Elutionsmittels, die geringere Präzision im Vergleich zu anderen Analysenverfahren und der nach oben eingeschränkte lineare Bereich.

In den letzten 25 Jahren ist eine große Anzahl unterschiedlicher Kopplungsmöglichkeiten entwickelt worden, welche sich hauptsächlich in der Art der Ionisation unterscheiden (eine Übersicht liefern [71, 24]).

¹sofern nicht anders erwähnt bezieht sich der Begriff “Masse” immer auf das Masse-Ladungsverhältnis m/z

5.1.1. Ionisierung

In der vorliegenden Arbeit kommt eine LC-MS Kopplung mit Elektrospray-Ionisation (ESI) zur Verwendung (LCQ, Thermoquest, USA). Das Eluat aus der HPLC wird hierbei im Spraykopf der Ionisationsquelle an der ESI-Nadel bei Atmosphärendruck zu einem feinen Nebel versprüht. Durch Anlegen einer Hochspannung von mehreren kV zwischen ESI-Nadel und beheizter Capillare werden die entstehenden Tropfen negativ² geladen (siehe hierzu Abbildung 5.1).

Ein trockener coaxialer Stickstoffstrom unterstützt dabei die Vernebelung und übernimmt zusätzlich die Funktion eines Isolators. Dies verhindert Glimmentladungen, welche ansonsten bei der hohen Spannungsdifferenz und dem geringen Abstand zwischen Anode und Kathode auftreten würden. Fernerhin sorgt der Stickstoffstrom für eine Stabilisierung der Temperatur während der Ionisation und fördert das kontinuierliche Verdampfen des Eluenten. Als Folge der Verdampfung nimmt der Tröpfchendurchmesser ab und die Flächenladungsdichte an der Oberfläche zu. Werden die attraktiven Oberflächenspannungskräfte von den repulsiven elektrostatischen Kräften übertroffen, so zerplatzen die Tröpfchen. Dieser Prozess setzt sich in den nun kleineren Tröpfchen fort bis die Analyten in ionischer Form frei vorliegen [72].

Der Vorteil der ESI-Methode liegt in der sehr energiearmen (“weichen”) Ionisation der Analyten. Da die Ionisierungsenergie weit unter der Bindungsenergie liegt, kommt es kaum zu Fragmentierungen. Es entstehen bei negativer Polarität bevorzugt die einfach negativ geladenen [M-H]-Ionen, das heißt der Peak des Molekülions erscheint im Massenspektrum bei $m/z = [\text{Molekülmasse} - 1]$.

Über den Mechanismus der Tröpfchenbildung gibt es unterschiedliche Theorien (v.a. [73] und [74]), ebenso ist der exakte Mechanismus der Ionenbildung noch Gegenstand aktueller Forschung (v.a. [75] und [76]).

5.1.2. Detektion

Durch die angelegte Spannung werden die Ionen in Richtung der beheizten Capillare und der Tube Lens beschleunigt. Ein Skimmer und zwei Octapole dienen der Fokussierung des Ionenstroms in die Ionenfalle, in welcher die Ionen gemäß dem Prinzip der Paul’schen Flasche³ für einige Millisekunden gespeichert werden.

Durch Anlegen eines variablen Feldes können die Ionen entsprechend ihres m/z -Wertes sequentiell aus der Falle ausgelesen werden (Details zu Speicherung und Selektion von Ionen in [78, 79, 80]). Die Detektion der Ionen erfolgt zunächst durch eine Dynode, die das Ionensignal in ein verstärktes Elektronensignal umwandelt; diese Elektronen werden dann mittels eines Sekundärelektronenvervielfachers verstärkt und detektiert.

²durch Umpolung wahlweise auch positiv

³Wolfgang Paul, Universität Bonn; Nobelpreis 1990 [77]

5.1.3. MS/MS Experimente

Die oben erwähnte Ionenfalle gestattet nicht nur die Speicherung von Teilchen, sondern auch eine gezielte Selektion von Ionen mit einem definierten m/z -Verhältnis, deren Fragmentierung und die anschließende Detektion der Fragmente. Vorteil einer solchen MS² (oder MS/MS) Messung ist die Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnis (S/N, signal to noise) und somit der Selektivität (siehe Abbildung 5.2).

Zunächst wird die Ionenfalle bis zu einem maximalen Füllgrad von etwa 10^7 Teilchen gefüllt. In der Ionenfalle dient Helium als Dämpfungsgas. Die Ionen werden durch elastische Stöße abgebremst und die Coulombwolke abgekühlt. Durch Anlegung eines entsprechenden hochfrequenten elektrischen Feldes sammeln sich

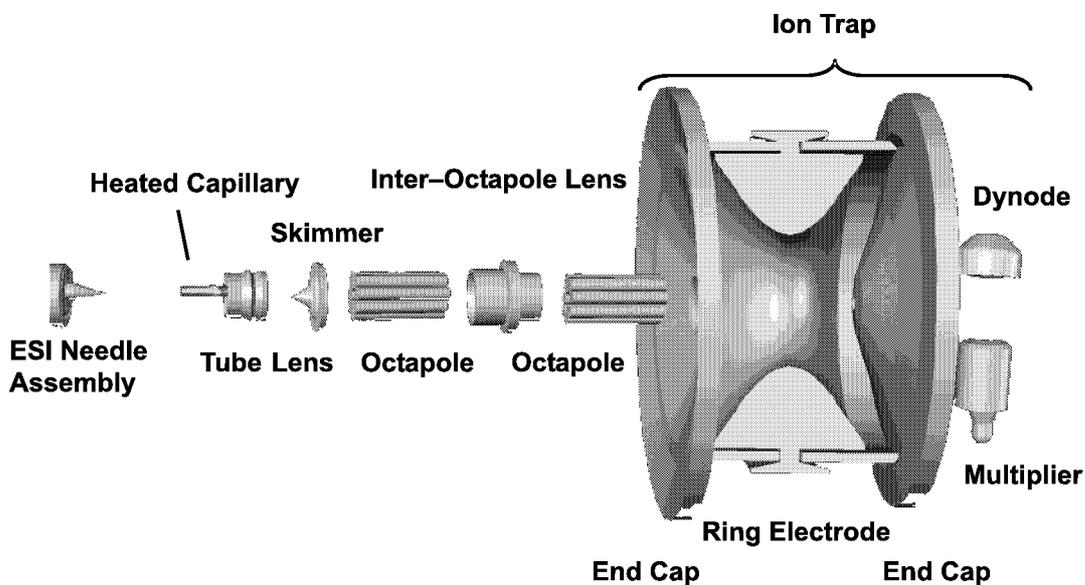


Abbildung 5.1.: Aufbau des Thermoquest LCQ ESI-MS mit Ionenfalle

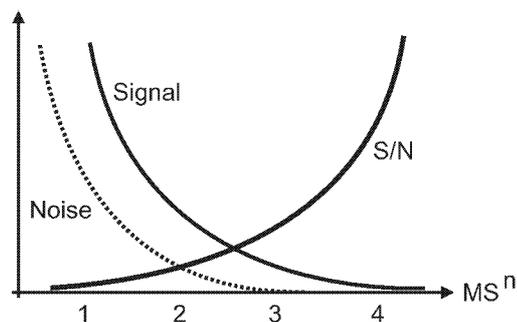


Abbildung 5.2.: Verbesserung des Signal-Rausch Verhältnis mit zunehmendem n in MSⁿ Experimenten

5. Analytische Methoden

die Ionen im Potentialminimum der Falle. Soll nun z.B. NAD ($M=663,4 \text{ g mol}^{-1} \Rightarrow [M-H]=662,4$) gemessen werden, so werden durch Veränderung der elektrischen Felder alle Ionen aus der Ionenfalle ausgeschlossen, deren m/z -Verhältnis nicht im Bereich von $662,4 \pm 2,5$ liegt. Umgekehrt bedeutet das, daß Ionen mit dem m/z -Quotienten des Moleküliions von NAD angereichert werden.

Da wegen der komplexen Zellmatrix nicht alle Ionen für die $m/z = 662,4$ gilt, tatsächlich NAD-Molekülionen sind, wird vor der Detektion eine Fragmentierung durchgeführt. Dazu werden die Ionen in der Ionenfalle so stark beschleunigt, daß sie durch reaktive Stöße mit den Heliumatomen in kleinere Fragmente zerfallen. Anschließend werden dann diese Fragmente sequentiell aus der Ionenfalle ausgelesen. Charakteristisch für NAD ist hierbei der Verlust des Nicotinsäureamid-Restes zum Bruchstück mit $m/z=540,4$ (siehe Abbildung 5.3).

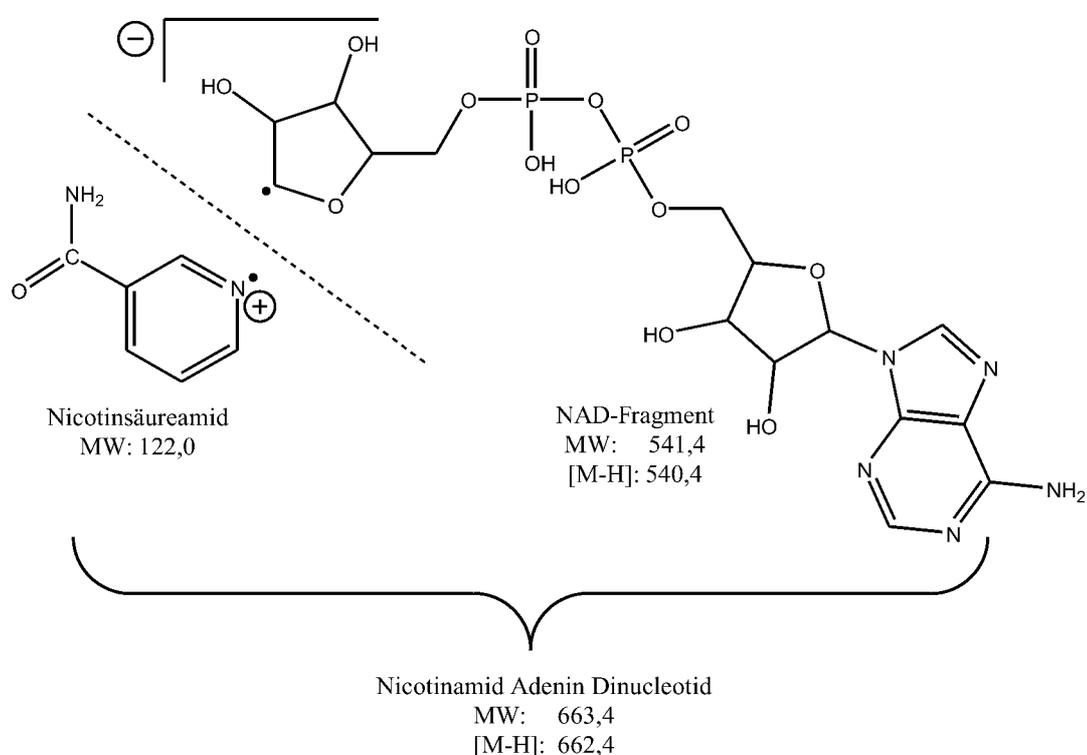


Abbildung 5.3.: Fragmentierung von NAD während eines MS^n Experimentes zu dem Fragment mit $m/z=540,4$ (detektiert) unter Abspaltung eines Nicotinsäureamid-Restes

Die Quantifizierung über das charakteristische Fragment-Ion besitzt gegenüber dem Moleküliion eine höhere Selektivität, da das Signal des Moleküliions in Zellextrakten durch Störionen (Rauschen) mit dem gleichen m/z -Quotienten überlagert ist.

5.1.4. ESI-TOF-Massenspektrometer

Ein Teil der Arbeiten wurden auf einem alternativen LC-MS Gerät in der Arbeitsgruppe von Prof. Douglas B. Kell in Aberystwyth, Wales (UK) durchgeführt. Das LCT (Micromass UK Ltd., Manchester, UK) verwendet wie auch das LCQ eine Electrospray-Ionisierung, jedoch wird das Ionenspray nicht linear in das MS geführt, sondern über eine zweifache Ablenkung ("Z-Spray"). Vorteil dieser Methode ist eine höhere Flexibilität (z.B. bei der Verwendung nicht-flüchtiger Lösungsmittel) und Sensitivität (durch bessere Verdampfung des Lösungsmittels). Die nicht-flüchtigen Bestandteile (z.B. Salze) im Eluenten gelangen nicht in das MS sondern werden vorher über den Z-Verlauf des Ionenstroms abgetrennt (und landen auf der Abtrennplatte, siehe "Baffle" in Abbildung 5.4).

Die Detektion im LCT erfolgt über ein time-of-flight (TOF) MS. Über einen "Pusher" werden die Ionen gegen einen Reflectron gedrückt, welcher die Ionen zu einem Detektor reflektiert (siehe Abbildung 5.4). Auf der Wegstrecke zwischen Pusher und Detektor werden die Ionen gemäß ihrer Flugzeit aufgetrennt, d.h. Ionen mit hoher Masse (bzw. m/z) fliegen länger und werden später detektiert. Dieser Aufbau gestattet nur eine massenspezifische Trennung, MSⁿ Experimente sind nicht möglich.

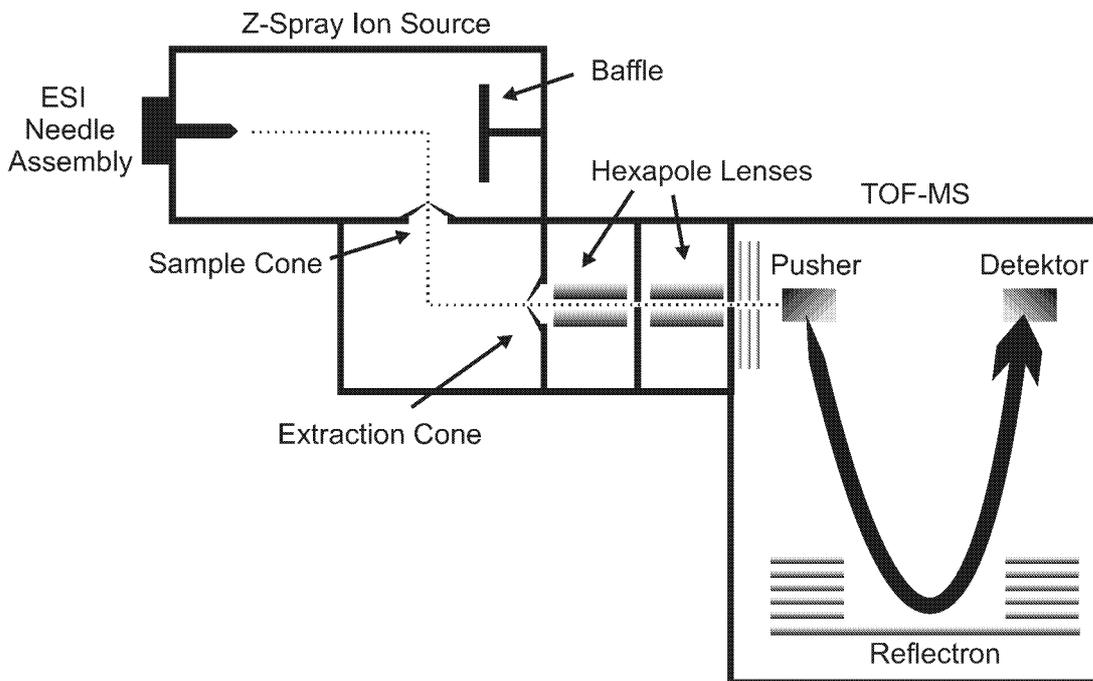


Abbildung 5.4.: Aufbau des Micromass LCT mit Z-Spray Ionisierung und TOF-MS Detektion

5.2. Capillarelektrophorese

Die Capillarelektrophorese (CE) wurde in den späten 80er Jahren als eine Weiterentwicklung der Elektrophorese (per Definition die Migration geladener Teilchen in einem Elektrolyten bei Anlegen eines elektrischen Feldes) etabliert. Die Trennung der Analyten findet in einer (Silica-) Capillare statt und beruht in erster Linie auf den unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten der Teilchen. Diese Größe ist proportional zum Verhältnis aus Masse zu Ladung der Analyten. Kleine, hoch geladene Teilchen werden im elektrischen Feld stärker beschleunigt als große, wenig geladene Teilchen [81, 82].

Der durch die Silica-Kapillarwände hervorgerufene Elektroosmotische Flow (EOF) erlaubt auch die Trennung und den Nachweis nicht-ionisierter Teilchen in der Capillare. Ursache des EOF ist die vom pH-Wert der Lösung stark abhängige Ionisierung der Silicat-Oberfläche an den Kapillarwänden. Bei hohen pH-Werten sind die Silanolgruppen deprotoniert - die Kapillarwand ist negativ aufgeladen. Um Elektroneutralität zu gewähren, bildet sich entlang der Kapillarwand eine Schicht positiv geladener Ionen aus. Diese Ionen sind solvatisiert und werden, in Abhängigkeit vom Abstand zur Kapillarwand, in Richtung der Kathode bewegt. Es resultiert ein kontinuierlicher Analytenfluß in Richtung der Kathode - der EOF. Die Größe des EOF hängt von mehreren Parametern ab und kann näherungsweise durch die folgende Gleichung beschrieben werden.

$$\begin{aligned}\mu_{EO} &= \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4\pi\eta r} & (5.1) \\ \text{mit: } \mu_{EO} &\equiv \text{EOF} \\ \epsilon &\equiv \text{Dielektrizitätskonstante} \\ \zeta &\equiv \text{sog. zeta-Potential der Kapillarwand} \\ \eta &\equiv \text{Viskosität der Lösung} \\ r &\equiv \text{Kapillarradius}\end{aligned}$$

Abbildung 5.5 zeigt schematisch das Zustandekommen des EOF auf.

Die Möglichkeit, mit Hilfe der CE sowohl geladene als auch ungeladene Teilchen analysieren zu können, macht diese Analytik in sehr vielen Bereichen attraktiv. Ein weiterer Vorteil dieser Methode sind die oft nur sehr geringen Substanzmengen (Nanoliter-Bereich), die benötigt werden.

CE-Geräte bestehen prinzipiell aus einer mit Elektrolyt gefüllten, feinen Capillare (Silicat-Oberfläche, typische Größenordnung: ca. 50 - 75 cm lang; Radius: 25-100 μm), die mit ihren Enden in zwei Reservoirs der Elektrolytlösung taucht. Zwei Elektroden sind ebenfalls in die beiden Reservoirs getaucht, um den elektrischen Stromkreis zu schließen. Sie liefern elektrische Spannungen im Bereich von 10-40 kV. Die daraus resultierenden Ströme bewegen sich, in Abhängigkeit vom Elektrolyten, im μA -Bereich. Um ein Aufheizen der Capillare zu verhindern,

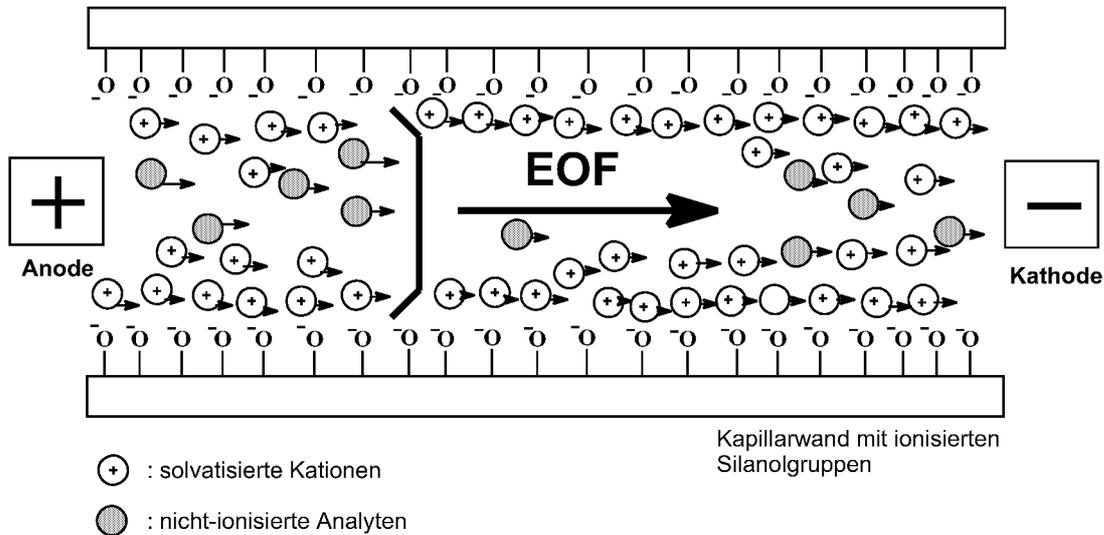


Abbildung 5.5.: Der Elektroendosmotische Flow (EOF)

werden diese bei handelsüblichen Geräten mit einem Kühlmittel temperiert. Die Capillare durchläuft an einem Ende einen UV-Detektor. Es sind aber auch andere Detektionsarten wie etwa ein Fluoreszenzdetektor oder auch ein angeschlossenes Massenspektrometer möglich. Den prinzipiellen Aufbau eines CE-Gerätes zeigt die Abbildung 5.6.

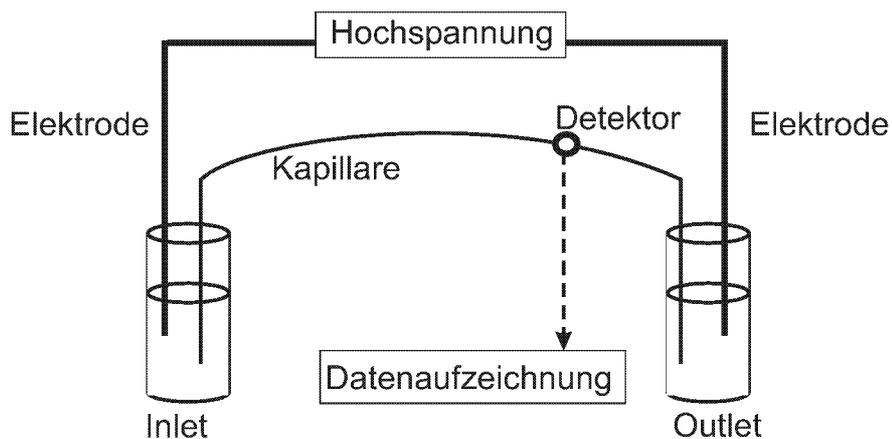


Abbildung 5.6.: Schematischer Aufbau eines CE-Gerätes

Die elektrophoretische Mobilität einer Spezies im elektrischen Feld ist abhängig von ihrer Ladung, der Größe des Ions und der Viskosität des Mediums (siehe Gleichung 5.3).

$$\mu_a = \frac{q}{R_I \cdot \eta} \quad (5.2)$$

mit: $\mu_a \equiv$ elektrophoretische Mobilität $[(A \cdot s^2)kg^{-1}]$
 $q \equiv$ Ladung $[A \cdot s]$
 $R_I \equiv$ Ionengröße $[m]$
 $\eta \equiv$ Viskosität $[kg(m \cdot s)^{-1}]$

Kleine, hochgeladene Teilchen bewegen sich folglich schneller als große Teilchen mit kleinerer Ladung.

Bei der Untersuchung von Kationen ist der EOF von Vorteil, da er die Kationen in Richtung des Detektors transportiert. Für die Anionenanalyse ist die kathodische Flußrichtung des EOF nicht geeignet, da negative Teilchen aufgrund ihrer Ladung zur Anode wandern und daher nur solche Anionen zum Detektor gelangen können, deren elektrophoretische Mobilität kleiner ist als der EOF.

5.3. HPLC-Methoden

Die in dieser Arbeit spezifisch für die Verwendung mit massenspektrometrischer Detektion entwickelten Methoden sind in Abschnitt 5.3.1 dargestellt. Im folgenden werden 2 Methoden präsentiert, welche in Verbindung mit UV-Detektion der Analytik von Nucleotiden und Pentosephosphaten dienen. Abschließend werden die Parameter für 2 Standardmethoden für organische Säuren, bzw. Aminosäuren, dargestellt, welche schon seit längerem am Institut für Biotechnologie 2 [83] etabliert sind.

5.3.1. HPLC-MSⁿ Methoden

Für die HPLC-MS Kopplung werden zwei verschiedene chromatographische Systeme verwendet; sie werden im Detail in den folgenden Abschnitten behandelt. Zwecks einfacher Handhabbarkeit und schnellem Wechsel zwischen beiden Methoden werden die Flußraten, und somit auch das Splitverhältnis konstant gehalten. Das Injektionsvolumen beträgt 20 μ l. Die Flußrate (M 480 HPLC Pumpe, Gynkotek, D) beträgt 0,5 ml min⁻¹. Über einen T-Splitter werden 40 μ l min⁻¹ in die ESI-Quelle des Massenspektrometers eingeleitet. Zusätzlich werden 25 μ l min⁻¹ Methanol über eine externe HPLC Pumpe (PU 1585, Jasco, D) hinzugefügt (sog. "sheath flow") um eine schnelle Verdampfung des Laufmittels beim Versprühen in der ESI-Quelle zu unterstützen.

Im Finnigan LCQ Massenspektrometer wird Stickstoff zur Unterstützung des ESI-Mechanismus verwendet (sheath gas); Helium (0,1 Pa) dient in der Ionenfalle als Dämpf- und Kollisionsgas. Die Datenaquisition und -analyse erfolgt über die Software Xcalibur (Version 1.0 SR1, Thermoquest, USA).

Die folgenden ESI Parameter werden verwendet: Temperatur der beheizten Capillare (250°C), Spannung der Electrospray Capillare (4.5 kV), N₂ sheath gas (80 units = 1,2 l min⁻¹), Detektion im negativen Ionenmodus (50-815 m/z) im

full scan Modus. Zusätzlich durchgeführte MS/MS Experimente sind bedingt durch den jeweiligen Analyten.

Die optimalen Parameter der MS/MS Experimente wurden unter Verwendung 0,5 mM Standards in einem Methanol-Wasser Gemisch (50:50%, v/v) ermittelt. Durch direkte Injektion über eine Spritzenpumpe ($5 \mu\text{l min}^{-1}$) werden die Tune Parameter (heated capillary voltage, tube lens offset voltage, first and second octapole offset voltage, interoctapole offset voltage) sowie die Kollisionsenergie für das spezifische Fragment bestimmt.

Die Überprüfung des Systems (system suitability check) erfolgt vor Beginn jeder Probensequenz durch die Überprüfung der entsprechenden Flußraten, die Injektion eines Standardgemischs sowie während jedes Probenlaufs durch die Analyse des internen Standards cGMP. cGMP wurde aufgrund seiner UV-Absorption, spezifischen Retentionszeit, m/z and Abwesenheit in den untersuchten Zellproben als interner Standard ausgewählt.

5.3.1.1. β -Cyclodextrin-OH Phase

Zur Trennung werden zwei Nucleodex β -Cyclodextrin-OH Säulen (250 x 4 mm, $5 \mu\text{m}$, Macherey-Nagel, Düren, D) in Reihe geschaltet. Zum Schutz der zwei Hauptsäulen wird zusätzlich eine Vorsäule aus dem selben Material (KS 11/4 Nucleodex β -OH) verwendet. Zwecks optimaler Trennung sind die Parameter Gradient, Temperatur, Einspritzvolumen, Laufmittel und Flow optimiert worden (Parameter in Tabelle 5.1). Die Nachweisgrenzen und Kapazitätsfaktoren⁴ sind aus Abbildung 6.5 (Seite 64), bzw. Tabelle 6.5 (Seite 78) zu entnehmen.

5.3.1.2. Hypercarb Phase

Zur Trennung der phosphorylierten Kohlenhydrate wird eine Hypercarb Säule (250 x 4 mm, $5 \mu\text{m}$, Thermo-Hypersil, Kleinostheim, D) verwendet. Zum Schutz der Hauptsäule wird zusätzlich eine Vorsäule aus dem selben Material (20/4 Hypercarb) verwendet. Zwecks optimaler Trennung wurde die Zusammensetzung des Laufmittels optimiert (Parameter in Tabelle 5.2). Die Nachweisgrenzen und Kapazitätsfaktoren sind aus Abbildung 6.5, bzw. Tabelle 6.6 zu entnehmen. Nach jeweils 10 Proben wird die Säule mit 30% 2-Propanol und 70% 12 mM Ammoniumacetat für 300 min gereinigt. Eine Equilibrierung ist aufgrund des Säulenmaterials nicht notwendig.

⁴Der Kapazitätsfaktor k' berücksichtigt neben der Retentionszeit (t_r) auch die Totzeit (t_t) und erlaubt somit eine geräteunabhängige Beurteilung der Verweilzeit an der stationären Phase: $k' = \frac{t_r - t_t}{t_t}$

5. Analytische Methoden

Säule	2 x Nucleodex β -Cyclodextrin-OH, 250 x 4 mm, 5 μ m	
Laufmittel A	12 mM Ammoniumacetat	
Laufmittel B	80% A, 20% Methanol	
Temperatur	20°C	
Flußrate	0,5 ml min ⁻¹	
Injektionsvolumen	20 μ l	
Detektion	254 nm (UV), 50-815 m/z (MS)	
Gradient	Zeit [min]	% B
	0	2
	15	2
	30	100
	40	100
	50	2
60	2	

Tabelle 5.1.: HPLC-MS-Parameter zur Trennung und Detektion von Metaboliten unter Verwendung einer β -Cyclodextrin-OH Phase

Säule	Hypercarb, 250 x 4 mm, 5 μ m
Laufmittel	12 mM Ammoniumacetat
Temperatur	20°C
Flußrate	0,5 ml min ⁻¹
Injektionsvolumen	20 μ l
Detektion	254 nm (UV), 50-815 m/z(MS)

Tabelle 5.2.: HPLC-MS-Parameter zur Trennung und Detektion von phosphorylierten Kohlenhydraten unter Verwendung einer Hypercarb Phase

5.3.2. Nucleotide

Die Trennung und Quantifizierung der Nucleotide wird über eine reversed-phase HPLC-Methode erreicht. Als Trennsäule wird eine C₁₈-Säule (Lichrospher 100 RP 18 EC-5, 125,0 x 4,6 mm) verwendet, die Detektion erfolgt über einen Di-odenarraydetektor (DAD). Das Einspritzvolumen beträgt 20,0 μ l, so daß bei einem sehr geringen Probenvolumen eine große Anzahl an Nucleotiden analysiert werden kann. Zwecks optimaler Trennung sind die Parameter Gradient, Temperatur, Einspritzvolumen und Flow optimiert worden (Parameter in Tabelle 5.3). Die Nachweisgrenzen sind aus Tabelle 6.5 zu entnehmen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration (Phosphatpuffer) und der Anwesenheit eines Ionenpaarreagens (tert-butyl-Ammoniumsulfat, TBA), eignet sich dieses System jedoch nicht für die Ankopplung an eine MS Detektion (siehe Abschnitt 5.1).

Säule	Lichrospher 100 RP 18 EC-5	
Laufmittel A	KH ₂ PO ₄ (100 mM)/TBA (8 mM)	
Laufmittel B	70% A, 30% Methanol, 8 mM TBA	
Temperatur	40°C	
Flußrate	1,0 ml min ⁻¹	
Injektionsvolumen	20 µl	
Detektion	254 nm	
Gradient	Zeit [min]	% B
	0	20
	10	20
	45	50
	46	100
	56	100
	58	20
	68	20

Tabelle 5.3.: HPLC-Parameter zur Trennung und Detektion von Nucleotiden

5.3.3. Pentosephosphate

Die etablierte Stoffwechsellanalytik für Pentosephosphate basiert auf enzymatischen Testmethoden, welche pro Metabolit ein Probenvolumen von 375 µl benötigen [84]. Die Etablierung alternativer nicht-enzymatischer Nachweismethoden ist im Hinblick auf das beschränkte Probenvolumen sinnvoll, daher wurden die Metabolite des Pentosephosphat-Weges über eine HPLC-Methode getrennt und quantifiziert. In Tabelle 5.4 sind die wichtigsten Parameter des Verfahrens dargestellt.

Säule	Aminex HPX 87 H
Laufmittel	3M H ₂ SO ₄
Temperatur	40°C
Flußrate	0,6 ml min ⁻¹
Druck	64 bar
Injektionsvolumen	20 µl
Detektion	190 nm

Tabelle 5.4.: HPLC-Parameter zur Trennung und Detektion von Metaboliten des Pentosephosphat-Weges

Unter diesen Bedingungen sind nur reine Zucker und nicht Zuckerphosphate trennbar. Die Phosphatgruppe muß vor der Messung mittels HPLC über eine alkalische Phosphatase abgespalten werden.

Die Bedingungen, unter denen die Abspaltung der Phosphatgruppe über die alkalische Phosphatase quantitativ und reproduzierbar abläuft, wurden am Bei-

spiel von D-Ribose untersucht. Optimale Ergebnisse wurden beim Einsatz von 10% Pufferlösung, 1% alkalischer Phosphatase und einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C erreicht.[85]

5.3.4. Organische Säuren

Die organischen Säuren Pyruvat, Lactat, Oxoglutarat, Acetat, Succinat und Fumarat werden mittels Ionenausschluß-Chromatographie in Fermentationsüberständen quantifiziert. Zur Trennung der organischen Säuren werden zwei in Reihe geschaltete Aminex HPX-87H-Säulen (250 mm Länge, 4,6 mm Durchmesser, Biorad, München, D) verwendet. Die Elution erfolgt isokratisch bei 40°C mit 0,2 M H₂SO₄ und einem Eluentenfluß von 0,5 ml min⁻¹. Die Säuren werden mit einem UV-Detektor (S3300 Sykam, Gilching, D, bzw. DAD, Gynkotek, D) bei 254 nm detektiert. Die Auswertung erfolgt mit einem Integrator C-R6A (Shimadzu, D), bzw. der Chromeleon Software (Gynkotek, D). Das Probenvolumen beträgt 100 µl. Ein Standardchromatogramm befindet sich im Anhang auf Seite 169.[83]

5.3.5. Aminosäuren

Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure werden durch Derivatisierung und reversed-phase Chromatographie getrennt und quantifiziert. Als Derivatisierungsreagenz dient ortho-Phthaldialdehyd (OPA), dessen Carbonylfunktionalität mit den primären Aminogruppen der Aminosäuren in Gegenwart von Thiolen zu fluoreszierenden Isoindolen reagiert, welche hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial eingehen. Es wird eine Chromatographiesäule (Superspher 100RP 18-5EC, 125 x 4 mm, Merck, D) verwendet. Die Elution erfolgt bei 0,9 ml min⁻¹ (Pumpe S1000, Sykam, D) mit einem Gradienten (Mixer S8110, Sykam, D) und einer Temperatur von 40°C (Säulenofen S4110, Sykam, D). Die Detektion wird mittels eines Fluoreszenzdetektors (RF 535, Shimadzu, D) bei einer Anregung mit 330 nm und Detektion bei 450 nm durchgeführt. Die Auswertung des Signals erfolgt durch einen Integrator (C-R6A, Sykam, D), bzw. über die Chromeleon Software (Gynkotek, D). In Tabelle 5.5 sind die wichtigsten Parameter des Verfahrens dargestellt.[83]

5.4. ³¹P-NMR Spektrometrie

Durch Anwendung des Standardadditionsverfahrens (siehe 6.3.6.1) bei Zellextrakten wurde die Detektion von phosphorhaltigen Metaboliten im ³¹P-NMR untersucht. Hierbei zeigte sich, daß eine Zugabe von 3 mM FBP, PEP, GAP, DHAP und 3PG gut detektierbar ist (siehe Abbildung 5.7). Jedoch sind zwecks akzeptabler Auflösung der Spektren sehr lange Meßzeiten (ca. 24 h) notwendig,

Säule	Superspher 100RP 18-5EC	
Laufmittel A	KH ₂ PO ₄ (10 mM)/Tetrahydrofuran (0,5 %)	
Laufmittel B	50% A, 35% Methanol, 15% Acetonitril	
Temperatur	40°C	
Flußrate	0,9 ml min ⁻¹	
Injektionsvolumen	100 µl	
Detektion	330 nm / 450 nm	
Gradient	Zeit [min]	% B
	0	80
	7	90
	8,5	100
	12	80

Tabelle 5.5.: HPLC-Parameter zur Trennung und Detektion von Aminosäuren

wobei die Probe während dieser Zeit maximal bei 5°C gehalten werden kann [86]. Fernerhin befinden sich die oben erwähnten Metabolite in den reinen Zellextrakten nur in Konzentration von ca. 100 µM und konnten daher nicht nachgewiesen werden. Ein Anreicherungsschritt wäre für diese Art von Analytik notwendig.

Aufgrund des großen Analysenvolumens (3 ml Zellextrakt), der geringen Empfindlichkeit, der langen Messzeiten (24 h) sowie messtechnischer Probleme (Kühlung der Proben über langen Zeitraum nicht möglich, daher Veränderung der Probe während Meßzeitraum sehr wahrscheinlich) ist eine Analyse der Zellextrakte auf Metabolite der Glycolyse mittels ³¹P-NMR Spektrometrie für die in dieser Arbeit benötigten Ansprüche nicht sinnvoll und wurde daher nicht weiter untersucht.

5.5. Enzymatische Nachweismethoden

Als automatische Pipettierstation findet ein Laborroboter der Firma Beckman/Sagian (Biomek 2000) Verwendung. Dieser Roboter, welcher normalerweise im Bereich des High Throughput Screening (HTPS) Verwendung findet, erlaubt es, mit einem hohen Grad an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit Pipettiervolumina zwischen 1 und 1000 µl zu dispensieren und gestattet so eine Automation der enzymatischen Assays. Dies erlaubt einen hohen Probendurchsatz bei geringem und konstantem Fehler.

Mit diesem System werden alle Pipettiervorgänge, vom Erstellen der Standardreihen über die Neutralisation der Perchlorsäureextrakte bis hin zu den enzymatischen Analysen, durchgeführt.

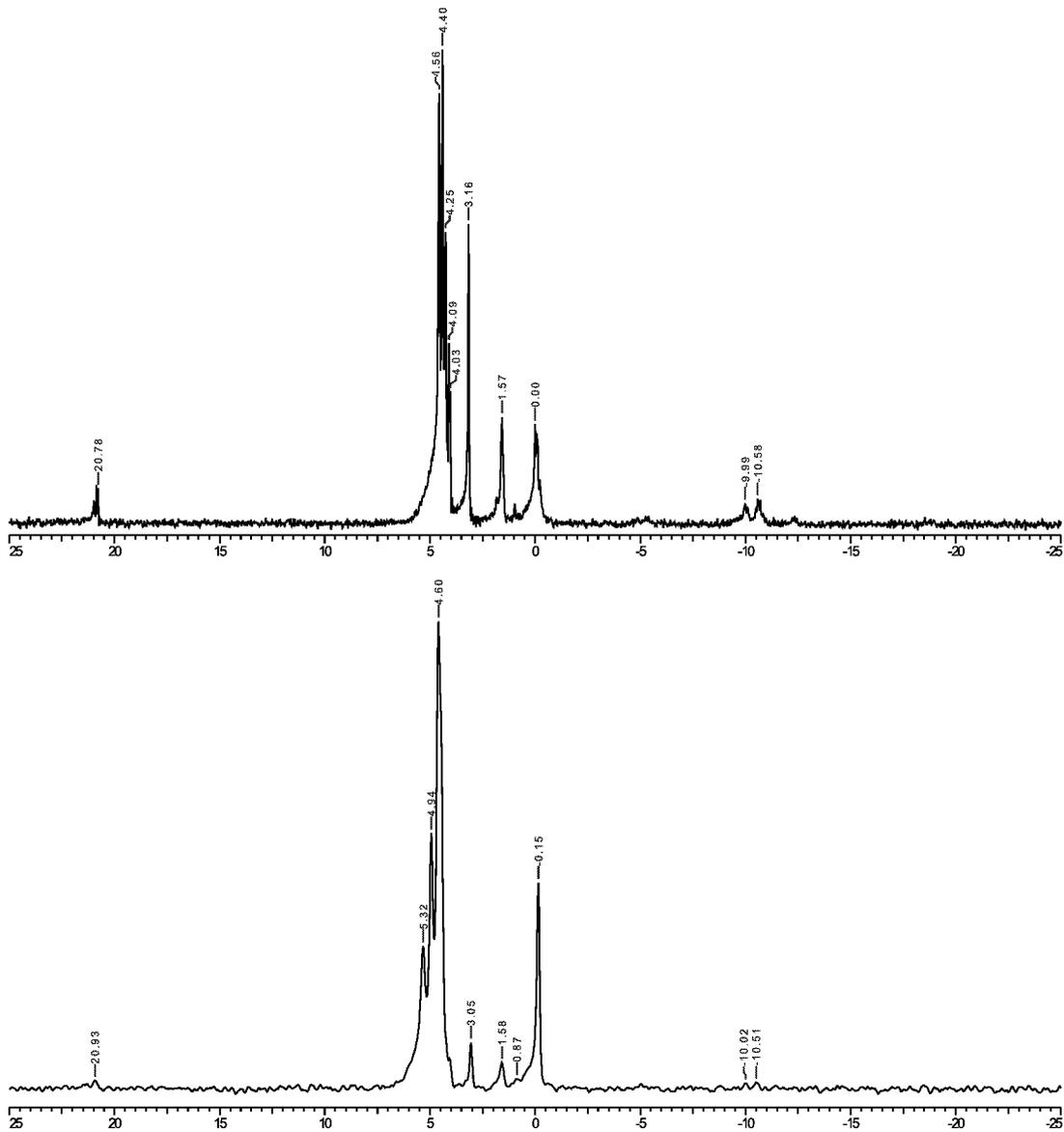


Abbildung 5.7.: ^{31}P -NMR steady state Messung, Zellextrakte aus Glucose steady state (oben); (unten) nach Addition von je 3 mM (FBP [5.41, 4.50, 4.60 ppm], PEP [-0.15 ppm], GAP [4.94 ppm], DHAP [5.32 ppm], 3PG [4.67 ppm])

Programmierung der Pipettierstation

Die Programmierung sämtlicher Methoden wird mit der Software BioWorks (Ver. 2.0, Beckman, D) durchgeführt. Alle Programme werden in einer Datenbank abgelegt. Die Programme enthalten Informationen über Mengen, Geschwindigkeiten, Reihenfolge, etc. der einzelnen Pipettierschritte und dienen der Berechnung eines Code Files. Diese Code Files werden an den Laborroboter übertragen und beinhalten die Arbeitsanweisung und Zeiten für sämtliche Systemabläufe.

Jedes Programm ist spezifisch für einen Enzymassay. Bevor ein solcher Test gestartet wird, erfolgt durch das Programm eine Mitteilung bezüglich Anordnung und Menge der benötigten Reagenzien. Anschließend werden Puffer und evtl. benötigte Salze, bzw. Cofaktoren pipettiert. Danach werden die Proben in Dreifachansätzen auf die Meßplatte pipettiert und abschließend das Enzym dispensiert.

Entwicklung der enzymatischen Nachweisreaktionen

Die verwendeten enzymatischen Nachweisreaktionen basieren auf Grundlagen von Bergmeyer [84] und sind in früheren Arbeiten [23, 87] bezüglich der Verwendung im Mikrotiterplattenmaßstab und der Minimierung des Probenvolumens opti-

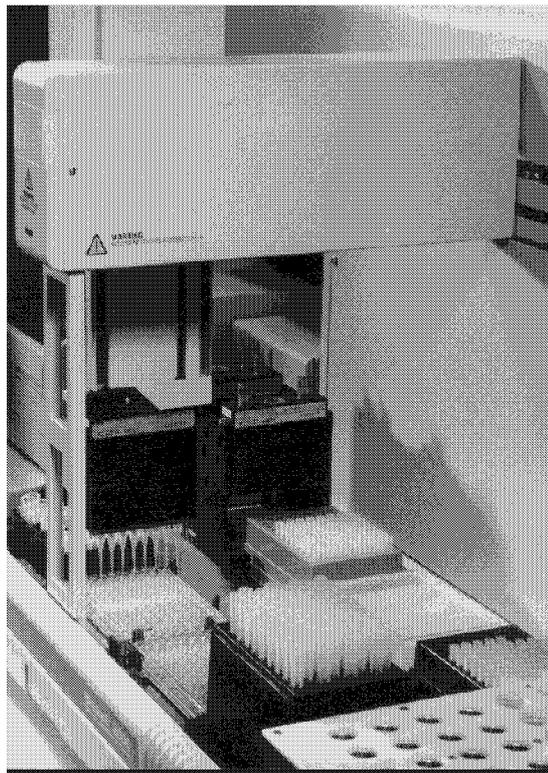


Abbildung 5.8.: Laborroboter Biomek 2000

miert worden. Über eine Endpunktbestimmung wird die Absorptionsänderung von NADH, bzw. NADPH bei 340 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (Thermomax, Molecular Devices, USA) nach erfolgter enzymatischer Umsetzung bestimmt. Für jede enzymatische Bestimmung werden Kalibrierreihen in einem Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,1 mM eingesetzt, anhand derer die Konzentration in den unbekanntenen Proben bestimmt werden. Der Vorteil enzymatischer Nachweisreaktionen liegt in der sehr hohen Substratspezifität der verwendeten Enzyme; einzelne Metabolite können daher spezifisch in der zellulären Matrix bestimmt werden. Nachteilig wirkt sich das relativ große benötigte Probenvolumen (100-300 μl pro Metabolit) aus. Die Nachweisgrenzen sind aus Abbildung 6.5, bzw. Tabelle 5.6 zu entnehmen (Zustandekommen der Nachweisgrenzen, siehe Abschnitt 6.3.6, Seite 66). Versuchsbedingungen und Vorgehensweise der enzymatischen Nachweisreaktionen werden detailliert in [23] behandelt.

5.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kommerziell erhältlicher Kit verwendet. Im Arbeitsreagenz des BCA-Proteinassays (Pierce, USA) enthaltene Cu^{2+} -Ionen binden an Peptidbindungen, so daß ein Tetradentat- Cu^+ -Komplex entsteht. Cu^+ reagiert mit BCA (2,2-Bichinoly-4,4-Dicarbonsäure) zu einem BCA- Cu^+ -Komplex. Das Arbeitsreagenz wird aus 50 Teilen BCA-Reagenz A und 1 Teil BCA-Reagenz B gemischt. Reagenz A enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid; Reagenz B ist eine 4%ige Kupfersulfatlösung. Der Überstand des Zellaufschlusses wird in mehreren Verdünnungen (1:10, 1:20 und 1:50) eingesetzt. Die nötige Standardreihe wird mit Proben von 125-2000 μg BSA ml^{-1} in einer Lösung aus 0,9% Salzlösung und 0,05% Natriumazid vorbereitet. 25 μl der Proben werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Als Reagenzienleerwert dient Aqua bidest. Zu den 25 μl werden je 200 μl Arbeitsreagenz hinzugegeben, die Platte wird 30 s geschüttelt und anschließend 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Platte auf 25°C abgekühlt ist, wird die Absorption bei 570 nm gemessen.[88, 89, 90]

Anhand der erhaltenen Kalibriergerade kann der Proteingehalt der Proben ermittelt werden. Dieser Test wird vom Laborroboter Biomek 2000 pipettiert. Die Extinktion der Proben wird im Mikrotiterplattenphotometer (Thermomax, Molecular Devices, USA) gemessen.

5.7. Bestimmung der Biomassekonzentration

5.7.1. Bestimmung der optischen Dichte (OD_{650})

Ein Maß für die Konzentration der Biomasse ist die optische Dichte. Diese wird aus der Extinktion nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt. Die Ex-

Substanz	[mM]	Substanz	[mM]
Glycolyse		Citratcyclus	
G6P	0,23	Cit	0,15
F6P	0,30	IsoCit	0,17
FBP	0,30	2OG	0,18
GAP	0,53	Succ	0,19
DHAP	0,53	Mal	0,06
3PG	0,30	OxAc	0,68
2PG	0,38	AcCoA	0,30
PEP	0,38		
PYR	0,38		
Gluconeogenese		Substrate	
Gly	0,27	Glc	0,30
G3P	0,40	Gly	0,27
		Ac	0,28

Tabelle 5.6.: Intrazelluläre Nachweisgrenzen [mM] für enzymatische Nachweisreaktionen

tinktion wird mittels eines Photometers (Shimadzu UV 160) gegen bidestilliertes Wasser bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen. Der lineare Meßbereich des Photometers liegt zwischen 0,03 und 0,3 I, daher werden die Proben entsprechend verdünnt (1:10 bis 1:100).

5.7.2. Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wird 1,0 ml der Fermentations-suspension auf einen zuvor gewogenen und getrockneten Celluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 2 μm gespritzt und mit 1,0 ml Aqua bidest nachgespült. Der Filter wird anschließend bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und erneut gewogen. Der Korrelationsfaktor zwischen Biotrockenmasse und optischer Dichte beträgt $0,47 [\text{gl}^{-1} \cdot OD_{650}] \pm 0,3 \%$.

5.7.3. Bestimmung der Zellzahl und des Zellvolumens

5.7.3.1. Zellzahl

Das CASY (Cell Counter and Analyser System 1, Modell TT, Schärfe System, D) ist ein elektronisches Gerät zur Partikelmessung nach dem Widerstandsprinzip. Die Signalauswertung erfolgt über die Pulsflächenanalyse. Zur Messung werden die Partikel (Zellen) in einem schwachen Elektrolyten (isotonisch) suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine 0,45 μm Capillare definierter Geometrie gesaugt. Die Präzisionsmeßpore ist als Bohrung in einem Rubin

realisiert, der in den Kapillarkörper eingegossen ist. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Capillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Capillare verdrängen die Zellen ein ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Dies hat eine Erhöhung des Widerstandes zur Folge, welche als direktes Maß für das Volumen der Zellen dient. Voraussetzung hierfür ist, daß die Zellen die Capillare einzeln passieren. Für sämtliche Messungen muß die Zellsuspension daher um einen geeigneten Faktor verdünnt (1:1.000 je OD Einheit) werden. Mit diesem Messgerät lassen sich u.a. die Zellzahl und das Zellvolumen bestimmen. Zwischen BTM, OD_{650} und der Zellzahl besteht ein linearer Zusammenhang, da alle drei Größen ein Maß für die Zelldichte darstellen. In Abbildung 6.14 (siehe Seite 87) ist dieser lineare Zusammenhang graphisch dargestellt.

5.7.3.2. Zellvolumen

Im Rahmen dieser Arbeit ist das Zellvolumen unter Einsatz eines Partikelzählers (siehe Abschnitt 5.7.3.1) bestimmt worden, da es sich hierbei um eine sehr einfache und schnelle Methode mit minimalem Fehler handelt.

5.8. Desaktivierung, Extraktion und Analyse der Proben

5.8.1. Extrazelluläre Metabolite

Für die Analytik extrazellulärer Metabolite während der unterschiedlichen Fermentationsphasen werden die Zellsuspensionsproben abzentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -28°C gelagert. Die während der Pulsexperimente anfallenden Überstandsproben (bestehend aus Quenchingflüssigkeit) werden nach Zentrifugation bei -80°C gelagert. Glucose wird direkt aus der Zellsuspension mit dem Accutrend Sensor (Roche, CH) bestimmt. Die auf einen Teststreifen aufgetragene Glucose wird von dem dort immobilisierten Enzym Glucoseoxidase in Gluconolacton umgewandelt. Der dabei in äquimolarer Menge zur Glucose entstehende Sauerstoff in Form von H_2O_2 wird amperometrisch gemessen. Alle anderen Substanzen werden nach entsprechender Verdünnung über die oben beschriebenen analytischen Verfahren bestimmt.

5.8.2. Intrazelluläre Metabolite

Die Analytik intrazellulärer Metabolite erfordert ein Abstoppen des zellulären Stoffwechsels ("Quenching", siehe Abschnitt 4.2.4.2). Nach erfolgter Abtrennung des Überstandes, Extraktion der Metabolite mittels Perchlorsäure und Neutralisation (siehe Abschnitt 4.2.4.3), werden die intrazellulären Metabolite gemäß der

oben erwähnten Verfahren analysiert. Im Gegensatz zu den extrazellulären Metaboliten muß neben der durch die analytische Methode bedingten Verdünnung noch eine Korrektur bezüglich des intrazellulären Volumens durchgeführt werden.

$$\text{Verdünnung} = \frac{V_I + V_E + V_N + V_X}{V_I} \quad (5.3)$$

V_I	intrazelluläres Volumen
V_E	Volumen Perchlorsäure (2000 μl)
V_N	Volumen Neutralisation (1095 μl)
V_X	interzelluläres Volumen (318 μl)

Das interzelluläre Volumen V_X (nicht zu verwechseln mit dem intrazellulären Volumen) ist das Zwischenzellvolumen im Zellpellet nach der Zentrifugation. Dieses Volumen beinhaltet noch extrazellulären Fermentationsüberstand und wirkt störend bei der Detektion der intrazellulären Metabolite. So können z.T. zellexterne Stoffe (z.B. Glucose) im interzellulären Volumen nachgewiesen werden, welche dann falsch "intrazellulär" zugeordnet werden. Das interzelluläre Volumen V_X ist abhängig von dem verstoffwechselten Substrat (siehe Abschnitt 6.4.7) und ist für die Bestimmung der intrazellulären Konzentration essentiell, da es die Verdünnung von Proben mitbestimmt.

Das intrazelluläre Volumen V_I ist eine Funktion der Zelldichte (BTM, 10 g l^{-1}), des Probenvolumen V_S (5,0 ml) und des experimentell über CASY ermittelten spezifischen Zellvolumens K_E ($2,78 \mu\text{l mg}^{-1}$ bei einer Wachstumsrate von $\mu=0,125 \text{ h}^{-1}$ auf Glucose [28]). Die Parameter für die beispielhafte Berechnung in diesem Abschnitt gelten strikt nur für das Wachstum von *E. coli* K12 auf Glucose bei einer Durchflußrate von $\mu=0,125 \text{ h}^{-1}$, siehe hierzu auch Tabelle 6.8, Seite 86 und ergeben einen Verdünnungsfaktor von 25,55.

$$V_I = BTM \cdot V_S \cdot K_E \quad (5.4)$$

Stoffwechselmodellierung

Der starke Anstieg an Quantität und Qualität biologischer Daten, bedingt durch die Forschung in der Genom-, Proteom-, Transcriptom- und Metabolom-Forschung (s.a. Abschnitt 3.1.1), ermöglicht erstmals eine detaillierte Analyse intrazellulärer Metabolitdynamiken und somit ein quantitatives Verständnis des mikrobiellen Stoffwechsels. Die Komplexität metabolischer Stoffwechselnetzwerke läßt sich jedoch nur unter Zuhilfenahme mathematischer Modelle verstehen [91]. Diese Modelle basieren zumeist auf strukturierten Modellen einer einzelnen Zelle und können je nach Bedarf sehr einfach oder hochkomplex ausfallen. Zur Interpretation von intrazellulären Metabolitdynamiken ("metabolomics") können metabolische Stoffwechselnetzwerke anhand ihrer Reaktionskinetiken modelliert werden [92, 93]. Hierfür gelten jedoch gewisse Einschränkungen.

1. Es findet keine Regulation auf genetischer Ebene (Enzyminduktion) statt: Das dynamische Verhalten des Stoffwechsels wird lediglich durch die allosterische Kontrolle der enzymatischen Reaktionen beeinflusst. Da der Zeitraum des Experimentes sich auf ca. 40 s beschränkt, ist diese Annahme berechtigt (s.a. Abbildung 2.1).
2. Es wird nur eine "Durchschnittszelle" betrachtet: Die Verteilung innerhalb einer Zellpopulation (z.B. Größe, Alter, Zellcyclus, spezifische Stoffwechselaktivität [94], Genom, etc.) wird vernachlässigt. Innerhalb der Zelle herrscht Homogenität, Konzentrationsgradienten werden vernachlässigt⁵.

Das strukturierte Stoffwechselmodell einer einzelnen "Durchschnittszelle" das diesen Anforderungen genügt kann durch ein System gewöhnlicher Differentialgleichungen beschrieben werden:

$$\dot{\mathbf{C}} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v}(\mathbf{C}, \mathbf{E}, \mathbf{P}) \quad (5.5)$$

mit \mathbf{C} als Vektor der Metabolitkonzentrationen, $\dot{\mathbf{C}}$ als Ableitung dieses Vektors nach der Zeit, \mathbf{N} als stöchiometrische Matrix und \mathbf{v} als Vektor der intrazellulären Flüsse. Der Flußvektor \mathbf{v} ist abhängig von den Metabolit- und Enzymkonzentrationen \mathbf{C} , \mathbf{E} und dem Vektor der kinetischen Parameter \mathbf{P} . Für den Zeitraum des Pulsexperiments kann \mathbf{E} als konstant angenommen werden.

Im folgenden soll die Modellierung intrazellulärer Metabolitdynamiken anhand eines Beispiels verdeutlicht werden. Bei diesem Modell handelt es sich um eine Beschreibung des Phosphoenolpyruvat:Glucose Phosphotransferase Systems (PEP:PTS). Glucose (GLC) wird in einer Transportreaktion in die Zelle aufgenommen ($\text{GLC} \rightarrow \text{G6P}$), in einer zweiten Reaktion reagiert G6P zu PEP (Glycolyse) und in einer dritten Reaktion reagiert PEP zu Pyruvat (siehe Abbildung 5.9). Dieses Modell läßt sich folgendermaßen beschreiben:

$$\begin{aligned} \dot{\mathbf{C}} &= \begin{pmatrix} \dot{\text{G6P}} \\ \dot{\text{PEP}} \\ \dot{\text{Pyruvat}} \end{pmatrix} = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v} = \\ &= \begin{pmatrix} \mathbf{v}_1 - \mathbf{v}_2 - \mathbf{v}_3 \\ -\mathbf{v}_1 + 2\mathbf{v}_2 - \mathbf{v}_4 \\ \mathbf{v}_1 + \mathbf{v}_4 - \mathbf{v}_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} +1 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & +2 & 0 & -1 & 0 \\ +1 & 0 & 0 & +1 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{v}_1 \\ \mathbf{v}_2 \\ \mathbf{v}_3 \\ \mathbf{v}_4 \\ \mathbf{v}_5 \end{pmatrix} \quad (5.6) \end{aligned}$$

$\dot{\text{G6P}}$, $\dot{\text{PEP}}$ and $\dot{\text{Pyruvat}}$ sind die Ableitungen der Metabolitkonzentrationen (G6P, PEP, Pyruvat) nach der Zeit. Die Flüsse \mathbf{v}_i werden im Stoffwechselmodell

⁵Eine Ausnahme bilden kompartimentierte Zellen, z.B. Mitochondrien in *Saccharomyces cerevisiae* [18], etc.

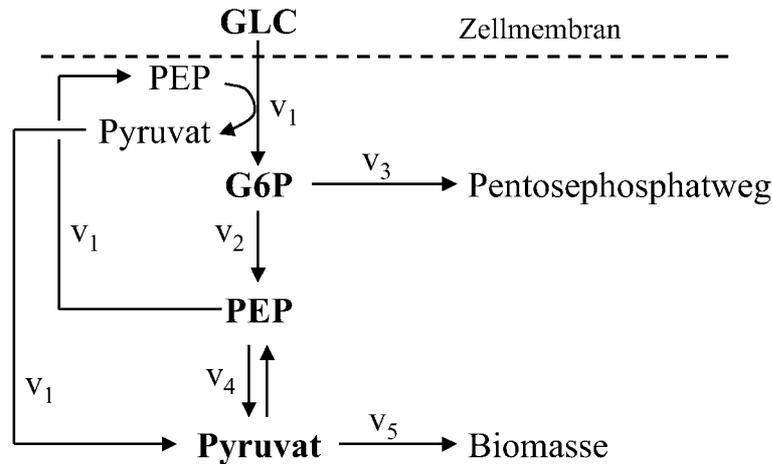


Abbildung 5.9.: Beispiel für eine Modellierung: Glucose (GLC) Aufnahme und Verstoffwechslung zu PEP und Pyruvat mit zusätzlichen Flüssen in den Pentosephosphatweg und in die Biomasse. v_i repräsentiert die Flüsse zwischen den Metaboliten

durch kinetische Reaktionsgleichungen dargestellt. Ein häufig verwendeter Ansatz ist die Michaelis-Menten Gleichung (hier vereinfachend irreversibel):

$$v = v_{max} \cdot \frac{C}{K_m + C} \quad (5.7)$$

mit v_{max} als maximale Reaktionsrate und K_m als Michaelis-Menten-Konstante (d.h. die Konzentration C bei welcher v die Hälfte der maximalen Reaktionsrate v_{max} beträgt). Mit entsprechenden Anfangswerten, d.h. Metabolitkonzentrationen ($\mathbf{C}_0, \mathbf{C}_{t0}$) und kinetischen Parametern (\mathbf{P}) können durch Lösung des Differentialgleichungssystems die Metabolitverläufe über die Zeit berechnet werden.

In diesem stark vereinfachten Modell wird die Glycolyse als black-box behandelt ($G6P \rightarrow PEP$). Black-box Ansätze werden in Stoffwechselmodellen häufig verwendet, um die Modelldimensionen zu minimieren [95]. Die hohe Komplexität metabolischer Netzwerke erfordert solche Vereinfachungen, jedoch ist es extrem schwierig bei mangelnder Stoffwechselkenntnis diese Vereinfachung so vorzunehmen, daß das Resultat noch realistisch erscheint.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen wäre die Generation einer großen Anzahl von verschiedenen Stoffwechselmodellen mit unterschiedlichen black-box Annahmen. Unter Verwendung einer Modelldiskriminierungsmethode wäre es dann möglich das Modell auszuwählen, welches die experimentellen Daten am besten widerspiegelt.

5.8.3. Metabolic Modeling Tool (MMT)

Zwecks Generierung und Analyse einer großen Anzahl an Stoffwechselmodellen ist im Rahmen der Doktorarbeit von Jochen Hurlebaus [32] die Metabolic Modeling Tool Software (MMT) entwickelt worden. Dieses Programm gestattet die Konstruktion und Analyse dynamischer Stoffwechselmodelle der in Gleichung 5.5 beschriebenen Struktur. Im Gegensatz zu anderen Programmen der Stoffwechselmodellierung (z.B. Metamodel [96], Metatool [97], Jarnac [98], Dynafit [99], Gepasi [100]; s.a. [101, 102, 103, 104, 105, 106, 107]) ist MMT nicht in der Anzahl möglicher Metabolite, Reaktionsraten und Stoffwechselfparameter beschränkt.

Da die Geschwindigkeitsgleichungen \mathbf{v}_i nicht-linear sind, wird das Stoffwechselmodell über numerische Algorithmen (z.B. ableitungsfreie Optimierer und ein modifizierter Nelder-Mead Simplex Algorithmus) an die experimentellen Daten angepaßt.

Selbst in einfachen Fällen ist die Identifizierung der Parameter jedoch stark von den experimentellen Bedingungen und der Meßgenauigkeit abhängig [108]. Hierdurch wird der Optimierungsvorgang sehr zeitaufwendig und in der Regel gibt es nicht eine eindeutige Lösung für den Parametervektor \mathbf{P} . [32]

6. Ergebnisse und Diskussion

“Es zeichnet einen gebildeten Geist aus, sich mit jenem Grad an Genauigkeit zufriedenzugeben, den die Natur der Dinge zuläßt, und nicht dort Exaktheit zu suchen, wo nur Annäherung möglich ist.”

*Aristoteles, Nikomachische Ethik
(4. Jahrhundert v. Chr.)*

6.1. Pulsaufgabesystem (PAS)

Zur Durchführung spezieller Pulsexperimente unter unterschiedlichen physiologischen Zuständen war die Neuentwicklung eines Pulsaufgabesystems (PAS) erforderlich, welches es gestattet, zu definierten Zeitpunkten dem Reaktionssystem exakte Volumina zuzuführen. Hierbei muß die Mischzeit während der Pulsversuche minimiert werden, um während des Experiments einen möglichst schnellen Übergang vom limitierten zum nicht-limitierten Zustand zu erreichen (Verhinderung von Substratgradienten). Der bisherige Anlagenaufbau mit einer Pulsaufgabe von oben in das Arbeitsvolumen, wurde hinsichtlich eines seitlichen Einbringens der Pulslösung in Höhe des Rührblattes (\equiv schnellere Vermischung) modifiziert. Details zum Aufbau des Pulsaufgabesystems (PAS) befinden sich im Anhang auf Seite 170, bzw. in [109].

Durch Minimierung der Wegstrecke zwischen Ventil und Bioreaktor sowie durch Dosierung der Pulslösung über Druck und Ventilschaltzeiten wird verhindert, daß Druckluft in den Bioreaktor gelangt. Somit wird eine Druckspitze während der Pulsaufgabe vermieden und ein zweites Ventil zum Abfangen dieser Druckspitze überflüssig (Abbildung 6.1). Durch den modularen Aufbau lassen sich mehrere Pulsbehälter hinzufügen, so daß unterschiedliche Substrate zudosiert werden können (siehe Abbildung auf Seite 173).

Die Messung der Mischzeiten erfolgt über eine Bestimmung der Leitfähigkeit nach Einbringen einer Spurstoff-Lösung. Die Spurstoff-Lösung besteht aus einer gesättigten Kaliumchlorid-Lösung mit variablen Anteilen Phosphorsäure zur Einstellung höherer Viskositäten. Durch Variation verschiedenster Variablen (Druck, Winkel, Volumen, etc.) wird ein Mischzeitminimum angestrebt. Derzeit werden bei Verwendung von zwei Ventilen in einem 72° Winkel Werte von Θ_{90}

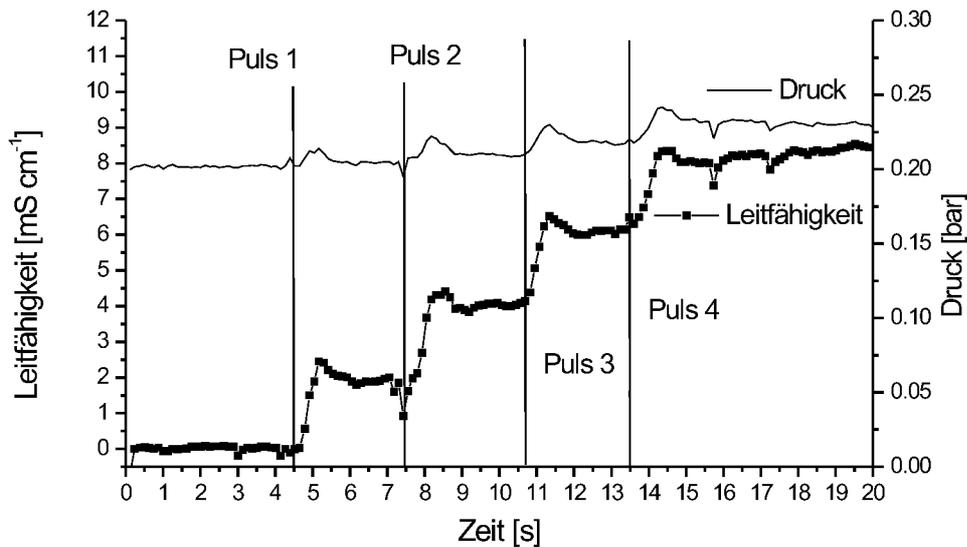


Abbildung 6.1.: Multipuls (4 x Ventil öffnen, jeweils 0,300 ms lang, 3,0 s zwischen Pulsen); Druckanstieg < 6%

= $0,630 \pm 0,154$ ms erreicht¹, s.a. Abbildung 6.2). Die Aufhebung der Substratlimitierung im Bioreaktor erfolgt jedoch sehr viel schneller. Aufgrund der hohen Substrataffinität von *E. coli* gegenüber den eingesetzten Kohlenstoffquellen wird der entsprechende K_S -Wert² (halbmaximale Substratsättigung) in <100 ms überschritten und die limitierte Kultur schnell aus der Limitierung gebracht (siehe hierzu auch Abbildung 6.18 auf Seite 94).

6.2. MeOH-Quenching-Verfahren

Das Methanol-Quenching-Verfahren (siehe Abschnitt 4.2.4.2) zur schnellen und effektiven Desaktivierung des Stoffwechsels wurde anhand der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt [30]. In Hinblick auf das Bakterium *E. coli* ist es jedoch notwendig, die Übertragbarkeit dieses Verfahrens zu überprüfen. Das Quenching-Verfahren hat die Aufgabe, den bakteriellen Stoffwechsel schnell abzustoppen. Fernerhin soll die Integrität der Zellmembran erhalten bleiben, da ansonsten keine Differenzierung zwischen intra- und extrazellulären Metaboliten

¹ Θ_{90} entspricht der Zeit, die notwendig ist, um einen Substratpuls bis zur definierten Mischqualität von 90% zu homogenisieren; einen exemplarischen Überblick über verschiedene Systeme und deren Mischzeiten liefert Abbildung 6.3

² $K_S^{Glucose} \leq 10 \mu\text{M}$ [110, 111], $K_S^{Glycerol} = 7,4 \mu\text{M}$ [112]

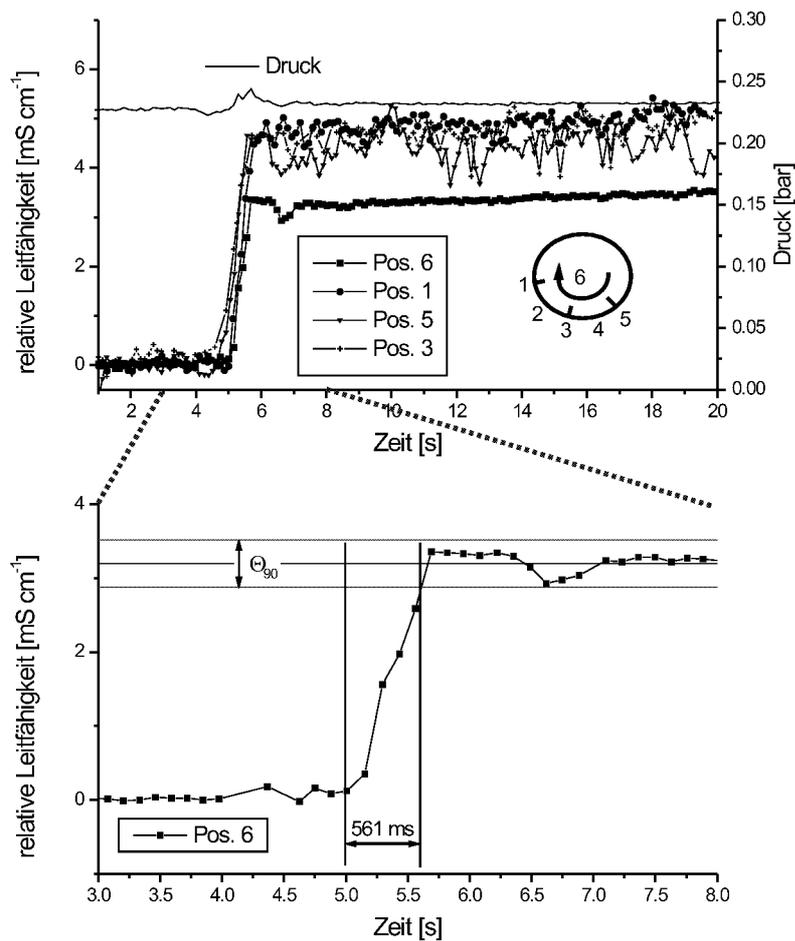


Abbildung 6.2.: Messungen der Mischzeiten an verschiedenen Stellen im Bioreaktor (1,3,5,6); Position 2 und 4 enthalten die Pulsventile, Position 6 befindet sich am Auslaß des Bioreaktors. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Elektroden zur Leitfähigkeitsmessung kommt es zu unterschiedlich hohen Niveaus. Zeitliche Bereichsvergrößerung zur deutlicheren Darstellung der Mischzeit unten.

nachvollzogen werden kann. Da Aufgrund der großen Anzahl an Proben, die im Verlauf eines Pulsexperiments anfallen ein gewisser Zeitraum (ca. 6 h) verstreicht bis alle Proben aufgearbeitet worden sind, sollte in dieser Zeit kein Ausfluß von Metaboliten aus der Zelle in den methanolischen Überstand stattfinden.

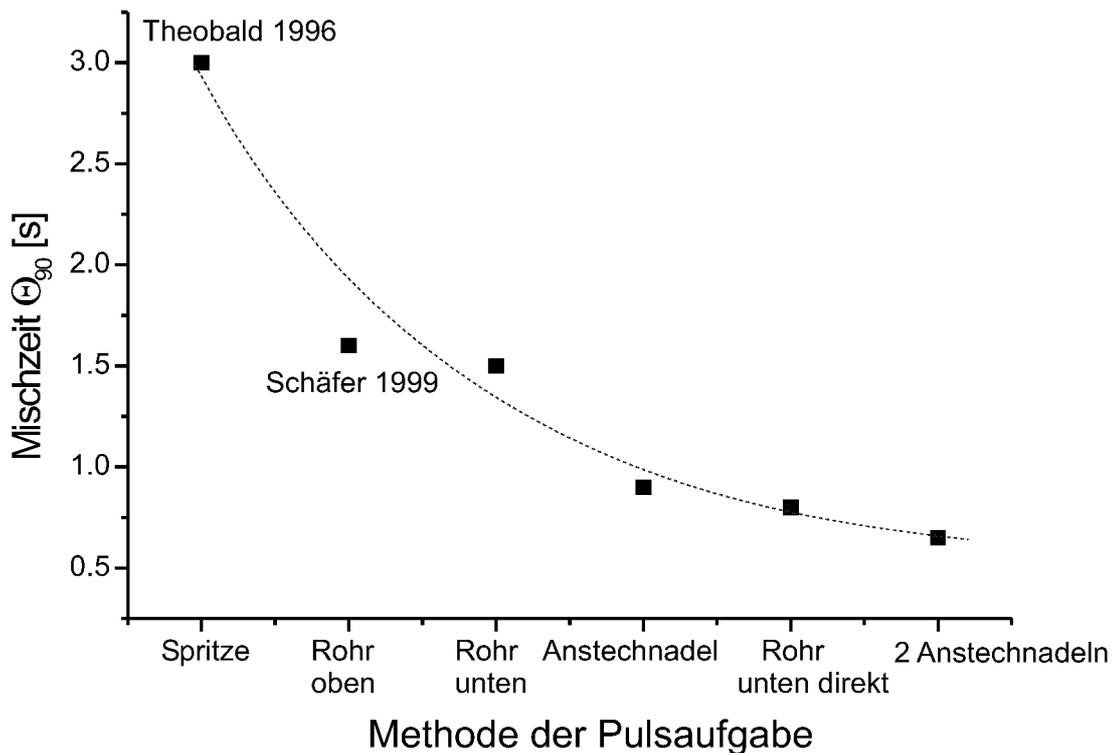


Abbildung 6.3.: Entwicklung und Mischzeiten verschiedener Systeme zur Aufgabe von Substratpulsen (Theobald 1996 siehe [113], Schäfer 1999 siehe [22], restliche Datenpunkte diese Arbeit)

6.2.1. Desaktivierung

Eine rasche Desaktivierung des Stoffwechsels ist zwingend notwendig, da die meisten intrazellulären Metabolite Halbwertszeiten (turnover) im Bereich $\leq 1,0$ s besitzen [114, 115, 21]. Da die Geschwindigkeit von Reaktionen exponentiell von der Temperatur abhängig ist³, verlangsamt die Erniedrigung der Temperatur um 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit um ca. den Faktor zwei. Um den augenblicklichen Stoffwechselzustand "einzufrieren" ist daher eine schnelle Abkühlung der Probe auf -20°C erforderlich. Bei dieser Temperatur findet keine Stoffwechselaktivität mehr statt. Die Zeit welche zur Stoffwechseldesaktivierung benötigt wird kann so (siehe Seite 137) auf ca. 50 ms abgeschätzt werden.

6.2.2. Zellyse

Während der Stoffwechseldesaktivierung sollte die Integrität der Zellen erhalten bleiben. Zur Überprüfung dieses Tatbestandes wurden sowohl im Fermentationsüberstand als auch im Quenchingüberstand Proteinkonzentrationen gemes-

³Arrhenius'sche Gleichung: $k = Ae^{-E_A/RT}$

sen. Da die Zellwand Moleküle mit einer Masse > 600 Da zurückhält [53], sollten sämtliche Zellproteine ($\gg 600$ Da) von einer intakten Zellmembran zurückgehalten werden und während des MeOH-Quenching-Verfahrens in der Zelle bleiben. Die Menge an freiem Protein im Quenching-Überstand abzüglich der bereits im Fermentationsüberstand vorhandenen Menge Protein stellt daher ein Maß für die Zellyse während des Quenching-Vorgangs dar. Unter Annahme eines durchschnittlichen Proteingehaltes von 55% [27] kann nun die BTM der lysierten Zellen berechnet und mit der im Chemostat vorherrschenden BTM verglichen werden. Die Untersuchungen ergaben, daß es beim MeOH-Quenching-Verfahren mit *E. coli* zu einer Zellyse im Größenbereich von ca. 5 % kommt [116]. Fernerhin konnte festgestellt werden, daß die Proteinwerte in den methanolischen Überständen über > 400 h innerhalb des Meßfehlers konstant bleiben. Die Zellyse scheint daher nur durch die sprunghafte Temperaturänderung beim Quenching bedingt zu sein.

6.2.3. Permeabilisierung

Zur Untersuchung einer Permeabilisierung der Zellen durch das MeOH-Quenching-Verfahren, d.h. ein Ausfluß von Metaboliten aus der Zelle in den methanolischen Überstand, wird die Konzentration von NAD in den methanolischen Überständen nach Zentrifugation der Zellen bestimmt. In einem Zeitraum von 7 h ist keine Zunahme der NAD-Konzentration zu verzeichnen. Die Zellen von *E. coli* sind offenbar widerstandsfähig in bezug auf eine Permeabilisierung und einen damit verbundenen Ausfluß von Metaboliten durch das MeOH-Quenching-Verfahren.[116]

6.3. Methodische Entwicklung der Extraktionsverfahren

Abbildung 6.4 gibt eine Übersicht über grundsätzlich bestehende Möglichkeiten des Zellaufschlüsse bei Mikroorganismen [117].

Die Wahl der Aufschlußmethode ist stark eingeschränkt durch die zu untersuchenden zellinternen Substanzen. Zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken muß das Aufschlußverfahren folgenden Ansprüchen genügen:

1. schneller und quantitativer Aufschluß aller Zellen einer Probe
2. die Deaktivierung des Stoffwechsels muß während des gesamten Aufschlußverfahrens gewährleistet sein
3. die zu bestimmenden Metabolite müssen unter den Aufschlußbedingungen stabil sein
4. Proteine (Enzyme) müssen freigesetzt und denaturiert werden, um eine weitere Umsetzung der Stoffwechselmetabolite in den Zellextrakten zu verhindern

5. Kompatibilität der Aufschlußreagenzien mit anschließenden analytischen Methoden
6. bedingt durch die große Probenanzahl und der Anforderung, daß die Proben nach der Desaktivierung des Stoffwechsels (siehe Abschnitt 6.2) direkt aufgeschlossen werden müssen, sollte der Zellaufschluß innerhalb eines vertretbarem Zeitraums durchführbar sein

Aufgrund der Erwärmung der Proben und der dadurch herabgesetzten Stabilität der Metabolite sowie durch den hohen Zeitbedarf, sind mechanische Methoden nicht geeignet. Der Aufschluß über Gefriertrocknung ist wegen des hohen Zeitbedarfs bei großer Probenmenge ungeeignet. Physikalische und enzymatische Aufschlußmethoden entfallen aufgrund der geforderten Quantität des Aufschlusses und der geforderten Denaturierung der Proteine. Ideal in dieser Hinsicht wäre folglich ein chemischer Aufschluß welcher zeitgleich eine Denaturierung der Proteine gestattet.

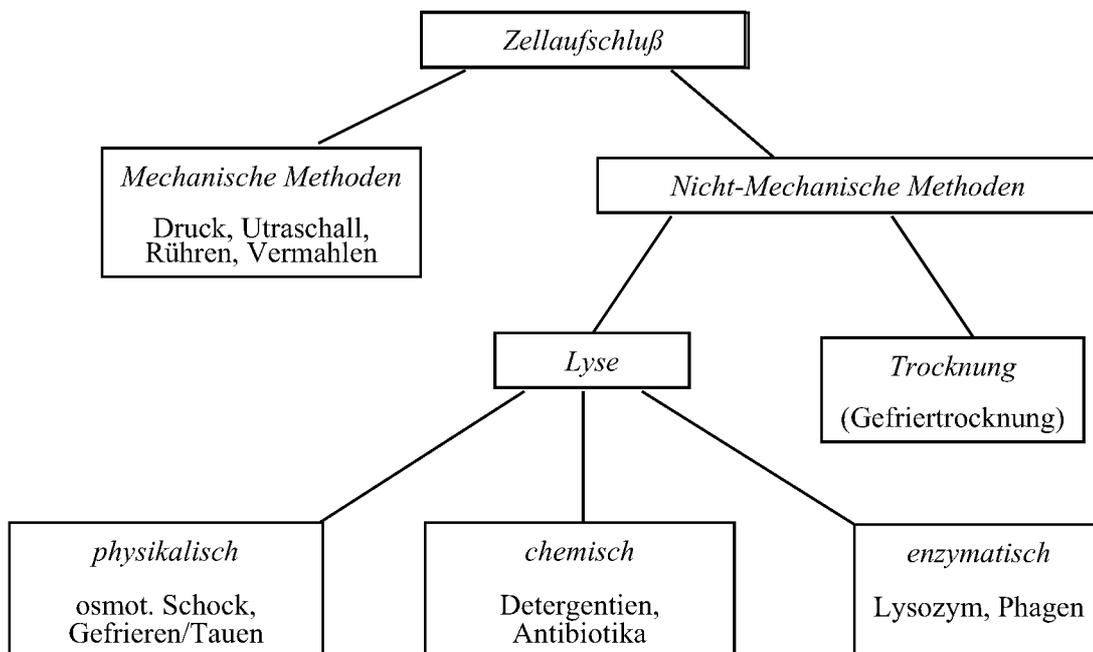


Abbildung 6.4.: Übersicht von Verfahren des Zellaufschlusses [117]

6.3.1. Wahl des Extraktionsverfahrens

Viele der zu bestimmende Metabolite liegen innerhalb der Zellen und/oder an bestimmte Zellstrukturen gebunden vor. Um die zu untersuchenden Stoffe freizusetzen sind das Abstoppen der Stoffwechselaktivität sowie die Zerstörung der intakten Zellstruktur zwei der wichtigsten Voraussetzungen.

Hieraus resultiert die Zielsetzung einer möglichst schnellen Probenentnahme aus dem Reaktor, raschen Desaktivierung des Stoffwechsels sowie eines effektiven Zellaufschlusses. Die schnelle Probenentnahme aus dem Reaktor mit gleichzeitigem Stoppen des Stoffwechsels der Zellen wurde in Form der automatisierten Probenahme verwirklicht [22].

Eine kritische Bewertung der einschlägigen Literatur bezüglich des Zellaufschlusses zeigt, daß für die vorliegende Arbeit der Einsatz eines chemischen Aufschlußprozesses am geeignetsten erscheint. Daher wurde auf Perchlorsäure zurückgegriffen, die eine starke oxidierende Wirkung hat und sowohl die Zellwand zerstört als auch Proteine freisetzt und denaturiert. Da zahlreiche Autoren unterschiedliche Konzentrationen von Perchlorsäure einsetzen und auf die erhöhte Fehlermöglichkeit durch unzureichende Extraktion hinweisen, wurde in Vorversuchen die Konzentration des Extraktionsmittels variiert (siehe [85, 116]). Als Indikatormetabolite dienten die Nucleotide, deren Halbwertszeit (turnover) in der Zelle im Bereich von einer Sekunde liegt [115, 21]. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 4.2.4.3 beschrieben mit -18°C kalter Perchlorsäure als Extraktionsmittel sowie einem Gefrier-Tau-Cyclus, der für eine vollständige Zerstörung der Zellstrukturen notwendig ist. Im Gefrier-Tau-Cyclus bewirkt ein Wechsel zwischen Auftauen (maximal 0°C) und Einfrieren (-80°C) einen effektiveren Zellaufschluß durch Eiskristallbildung.

Als Standardmethode wurde in dieser Arbeit der Zellaufschluß mittels Perchlorsäure verwendet (siehe Abschnitt 6.3.2). Diese zerstört die Zellwand schnell und effektiv, setzt die Proteine frei und denaturiert sie. Im folgenden sind ebenfalls mehrere alternative Aufschlußmethoden beschrieben, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Die komplette Methodenentwicklung und Optimierung der Aufschlußverfahren fand mit Zelldichten statt, welche auch in den dynamischen Pulsexperimenten zu erwarten waren ($10\text{-}15\text{ g l}^{-1}$).

6.3.2. Perchlorsäure

Die Extraktion intrazellulärer Metabolite mittels Perchlorsäure ist in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben [21, 118, 119, 30], wobei die jeweiligen Reaktionsbedingungen jedoch z.T. stark abweichen. Untersuchungen zur Extraktionsleistung von Perchlorsäure bei Variation der Konzentration ergaben ein Optimum für 35% ige (w/v) Perchlorsäure [85].

Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Perchlorsäureverfahrens zeigten, daß diese Extraktionsmethode mit einer Streuung in der Größe von ca. 12 % relativer Standardabweichung behaftet ist. Es konnte gezeigt werden [116], daß diese starke Streuung durch eine nicht einheitliche Homogenisierung des Zellpellets im Aufschlußreagenz zustande kommt. Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, werden die Zellpellets vor Zugabe des Aufschlußreagenz in $500\text{ }\mu\text{L}$ wäßriger 60% iger 70 mM HEPES enthaltender Methanollösung resuspendiert. Durch diesen Re-

suspendierungsschritt konnte der Standardfehler für Reproduktionsmessung auf 6,1 % gesenkt werden [116]. Bedingt durch die bei der Resuspension auftretende Verdünnung muß die Konzentration der Perchlorsäure auf 43,8% (w/v) erhöht werden.

Ein Nachteil der Perchlorsäuremethode ist die Instabilität der reduzierten Nucleotide NADH und NADPH während des Aufschlußverfahrens. Diese Substanzen zerfallen in nicht identifizierbare Bruchstücke. Aufgrund der hohen Relevanz für den Stoffwechsel ist daher nach alternativen Methoden gesucht worden, welche eine Analytik dieser Substanzen zulassen (siehe Abschnitt 6.3.3).

6.3.2.1. Aufschlußbedingungen

Die Aufschlußbedingungen befinden sich in Abschnitt 4.2.4.3 auf Seite 31.

6.3.3. Alkalisches Ethanol (KOH/EtOH)

Nach Untersuchungen mit *Thermoanaerobacter finii* [120] ist der quantitative Nachweis der reduzierten Nicotinamid-Adenin-Dinukleotide über eine Extraktion mit ethanolischen KOH möglich. Bei saurer Extraktion mit Perchlorsäure bleibt NAD(P) stabil, während NAD(P)H vollständig zerstört wird [121, 122]; bei alkalischer Extraktion hingegen bleibt NAD(P)H stabil während NAD(P) vollständig zerstört wird [123]. Der Aufschluß mittels alkalischem Ethanol (KOH/EtOH) bietet daher eine Alternative zum Perchlorsäureaufschluß, da sich die reduzierten Nucleotide NAD(P)H, welche im sauren Milieu des Perchlorsäureaufschluß zerfallen, extrahieren und nachweisen lassen. Aufgrund der hohen Instabilität der reduzierten Nucleotide NAD(P)H (auch im basischen) erfolgt im Anschluß and den Zellaufschluß eine sofortige enzymatische Oxidation zu den sehr viel stabileren Nucleotiden NAD(P) mittels Glutamat Dehydrogenase.

Der Standardfehler für Reproduktionsmessung von FBP, GTP, GDP, ATP, ADP, AMP, NAD und NADP über LC-MS liegt bei 14,9 %.

Nachteilig bei diesem Verfahren ist die Tatsache, daß es bisher keine Möglichkeit des Vergleichs mit dem Perchlorsäureaufschluß bezüglich Effektivität gibt, daher ist eine direkte Bestimmung des Verhältnis NAD:NADH, bzw. NADP:NADPH bisher nicht möglich. Fernerhin gibt es noch keine Untersuchungen bezüglich der Stabilität anderer Metabolite bei Verwendung dieser Methode, d.h. momentan kann diese Methode ausschließlich für die Quantifizierung von den oben genannten Verbindungen verwendet werden, und auch das nur mit einem sehr hohen Fehler.

6.3.3.1. Aufschlußbedingungen

Nach der Probenahme, Entfernung des Quenching-Überstandes und Resuspension des Zellpellets (siehe Abschnitt 4.2.4.3) werden 2 ml alkalisches Ethanol (0,3 M KOH, 25% v/v EtOH, pH 12.55) zugegeben und mit einem Vortex-Schüttelgerät

homogenisiert. Nach einer Einwirkzeit von 5 min bei 0°C wird mit 30 μ l Eisessig (97%) neutralisiert. Es wird für 5 min bei 4°C und 42.000 g zentrifugiert. Es verbleiben 2,5 ml Zellextrakt, welche enzymatisch oxidiert werden. Hierzu werden 6,25 μ l 1 M 2-Oxoglutarat Lösung und 1,25 μ l Glutamatdehydrogenase (ca. 3000 U l⁻¹) hinzugefügt und 15 min bei 25°C inkubiert. Durch die Inkubation bei 75°C für weitere 10 min wird die Glutamatdehydrogenase denaturiert. Es wird erneut abzentrifugiert, das Zellextrakt aliquotiert und bis zur Analyse bei -28°C gelagert.

6.3.4. Ethanol/HEPES

Nach Untersuchungen an Hefezellen [124] ist der Nachweis von NAD(P)H anschließend an eine Extraktion mit heißem, gepuffertem Ethanol möglich. Bei dieser Aufschlußmethode verwendet man eine 75% [v/v] EtOH 25% 0,25 M HEPES-Lösung bei einer Temperatur von 80°C zum Aufschließen der Zellen. Bei Vorversuchen mit dieser Methode stellte sich jedoch heraus, daß die hohen Ethanol-Konzentrationen eine direkte enzymatische Detektion der Metabolite in den Zellextrakten nicht gestattet. Fernerhin ist bei Verwendung eines heißen, flüchtigen Aufschlußreagenzes die Zugabe eines exakten Volumens, bzw. einer exakten Konzentration, erschwert [125]. Die Untersuchungen zum Ethanol/HEPES Aufschluß wurden daher nicht fortgeführt.[85]

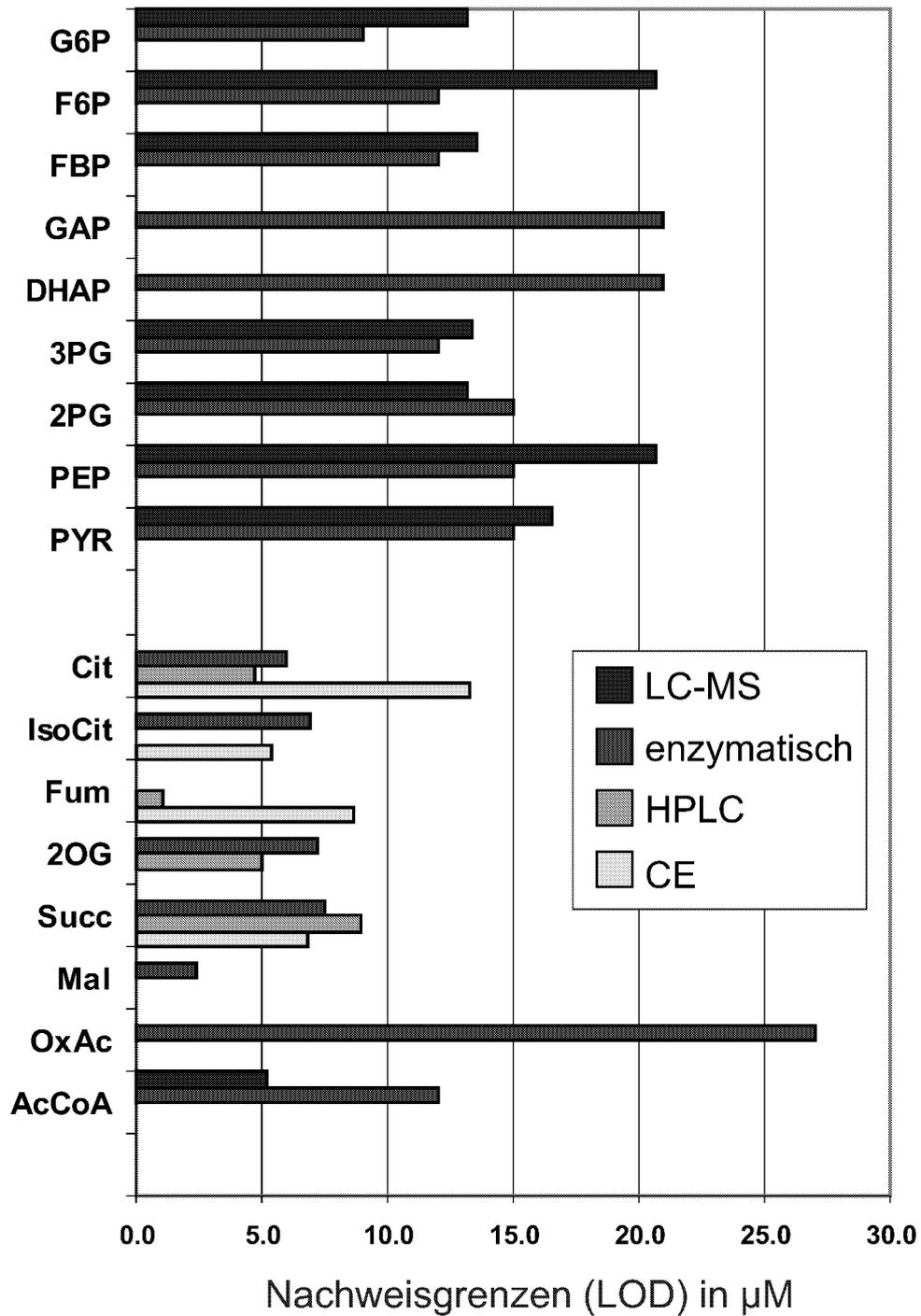
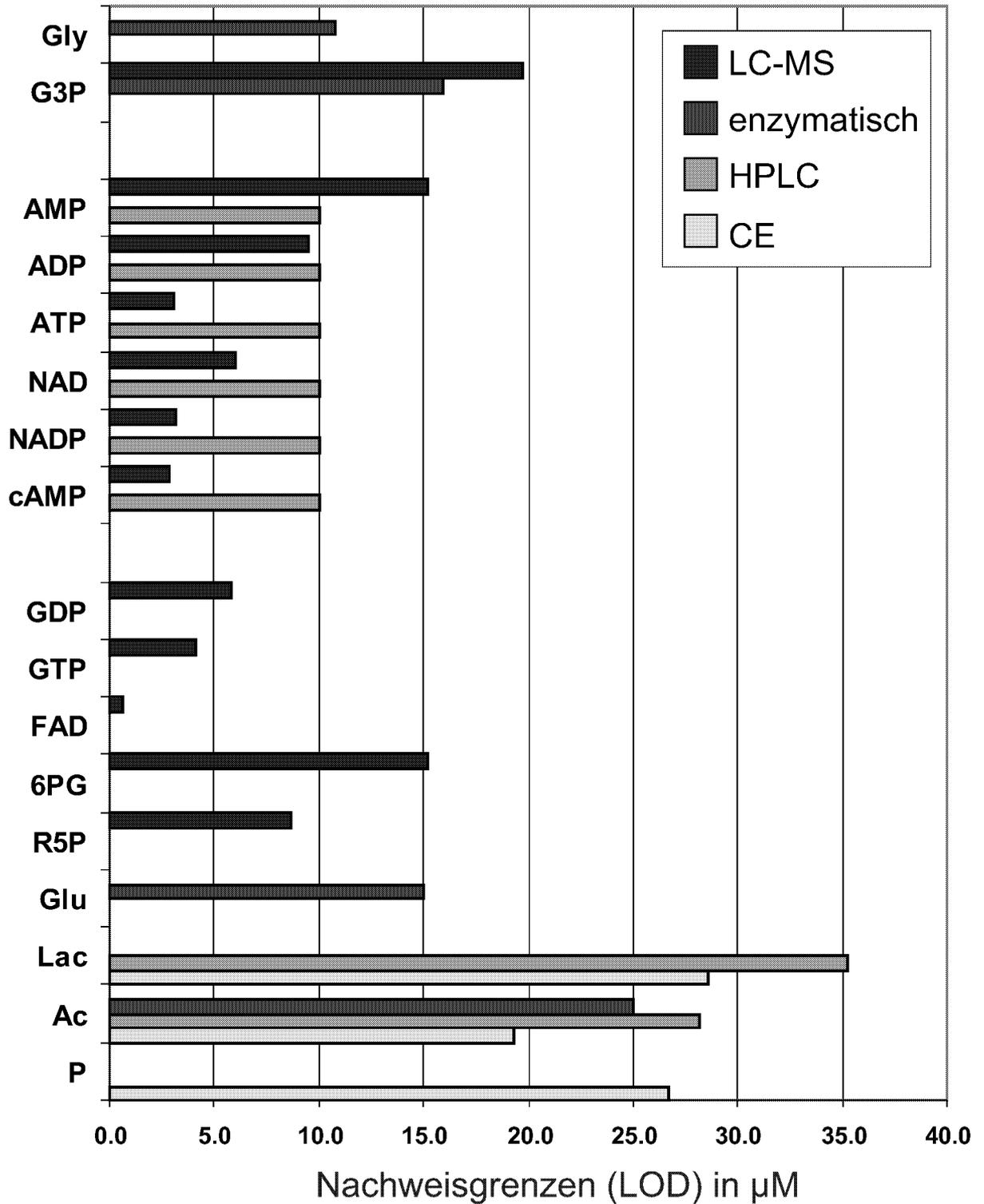


Abbildung 6.5.: Nachweisgrenzen [μM] unterschiedlicher Analysenmethoden im Vergleich (LC-MS, Enzymassay, HPLC und CE)

6.3. Methodische Entwicklung der Extraktionsverfahren



6.3.5. Zellaufschluß für Proteine

Für die Quantifizierung von Glycolyseenzymen über die 2D-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 8.2) wurden unterschiedliche Zellaufschlußmethoden getestet (Details in [126]). Ein Maximum an detektierter Proteinkonzentration und Reproduzierbarkeit (< 4,7%) wurde bei Verwendung einer Kugelmühle gefunden.

6.3.5.1. Bedingungen

10 ml Zellsuspension werden abzentrifugiert (30 min, 3000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet dreimal mit Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen. Als Proteaseinhibitor wird 1 mM PMSF zugesetzt, um den Abbau der Proteine durch zelleigene Proteasen zu verhindern. Außerdem werden zur weiteren Probenaufarbeitung 0,025 mg ml⁻¹ DNase I, 0,1 mg ml⁻¹ RNase A und 5 mM MgCl₂ zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgt in einer Kugelmühle (MM2, Retsch GmbH, D) für 10 min bei höchster Geschwindigkeit. Hierzu werden je 1,2 g Glaskugeln (0,25-0,5 mm Durchmesser) in Eppendorffreaktionsgefäße abgewogen und 0,6 ml Zellsuspension hinzugefügt. Sind die Zellen aufgeschlossen, folgt eine Zentrifugation für 5 min, 14.000 rpm bei 25°C. Die löslichen Proteine befinden sich im Überstand, werden abgenommen und zur Trennung von den ebenfalls im Überstand vorhandenen Membranen und Zellwänden 90 min bei 50.000 rpm, 4°C in einer Ultrazentrifuge (L7-55, Beckmann Instruments GmbH, München, D) zentrifugiert. In dem so erhaltenen Überstand wird der Proteingehalt bestimmt (siehe Abschnitt 5.6) und eine Acetonfällung (9 Teile Aceton/1 Teil Überstand, v/v, -20°C, über Nacht) zur Entfernung von Salzen und zur Konzentration der Proteine wird angeschlossen.[126]

6.3.6. Stabilitätsuntersuchungen und Nachweisgrenzen

Da ein Großteil der Metabolite sowohl in Säuren als auch in Laugen instabil und temperaturempfindlich sind, wurde die Stabilität jedes einzelnen zu bestimmenden Metaboliten während der Probenvorbereitung untersucht. Diese Versuche ergaben, daß die in dieser Arbeit zu untersuchenden Metabolite während der gesamten Probenvorbereitung stabil sind, wenn eine Temperatur von 4°C nicht überschritten wird. Die untersuchten Metabolite der Glycolyse, des Citratcyclus, des Pentosephosphate Wegs und der Nucleotide sind im Rahmen der Fehler säurestabil.[87]

Die untere Nachweisgrenze (LOD, engl.: limit of detection) der einzelnen Metabolite wird als dreifacher Wert des Standardfehlers der linearen Regression für Konzentrationen im Bereich 0,005-1,5 mM definiert. Dieser Wert entspricht 99,7 % der Meßwahrscheinlichkeit einer Gaußverteilung. Für Enzymassays, UV-HPLC und Capillarelektrophorese wird die Nachweisgrenze wie oben beschrieben aus Standardreihen [127, 128] berechnet. Im Falle der LC-MS wird abweichend hiervon zusätzlich die zelluläre Matrix berücksichtigt [129], da diese einen starken

Einfluß auf die Ionisation und somit auch die Detektion von Analyten besitzt. Grundsätzlich wird für die LC-MS sowohl für die Quantifizierung als auch die Bestimmung der unteren Nachweisgrenzen das Verfahren der Standardaddition [130] verwendet.

In Abbildung 6.5 ist ein Vergleich der Nachweisgrenzen der bestehenden Analysenmethoden aufgelistet.

6.3.6.1. Standardadditions-Methode

Die Standardadditionsmethode erlaubt die Kalibrierung eines Analysenverfahrens unter Verwendung der zu analysierenden Probe. Sie eignet sich besonders, wenn sich Unterschiede in der Zusammensetzung der Matrix auf die Richtigkeit der Ergebnisse stark auswirken und keine matrixangepaßten Kalibrierproben verfügbar sind. Durch lineare Regression aus den Zusätzen des Analyten und den zugehörigen Meßsignalen ergibt sich eine Schätzung der Kalibrierfunktion $y = a + b \cdot x$. Der gesuchte Gehalt x_A läßt sich aus dem Ordinatenabschnitt a und der Steigung b der Kalibrierfunktion berechnen.[131, 132]

6.4. Entwicklung der Analysemethoden

6.4.1. Capillarelektrophorese

Die Capillarelektrophorese (CE) hat sich zunehmend als analytische Methode etabliert. Sie benötigt lediglich ein Probenvolumen im Nanoliter-Bereich und funktioniert nach einem anderen physikalischen Trennprinzip als die HPLC. Während bei der HPLC die Wechselwirkungen der Analyte mit dem Säulenmaterial die Trennung verursachen, basiert die CE-Trennung auf Unterschieden der elektrophoretischen Mobilität von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld (vgl. Abschnitt 5.2). Da die Trennung bei diesen Methoden auf unterschiedlichen Eigenschaften der Analyte beruht, ergänzen sich beide Methoden hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit. Mit Metaboliten des Citratcyclus als Ziel-Analyte wurde das Potential der CE als analytisches Werkzeug bei der Quantifizierung dieser Substanzen in Zellextrakten und Fermentationsüberstandsproben untersucht. Ausgehend von einer literaturbeschriebenen Methode [133] zur Untersuchung von organischen Säuren in Bier, Weinen und Fruchtsäften mittels indirekter UV-Detektion wurde eine Methodenentwicklung durchgeführt [116]. Die Methode mit direkter UV-Detektion wurde aus einem einfachen Phosphatpuffer heraus entwickelt. Im Laufe der Methodenentwicklung für beide Detektionsmethoden wurden verschiedene oberflächenaktive Substanzen und pH-Werte getestet (siehe auch [116]).

6.4.1.1. Indirekte UV-Absorption

Die Methode der indirekten UV-Absorption⁴ eignet sich für die Auftrennung und Quantifizierung der in Tabelle 6.1 genannten Verbindungen. Proben werden für 5 min bei $13\,000\text{ U min}^{-1}$ (Biofuge pico, Heraeus, D) abzentrifugiert um Schwebstoffe zu entfernen. Alle Messungen werden in einem P/ACE MDQ Capillarelektrophoresegerät (Beckmann, D) durchgeführt. Als Meß- und Spülpuffer wird eine wäßrige 5 mM 2,6-Pyridincarbonsäure (PDC), 0,5 mM Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Lösung, pH = 5,6 verwendet (Organic Acids Buffer, Hewlett Packard, D). Der Meßpuffer wird für maximal 5 Messung verwendet und anschließend durch frische Lösung ersetzt. Die fused silica Capillare (Supelco, D) besitzt einen Innendurchmesser von $75\ \mu\text{m}$, eine Gesamtlänge von 114 cm und eine effektive Länge bis zum Detektor von 100 cm. Durch hydrodynamische Injektion mit 28 mbar für 4 s wird ein Probenvolumen von ca. 8 nl aufgegeben. Eine weitere hydrodynamische Injektion aus dem Spülpuffergefäß mit 28 mbar für 8 s verbessert die Reproduzierbarkeit. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung

⁴Bei der indirekten UV-Detektion wird im Meßpuffer ein stark aktives UV-Chromophor vorgelegt, welches im Detektor eine starke Absorption verursacht. Passiert nun ein gering oder nicht UV-aktiver Analyt den Detektor, so verdrängen seine Moleküle die des UV-Chromophors. Die UV-Absorption wird geringer und ein negativer Peak wird aufgezeichnet. Die indirekte Detektion ist vor allem wegen ihrer höheren Empfindlichkeit gegenüber gering UV-aktiven Analyten geeignet.

von 27 kV (elektrische Feldstärke $236,8 \text{ V cm}^{-1}$) und einer Kapillartemperatur von 20°C . Die Detektion erfolgt mittels eines Dioden-Array-Detektors bei 350 nm (Bandbreite 20 nm) und einer Referenz bei 200 nm (Bandbreite 20 nm). Vor jeder Messung wird die Capillare bei 1,4 bar für 10 min mit 0,2 M Natriumhydroxidlösung, bidestilliertem Wasser und Meßpuffer gespült und anschließend bei 1,4 bar für 5 min mit Meßpuffer konditioniert. Ein exemplarisches Elektropherogramm befindet sich in auf Seite 168.

6.4.1.2. Direkte UV-Absorption

Die Methode der direkten UV-Absorption eignet sich v.a. für die Detektion der organischen Säuren Fumarat und Shikimat sowie der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. Proben werden für 5 min bei $13\,000 \text{ U min}^{-1}$ (Biofuge pico, Heraeus, D) abzentrifugiert um Schwebstoffe zu entfernen. Als Meß- und Spülpuffer wird eine wäßrige 20 mM ortho-Phosphat, 0,5 mM Tetradecyltrimethylammoniumbromid (TTAB) Lösung bei $\text{pH} = 6$ verwendet. Die fused silica Capillare (Supelco, D) besitzt einen Innendurchmesser von $75 \mu\text{m}$, eine Gesamtlänge von 60 cm und eine effektive Länge bis zum Detektor von 46 cm. Durch hydrodynamische Injektion mit 28 mbar für 6 s wird ein Probenvolumen von ca. 22 nl aufgegeben. Eine weitere hydrodynamische Injektion aus dem Spülpuffergefäß mit 28 mbar für 8 s erhöht die Reproduzierbarkeit. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 20 kV (elektrische Feldstärke $333,3 \text{ V cm}^{-1}$) und einer Kapillartemperatur von 20°C . Die Detektion erfolgt mittels eines Dioden-Array-Detektors bei 215, 252 und 271 nm. Vor jeder Messung wird die Capillare bei 1,4 bar für 10 min mit 0,2 M Natriumhydroxidlösung, bidestilliertem Wasser und Meßpuffer gespült und anschließend bei 1,4 bar für 5 min mit Meßpuffer konditioniert.

6.4.1.3. Anwendungsbereiche

Beide CE-Methoden eignen sich für die Identifizierung und Quantifizierung von organischen Säuren in Fermentationsüberständen und konnten mit der bereits etablierten HPLC-Analytik (direkte UV-Detektion) verglichen werden.

Aufgrund der hohen Salzkonzentration und komplizierten Probenmatrix sind CE-Methoden für eine Quantifizierung von Analyten in Zellextrakten bei Verwendung eines Perchlorsäureaufschlusses nicht geeignet.

Die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Methode mit indirekter Detektion wurden mit einer $100 \mu\text{M}$ Standardlösung mit 8 verschiedenen organischen Säuren und ortho-Phosphat durchgeführt. Die mittlere relative Standardabweichung der korrigierten Peakflächen A_c ⁵ liegt bei 6,18 % (Details siehe Tabelle

⁵Zur Quantifizierung wird bei der CE nicht mit den Peakflächen, sondern mit dem Quotienten aus Peakfläche und Migrationszeit gerechnet. Da die Analyte wegen ihrer unterschiedlichen Mobilität den Detektor mit verschiedenen Geschwindigkeiten passieren, werden sie mit ab-

6.1).

Lineare Regressionsplots für die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden mit 11 Standardkonzentrationen zwischen 5 und 200 μM durchgeführt.

Substanz	t_R [min]	A_c [AU]
Fumarat	9,89 \pm 0,06 %	208 \pm 5,93 %
Malat + 2-Oxoglutarat ^a	10,47 \pm 0,06 %	1641 \pm 3,82 %
Citrat ^b	10,68 \pm 0,06 %	416 \pm 11,57 %
Iso-Citrat	10,76 \pm 0,06 %	1180 \pm 3,36 %
Succinat	11,32 \pm 0,06 %	784 \pm 3,84 %
Acetat	12,51 \pm 0,06 %	413 \pm 5,46 %
Lactat	12,80 \pm 0,03 %	608 \pm 7,98 %
ortho-Phosphat	13,22 \pm 0,04 %	430 \pm 7,47 %

^a nicht trennbar, Auswertung erfolgte zusammen

^b nur angetrennt, daher hohe Standardabweichung

Tabelle 6.1.: Reproduzierbarkeit (N=6) der Migrationszeit t_R und der korrigierten Peakfläche A_c

Der direkte Vergleich zwischen CE- und HPLC-Methode liefert für alle Analyten Korrelationskoeffizienten $\geq 0,98$.

Obwohl die CE-Messung mit einer sehr viel geringeren Probenmenge arbeitet (ca. Faktor 10^3), zeigt sie mit der HPLC-Messung vergleichbare Nachweisgrenzen (siehe Tabelle 6.2).

Der Vorteil der (direkten UV) HPLC- Methode liegt bei stark UV-aktiven Substanzen wie Fumarat, welches mit Abstand die stärkste Absorption der untersuchten organischen Säuren hat. Bei Substanzen mit deutlich geringerer UV-Aktivität ist die (indirekte UV) CE-Methode von Vorteil, da die UV-Aktivität des vorgelegten UV-Chromophors im Verhältnis zu den Analyten sehr groß ist.

6.4.1.4. CE-Methodenoptimierung mittels genetischer Algorithmen

Ein Beispiel für die Verwendung von genetischen Algorithmen zur Methodenoptimierung in der Capillarelektrophorese befindet sich im Anhang auf Seite 147.

Obwohl die CE-Methoden unter Verwendung der Standardzellaufschlußmethode zur Zeit noch keine Quantifizierung intrazellulärer Metabolite gestatten, so ermöglichen sie doch die Identifizierung und Quantifizierung extrazellulärer Metabolite in Fermentationsüberständen. Vor allem als Erweiterung der bereits

weichenden Flächen unter dem Peak detektiert. Analyte mit kurzer Migrationszeit passieren den Detektor schneller und werden mit kleineren Peakflächen erfaßt als Analyte mit langen Migrationszeiten, die eine längere Verweilzeit im Detektor haben und dadurch bei gleicher Empfindlichkeit mit größeren Peakflächen detektiert werden. Die gemessene Peakfläche wird daher mit der Migrationszeit normiert.

Substanz	Nachweisgrenzen	
	CE [μM]	HPLC [μM]
Fumarat	8,7	1,1
Citrat	13,3	4,7
Iso-Citrat	5,4	-
Succinat	6,8	8,9
Acetat	19,3	28,2
Lactat	28,6	35,2
Phosphat	26,7	-
2-Oxoglutarat	-	5,0
Shikimat ^a	-	-
Phenylalanin ^a	-	-
Tyrosin ^a	-	-

^a direkte Detektion, Quantifizierung nicht durchgeführt

Tabelle 6.2.: Vergleich zwischen CE und HPLC

etablierten HPLC-Methode liefert die CE-Methode wertvolle Information, z.B. im Bereich der eindeutigen Peakidentifizierung, der Trennung von Citrat und Isocitrat sowie der Bestimmung von ortho-Phosphat. Mit der Entwicklung alternativer Zellaufschlußmethoden werden CE-Methoden vor allem aufgrund der extrem geringen Probemengen (Nanoliter-Bereich) zunehmend zum Einsatz in der intrazellulären Analytik kommen.

6.4.2. HPLC-Bestimmung für Nucleotide

Die Trennung und Quantifizierung der Nucleotide wird über eine reversed-phase HPLC-Methode erreicht. Als Trennsäule wird eine C₁₈-Säule (Lichrospher 100 RP 18 EC-5, 125 x 4,6 mm) verwendet, die Detektion erfolgt über einen Diodenarraydetektor (DAD). Das Injektionsvolumen beträgt 20,0 μl , so daß bei einem geringen Probenvolumen eine große Anzahl an Nucleotiden analysiert werden kann. Zwecks optimaler Trennung sind diverse Versuche bezüglich des Gradientenprogramms, Temperatur, Einspritzvolumen, Vorsäule und Flow durchgeführt worden. Aufgrund der hohen Salzkonzentration (Phosphatpuffer) und der Anwesenheit eines Ionenpaarreagenzes (tert-butyl-Ammoniumsulfat, TBA) sowie der langen Gradientenläufe (70 min) eignet sich dieses System jedoch nicht für eine Ankopplung an eine LC-MS Analytik. Ein exemplarisches Chromatogramm befindet sich auf Seite 169.

6.4.3. HPLC-Bestimmung für Pentosezucker

Nach Abtrennung der Phosphatgruppe über eine alkalische Phosphatase können die Pentosphosphate als Pentosen mittels HPLC bestimmt werden. Die unteren Nachweisgrenzen von D-Ribose, D-Ribulose, D-Erythrose, D-Gluconat, D-Glucono- δ -lacton und D-Xylulose wurden über Standardreihen mit den Reinsubstanzen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.3 zusammengestellt.

Metabolit	RT [min]	Nachweisgrenze [mM]	Nachweisgrenze intrazellulär [mM]
D-Erythrose	11,51	2,20	60,0
D-Ribose	10,76	1,62	44,2
D-Ribulose	10,69	0,90	24,5
D-Xylulose	10,06	1,15	31,3
D-Gluconat	8,94	0,89	24,3
D-Glucono- δ -lacton	8,94	0,79	21,5

Tabelle 6.3.: Retentionszeiten und Nachweisgrenzen der Metabolite des Pentosephosphatweges. Die intrazelluläre Nachweisgrenze wurde für die bei Pulsversuchen üblichen Zelldichten ($10,7 \text{ g l}^{-1}$) berechnet.

Wie aus Tabelle 6.3 ersichtlich wird, sind außer Gluconat und Glucono- δ -lacton alle untersuchten Metabolite trenn- und detektierbar. Die geschätzten intrazellulären Nachweisgrenzen beziehen sich auf die Verdünnung des intrazellulären Gesamtvolumens durch Aufschluß der Biomasse und Neutralisation bei einem Pulsversuch. In Proben aus Schüttelkolben und Pulsversuchen konnten die Metabolite des Pentosephosphat-Weges über die beschriebene HPLC-Methode nicht nachgewiesen werden. Auch über eine Aufkonzentrierung von Zellextrakten konnten diese Metabolite nicht nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen dieser Methode sind für eine Quantifizierung intrazellulärer Pentosephosphat-Konzentrationen zu hoch.[85]

6.4.4. LC-MSⁿ Optimierung

Das in Abschnitt 5.1 beschriebene LC-MS Gerät der Firma Finnigan/Thermoquest wurde samt Peripherie (u.a. Vakuum- und Stickstoffversorgung) installiert. Die ersten Arbeiten an dem Gerät bezogen sich zum Großteil auf eine Analyse der zahlreichen Geräteparameter. Das Hauptinteresse lag hierbei in einer qualitativen Erfassung von Parametereinflüssen, Spezifität und Nachweismöglichkeiten der LC-MS Kopplung (einen Überblick liefert Tabelle 6.4).

Im folgenden wurde gezielt an einer Steigerung der Empfindlichkeit, und somit niedrigeren Nachweisgrenzen, gearbeitet. Diese Maßnahmen lassen sich grob den Teilbereichen HPLC (Flüssigchromatographie) und MS (Massenspektrometrie) zuteilen. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die zwei Teilsysteme nicht

Parameter	Erklärung	Einfluß
Ionisierung	Elektrospray-Ionisierung	gute Ionisierung = gute Detektion
pos. Ionisierung	Elektronendefizit (Ladung +1, +2, etc.)	bevorzugt für Aminosäuren, Gefahr der Adduktbildung, z.B. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, etc.
neg. Ionisierung	Elektronenüberschuß (Ladung -1, -2, etc.)	bevorzugt für Nucleotide, Zuckerphosphate; meist $[M-H]^-$, leichte Identifizierung
Trennung	je weniger Substanzen zeitgleich in das MS gelangen, desto höher ist die prozentuale Ionisierung	bessere Ionisierung aller Substanzen bei optimaler Trennung
Salzgehalt	Salze konkurrieren um Ionisationspotential, führen zu Adduktbildung	so niedrig wie möglich halten
Spray	Verdampfung	konstantes Spray = konstantes Detektorsignal
sheath gas	verdampft Lösungsmittel zu kleinen Tröpfchen; Ladungsgegensätze der Ionen in Tröpfchen führen zu weiterer Zersetzung, Ionisation	zu niedriger Wert verhindert Ionisation, zu hoher bewirkt starkes Rauschen des Signals (80 [-])
auxiliary gas	unterstützt die Ionisierung durch Verdampfung von Lösungsmittel	bei HPLC-Flüssen $< 1,0 \text{ ml min}^{-1}$ nicht notwendig
sheath flow	zusätzliche MeOH-Dosierung zur Unterstützung der Verdampfung	($25 \mu\text{l min}^{-1}$)
Flow	Eluentenfluß in das MS	bei hohem Flow Probleme mit der Ionisation, bei geringerem mit der Nachweisgrenze ($50 \mu\text{l min}^{-1}$)
Split	nur ein Teil des HPLC-Eluenten geht in das MS, Rest wird verworfen	($460 \mu\text{l min}^{-1}$ Waste; $40 \mu\text{l min}^{-1}$ MS-Detektor)
metal needle	fest installierte Metalnadel gestattet besser reproduzierbare Flüsse bei geringen Flußraten	geringere Empfindlichkeit, bessere Reproduzierbarkeit
MeOH-Gehalt	hohe MeOH-Konzentrationen erleichtern das Verdampfen des Lösungsmittels (schneller, bessere Tröpfchenbildung)	bessere Ionisierung bei hohen MeOH-, bessere HPLC Trennung bei niedrigen MeOH-Konzentrationen

Parameter	Erklärung	Einfluß
Scan	Ionen Injektion, Selektion und Detektion	
scan cycle time	Zeit für einen scan, beeinflußt Datendichte bei HPLC-Peakanalyse	zwischen 1-5 s; größere scan-Bereiche = längere Zeiten = weniger Datenpunkte pro HPLC-Peak
full	gesamter Bereich (z.B. 50-2000) wird eingelesen	verschiedene Bereiche möglich (z.B. 50-815 für Nucleotide), hohe Genauigkeit bei der Detektion einzelner Ionen
SIM	selected ion monitoring; nur eine Masse wird gesamt	Spezifitätsnachweis durch Fragmentierung
SRM	selected reaction monitoring; eine Masse wird fragmentiert und ein Fragment-Ion gesamt	
total microscans (TMS)	Anzahl an microscans, die für einen scan gemittelt werden	hohe TMS besser für konstante Werte, jedoch schlechter für Datendichte (3 TMS)
max. inject time (MIT)	Zeit, welche die Ionenfalle für die Aufnahme von Ionen geöffnet bleibt	hohe MITs besser für Detektion, jedoch schlechter für Datendichte (600 ms)
collision induced dissociation (CID)	Fragmentierung vor Detektion (source-CID)	geringe Werte sinnvoll um Lösungsmittel-Multimere zu verhindern, dadurch bessere Gesamtionisierung (5% CID)

Tabelle 6.4.: Geräteparameter der LC-MS (in Klammern optimierte Werte)

unabhängig von einander optimiert werden können, da Veränderung im Bereich der HPLC sich stark auf die Detektion im MS niederschlagen.

6.4.4.1. HPLC Optimierung

Wie schon erwähnt liegt ein Vorteil der massenspezifischen Detektion in der Auflösung koeluierender (nicht-isobarer) Substanzen. Dies mag den Anschein erwecken, daß eine chromatographische Auftrennung nicht notwendig sei⁶, jedoch ist gerade bei der Analyse biologischer Proben der sog. "Matrix-Effekt" nicht zu unterschätzen.

Die Probenmatrix, d.h. die Begleitkomponenten der zu analysierenden Substanz(en), wirkt sich v.a. bei Elektrospray-Ionisation negativ auf die Ionisierung aus [135]. Zum einen können sehr viele Substanzen gleichzeitig eluieren, was zu einer unvollständigen Ionisierung aller Komponenten ("ion suppression") führt. Zum anderen kann die Probenmatrix unbekannte Substanzen enthalten, welche die selbe Masse wie ein Zielanalyt besitzen. Es wird also deutlich, daß eine adäquate chromatographische Auftrennung der Probenkomponenten vor der massenspezifischen Detektion wünschenswert ist.

6.4.4.1.1. Chromatographische Trennung Da sowohl die Polarität als auch die Struktur der zu analysierenden Substanzen das chromatographische Verhalten beeinflussen, besitzen Cyclodextrin-Phasen (Methode auf Seite 41) diverse Vorteile. Sie gehen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wechselwirkungen ein, bilden größenabhängige sowie enantiospezifische Einlagerungskomplexe aus [136, 137, 138] und können negativ geladene Verbindungen über einen Anion-Austausch-Mechanismus retentieren [139, 140, 141].

Unter Verwendung von zwei in Serie geschalteten β -Cyclodextrin-OH Säulen ist es möglich, eine große Anzahl intrazellulärer Metabolite zu analysieren [129] (siehe Tabelle 6.5). Durch Variation des Methanolgradienten gelang es, den bei Perchlorsäureaufschlüssen oft störenden Perchloratpeak weitgehend von den zu analysierenden Metaboliten abzutrennen (siehe Abbildung 6.6).

Zur gezielten Auftrennung der phosphorylierten Kohlenhydrate wurde eine Methode unter Verwendung einer reinen Kohlenstoff-Phase (Methode auf Seite 41) entwickelt. Im Gegensatz zu reversed phase Systemen nimmt die Retention der Analyten mit steigender Polarität zu. Fernerhin bilden sich sterische Wechselwirkungen mit der Graphitoberfläche aus, so daß auch Substanzen mit sehr ähnlicher räumlicher Struktur noch voneinander getrennt werden können [142, 143]. Durch diese Methode lassen sich glycolytische Intermediate schon über die LC-Phase sehr gut voneinander trennen (siehe Tabelle 6.6, bzw. Abbildung 6.7), eine Analytik der Nucleotide und Cofaktoren ist jedoch bedingt durch die zu starke Retention dieser Substanzen nicht möglich.

⁶Prinzip des "dilute and shoot", siehe hierzu [134]

6.4.4.1.2. Trennung isobarer Metabolite durch LC-Phase Ein Nachteil der massenspektrometrischen Detektion glycolytischer Intermediate liegt in dem Vorhandensein isobarer Metabolitpaare (z.B. DHAP-GAP, G6P-F6P, 3PG-2PG). Obwohl sich einige dieser isobaren Metabolitpaare (DHAP-GAP, siehe Abschnitt 6.4.4.2.2) über einen MS² Schritt und Detektion spezifischer Fragmente "auftrennen" lassen, ist dies in den meisten Fällen nicht möglich. Die logische Konsequenz ist eine Auftrennung der entsprechenden isobaren Paare über ihre chemischen und sterischen Eigenschaften im LC-Bereich, d.h. über Wechselwirkungen mit

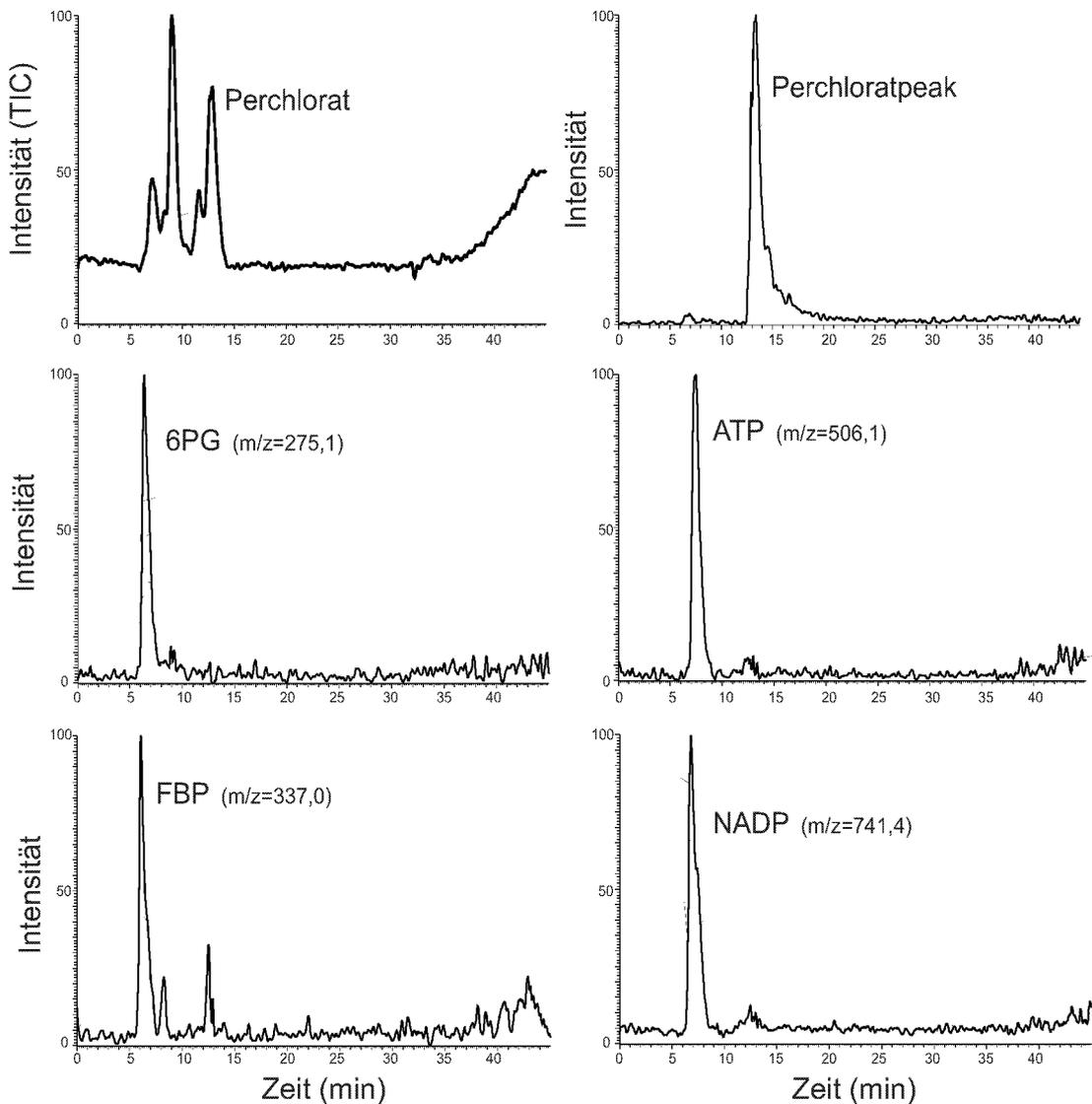


Abbildung 6.6.: LC-MS TIC (total ion count eines full scans von 50-815 m/z) oben links. Beispielhaft aus diesem Chromatogramm zwecks Quantifizierung extrahierte m/z in den folgenden Abbildungen

entsprechendem HPLC-Säulenmaterial. Leider ist dies in den oben genannten Verbindungen nur sehr schwer zu bewerkstelligen, so daß bisher über eine β -Cyclodextrin-OH Säule lediglich eine "Antrennung" möglich ist. Durch Verwendung einer Hypercarb Säule (poröser graphitisierter Kohlenstoff als stationäre Phase, Thermo-Hypersil, D) ist eine akzeptable Basislinientrennung erreichbar (siehe Abbildung 6.8 sowie Tabelle 6.6).

6.4.4.2. MS Optimierung

Die Optimierung der massenspektrometrischen Detektion läßt sich in zwei Teilbereiche unterteilen. Zum einen wurden die Parameter der ESI-Quelle untersucht um eine optimale Ionisierung (und dadurch Detektion) der Zielsubstanzen zu gewährleisten. Zum anderen wurden die sog. Scan-Parameter, d.h. die Versuchsbedingungen bei MS-Experimenten in der Ionenfalle, untersucht.

6.4.4.2.1. Untersuchung der ESI-Parameter

Ionisierungsmodus Bei der Electrospray Ionisation (ESI) findet die eigentliche Ionisation im Tropfen statt. Das Ion befindet sich nahe dem Grundzustand, es handelt sich hierbei also um eine sehr "weiche" Ionisationsmethode. Dieser

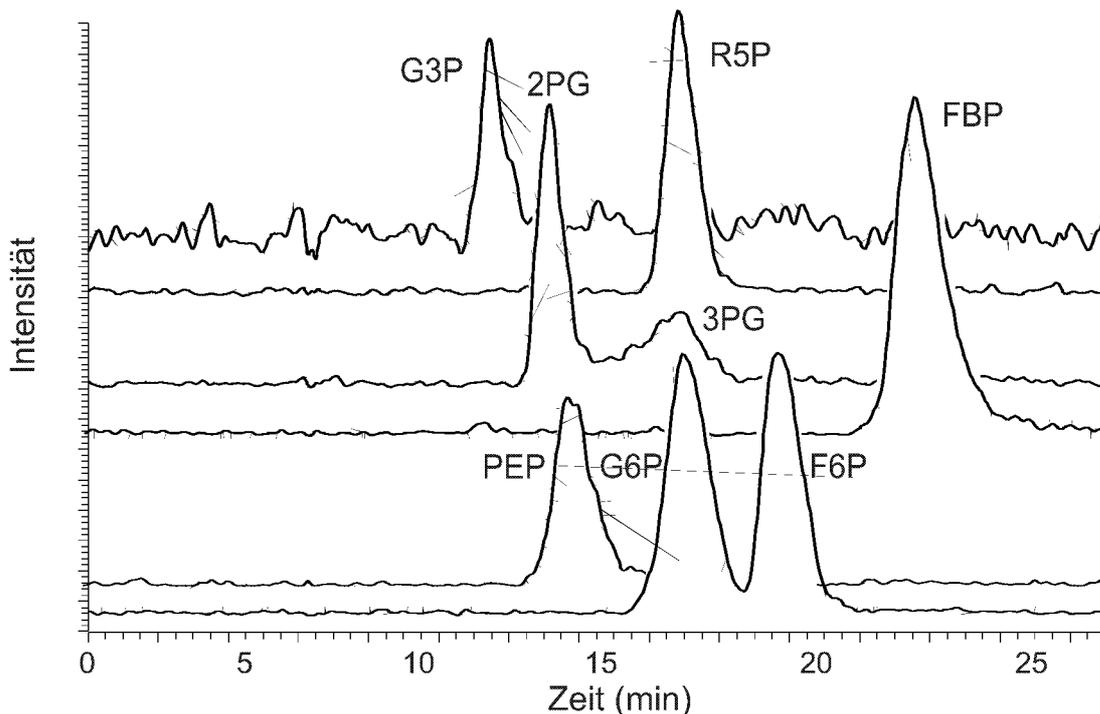


Abbildung 6.7.: Auftrennung phosphorylierter Kohlenhydrate an Hypercarb Phase

6. Ergebnisse und Diskussion

Substanz	k'	[M-H] ⁻	Hauptfragment [m/z]	Erläuterung zur Fragmentierung
6PG	0,44	275,1	177,0	[H ₂ PO ₄] Abspaltung
PEP	0,44	167,4	79,1 [PO ₃]	
FBP	0,48	337,0	241,0	[H ₂ PO ₄] Abspaltung
GTP	0,5	522,1	424,0	[H ₂ PO ₄] Abspaltung
G6P	0,53	259,1	97,1 [H ₂ PO ₄]	
F6P	0,53	259,1	97,1 [H ₂ PO ₄]	
R5P	0,56	229,0	97,1 [H ₂ PO ₄]	
GDP	0,56	442,1	344,1	[H ₂ PO ₄] Abspaltung
DHAP	0,57	168,9	79,1 [PO ₃]	
GAP	0,57	168,9	150,9	H ₂ O Abspaltung
3PG	0,6	185,1	97,1 [H ₂ PO ₄]	
2PG	0,6	185,1	97,1 [H ₂ PO ₄]	
ATP	0,62	506,1	408,0	[H ₂ PO ₄] Abspaltung
NADP	0,64	741,4	620,1	Nicotinsäureamid Abspaltung
G3P	0,64	171,4	79,0 [PO ₃]	
ADP	0,79	426,1	328,0	[H ₂ PO ₄] Abspaltung
AMP	1,59	346,2	211,1	Adenin Abspaltung
NAD	1,6	661,8	540,0	Nicotinsäureamid Abspaltung
cGMP	1,76	344,2	150,2 [Guanin]	
AcCoA	6,45	808,2	490,0	
FAD	6,89	784,2	437,1	AMP Abspaltung

Tabelle 6.5.: HPLC-ESI-MS/MS Trennung (über β-OH Cyclodextrinsäule) und Charakterisierung diverser Metabolite: Kapazitätsfaktoren (k'), detektiertes Ion ([M-H]⁻, Grundlage für Quantifizierung) und Hauptfragment (m/z) nach Fragmentierung (Grundlage für Identifizierung).

energiearme Ionisationsprozeß hat zur Folge, daß es kaum zu Fragmentierungen der Substanzen kommt.

Unterschiedliche Substanzen ionisieren unterschiedlich stark, wobei Polarisierbarkeit und Molekülsymmetrie einen starken Einfluß haben. Hierdurch sind auch die teils stark unterschiedlichen Nachweisgrenzen in homologen Reihen bedingt (siehe z.B. Nachweisgrenzen ATP, ADP, AMP; Seite 64, bzw. Tabelle 6.7).

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen ionisieren bevorzugt (bis ausschließlich) im negativen Modus, d.h. es bilden sich [M-H]⁻-Ionen. Die negative Ionisierung hat fernerhin den Vorteil der einfachen Identifizierung und Quantifizierung, da sich keine Addukte bilden. Im positiven Modus ionisieren z.B.

Substanz	$[M-H]^-$	k'
G3P	171,4	1,08
2PG	185,1	1,44
PEP	197,4	1,57
R5P	229,0	2,22
G6P	259,1	2,23
3PG	185,1	2,24
F6P	259,1	2,80
FBP	337,0	3,64
6PG	275,1	3,74

Tabelle 6.6.: Verbesserte Trennung glycolytischer Intermediate über Hypercarbsäule; isobare Metabolitpaare **hervorgehoben**

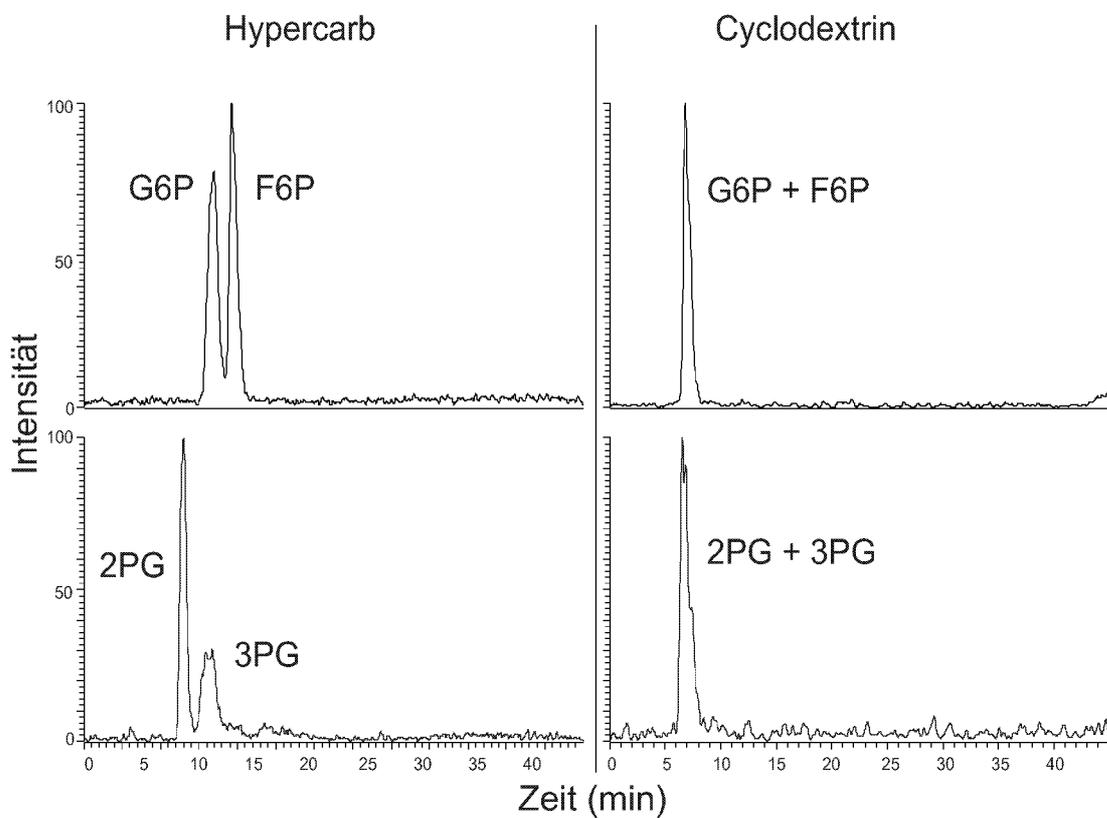


Abbildung 6.8.: Vergleich der chromatographischen Trennung isobarer Metabolite an Hypercarb- (links) und β -Cyclodextrin-OH-Phasen (rechts)

bevorzugt Aminosäuren (z.B. Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin), jedoch bilden sich hier je nach Proben-Matrix neben dem $[M+H]^+$ -Ion leicht Addukte, wie z.B. $[M+Na]^+$ oder $[M+K]^+$.

Substanz	[mM]	Substanz	[mM]
G6P	0,33	AMP	0,38
F6P	0,52	ADP	0,24
FBP	0,34	ATP	0,08
3PG	0,33	NAD	0,15
2PG	0,33	NADP	0,08
PEP	0,52	cAMP	0,07
PYR	0,41	GDP	0,14
G3P	0,49	GTP	0,10
6PG	0,38	FAD	0,02
R5P	0,22		

Tabelle 6.7.: Intrazelluläre Nachweisgrenzen [mM] für die LC-MS Analytik

Flußrate Die Flußraten des HPLC-Eluenten in die ESI-Quelle des Massenspektrometers beeinflusst die Ionenausbeute. Höhere Flußraten bedingen geringere Ionenausbeuten. Wird eine kritische Grenze jedoch unterschritten, so bricht das Ionenspray zusammen. Ein Optimum wurde bei $40 \mu\text{l min}^{-1}$ gefunden.

Temperatur beheizte Capillare Die Restverdampfung der Spraytröpfchen erfolgt in der beheizten Capillare, daher ist eine hohe Temperatur von Vorteil. Diese Aussage wird jedoch eingeschränkt durch die Temperaturempfindlichkeit der zu analysierenden Substanzen. Ein Optimum wurde bei 250°C gefunden.

Salzgehalt Ein hoher Salzgehalt wirkt sich ungünstig auf die Ionisation der Zielsubstanzen aus. Da Salze leicht ionisiert werden, führt dies zu einer schlechteren Ionenausbeute für die restlichen Substanzen; zusätzlich bilden sich Salzaddukte. In der Regel sollte bei der Verwendung von Ammoniumacetat eine Konzentration von 15 mM nicht überschritten werden. Es wurde jedoch hier ein Kompromiß zwischen Ionisation und chromatographischer Trennwirkung eingegangen, wodurch sich der Wert von 12 mM erklärt. Die Verwendung "nicht-flüchtiger" Salze (z.B. Sulfate, Phosphate und Borate) erwies sich als ungeeignet, da diese Substanzen bevorzugt ionisieren und (fast) ausschließlich detektiert werden. Aus dem selben Grund muß auch auf eine Verwendung von Ionenpaar-Reagentien verzichtet werden.

Methanol-Gehalt Eine Steigerung der Methanol Konzentration im Eluenten wirkt sich positiv auf die Ionisierung aus, höchstwahrscheinlich durch eine schnellere (azeotrope) Verdampfung des wäßrigen Lösungsmittels und eine Veränderung der Oberflächeneigenschaften der einzelnen Tröpfchen. Aufgrund der chromatographischen Trenneigenschaften ist es jedoch sinnvoll den Methanolgehalt erst nach durchlaufen des chromatographischen Systems zu erhöhen ("post-column").

Zu diesem Zweck wird über eine weitere HPLC-Pumpe ein konstanter Fluß Methanol in die ESI-Quelle geleitet. Bei einer HPLC Flußrate von $40 \mu\text{l min}^{-1}$ liegt das Optimum bei $25 \mu\text{l min}^{-1}$ Methanol.

Spray-Gas Das Verdampfen des wäßrigen HPLC Eluenten wird durch einen coaxialen ("sheath gas") und einen zusätzlichen Stickstoffstrom ("auxiliary gas") unterstützt. Bei zu geringen Flußraten kommt es nicht zu einer vollständigen Verdampfung des Lösungsmittels und die beheizte Capillare wird durch Tröpfchen zugesetzt. Bei zu hohen Flußraten entsteht ein starkes Grundrauschen bedingt durch ein instabiles Spray. Ein Optimum (für die oben festgelegten HPLC- und Methanol-Flußraten) wurde bei 80 units sheath gas und 0 units auxiliary gas gefunden.

6.4.4.2.2. Untersuchung der Scan-Parameter

Scan-Modus Je nach Scan-Modus erfolgt eine Detektion aller m/z in einem angegebenen Bereich (full scan), die Fragmentierung einer bestimmten m/z und die Detektion der Fragmente (SRM, selected reaction monitoring) oder die Detektion nur einer spezifischen m/z (SIM, selected ion monitoring). Der Quantifizierungsfehler bei Mehrfachmessungen liegt bei 3,0% (full), 2,0% (SRM) und 0,2% (SIM).

In allen drei Fällen werden Ionen in die Falle geleitet (injection time, IT, siehe Abbildung 6.9). Im full scan werden diese anschließend sofort wieder ausgelesen. Im SIM-Modus werden alle Ionen bis auf die Zielmasse eliminiert und anschließend die Zielmasse ausgelesen. Im SRM-Modus werden alle Ionen bis auf die Zielmasse eliminiert. Nach Anregung und Fragmentierung werden anschließend die Fragmente der Zielmasse ausgelesen. Sowohl SIM als auch SRM brauchen daher wesentlich mehr Zeit für einen scan-cyclus (microscan), was sich nachteilig auf die Anzahl an Meßpunkten pro LC-Peak auswirkt. Ein weitere Nachteil besteht in der Tatsache, daß beim full scan bei jedem microscan das komplette m/z -Spektrum analysiert wird. SRM und SIM sind spezifisch für nur eine Zielmasse. Um also z.B. 10 m/z zu analysieren, müßten 10 SRM-microscans, bzw. SIM-microscans durchgeführt werden, was die Anzahl an Meßpunkte pro m/z und LC-Peak auf ein Zehntel senken würde. In Hinblick auf den Nachweis möglichst vieler Substanzen zum Nachteil der Genauigkeit ist daher der full scan zur Quantifizierungen verwendet worden.

Trennung isobarer Substanzen durch MSⁿ In Einzelfällen ist es möglich, isobare Verbindungen über ein MS/MS Experiment voneinander zu trennen. Voraussetzung hierfür ist eine unterschiedliche Fragmentierung nach Anregung in der Ionenfalle. DHAP und GAP eluieren zeitgleich und besitzen das selbe m/z

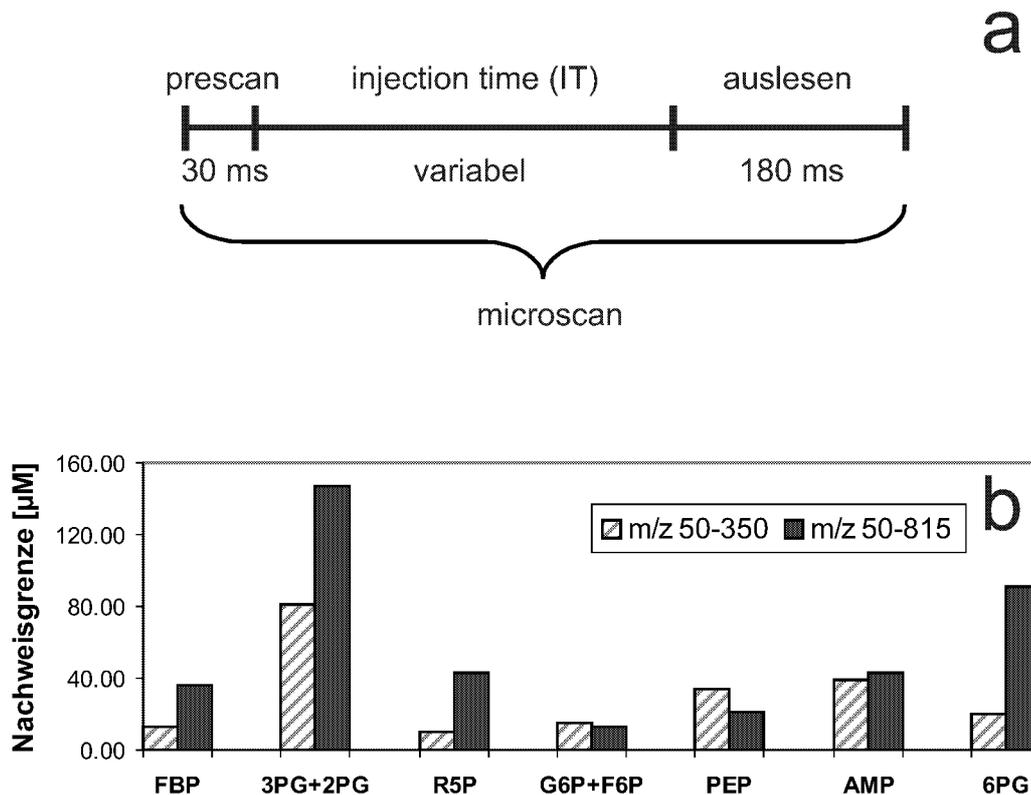


Abbildung 6.9.: Aufbau eines Meßzyclus (microscans) der Ionenfalle (a, oben) und Einfluß des scan-Bereichs auf die Nachweisgrenze (b, unten).

= 168,9. Nach Anregung bilden sich jedoch unterschiedliche Fragmentierungsmuster aus (siehe Abbildung 6.10). Nachteilig wirkt sich hier jedoch der Intensitätsverlust im Verlauf des Fragmentierungsexperiments aus. Fernerhin sind die zur Quantifizierung herangezogenen Fragmente nicht Hauptfragmente, sondern besitzen nur eine schwache Intensität (< 10% des Hauptfragmentes), so daß sich diese Methode nicht zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite eignet.

Scan-Bereich Eine Möglichkeit zur Steigerung der Nachweisgrenze besteht in einer Einschränkung des scan-Bereichs. Die Zeit für einen scan-Vorgang setzt sich zusammen aus einem prescan (30 ms), der injection time (Injektionszeit für das Befüllen der Ionenfalle, variable Zeit) und dem Auslesen der Ionenfalle (180 ms). Durch eine Einschränkung des scan Bereichs von 50 bis 815 m/z auf 50 bis 350 m/z wird eine Steigerung der Empfindlichkeit (bedingt durch Erhöhung der scan-Rate und dadurch Erhöhung der scans pro Peak) um den Faktor 2 erreicht. Es konnte gezeigt werden (siehe Abbildung 6.9), daß sowohl das Signal-Rausch-Verhältnis

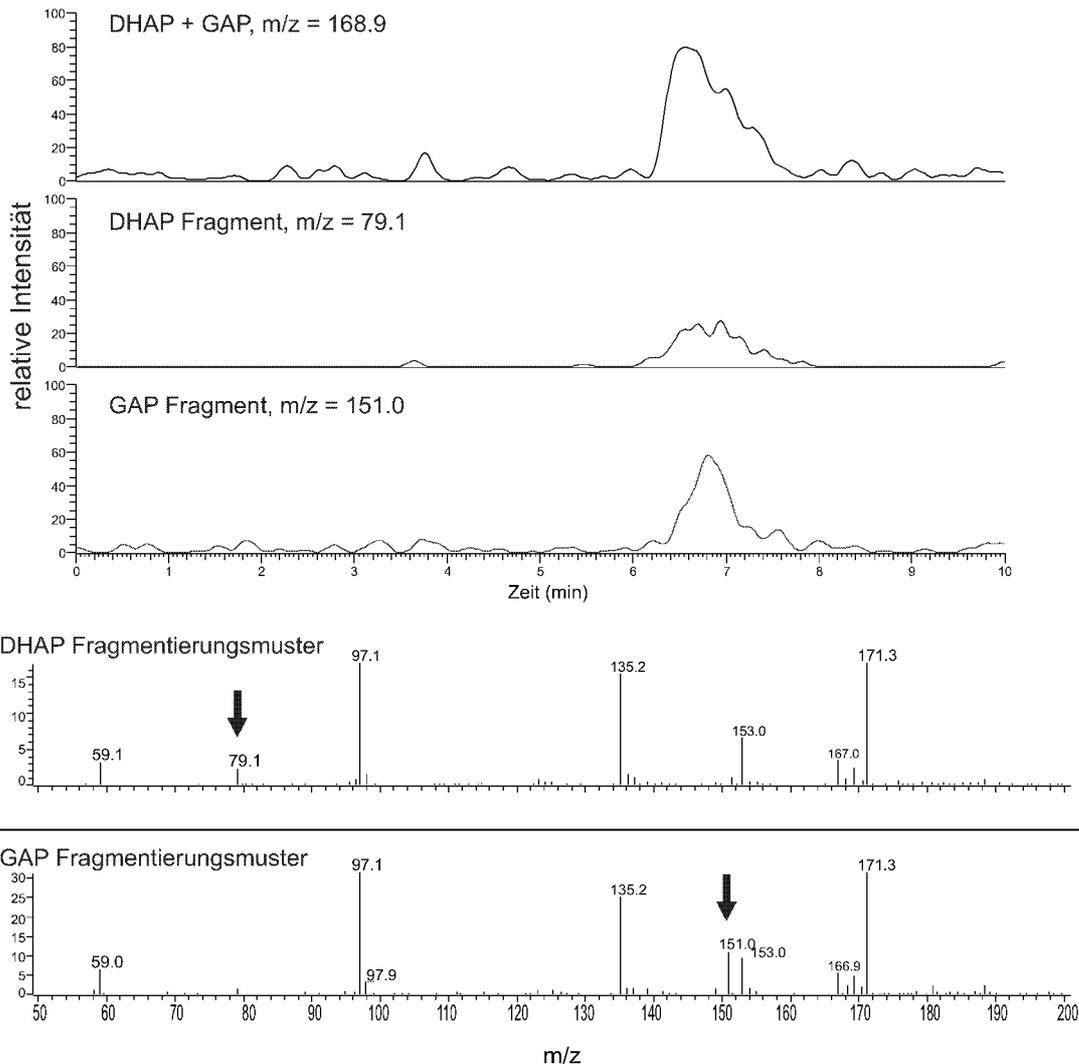


Abbildung 6.10.: Trennung isobarer Substanzen über unterschiedliche Fragmentierung (oben), Fragmentierungsmuster (unten)

als auch die Nachweisgrenze verbessert werden kann. Nachteil dieser Methode ist jedoch eindeutig der geringere Informationsgehalt, da im Bereich 50-350 m/z lediglich die gängigen Stoffwechselmetabolite der Glycolyse liegen. Information über sämtliche Verbindungen mit $m/z > 350$ (z.B. Nucleotide) entfällt.

6.4.4.3. Identifizierung unbekannter Substanzen

Durch den Aufbau einer LC-MS Datenbank wurde versucht eine schnelle Suche nach Verbindungen zu ermöglichen, die relevant für den Stoffwechsel von *E. coli* sind. Die Datenbank enthält zusätzlich unbekannte Verbindungen, welche während LC-MS Analysen von verschiedenen Puls- und Fermentationsexperi-

menten analysiert wurden. Für z.Zt. **585** unterschiedliche Substanzen kann nach Substanzname, Substanzformel, detektierte Masse, exakte Masse, Isotopenverteilung, Ionisierungsmodus, Fragmentierung und Bemerkung/Stoffwechselrelevanz recherchiert werden. Somit wird eine schnelle Identifizierung von bekannten und unbekanntem m/z wesentlich erleichtert.

6.4.4.3.1. Unbekannte Stoffwechselmetabolite Bei der Untersuchung von Proben aus diversen Pulsexperimenten sind eine Reihe möglicher Stoffwechselmetabolite aufgefallen, welche eine ausgeprägte Dynamik zeigen. Der in Abbildung 6.11 dargestellte Analyt ($m/z = 131,1$) ist einer von mehreren, bisher noch nicht identifizierten, wohl aber in sehr hoher Konzentration intrazellulär vorhandenen Metaboliten. Es besteht die Hoffnung, in der Zukunft diese Substanzen zu identifizieren und ihre Stoffwechselrelevanz aufzuklären. Mittels der LC-MS Methodik ist somit erstmals eine Möglichkeit gegeben, bisher unbekannte, stoffwechselrelevante Metabolite zu identifizieren und anschließend zu quantifizieren.

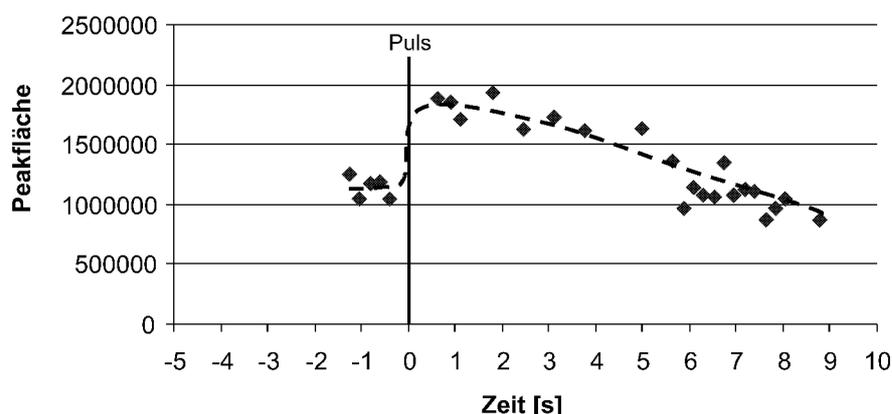


Abbildung 6.11.: Dynamischer Verlauf eines unbekanntes Metaboliten ($m/z = 131,1$) während eines GLC/GLC-Pulsexperimentes

6.4.5. Vergleich der LC-MS Daten mit enzymatischen Assays

Im Hinblick auf die Validierung der LC-MS Methode für die Quantifizierung intrazellulärer Metabolite wurden Aufschlußproben sowohl über enzymatische Assays als auch über die bestehende LC-MS Methode analysiert (siehe Abbildung 6.12 und 6.13). Es ist eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden zu erkennen.

Einen Überblick über alle momentan quantifizierte Metabolite mitsamt ihren Nachweisgrenzen liefert Abbildung 6.5. Die unterschiedlichen Nachweisgrenzen sind bedingt durch die molekularen Eigenschaften der jeweiligen Metabolite, welche das Ionisierungsverhalten in der API-Quelle des MS beeinflussen (u.a. Ladungsverteilung, räumliche Strukturen, funktionelle Gruppen, etc.).

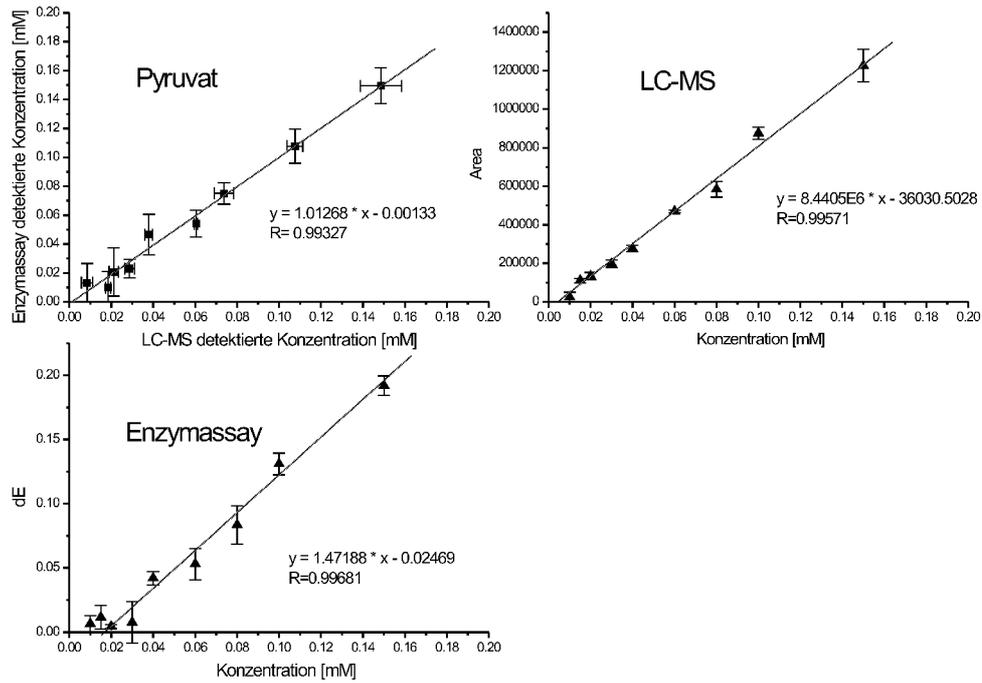


Abbildung 6.12.: Vergleich der LC-MS Daten mit enzymatischen Assays anhand von Pyruvat Standardreihen. Unten links und oben rechts die Standardreihen mit den jeweiligen Methoden für Enzymassay und LC-MS; oben links die Korrelation der beiden Methoden.

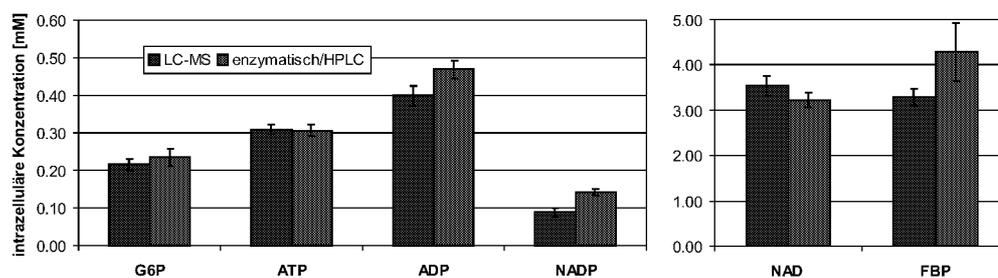


Abbildung 6.13.: Vergleich der LC-MS Methode mit Enzymassays (G6P, F6P) und einer UV-HPLC Methode (ATP, NAD, NADP)

6.4.6. Zellvolumenbestimmung

Die Bakteriengröße ist eine äußerst sensitive, komplexe Größe, die von sehr vielen Wachstumsparametern der Bakterienpopulation abhängt [27]. Die Größenverteilung verdeutlicht die Heterogenität der Population; es finden sich zu jedem Zeitpunkt sowohl kleine, mittlere als auch große Zellen in fließendem Übergang [27]. Für eine Zellgrößenverteilung wird die Häufigkeit einer Zellgröße über der Zellgröße aufgetragen. Formal läßt sich aus dieser Zellgrößenverteilung die Größe einer Durchschnittszelle berechnen. Es sind eine Vielzahl von reaktionstechnischen Parametern bekannt, die einen signifikanten Einfluß auf die Größe der Zellen in der Kultur haben. Hier sind u.a. das verwendete Medium (Zusammensetzung, Osmolarität), die Wachstumsphase der Kultur und die Begasung (aerob/anaerob) zu nennen. Für *E. coli* ist fernerhin eine Abhängigkeit der Zellgröße von der Rührergeometrie beobachtet worden sowie eine lineare Abhängigkeit der Zellgröße von der Rührerdrehzahl [144]. Neben den reaktionstechnischen Parametern kommt es auch durch das Meßprinzip der verschiedenen Methoden selbst zu mitunter gravierenden Eingriffen in die direkte Umgebung der Zelle (Gefriertrocknung zur elektronenmikroskopischen Präparation, Zentrifugation bei Radioaktivmethoden). Dabei ist anzunehmen, daß ein systematischer Fehler in die Messung eingebracht wird. Hier bietet der Partikelzähler einen großen Vorteil, da er die Zellen weitgehend unbeeinflusst erfassen kann.

Die Zellvolumina wurden sowohl in Batch- als auch Chemostatfermentationen regelmäßig über die in Abschnitt 5.7.3.1 beschriebene Methode bestimmt. Für die Berechnung des spezifischen Zellvolumens K_E (welches auch in die Berechnung der intrazellulären Konzentrationen eingeht, siehe Gleichung 5.4) wurden jedoch nur Werte aus steady state Chemostatfermentationen herangezogen (siehe Tabelle 6.8).

Im Hinblick auf die Größenordnung des Zellvolumens werden in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen Werte von $0,3 - 3 \mu\text{m}^3$ pro Zelle bestimmt [28].

Abbildung 6.15 zeigt exemplarisch den charakteristischen Kurvenverlauf einer wachsenden Bakterienpopulation. Der Anstieg im Bereich von $0,7 \mu\text{m}$ ist auf kleine Verunreinigungen aus dem Meßelektrolyten oder der Probe zurückzuführen.

Aus zeitlichen Verläufen ist ersichtlich, daß sich die Werte für das mittlere

Stamm	Substrat	Zellvolumen ^a	K_E ^b
K12	Glucose	0,3605	2,78
K12	Glycerol	0,2773	2,15
3pMK7	Glucose	0,4955	3,81

Tabelle 6.8.: Vergleich der Zellvolumina unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und bei verschiedenen Stämmen

^a Volumen am Maximum der Verteilung [$\text{fl} = 10^{-15} \text{ l}$]

^b spezifisches Zellvolumen [$\mu\text{l mg}^{-1}$]

Zellvolumen und das Maximum der Zellgrößenverteilung über den Verlauf einer chemostatischen Fermentation nur geringfügig ändern (Fehler der Mehrfachmessung $\leq 1\%$, Fehler über den Verlauf einer chemostatischen Fermentation $\leq 4\%$).

6.4.7. Bestimmung des Interzellulärvolumens

Zur Bestimmung des Interzellulärvolumens (siehe Gleichung 5.3) werden Proben aus chemostatischen Fermentationen verwendet. Die Proben werden wie unter Abschnitt 5.8 beschrieben deaktiviert. Nach anschließender Zentrifugation bei -20°C und 10.286 g für 5 min wird das Feuchtgewicht der Zellpellets bestimmt. Die Zellpellets werden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Über eine Differenzmessung kann so das Interzellulärvolumen bestimmt werden.

Bei Wachstum auf Glucose beträgt das Interzellulärvolumen $326 \pm 16\ \mu\text{l}$, bei Verwertung von Glycerol $520 \pm 24\ \mu\text{l}$. Je Substrat sind 8 separate Messungen gemittelt worden, der Fehler liegt in beiden Fällen unter 5% . Das wesentlich höhere Interzellulärvolumen bei Wachstum auf Glycerol ist höchstwahrscheinlich durch stärkere Wechselwirkungen mit der Zelloberfläche bedingt. Die Konsistenz der Zellpellets ist bei Verwendung dieses Substrats sehr viel zäher.

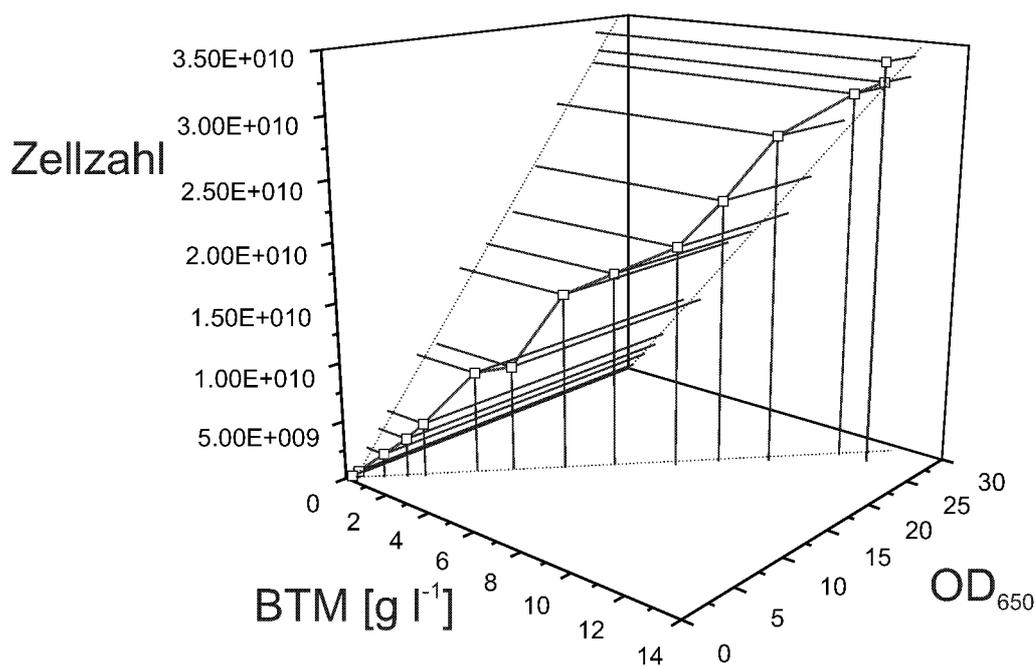


Abbildung 6.14.: Korrelation zwischen Zellzahl, OD und BTM

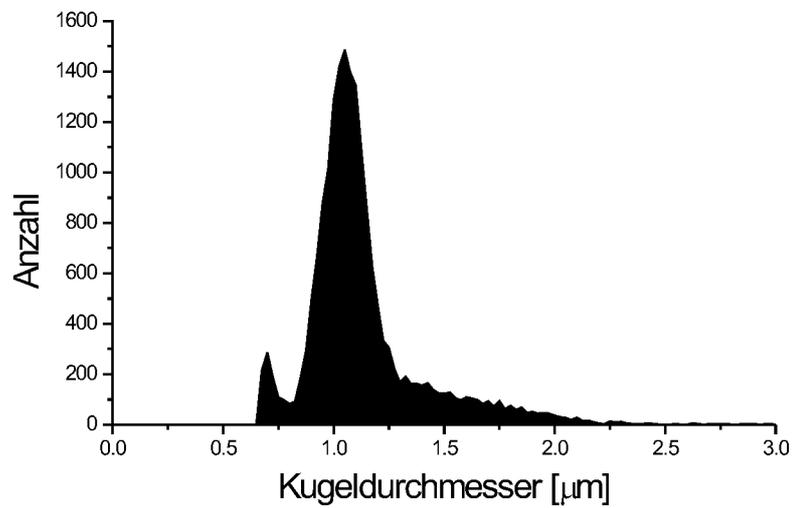


Abbildung 6.15.: Größenverteilung des Zelldurchmessers, berechnet auf einen äquivalenten Kugeldurchmesser (Wachstum auf Glucose, exponentielle Phase)

6.5. Untersuchungen im Batchbetrieb

Die Untersuchungen im Batchbetrieb stellen notwendige Vorversuche zu den Puls-experimenten dar. Da der Batchansatz die Ausgangsposition für die chemostatische Fermentation darstellt, muß zu diesem Zeitpunkt die Durchführbarkeit hinsichtlich der experimentellen Parameter klargestellt werden. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} des Mikroorganismus muß unter Verstoffwechslung des jeweiligen Substrats größer sein als die im Chemostat über die Durchflußrate eingestellte Wachstumsrate, da es ansonst zu einem Auswaschen der Zellen (“wash-out”) kommen würde. Weiterhin bietet der Batch die Möglichkeit, erste Indizien über die Verstoffwechslung des jeweiligen Substrats zu sammeln (z.B. Sauerstoffbedarf, Nebenproduktspektrum). Die Vorbereitung und Durchführung sämtlicher Fermentationen geschieht wie unter Abschnitt 4.2.4.1 beschrieben. Aus den ermittelten maximalen Wachstumsraten (siehe Tabelle 6.9) ist ersichtlich, daß sämtliche Versuche unter den Standardbedingungen des Chemostats (37°C , $\mu = 0,125 \text{ h}^{-1}$) problemlos durchgeführt werden können. Details zu den Batchfermentationen befinden sich in [23, 116, 145].

Stamm	Substrat	$\mu_{max} [\text{h}^{-1}]$
<i>E.coli</i> K12	Glucose	0,72
<i>E.coli</i> K12	Glycerol	0,41
<i>E.coli</i> K12	Acetat	0,32
<i>E.coli</i> 3pMK7	Glucose	0,34

Tabelle 6.9.: Vergleich der Wachstumsraten μ_{max} bei 37°C (Verdopplungszahlen berechnen sich gemäß $g = \ln 2 \cdot \mu^{-1}$)

6.6. Untersuchungen im Fließgleichgewichtszustand

Eine wichtige Grundlage für die Untersuchungen zur Stoffwechseldynamik ist die Einstellung eines Fließgleichgewichtszustandes (steady state) einer Kultur unter reproduzierbaren Bedingungen. Der stationäre Zustand des steady state dient als Ausgangspunkt für alle dynamischen Anregungen. Für den Zustandsvektor der intra- und extrazellulären Konzentrationen gilt:

$$\frac{dc}{dt} = 0 \quad (6.1)$$

Die Einstellung des Fließgleichgewichtszustandes wird anhand externer Prozeßparameter (BTM, $p\text{O}_2$, CO_2 ; siehe Abbildung 6.16) sowie durch Aufstellung einer Kohlenstoffbilanz (siehe Abbildung 6.17 und Seite 154) überprüft. Anhand dieser Kriterien wird die reproduzierbare Einstellung des steady state für alle chemostatischen Fermentationen gewährleistet.

6. Ergebnisse und Diskussion

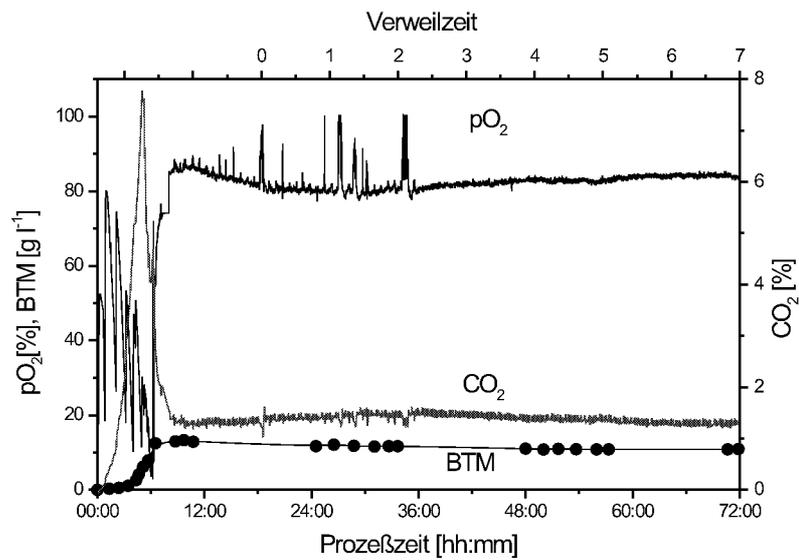


Abbildung 6.16.: Prozeßparameter einer ausgewählten chemostatischen Fermentation; deutlich sichtbar ist die Konstanz der Parameter BTM, pO_2 und CO_2 für 7 Verweilzeiten im Chemostat

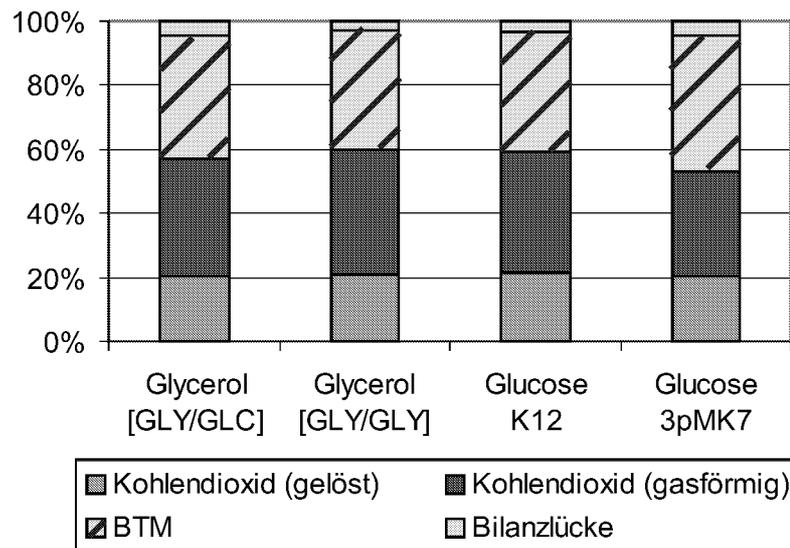


Abbildung 6.17.: Chemostat-Kohlenstoffbilanzen für unterschiedliche Substrate (Bilanzlücke in allen Fällen $\leq 5\%$)

6.6. Untersuchungen im Fließgleichgewichtszustand

Ein Vergleich der intrazellulären Konzentrationen im Fließgleichgewicht für die glucoselimitierten (*E. coli* K12 und 3pMK7) und glycerollimitierten (*E. coli* K12) chemostatischen Fermentationen befindet sich in Tabelle 6.10. Einzelheiten werden unter den jeweiligen Kapiteln für die Pulsexperimente diskutiert.

In Tabelle 6.11 befindet sich ein Vergleich der intrazellulären steady state Konzentrationen des glucoselimitierten Chemostats von *E. coli* K12 mit Daten aus der Literatur. Hierzu muß jedoch angemerkt werden, daß ein solcher Vergleich aufgrund der z.T. erheblich abweichenden experimentellen und biologischen Rahmenbedingungen (z.B. unterschiedliche Fermentationsbedingungen, Stämme, Inaktivierungs-, Extraktions- und Analysemethoden⁷⁾ schwierig ist.

Metabolit	K12, GLC [mM]	3pMK7, GLC [mM]	K12, GLY [mM]
G6P	0,19	0,16	0,44
F6P	0,16	0,33	n/d
FBP	2,68	1,48	n/d
DHAP	4,89	3,14	1,60
GAP	4,96	3,17	1,37
G3P	0,44	0,46	0,48
3PG	2,33	n/d	0,82
2PG	2,36	1,44	n/d
PEP	0,92	2,21	1,33
Pyr	1,36	0,48	0,71
6PG	3,75	0,34	n/a
M5P	1,39	0,15	n/a
Citrat	0,48	0,28	3,43
OxAc	2,07	0,26	n/a
AcCoA	3,66	1,60	1,13
ATP	0,44	0,95	1,28
ADP	0,69	0,92	0,40
AMP	0,56	0,70	n/a
cAMP	0,13	0,08	0,47
NAD	2,88	1,26	0,43
NADP	0,25	0,97	0,30

Tabelle 6.10.: Übersicht der intrazellulären steady state Konzentrationen für unterschiedliche Stämme und Substrate (n/a: nicht analysiert, n/d: nicht detektiert)

⁷z.T. sind bei fast identischen Versuchsbedingungen (siehe [22]) durch die Verwendung erweiterter Analysenmethoden bei neueren Untersuchungen leichte Abweichungen nachgewiesen worden

Metabolit	vorliegende Arbeit	Literatur [22]	Literatur [146, 147]	weitere Literatur
G6P	0,19 mM	0,3 mM	1-3 mM	$\leq 1,6$ mM [148, 149]
F6P	0,16 mM		$\leq 2,7$ mM	
FBP	2,68 mM	4,8 mM	21 mM	0-8 mM [150, 151]
DHAP	4,89 mM	2,3 mM	0-5 mM	0-5 mM [151]
GAP	4,96 mM	2,9 mM		
3PG	2,33 mM	1,1 mM	0,7-2,7 mM	
2PG	2,36 mM	0,4 mM		
PEP	0,92 mM	1,2 mM	0,2 mM	$\leq 1,6$ mM [152]
Pyruvat	1,36 mM	6,5 mM	1,0 mM	
Citrat	0,48 mM	3,1 mM		10-27 mM [153]
ATP	0,44 mM	0,4 mM	0,1-3 mM	0,1-3 mM [154]
ADP	0,69 mM	0,7 mM	0,15-1,3 mM	0,15-1,3 mM [149]
cAMP	0,13 mM	0,1 mM		$\leq 0,3$ mM [155, 156, 157]
NAD	2,88 mM	3,5 mM		1-3 mM [158, 159]
6PG	3,75 mM		2,4 mM	
M5P	1,39 mM		1,1 mM	

Tabelle 6.11.: Übersicht der in der Literatur publizierten Daten von intrazellulären Metabolitkonzentrationen in *E. coli* mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten (glucoselimitierter steady state)

6.7. Untersuchungen des dynamischen Verhaltens

Ein prinzipieller Beweggrund für Untersuchungen des dynamischen Verhaltens von Mikroorganismen liegt zum einen in der Bereitstellung von Daten für die mathematische Modellierung des mikrobiellen Stoffwechsels. Zum anderen liefern solche Experimente jedoch vorrangig Informationen über das Verhalten von Mikroorganismen gegenüber Veränderungen ihrer Umgebung (z.B. Substratkonzentration, pH, Temperatur, Sauerstoffpartialdruck, etc.). Die Korrelation des externen Stimulus mit Veränderungen intrazellulärer Metabolitkonzentrationen und Stoffwechselflüsse gestattet qualitative Rückschlüsse über Art, Umfang und Funktion des zellulären Stoffwechsels. Um das dynamische Verhalten des Stoffwechsels von *E. coli* nach der Zugabe eines limitierenden Substrats zu untersuchen, sind im folgenden vier unterschiedliche Experimente⁸ durchgeführt worden, welche im einzelnen phänomenologisch diskutiert werden sollen. Eine Modellierung dieser Daten findet ab Seite 122 statt.

6.7.1. Glucosepulsexperiment *E. coli* K12 [GLC/GLC pts(+)]

Zur Untersuchung des dynamischen Verhaltens glycolytischer Intermediate wird *E. coli* K12 in einem glucoselimitierten Fließgleichgewichtszustand kultiviert. Durch pulsartige Zugabe von Glucose wird der Stoffwechsel angeregt und die anschließende dynamische Veränderung der Konzentrationen von Metaboliten des Zentralstoffwechsels mittels einer schnellen Probenahme verfolgt.

Die Analytik des Glucose-Glucose (GLC/GLC) Pulsexperimentes mit dem Stamm *E. coli* K12 (wie auch *E. coli* 3pMK7, siehe Seite 104) erfolgte zum Teil über modifizierte enzymatische Assays, welche es über die Kopplung von zwei bis drei Assays gestatten, mit einem sehr viel geringeren Probenvolumen zu arbeiten. Dadurch konnte das pro Enzymassay benötigte Probenvolumen halbiert, bzw. gedrittelt werden und somit die Frequenz der schnellen Probenahme voll ausgenutzt werden. Im Gegensatz zu 1-2 Proben $\cdot s^{-1}$ zuvor ist es so möglich die glycolytischen Intermediate mit einer Frequenz von 4-5 Proben $\cdot s^{-1}$ zu bestimmen.

Fernerhin konnten erstmals Metabolite des Pentosephosphatweges (PPP) über LC-MS analysiert werden. Da es sich bei den Pentosephosphaten zumeist um isobare Substanzen handelt ($m/z = 230,11$ für: Ribulose-5-phosphat, Ribose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat, etc.) können diese nur als Summe (bezeichnet als "M5P") gemessen werden.

6.7.1.1. Pulsaufgabe

Nach 7,5 Verweilzeiten des Systems im glucoselimitierten Fließgleichgewichtszustand erfolgte eine Anregung durch pulsartige Zugabe von 70 ml einer 2.33 M

⁸Eine Fehlerbetrachtung der hier präsentierten Meßwerte findet sich im Anhang auf Seite 152.

6. Ergebnisse und Diskussion

Glucoselösung (siehe Seite 26). Innerhalb von 630 ms (Mischzeit Θ_{90}) wurde so die Konzentration des Substrats von unterhalb der Nachweisgrenze auf 16 mM erhöht (siehe Abbildungen 6.24b und 6.18).

Durch die hohe Glucoseaffinität von *E. coli* bei geringen extrazellulären Glucosekonzentrationen ($K_S \leq 10 \mu\text{M}$ [110, 111]), ist die Glucoselimitierung jedoch bereits nach <100 ms aufgehoben (siehe auch Seite 55). Exemplarisch für alle Pulsversuche zeigt Abbildung 6.18 den Substratanstieg im Bioreaktor während des Pulsexperiments. Die externe Glucosekonzentration wurde im Methanolüberstand bestimmt.

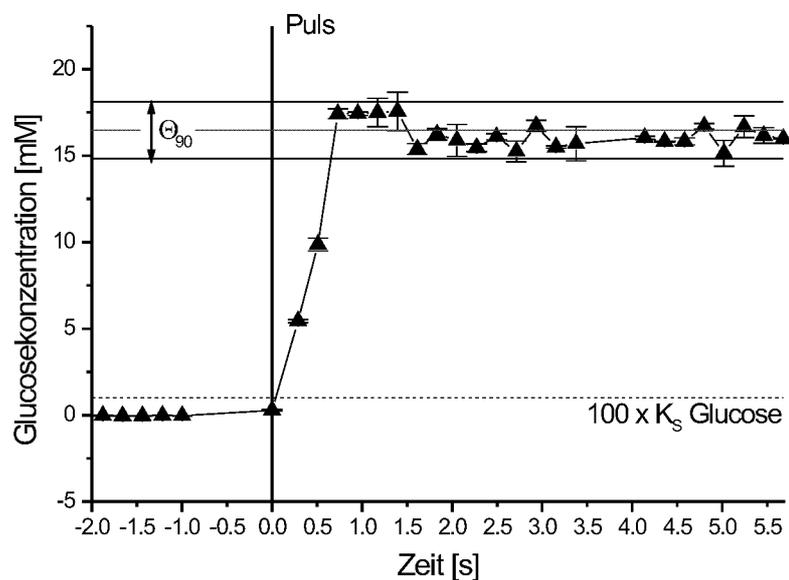


Abbildung 6.18.: Glucoseanstieg im Bioreaktor nach Pulsaufgabe und Aufhebung der Substratlimitierung. Mischbereich Θ_{90} und 100-facher K_S für Glucose [110, 111] eingezeichnet.

In Abbildung 6.19 sind die Parameter Druck und $p\text{O}_2$ während und kurz nach dem Pulsexperiment dargestellt. Die Verstoffwechslung der injizierten Glucose ist an der $p\text{O}_2$ -Abnahme zu erkennen. Der Druck schwankt aufgrund der neuen Pulsaufgabe-Technik nur minimal, so daß ein möglicher Einfluß auf die Bakterienkultur, bzw. den Stoffwechsel, vernachlässigt werden kann. Die Parameter im weiteren Verlauf (nach Abschluß der Probenahme für das Pulsexperiment) sind in Abbildung 6.20 dargestellt. Gekoppelt an die verstärkte Sauerstoffaufnahme nach Aufhebung der Substratlimitierung und somit verstärkter Stoffwechselaktivität ist die Produktion von CO_2 . Nach ca. 2500 s ist die injizierte Glucose verbraucht, und das System kehrt in einen neuen glucoselimitierten steady state zurück.

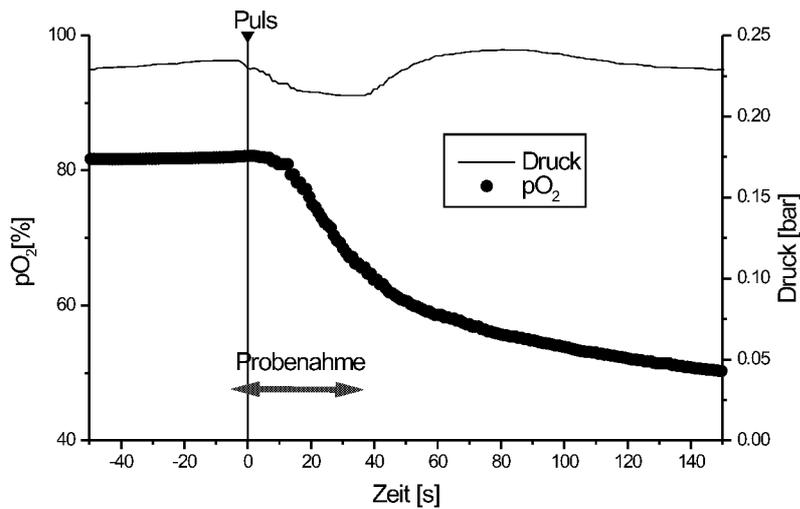


Abbildung 6.19.: Externe Parameter während des GLC/GLC-Pulsexperimentes. Die Verstoffwechslung der zugepulsten Glucose ist anhand der erhöhten Atmungsaktivität der Zellen (\equiv Abnahme pO_2) zu erkennen)

In allen Experimenten ist darauf geachtet worden, daß die Sauerstoffkonzentration während des Pulsversuchs nicht unter die kritische Sauerstoffkonzentration für *E. coli* ($\approx 0,26 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1} \equiv 3,5\% pO_2$ [63]) fällt. Eine Stoffwechsellimitierung durch Einschränkung der zellulären Respiration wird somit verhindert⁹.

6.7.1.2. Dynamik intrazellulärer Metabolite

Die Steigerung der Substrataufnahme (bedingt durch die erhöhte extrazelluläre Glucosekonzentration) spiegelt sich deutlich in den Verläufen der Hexosephosphate wieder. Sowohl G6P (als erstes glycolytisches Intermediat nach der Glucoseaufnahme durch das PTS) als auch F6P (Abbildung 6.21a,b) zeigt einen starken Anstieg der intrazellulären Konzentration¹⁰. Eine Abschätzung der Glucoseaufnahme nach dem Puls ist äußerst schwierig. Das Enzym I des PEP:PTS (PtsG) besitzt einen $K_M(\text{PEP}) = 0,2\text{-}0,4 \text{ mM}$ [57] und eine spezifische Aktivität von $5,3\text{-}10,0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ [160, 161]¹¹. Man muß jedoch berücksichtigen, daß bei

⁹Unterhalb der kritischen Sauerstoffkonzentration korreliert die Sauerstoffaufnahme mit der Sauerstoff-Konzentration in Lösung (Kinetik erster Ordnung)

¹⁰Sofern nicht anders gekennzeichnet, handelt es sich bei allen Kurven in den Abschnitten zur Dynamik intrazellulärer Metabolite lediglich um Visualisierungshilfen; sie beruhen nicht auf einem mathematischen Modell

¹¹Bei allen Enzymparametern in diesem Kapitel handelt es sich ausschließlich um *in vitro* Werte, siehe hierzu auch Abschnitt 6.8.4

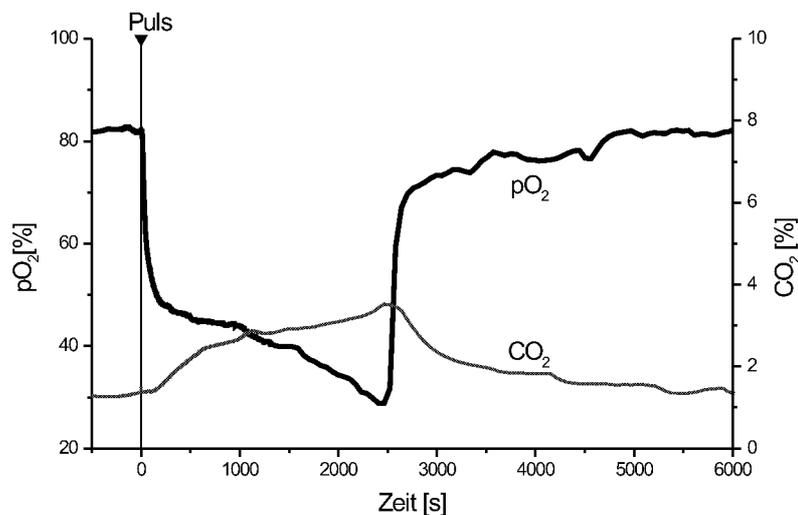


Abbildung 6.20.: Verhalten des Systems nach dem Substratpuls in dem GLC/GLC-Pulsexperiment. Nach 2500 s ist die zugepulste Glucoselösung verbraucht; das System stellt sich langsam auf einen neuen Fließgleichgewichtszustand ein

hohen Glucosekonzentrationen (wie sie nach dem Puls auftreten), auch andere Glucoseaufnahmesysteme aktiv sind (s.u.) welche nicht hinreichend charakterisiert sind.

Innerhalb der ersten Sekunde nach dem Glucosepuls steigen die intrazellulären Konzentrationen von G6P und F6P rapide von unterhalb der Nachweisgrenze auf ca. 1,2 mM, gefolgt von einem langsameren Anstieg nach 20 (G6P), bzw. 25 (F6P) s. Diese schnelle Reaktion bestätigt Untersuchungen, wonach die Reaktionszeit von *E. coli* auf Umgebungsveränderungen (z.B. Substraterhöhung) im Bereich ≤ 100 ms liegt [162].

Eine Oszillation der intrazellulären G6P-Konzentration [22] ist nicht nachzuweisen.

Die gemessene intrazelluläre Konzentration für G6P und F6P stimmen gut mit den aus der Literatur [148, 149] bekannten Werten überein (siehe Tabelle 6.11). Der fast simultane Anstieg der beiden Metabolite läßt darauf schließen, daß es sich bei der Phosphoglucoseisomerase um ein sehr schnelles Enzym handeln muß, bzw. daß die Equilibrierung der beiden Metabolitpools über dieses Enzym (PGI) sehr rasch erfolgt. Da Glucose bei der Aufnahme über das PTS zu G6P phosphoryliert wird, sollte ein starker Anstieg im G6P Pool mit einer Abnahme der intrazellulären PEP Konzentration gekoppelt sein. Dies ist aus dem Verlauf von PEP (Abbildung 6.22b) gut zu erkennen; innerhalb der ersten Sekunde sinkt die PEP Konzentration von ca. 1 mM auf einen nicht mehr detektierbaren

Wert. Erstaunlicherweise ist diese Limitierung jedoch nur sehr kurzfristig, die PEP Konzentration steigt innerhalb des Versuchszeitraums in zwei Stufen wieder an. Aufgrund des K_M (PEP) für Enzym I des PTS würde dies auch eine Erklärung für die leichte Abnahme des G6P Pools nach 2,5 s liefern. Die Glucose Aufnahme ist kurzfristig PEP-limitiert.

Das bei der Dephosphorylierung des PEP entstehende Pyruvat erhöht den intrazellulären Pyruvat Pool (Abbildung 6.22c); in den ersten 10 s ist zwischen diesen beiden Metaboliten eine eindeutige Kopplung nachweisbar. Der Anstieg beider Metabolite nach 15-17 s ist auf ein erneutes "Auffüllen" durch die Glycolyse zu erklären. Dies deutet sich u.a. in der stetigen Abnahme des 3PG (Abbildung 6.21f) sowie dem zum PEP fast spiegelbildlichem Verlauf des 2PG an (Abbildung 6.22a). Die spezifischen Aktivitäten der jeweiligen Enzyme Phosphoglyceratmutase ($3PG \rightarrow 2PG$, $124 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ [163, 164]) und Enolase ($2PG \rightarrow \text{PEP}$, $158 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ [165]) sind ausreichend, um für eine schnelle Regeneration des PEP Pools zu sorgen.

Je weiter man sich im Stoffwechsel von den Metaboliten entfernt, welche direkt an der Substrataufnahme beteiligt sind, desto schwieriger fällt eine rein phänomenologische Interpretation der Konzentrationsverläufe. FBP, welches durch Phosphofruktokinase (PFK) aus F6P gebildet wird, zeigt z.B. kaum dynamisches Verhalten (Abbildung 6.21c). Dies kann zum einen daran liegen, daß es sich bei der PFK um ein stark allosterisch reguliertes Enzym handelt (inhibiert durch PEP und ATP, aktiviert durch AMP [166, 167]). Zum anderen ist es aber auch möglich, daß ein Großteil des Stoffflusses über den Pentosephosphatweg umgeleitet wird. Dies deutet sich in dem leichten Anstieg der 6PG Konzentration nach dem Glucosepuls an sowie in der Dynamik des M5P Pools (Abbildung 6.23a,b). Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die PFK geschwindigkeitslimitierend auf die Glycolyse wirkt. Sie verursacht einen Rückstau (siehe starker Anstieg G6P und F6P), welcher dann langsam weitergeleitet wird (v.a. zu sehen an der fehlenden Dynamik in den Folgemetaboliten FBP, GAP, DHAP, etc.).

Vom Pyruvat zweigen verschiedene Stoffwechselwege ab, z.B. zur Biosynthese (Aminosäuren); ein großer Teil der Kohlenstoffquelle wird jedoch im Citratcyclus zu CO_2 oxidiert. Pyruvat wird zu Acetat oder durch Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgesetzt, das wiederum durch Citrat-Synthase mit Oxalacetat zu Citrat umgesetzt wird (siehe auch Abbildung 6.25). Pyruvat nimmt eine zentrale Stellung im Stoffwechselnetzwerk ein; durch die vielen Zu- und Abflüsse von diesem Metabolit-Pool wird eine Interpretation der Metabolit-Verläufe die an Pyruvat angrenzen äußerst schwierig ("branch point effect", siehe hierzu auch [168, 169]). Das aus Acetyl-CoA und Oxalacetat entstehende Citrat zeigt innerhalb der ersten 10 s nach dem Puls einen graduellen Anstieg auf 1,5 mM, gefolgt von einem ebenfalls 10 s dauernden Minimum bei 0,4 mM (Abbildung 6.22f). Eine Korrelation mit dem Acetyl-CoA Verlauf ist hierbei zu beobachten (Abbildung 6.22e), d.h. eine Abnahme im Acetyl-CoA Pool bedingt eine Zunahme des Citrat Pools (und umgekehrt). Ein entsprechendes Verhalten ist beim Oxalacetat Pool

6. Ergebnisse und Diskussion

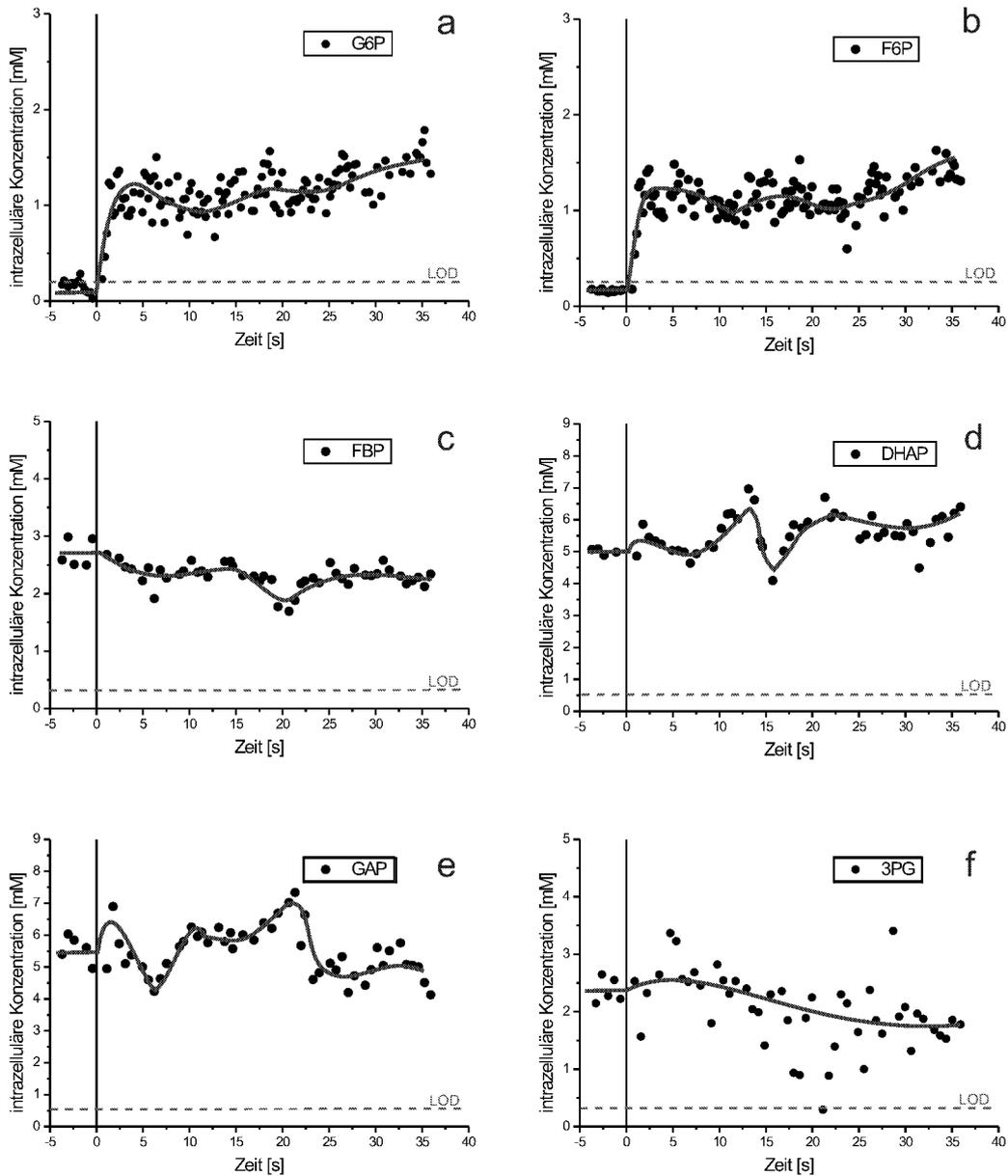


Abbildung 6.21.: GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite

jedoch nicht aufzufinden (Abbildung 6.22d).

Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP, Abbildung 6.23f) ist ein wichtiger Regulator, sowohl bei der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten¹² als auch bei Stoffwechselfvorgängen, die nicht direkt mit dem Energie-/Kohlenhydrathaushalt

¹²Kontrolle der gal-, ara- und pts-operons

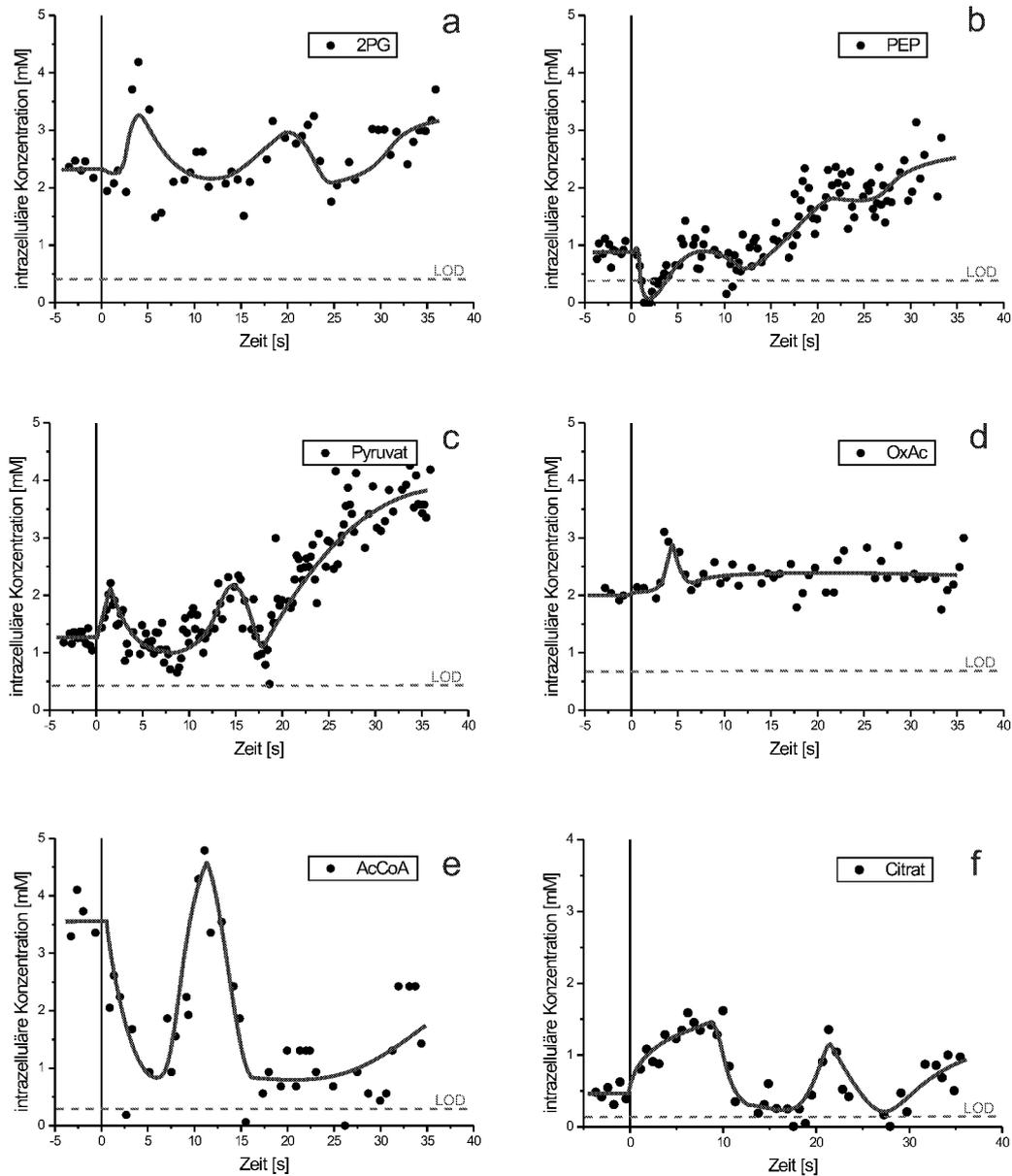


Abbildung 6.22.: GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite

der Zelle in Verbindung stehen¹³. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf von cAMP zeigt den typischen in der Literatur beschriebenen Verlauf ([170, 155, 22, 156, 157]). Unter Glucoselimitierung wird ein ca. 5 mal größerer cAMP-Pool in der Zelle gemessen als nach dem Glucosepuls.

Die intrazelluläre Konzentration von cAMP nimmt nach Aufhebung der Sub-

¹³tna-, ilv-, nadA-operons; cya- und ompA-loci

6. Ergebnisse und Diskussion

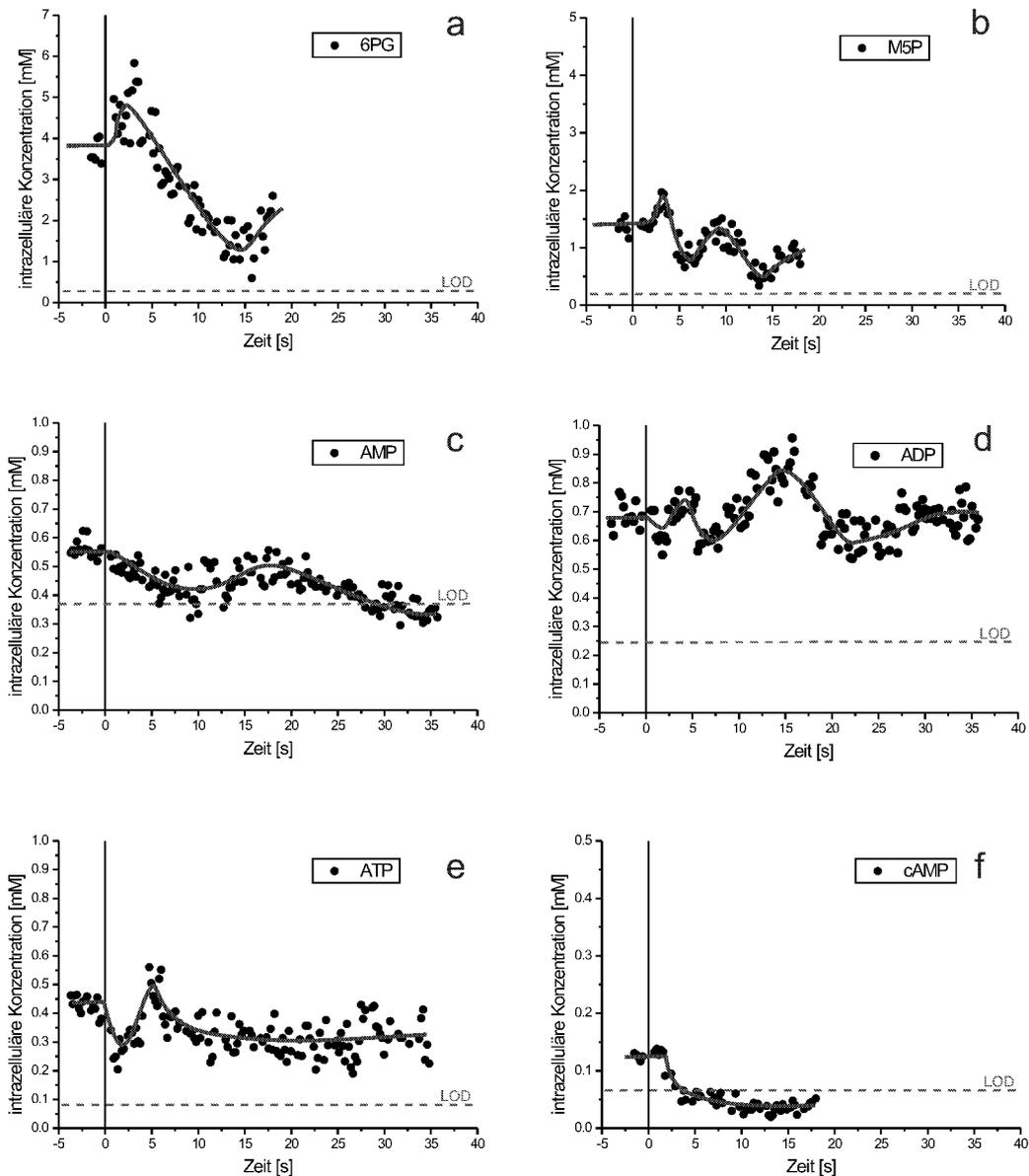


Abbildung 6.23.: GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite

stratlimitierung innerhalb von ca. 10 s von 0,13 mM bis unter die Nachweisgrenze ab, wobei es sich hierbei höchstwahrscheinlich um einen Efflux-Mechanismus handelt [111, 171].

Das typische Verhalten der cAMP-Konzentration und die Tatsache, daß bis zu dem Zeitpunkt des Glucosepulses nur submikromolare Glucosekonzentrationen im Medium vorhanden waren deutet darauf hin, daß das Phosphoenolpyruvat:Glucose Phosphotransferase System mit dem hochaffinen Enzym II^{Glc} indu-

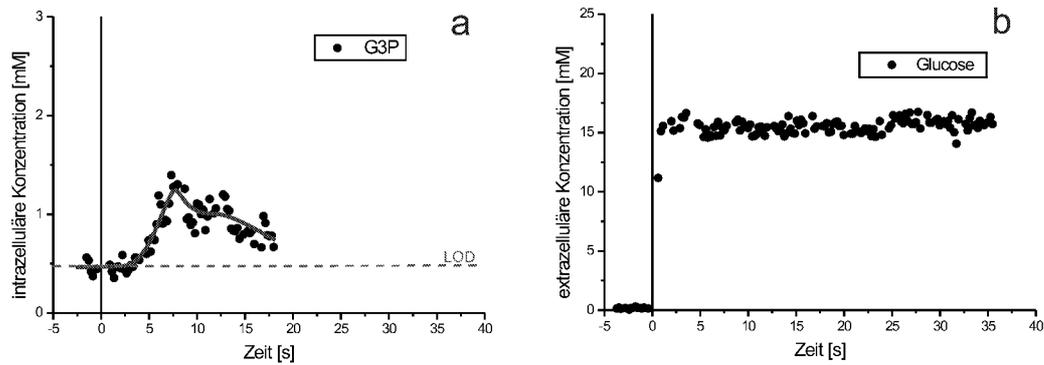


Abbildung 6.24.: GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf der intrazellulären G3P-Konzentration (a) und der externen Glucosekonzentration (b)

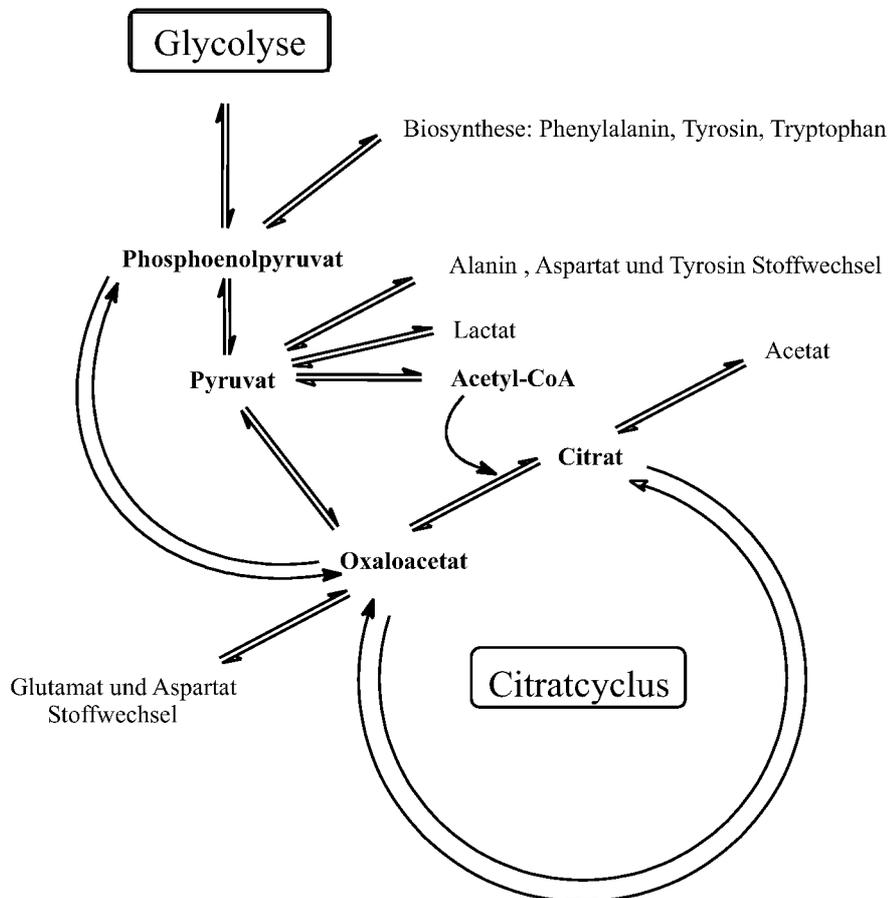


Abbildung 6.25.: Übergang zwischen Glycolyse und Citratcyclus

ziert ist. Da die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit des PEP:Glucose Phos-

phosphotransferase System von *E. coli* bei PEP-Konzentrationen von 0,2-0,4 mM liegt [172], ist es sehr wahrscheinlich, daß unterhalb einer PEP-Konzentrationen von 0,2 mM eine Limitierung der Translokation und Phosphorylierung von Glucose auftritt. *E. coli* besitzt jedoch multiple, kinetisch unterschiedliche Aufnahmesysteme für Glucose [27, 173], die in Abhängigkeit der externen Glucosekonzentration exprimiert, bzw. aktiv sind. Je nach Konzentration der externen Glucose wird so der Transport und die Phosphorylierung dieses Substrats über ein System bevorzugt, bzw. über mehrere kinetisch unterschiedliche Systeme bewerkstelligt (z.B. PtsG, MglAC oder ManXYZ; Details in [110, 174, 175]). Die Expression dieser Aufnahmesysteme (v.a. das Mlc-regulierte PtsG), bzw. ihre Regulation ist Gegenstand aktueller Forschung [176, 177, 178], siehe hierzu auch Abbildung 6.26. Es ist anzunehmen, daß die Glucoseaufnahme unter glucoselimitierten Bedingungen hauptsächlich über das PtsG erfolgt. Nach dem Glucosepuls, d.h. bei sehr hohen externen Glucosekonzentrationen, können jedoch durchaus PtsG, MglAC und ManXYZ parallel Glucose in die Zelle befördern.

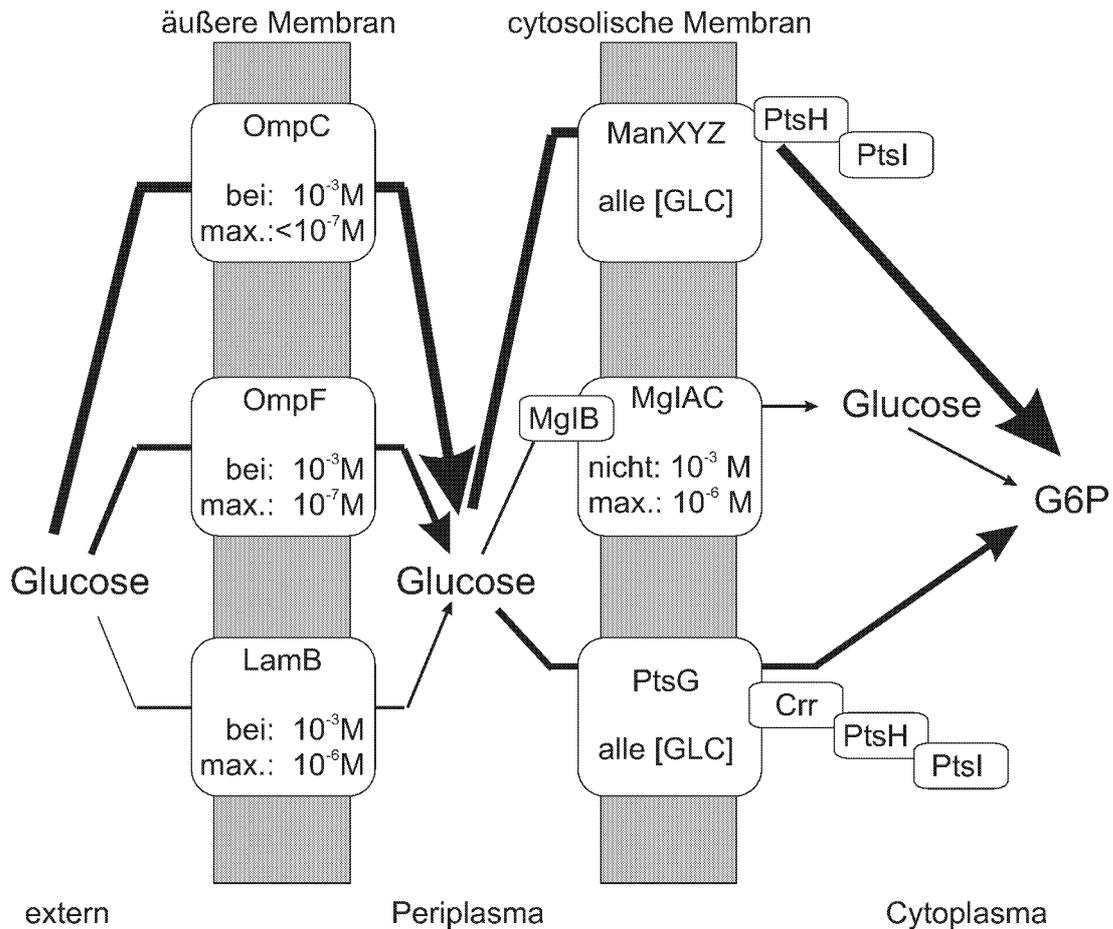


Abbildung 6.26.: Übersicht unterschiedlicher Glucose Aufnahmesysteme in *E. coli*, adaptiert nach [173]. Aufnahme von Glucose in Abhängigkeit von der externen Glucosekonzentration. Die breite Linie zeigt den optimalen Aufnahmeweg bei hohen Glucosekonzentrationen, die mittlere Linie bei sowohl hohen als auch niedrigen, und die dünne Linie bei micromolaren Glucosekonzentrationen im Medium. Details in [110, 174, 175].

6.7.2. Glucosepulsexperiment *E. coli* 3pMK7 [GLC/GLC pts(-)]

Um den Einfluß des PEP-abhängigen Phosphotransferasesystems (PEP:PTS) auf die intrazelluläre Dynamik zu bestimmen, wurde ein Pulsexperiment mit dem gentechnisch veränderten Stamm *E. coli* 3pMK7 durchgeführt. Da das PTS in diesem Stamm deletiert wurde, muß der Transport von Glucose in die Zelle sowie deren Verstoffwechslung zu G6P auf einem anderen Wege erfolgen. Hierfür ist ein plasmidaler Glucosefacilitator (*glf*) sowie eine Glucokinase (*glk*) aus *Z. mobilis* in den Stamm eingebunden worden [64] (siehe Abbildung 6.27). Im Gegensatz zu *E. coli* K12 sollte bei *E. coli* 3pMK7 nicht eine PEP-, sondern eine ATP-Abhängigkeit der Glucoseverstoffwechslung zu beobachten sein.

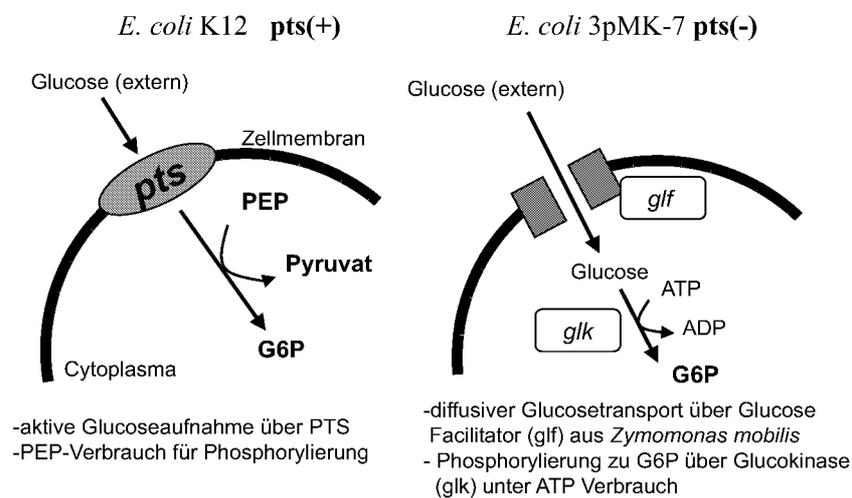


Abbildung 6.27.: Unterschiede in der Glucoseaufnahme in *E. coli* K12 pts(+) und *E. coli* 3pMK7 pts(-)

Unter den gleichen chemostatischen Bedingungen wie auch für den Stamm *E. coli* K12 ist mit dem pts(-)-Stamm *E. coli* 3pMK7 eine 16% höhere Biomasse erzielt worden, wobei der Sauerstoffbedarf der Zellen um ca. 25% unter dem von *E. coli* K12 lag. Diese höhere "Stoffwechseleffektivität", sowohl in Bezug auf Biomasse als auch auf Proteinproduktion, ist auch von anderen PtsG-Mutanten bekannt (siehe [179]).

6.7.2.1. Pulsaufgabe

Nach 7 Verweilzeiten des Systems im glucoselimitierten Fließgleichgewichtszustand erfolgte eine Anregung durch pulsartige Zugabe einer konzentrierten Glucoselösung wie beschrieben in Abschnitt 6.7.1.1. Eine Verstoffwechslung der Glucose ist (analog zum Experiment mit *E. coli* K12) anhand der Abnahme der gelösten Sauerstoffkonzentration nach dem Substratpuls deutlich. Vergleicht

man jedoch diese beiden Experimente miteinander, so ist eine um den Faktor 2,4 höhere Sauerstoffaufnahme nach dem Glucosepuls für *E. coli* 3pMK7 zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf des Experiments sieht man auch eine deutlich höhere Produktion von CO₂. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die erhöhte Atmungsaktivität des pts(-)-Stammes bedingt ist durch die Notwendigkeit, ATP mittels der Atmungskette für die Glucoseverstoffwechslung zur Verfügung zu stellen.

6.7.2.2. Dynamik intrazellulärer Metabolite

Der starke Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration nach dem Substratpuls resultiert in einer verstärkten Aufnahme und anschließende Verstoffwechslung von Glucose. Dies wird sehr deutlich durch den Verlauf der intrazellulären G6P Konzentration belegt, welche innerhalb der ersten Sekunde auf 2 mM ansteigt (Abbildung 6.28a). Da in *E. coli* 3pMK7 der Glucosetransport in die Zelle nicht über ein PTS, sondern diffusiv über einen Glucosefacilitator erfolgt, ist eine Abnahme der PEP Konzentration nicht zu erwarten und wird auch nicht beobachtet. Für die Glucoseaufnahme in diesem Stamm ist ein K_M (Glucose) = 4,1 mM und ein $V_{max} = 410 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (bei 30°C) bestimmt worden [65].

Die Phosphorylierung der Glucose erfolgt durch eine Glucokinase, wobei der Phosphatrest von einem ATP übertragen wird. Bei verstärkter Aufnahme und Konvertierung von Glucose zu G6P sollte folglich eine Abnahme der ATP Konzentration zu beobachten sein, was auch der Fall ist (Abbildung 6.30e). Interessanterweise sieht man jedoch auch eine stufenweise Abnahme der ATP Konzentration, was womöglich darauf hindeutet, daß ATP schneller verbraucht wird als es wieder regeneriert werden kann. Eine Limitierung des für die Phosphorylierung von Glucose benötigten ATP ist möglicherweise auch der Grund für die Abnahme des G6P Pools im Zeitraum von 3 bis 7 s. Dieser Peak im Verlauf der intrazellulären G6P Konzentration (1 bis 7 s) findet sich auch im F6P- (2 bis 10 s, Abbildung 6.28b) und FBP-Verlauf (6 bis 13 s, Abbildung 6.28c) wieder. Sowohl DHAP als auch GAP weisen einen ähnlichen Peak zwischen 11 und 20 s auf (Abbildung 6.28d,e). Dieser Kohlenstoffpeak verbreitert sich zunehmend von G6P bis zum DHAP-GAP Knotenpunkt. Im unteren Teil der Glycolyse ist diese Dynamik nicht mehr eindeutig zuzuordnen.

Der PEP Verlauf streut stark zwischen 1,5 und 3 mM (Abbildung 6.29b). Im Hinblick auf den Verlauf von Pyruvat (Abbildung 6.29c), mit einem leichten Anstieg nach ca. 10 s, ist von einer Dynamik nicht auszugehen. Wie schon in Abschnitt 6.7.1.2 erwähnt, stellt der Übergang von Glycolyse zu Citratcyclus ein äußerst komplexes Netzwerk an Reaktionen dar, was eine Interpretation der beteiligten Metabolit-Verläufe an diesem Knotenpunkt bisher verhindert hat.

Die Umstellung der Abhängigkeit der Glucoseaufnahme und -verstoffwechslung von PEP zu ATP in dem Stamm *E. coli* 3pMK7 hat nicht nur eine lokale, limitierte Auswirkung auf die Substrataufnahme. Im Ver-

6. Ergebnisse und Diskussion

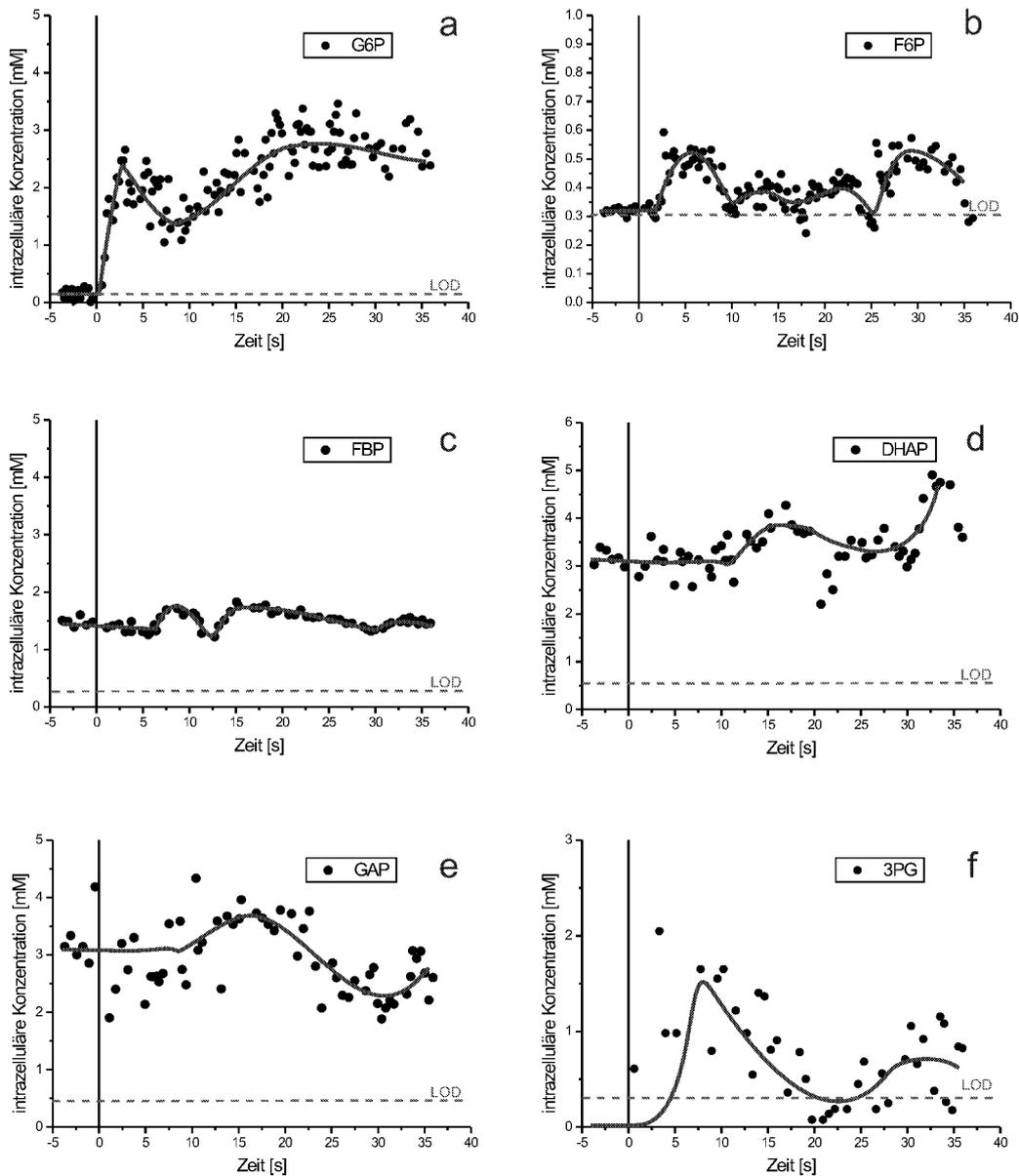


Abbildung 6.28.: GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabolite

gleich zu den intrazellulären Metabolitdynamiken im GLC/GLC-Pulsexperiment wird ein globaler Einfluß dieser genetischen Veränderungen auf den gesamten Stoffwechsel deutlich. Dies ist womöglich verstärkt bedingt durch die doppelt so hohen PEP-Konzentrationen im pts(-)-Stamm. PEP ist ein wichtiger Precursor (z.B. Aromatenbiosynthese) und spielt in zahlreichen anaplerotischen Reaktionen eine entscheidende Rolle, was mitunter die 16% höhere Biomasseausbeute im

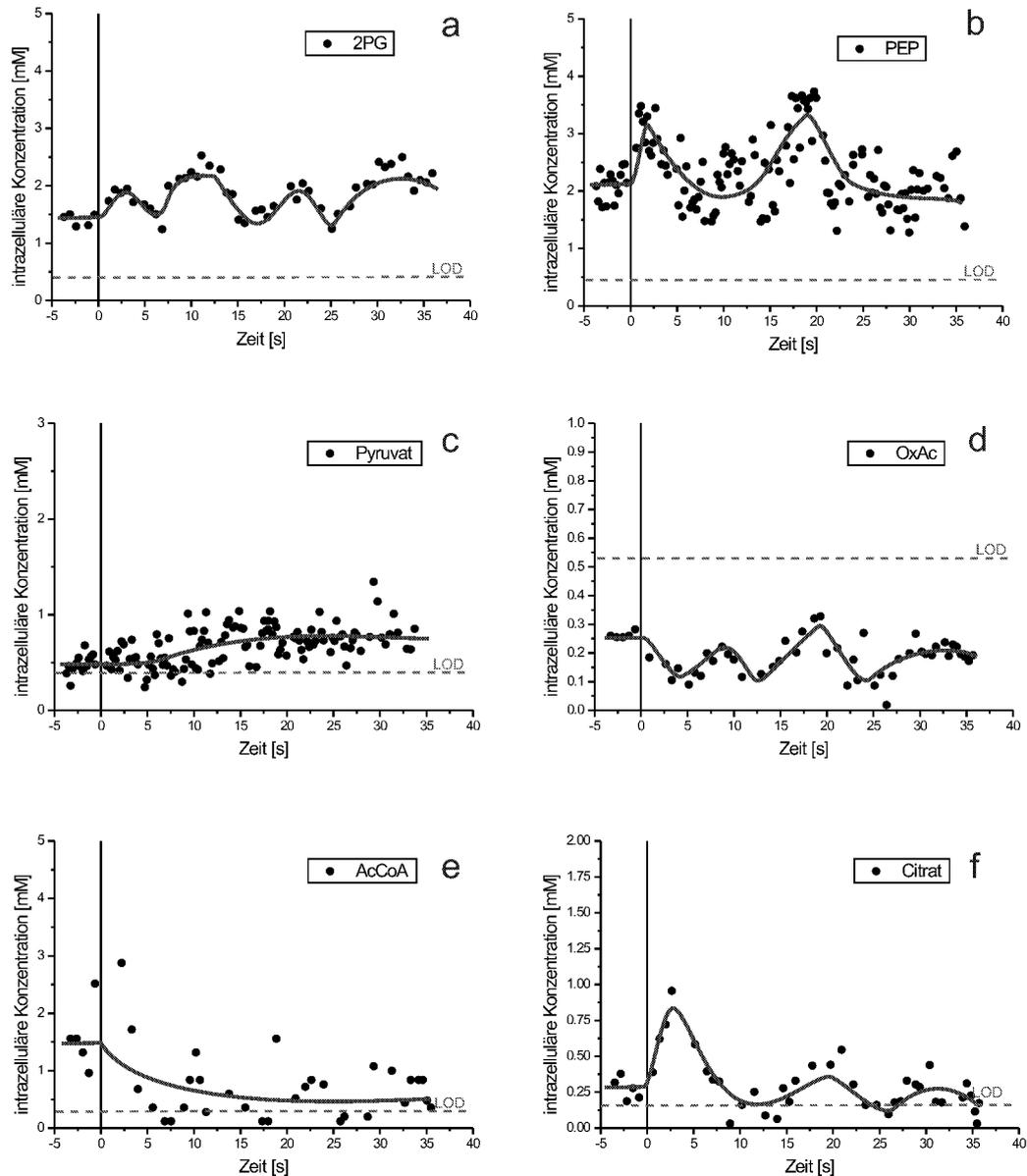


Abbildung 6.29.: GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabolite

Vergleich zu *E. coli* K12 erklären würde. Die Kombination einer erhöhten PEP-Verfügbarkeit mit einer starken Abhängigkeit der Substrataufnahme von ATP macht Interpretationen jedoch schwierig, da zwei sehr unterschiedliche Effektoren berücksichtigt werden müssen.

Ein starker Unterschied zwischen *E. coli* K12 und 3pMK7 zeichnet sich in den intrazellulären Konzentrationen der Pentosephosphatwegmetabolite 6PG und

6. Ergebnisse und Diskussion

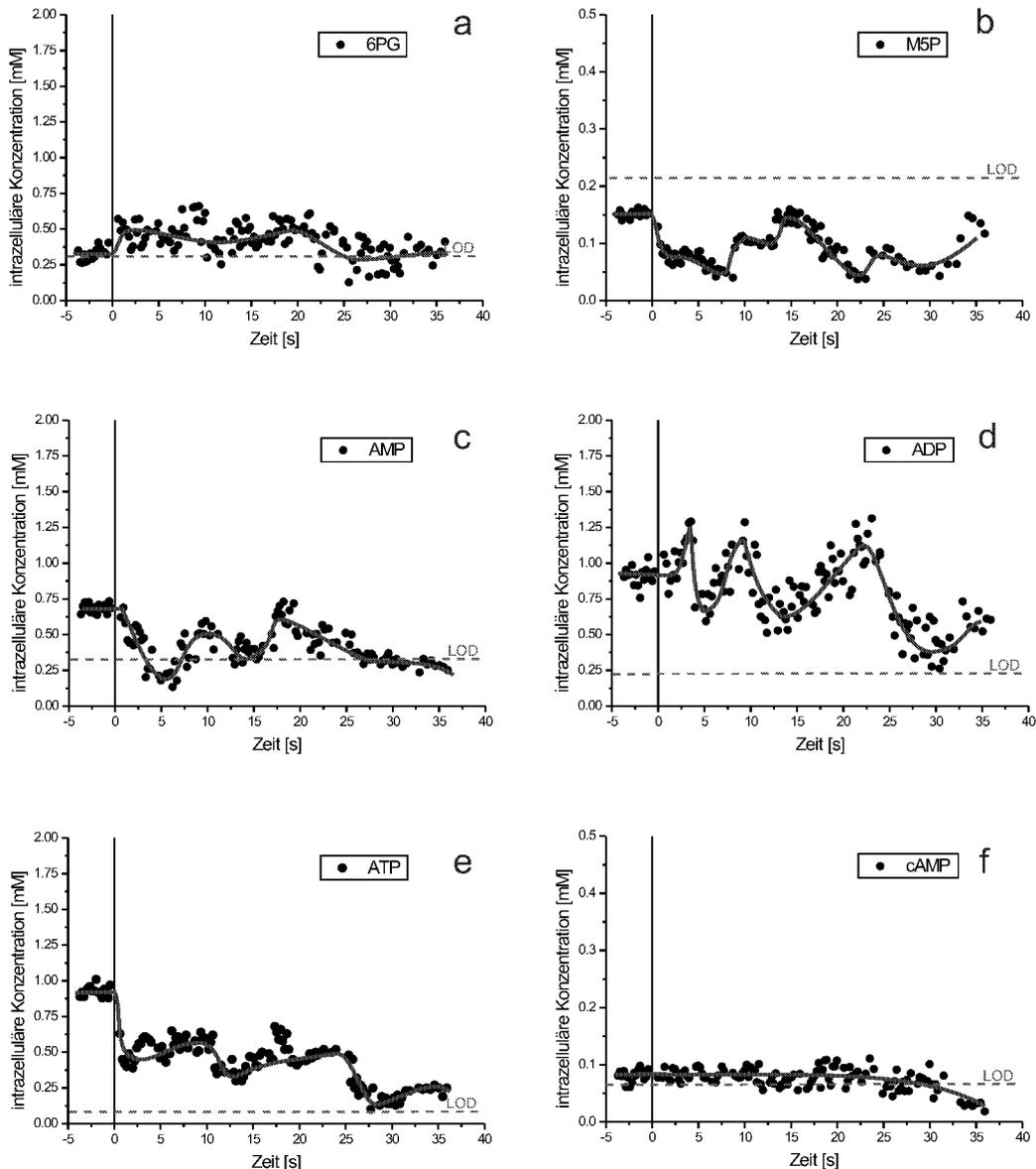


Abbildung 6.30.: GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabolite

M5P ab (Abbildung 6.30a,b). Diese liegen für den pts(-)-Stamm nahe der Nachweisgrenze; in *E. coli* K12 hingegen sind die Konzentrationen sehr viel höher. Dies könnte einen geringeren Fluß in den Pentosephosphatweg im pts(-)-Stamm bedeuten. Der Kohlenstoffpeak, welcher sich von G6P über F6P zu FBP in *E. coli* 3pMK7 fortpflanzt, ist nicht in den Metaboliten des Pentosephosphatweges wiederzufinden. Die geringe Nutzung des Pentosephosphatweges könnte bedingt

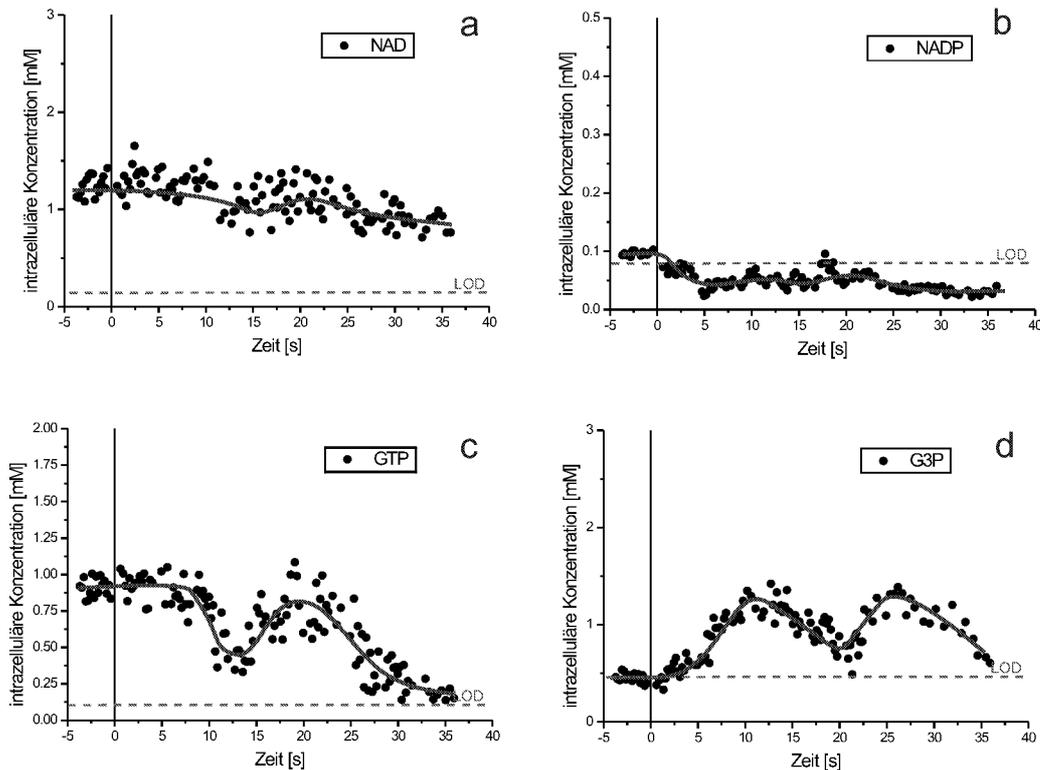


Abbildung 6.31.: GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabolite

sein durch eine verstärkte Nutzung des Citratcyclus. Mit einem stöchiometrischem Stoffwechselmodell von *E. coli* konnte gezeigt werden, daß die NADPH-Produktion durch den Pentosephosphatweg mit ansteigendem ATP-Bedarf für Maintenance (bzw. in diesem Fall für die Substrataufnahme) weniger wichtig wird [180]. Dies wird dadurch verursacht, daß sich der Stofffluß durch den Citratcyclus bei steigendem ATP-Bedarf erhöht und somit auch die NADPH Produktion durch die Isocitrat Dehydrogenase größer wird. Diese Entlastung des Pentosephosphatweges zu Lasten des Citratcyclus äußert sich in den sehr viel geringeren Konzentrationen der Citratcyclus-Metabolite Acetyl-CoA, Oxalacetat und Citrat im pts(-)-Stamm (Abbildung 6.29e,d,f).

Eine vergleichende Modellierung unterschiedlicher Szenarien der Stoffflußverteilung zwischen Glycolyse, Pentosephosphatweg und Citratcyclus würde hier konkrete Aussagen gestatten. Ebenso müssten in zukünftigen Pulsexperimenten alle Metabolite des Citratcyclus gemessen werden um eine modelltechnische Erfassung dieses Stoffwechselweges zu ermöglichen. Zum jetzigen Zeitpunkt läßt sich die Aussage bestätigen, daß die Stoffflußverteilung zwischen Glycolyse, PPP und Citratcyclus stark durch die Verfügbarkeit von Energieäquivalenten (z.B.

ATP) und Reduktionsäquivalenten (z.B. NADPH) beeinflusst wird [181, 123].

Die Adenylate Energy Charge (siehe Gleichung 6.2) ist ein Maß für den Gesamtenergetischen Zustand der Zelle. Ein Vergleich der AEC während der Pulsexperimente für beide Stämme (siehe Abbildung 6.32) weist erstaunlicherweise nur geringe Abweichungen innerhalb der ersten 25 s auf. Obwohl beide Stämme vollkommen unterschiedliche energetische Ansprüche (v.a. im Bezug auf das Substrataufnahmesystem) besitzen, sind die Verläufe, abgesehen von einem erhöhten Gesamtwert für den pts(-)-Stamm nahezu identisch. Erst nach 25 s, zeitgleich mit der dritten starken Abnahme der ATP-Konzentration im pts(-)-Stamm, sind Unterschiede in der AEC offensichtlich. Eine Erklärung für dieses Verhalten steht noch aus. Generell liegen die ermittelten Werte im Bereich der in der Literatur publizierten Daten [182, 183].

$$AEC = \frac{[ATP] + 0.5 \cdot [ADP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]} \quad (6.2)$$

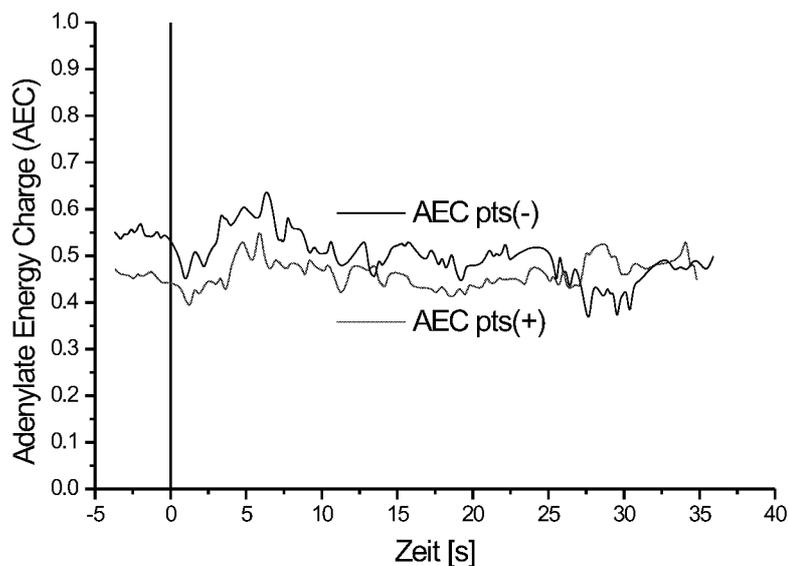


Abbildung 6.32.: Adenylate Energy Charge während der Pulsexperimente für pts(-) und pts(+) Stamm

6.7.3. Glycerolpulsexperiment *E. coli* K12 [GLY/GLY]

Neben Glucose ist Glycerol eines der häufigsten Substrate für die Kultivierung von *E. coli*, vor allem im Bereich der Hochzell-dichtefermentation [184, 185] und der Produktion rekombinanter Proteine [186]. Die Verstoffwechslung unterscheidet sich jedoch wesentlich von der Kohlenstoffquelle Glucose (siehe z.B. [35, 186, 187, 188, 189, 190]), so daß eine Quantifizierung und Modellierung dieses Verhaltens von hohem Interesse ist.

Die Analytik des Glycerol-Glycerol (GLY/GLY) Pulsexperimentes (wie auch des Glycerol-Glucose Pulsexperimentes, siehe Seite 116) mit dem Stamm *E. coli* K12 erfolgte über enzymatische Assays, bzw. einer UV-HPLC Methode. Zum Zeitpunkt dieser Versuche war eine LC-MS Analytik noch nicht vollständig etabliert.

6.7.3.1. Pulsaufgabe

Nach 7,5 Verweilzeiten des Systems im glycerollimitierten Fließgleichgewichtszustand erfolgte eine Anregung durch pulsartige Zugabe von 71 ml einer 4,6 M Glycerollösung (siehe Seite 26). Innerhalb von 630 ms (Mischzeit Θ_{90}) wird so die Konzentration des Substrats von unterhalb der Nachweisgrenze auf 40 mM erhöht (siehe Abbildung 6.35e).

Durch die hohe Glycerolaffinität von *E. coli* ($K_S = 7,4 \mu\text{M}$ [112], bzw. normale Diffusion bei Glycerolkonzentrationen $> 10 \text{ mM}$, s.u.) wird die Glycerolimitierung jedoch bereits nach $< 100 \text{ ms}$ aufgehoben (siehe auch Seite 55).

6.7.3.2. Dynamik intrazellulärer Metabolite

Glycerol wird im Gegensatz zu Glucose über erleichterte Diffusion [191] in die Zelle aufgenommen und dort über eine Glycerolkinase unter Verbrauch von ATP zu G3P phosphoryliert. Das niedrige Konzentrationsniveau von G3P (Abbildung 6.33e) im Fließgleichgewichtszustand bei Wachstum auf Glycerol korreliert mit Ergebnissen, wonach eine hohe G3P-Konzentration zu einer lethalen Akkumulation von Methylglyoxal (aus DHAP) in den Zellen führt [27]. Die erhöhte Substrataufnahme und Umsetzung zu G3P nach dem Glycerolpuls ist deutlich sowohl am Anstieg des G3P Pools als auch an der Abnahme der ATP Konzentration zu erkennen (Abbildung 6.35d). Hierbei muß jedoch auch berücksichtigt werden, daß bei externen Glycerolkonzentrationen $> 10 \text{ mM}$ (wie sie nach dem Substratpuls vorliegen) nicht nur eine "erleichterte", sondern auch eine "normale" Diffusion stattfindet¹⁴ [64]. Zwischen 0 und 2,5 s reagiert Glycerol zu G3P unter ATP Verbrauch. Im Zeitraum zwischen 2,5 und 5 s nimmt die G3P Konzentration jedoch

¹⁴Im Unterschied zur (passiven) Diffusion gelangt das Substrat bei der erleichterten Diffusion über einen spezifischen Carrier durch die Cytoplasmamembran. Sie ist reversibel, erfordert keinen Energieaufwand und führt zu einem Konzentrationsausgleich.

wieder ab, höchstwahrscheinlich durch eine ATP-Limitierung. ATP erreicht zu diesem Zeitpunkt ein Minimum bei 0,5 mM. Erst wenn ein leichter Anstieg der ATP Konzentration zu verzeichnen ist, womöglich durch Regeneration aus ADP (Abbildung 6.35c) bzw. in den glycolytischen Reaktionen zu 3PG und Pyruvat (Abbildung 6.33f, 6.34c) oder über die Atmungskette, steigt auch wieder die intrazelluläre G3P Konzentration an (Zeitraum 5 bis 11 s). Eine erneute, leichte Abnahme des G3P Pools zwischen 20-26 s ist wiederum bedingt durch eine ATP Limitierung. Nach ca. 17 s sinkt die ATP Konzentration auf ca. 0,25 mM und könnte so die Aktivität der Glycerolkinase herabsetzen. Einen weiteren Einfluß auf die Dynamik des G3P Pools hat auch die intrazelluläre FBP Konzentration (Abbildung 6.33b). FBP inhibiert die Glycerolkinase allosterisch [27, 192] und steigt nach 5 s auf einen Wert von 0,5 mM. Die Konzentration klingt im Verlauf der nächsten 30 s auf unterhalb der Nachweisgrenze ab; in diesem Zeitraum ist auch ein Anstieg des G3P Pools zu verzeichnen.

Die schnelle Abnahme des G3P Pools im Bereich von 2,5 bis 5 s läßt auf eine schnelle Folgereaktion zum DHAP schließen.

Die weitere Verstoffwechslung erfolgt gluconeogenetisch (über FBP und F6P zu G6P, Abbildung 6.33a), bzw. glycolytisch (über 3PG, 2PG, PEP und Pyruvat in den Citratcyclus, Abbildung 6.33f, 6.34a-e).

6.7. Untersuchungen des dynamischen Verhaltens

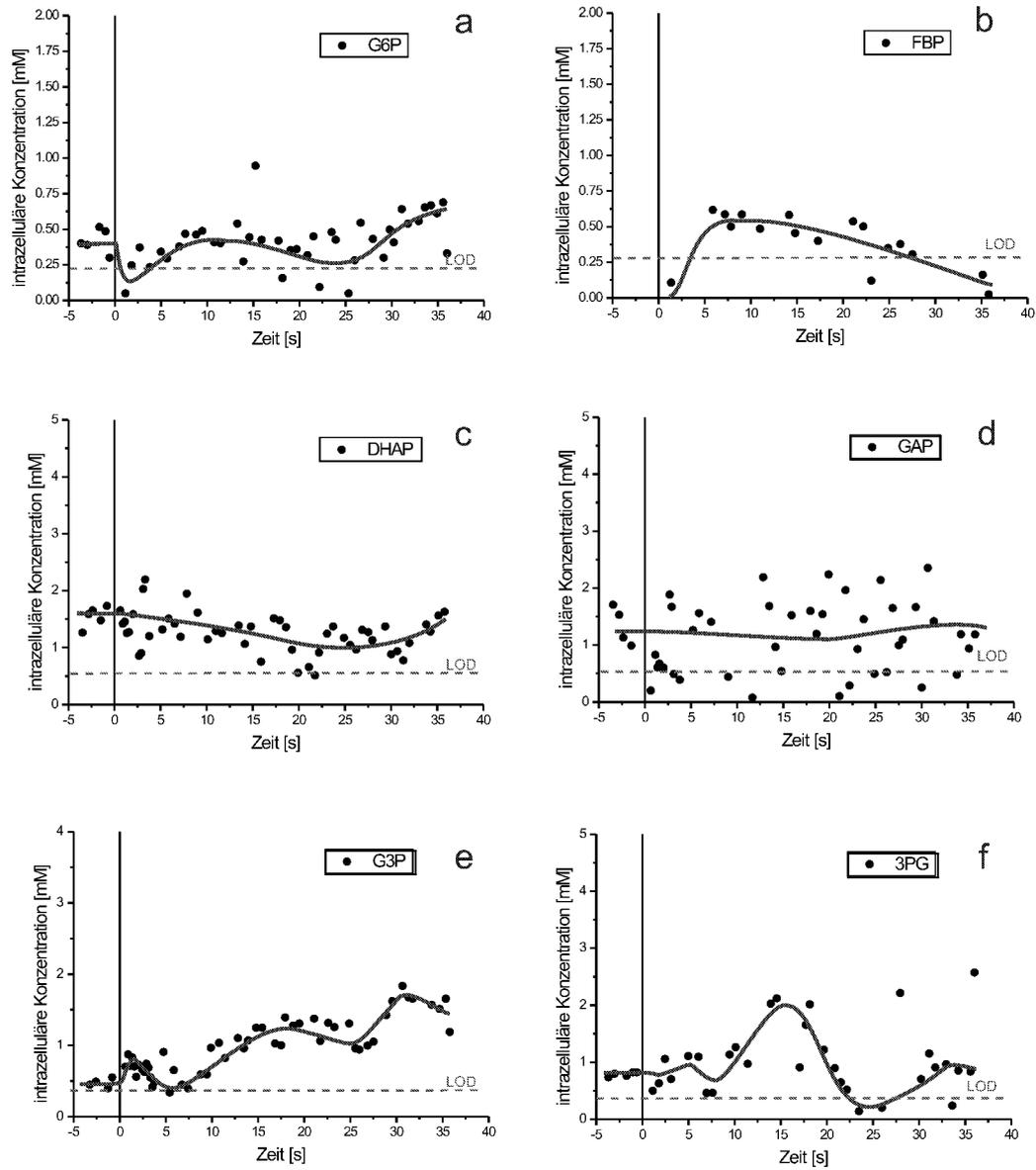


Abbildung 6.33.: GLY/GLY Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite

6. Ergebnisse und Diskussion

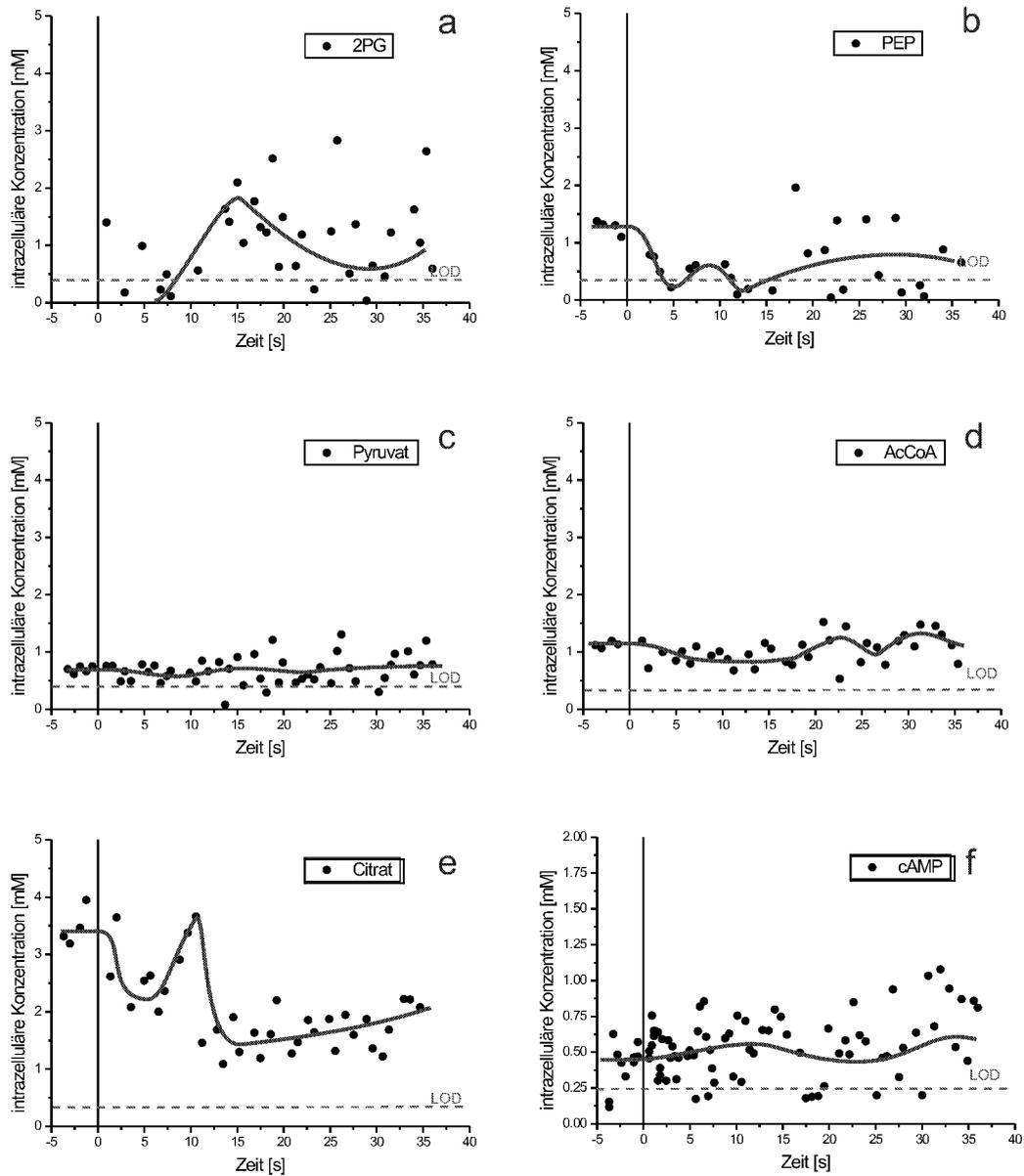


Abbildung 6.34.: GLY/GLY Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite

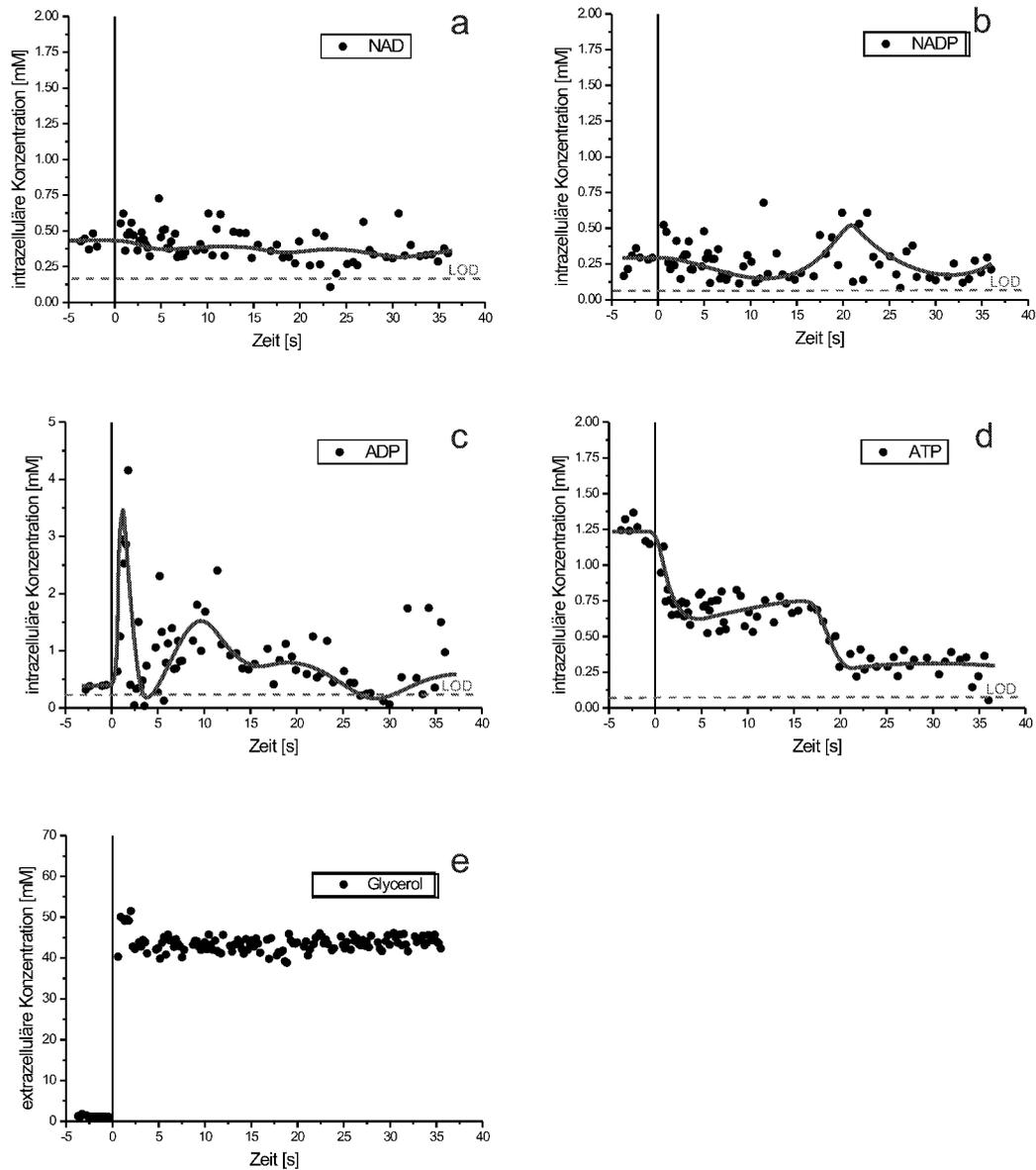


Abbildung 6.35.: GLY/GLY Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite (a-d) und der externen Glycerolkonzentration (e)

6.7.4. Glucosepulsexperiment *E. coli* K12 [GLY/GLC]

Wie im GLY/GLY-Pulsexperiment des vorangehenden Abschnitts dargelegt wurde, findet eine Verstoffwechslung des Substrats Glycerol über die Glycerol Kinase (GK) statt. Die GK wird sowohl durch FBP als auch durch das nicht-phosphorylierte Enzym III (E_{III}^{Glc}) des PTS inhibiert [192]. Aufgrund der hohen FBP-Konzentrationen im glucoselimitierten steady state sowie der starken Expression des PTS-Enzyms E_{III}^{Glc} ist keine signifikante Umstellung des Stoffwechsels von GLC zu GLY innerhalb des Versuchszeitraums von 40 s zu erwarten. Um eine Umstellung des bakteriellen Stoffwechsel zwischen diesen beiden Substraten zu untersuchen, ist daher nur der Übergang GLY zu GLC über eine schnelle Probenahmetechnik zugänglich.

6.7.4.1. Pulsaufgabe

Nach 7 Verweilzeiten des Systems im glycerollimitierten Fließgleichgewichtszustand erfolgte eine Anregung durch pulsartige Zugabe einer konzentrierten Glucoselösung (wie beschrieben in Abschnitt 6.7.1.1), so daß die Konzentration des Substrats von unterhalb der Nachweisgrenze auf 16 mM erhöht wird. Durch die hohe Glucoseaffinität von *E. coli* ($K_S \leq 10 \mu\text{M}$ für PtsG [110, 111]) ist die Glucoselimitierung jedoch bereits nach <100 ms aufgehoben.

Die extrazelluläre Glycerolkonzentration steigt 2,0 s nach dem Glucosepuls kontinuierlich mit $0,01 \text{ mM s}^{-1}$, woraus zu schließen ist, daß ab diesem Zeitpunkt die Glucoseaufnahme und somit die Glycolyse (statt der Gluconeogenese) stoffwechselbestimmend ist [85].

Wie auch in den vorangehenden Pulsexperimenten wird eine Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration nach dem Substratpuls verzeichnet.

6.7.4.2. Dynamik intrazellulärer Metabolite

Glycerol wird über das Enzym Glycerol Kinase zu Glycerol-3-phosphat (G3P) umgesetzt und hierüber auf der Höhe von DHAP in den Stoffwechsel eingebracht. Die Konzentrationen von G3P befindet sich während des gesamten Experiments in einem Bereich nahe der Nachweisgrenze (Abbildung 6.37f). Aus dem Verlauf der G3P Konzentration kann somit nicht abgeleitet werden, ob Glycerol nach dem Glucosepuls verstoffwechselt wird oder nicht. Glucose wird über das PTS als G6P in die Zelle aufgenommen und dem Stoffwechsel zugeführt. Direkt nach dem Glucosepuls bleibt die G6P Konzentration für 1,1 s konstant bei 0,47 mM und liegt somit auf dem Niveau des Fließgleichgewichtes (Abbildung 6.36a). Die Konzentration steigt im weiteren Verlauf innerhalb von 7 s auf 1,0 mM. Im weiteren Zeitraum der Probenahme ist ein konstanter Anstieg (bis etwa 1,4 mM) zu erkennen. Vergleicht man diesen Verlauf mit dem durchgeführten GLC/GLC Pulsexperimente (Abschnitt 6.7.1, Abbildung 6.21a) so zeigt sich, daß die in

diesem Experiment zugepulste Glucose in etwa im gleichen Maße in die Zelle aufgenommen wird, wenn auch wesentlich langsamer.

Die Aufnahme von G6P über das PTS ist mit der Übertragung einer Phosphatgruppe von PEP auf Glucose verbunden. Die intrazelluläre Konzentration von PEP befindet sich 1,6 s nach dem Glucosepuls auf dem Niveau des Fließgleichgewichtszustandes (Abbildung 6.37b). Dies korreliert mit der konstanten G6P-Konzentration in den ersten 1,1 s nach dem Glucosepuls. Im weiteren Verlauf des Pulsexperimentes konnte kein PEP mehr nachgewiesen werden. Bei der beobachteten Umstellung auf Glucose als Substrat muß bedacht werden, daß der Mikroorganismus bis zum Zeitpunkt des Glucosepuls den Stoffwechsel auf den Energiegewinn aus Glycerol als Substrat eingestellt hat. Innerhalb der ersten Sekunde ist kein Anstieg der G6P- bzw. Abfall der PEP-Konzentration zu erkennen. Eine mögliche Erklärung ist, daß in diesem Zeitraum Glucose nicht verstoffwechselt wird. Im weiteren Verlauf der G6P-Konzentration ist ein schneller Anstieg auf 1,0 mM (7 s nach dem Glucosepuls) und ab dann ein langsamer Anstieg bis zum Ende des Pulsexperimentes zu erkennen. Dies deutet darauf hin, daß die zur Verfügung stehende Menge an PEP nicht ausreichend ist, um genügend Glucose über das PEP:PTS in die Zelle einzuschleusen. Die Stoffwechselaktivität wird so weit angeregt, daß das gesamte aufgenommene Substrat sofort bis zum Stoffwechselmetabolit PEP umgesetzt wird, um weitere Glucose in die Zelle zu transportieren.

Eine weitere mögliche Erklärung des langsamen G6P-Anstieges liegt in der Induzierbarkeit des Enzyms E_{II} des PTS [193]. Liegt dieses unter den Bedingungen des glycerollimitierten Chemostaten in geringen Konzentrationen in der Zelle vor, so kann die Aufnahme von Glucose durch diesen Effekt zusätzlich erschwert werden. Die intrazellulären Konzentrationen der Enzyme E_I und HPr können je nach Wachstumsbedingungen um das 2-3fache variieren [194]. Die Voraussetzung für eine vollständige Induktion der PTS-Enzyme E_I und HPr bei Wachstum auf Glucose ist die Anwesenheit des Enzyms E_{II} [195, 196, 194]. Somit kann die langsame Aufnahme von Glucose bei vorherigem Wachstum auf Glycerol auch auf ein nicht in ausreichendem Maße vorhandenes, bzw. aktives PTS zurückgeführt werden (siehe hierzu auch Mlc-Regulation PtsG [176, 177, 178]).

Dihydroxyacetonphosphat (DHAP, Abbildung 6.36d) kann über den Abbau von Glucose über die Glycolyse oder durch die Verstoffwechslung von Glycerol über die Umsetzung von G3P zu DHAP gebildet werden. Aus dem Verlauf der intrazellulären Konzentration von G3P kann nicht detektiert werden, inwieweit Glycerol direkt nach einem Glucosepuls noch verstoffwechselt wird bzw. zu welchem Zeitpunkt die allosterische Inhibierung der Glycerol-Aufnahme durch Verstoffwechslung von Glucose eintritt. Im Verlauf der DHAP-Konzentration ist zu sehen, daß die Konzentration von 0,8 mM im steady state innerhalb von ca. 620 ms nach dem Glucosepuls auf einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze abfällt. Da die Konzentration von G6P innerhalb der ersten 1,1 s nicht ansteigt und somit DHAP in diesem Zeitraum nicht aus der Verstoffwechslung von Glu-

cose entsteht, kann vermutet werden, daß die Inhibierung der Aufnahme von Glycerol innerhalb der ersten 620 ms eintritt. Der weitere Verlauf ist durch einen konstanten Anstieg der DHAP-Konzentration gekennzeichnet. Der Anstieg der DHAP-Konzentration korreliert mit dem der G6P-Konzentration (d.h. der Verstoffwechslung von Glucose), der ab 1,1 s nach dem Glucosepuls zu erkennen ist. Die intrazelluläre Konzentration von GAP weist, wie auch 3PG, über den gesamten Verlauf des Experiments eine starke Streuung auf, welche eine Interpretation erschweren. Die intrazellulären Konzentrationen der Metabolite GAP und 3PG streuen stark um den Wert 2,3 mM (GAP, Abbildung 6.36e), bzw. 1,5 mM (3PG, Abbildung 6.36f).

2-Phosphoglycerat konnte weder im Fließgleichgewichtszustand noch während der dynamischen Anregung detektiert werden. Das niedrige Konzentrationsniveau während des Pulsversuches läßt sich mit der Tatsache erklären, daß *E. coli* durch die Verstoffwechslung von Glucose einen hohen Bedarf an Phosphoenolpyruvat hat. Die Umsetzung von 2PG zu PEP über das Enzym Enolase könnte unter diesen Bedingungen so schnell ablaufen, daß kein 2PG nachweisbar ist.

Pyruvat entsteht in der Glycolyse durch Umsetzung von PEP durch Pyruvat Kinase, aber auch im PTS durch die Übertragung der Phosphatgruppe von PEP auf HPr durch das Enzym E_I . Die Aufnahme von Glucose in die Zelle ist somit mit der Bildung von Pyruvat verbunden. Der relativ langsame Anstieg der Pyruvat-Konzentration (Abbildung 6.37c) bis 18 s nach dem Glucosepuls korreliert mit dem langsamen Anstieg der G6P-Konzentration. Da Pyruvat bei der Phosphorylierung von Glucose mittels PEP entsteht, ist auf eine kontinuierliche Verstoffwechslung von PEP zu schließen. Der Fluß durch diesen Pool scheint so hoch zu sein, daß keine freies PEP intrazellulär detektierbar ist.

Der Verlauf der intrazellulären AcCoA-Konzentration (Abbildung 6.37e) ist durch einen konstanten Abfall der Konzentration nach dem Glucosepuls gekennzeichnet welcher mit einem ähnlichen Verlauf der intrazellulären Citrat-Konzentration korreliert (Abbildung 6.37d).

6.7. Untersuchungen des dynamischen Verhaltens

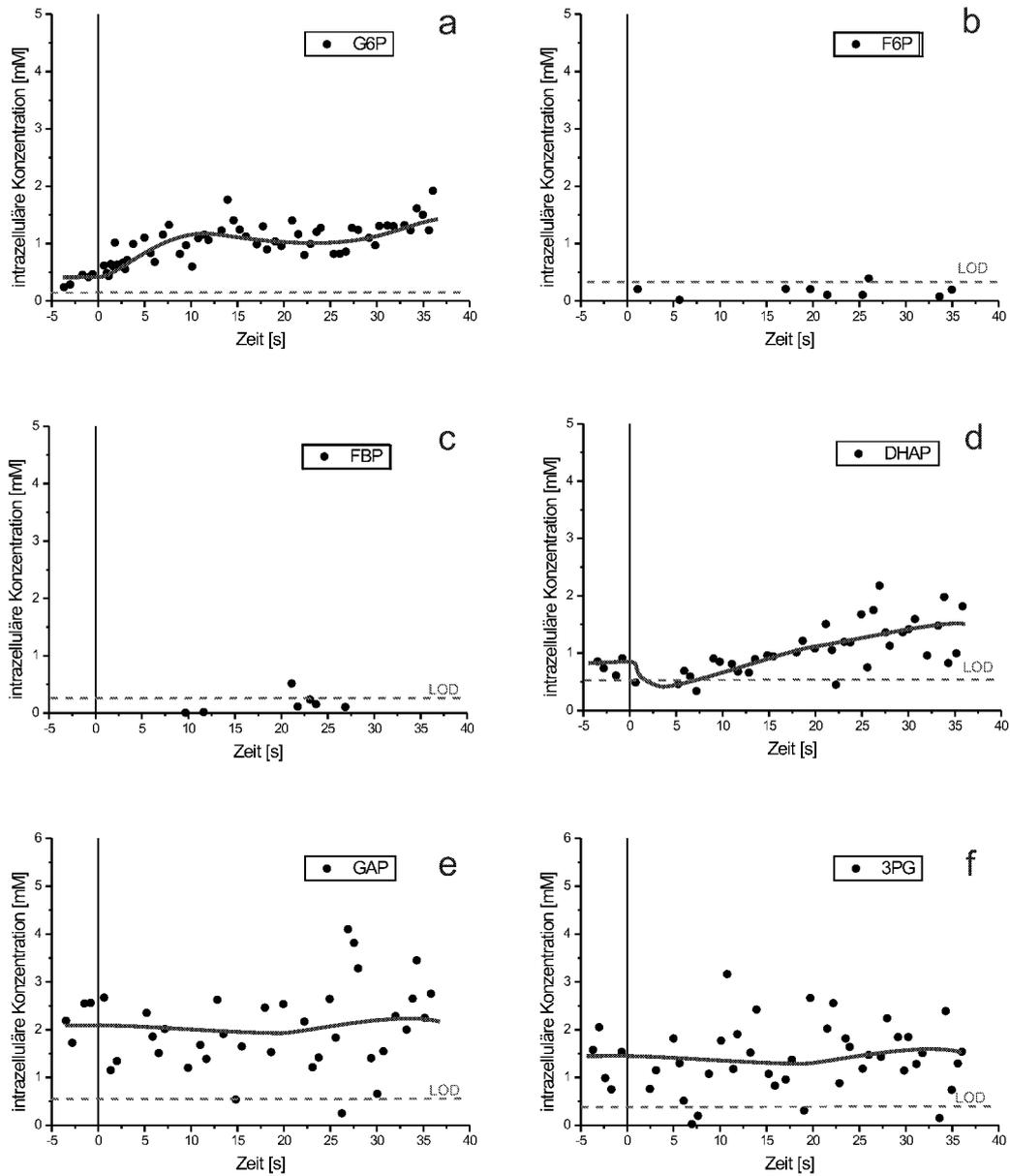


Abbildung 6.36.: GLY/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite

6. Ergebnisse und Diskussion

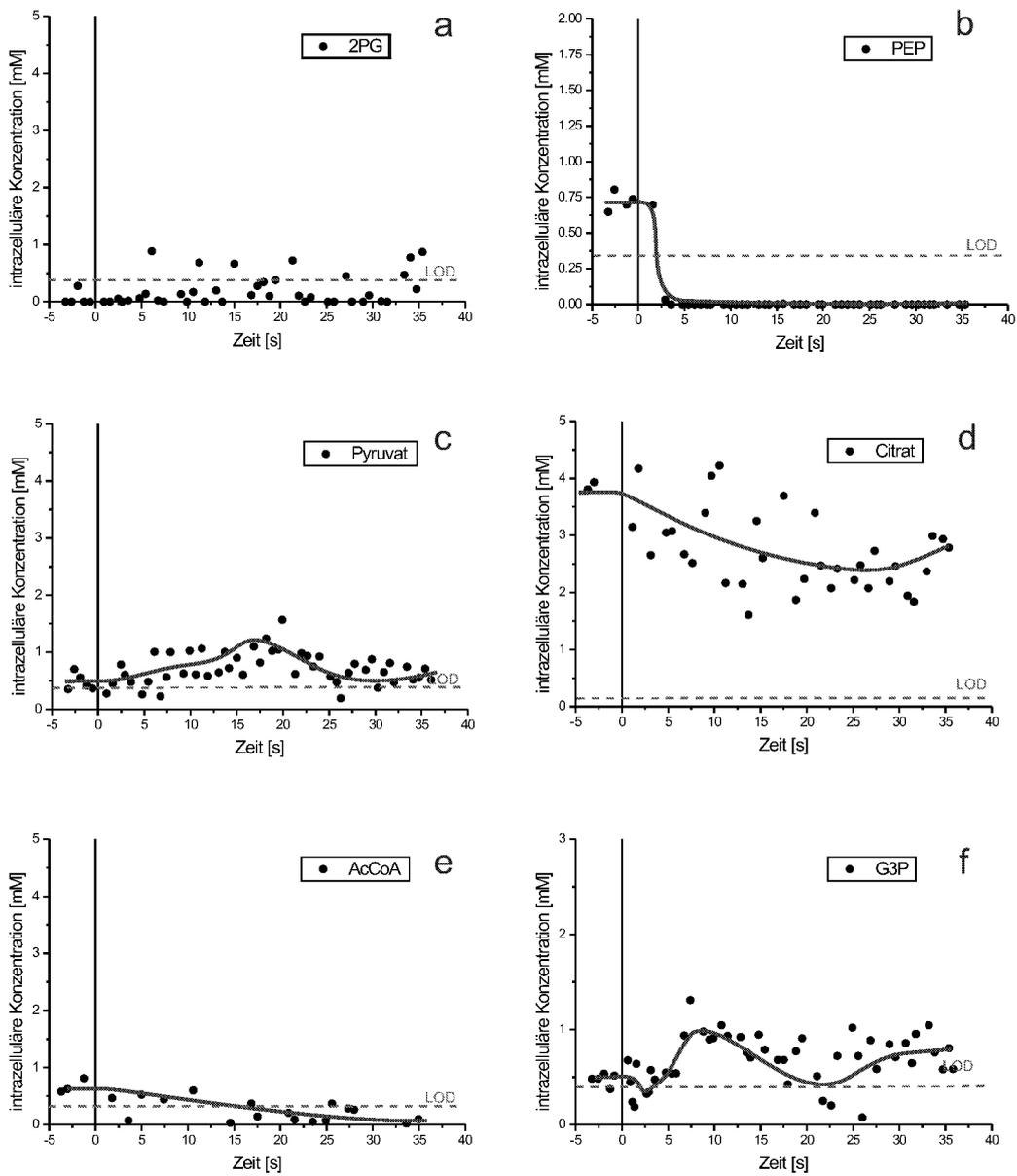


Abbildung 6.37.: GLY/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite

6.7.5. Vergleich der Metabolitdynamiken

6.7.5.1. Glucosepulsexperiment *E. coli* K12 [GLC/GLC pts(+)]

Anhand des GLC/GLC-Pulsexperimentes läßt sich der aus der Literatur bekannte Zusammenhang PEP-G6P während der Aufnahme von Glucose über das PTS gut nachvollziehen. Die durch die Pulszugabe verursachte Dynamik der Metabolitkonzentrationen spiegelt sich in den G6P und F6P Pools wieder, wird jedoch anscheinend durch die Phosphofruktokinase ($F6P \rightarrow FBP$) stark reguliert¹⁵. Das GLC/GLC-Pulsexperiment stellt die Ausgangsposition für den Vergleich mit anderen Pulsexperimenten dar.

6.7.5.2. Glucosepulsexperiment *E. coli* 3pmK7 [GLC/GLC pts(-)]

Im Unterschied zum GLC/GLC-Pulsexperiment mit *E. coli* K12 wurde bei diesem Versuch die PEP-Abhängigkeit der Glucoseaufnahme durch Verwendung eines gentechnisch veränderten Stammes aufgehoben. Die erhöhte PEP-Verfügbarkeit sowie die Metabolitverläufe, v.a. die intrazelluläre ATP Konzentration, spiegeln diese veränderte Stoffwechselsituation wider. Vorteilhaft bei diesem Experiment ist die Tatsache, daß die Dynamik nur an einer Stelle ansetzt (G6P Pool) und nicht wie beim pts(+)-Stamm in zwei getrennten Bereichen des Stoffwechsels (G6P und PEP Pool) statt findet.

6.7.5.3. Glycerolpulsexperiment *E. coli* K12 [GLY/GLY]

Das Wachstum auf Glycerol unterscheidet sich wesentlich von der Verstoffwechslung von Glucose. Diese Unterschiede spiegeln sich sowohl im Proteom als auch im Metabolom wieder. Zum einen konnte über 2D-Gelelektrophorese eine sehr viel stärkere Expression der Glycerol Kinase (GK) nachgewiesen werden (siehe Seite 143), welche für die Reaktion von Glycerol zu G3P verantwortlich ist. Aus der Literatur ist fernerhin bekannt, daß bei Wachstum auf C-3 Kohlenstoffquellen (z.B. Glycerol), ein Isoenzym der Aldolase ($FBP \rightleftharpoons DHAP + GAP$), die Aldolase II, vorhanden ist. Es wird postuliert, daß Aldolase II primär der Gluconeogenese dient und Aldolase I hauptsächlich der Glycolyse [198]. Aufgrund dieser sehr starken Unterschiede im Proteom von *E. coli* bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen ist ein direkter Vergleich zwischen GLY/GLY- und GLC/GLC-Pulsexperimenten nicht sinnvoll. Die Stoffwechselsituationen müssen unabhängig von einander betrachtet werden.

Das GLY/GLY-Pulsexperiment zeichnet sich durch eine starke Abhängigkeit der Substrataufnahme von der ATP-Konzentration aus. Eine ähnliche Situation,

¹⁵Streng genommen trifft diese Argumentation nur auf die PFK-1 zu, welche für 90% der Aktivität dieser Reaktion zuständig ist. *E. coli* besitzt ein Isoenzym der Phosphofruktokinase (PFK-2), deren regulatorische Eigenschaften sich stark von denen der PFK-1 unterscheiden (z.B. keine Inhibierung durch PEP) [197]

wenn auch mit einer unterschiedlichen Kohlenstoffquelle, ist vom GLC/GLC-Pulsexperiment mit *E. coli* 3 pMK7 bekannt. Interessanterweise ähneln sich die Dynamiken der ATP Verläufe sehr stark. Bei beiden Experimenten beläuft sich die erste Abnahme der ATP-Konzentration auf ca. 0,5 mM. Im weiteren Verlauf ist bei beiden Pulsexperimenten ein leichter Anstieg, gefolgt von einer weiteren stufenförmige Abnahme zu beobachten. Eine denkbare Erklärung wäre eine in beiden Stoffwechselsituationen ähnliche Regeneration des ATP Pools. Da ATP von zentraler Bedeutung für den Stoffwechsel ist, könnte diese Regeneration (sowohl über die Atmungskette als auch über die Glycolyse) eventuell einer globalen Regulation unterworfen.

6.7.5.4. Glycerolpulsexperiment *E. coli* K12 [GLY/GLC]

Die Umstellung der Substrataufnahme von Glycerol auf Glucose ist bei dem GLY/GLC-Pulsexperiment beobachtet worden. Charakteristisch für diese Stoffwechselsituation ist die starke Limitierung des für die Glucoseaufnahme über das PEP:PTS benötigten PEP. Dies bedingt eine im Vergleich zu den anderen Versuchen sehr geringe Aufnahmerate des Substrats (ersichtlich aus einem geringen Anstieg der intrazellulären G6P Konzentration).

6.8. Modellierung des dynamischen Verhaltens

Mit den aus Pulsexperimenten ermittelten Konzentrations-Zeit-Verläufen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jochen Hurlebaus und Dipl.-Chem. Daniela Degenring versucht, die gemessenen Metabolitdynamiken über eine mathematische Modellierung¹⁶ wiederzugeben. Dies erweist sich als schwierig, da zum einen die Datenpunkte stark streuen, und zum anderen das Wissen über Art und Umfang der Stoffflüsse nur begrenzt bekannt, bzw. im Modell nur begrenzt umsetzbar ist. Im folgenden soll anhand von drei Beispielen die dynamische Stoffwechselmodellierung dargestellt werden. Hierbei werden zwei unabhängig voneinander entwickelte Modelle zum Verhalten von *E. coli* K12 während des GLC/GLC-Pulsexperiments verglichen, sowie ein PTS-Modell für die Glucoseaufnahme und ein Modell für die Verstoffwechslung von Glycerol präsentiert.

6.8.1. Modellierung des PTS

Eine einfache dynamische Modellierung des PTS während eines GLC/GLC-Pulsexperiments (Abschnitt 6.7.1) soll die Vorgehensweise bei der Modellierung von Stoffwechseldaten exemplarisch darlegen [199]. Abbildung 5.9 (siehe Seite 53) und die korrespondierende Gleichung 5.6 bilden die Basis dieses Modells. Fernerhin wurde ein Produktinhibierung des PTS durch G6P und eine Inhibierung der

¹⁶sämtliche Modelle entstanden unter Verwendung der MMT-Software [32] und sind Bestandteil laufender Arbeiten am Institut für Biotechnologie 2 [199, 200]

Reaktion $G6P \rightarrow PEP$ durch PEP berücksichtigt. Die kinetischen Gleichungen sind in Tabelle 6.12 zusammengefaßt.

Fluß	Reaktion	Kinetik
v_1	$GLC + PEP \rightarrow G6P + PYR$	irreversible Michaelis-Menten Kinetik für zwei Substrate; ergänzt um G6P-Produktinhibierung
v_2	$G6P \rightarrow PEP$	Kinetik für ein Substrat mit allosterischer Inhibition durch PEP
v_3	$G6P \rightarrow PPP$	Hill Kinetik
v_4	$PEP \leftrightarrow PYR$	reversible Michaelis-Menten Kinetik
v_5	$PYR \rightarrow BM$	Hill Kinetik

Tabelle 6.12.: Zusammenfassung der Kinetiken für das vereinfachte PTS-Modell (BM = Biomasse). Einzelheiten zu Kinetiken und Effektoren siehe [32, 199]

Die Glucosekonzentration im Modell wurde auf 0,1 mM im steady state und 15 mM nach Pulszugabe gesetzt. Die Konzentrationen von G6P, PEP und Pyruvat werden durch Lösung des Systems gewöhnlicher Differentialgleichungen bestimmt.

In Abbildung 6.38 werden die Modellaussagen mit den experimentellen Daten für G6P und PEP verglichen. Die Reaktion des Modellsystems auf den Substratpuls (0-4 s) stimmt gut mit den experimentellen Beobachtungen überein. Ab diesem Zeitpunkt strebt das Modell einen neuen steady state an. Die Dynamik der experimentellen PEP Daten wird nicht wiedergegeben.

Dieses sehr einfache Modell mit nur drei abhängigen dynamischen Variablen kann die Dynamik der intrazellulären G6P- und PEP-Pools nach einem Glucosepuls nicht erklären. Hierzu sind wesentlich umfangreichere Modell notwendig. Eine entscheidende Aussage läßt dieses Modell jedoch zu: die Reaktion des Stoffwechsels auf den Glucosepuls wird im wesentlichen bestimmt durch die schnelle Glucoseaufnahme, und zwar bis zu dem Zeitpunkt, wo die PEP-Konzentration limitierend wird (nach 3 s). Im Anschluß wird die Stoffwechselfynamik durch andere Faktoren bestimmt, welche in diesem einfachen Modell nicht berücksichtigt werden. Eine Erweiterung des Modells um weitere Stoffwechselemente, z.B. die komplette Verstoffwechselung durch die Glycolyse, Verteilung des Stoffflusses über Knotenpunkte in den Pentosephosphatweg oder in den Citratcyclus sowie dadurch bedingte Inhibition/Aktivierung von glycolytischen Enzymen, etc., sollte eine bessere Anpassung der experimentellen, und somit ein besseres Verständnis der Stoffwechselforgänge liefern.

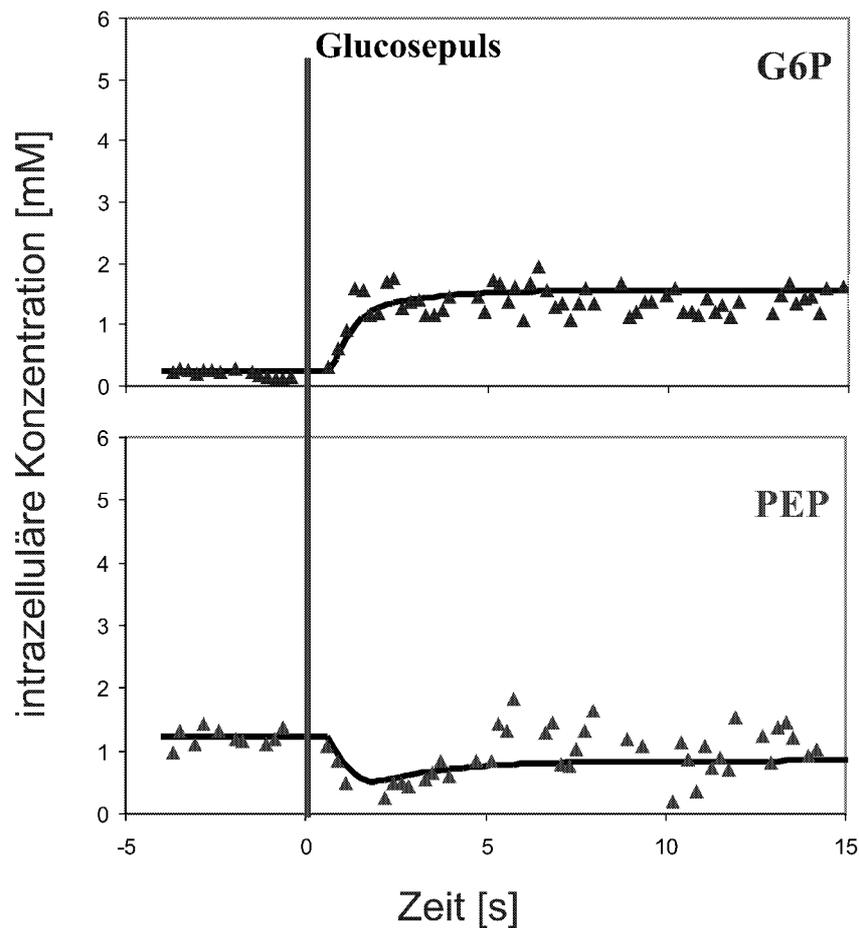


Abbildung 6.38.: PTS-Modell: Experimentelle Daten als Punkte, Daten des Modells als durchgezogene Linie

6.8.2. Modellierung der Glucose Verstoffwechslung

Ausgehend von dem GLC/GLC-Pulsexperiment (Abschnitt 6.7.1) und ergänzend zu dem PTS-Modell (Abschnitt 6.8.1) ist in zwei unabhängigen Ansätzen¹⁷ an einem erweiterten Modell zur Verstoffwechslung von Glucose gearbeitet worden (siehe Tabelle 6.13).

Die Abbildung 6.39 zeigt die Resultate für die Anpassung der experimentellen Daten mittels der zwei unterschiedlichen Modellansätze. Es ist eine sehr gute Anpassung zu erkennen, wobei jedoch eine Dynamik der Daten eher von Modell B erfaßt wird. Obwohl die Anpassung der Daten von beiden Modellen sehr ähnlich ausfallen, so sind die jeweils berechneten Enzymparameter sehr unterschiedlich. Dies wirkt sich v.a. auf die Stoffflußberechnung aus (s. Abbildung 6.39, unten

¹⁷J. Hurlebaus [199] und D. Degenring [200], Modellierung jeweils mit der MMT-Software [32]

Parameter	Modell A	Modell B
Σ dynamische Variablen	10	10
Σ kinetische Parameter	102	106
Glucose Aufnahme	Multiplikativ: 2 Michaelis-Menten + 1 Inhibitor	Multiplikativ: 2 Michaelis-Menten + 1 Inhibitor
$G6P \rightleftharpoons F6P$	Michaelis-Menten, rev.	Michaelis-Menten, rev., inhib.
$F6P \rightleftharpoons FBP$	Goldbeter + Michaelis-Menten	Goldbeter + Michaelis-Menten + 2 Inhibitoren
$FBP \rightleftharpoons DHAP + GAP$	Ordered Uni-Bi, 4 Inhibitoren, 2 Aktivatoren	Ordered Uni-Bi, rev., 2 Inhibitoren
$DHAP \rightleftharpoons GAP$	Michaelis-Menten, rev.	Isomerase mit Inhibierung
$GAP \rightleftharpoons PEP$	Michaelis-Menten, irrev.	Multiplikativ: 3 Michaelis-Menten, irrev.
$GAP \rightleftharpoons BM$	Hill Kinetik	Massenfluss
$FBP \rightleftharpoons F6P$	Hill Kinetik	Hill Kinetik
$G6P \rightleftharpoons 6PG$	Multiplikativ: 2 Michaelis-Menten + 1 Inhibitor	
$G6P \rightleftharpoons 6PG$		Theorell Chance Bi Bi
$E4P + M5P \rightleftharpoons GAP + F6P$	Multiplikativ: 2 Michaelis-Menten, 3 Inhibitoren	
$6PG \rightleftharpoons M5P$	Ordered Bi-Uni, irrev.	Michaelis-Menten, rev.
$6PG \rightleftharpoons BM$		Hill Kinetik, aktiviert
$2 M5P \rightleftharpoons E4P + F6P$	Hill, inhib.	
$M5P \rightleftharpoons E4P + F6P$		Ordered Uni Bi Kinetik
$M5P + E4P \rightleftharpoons F6P + GAP$		Ordered Bi Bi Kinetik
$PEP \rightleftharpoons PYR$	Michaelis-Menten, rev.	Ordered Bi Bi Kinetik
$PYR \rightleftharpoons BM$		Hill Kinetik
$PYR+CoA \rightleftharpoons AcCoA$	Ordered Bi Uni Kinetik, inhib.	Ordered Bi Uni Kinetik
$PEP+E4P \rightleftharpoons Shikimat$	Odered Ter-Bi Kinetik	Odered Ter-Bi Kinetik

Tabelle 6.13.: Vergleich der Modellparameter; Einzelheiten zu Kinetiken und Effektoren siehe [32, 199, 200] (rev.: reversibel, irrev.: irreversibel, inhib.: inhibiert)

6. Ergebnisse und Diskussion

rechts). Zum einen sind die steady state Aufnahme­raten für das Substrat sehr unterschiedlich ($0,52 \text{ mM s}^{-1}$ Modell A, $0,23 \text{ mM s}^{-1}$ Modell B), zum anderen ist die Aufnahmedynamik nach dem Glucosepuls sehr verschieden. Modell A reagiert mit einem schnellen, aber nur leichten Anstieg der Aufnahme­rate. Modell B hingegen nimmt das Substrat erst wesentlich später verstärkt auf, dann jedoch in beträchtlich höheren Konzentrationen. Interessanterweise pendeln sich beide Modelle auf eine ähnliche Aufnahme­rate nach maximal 5 s ein ($0,65\text{--}0,7 \text{ mM s}^{-1}$).

Um zwischen diesen zwei (von einer Vielzahl möglichen) Modellen zu entscheiden, wären weitere experimentelle Untersuchungen notwendig, z.B. ein Isotopenmarkierungsexperiment zwecks exakter Bestimmung der Glucoseaufnahme­raten nach dem Substratpuls. Dies unterstreicht nochmals die iterative Natur von Untersuchungen zur Stoffwech­sel­dynamik: eine Verifizierung des Modells ist nur durch eine Vielzahl von Versuchen möglich.

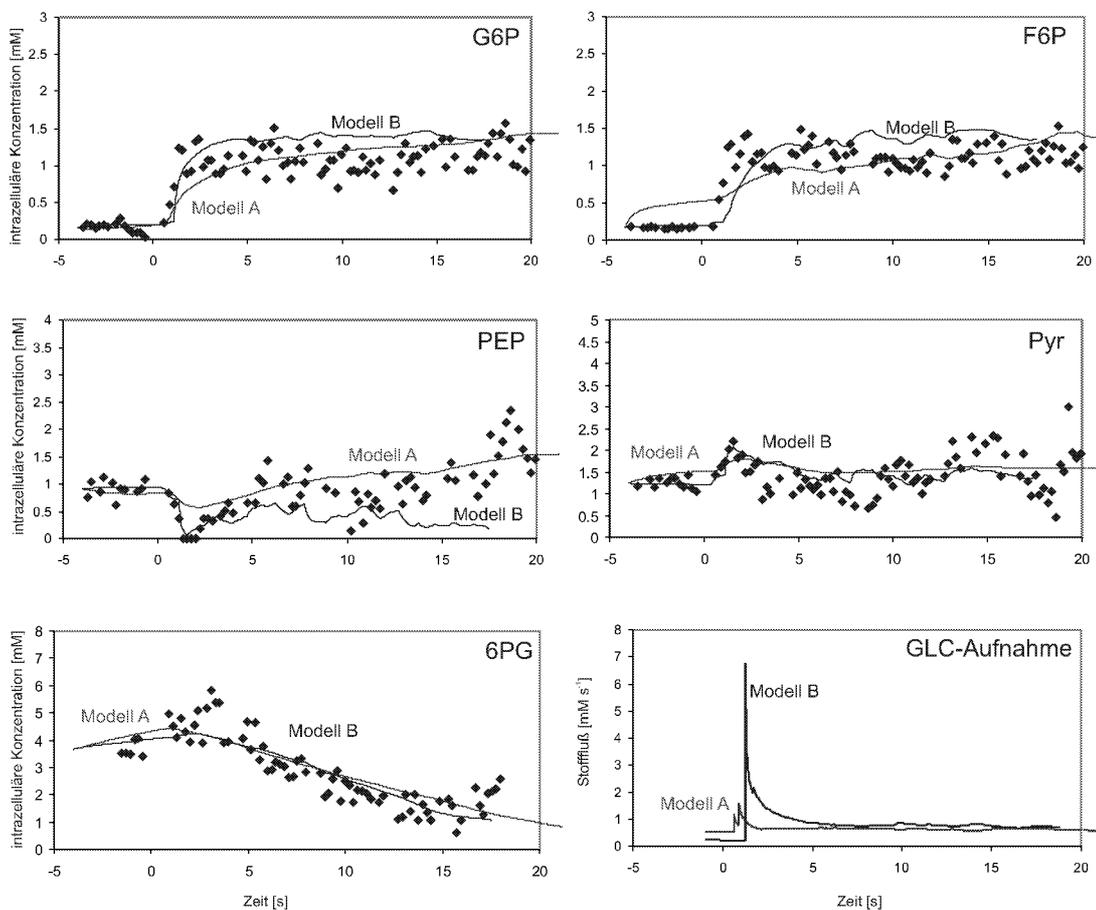


Abbildung 6.39.: GLC-Modelle: Vergleich der Modelle mit den experimentellen Daten; experimentelle Daten als Punkte, Daten des Modells als durchgezogene Linie. Unten rechts ein Vergleich der berechneten Glucoseaufnahme­raten.

6.8.3. Modellierung der Glycerol Verstoffwechslung

Ausgehend von dem GLY/GLY-Pulsexperiment (Abschnitt 6.7.3) ist ein Modell aufgestellt worden, welches versuchen soll die Dynamik während der Glycerol-aufnahme und weiteren Verstoffwechslung zu G3P zu beschreiben. Da dieser Schritt unter Verbrauch von ATP stattfindet und eine erste phänomenologische Auswertung eine mögliche Limitierung in der Regeneration des Energieträgers andeutet, ist bei diesem Modell v.a. auf die Einbindung von ATP-bildenden und -verbrauchenden Reaktionen geachtet worden. Abbildung 6.40 zeigt den schematischen Aufbau des Modells. Berücksichtigt werden neben dem ATP-Verbrauch (Glycerol \rightarrow G3P) auch die glycolytische Regeneration (Reaktionen zu 3PG, bzw. Pyruvat). Eine Erfassung der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) ist im Modell nicht vorgenommen worden. Diese Modell mit 12 dynamischen Variablen und 62 kinetischen Parametern erfordert bereits einen recht hohen Rechenaufwand.

Die Resultate der Modellierung von J. Hurlebaus [199] sind in Abbildung 6.41 dargestellt. Ähnlich dem Modell für das PTS (Abschnitt 6.8.1) ist die Dynamik der Substrataufnahme nicht vollständig wiedergegeben. Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich die fehlende Dynamik des ATP Pools, welcher entscheidend für die Reaktion Glycerol \rightarrow G3P ist. Die generelle Problematik bei der Anpassung der ATP-Daten liegt in der Tatsache, daß ATP in *E. coli* an > 300 Reaktionen [201] beteiligt ist. Eine erschöpfende Berücksichtigung aller relevanten Reaktion, ebenso wie die modelltechnische Beschreibung der Atmungskette ist noch nicht erfolgt.

Obwohl das Modell nicht vollständig mit den experimentellen Daten übereinstimmt, so läßt sich doch durch die ermittelten "quasi-*in vivo*" Enzymparameter eine Stoffflußberechnung für die Substrataufnahme durchführen. Das Resultat ist in Abbildung 6.42 dargestellt. Man erkennt sehr gut den stark erhöhten Umsatz zu G3P in den ersten 3 s, welcher dann durch ATP-Limitierung (bzw. FBP-Inhibierung) wieder auf ein niedrigeres Niveau von ca. $0,20 \text{ mM s}^{-1}$ geregelt wird. Trotz der eingeschränkten Anwendbarkeit dieses Modellierungsansatzes¹⁸ ist dies ein erster Schritt in Richtung einer quantitative Beschreibung dynamischer Stoffflüsse in glycerollimitierten *E. coli*.

6.8.4. Vergleich von *in vivo* und *in vitro* Enzymkinetiken

Entscheidend für die Unterschiede von enzymkinetischen Parametern *in vivo* und *in vitro* sind die sehr verschiedenen Umgebungen der betrachteten Enzyme. Die typischen *in vivo* Konzentrationen glycolytischer Enzyme in Zellen sind ca. 1000

¹⁸Da der Fluß nur eine berechnete Größe darstellt, in welche die Modellanpassungen (G3P, ATP) der Abbildung 6.41 eingehen, steigt der Fluß Glycerol \rightarrow G3P bedingt durch die höhere Verfügbarkeit von ATP nach 15-20 s. Da das (begrenzte) Modell die experimentellen Daten nicht hinreichend anpassen kann (siehe v.a. ATP-Verlauf), sind auch die ermittelten "quasi-*in vivo*" Enzymparameter nur bedingt für eine Flußberechnung verwendbar.

6. Ergebnisse und Diskussion

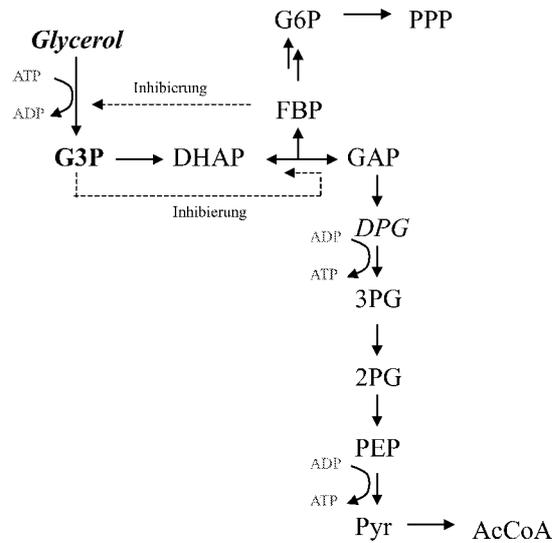


Abbildung 6.40.: Modell Glycerol-Verstoffwechslung: Glycerol Aufnahme und Verstoffwechslung; zusätzliche Hervorhebung ATP-verbrauchender und -regenerierender Reaktionen.

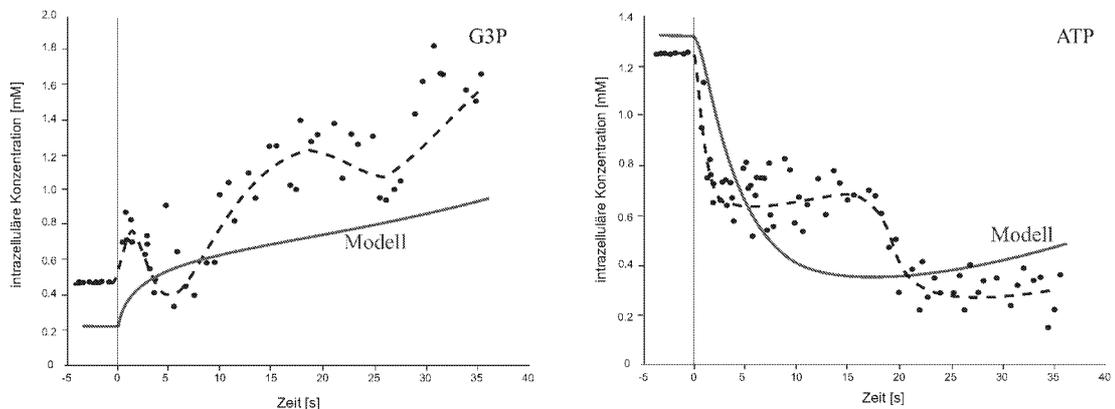


Abbildung 6.41.: GLY-Modell: Experimentelle Daten als Punkte (zusätzlich gestrichelte Linie als Visualisierungshilfe), Daten des Modells als durchgezogene Linie; links G3P, rechts ATP.

mal höher als in *in vitro* Assays [202]. Für das Enzym Phosphofruktokinase (PFK1, *S. cerevisiae*, Details ins [203]) konnte gezeigt werden, daß die sehr viel höhere *in vivo* Konzentration einen entscheidenden Einfluß auf die Regulation ausübt. Ebenso konnte für dieses Enzym eine starke Interaktion mit Zellstrukturen (Mikrotubuli) nachgewiesen werden [92], deren Einfluß auf die Regulation noch nicht bekannt ist. Rein physikalisch ist durch die Erhöhung der Entropie (und somit der Reaktionswahrscheinlichkeit) durch Erhöhung der Konzentration makromolekularer Substanzen (“macromolecular crowding”) eine Steigerung der Reak-

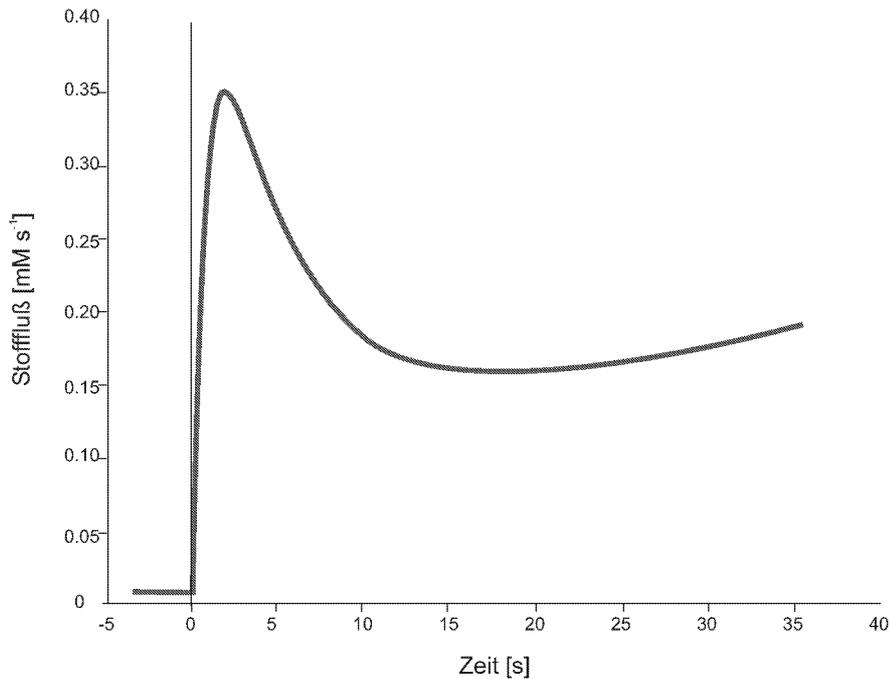


Abbildung 6.42.: GLY-Modell: Dynamische Flußbestimmung der Reaktion Glycerol \rightarrow G3P durch die enzymkinetischen Parameter des Modells

tionsgeschwindigkeit nachgewiesen worden [204, 205]. Unter solchen Umständen ist auch eine starke Bindung des Enzyms im Enzym-Substrat-Produkt-Komplex postuliert worden. Hierdurch würden die Konzentration an freiem Enzym sowie Substrat-Enzym- und Produkt-Enzym-Komplex stark herabgesetzt. Die Bindung eines Großteils des Enzyms im Enzym-Substrat-Produkt-Komplex sollte zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führen (sog. “metabolite channelling” [204])¹⁹. Neben diesen Effekten spielen noch die Anwesenheit von bekannten und unbekanntem Cofaktoren (welche in *in vitro* Untersuchungen nicht alle berücksichtigt werden können) und die mögliche Restrukturierung von Proteinen unter unterschiedlichen externen Bedingungen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Ein direkter Vergleich der *in vivo* und *in vitro* bestimmten Enzymparameter ist daher nur beschränkt möglich und sinnvoll.

¹⁹Bei der Quantifizierung und Modellierung in dieser Arbeit wird davon ausgegangen, daß kein metabolite channelling stattfindet. Gemessene Metabolit-Konzentrationen sind “reale” Metabolit-Konzentrationen, d.h. evtl. im Enzym-Substrat-Komplex vorliegende Metabolite werden bei der Denaturierung der Enzyme während des Aufschlusses freigesetzt. Auch für die Modellierung muß in erster Linie davon ausgegangen werden, daß kein metabolite channelling statt findet, da z.Zt. weder *in vivo* Enzymkonzentrationen, noch Enzym-Substrat-Komplex-Konzentrationen akkurat gemessen werden können.

6. *Ergebnisse und Diskussion*

7. Zusammenfassung und Ausblick

*“Nihil est enim simul et inventum et perfectum.”
“Denn nichts ist, wenn es erfunden wird, zugleich auch vollendet.”*

Marcus Tullius Cicero (106 - 43 v. Chr.)

7.1. Zusammenfassung

Die Etablierung von analytischen Methoden zur quantitativen Untersuchung mikrobieller Stoffwechselnetzwerke und deren gezielte Veränderung durch molekularbiologische Techniken sind die Grundvoraussetzungen für eine rationale Stammentwicklung im Sinne des “metabolic engineering”.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Werkzeuge des “metabolic engineering” in den Bereichen der analytischen Methodenentwicklung und der experimentellen Durchführung dynamischer Pulsexperimente wesentlich erweitert. Anhand der mit diesen Techniken gewonnenen intrazellulären Metabolitdynamiken sind mathematische Modellierungen des bakteriellen Stoffwechsels durchgeführt worden.

7.1.1. Anlagenoptimierung

Ein Pulsaufgabesystem (PAS) wurde entwickelt, welches es gestattet, eine mehrfache, exakte Dosierung einer oder mehrerer Substratlösungen unter sterilen Bedingungen und ohne Druckanstieg im Bioreaktor vorzunehmen. Die Mischzeit dieses Systems wurde auf $\Theta_{90} = 0,630 \pm 0,154$ ms minimiert. Hierdurch ist eine Grundvoraussetzung für die Durchführung dynamischer Pulsexperimente erfüllt, nämlich die Überführung der gesamten Zellpopulation von einem limitierten in einen nicht-limitierten Zustand innerhalb kürzester Zeit.

In Kombination mit der in früheren Arbeiten entwickelten schnellen Probenahme [22] steht nun ein flexibles System zu Durchführung unterschiedlichster dynamischer Stoffwechseluntersuchungen zur Verfügung.

7.1.2. Analytik

Die zuverlässige und sichere Messung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen und Metabolitkonzentrationsverläufe ist eine entscheidende Grundlage zur Durchführung jeder weitergehenden Stoffflußanalyse [20]. Inaktivierungs-, Extraktions- und Analytikmethoden sind untersucht und optimiert worden.

Inaktivierung

Das verwendete MeOH-Quenching-Verfahren eignet sich für eine schnelle Inaktivierung des mikrobiellen Stoffwechsels innerhalb von ca. 50 ms. Die dabei auftretende Lyse von *E. coli* Zellen liegt bei $\leq 5\%$. Eine längere Lagerung ($\gg 6$ h) ist möglich, ohne daß es zu einem Efflux von Metaboliten aus der Zelle kommt.

Extraktion

Der Fehler der Standardmethode zur Extraktion mittels Perchlorsäure ist um den Faktor 2 auf 6,1% verringert worden. Zusätzlich sind alternative Methoden für säure-instabile Metabolite untersucht worden. Für die Extraktion von Proteinen wurden unter Verwendung einer Kugelmühle reproduzierbare Aufschlüsse (Fehler $< 4,7\%$) erarbeitet.

Analytik

Zur Analytik intra- und extrazellulärer Metabolite wurden mehrere **HPLC-MS Verfahren etabliert**. Die Nachweisgrenzen liegen in einem mit enzymatischen Assays vergleichbaren Bereich, wobei sich die HPLC-MS Methoden jedoch durch den Vorteil auszeichnen, ein große Anzahl an Metaboliten parallel zu quantifizieren. Fernerhin ist das benötigte analytische Volumen um den Faktor 10 geringer als bei den herkömmlich verwendeten enzymatischen Assays, was sowohl eine höhere Probefrequenz als auch ein breiteres Metabolitspektrum bei der Analyse dynamischer Pulsexperimente gestattet. Das Problem der Quantifizierung isobarer Metabolite konnte über die Verwendung einer reinen Kohlenstoff-Phase gelöst werden. Fernerhin gestatten die HPLC-MS Methoden eine **Identifizierung und Quantifizierung bisher noch unbekannter Stoffwechselmetabolite**.

Im Bereich der **Capillarelektrophorese**, einer Analytikmethode für den Nanoliterbereich, sind Methoden zur direkten und indirekten UV-Detektion entwickelt worden. Zusätzlich wurde über die Verwendung von **genetischen Algorithmen** ein effektiver Zugang zur schnellen Methodenentwicklung im Bereich der CE-Trennung etabliert.

Unter Verwendung der analytischen Verfahren HPLC-MS, enzymatische Assays, Capillarelektrophorese und UV-HPLC sind **über 30 Metabolite der Glycolyse, des Citratcyclus und des Pentosephosphatweges direkt quantifizierbar**.

Unter Verwendung eines elektronischen Geräts zur Partikelmessung wurde eine akkurate Methode zur **Bestimmung des intrazellulären Volumens** und somit eine präzise Berechnung der intrazellulären Konzentrationen bei beliebigen experimentellen Bedingungen, etabliert.

Im Bereich der **2D-Gelelektrophorese** wurden mehrere stoffwechselrelevante Enzyme identifiziert und Untersuchung bezüglich ihrer Quantifizierbarkeit durchgeführt.

7.1.3. Dynamische Pulsexperimente

Unter Verwendung der oben genannten Techniken sind verschiedene dynamische Pulsexperimente durchgeführt worden. Im Bereich der Glucose-Verstoffwechslung fanden Untersuchungen an der Substrataufnahme durch das PEP:PTS sowie der weiteren Verwertung in *E. coli* K12 statt. Anhand eines gentechnisch veränderten Stammes wurden diese Untersuchungen erweitert. An einem PTS-defizientem Stamm (*E. coli* 3pMK7) wurde die veränderte Stoffwechselsituation bei einer Umstellung der Abhängigkeit der Substrataufnahme von PEP auf ATP analysiert.

Ebenso wurde an *E. coli* K12 die Verstoffwechslung von Glycerol untersucht. Es konnte mitunter eine starke Abhängigkeit der Glycerolaufnahme von der intrazellulären ATP Konzentration nachgewiesen werden. In einem Experiment zur Substratumstellung von Glycerol auf Glucose konnte die starke Abhängigkeit der Glucoseaufnahme von der verfügbaren PEP Konzentration bestätigt werden.

7.1.4. Modellierung

In Kooperation mit Dr. J. Hurlebaus und Dipl.-Chem. D. Degenring sind zahlreiche Stoffwechselmodelle erstellt worden, wobei die von Dr. J. Hurlebaus entwickelte Modellierungssoftware MMT sich als effektives Werkzeug erwies. Durch die Modellierung konnten zahlreiche Stoffwechselphänomene, welche zuvor nur phänomenologisch erklärt wurden, im Rahmen strukturierter Modelle quantifiziert werden.

Basierend auf den experimentell bestimmten intrazellulären Metabolitdynamiken konnten so erstmals intrazelluläre Stoffflüsse unter dynamischen Bedingungen berechnet werden. Dies ist ein erster Schritt in einem iterative Verfahren zur Modellvalidierung und -diskriminierung.

7.2. Ausblick

Eine Quantifizierung des mikrobiellen Stoffwechsel bis hin zu einem *in silico* Modell mit *in vivo* Enzymparametern erfordert eine Vielzahl iterativer dynamischer Pulsexperimente, welche zukünftig durchgeführt werden müssen. Ebenso muß die bestehende intrazelluläre Analytik ausgeweitet werden. Das Potential der LC-MS

ist bei weitem noch nicht ausgeschöpft; eine Vielzahl unbekannter Verbindungen müssen noch identifiziert werden, ebenso müssen gezielt weitere relevante Stoffwechselmetabolite erfaßt werden. Dies beinhaltet auch eine Weiterentwicklung der bestehenden Extraktionsmethoden sowie die Etablierung neuer Zellaufschlußverfahren. Durch die Kombination der massenspektrometrischen Quantifizierung mit ^{13}C -Pulsexperimenten besteht die Möglichkeit, gleichzeitig Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Metabolitkonzentrationen sowie über die Flußverteilung (via Isotopomere) an Knotenpunkten des Stoffwechsels zu treffen (siehe z.B. [206, 207]).

Fernerhin sollte verstärkt an der bisher sehr erfolgreichen Kooperationen mit dem Institut für Biotechnologie 1 (IBT 1) gearbeitet werden. Denkbar wäre hier die Kombination von steady state Stoffflußdaten (NMR) mit dynamischen Pulsdaten in einem Gesamtmodell. Ebenso wäre ein ^{13}C -Pulsexperiment sinnvoll, da hierbei sowohl Information über die Stoffflußverteilung (Isotopenverhältnisse) als auch die Pooldynamik erhältlich sind. Die Stoffflußverteilung an metabolischen Knotenpunkten könnte so sehr viel präziser gedeutet werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Konstellation für ein effektives “metabolic engineering” am Institut für Biotechnologie günstig steht. Ein Überblick über die Vielzahl der unter einem Dach vereinten Techniken (s.u.) und das vorhandene interdisziplinäre Wissen läßt auf weitere Fortschritte in diesem Bereich hoffen.

Genomics	Konstruktion neuer Stämme durch Anwendung molekularbiologischer Techniken, biochemisches Stoffwechselwissen (IBT 1)
Transcriptomics	Bestimmung von Protein-Expressionsraten mittels DNA Chip Technologie (IBT 1)
Proteomics	Protein-Identifizierung und Quantifizierung mittels 2D-Gelelektrophorese (IBT 1)
Metabolomics	Stoffflußanalyse und Isotopenmarkierungsexperimente mittels NMR (IBT 1) Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken mittels dynamischer Pulsexperimente und zahlreicher analytischer Methoden (IBT 2)
Bioinformatik	Stoffwechselmodellierung zur Identifizierung von Stoffwechselnetzwerken, möglichen Limitierungen und regulatorischen Effekten (IBT 2)
Fermentationstechnik	Durchführung von Fermentationsexperimenten, Stammcharakterisierung, Entwicklung neuer Fermentationstechnik und -analytik (IBT 2)

7. Zusammenfassung und Ausblick

8. Anhang

8.1. Quenching

Die Abfüllzeit, d.h. der Zeitraum zwischen Austritt aus dem Bioreaktor und Kontakt mit der Quenchingflüssigkeit, beträgt 12,4 ms. Bei Zugrundelage eines hypothetischen kugelförmigen Probetropfens läßt sich die Abkühlzeit über eine Wärmebilanz (instationäre Wärmeleitung in einer Kugel [214]) abschätzen. Unter der Annahme, daß die Oberflächentemperatur sprunghaft von 37°C auf den Endwert der Mischung aus Probe und Quenchingreagens (-20°C) abfällt, kann die Abhängigkeit der Abkühlzeit vom Tropfenradius abgeschätzt werden (siehe Abbildung 8.2). Die Abkühlzeit bis zu einer kalorischen Mitteltemperatur von -20°C bei einem Tropfenradius von 100 µm liegt bei ca. 50 ms. In Abbildung 8.1 ist der Temperaturverlauf im -50°C kalten Quenchingreagenz nach Zugabe der 37°C warmen Zellsuspension aufgezeichnet. Der Temperatursprung auf -20°C nach Zugabe ist gut zu erkennen. Da die Proben sofort ca. 30 s nach der Entnahme aus dem Bioreaktor bei -28°C gelagert werden, ist eine effektive Abstopfung des Stoffwechsels (bedingt durch eine Abkühlung auf ca. -20°C) gewährleistet.

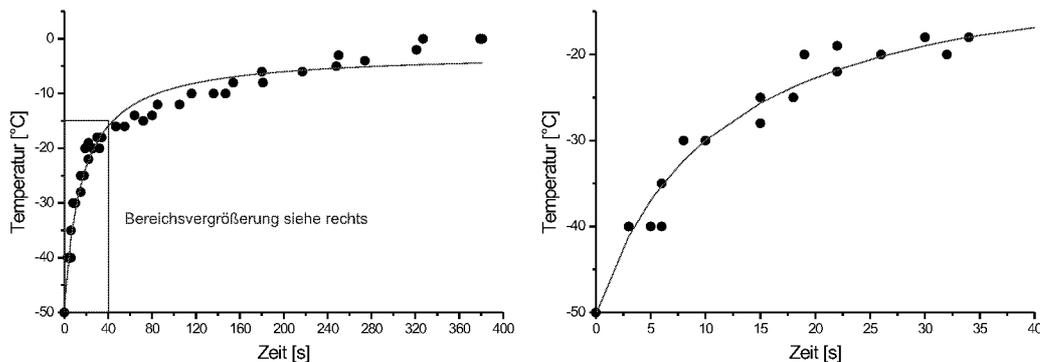


Abbildung 8.1.: Temperaturverlauf in Quenchingproben (Zugabe von 5,0 ml Fermentationslösung, $T = 37^{\circ}\text{C}$ zu 15,0 ml Quenchingreagens, $T = -50^{\circ}\text{C}$); Rational Function Fit: $y = \frac{b+cx}{1+ax}$

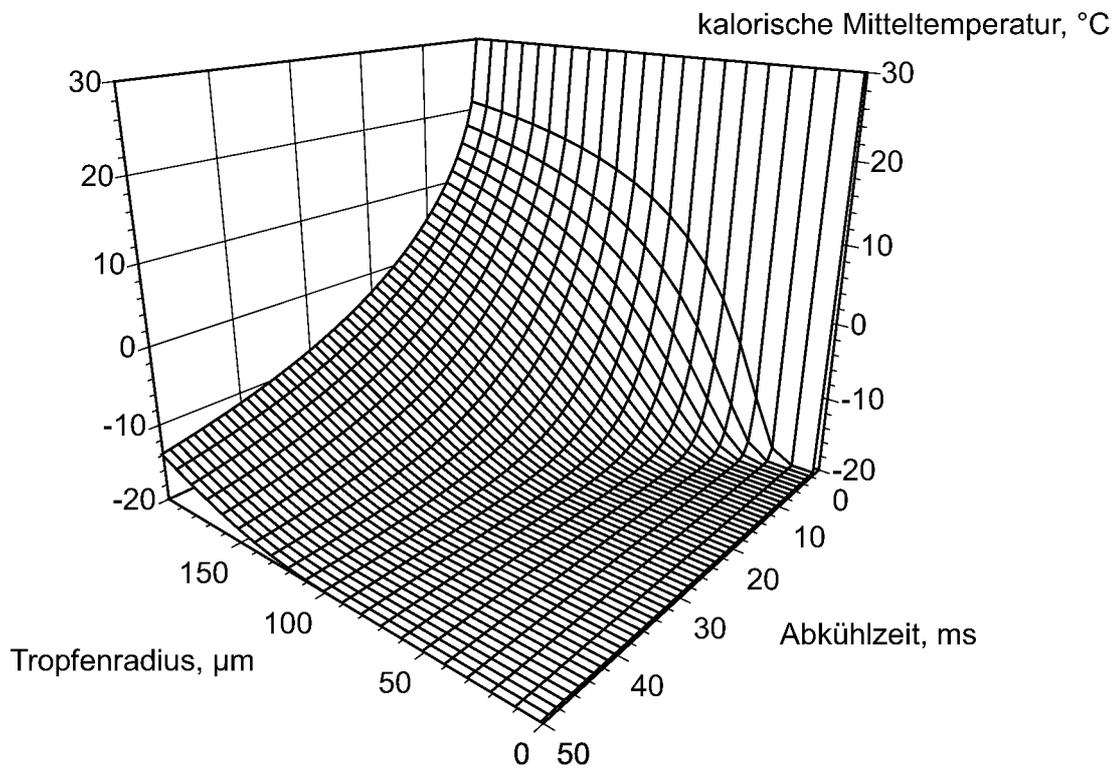


Abbildung 8.2.: Abschätzung der Abkühlzeit eines Probetropfens beim Einsprühen in -50°C kalte Quenchingflüssigkeit (instationäre Wärmeleitung in kugelförmigen Tropfen mit Anfangstemperatur 37°C und Endtemperatur -20°C , $\rho = 1,01 \text{ kg m}^{-3}$, $\lambda = 0,560 \text{ m}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $c_P = 4,2 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$)[20]

8.2. Proteinidentifizierung und Quantifizierung mittels 2D-Gelelektrophoreses

Zur Quantifizierung intra- und extrazellulärer Metabolitkonzentrationen und zur Identifizierung von Stoffwechselwegen ist die Einstellung definierter Stoffwechsellustände Grundlage und Voraussetzung. Die Kultivierung von Mikroorganismen erfolgt deshalb in einem kontinuierlichen System, da hier definierte Bedingungen herrschen und Stoffwechsellustände gezielt und reproduzierbar eingestellt werden können. Werden die Proben bei gleichem Fließgleichgewichtszustand (steady state) entnommen, können die reaktionskinetischen Einflüsse, bei konstantem Fehler der Fermentation, minimiert werden. *E. coli* K12 wird in kontinuierlichen Fermentationen im substratlimitierten Chemostaten kultiviert, wobei als Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerol verwendet werden. Im Fließgleichgewicht werden Proben entnommen und die Zellen aufgeschlossen (siehe Abschnitt 6.3.5), um die im Cytoplasma vorliegenden glycolytischen Enzyme freizusetzen. Die Konzentration der im Extrakt befindlichen Proteine wird mit der unter Abschnitt 5.6 beschriebenen Methode ermittelt, da für die 2D-Gelelektrophorese 300 μg Protein nötig sind.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mit der Technik der 2D-Gelelektrophorese. In der ersten Dimension werden die Proteine über eine isoelektrische Fokussierung, in der zweiten über ihre molekulare Masse aufgetrennt. Durch eine manuelle Nachbearbeitung der computergestützten Auswertung von 2D-Gelen wird der Fehler auf weniger als 10% gesenkt, was in Anbetracht der verschiedenen Fehlerquellen die bis zur Auswertung auftreten akzeptabel ist.

Isoelektrische Fokussierung

Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung beruht darauf, daß die Nettoladung eines Moleküls sich mit dem pH-Wert der umgebenden Lösung ändert. Proteine lassen sich mit dieser Methode nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) auftrennen. Dieser Punkt gibt den pH-Wert an, bei dem die Nettoladung z des Proteins Null ist. Die elektrophoretische Beweglichkeit ist hier auch Null. Geladene Teilchen wandern im elektrischen Feld. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit v von der elektrischen Feldstärke E , der Nettoladung z des Teilchens und einem Reibungskoeffizienten f ab:

$$v = E \cdot \frac{z}{f} \quad (8.1)$$

Jedes Ion bewegt sich mit einer charakteristischen Geschwindigkeit, da der Reibungskoeffizient von Form und Größe des Teilchens, aber auch von der Viskosität der Lösung abhängt. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist von der Temperatur abhängig. Ein Temperaturunterschied von 2°C bewirkt eine Verschiebung des pI um 0,01. Außerdem ist die isoelektrische Fokussierung nur dann als reproduzierbare Methode einsetzbar, wenn die Zusammensetzung der benötigten

Reagenzien und Geräte standardisiert ist [93, 215].

Elektrophorese

Bei der Elektrophorese werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Trägermaterial der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; SDS = Sodium-dodecylsulfate) ist Polyacrylamid. Es entsteht aus Acrylamid, dessen Monomere mit dem Quervernetzungsreagenz Bisacrylamid in Gegenwart eines Katalysators copolymerisiert werden. Durch unterschiedliche Konzentrationen der beiden Reagenzien entstehen Gele mit unterschiedlichen Porengrößen. Gradientengele werden mit Hilfe eines Gradientenmischers erzeugt, der unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen miteinander mischt. Infolge der Molekularsiebeigenschaften des Gels sind die Beweglichkeiten der Proteine dem dekadischen Logarithmus der Molekularmassen über einen bestimmten Bereich hinweg (15-80 kDa, Gelabhängig) umgekehrt proportional. Läßt man Standardproteine bekannter Molekularmassen "mitlaufen", können die apparenten Massen der unbekannt Proteine bestimmt werden. SDS ist ein anionisches Detergenz, das über hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine bindet und sie denaturiert. Die Protein-SDS-Komplexe wandern zur Anode. Kleine Proteine wandern weit durch das Gel, große bleiben nahe der Auftragungsstelle liegen, da sie nicht durch die Poren hindurch wandern können. Eine Anfärbung mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 macht Proteine ab einer Konzentration von etwa 60 ng mm^{-2} sichtbar. Eine Silberfärbung ist etwa 20-200 mal empfindlicher. [216, 217, 218]

2D-Gelelektrophorese

Proteine komplexer Systeme werden nach zwei verschiedenen Trennmethode, die miteinander kombiniert werden, separiert. In der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Dazu werden sogenannte IPG-Streifen verwendet (IPG = immobilisierter pH Gradient). Die abpuffernden Gruppen (Immobiline) werden an eine Matrix, z. B. an ein Polyacrylamidgel, gebunden. Die immobilisierten pH-Gradienten zeigen einige Vorteile gegenüber den früher verwendeten Trägerampholyten. Die Auftrennung der Proteine zeigt schärfere Banden und die kathodische Drift ist geringer. Das Gel der ersten Dimension muß equilibriert werden. In diesem Schritt wird der IPG-Streifen mit einem SDS-Tris-Puffer, der für die Auftrennung in der zweiten Dimension nötig ist, gesättigt. Anschließend erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrer Größe in der zweiten Dimension mit SDS-PAGE. Isoelektrische Fokussierung und die anschließende SDS-PAGE sind für die Trennung von Proteinen sehr geeignet, da pI und Molekulargewicht der Proteine nicht miteinander in Verbindung stehen. Das fertige Gel wird fixiert und mit einer geeigneten Färbemethode werden die aufgetrennten Proteine angefärbt. [219, 220, 221, 222, 223, 224]

Identifizierung und Quantifizierung

Aus dem auf dem Gel entstandenen Muster werden die Enzyme der Glycolyse identifiziert, um eine Aussage über deren Expression treffen zu können. Die Identifikation von Proteinen geschieht durch Vergleich der produzierten Gele mit veröffentlichten 2D-Karten von *E. coli* [226] und Analyse der durch tryptischen Verdau erhaltenen Peptide über MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry). Die so erhaltenen Peptidmassen werden über ein im Internet zugängliches Programm mit bereits bekannten Proteinen verglichen und zugeordnet [227].

8.2.0.1. Identifizierung der Spots

Einige der Spots konnten eindeutig über MALDI-TOF-MS analysiert und Proteinen zugeordnet werden (siehe Tabelle 8.1 und Abbildung 8.3). An Glycolyseenzymen wurde die Phosphoglycerat-Mutase gefunden. Aus dem Citratcyclus wurden die Isocitrat-Dehydrogenase sowie die Malat-Dehydrogenase identifiziert. Außerdem wurde die Glycerolkinase entdeckt sowie Zucker- und Aminosäure-Bindeproteine. Eine Quantifizierung konnte relativ in Form der Intensitäten der Spots durchgeführt werden. Wie an anderer Stelle [228] gezeigt wird sind für eine absolute Quantifizierung viele Standardgele benötigt, im Idealfall von jedem zu quantifizierenden Protein. Eine absolute Quantifizierung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da diese sehr zeit- und kostenintensiv ist.

Name	pI	Masse [kDa]
<i>Isocitrat Dehydrogenase</i>	5,2	45
D-Galactose-D-Glucose-Bindeprotein	5,3	33
Leucin-Isoleucin-Valin-Bindeprotein	5,3	37
<i>Glycerolkinase</i>	5,4	56
<i>Malat-Dehydrogenase</i>	5,6	30
Cytidin-Desaminase	5,4	32
<i>Phosphoglycerat Mutase</i>	5,8	29
Azurin (Standard)	5,7	14

Tabelle 8.1.: Über 2-D Gelelektrophorese identifizierte Proteine (kursiv: Enzyme des Zentralstoffwechsels)

Das Genom eines Organismus ändert sich unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nicht, wohl aber die Proteinzusammensetzung der Zelle. Je nach Substrat werden zur Verstoffwechslung andere Enzyme benötigt, deren Expression geregelt wird [229]. Um die Unterschiede in der Enzymexpression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen sowie Veränderungen der Enzymkonzentrationen bezüglich wechselnder Substrate festzustellen, wurden diese untersucht.

Dazu wurde *E. coli* auf Glucose bzw. Glycerol als Kohlenstoffquelle kultiviert und die hergestellten 2D-Gele verglichen.[126]

8.2.0.2. Vergleich von Substratlimitierung und Substratüberschuß

Bei Vergleich der Gele, die von Zellen gemacht wurden, die im substratlimitierten Zustand und bei Überschuß kultiviert wurden, konnte innerhalb des Fehlers der Meßmethode für alle betrachteten Spots kein Unterschied festgestellt werden. Die Proben zum Substratüberschuß wurden 45 min nach Erhöhung der Substratkonzentrationen aus dem Bioreaktor entnommen. Anscheinend ist dieser Zeitraum nicht ausreichend, um eine signifikante Veränderung des Proteinexpressionsprofils zu bewirken. Andererseits kann die Veränderung so gering sein, daß sie im Meßrauschen des Fehlers untergeht.[126]

8.2.0.3. Vergleich von Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

E. coli K 12 wurde auf Glucose und Glycerol kultiviert. Ein Vergleich der Gele der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen zeigt, daß einige Proteine auf Glycerol stärker, andere schwächer exprimiert sind. Identifiziert wurde die Glycerolkinase, die auf dem Glycerolgel deutlich sichtbar ist (siehe Abbildung 8.4) .[126]

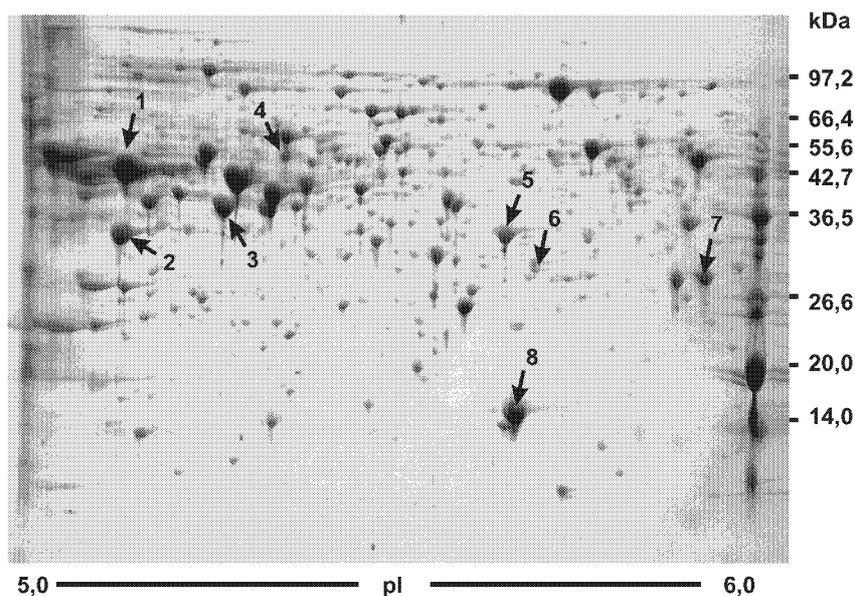


Abbildung 8.3.: Identifizierte Spots in der 2D-Gelelektrophorese: 1. Isocitrat Dehydrogenase, 2. D-Galactose-D-Glucose-Bindeprotein, 3. Leucin-Isoleucin-Valin-Bindeprotein, 4. Glycerolkinase, 5. Malat-Dehydrogenase, 6. Cytidin-Desaminase, 7. Phosphoglycerat Mutase, 8. Azurin; Details zu den Proteinen in Tabelle 8.1

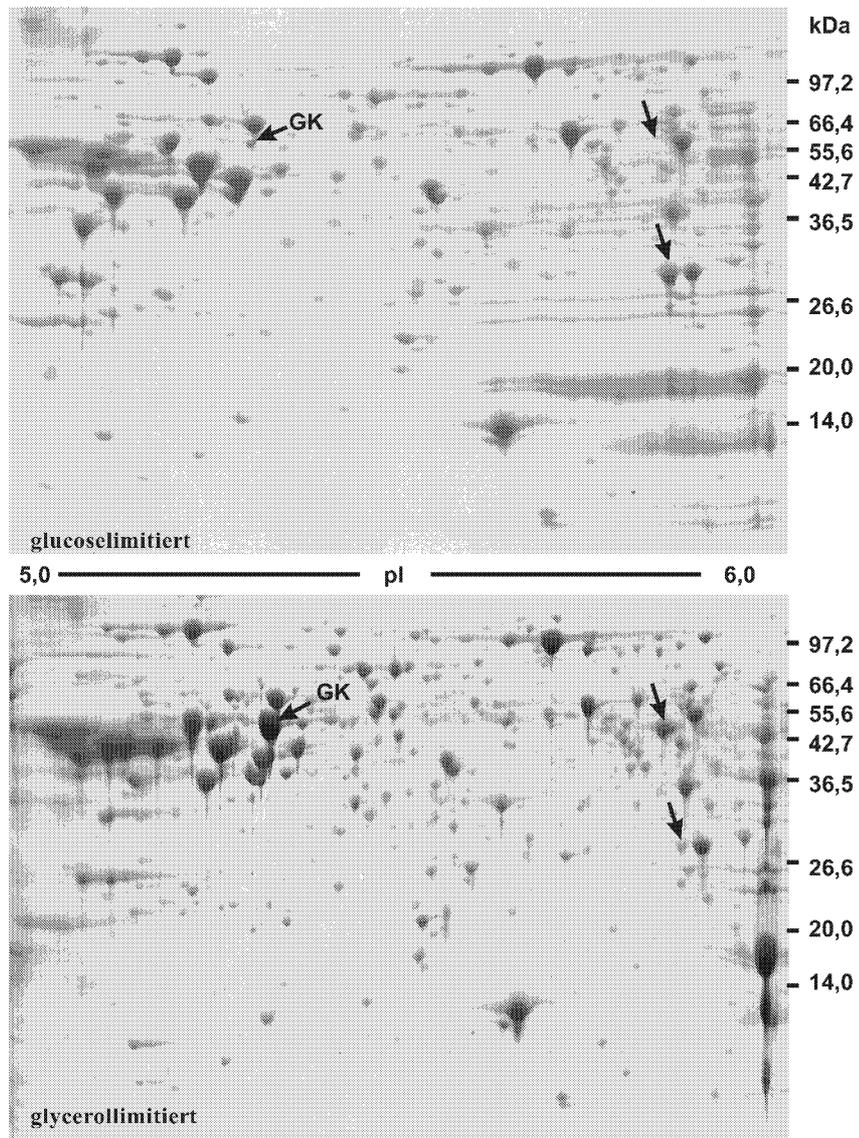


Abbildung 8.4.: 2D-Gele von *E. coli* K12 in glucoselimitiertem (oben) und glycerollimitiertem Zustand (unten). Unterschiedlich ausgeprägte Proteinspots sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Glycerolkinase (GK) ist identifiziert worden.

8.3. Biochemische Interpretation mithilfe der Hauptkomponentenanalyse

Hauptkomponentenanalyse

Eines der Hauptprobleme in der modernen instrumentellen Analytik ist die Tatsache, daß häufig eine Vielzahl, z.T. überflüssiger Variablen gemessen werden. Hiervon ist meist nur eine, die sogenannte “abhängige Variable”, diejenige, welche anhand der anderen (“unabhängige Variablen”) bestimmt werden soll, bzw. aussagekräftig ist. Da die Variablen meist miteinander korrelieren, nimmt der Beitrag jeder zusätzlichen Variable in Bezug auf die gesamte Korrelation zwischen der abhängigen und den unabhängigen Variablen ab.

Die Hauptkomponenten-Analyse ist ein multivariates statistisches Verfahren, welche es gestattet, durch eine Matrixtransformation der ursprünglichen Variablen neue Variablen (=Hauptkomponenten) zu definieren. Die Hauptkomponenten stellen eine Wiedergabe des maximalen Anteils der gesamten Varianz durch ein orthogonales Vektorsystem dar, welches eine Linearkombination der Einflußgrößen repräsentiert. Geht man von k Variablen aus, so kann man k Hauptkomponenten definieren, mit der Eigenschaft, dass die erste Hauptkomponente einen möglichst hohen Anteil der Gesamtvariabilität erfasst. Die zweite Hauptkomponente enthält nur Variabilität, die nicht schon von der ersten erfasst wird, usw. für die restlichen Hauptkomponenten. Hierdurch wird es möglich, einen Datensatz mit mehreren Variablen auf wenige Hauptkomponenten zu reduzieren, die dann einen grossen Anteil der Gesamtvariabilität erfassen [230]. Die (lineare) Korrelation der ursprünglichen Variablen mit den Hauptkomponenten ermöglicht deren Interpretation, ohne daß Information verloren geht. [231]

Die Hauptkomponentenanalyse als multivariates statistisches Verfahren gestattet es also, durch eine Matrixtransformation der ursprünglichen Variablen neue Variablen (=Hauptkomponenten) zu definieren. Man kann so einen großen Datensatz, z.B. 160 verschiedene Massenspektren bestehend aus je 750 (m/z)/Intensität-Paaren, auf z.B. 2 Hauptkomponenten vereinfachen.

Die resultierende Datenmatrix (m/z vs. Intensität) wurde mittels des Matlab-Programms “pcaMS3D” [232] analysiert und die Resultate, d.h. der Plot der 1. und 2. Hauptkomponente jeder Probe¹ aufgetragen.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß man mittels Hauptkomponentenanalyse zwischen Medium-, Zellextrakt-, Standard- und Fehler-Proben unterscheiden kann. Die Abbildung 8.5 zeigt die Projektion von 4 unterschiedlichen LC-MS Proben typen auf die ersten 2 Hauptachsen (=Hauptkomponenten). Hierdurch lassen sich die einzelnen Proben charakterisieren, bzw. Abweichungen und Ähnlichkeiten erkennen. In diesem Beispiel sind aus den drei Kategorien Fermentationsüberstände, Quenchingüberstände und Zellextrakte mehrere unterschied-

¹soweit nicht anders angemerkt, beträgt der Beitrag der ersten beiden Hauptkomponenten zur Gesamtvariabilität mindestens 90%

liche Probenläufe aufgetragen. Die Gruppierungen sind leicht wiederzufinden, ebenso fehlerhafte LC-MS Läufe.

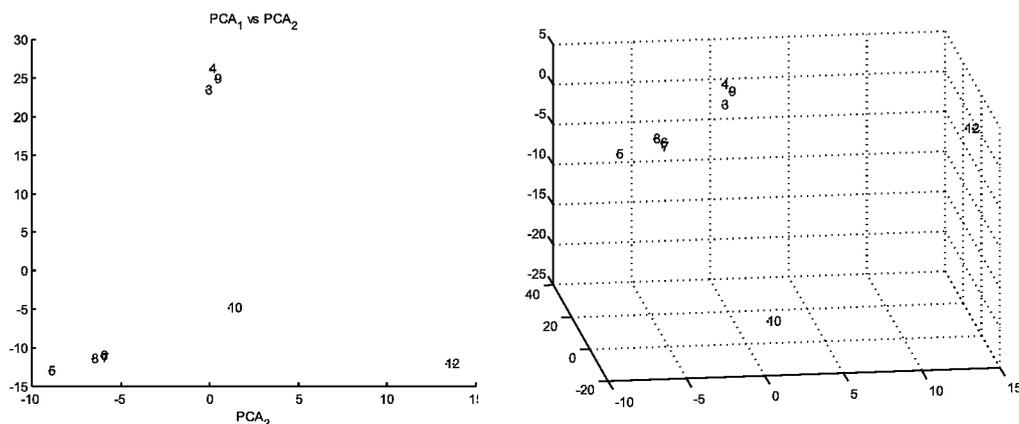


Abbildung 8.5.: Die Hauptkomponenten werden aus einer Matrize bestimmt, welche als Zeilen die laufende Nummer (1-10) des MS-Experimentes trägt und die Spalten die Intensitäten bei den jeweiligen m/z von $m/z = 50$ bis $m/z = 815$, aufsummiert über den kompletten Verlauf des jeweiligen MS-Experimentes (fingerprint). Fermentationsüberstände (1,2), Standards (3,4,9), Zellektrakte (5-8) und Fehlinjektion (10) in 2D Auftragung (PCA 1 vs. PCA 2, links) und 3D Auftragung (PCA 1 vs. PCA 2 vs. PCA 3). Die unterschiedlichen Cluster sind deutlich zu erkennen.

Massenspektrometrische Applikationen

Ein “spin-off” der Hauptkomponentenanalyse ist die Möglichkeit, Ähnlichkeiten verschiedener m/z in Einzelspektren (z.B. Mehrfachbestimmungen) zu identifizieren. Eines der größten Probleme der API (atmospheric pressure ionization) ist die Bildung diverser Addukte. Dies macht eine Interpretation der MS-Spektren äußerst schwierig. Eine einzige Substanz kann z.B. gleichzeitig als Monomer, Dimer, Trimer, Monomer mit Phosphat-Addukt, Dimer mit Phosphat-Addukt, etc., detektiert werden. Durch Anwendung der Hauptkomponentenanalyse auf die invertierte Matrix und Auftragung der m/z (anstelle der Einzelproben) in einem Plot, gruppieren sich alle m/z einer Substanz in einem Cluster zusammen. Dies macht eine Identifizierung von Addukten wesentlich einfacher und vereinfacht die Spektrenanalyse (siehe zum Beispiel Abbildung 8.6).

Mittels der selben Prozedur kann zwischen “wichtigen” peaks und “unwichtigen” (z.B. Perchlorat-Peaks, Puffer-Peaks, Rauschen, etc.) unterschieden werden (siehe Abbildung 8.7).

8.4. Genetische Algorithmen

Die gesamte DNA eines Lebewesens, die Chromosomen, codieren alle vererbba- ren Eigenschaften der Lebewesen. Die Evolution, die eine enorme Vielfalt nahe- zu ideal angepaßter Lebewesen hervorgebracht hat, ist somit das Ergebnis einer ständigen Veränderung und Optimierung der das jeweilige Lebewesen codieren- den Gene. Eine definierte genetische Struktur (Genotyp) ist Grundlage einer definierten äußeren Erscheinung (Phänotyp).

Genetische Algorithmen (GA) besitzen dieses natürliche Vorbild als Grundla- ge ihres Prinzips. Bevor diese Algorithmen zur Optimierung künstlicher Systeme herangezogen wurden, nutzten in den späten 50er und frühen 60er Jahren vor al- lem Biologen den GA zur Simulation natürlicher, genetischer Systeme [233, 234].

In der Biochemie und der Biotechnologie werden genetische Algorithmen be- reits erfolgreich eingesetzt, z.B. zur Optimierungen von Nährmedien in Fermen- tationen [235, 236], reaktionstechnische Optimierungen enzymatischer Synthesen [237], Simulationen zur Protein-Faltung [238] sowie die computergestützte Mo- dellierung von Rezeptor-Ligand-Strukturen [239], [240].

Eine Optimierung von Systemen mit Hilfe genetischer Algorithmen ist univer- sell anwendbar wie die Literaturbeispiele im vorangegangenen Abschnitt belegen. Dabei gelingt es, Optima auch solcher Systeme aufzufinden, die aufgrund ihrer mathematischen Komplexität nicht eindeutig beschrieben werden können. Eine Optimierung kann also ohne Kenntnis eines Modells durchgeführt werden [241].

Eine Optimierung mit einem GA kann als die Suche nach bestimmten Kom- binationen von Parametern verstanden werden, die eine Optimierung einer de- finierten, vorgegebenen Zielfunktion erwarten lassen. Die Zielfunktion ist dabei durch festgelegte Kriterien definiert, welche die Parameterkombinationen (Indi- viduen) erfüllen sollen - zum Beispiel eine optimale Trenngüte bei analytischen Problemen, wobei die Definition dieser Güte zunächst einmal beliebig sein kann. Die Zielfunktion ist nicht die mathematische Beschreibung des Systems durch die gewählten Parameter. Diese ist dem GA nicht bekannt und stellt die zu optimie- rende "black box" dar. Ziel der Optimierung ist es, die Parameterkombinationen (input) zu finden, die in der "black box" die Kriterien der gesetzten Zielfunk- tion möglichst optimal erfüllen. Nur das Ergebnis (output) ist von Interesse. Wie dieses Ergebnis zustande kommt, d.h. die Funktionsweise der "black box", interessiert nicht ². Der GA ist lediglich das Instrumentarium zum Auffinden ge- eigneter Parameterkombinationen, indem er die gewonnenen Erkenntnisse über einmal generierte Kombinationen als Grundlage zum Auffinden neuer Individuen nutzt.

Die drei elementaren Prozesse (Operatoren) dieser Evolutionsstrategie sind:

1. Selektion: Nur Individuen, die den vorgegebenen Zielen gerecht werden,

²"Eine Frage in eine black box einzuspeisen und am anderen Ende die Antwort geliefert zu bekommen, bereichert das Wissen, aber nicht das Verstehen." [242]

überleben.

2. Reproduktion: Sie sichert den Bestand der “guten” (im Sinne der Zielfunktion) Individuen. Mit jeder neuen Generation werden einmal erworbene gute Merkmale beibehalten und untereinander durch crossing-over (s.u.) vermischt.
3. Mutation: Zufällige Veränderung der Erbinformation (Chromosomen), die unmittelbar oder in späteren Generationen eine Veränderung des Phänotyps zur Folge haben kann.

In dieser Arbeit fand der GA Anwendung im Bereich der Optimierung capillarelektrophoretischer Analysenverfahren. Ein Beispiel zur Anwendung des GA bei der CE-Methodenentwicklung liefert die experimentelle Optimierung einer Trennmethode für sechs Nucleotide ATP, ADP, AMP, cAMP, NAD und NADP.

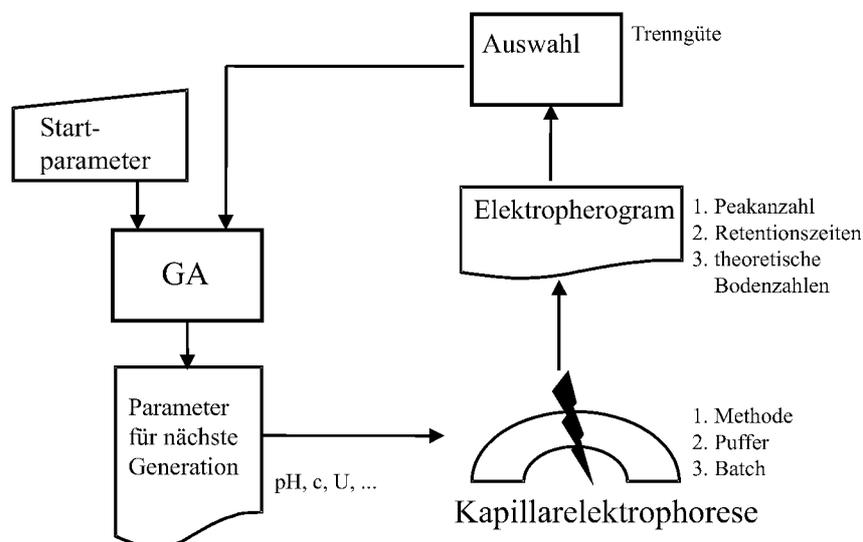


Abbildung 8.8.: Flußbild des Versuchsablaufs bei der Verwendung genetischer Algorithmen zur CE-Methodenentwicklung

Vor Beginn der Optimierung müssen die Versuchsparameter, Parameterbereiche, Zielgrößen und Bewertungskriterien festgelegt werden. Aufgabe der Optimierung ist es, die 6 Analyten elektrophoretisch optimal aufzutrennen. Die Trenngüte (“Bewertungskriterium”) wird in diesem Beispiel als Faktor aus Retentionszeitdifferenz zwischen den Einzelpeaks und theoretischer Bodenzahl eines Einzelpeaks definiert (siehe Gleichung 8.2 und Abbildung 8.9). Für jeden Versuch (d.h. jedes Mitglied einer Generation) werden diese Faktoren der Einzelpeaks zu einer Gesamttrenngüte aufsummiert. Es wird ein Maximum dieser Gesamttrenngüte (“Zielgröße”) angestrebt, d.h. also eine maximale Trennung der Peaks voneinander bei gleichbleibender theoretischer Bodenzahl (als Maß für die Qualität eines Peaks).

$$\text{Trenngüte} = \sum_{i=1}^n (\Delta t_i \cdot TP_i) \quad (8.2)$$

Mit n : Anzahl der Substanzen, Δt_i : Migrationszeitdifferenz zum vorherigen Peak³, TP_i : Anzahl theoretischer Böden des Peaks i ⁴.

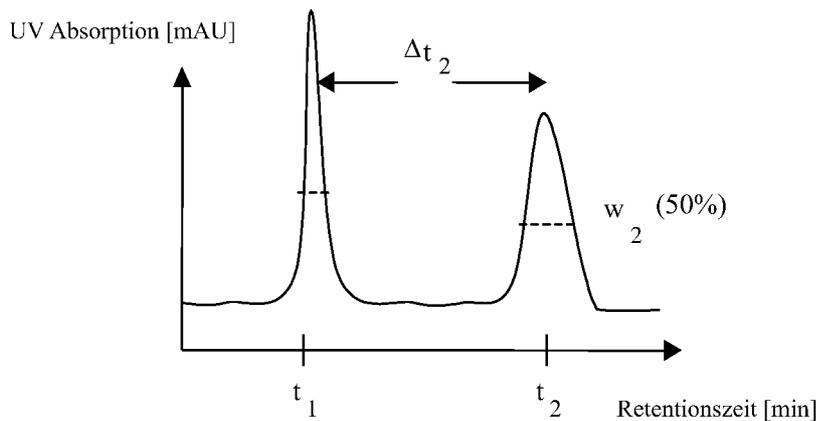


Abbildung 8.9.: Definition der Trenngüte

Es wurden 6 Parameter ausgesucht, welche einen Einfluß auf die elektrophoretische Trennung besitzen: Injektionszeit, Trennungsspannung der capillarelektrophoretischen Methode, pH des Trennpuffers, Konzentration des Puffers, Temperatur während der capillarelektrophoretischen Trennung und überlagerter Druck während der capillarelektrophoretischen Trennmethode. Für diese Parameter werden Variationsbereiche festgelegt, innerhalb welcher der Wert dieses Parameters während des Optimierungsprozesses schwanken darf (siehe Tabelle 8.2). Beispielsweise wird der Parameter Injektionszeit in einem Bereich von 5 bis 20 Sekunden variiert, und zwar in 4 Schritten, d.h. es sind zulässig die Werte: 5, 10, 15, 20 Sekunden. Diese Information belegt 2 bits auf dem "Chromosomenstrang" des genetischen Algorithmus.

Mit den für die erste Generation zufällig ausgewählten Versuchsparametern werden die ersten 16 Experimente durchgeführt (siehe Abbildung 8.8), d.h. es werden die Trennpuffer in den jeweils angegebenen Konzentration und mit dem jeweils angegebenen pH-Wert angesetzt und die capillarelektrophoretische Trennmethode mit den Parametern Injektionszeit, Trennungsspannung, Temperatur und Druck programmiert. Die 16 Versuche werden in Mehrfachansätzen durchgeführt und die Resultate, d.h. die Elektropherogramme ausgewertet.

Die Elektropherogramme werden ausgewertet nach Anzahl der Peaks und Retentionszeit, bzw. theoretische Bodenzahl der einzelnen Peaks. In diesem Beispiel werden alle Versuche verworfen ("ausselektiert"), welche weniger als die

³für den ersten Peak ($n = 1$) gilt hier die absolute Migrationszeit

⁴ $TP_i = 5,54 \left(\frac{t_i}{w_{i50\%}} \right)^2$

8. Anhang

Parameter	Einheit	Variationsbreite	Schritte	bits
Injektionszeit	sec	5-20	5 (4)	2
Trennungsspannung	kV	10-30	5 (5)	3
pH (Puffer)	-	2-12	1 (10)	4
Konzentration (Puffer)	mM	0-200	50 (5)	3
Temperatur	°C	15-35	5 (5)	2
Druck	psi	0, 0.1, 0.5	1 (3)	2

Tabelle 8.2.: Versuchparameter und Variationsbereiche für die Optimierung mittels GA

erwarteten 6 Peaks (entsprechend der 6 eingesetzten Analyten) enthalten. Somit findet eine erste Selektion statt, indem zu den "überlebenden" Mitglieder einer Generation nur solche zählen, welche alle 6 erwarteten Peaks aufweisen. In einem zweiten Selektionsschritt werden die noch überlebenden Mitglieder einer Generation nach Gleichung 8.2 eingestuft. D.h. es wird für jedes Mitglied einer Generation eine Trenngüte berechnet, anhand welcher eine Aussage über die Qualität der Trennung gemacht werden kann. Mittels dieses zweiten Selektionsschrittes werden Versuche mit "guter" Trennung gegenüber solchen mit "schlechter" Trennung bevorzugt und in der nächsten Iterationsrunde des genetischen Algorithmus bevorzugt.

Anhand der Parameter der erfolgreichen Versuche und der entsprechenden Trenngüten als Qualitätskriterium wird durch den genetischen Algorithmus die nächste Generation, d.h. die Parameter für die Versuche der nächsten Generation, berechnet. Die Wahrscheinlichkeit einer Punktmutation liegt bei 0,05; die eines Crossovers bei 0,95. Es wird automatisch das beste Mitglied der letzten Generation in die nächste übernommen. Fernerhin haben die übrigen "erfolgreichen" Mitglieder gleiche Chancen in die nächste Generation übernommen zu werden (ball-bearing Methode). Nach diesem Schema (siehe Abbildung 8.8) wird fortgefahren bis ein Abbruchkriterium erreicht wird, in diesem Falle eine zufriedenstellende elektrophoretische Trennung der 6 Analyten. In dem beschriebenen Beispiel ist die Optimierung der elektrophoretischen Trennmethode über einen Optimierungszeitraum von 4 Generation erfolgt (siehe Abbildung 8.10 und 8.11). Anhand der Trenngüte läßt sich der Gang und der Erfolg der Optimierung gut nachverfolgen.

Die Methodenentwicklung in der Capillarelektrophorese mittels genetischer Algorithmen ist auch auf andere Systeme ausgedehnt worden [243, 244].

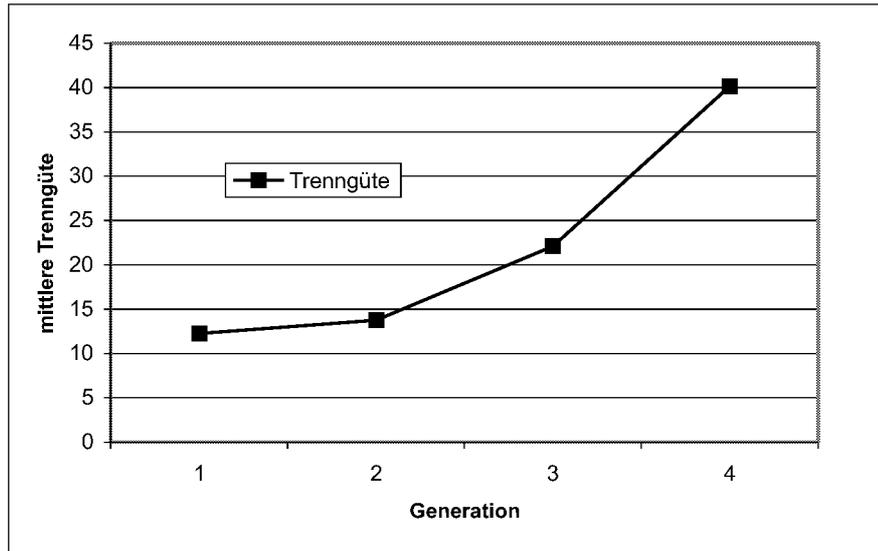


Abbildung 8.10.: Optimierung der Trennmethode in 4 Generationen

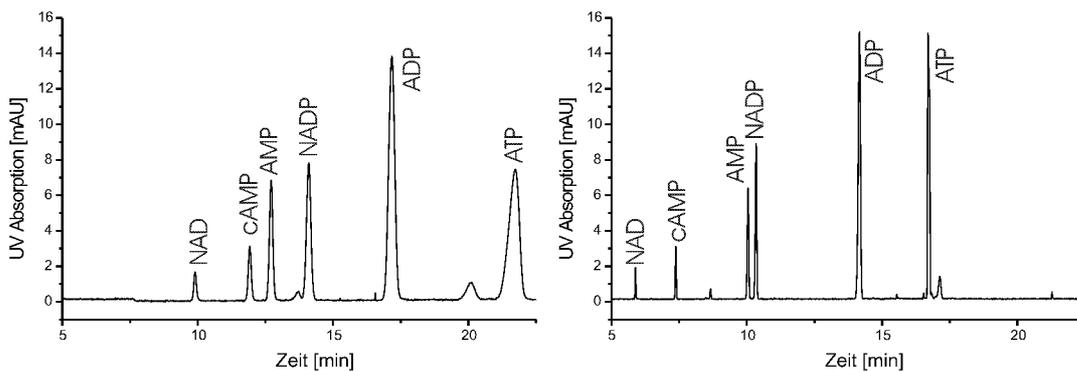


Abbildung 8.11.: [CE Optimierung: Elektropherogramme] Exemplarische Elektropherogramme der 1. und 4. Generation

8.5. Fehlerbetrachtung

Eine exemplarische Fehlerbetrachtung wird anhand der intrazellulären Metabolitdynamiken von G6P und PEP aus dem GLC/GLC-Pulsexperiment (siehe Seite 93) durchgeführt.

In einem ersten Ansatz wird die Standardabweichung der Meßwerte im steady state als Maß für den Gesamtfehler aller Meßwerte herangezogen. Diese Standardabweichung erfaßt (unter Voraussetzung eines konstanten Wertes für das Fließgleichgewicht) den Fehler der Probenahme, der Probenaufarbeitung und der Analytik. Je nach Metabolit bewegt sich dieser Fehler im Bereich von 10 bis 15% (siehe Abbildung 8.12).

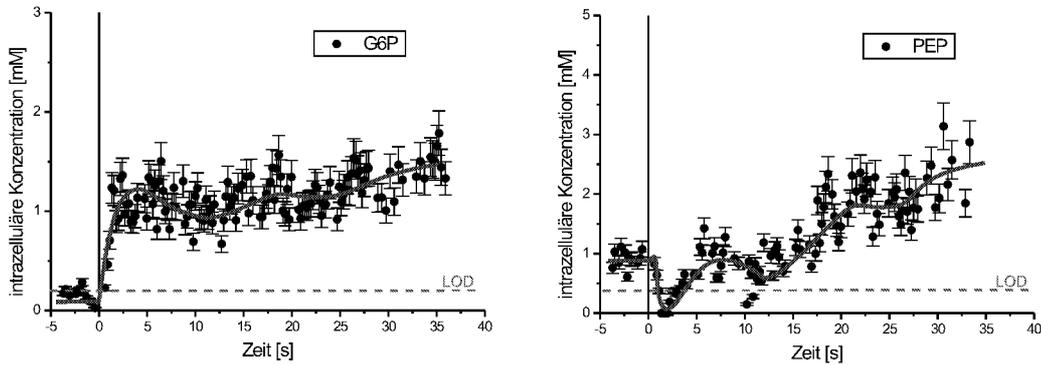


Abbildung 8.12.: Fehlerbetrachtung unter Annahme eines konstanten Fehlers (berechnet aus der Varianz der steady state Werte)

Die oben durchgeführte Fehlerbetrachtung ist dahingehend stark vereinfachend, als daß der Meßfehler der Zustandsgrößen als konstant vorausgesetzt wird. Diese Annahme ist jedoch meist nicht gerechtfertigt. In der folgenden Fehlerbetrachtung wird daher der relative Meßfehler $y_{rel,ges}$ einer Zustandsgröße c als Funktion des Meßbereichs aufgefaßt. Die Abschätzung des relativen Fehlers zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen wird mit Hilfe der Gleichung 8.3 durchgeführt [199, 22].

$$y_{rel} = y_0 + a \cdot e^{-\frac{c}{b}} \quad (8.3)$$

Hierbei ist y_0 der minimale relative Fehler, a und b sind systemabhängige Parameter und c die zu bestimmende Konzentration (Zustandsgröße).

Der Fehler y_{rel} wird aus den relativen Fehlern jeder einzelnen Analysemethode bestimmt. Hierzu wird die relative prozentuale Abweichung von bekannten Standardkonzentrationen nach deren Bestimmung über eine Kalibriergerade untersucht. Nach Ermittlung des Mittelwertes der einzelnen relativen Fehler einer Analysenmethode werden diese Datenpunkte durch die Gleichung 8.3 angepasst.

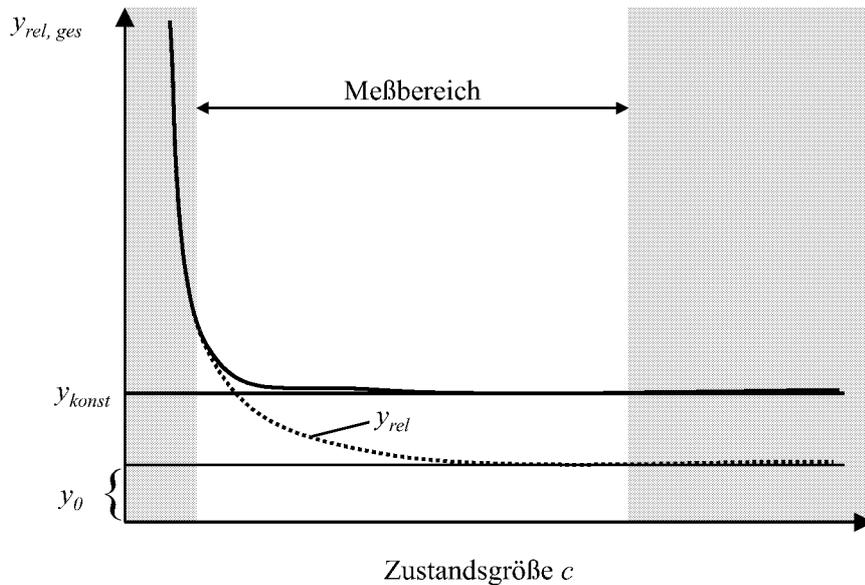


Abbildung 8.13.: Abschätzung des gesamten relativen Fehlers bei der Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen. Der gesamte relative Fehler $y_{rel, ges}$ berücksichtigt einen prozentualen Fehler y_{rel} und einen konstanten Fehler y_{konst}

Der so erhaltene Fehler y_{rel} ist konzentrationsabhängig und nähert sich bei höheren Konzentrationen einem minimalen relativen Fehler y_0 asymptotisch an. Der minimale Fehler y_0 ist wie die Parameter a und b systemabhängig; diese Werte werden bei der Kurvenanpassung eines Analysensystems durch die Gleichung 8.3 ermittelt. Der so abgeschätzte relative Fehler y_{rel} beinhaltet die Fehler, die bei der Probenvorbereitung bis zur Bestimmung des einzelnen Metaboliten (ohne Probenahme und Extraktion) auftreten. Die Fehler, die bei der Probenahme und der Extraktion der Zellen auftreten, werden als konstant (y_{konst}) angenommen.

Die Standardabweichung der Probenahme (1,6% [22]) wird zu dem relativen Fehler y_{rel} der einzelnen Analysenmethoden addiert. Der Extraktionsfehler wird aus steady state Proben abgeschätzt. Diese Proben sollten im Rahmen der oben abgeschätzten Fehler (Analytik und Probenahme) alle die gleiche Konzentration aufweisen, da die Zellen sich in einem Fließgleichgewicht befinden. Ist der so ermittelte Fehler der Proben größer als der abgeschätzte, ist es wahrscheinlich, daß diese Differenz aus der Extraktion der einzelnen Proben entsteht. Literaturdaten (z.B. [30, 21, 22]) zeigen ähnliche Extraktionsfehler. Der ermittelte Extraktionsfehler muß ebenso wie der Probenahmefehler zu dem relativen Fehler y_{rel} addiert werden.

$$y_{rel, ges} = y_{rel} + y_{konst} \quad (8.4)$$

Hierbei gilt $y_{konst} = y_{Probenahme} + y_{Extraktion}$.

Die Abschätzung des gesamten relativen Fehlers setzt sich aus der Probenahme (Standardabweichung), der Extraktion (Abschätzung aus steady state Proben) und der jeweiligen Analysemethode (einschließlich der Probenvorbereitung) zusammen. Durch Abschätzung des gesamten relativen Meßfehlers der zu bestimmenden Metabolitkonzentrationen ist es möglich, Meßfehler vom dynamischen Verhalten eines Metaboliten zu unterscheiden. Die durch Kurvenanpassung ermittelten Parameter (y_0 , a , b) sind exemplarisch für die Metabolitverläufe von G6P und PEP in Abbildung 8.14 aufgeführt.

Bei Verwendung dieser Methode ist der berechnete Fehler um den Faktor 1,3 bis 1,4 größer als bei Verwendung der steady state Abschätzung. Selbst unter Berücksichtigung dieses größeren Fehlers ist jedoch gut zu erkennen, daß die beobachtete Dynamik der intrazellulären Metabolitverläufe nicht durch eine Varianz der Meßwerte bedingt ist.

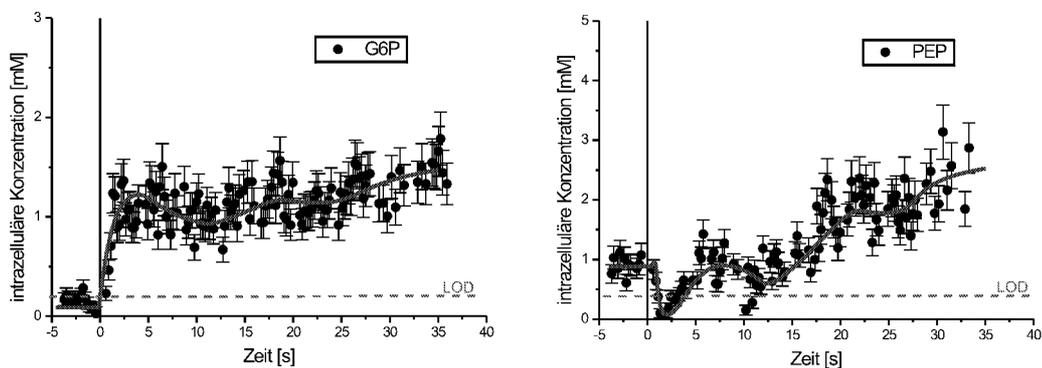


Abbildung 8.14.: Fehlerbetrachtung unter Verwendung der Gleichungen 8.3 und 8.4 (Parameter G6P: $y_0 = 0,04283$, $a = 0,13362$, $b = 0,01537$; Parameter PEP: $y_0 = 0,06231$, $a = 1,11684$, $b = 0,01119$)

8.6. Berechnung der Kohlenstoffbilanzen

Zur Überprüfung der durchgeführten Messungen werden von allen Chemostat-Fermentationen Kohlenstoffbilanzen erstellt. Hierzu werden die den Reaktor verlassenden Stoffströme (Biomasse, CO_2 gasförmig, CO_2 gelöst, organische Säuren) als Kohlenstoffströme formuliert und auf den in den Reaktor gelangenden Kohlenstoffstrom (Glucose, CO_2 gasförmig) bezogen. Folgende Gleichungen wurden zur Bilanzierung des Chemostaten verwendet⁵:

⁵Daten für sämtliche chemostatischen Fermentationen, siehe Tabelle 8.3

$$Substrat_{ein} = \frac{c_{Substrat}[g\ l^{-1}] \cdot \sum(C - Atome) \cdot Volumenstrom[l\ h^{-1}]}{M_{Substrat}[g\ mol^{-1}]} \quad (8.5)$$

$$Zuluft = \frac{CO_2[\%] \cdot \sum(C - Atome) \cdot Zuluft[l\ h^{-1}]}{100[\%] \cdot 22,4[l\ mol^{-1}]} \quad (8.6)$$

Die Zuluft enthält einen Anteil von 20,8% Sauerstoff und 0,03% Kohlenstoffdioxid. Der Kohlenstoffstrom, der in den Reaktor eingeht, berücksichtigt den Substratzulauf und die Zuluft:

$$C_{ein} = Substrat_{ein}[mol\ h^{-1}] + Zuluft[mol\ h^{-1}] \quad (8.7)$$

Die Kohlenstoffströme, die den Reaktor verlassen, werden wie folgt berechnet (MO-Koeffizient = 0,4; entspricht 40% C-Gehalt in *E. coli*):

$$C_{BTM} = \frac{BTM[g\ l^{-1}] \cdot MO - Koeffizient \cdot Volumenstrom[l\ h^{-1}]}{M(C)[g\ mol^{-1}]} \quad (8.8)$$

$$Abluft = \frac{CO_2[\%] \cdot \sum(C - Atome) \cdot Zuluft[l\ h^{-1}]}{100[\%] \cdot 22,4[l\ mol^{-1}]} \quad (8.9)$$

Der Gehalt an CO_2 in der Abluft wurde wie in Tabelle 8.3 bestimmt. Der als gelöstes CO_2 den Reaktor verlassende Kohlenstoffstrom wird über das Henry-Gesetz und das Kohlensäuregleichgewicht abgeschätzt, wobei in erster Näherung die Ionenstärke nicht berücksichtigt wird [245]:

$$C_{CO_2} = Kh_{CO_2/H_2O} \cdot p_{CO_2} \quad (8.10)$$

$$C_C = C_{CO_2} \cdot \left(1 + \frac{K_1}{C_{H^+}} + \frac{K_1 \cdot K_2}{(C_{H^+})^2}\right) \quad (8.11)$$

Der den Reaktor verlassende Gesamtkohlenstoffstrom wird über die Summe der einzelnen Ströme berechnet:

Puls	Substrat	c(Substrat) [g l ⁻¹]	V [l h ⁻¹]	Flow [l min ⁻¹]	BTM [g l ⁻¹]	Abgas CO ₂ [%]
GLC/GLC K12	Glucose	30	0,875	10	10,0	1,2
GLC/GLC 3pMK7	Glucose	30	0,875	7	11,6	1,6
GLY/GLY	Glycerol	30,3	0,875	10	10,25	1,2
GLY/GLC	Glycerol	30,3	0,875	10	10,26	1,2

Tabelle 8.3.: C-Bilanz Parameter für alle Fermentationen

K_{hCO_2/H_2O} :	29,28 mol/m ³ ·bar
p_{CO_2} :	1,23 bar
K_1 (37°C):	$4,7424 \cdot 10^{-7}$ mol/l
K_2 (37°C):	$5,781 \cdot 10^{-11}$ mol/l
c_{H^+} :	10^{-7} mol/l (bei pH 7,0)

Tabelle 8.4.: Daten zur Berechnung der C-Bilanz

$$C_{aus} = Abluft[mol h^{-1}] + C_{BTM}[mol l^{-1}] + CO_2(\text{gelöst})[mol h^{-1}] \quad (8.12)$$

Die Bilanzdeckung errechnet sich aus dem Verhältnis der eingehenden zu den ausgehenden Kohlenstoffströmen:

$$C = \frac{C_{aus}[mol h^{-1}]}{C_{ein}[mol h^{-1}]} \quad (8.13)$$

Das Ergebnis dieser Kohlenstoffbilanz ist in Abbildung 6.17 auf Seite 90 dargestellt. Bei vollständigem Umsatz werden 37,1% des eingesetzten Kohlenstoffs für die Produktion von Biotrockenmasse verbraucht, während etwa dieselbe Menge (38,1%) in Form von gasförmigen Kohlenstoffdioxid den Reaktor verlassen. Der Anteil, der den Reaktor in Form von gelöstem CO₂ verläßt, liegt bei 21,2%.

Die Bilanzlücke von unter 4% unter substratlimitierenden Bedingungen kommt durch die Vernachlässigung von nicht detektierten Nebenprodukten (Acetat, etc.) zustande. Alle substratlimitierten Chemostaten liefern die gleiche Kohlenstoffbilanz. Somit wurde bei allen Fermentationen reproduzierbar ein definierter Fließgleichgewichtszustand eingestellt.

8.7. Weiterführende Untersuchungen zum Zellaufschluß

Zellabtrennung

Es wurde die Notwendigkeit der Zellabtrennung vor der Neutralisationsphase des Perchlorsäureaufschlusses untersucht. Bisher wurden nach Perchlorsäurezugabe und Gefriertaucyclus die Zellbestandteile durch eine Ultrazentrifugation abgetrennt und der klare Überstand anschließend neutralisiert. LC-MS Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß auch direkt (d.h. mit Zellbestandteilen) neutralisiert werden kann. Die Aufarbeitung von Pulsproben kann so um einen Schritt reduziert werden. Das zur Neutralisation benötigte Volumen an K_2CO_3 erhöht sich um 2.5%, höchstwahrscheinlich aufgrund der Pufferkapazität der Zellbestandteile (Phosphatgehalt höher).

Durch LC-MS Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß Zellextrakte ohne vorherige Zellabtrennung weniger Perchlorate, dafür aber mehr Phosphate enthalten (Phosphat als Zellwandbestandteil).

Der Zeitgewinn bei der Probenaufarbeitung, die Abnahme an Perchlorat in der Probe und die Zunahme der Sensitivität sprechen dafür, in Zukunft auf einen Zellabtrennungsschritt zu verzichten.

Aufschlußquantifizierung über Aminosäuren

Als eine weitere Möglichkeit der Aufschlußquantifizierung wurde die Quantifizierung intrazellulärer Aminosäuren untersucht. Aufgrund der relativ isolierten Position wurde der Phenylalanin-Peak als Indikator für den Zellaufschluß herangezogen. Der Fehler bei Reproduktionsmessungen lag für diese Aminosäure unter 3,5%, in den steady state Proben eines Glucosepulssexperimentes jedoch bei 10,2%. Ein ähnliches Resultat läßt sich auch bei anderen Aminosäuren erzielen. Über diese Differenz sollte es möglich sein, eine Abschätzung über die Reproduzierbarkeit des Zellaufschlusses zu erhalten (ca. 6,7%). Der hierbei ermittelte Fehler würde sowohl die Probenahme, sämtliche Pipettierschritte, die Neutralisation und den Gerätefehler (in diesem Falle Aminosäuren-HPLC) enthalten und für jede Probe diskret bestimmbar sein.

8.8. Symbole und Abkürzungen

μ	spezifische Wachstumsrate	$[\text{h}^{-1}]$
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	$[\text{h}^{-1}]$
θ	mittlere Verweilzeit	$[\text{h}]$
Θ	Mischzeit	$[\text{s}]$
2PG	2-Phosphoglycerat	
3PG	3-Phosphoglycerat	
6PG	6-phosphogluconate	
AcCoA	Acetyl Coenzym A	
ADP	Adenosin Diphosphate	
AMP	Adenosin Monophosphate	
API	atmospheric pressure ionisation	
AST	Aspartat Aminotransferase	
ATP	Adenosin Triphosphate	
BM	Biomasse	
BPS	Berufspraktisches Semester	
BSA	bovine serum albumin	
BTM	Biotrockenmasse	
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat	
cGMP	cyclisches Guanosin Monophosphat	
CID	collision induced dissociation	
CL	Citrat Lyase	
CoA	Coenzym A	
CRP	cyclisches-AMP Rezeptorprotein	
CS	Citrat Synthetase	
CSTR	continuous stirred tank reactor	
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid	
D	Durchflußrate	$[\text{h}^{-1}]$
Da	Dalton	
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	
DREEM	DREEM Really Easily Explains Metabolism	
E	Enzymkonzentration	$[\text{g l}^{-1}]$
$E_{I,II,III}$	Enzym I, II, III	
E_A	Aktivierungsenergie	$[\text{kJ mol}^{-1}]$
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg	
ES	Enzym-Substrat-Komplex-Konzentration	$[\text{g l}^{-1}]$
ESI	Electrospray Ionisierung	
F	Flüssigkeitsstrom	$[\text{h}^{-1}]$
F_L	Volumenstrom der Flüssigkeit	$[\text{s}^{-1}]$
F6P	Fructose-6-phosphat	

FAD	Flavin Adenin Dinucleotid	
FADH ₂	Flavin Adenin Dinucleotid, reduzierte Form	
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat	
G3P	Glycerol-3-phosphat	
G6P	Glucose-6-phosphat	
G6P-DH	Glycerolaldehyd-6-phosphat Dehydrogenase	
GA	Genetischer Algorithmus	
GAP	Glycerinaldehydphosphat	
GAP-DH	Glycerolaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	
GDH	Glycerolphosphat Dehydrogenase	
GIDH	Glutamat Dehydrogenase	
GK	Glycerolkinase	
GLC	Glucose	
GLY	Glycerol	
GOT	Glutarat-Oxotransferase	
GTP	Guanosin Triphosphate	
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	
HPLC	High-performance liquid chromatography	
HPr	hitzestabiles Protein	
HTS	High Throughput Screening	
ICDH	Isocitrat Dehydrogenase	
IT	injection time	[s]
ITP	Inosin-Triphosphat	
K ₁ , K ₂	Konzentrationen	[mol l ⁻¹]
k ₁ , k ₂ , k ₃	Geschwindigkeitskonstanten	
K _E	spezifisches Zellvolumen	
K _I	Inhibierungskonstante	[g l ⁻¹]
K _M	Michaelis-Konstante	[g l ⁻¹]
K _S	Monod-Konstante	[g l ⁻¹]
LCT	ESI-TOF MS (Micromass Ltd., UK)	
LCQ	ESI-Ionenfallen MS (Thermoquest, USA)	
LDH	Lactat Dehydrogenase	
LOD	limit of detection	
Lsg.	Lösung	
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis	
M5P	Summenpool Pentose-5-phosphate	
MCA	metabolic control analysis	
MDH	Malat Dehydrogenase	
MFA	metabolic flux analysis	
MIT	maximum injection time	[s]
mm	Millimeter	
mM	Millimol	

8. Anhang

MMT	Metabolic Modeling Tool	
ms	Millisekunden	
mS	Millisiemens	
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie	
MS ⁿ	n-faches MS/MS (Fragmentierungs) Experiment	
MS/MS	massenspektrometrisches Fragmentierungs-Experiment	
MSR	Messen, Steuern, Regeln	
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid	
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form	
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat	
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form	
OD	optische Dichte	
OxAc	Oxaloacetat	
p	Druck	[bar]
P _i	anorganisches Phosphat	
PEP	Phosphoenolpyruvat	
PEP:PTS	Phosphoenolpyruvatabhängiges PTS	
PFK	Phosphofruktokinase	
PGI	Phosphoglucose-Isomerase	
PGK	Phosphoglycerat Kinase	
PK	Pyruvat Kinase	
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck	[bar]
PPP	Pentosephosphatweg	
pts(-)	PEP-Phosphotransferase-System defizient	
PTS	Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-System	
Pyr	Pyruvat	
q	spezifische Substratverbrauchsgeschwindigkeit	[h ⁻¹]
R	Gaskonstante	[J K ⁻¹ mol ⁻¹]
R5P	Ribose-5-phosphat	
rp	reversed phase	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
RSD	relative standard deviation	
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute	
S	Substratkonzentration	[g l ⁻¹]
S ₀	Substratkonzentration im Zulaufmedium	[g l ⁻¹]
S _G	Substrat für Wachstum	
S _M	Substrat für Zellerhalt	
S _{stat}	stationäre Substratkonzentration	[g l ⁻¹]
SIM	selected ion monitoring	

SMP	Siemens Microprocessor Peripherie	
SRM	selected reaction monitoring	
STR	stirred tank reactor	
t	Zeit	[s]
t_c	Zirkulationszeit	[s]
t_r	Retentionszeit	[s]
t_t	Totzeit	[s]
t_m	Mischzeit	[s]
T	Temperatur	[K]
TBA	tert-butyl-Ammoniumsulfat	
TCA	Trichloressigsäure	
TEA	Triethanolamin	
TIC	total ion count	
TIM	Triphosphat-Isomerase	
TMS	total microscans	
TOF	time-of-flight	
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
UV	Ultraviolett	
V	Reaktorvolumen	[l]
V_P	Probenvolumen	[l]
V_Z	zellinternes Volumen	[l]
VE	voll entsalzt	
VVM	Gasvolumenstrom pro Flüssigkeitsvolumen	[min ⁻¹]
Vol%	Volumenprozent	
X_{stat}	Biomasse-Konzentration	

8.9. Verwendete Medien

8.9.1. Substratkonzentrationen

8.9.2. Synthetisches Medium für die erste und zweite Vorkultur

Alle Salzbestandteile werden in 900 ml Aqua bidest gelöst und mit konzentrierter NaOH auf pH=7 titriert. Substrat und MgSO₄ werden separat in jeweils 50 ml Aqua bidest gelöst und getrennt bei 121°C und 2 bar für 30 min autoklaviert um eine Maillard-Reaktion, d.h. eine nichtenzymatische Bräunung durch

Substrat	Vorkultur [g/l]	Batch [g/l]	Konti [g/l]
Glucose [C6]	6,0	30,0	30,0
Glycerol [C3]	4,65	30,8	30,8
Ammoniumacetat [C2]	6,21	38,5	38,5

Tabelle 8.6.: Konzentration unterschiedlicher Substrate in den jeweiligen Kulturen

Salze	Konz. [g/l]	Spuren	Konz. [g/l]
NH ₄ Cl	0,2	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,0005
KH ₂ PO ₄	3,25	CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,00025
K ₂ HPO ₄	2,5	MnSO ₄ ·1 H ₂ O	0,0025
NaH ₂ PO ₄	1,5	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,00175
		H ₃ BO ₃	0,000125
		AlCl ₃ ·6 H ₂ O	0,0025
MgSO ₄	0,5	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,0005
Substrat	s.o.	FeSO ₄	0,01

Tabelle 8.7.: Synthetisches Medium für die erste und zweite Vorkultur

die Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren zu verhindern. Bei diesem und den folgenden Medien handelt es sich um eine Abwandlung eines Minimalmediums [246] für die Hochzelldichtefermentation von *E. coli*. Es wurden die Konzentration der Salze geviertelt und, nach ersten Versuchen in einer Batchfermentation, der Stickstoffanteil erhöht.

8.9.3. Synthetisches Medium für die Batchfermentation

Salze:	Konz. [g/l]	Spuren	Konz. [g/l]
NH ₄ Cl	0,2	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,0005
KH ₂ PO ₄	3,25	CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,00025
K ₂ HPO ₄	2,5	MnSO ₄ ·1 H ₂ O	0,0025
NaH ₂ PO ₄	1,5	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,00175
		H ₃ BO ₃	0,000125
		AlCl ₃ ·6 H ₂ O	0,0025
MgSO ₄	0,5	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,0005
Substrat	s.o.	FeSO ₄	0,01

Tabelle 8.8.: Synthetisches Medium für die Batchfermentation

Alle Salzbestandteile werden in 4,5 l Aqua bidest gelöst. Substrat und MgSO₄ werden separat in jeweils 250 ml Aqua bidest gelöst und wie unter 8.9.2 beschrieben autoklaviert. Zusätzlich dient 1 ml l⁻¹ PPG 1:10 als Antischaum.

8.9.4. Synthetisches Medium für den Chemostat

Alle Salzbestandteile werden in 80 l Aqua bidest gelöst und in einem Autoklav Modell D-190 der Firma Bioengineering AG, Schweiz, sterilisiert. Substrat und

Salze:	Konz. [g/l]	Spuren	Konz. [g/l]
NH ₄ Cl	0,2	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,0005
KH ₂ PO ₄	3,25	CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,00025
K ₂ HPO ₄	2,5	MnSO ₄ ·1 H ₂ O	0,0025
NaH ₂ PO ₄	1,5	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,00175
		H ₃ BO ₃	0,000125
		AlCl ₃ ·6 H ₂ O	0,0025
MgSO ₄	0,5	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,0005
Substrat	s.o.	2464,0 FeSO ₄	0,01

Tabelle 8.9.: Synthetisches Zulaufmedium für den substratlimitierten Chemostat

MgSO₄ werden separat in jeweils 500 ml Aqua bidest gelöst und wie unter 8.9.2 beschrieben autoklaviert. Zusätzlich dient 1 ml l⁻¹ PPG 1:10 als Antischaum.

8.9.5. Stammlösung für Spurenelemente

Spurenelemente	Konz. [g/mol]	[g/l]	250fach [g/l]
CaCl ₂ · 2H ₂ O	128,99	0,040	10,0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,45	0,002	0,50
CuCl ₂ · 2H ₂ O	170,48	0,001	0,25
MnSO ₄ · 1H ₂ O	169,02	0,010	2,50
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	237,93	0,007	1,75
H ₃ BO ₃	61,83	0,0005	0,125
AlCl ₃ · 6 H ₂ O	241,45	0,010	2,50
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	241,95	0,002	0,50
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	278,02	0,040	10,0

Tabelle 8.10.: Zusammensetzung der konzentrierten Spurenelementelösung

Die einzelnen Komponenten werden in 5 N Salzsäure (245 ml HCl 32% auf 500 ml Wasser) gelöst. Es werden 1,0 ml der 250fach-Stammlösung pro Liter Fermentationsmedium hinzugegeben.

8.10. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien in der Reinheit "pro analysi" oder "reinst" verwendet.

Chemikalien und Enzyme	Hersteller
2-Oxoglutarat	Merck, Darmstadt
3-Amino-1-propanol	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Biosolve LTD
Acetyl-CoA	Merck, Darmstadt
Adenosindiphosphat, ADP	Merck, Darmstadt
Adenosinmonophosphat, AMP	Merck, Darmstadt
Adenosintriphosphat, ATP	Boehringer GmbH, Mannheim
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Antischaum PPG 1200	Fluka
Aspartat Aminotransferase, AST (GOT)	Boehringer GmbH, Mannheim
BCA-Proteinassay	Pierce, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CHAPS	Amersham Pharmacia , S
Citrat	Merck, Darmstadt
Citrat Lyase, CL	Boehringer GmbH, Mannheim
Citrat Synthetase, CS	Sigma GmbH, München
Coenzym A, CoA	Boehringer GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka
D-Isocitrat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Amersham Pharmacia , S
DL-Malat	Sigma GmbH, München
EDTA, Titriplex III	Merck, Darmstadt
Erythrose	Sigma GmbH, München
Excel Gel SDS Buffer Strips	Amersham Pharmacia , S
Excel Gel XL SDS 12-14	Amersham Pharmacia , S
Gluconat	Sigma GmbH, München
Glucono-d-lacton	Sigma GmbH, München
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutamat-Dehydrogenase, GDH	Boehringer GmbH, Mannheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycylglycin	Boehringer GmbH, Mannheim
Harnstoff	Amersham Pharmacia , S
IEF-Standard	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
Immobiline DryStrip, (4-7, 5-6), 18 cm	Amersham Pharmacia , S
Inosin-Triphosphat, ITP	Boehringer GmbH, Mannheim

Iodacetamid	Fluka
Isocitrat-Dehydrogenase, ICDH	Boehringer GmbH, Mannheim
K_2CO_3	Merck, Darmstadt
K_2HPO_4	Merck, Darmstadt
K_3PO_4	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
$KHCO_3$	Merck, Darmstadt
Lactat-Dehydrogenase, LDH	Boehringer GmbH, Mannheim
L-Glutamat	Merck, Darmstadt
L-Malat	Merck, Darmstadt
Malat-Dehydrogenase, MDH	Boehringer GmbH, Mannheim
Methanol	Merck, Darmstadt
$MgSO_4$	Merck, Darmstadt
$MnSO_4$	Merck, Darmstadt
NAD	Boehringer GmbH, Mannheim
NADH	Boehringer GmbH, Mannheim
NADP	Boehringer GmbH, Mannheim
NADPH	Boehringer GmbH, Mannheim
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
NH_4Cl	Merck, Darmstadt
Oxaloacetat	Merck, Darmstadt
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Phosphoenolpyruvat, PEP	Boehringer GmbH, Mannheim
PMSF	Sigma GmbH, München
Protein Marker Broad Range (2-212 kDa)	Biolabs, New England
Pyruvat Kinase, PK	Boehringer GmbH, Mannheim
SDS	Riedel-de-Haen
Sequencing Grade modified Trypsin	Promega
Succinat	Merck, Darmstadt
Succinyl-CoA-Synthetase	Boehringer GmbH, Mannheim
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Triethanolamin	Boehringer GmbH, Mannheim
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Boehringer GmbH, Mannheim
$ZnCl_2$	Merck, Darmstadt

8.11. Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
80 Liter Autoklav	Modell D-190	Bioengineering AG, Schweiz
CO ₂ -Meßgerät	Binos	Leybold-Heraeus

8. Anhang

Desintegrator	S	IMA, Frankfurt
Dosierstrecke	IP 65	Sartorius
Electrophoresis Power Supply	EPS 1000	Amersham Pharmacia, S
Elektronische Waage	R160/P	Sartorius GmbH, Göttingen
Bioreaktor	ATGU 503	Infors AG, Schweiz
großer Autoklav	4507 E	Fedegari Autoclavi Spa
HPLC		Dionex
IPG Phor		Amersham Pharmacia, S
Capillarelektrophorese	P/ACE MDQ	Beckmann, München
Kryostat	RC6 CS	Lauda, Königshofen
Kugelmühle	MM2	Retsch GmbH, Haan
Kühlelement	Multitemp III	Amersham Pharmacia, S
Kühlelement	RT 100	Savant
Laborroboter	Biomek 2000	Beckmann, München
Magnetrührer	Magnetic 80	Edwards, Marburg
Magnetrührer	IKAMAG RET-G	Edwards, Marburg
Massenspektrometer	LCQ	Finnigan/Thermoquest
Mikrotiterplatten	Flachboden, 300 μ l	Beckmann, München
Mikrotiterplattenphotometer	Thermomax	Molecular Devices, USA
Multiphor II		Amersham Pharmacia, S
pH-Meßgerät	EH Conducta	Metrohm, Flensburg
pH-Meßgerät	pH-Meter 632	Metrohm, Flensburg
Photometer	UV-160A	Shimadzu, Duisburg
Pipetten	0,5 ml - 5,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Präzisionsküvetten	Schichtdicke 10 mm	Hellma, München
Pumpen	101 U und 501 U	Watson-Marlow
Scanner	JX 330	Sharp
Speed Vac	RH 40-11	Savant
Standautoklav	2540 ELY	Tutnauer GmbH
Thermofalle	Herastat	
Thermostat	M3	mgw Lauda
Zentrifuge	Avanti 30	Beckmann , München
Zentrifuge	2K15	Sigma
Zentrifuge	5415	Eppendorf , Hamburg
Zentrifuge	CS-15R	Beckmann , München
Zentrifuge	L7-55	Beckmann , München
Zentrifugenröhrchen	10 ml	Nalgene Centrifuge Ware, USA
Zentrifugenröhrchen	50 ml	Corning
ZipTipC ₁₈		Millipore

8.12. Verwendete Software

Windows NT 4.0	Microsoft
Windows 98	Microsoft
Windows 3.11 for Workgroups	Microsoft
Office 2000	Microsoft
QND	Wolfgang Boos, Heinz-Bert Cuypers, IBT 2
DROBS	Wolfgang Boos, IBT 2
Origin 5.0	Microcal Software, Inc.
Corel Draw 8.0	Corel Corporation
Softmax for Windows 2.5	Molecular Devices GmbH
BioWorks Operating System	Beckmann Instrumentes GmbH
Labview	National Instruments Corporation
Matlab 5.0	The MathWorks, Inc.
Win \TeX	Michael Mücke
ImageMaster v3.01	Amersham Pharmacia Biotech
Chromeleon 6.01	Dionex Softron GmbH
Xcalibur1	Finnigan Corp.
MassLynx	Micromass Ltd.
GEPASI	Pedro Mendes
Metabolic Modeling Tool	Jochen Hurlebaus
PACE MDQ Software	Beckman Instruments
WinEdt 5.2	Aleksander Simonic
Maple 6.0	Waterloo Maple Inc.
Mik \TeX	Christian Schenk

8.13. MS Parameter

Finnigan LCQ

Parameter	Wert
Sheath Gas	80 units
Auxilliary Gas	0 units
Temp. heated capillary	250 °C
capillary voltage	4,5 kV

Micromass LCT

Parameter	Wert
Nebulizer Gas	90 L h ⁻¹
Desolvation Gas	520 L h ⁻¹
Lteff	1120
MCP	2700
Desolvation Temperature	150 °C
Source Temperature	80 °C
Capillary Voltage	2000 V
Sample Cone Voltage	40 V
Extraction Cone Voltage	11 V

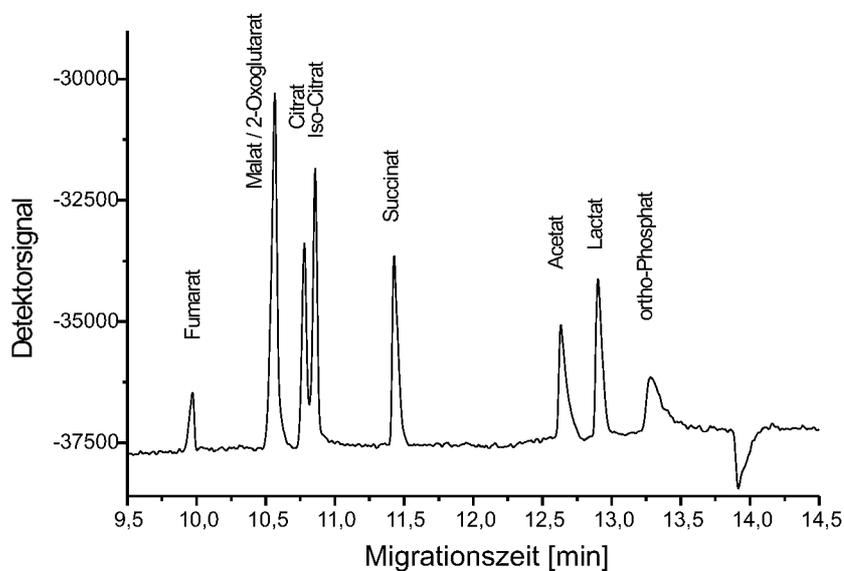
8.14. Chromatogramme

Abbildung 8.15.: CE-Elektropherogramm (indirekte UV-Methode) einer 100 μM Standardlösung organischer Säuren

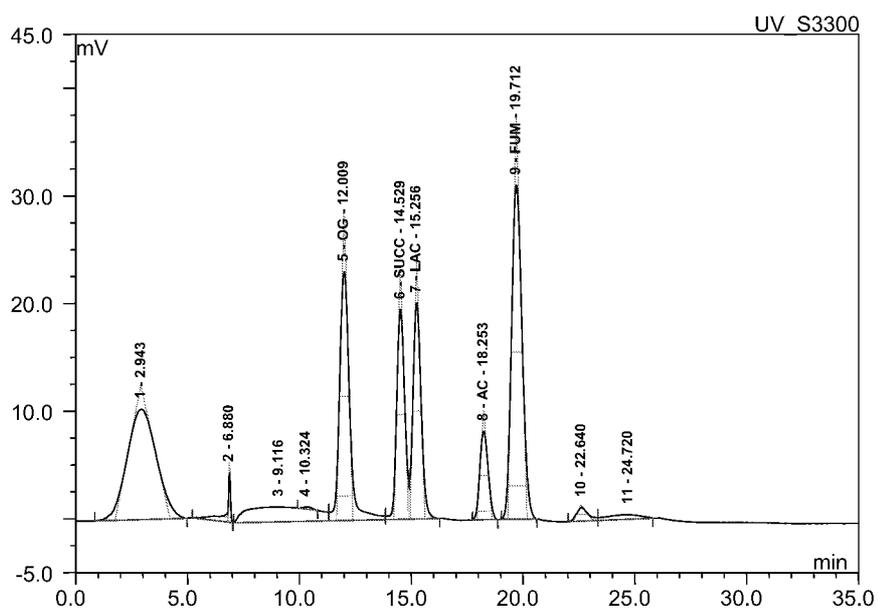


Abbildung 8.16.: HPLC-Chromatogramm einer 100 μ M Standardlösung organischer Säuren

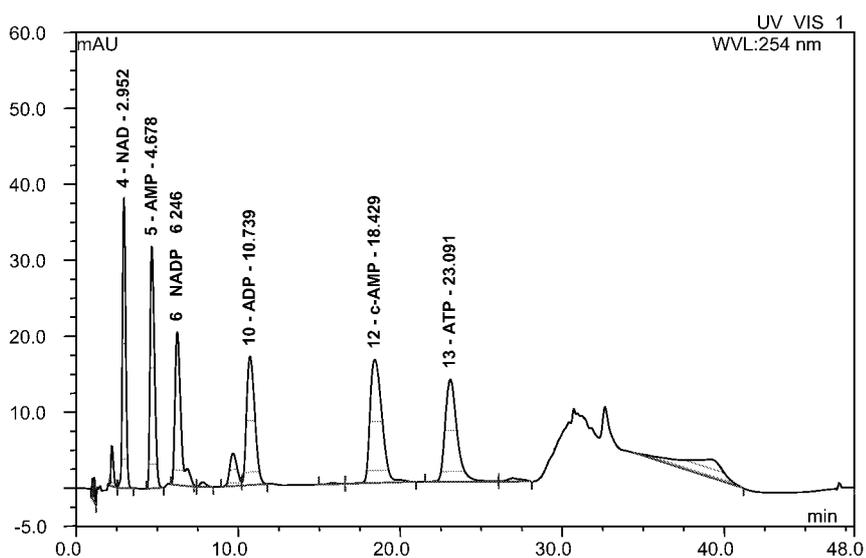
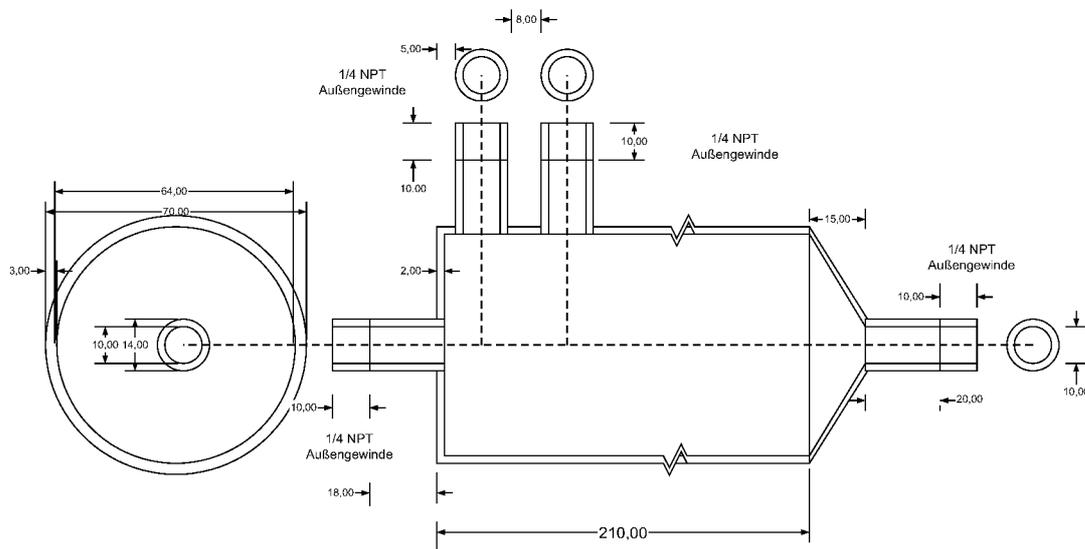


Abbildung 8.17.: HPLC-Chromatogramm für Nucleotide

8.15. Pulsaufgabesystem (PAS)

Mit der Entwicklung dieses Pulsaufgabesystems wird ein Verfahren beschrieben, mit welchem es möglich ist, unter sterilen Bedingungen eine exakte, mehrmalige Dosierung mit einer oder mehreren Substratlösungen durchzuführen, ohne daß es zu einem Druckanstieg im Bioreaktor kommt. Das Verfahren wird anhand der Abbildungen 8.19 und 8.20 näher erläutert: Aus einem Vorratsbehälter 1 wird mittels einer Pumpe 2 eine Flüssigkeit (Substratlösung) einem Pulsbehälter 3 zugeführt (siehe Abbildung 8.19). Ventil 4 sorgt für einen sterilen Druckausgleich in dem unten konisch zulaufenden Pulsbehälter 3. Durch Schließen der Ventile 4 und 5 und Öffnen der Ventile 6, 7 und 9 wird die Flüssigkeit mittels Druckluft über das 3-Wege Ventil 8 (Stellung: geschlossen) bis hin zu dem Ablaufventil 9 befördert. Durch Schließen des Ablaufventils 9 wird gewährleistet, daß die gesamte Strecke von Pulsbehälter 3 bis zum Ablaufventil 9, einschließlich des 3-Wege Ventil 8 (Stellung: geschlossen), mit Flüssigkeit gefüllt ist. Durch elektrische Ansteuerung des 3-Wege Ventils 8 kann nun über die Ventilöffnungszeit und den angelegten Druck ein exakt definiertes Volumen an Flüssigkeit in den Bioreaktor 10 dosiert werden. Durch die Sterilfilter 11, 12, 13 und 19 wird eine Kontamination der Mikroorganismen-Kultur verhindert. Durch Erweiterung um ein oder mehrere Pulsbehälter (Pulsbehälter 14 und 15 in Abbildung 8.20 exemplarisch) sowie um ein Verteilerventil 16 ist es möglich, unterschiedliche Flüssigkeiten nacheinander durch die Strecke über den Ventilverteiler 16, das 3-Wege Ventil 8 und das Ablaufventil 9 zu leiten, entweder um diese Strecke zu reinigen, oder um mehrere Flüssigkeiten in den Bioreaktor 10 zu dosieren. Durch Erweiterung um ein oder mehrere 3-Wege Ventile (3-Wege Ventil 18b exemplarisch) mit Anschluß and die Zweigstelle 17 kann das zudosierbare Volumen erhöht werden und, bei günstiger geometrischer Anordnung, die Mischzeit im Bioreaktor 10 verringert werden. Durch Verwendung einer standardisierten Anstechnadel 18 kann das oben beschriebene Verfahren zur schnellen, sterilen Dosierung von exakten Volumina ein oder mehrerer unterschiedlicher Flüssigkeiten an verschiedenen Bioreaktoren angebracht und verwendet werden.[109]



Pulsbehälter
 Material: V2A Stahl
 Druck: bis 5 bar

Abbildung 8.18.: PAS: Pulsbehälter

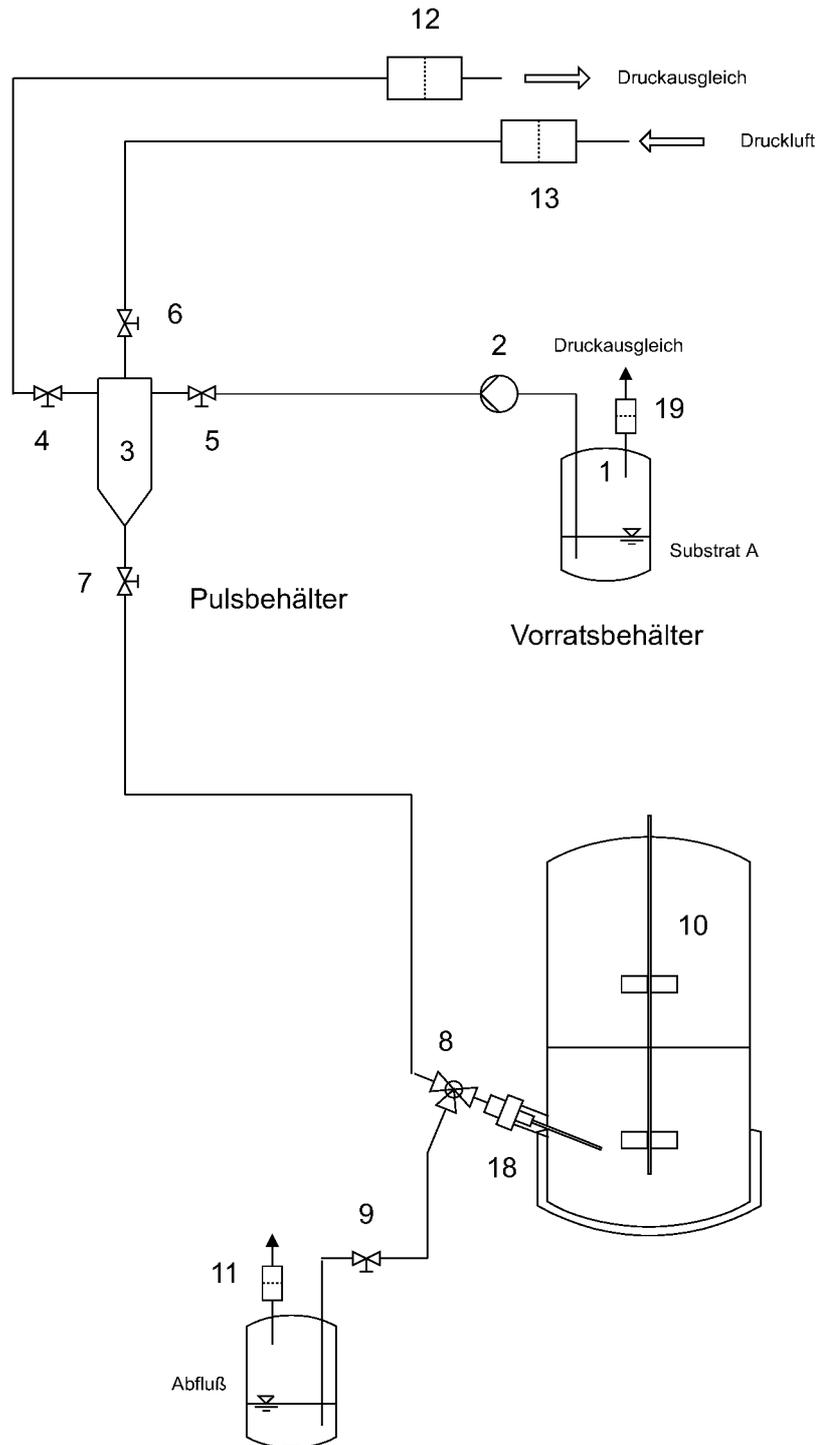


Abbildung 8.19.: PAS: Pulsbehälter (Ansteuerung). 1 Vorratsbehälter, 2 Pumpe, 3 Pulsbehälter, 4-7 2-Wege Ventile, 8 3-Wege Ventil, 9 2-Wege Ventil, 10 Bioreaktor, 11-13 Sterilfilter, 18 Standard Anstechnadel, 19 Sterilfilter

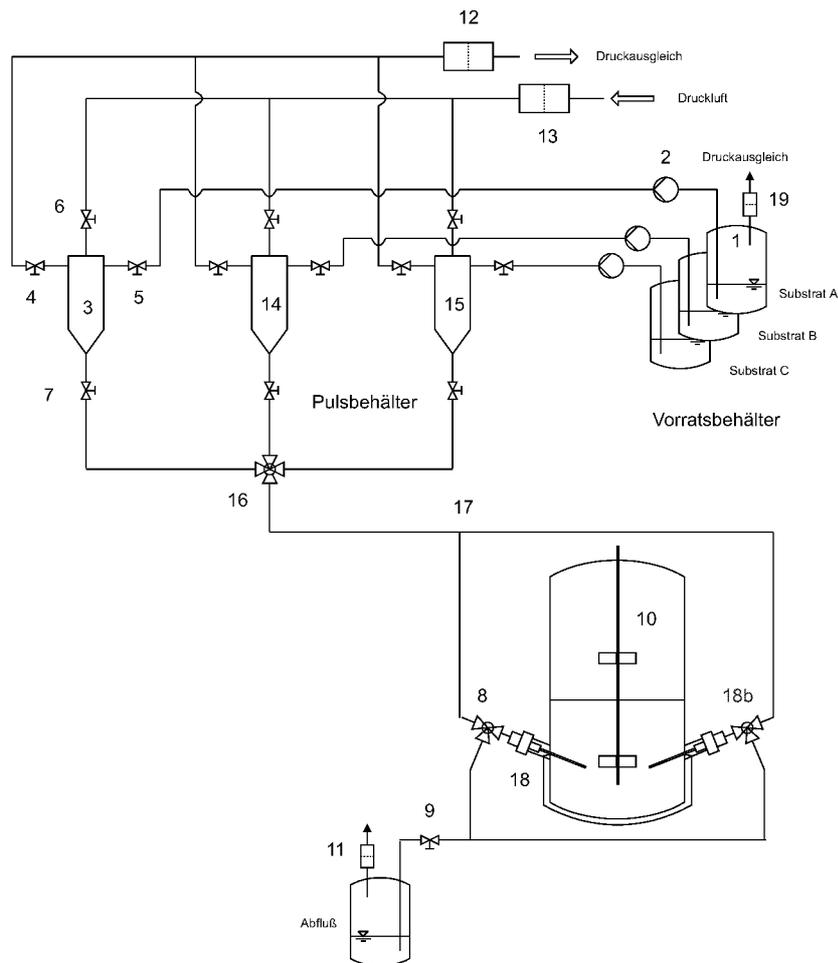


Abbildung 8.20.: Modularer Aufbau des PAS. 1 Vorratsbehälter, 2 Pumpe, 3 Pulsbehälter, 4-7 2-Wege Ventile, 8 3-Wege Ventil, 9 2-Wege Ventil, 10 Bioreaktor, 11-13 Sterilfilter, 14-15 zusätzliche Pulsbehälter, 16 4-Wege Ventil, 17 Zweigstelle, 18 und 18b Standard Anstechnadel, 19 Sterilfilter

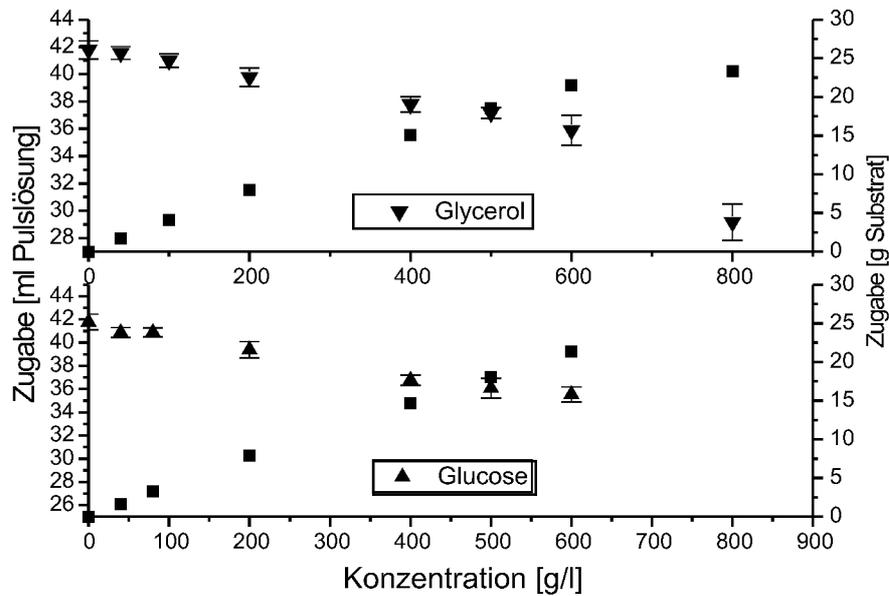


Abbildung 8.21.: Viskositätseinfluß (ausgedrückt als Erhöhung der Konzentration in der Pulslösung) auf die Dosierung bei variierenden Konzentrationen; die Viskosität wurde variiert zwischen 40-400 g l⁻¹ Glucose, bzw. Glycerol. Der Fehler der Zugabe im gesamten Konzentrationsbereich liegt unter 1,5% des Zugabevolumens

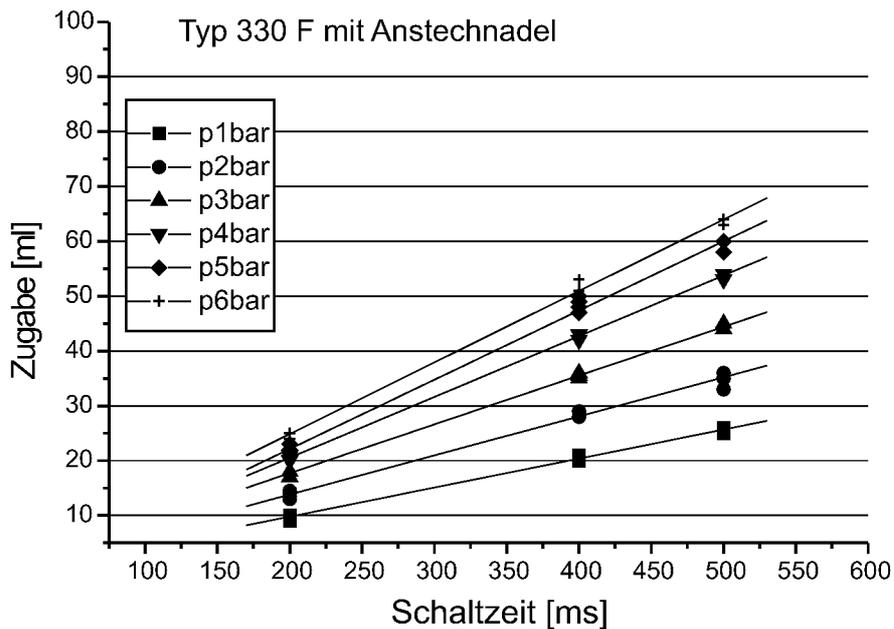


Abbildung 8.22.: Einstellung eines definierten Volumens an Pulslösung durch Variation von beaufschlagtem Druck und Ventilschaltzeit; hier am Beispiel eines Ventils (Typ 330F) mit Anstechnadel

Literaturverzeichnis

- [1] Behrens. 10 Years of EFB. *BTF-Biotech-Forum - EFB Newsletter, Heidelberg: Hüthig Verlag*, 5, 1988.
- [2] G. Stephanopoulos, J. Nielsen, and A. Aristidou. *Metabolic Engineering*. Academic Press: San Diego, 1998.
- [3] G. Stephanopoulos. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, (1):1–11, 1999.
- [4] D. Cameron and I. Tong. Cellular and metabolic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38:105–140, 1993.
- [5] W. Farmer and J. Liao. Progress in metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, (7):199–204, 1996.
- [6] J.E. Bailey. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 252:1668, 1991.
- [7] J.C. Liao, S.Y. Hou, and Y.P. Chao. Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(1):129–140, 1996.
- [8] N. Flores, J. Xiao, A. Berry, F. Bolivar, and F. Valle. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *E. coli*. *Nature Biotechnology*, 14:620–623, 1996.
- [9] Jens Nielsen. Metabolic engineering for the improvement of industrial fermentation processes. *Abschlußkolloquium des BMBF Schwerpunkts Stoffumwandlung mit Biokatalysatoren: Proteinsekretion und Metabolic Design*, 9. November 2000.
- [10] H. Holmes. Flux analysis and control of central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19:85, 1996.
- [11] K. Sonntag et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (44):489–495, 1995.
- [12] G. Stephanopoulos. *Biotechnol. Bioeng.*, (45):292–303, 1995.
- [13] M. Klapa and G. Stephanopoulos. *Metabolic Flux Analysis in Saccharomyces cerevisiae*. In: *Bioreaction Engineering*, Schügerl, K. and Bellgardt, K.H. (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000.

- [14] J.J. Vallino and G. Stephanopoulos. *Flux determination in cellular bioreaction networks*. In: *Frontiers in Bioprocessing*, S.K. Sikdar, M. Bier, P. Todd (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 1989.
- [15] W. Wiechert and A.A. deGraaf. *In vivo* stationary flux analysis by ^{13}C labelling experiments. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 54:109–154, 1996.
- [16] J. Nielsen. Metabolic engineering: Techniques for analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnol. Bioeng.*, 58:125–132, 1998.
- [17] K. Mauch, S. Vaseghi, and M. Reuss. *Quantitative Analysis of Metabolic and Signaling Pathways in Saccharomyces cerevisiae*. In: *Bioreaction Engineering*, Schügerl, K. and Bellgardt, K.H. (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000.
- [18] M. Rizzi, M. Baltes, U. Theobald, and M. Reuss. *Biotechnol. Bioeng.*, 55:592–608, 1997.
- [19] U. Schäfer, W. Boos, R. Takors, and D. Weuster-Botz. Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal. Biochem.*, (270):88, 1999.
- [20] D. Weuster-Botz. *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*. Schriften des Forschungszentrums Jülich GmbH, Reihe Lebenswissenschaften, 1999.
- [21] U. Theobald, W. Mailinger, M. Reuss, and M. Rizzi. *In vivo* analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Analytical Biochemistry*, 214:31–37, 1993.
- [22] U. Schäfer. *Automatisierte Probenahme zur Messung intrazellulärer Metabolitdynamiken*. Dissertation, Universität Bonn, 2000.
- [23] A. Buchholz. Reaktionstechnische Untersuchungen zur Dynamik intrazellulärer Metabolite in glycerollimitierten *Escherichia coli* K12. Diplomarbeit, Universität Bonn, 1998.
- [24] R.B. Cole. *Electrospray Mass Spectrometry - Fundamentals, Instrumentation and Application*. Wiley, New York, 1997.
- [25] F.M. Lagerwerf, W.D. vanDongen, R. Steenvoorden, M. Honing, and J. Jonkman. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 19(7):418–427, 2000.
- [26] Catherine E. Costello. Bioanalytic applications of mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:22–28, 1999.

-
- [27] F.C. Neidhardt, editor. *Escherichia coli and Salmonella*. ASM Washington, 1996.
- [28] J.D. Pramanik, J.; Keasling. Stoichiometric model of *E. coli* metabolism: Incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(4):398–421, 1997.
- [29] B. Mattiasson and H. Hakanson. Sampling and sample handling - crucial steps in process monitoring and control. *Trends in Biotechnology*, 11, 1993:136-142.
- [30] W. de Koning and K. van Dam. A method for determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 204:118, 1992.
- [31] J.W. Lengeller, G. Drews, and H.G. Schlegel, editors. *Biology of the prokaryotes*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1999.
- [32] Jochen Hurlbaas. *A Pathway Modelling Tool for Metabolic Engineering*. Dissertation, Universität Bonn, 2001.
- [33] W.H. Holms. The central metabolic pathways of *E. coli*: Relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation*, 28:69, 1986.
- [34] J. Delgado and J.C. Liao. Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.*, 13:361–367, 1997.
- [35] S.M. See, J.P. Dean, and G. Dervakos. On the topological features of optimal metabolic pathway regimes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (60):251–301, 1996.
- [36] A. Varma, B. Boesch, and B. Palsson. Stoichiometric interpretation of *E. coli* glucose metabolism under various oxygenation rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8):2465–2473, 1993.
- [37] J.S. Edwards and B.O. Palsson. How will bioinformatics influence metabolic engineering? *Biotechnology and Bioengineering*, (58):162–169, 1998.
- [38] R. Knippers. *Molekulare Genetik*, volume 7. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997.
- [39] K. L. Williams. *Electrophoresis*, 29:678–688, 1999.
- [40] S.J. Cordwell et al. *Electrophoresis*, 20:3580–3588, 1999.

- [41] Kelvin H. Lee. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends in Biotechnology*, 19(6):217–222, 2001.
- [42] J. Klose. *Electrophoresis*, 20:643–652, 1999.
- [43] F. Lottspeich. *Angew. Chem.*, 111:2630–2647, 1999.
- [44] A. Dove. *Nature Biotechnology*, 17:233–236, 1999.
- [45] H. Tweeddale, L. Notley-McRobb, and T. Ferenci. Effect of slow growth on metabolism of *E. coli*, as revealed by global metabolite pool (“metabome”) analysis. *Journal of Bacteriology*, (180):5109–5116, 1998.
- [46] O. Fiehn, J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R. Trethewey, and L. Willmitzer. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18:1157–1161, 2000.
- [47] L.M. Raamsdonk et al. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnology*, 19:45–50, 2001.
- [48] U. Theobald, M. Baltes, M. Reuss, and M. Rizzi. *In Vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. experimental observations. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(2):305, 1997.
- [49] U. Theobald, M. Baltes, M. Reuss, and M. Rizzi. *In Vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. mathematical model. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(4):592–608, 1997.
- [50] A. Buchholz, J. Hurlebaus, C. Wandrey, and R. Takors. Metabolomics: Quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomolecular Engineering (accepted)*, 2001.
- [51] Oliver Fiehn. Combining genomics, metabolome analysis and biochemical modelling to understand metabolite networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2:155–168, 2001.
- [52] T. Escherich. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte Med.*, 3:547–554, 1885.
- [53] H.G. Schlegel. *Allg. Mikrobiologie, 7. Auflage*. 1992.
- [54] A. Varma, B. Boesch, and B. Palsson. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42:59, 1993.
- [55] F. R. Blattner et al. *Science*, 277:1453–1474, 1997.
- [56] *Methods Enzymol.*, 101:347, 1983.

-
- [57] P.W. Postma, J.W. Lengeler, and G.R. Jacobson. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*, (57):543–594, 1993.
- [58] G. Gottschalk. *Bacterial Metabolism, 2nd Ed.* 1986.
- [59] J. Kay and P.D.J. Weitzmann. *Krebs' Citric Acid Cycle - Half a Century and Still Turning.* The Biochemical Society, London, 1987.
- [60] E. Buddecke. *Grundriss der Biochemie, 8. Auflage.* 1989.
- [61] C.H. Wang and I. Stern. *J. Bacteriol.*, 76:207–216, 1958.
- [62] Lehninger. *Principles of Biochemistry.* The Mona Group, LLC, 2000.
- [63] Crueger and Crueger. *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie.* München, Oldenbourg, 1989.
- [64] G. Sprenger. Persönliche Mitteilung, 2001.
- [65] P. Weisser, R. Krämer, H. Sahm, and G. Sprenger. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *E. coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J. Bacteriology*, 177(11):3351–3354, 1995.
- [66] D. Riesenberg, K. Menzel, J. Günther, and K. Mund. Preparation, characterization and application of *E. coli* glycerol stocks for high cell density fermentation. *DEHEMA Biotechnology Conferences*, 4:1013–1034, 1990.
- [67] H. Paschold, D. Weuster-Botz, U. Schäfer, and W. Boos. Patent: Verfahren zur schnellen Probenahme biologischer Proben. *Patentschrift DE 197 05 289 C1*, 1998.
- [68] H.-B. Cuypers. Ansteuerung eines Probenahmesystems unter dem Echtzeitbetriebssystem QNX mit der Programmiersprache C++. Diplomarbeit, FH Aachen, 1997.
- [69] D. Simic, G. Hochheimer, and J. Reichwein. *Messen, Steuern, Regeln.* VCH Verlagsgesellschaft, 1989.
- [70] Hanswerner Dellweg. *Biotechnologie.* VCH Verlagsgesellschaft, 1987.
- [71] W.M.A. Niessen. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *Journal of Chromatography A*, 794:407–435, 1998.
- [72] P. Kebarle and L. Tang. From ions in solution to ions in the gas phase. *Analytical Chemistry*, 65(22):972A–986A, 1993.

- [73] C. D. Hendricks and R. J. Pfeiffer. *AIAA Journal*, 6:496, 1968.
- [74] D.P.H. Smith. *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 22:527, 1986.
- [75] B.A. Thomson and I.V. Iribarne. *J. Chem. Phys.*, 64:2287, 1976.
- [76] G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütfering, and F.W. Roellgen. *Int. J. Mass Spectrometry Ion Processes*, 90:139, 1989.
- [77] Wolfgang Paul. Electromagnetic traps for charged and neutral particles (nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29:739, 1990.
- [78] Scott A. McLuckey, Gary J. VanBerkel, Douglas E. Goeringer, and Gary L. Gish. Ion trap mass spectrometry of externally generated ions. *Analytical Chemistry*, 66(13):689A, 1994.
- [79] Scott A. McLuckey, Gary J. VanBerkel, Douglas E. Goeringer, and Gary L. Gish. Ion trap mass spectrometry using high-pressure ionisation. *Analytical Chemistry*, 66(14):737A, 1994.
- [80] R. Graham Cooks, Scott A. McLuckey, and Raymond E. Kaiser. Ion trap mass spectrometry. *Chemical and Engineering News*, 69:26–41, 1991.
- [81] M. Gordon, X. Huang, and R. Zare. Capillary electrophoresis. *Science*, 242:224–228, 1988.
- [82] H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, and T. Schmitt. Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. *Angewandte Chemie*, 105:659–680, 1993.
- [83] Heidi Haase-Reiff. Persönliche Mitteilung, 1998.
- [84] H. Bergmeyer. *Methods of Enzymatic Analysis, Third. Ed.* Verlag Chemie, Weinheim, 1985.
- [85] Jochen Penzien. Intrazelluläre Metabolitdynamiken in glycerollimitierten *Escherichia coli* K12 nach einem Glucosepuls. Diplomarbeit, Universität Bonn, 1999.
- [86] S. Schobert. Persönliche Mitteilung, 1999.
- [87] Uwe Trenz. Enzymatische Analyse von katabolen Metaboliten in Perchlorsäureextrakten von *Escherichia coli*. Diplomarbeit, FH Aachen, Abteilung Jülich, 1997.
- [88] K.J. Wiechelmann, R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick. *Anal. Biochem.*, 175:231–237, 1988.
- [89] P.K. Smith et al. *Anal. Biochem.*, 150:76–85, 1985.

-
- [90] M. Holtzhauer. *Biochemische Labormethoden*. Springer Verlag, 1997.
- [91] J.E. Bailey. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biochechnol. Prog.*, 14, 1998.
- [92] K. Schügerl and K.H. Bellgardt. *Bioreaction Engineering, Modeling and Control*. Springer Verlag, 2000.
- [93] L. Stryer. *Biochemie, 4 Ed.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
- [94] C.J. Hewitt, G.N. Caron, B. Axelsson, C. McFarlane, and A.W. Nienow. Studies related to the scale-up of high-cell density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing micro-environment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotech. Bioeng.*, 70, 2000.
- [95] J. Nielsen, A.G. Pedersen, K. Strudsholm, and J. Villadsen. Modeling fermentations with recombinant microorganisms: formulation of a structured model. *Biotech. Bioeng.*, 37, 1991.
- [96] A. Cornish-Bowden and J.H. Hofmeyr. **MetaModel**: a program for modeling and control analysis of metabolic pathways on the IBM PC and compatibles. *Comput. Appl. Biosci.*, 1(7):89–93, 1991.
- [97] T. Pfeiffer, I. Sánchez-Valdenbro, J.C. Nuno, F. Montero, and S. Schuster. **METATOOL**: For studying metabolic networks. *Bioinformatics*, 3(15):251–257, 1999.
- [98] M. Sauro. **JARNAC - SCAMP II**. <http://members.tripod.co.uk/sauro/biotech.htm>, 2001.
- [99] P. Kuzmic. Program **DYNAFIT** for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.*, 237:260–273, 1996.
- [100] P. Mendes and D.B. Kell. Non-linear optimization of biochemical pathways: applications to metabolic engineering and parameter estimation. *Bioinformatics*, 14(10), 1998.
- [101] M. Ehldé and G. Zacchi. **MIST**: a user-friendly metabolic simulator. *Comput. Appl. Biosci.*, 2(11):201–207, 1995.
- [102] D.H. Irvine, E. Voit, and M.A. Savageau. *Analysis of complex dynamic networks with ESSYNS. A program for the efficient solution of nonlinear differential equations in S-systems form*. In: Voit, E.O., *Canonical Nonlinear Modeling. S-system approach to understanding complexity*. Van Nostrand Reinhold, 1991.

- [103] H.J. Stoffers, E.L. Sonnhammer, G.J. Blommestijn, N.J. Raat, and H.V. H.V. Westernhoff. METASIM: object-oriented modeling of cell regulation. *Comput. Appl. Biosci.*, 5(8):443–449, 1992.
- [104] Q. Dang and C Frieden. New PC versions of the kinetic simulation and fitting programs, KINSIM and FITSIM. *Trends Biochem. Sci.*, 8(22):317, 1997.
- [105] M. Tomita, K. Hashimoto, K. Takahashi, T.S. Shimizu, Y. Matsuzaki, F. Miyoshi, K. Saito, S. Tanida, K. Yugi, J.C. Venter, and C.A. Hutchison. E-cell: a software environment for whole-cell simulation. *Bioinformatics*, 1(15), 1999.
- [106] I. Goryanin, T.C. Hodgman, and E. Selkov. Mathematical simulation and analysis of cellular metabolism and regulation. *Bioinformatics*, 9, 1999.
- [107] A. Kremling, K. Jahreis, J.W. Lengeler, and E.D. Gilles. The organization of metabolic reaction networks: a signal-oriented approach to cellular models. *Metabolic Engineering*, 2, 2000.
- [108] A. Holmberg. On the practical identifiability of microbial growth models incorporating Michaelis-Menten type nonlinearities. *Mathematical Biosciences*, 62, 1982.
- [109] A. Buchholz, R. Takors, and C. Wandrey. Verfahren und Vorrichtung zur schnellen, sterilen Dosierung von exakten Volumina einer oder mehrerer unterschiedlicher Flüssigkeiten in einen Bioreaktor. *Patentanmeldung: DE 100 03 416.0-52*, 1999.
- [110] T. Ferenci. Adaptation to life at micromolar nutrient levels: The regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiol. Rev.*, 18(4):301–317, 1996.
- [111] L. Notley McRobb, A. Death, and T. Ferenci. The relationship between external glucose-concentration and cAMP levels inside *Escherichia coli* - implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate-cyclase. *Microbiology*, 6(143):1909–1918, 1997.
- [112] A.C. Dubach and H. Maerkl. Application of an extended Kalman filter method for monitoring high density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73:396, 1992.
- [113] U. Theobald, M. Reuss, and M. Rizzi. *In Vivo* investigations of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 49:316–327, 1996.

-
- [114] Wolfgang Wiechert. *Metabolische Kohlenstoff-Markierungssysteme: Modellierung, Simulation, Analyse, Datenauswertung*. Habilitation, Universität Bonn, 1996.
- [115] D.E.F. Harrison and P. K. Maitra. Control of respiration and metabolism in growing *Klebsiella aerogenes*. *Biochem. J.*, 112:647, 1969.
- [116] Marco Schmitz. Entwicklung analytischer Methoden zur Quantifizierung ausgewählter Metabolite in *Escherichia coli* K12. Diplomarbeit, Universität Bonn, 2000.
- [117] G. Schmidt-Kastner and C. Gölker. *Aufarbeitung in der Biotechnologie*. In: *Handbuch der Biotechnologie, Präve, P.; Faust, U.; Sittig, W.; Sukatsch, D.A. (Eds.)*. R. Oldenbourg Verlag, München, 1988.
- [118] R.H. Müller, N. Loffhagen, and W. Babel. Rapid extraction of (di)nucleotides from bacteria cell and determination by reversed-phase HPLC. *J. Microbiol. Methods*, 25:29–35, 1995.
- [119] E.S. Polakis and W. Bartley. Changes in the intracellular concentration of adenosine phosphates and nicotinamide nucleotides during the aerobic growth cycle of yeast on different carbon sources. *Biochemical Journal*, 99:521, 1966.
- [120] U. Schmid, K.H. Schimz, and H. Sahm. Determination of intracellular puridine nucleotide levels by bioluminescence using anaerobic bacteria. *Analytical Biochemistry*, 180:17–23, 1989.
- [121] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265–275, 1951.
- [122] N.O. Kaplan, S.P. Colowick, and C.C. Barnes. Effect of alkali on diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, 224:461–472, 1951.
- [123] Bernd Stefan Moritz. *Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatweges in Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität Düsseldorf, 2000.
- [124] B. Gonzalez, J. Francois, and M. Renaud. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast*, 13:1347–1356, 1997.
- [125] Hazel Davey. Persönliche Mitteilung, 2000.
- [126] Susanne Thies. Untersuchungen zur Identifizierung und Quantifizierung ausgewählter glycolytischer Enzyme in *Escherichia coli* K12. Diplomarbeit, Universität Bonn, 2000.

- [127] Vinod Shah et al. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81:309–312, 1992.
- [128] Antonio Gonzalez-Casado et al. A comparative study of different calibration data subsets in an attempt to minimize experimental work. *LC-GC International*, pages 726–735, 1998.
- [129] A. Buchholz, R. Takors, and C. Wandrey. Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. *Analytical Biochemistry*, 295(2):129–137, 2001.
- [130] J.J. Leary D.A. Skoog. *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing, 1992.
- [131] Deutsches Institut für Normung e.V. Deutsche Norm Ref. Nr. DIN 32633:1998-12, 1998.
- [132] Morris Bader. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *Journal of Chemical Education*, 57(10):703–706, 1980.
- [133] T. Soga. Analysis of inorganic cations and organic anions by capillary zone electrophoresis. *Hewlett Packard, Publication Nr. 12-5965-5744E*, 1996.
- [134] J. Henion, E. Brewer, and G. Role. Sample preparation for LC/MS/MS: Analyzing biological and environmental samples. *Analytical Chemistry News and Features*, pages 650A–656A, 1998.
- [135] B. K. Matuszewski, M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng. *Anal. Chem.*, (70):882–889, 1998.
- [136] J. Feurle, H. Jomaa, M. Wilhelm, B. Gutsche, and M. Herderich. *Journal of Chromatography A*,, 803:111, 1998.
- [137] W. Armstrong and H.J. Lin. *J. Chromatogr.*, 462:219., 1989.
- [138] D. Schumacher and L.W. Kroh. *Food Chem.*, 54:353., 1995.
- [139] R. Wilder, G.W. Tindall, L.J. Cunningham, and J.L. Little. *J. Chromatogr.*, 635:221, 1993.
- [140] K. Fujimura, M.Kitagawa, H. Takayanagi, and T. Ando. *J. Chromatogr.*, 350:371, 1985).
- [141] J. Simms, A.T. Hochkill, P.L. Irwin, and K.B. Hicks. *Carbohydr. Res.*, 278:1, 1995.

-
- [142] M.-C. Hennion and V. F. Coquart. *J. Chromatogr.*, 642:211–213, 1993.
- [143] P. Ross and J.H. Knox. *Advances in Chromatography*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1997.
- [144] D.A.J. Wase and Y.R. Patel. Variations in the volume of microbial cells with change in agitation rates of chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, 131:725–736, 1985.
- [145] Stanley Obasuyi. Diplomarbeit, FH Mannheim, 2002.
- [146] H. Holms. *FEMS Microbiology Reviews*, 19:85, 1996.
- [147] V. Moses and P.B. Sharp. *J. Gen. Microbiol.*, 71:181, 1972.
- [148] J.B. Russel and G.M. Cook. *Microbiol. Reviews*, 59:48, 1995.
- [149] M. Bhattacharya, L. Fuhrman, and A. Ingram. *Anal. Biochem.*, 232:98, 1995.
- [150] J.C. Torres, V. Guixe, and J. Babul. *Biochem. J.*, 327:675, 1997.
- [151] J. Babul, D. Clifton, M. Kretschmer, and D.G. Fraenkel. *Biochemistry*, 32:4685, 1993.
- [152] J.W. Lengeler. Persönliche Mitteilung, 1998.
- [153] D.G. Fraenkel. Genetics and intermediary metabolism. *Annu. Rev. Genet.*, 26:159–178, 1992.
- [154] M. Futai. *Systems for bacterial active transport study*. In *Bacterial Transport*, B.P. Rosen (Ed.), page 4, 1978.
- [155] A. Death and T. Ferenci. Between feast and famine: Endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.*, 176(16):5101–5107, 1994.
- [156] W. Epstein, L.B. Rothman-Denes, and J. Hesse. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *E. coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72:2300–2304, 1975.
- [157] M.J. Buettner, E. Spitz, and H.V. Rickenberg. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 14:1068–1073, 1973.
- [158] M.R. Leonardo, Y. Dailiy, and D.P. Clark. *J. Bacteriol.*, 178:6013, 1996.
- [159] B.D. Sanwal. *Bacteriol. Rev.*, 34:20., 1970.

- [160] M. Meins, B. Zanolari, J.P. Rosenbusch, and B. Erni. Glucose permease of *Escherichia coli*. purification of the IIGlc subunit and functional characterization of its oligomeric forms. *J. Biol. Chem.*, 263:12986–12993, 1988.
- [161] G.R. Jacobson, C.A., and M.H. Saier. purification of the mannitol-specific enzyme II of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.*, 254:249–252, 1979.
- [162] R.A. Black, A.C. Hobson, and J. Adler. Adenylate cyclase is required for chemotaxis to phosphotransferase system sugar by *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 153:1187–1195, 1983.
- [163] C.M. Johnson, M.J. Gore, and N.C. Price. Co-factor-independent phosphoglycerate mutases. *Biochem. Soc. Trans.*, 15:878, 1987.
- [164] G. D'Alessio and J. Josse. Phosphoglycerate kinase, phosphoglyceromutase from *Escherichia coli*. *Methods. Enzymol.*, 42:139–144, 1975.
- [165] T.G. Spring and F. Wold. The purification and characterization of *Escherichia coli* enolase. *J. Biol. Chem.*, 246:6797–6802, 1971.
- [166] V.F. Kemerer, C.C. Griffin, and L. Brand. *Methods. Enzymol.*, 42C:91–98, 1975.
- [167] D. Kotlarz and H. Buc. Phosphofructokinases from *Escherichia coli*. *Methods. Enzymol.*, 90:60–70, 1982.
- [168] David C. LaPorte, Kenneth Walsh, and D.E. Koshland. The branch point effect. *Journal of Biological Chemistry*, 259(22):14068–14075, 1984.
- [169] G. Stephanopoulos and J.J. Vallino. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, (252):1675–1681, 1991.
- [170] T. Ferenci. *FEMS Microbiology Reviews*, 18:301–317, 1996.
- [171] R. Makman and E. Sutherland. Adenosine 3',5'-phosphate in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 240(3):1309–1314, 1965.
- [172] F.C. Grenier, E.B. Waygood, and M. H. Saier. The bacterial phosphotransferase system: kinetic characterization of the glucose, mannitol, glucitol, and N-acetylglucosamine systems. *J. Cell. Biochem.*, 31:97–105, 1986.
- [173] T. Ferenci. Growth of bacterial cultures 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Res. Microbiol.*, 150:431–438, 1999.
- [174] T. Ferenci. Regulation by nutrient limitation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2:208–213, 1999.

-
- [175] X.Q. Liu and T. Ferenci. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 180:3917–3922, 1998.
- [176] J. Plumbridge. Expression of the PTS both mediates and is mediated by Mlc regulation in *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, 33(2):260–273, 1999.
- [177] S.J. Lee, W. Boos, J.P. Bouche, and J. Plumbridge. Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *E. coli*. *EMBO*, 19(20):5353–5361, 2000.
- [178] K. Decker, F. Gerhardt, and W. Boos. The role of the trehalose system in regulation the maltose regulon of *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, 32(4):777–788, 1999.
- [179] Chih-Hsiung Chou, George Bennett, and Ka-Yiu San. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *E. coli* dense cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 44:952–960, 1994.
- [180] A. Varma and B.O. Palsson. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: II. optimal growth patterns. *J. Theor. Biol.*, 165:503–522, 1993.
- [181] B. J. Koebmann, D. Nilsson, J.L. Snoep, H.V. Westerhoff, and P.R. Jensen. The glycolytic flux in *E. coli* appears to be controlled by the demand for ATP. In Larrson et al., editors, *Biothermokinetics in the post-genomic Era*, pages 205–210, 1998.
- [182] A.G. Chapman, L. Fall, and D.E. Atkinson. Adenylate energy charge in *E. coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.*, 108:1072–1086, 1971.
- [183] W.C. Barrette, D. M. Hannum, W.D. Wheeler, and J.K. Hurst. Viability and metabolic capability are maintained by *E. coli*, *P. aeruginos* and *S. lactis* at very low adenylate energy charge. *J. Bacteriol.*, 170(8):3655–3659, 1988.
- [184] A.C. Dubach and H. Maekl. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73:396–402, 1992.
- [185] D.J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E.A. Sanders, and W.D. Deckwer. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *E. coli*. *Journal of Biotechnology*, 39:59–65, 1995.
- [186] Soonjo Kwon, Sungsoo Kim, and Eunki Kim. Effects of glycerol on β -lactamase production during high cell density cultivation of recombinant *E. coli*. *Biotchnol. Prog.*, 12:205–208, 1996.

- [187] E.C.C. Lin. Glycerol utilization by facilitated diffusion coupled to phosphorylation in bacteria. *The Cell Membrane (Edgar Haber, Ed.)*, Plenum, 1984.
- [188] A. Varma, B. Boesch, and B. Palsson. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42:59–73, 1993.
- [189] M.M. Potselueva, V.V. Rybina, V.V. Koshevoi, and N.A. Polteva. The content of the products of energy metabolism in *Escherichia coli* cells cultured on various substrates. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 27(3):399–404, 1991.
- [190] J. Pramanik and J.D. Keasling. Effect of *E. coli* biomass composition on central metabolic fluxes predicted by a stoichiometric model. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(2):230–238, 1998.
- [191] E.C.C. Lin. Glycerol facilitator in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 125:467, 1986.
- [192] M. deBoer, C.P. Broekhuizen, and P.W. Postma. Regulation of glycerol kinase by enzyme III_{Glc} of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*, 167(1):393–395, 1986.
- [193] M.C. Jones-Mortimer and H.C. Kornberg. Aminosugar-transport systems of *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 117:369–376, 1980.
- [194] A. W. Raphaeli and M. W. Saier. Regulation of the genes coding for enzyme constituents of bacterial phosphotransferase system. *J. Bacteriol.*, 141:658–663, 1980.
- [195] H. DeReuse and A. Danchin. *J. Bacteriol.*, 170:3827–3837, 1988.
- [196] R.L. Mattoo and E.B. Waygood. *Can. J. Biochem. Cell. Bio.*, 61:29–37, 1983.
- [197] D. Kotlarz and H. Buc. Regulatory properties of phosphofructokinase 2 from *E. coli*. *Eur. J. Biochem.*, 117(3):569–574, 1981.
- [198] M.D. Scamuffa and R.M. Caprioli. Comparison of the mechanisms of two distinct aldolases from *Escherichia coli* grown on gluconeogenic substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 614(2):583–590, 1980.
- [199] Jochen Hurlebaus. Persönliche Mitteilung, 2001.
- [200] Daniela Degenring. Persönliche Mitteilung, 2001.
- [201] Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <http://www.genome.ad.jp>, 2001.

-
- [202] P.A. Srere. *Science*, 158:936–941, 1967.
- [203] J.J. Aragon and V. Sanchez. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131:849–853, 1985.
- [204] J.M. Rohwer, P.W. Postma, B.N. Kholodenko, and H.V. Westerhoff. Implications of macromolecular crowding for signal transduction and metabolite channeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1998.
- [205] B. von Grünbert. Die Attraktivität von Unordnung. *Spektrum der Wissenschaft, Juni*, pages 16–18, 2000.
- [206] C. Wittman and E. Heinzle. Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(6):739–750, 1999.
- [207] B. Christensen and J. Nielsen. Metabolic network analysis of *Penicillium chrysogenum* using ^{13}C -labeled glucose. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(6):652–659, 2000.
- [208] Vladimir Petrovic Karcev and Petr Michajlovic Chazanovskij. *Warum irren die Experten?* Verlag Technik Berlin, 1990.
- [209] Douglas R. Hofstadter. *Gödel, Escher, Bach: ein Endlos Geflochtenes Band*. Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1991.
- [210] Helmut Kopka. *LaTeX*. Addison-Wesley, München, 2000.
- [211] Hoimar von Ditfurth. *Im Anfang war der Wasserstoff*. Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1981.
- [212] Heinrich Khunrath. *Von Hylealischen, das ist Pri-Materialischen Catholischen oder Allgemeinen Natürlichen Chaos der naturgemässen Alchymiae und Alchymisten*. Akademische Druck und Verlagsanstalt Graz, Austria, 1990.
- [213] Christian de Duve. *Aus Staub geboren: Leben als kosmische Zwangsläufigkeit*. Rowolth Taschenbuch Verlag, 1997.
- [214] H. Martin. Instationäre Wärmeleitung in ruhenden Körpern. *VDI Wärmeatlas, 4. Auflage*, pages Ec1–Ec20, 1984.
- [215] W.J. Gelsema and C.L. DeLigny. *J. Chromatogr.*, 130:41–50, 1977.
- [216] D. Voet and J.G. Voet. *Biochemie, 1. Ed.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994.
- [217] R.C. Allen, C. A. Saravis, and H.R. Maurer. *Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins*. de Gruyter, Berlin, New York, 1984.

- [218] A.L. Shapiro, E. Vinuela, and J.V. Maizel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, pages 815–820, 1967.
- [219] P. H. O’Farell. *J. Biol. Chem.*, 250:4007–4021, 1975.
- [220] B. Bjellqvist, P.G. Rhigetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier, and W. Postel. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 6:317–339, 1982.
- [221] B. Bjellqvist, J.C. Sanchez, C. Pasquali, F. Ravier, N. Paquet, S. Frutiger, G. J. Hughes, and D. Hochstrasser. *Electrophoresis*, 14:1375–1378, 1993.
- [222] A. Görg, W. Postel, and S. Günther. *Electrophoresis*, 9:531–546, 1988.
- [223] A. Görg, G. Boguth, C. Obermaier, A. Posch, and W. Weiss. *Electrophoresis*, 16:1079–1086, 1995.
- [224] A. Görg, G. Boguth, A. Harder, C. Obermaier, B. Scheibe, R. Wildgruber, and W. Weiss. Two-dimensional electrophoresis of proteins using immobilized pH gradients - a laboratory manual. *Technical University of Munich, München*, 1998.
- [225] Udo R. Kunze. *Grundlagen der quantitativen Analyse*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1990.
- [226] Expasy. <http://www.expasy.ch>. <http://www.expasy.ch>, 2000.
- [227] Profound. <http://129.85.19.192/prowl-cgi/ProFound.exe>, 2000.
- [228] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt. *Electrophoresis*, 9:255–262, 1988.
- [229] V. Hatzimanikatis. *Biotechnology Progress*, 15:312–318, 1999.
- [230] I.T. Jolliffe. *Principal component analysis*. Springer: New York, NY, 1986.
- [231] Matthias Otto. *Chemometrie*. VCH Wiley, 1997.
- [232] Arne Buchholz. Persönliche Mitteilung, 2000.
- [233] J.H. Holland. *Adapation in Natural and Artificial Systems*. The University of Michigan Press:Ann Arbor, MI, USA, 1975.
- [234] J.H. Holland. Genetische Algorithmen. *Spektrum der Wissenschaft*, pages 44–51, 1992.
- [235] D. Weuster-Botz, V. Pramatarova, G. Spassov, and C. Wandrey. Use of a genetic algorithm in the development of a synthetic growth medium for *Arthrobacter simplex* with high hydrocortisone λ 1-dehydrogenase activity. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 64:386–392, 1995.

-
- [236] D. Weuster-Botz and C. Wandrey. Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase. *Process Biochemistry*, 30(6):563–571, 1995.
- [237] K. Uhlenbrock. *Methoden zur reaktionstechnischen Optimierung enzymatischer Synthesen – dargestellt am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von p-Chloracetophenon im organisch wässrigen Zwei-Phasen-System*. Dissertation, Universität Bonn, 1994.
- [238] T. Dandekar and P. Argos. Applying experimental data to protein fold prediction with the genetic algorithm. *Protein Engineering*, 10:877–893, 1997.
- [239] G. Jones and R. Glen. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.*, 245:45–53, 1995.
- [240] P. Willet. Genetic algorithms in molecular recognition and design. *Trend. Biotechnol.*, 13:516–521, 1995.
- [241] Dirk Weuster-Botz. Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search? *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(5):473–483, 2000.
- [242] Simon Singh. *Fermats letzter Satz*. dtv München, 1997.
- [243] A. Buchholz, L. Greiner, C. Hoh, and C. Wandrey. Patentanmeldung: Verfahren zur Optimierung der Parameter eines Trennungsvorgangs für Stoffgemische. *Patentanmeldung: DE 100 21 597.1*, 2000.
- [244] A. Buchholz, L. Greiner, C. Hoh, and A. Liese. Genetic algorithms as a tool in capillary electrophoresis method development. *Journal of Capillary Electrophoresis (accepted)*, 2002.
- [245] H. Sontheimer, P. Spindler, and U. Rohmann. *Wasserchemie für Ingenieure. DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut, Karlsruhe*, 1980.
- [246] J.G. Pan, S.R. Joon, and J.M. Lebeault. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *E. coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 9:89–94, 1987.

Tabellenverzeichnis

4.1. MSR-Stellen des Bioreaktors	30
5.1. HPLC-MS-Parameter: β -Cyclodextrin-OH Phase	42
5.2. HPLC-MS-Parameter: Hypercarb Phase	42
5.3. HPLC-Parameter: Nucleotide	43
5.4. HPLC-Parameter: Pentosen	43
5.5. HPLC-Parameter: Aminosäuren	45
5.6. Intrazelluläre Nachweisgrenzen: enzymatische Nachweisreaktionen	49
6.1. Reproduzierbarkeit CE	70
6.2. Vergleich zwischen CE und HPLC	71
6.3. Retentionszeiten und Nachweisgrenzen: Pentosen	72
6.4. Geräteparameter der LC-MS	74
6.5. HPLC-ESI-MS/MS Trennung	78
6.6. Trennung isobarer glycolytischer Intermediate	79
6.7. Intrazelluläre Nachweisgrenzen LC-MS	80
6.8. Zellvolumina	86
6.9. Wachstumsraten	89
6.10. Intrazelluläre steady state Konzentrationen	91
6.11. Literaturvergleich intrazellulärer Metabolitkonzentrationen	92
6.12. Kinetiken des vereinfachten PTS-Modell	123
6.13. Vergleich der Modellparameter	125
8.1. 2-D Gelelektrophorese: identifizierte Proteine	141
8.2. GA: Versuchparameter und Variationsbereiche	150
8.3. C-Bilanz Parameter	155
8.4. C-Bilanz Daten	156
8.6. Substratkonzentrationen	161
8.7. Vorkulturmedium	162
8.8. Batch Medium	162
8.9. Chemostat Medium	163
8.10. Spurenlösung	163

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Relaxationszeiten unterschiedlicher Prozesse	5
2.2.	Iterative Vorgehensweise zur Stoffwechselquantifizierung	6
3.1.	Grobe Einteilung der genomischen Biologie in die Bereiche Ge- nomics (DNA-Sequenzanalyse), Transcriptomics (Proteinexpressi- on), Proteomics (Proteinanalyse) und Metabolomics (Analyse nie- dermolekularer Zellbestandteile)	8
3.2.	<i>Escherichia coli</i>	10
3.3.	PEP-abhängiges Phosphotransferase System	11
3.4.	Glycolyse und Gluconeogenese	12
3.5.	Oxidativer Endabbau der Kohlenstoffquelle im Citratcyclus	14
3.6.	Pentosephosphat-Weg	15
3.7.	Gesamtstoffwechsel von <i>E. coli</i>	17
3.8.	Wachstumskurve	18
3.9.	Abhängigkeit μ von S	19
4.1.	Schematische Darstellung der schnellen Probenahme	25
4.2.	Bioreaktor mit Pulsaufgabesystem und schneller Probenahme; im Vordergrund die Vorschubeinheit mit Magazinen	27
4.3.	Darstellung der sukzessiven Kultivierungsschritte	28
4.4.	MSR-Stellen des Bioreaktors	29
4.5.	Nahaufnahme der schnellen Probenahme	31
5.1.	Aufbau des Thermoquest LCQ ESI-MS mit Ionenfalle	35
5.2.	Verbesserung des S/N bei MS^n Experimenten	35
5.3.	Fragmentierung von NAD während eines MS^n Experimentes	36
5.4.	Micromass LCT mit Z-Spray Ionisierung und TOF-MS	37
5.5.	Der Elektroendosmotische Flow (EOF)	39
5.6.	Schematischer Aufbau eines CE-Gerätes	39
5.7.	^{31}P -NMR Messung	46
5.8.	Laborroboter Biomek 2000	47
5.9.	Beispiel für Modellierung: Glucoseaufnahme	53
6.1.	Multipuls	56
6.2.	Mischzeitmessungen	57
6.3.	Entwicklung und Mischzeiten verschiedener System	58
6.4.	Übersicht von Verfahren des Zellaufschlusses [117]	60

6.5. Nachweisgrenzen unterschiedlicher Analysenmethoden	64
6.6. LC-MS TIC und extrahierte m/z	76
6.7. Auftrennung phosphorylierter Kohlenhydrate an Hypercarb Phase	77
6.8. Chromatographische Trennung isobarer Metabolite	79
6.9. Einfluß des scan-Bereichs auf die Nachweisgrenze	82
6.10. Trennung isobarer Substanzen über unterschiedliche Fragmentierung	83
6.11. Dynamischer Verlauf eines unbekanntes Metaboliten	84
6.12. Vergleich der LC-MS Daten mit enzymatischen Assays	85
6.13. Vergleich der LC-MS Methode mit Enzymassays und einer UV- HPLC Methode	85
6.14. Korrelation zwischen Zellzahl, OD und BTM	87
6.15. Größenverteilung des Zelldurchmessers	88
6.16. Prozeßparameter einer ausgewählten chemostatischen Fermentati- on; deutlich sichtbar ist die Konstanz der Parameter BTM, pO ₂ und CO ₂ für 7 Verweilzeiten im Chemostat	90
6.17. Chemostat-Kohlenstoffbilanzen	90
6.18. Glucoseanstieg im Bioreaktor nach Pulsaufgabe	94
6.19. Externe Parameter während des GLC/GLC-Pulsexperimentes . .	95
6.20. Verhalten des Systems nach dem Substratpuls (GLC/GLC- Pulsexperiment)	96
6.21. GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite . .	98
6.22. GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite . .	99
6.23. GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite . .	100
6.24. GLC/GLC Pulsexperiment: Verlauf der intrazellulären G3P- Konzentration (a) und der externen Glucosekonzentration (b) . .	101
6.25. Übergang zwischen Glycolyse und Citratcyclus	101
6.26. Unterschiedliche Glucose Aufnahmesysteme in <i>E. coli</i>	103
6.27. Glucoseaufnahme in <i>E. coli</i> K12 und <i>E. coli</i> 3pMK7	104
6.28. GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabo- lite	106
6.29. GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabolite	107
6.30. GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabolite	108
6.31. GLC/GLC Pulsexperiment pts(-): Verlauf intrazellulärer Metabolite	109
6.32. Adenylate Energy Charge während der Pulsexperimente	110
6.33. GLY/GLY Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite . .	113
6.34. GLY/GLY Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite . .	114
6.35. GLY/GLY Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite (a- d) und der externen Glycerolkonzentration (e)	115
6.36. GLY/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite . .	119
6.37. GLY/GLC Pulsexperiment: Verlauf intrazellulärer Metabolite . .	120
6.38. PTS-Modell	124
6.39. Vergleich der GLC-Modelle	126
6.40. GLY-Modell: Modellaufbau	128

6.41. GLY-Modell: G3P	128
6.42. GLY-Modell: Dynamische Flußbestimmung	129
8.1. Temperaturverlauf in Quenchingproben	137
8.2. Abschätzung der Abkühlzeit eines Proben tropfens	138
8.3. Identifizierte Spots in der 2D-Gelelektrophorese	142
8.4. 2D-Gele von <i>E. coli</i> K12 in glucoselimitiertem und glycerollimitiertem Zustand	143
8.5. Hauptkomponentenanalyse: Voruntersuchungen	145
8.6. Identifizierung multipler m/z	146
8.7. Identifizierung spezifischer m/z	146
8.8. GA bei der CE-Methodenentwicklung	148
8.9. Definition der Trenngüte	149
8.10. Optimierung der Trennmethode in 4 Generationen	151
8.11. [CE Optimierung: Elektropherogramme]Exemplarische Elektropherogramme der 1. und 4. Generation	151
8.12. Fehlerbetrachtung unter Annahme eines konstanten Fehlers	152
8.13. Erweiterte Fehlerbetrachtung	153
8.14. Fehlerbetrachtung unter Verwendung der Gleichungen 8.3 und 8.4 (Parameter G6P: $y_0 = 0,04283$, $a = 0,13362$, $b = 0,01537$; Parameter PEP: $y_0 = 0,06231$, $a = 1,11684$, $b = 0,01119$)	154
8.15. CE-Elektropherogramm, organische Säuren	168
8.16. HPLC-Chromatogramm, organische Säuren	169
8.17. HPLC-Chromatogramm, Nucleotide	169
8.18. PAS: Pulsbehälter	171
8.19. PAS: Pulsbehälter (Ansteuerung). 1 Vorratsbehälter, 2 Pumpe, 3 Pulsbehälter, 4-7 2-Wege Ventile, 8 3-Wege Ventil, 9 2-Wege Ventil, 10 Bioreaktor, 11-13 Sterilfilter, 18 Standard Anstechnadel, 19 Sterilfilter	172
8.20. Modularer Aufbau des PAS. 1 Vorratsbehälter, 2 Pumpe, 3 Pulsbehälter, 4-7 2-Wege Ventile, 8 3-Wege Ventil, 9 2-Wege Ventil, 10 Bioreaktor, 11-13 Sterilfilter, 14-15 zusätzliche Pulsbehälter, 16 4-Wege Ventil, 17 Zweigstelle, 18 und 18b Standard Anstechnadel, 19 Sterilfilter	173
8.21. PAS: Viskositätseinfluß	174
8.22. PAS: Einstellung eines definierten Volumens	174

8 2 4 5 3 1 5 2 6 3 2 5 9 3 6 5 1 1 6
 4 4 4 3 9 9 9 8 2 7 1 1 9 8 2 6 9 1 5
 3 4 4 9 5 6 1 6 4 9 2 4 9 3 8 8 3 1 2
 4 7 1 2 1 9 5 8 1 7 1 2 9 3 5 9 5 9 1
 1 5 5 2 4 3 1 1 9 2 3 8 2 3 3 9 6 5 1
 8 2 3 4 6 6 5 6 5 2 1 5 4 3 8 2 3 2 9
 3 5 4 3 3 7 2 2 4 6 7 2 6 4 4 4 2 9 5
 5 6 9 1 5 9 2 4 5 9 3 4 5 2 5 5 3 2 9
 3 5 9 2 4 9 9 3 8 3 8 8 2 8 3 3 1 9 7
 1 6 5 1 1 5 4 5 3 3 9 2 5 9 5 5 5 4 9
 3 5 2 4 4 5 6 6 9 1 8 1 8 1 1 9 2 5 7
 5 9 2 2 8 2 3 1 9 6 5 2 5 3 7 6 5 3 9
 2 4 3 5 9 1 9 1 2 9 9 5 1 5 2 7 6 5 3
 1 5 4 6 3 1 9 1 5 7 5 6 9 2 5 3 8 2 1
 1 4 5 5 2 9 3 5 4 3 6 3 1 1 9 2 2 8 1
 3 1 9 6 5 4 5 1 5 1 7 4 5 3 9 4 9 6 7
 9 1 7 2 4 5 3 5 6 9 1 5 5 4 2 5 9 3 7
 2 4 9 5 9 1 9 9 9 8 8 8 7 8 8 8 8 8

“I do not know what I may appear to the world; but to myself I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.”

Isaac Newton (1643-1727)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1998 bis August 2001 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der Arbeitsmittel, seine anspruchsvolle Begeisterungsfähigkeit, sowie die lehrreiche Zeit und dem Unterschied zwischen "problems" und "challenges".

Herrn Prof. Dr. H. Wamhoff, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Ing. R. Takors für sein reges Interesse an dieser Arbeit, die hilfreiche Diskussion der Ergebnisse sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. J. Hurlebaus und Dipl.-Chem. D. Degenring für die Modellierung der Daten und zahlreiche Diskussionen über "plausible" Stoffwechselphänomene innerhalb und außerhalb der DREEM-Team Treffen.

Dipl.-Chem. M. Schmitz, S. Obasuyi, Dipl.-Biol. S. Thies, Dipl.-Chem. J. Penzien und Christoph Opielka für die Bearbeitung von zahlreichen Teilaspekten im Rahmen ihrer eigenen Diplom-, Masters- und BPS-Arbeiten.

Frau H. Haase-Reiff für diverse HPLC-Messungen und die engagierten analytischen Diskussionen sowie Herrn Dipl.-Ing. A. Franz und H. Kiehl für die stetige Unterstützung bei elektro- und datentechnischen Problemen.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 1, insbesondere Herrn Prof. Dr. M. Bott für die Bereitstellung der 2D-Gelelektrophorese Geräte und seiner Diskussions- und Hilfsbereitschaft; außerdem PD Dr. G. Sprenger und U. Degener für die fachliche Unterstützung und Bereitstellung von *E. coli*-Stämmen und -Wissen.

Den Mitarbeitern der Fermentations- und Informatikgruppe, der Enzymgruppe und des gesamten Instituts für Biotechnologie für die fachliche Unterstützung und wertvollen Diskussionen, die vielen Hilfestellungen und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Den Damen und Herren der Verwaltung, der Werkstätten und des Elektronik- und Photolabors für die immer wieder gewährte Unterstützung.

Prof. D. Kell, Dr. N. Kaderbhai und J. Heald an der University of Wales, Aberystwyth für die produktive Zeit in Wales und zahlreiche neue Einsichten.

Den immer wieder wechselnden Mitgliedern diverser Fahrgemeinschaften Bonn \Leftrightarrow Jülich, welche in den letzten 4 Jahren an den umgerechnet 3,8 Erdumrundungen teilgenommen haben.

Meinen Eltern für ihre Unterstützung und den Rückhalt, welchen ich durch sie jederzeit erhalten habe.

Meiner Ehefrau und stärksten Stütze Annette Buchholz für ihre Geduld und ihr Verständnis in den letzten acht Jahren; *“durch die Liebe und den Tod berührt der Mensch das Unendliche”*.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-3971
Februar 2002
ISSN 0944-2952