
Inhaltsverzeichnis

I. EINFÜHRUNG UND GRUNDLAGEN

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

7.6	Parameteranpassung.....	41
7.7	Statistische Auswertung.....	43
7.8	Experimentelles Design.....	43
7.9	Generelles Vorgehen bei der SFA.....	44
8	FLUX-BALANCE-ANALYSE	46

II. MATERIAL UND METHODEN

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

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

III. ISOTOPISCH STATIONÄRE STOFFFLUSSANALYSE

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

IV. ISOTOPISCH INSTATIONÄRE STOFFFLUSSANALYSE

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