

Metabolomanalyse zur Untersuchung der  
Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in  
L-Phenylalanin Produzenten von  
*Escherichia coli*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Marco Oldiges**

aus

Leverkusen

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung  
der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Ch. Wandrey  
2. Referent: Prof. Dr. H. Wamhoff

Tag der Promotion: 11.08.2004

Für Claudia



*Die Menschen pflegen die Natur wie von einem hohen Turm herab und von weitem zu betrachten und sich zu sehr mit Allgemeinheiten zu befassen, während sie weit klarere und nützlichere Begriffe bekämen, wenn sie von ihrem Turm herabstiegen, auf Einzelheiten eingingen und die Dinge selbst mit mehr Aufmerksamkeit und Sorgfalt anschauten.*

*Diesen Nachteil hebt man nicht allein dadurch auf, dass man die Sinne schärft und kräftigt, sondern dass man näher an den Gegenstand herangeht.*

*Francis Bacon*



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt. Ohne die Unterstützung vieler Menschen ist eine solche Arbeit nur sehr schwer durchführbar. Einigen von ihnen gilt mein besonderer Dank:

- Prof. C. Wandrey als meinem Doktorvater für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen, unnachgiebige Begeisterungsfähigkeit, dem Unterschied zwischen “problems“ und “challenges“ und für das in mich gesetzte Vertrauen.
- Prof. H. Wamhoff, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn für die freundliche Übernahme des Koreferates.
- Dr. Ing. Ralf Takors für seine Unterstützung zu jeder Zeit, Rat, Hilfestellung, viele hilf- und lehrreiche Diskussionen und die kritische Durchsicht der Arbeit.
- Prof. H. Vereecken und Dr. H.-D. Narres für die Zugangsmöglichkeit zur HPLC-MS Anlage im ICG IV und S. Köppchen und Y. Zielezny für die angenehme Kooperation vor Ort. Diese Zusammenarbeit gab den entscheidenden Ausschlag für den Fortgang dieser Arbeit, und daher bin ich zu sehr großem Dank verpflichtet. Besonders Dr. H.-D. Narres möchte ich für die offene Kooperation danken.
- Dipl.-Ing. Silvia Zaja, Dipl.-Ing. Eike Hirsch und Dipl.-Ing. Matthias Kunze für ihr wertvolles Engagement im Rahmen ihrer Diplomarbeiten und C. Oleszinski, M. Radix und N. Hersch für Unterstützung im Rahmen von Praktika bzw. Ausbildung.
- Dr. Marc Gerigk, Dipl.-Biotech. Nicole Rüffer und Dipl.-Ing. Andrea Kreutzer für die in jeder Hinsicht tolle und freundschaftliche Zusammenarbeit im Alltag des FAME-Projektes. Besonders Marc Gerigk danke ich für die Einweisung in die laufenden L-Phe Aktivitäten am Anfang meiner Arbeit und entschuldige mich für das Ungleichgewicht, dass wir in 5 Minuten wussten, was er in 50 h fermentiert hatte.
- Der gesamten Fermentationsgruppe des IBT 2 in wechselnder Besetzung für offene Worte und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Heidi Haase-Reiff für ungezählte HPLC Messungen und Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Brandt für seine Unterstützung und für sehr viele Antworten zu sehr vielen Fragen.
- Der DSM Biotech GmbH in Jülich und der Stammentwicklung im IBT 1 für die Zusammenarbeit und Unterstützung im FAME-Projekt. Mein besonderer Dank gilt Prof. G. Sprenger, Dr. J. Bongaerts, Dr. M. Wubbolts, Dr. D. Schippers, Dr. M. Krämer, Dr. L. Raeven, Frau U. Degner und Frau S. Kremer.
- Der Infrastruktur des IBT, der mechanischen und elektronischen Werkstatt, Dipl.-Ing. Andreas Franz und Horst Kiehl bei allen Soft- und Hardware Widrigkeiten und Kirsten Bräker für besondere Bilder
- Meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung bis zum Ende meiner Ausbildung



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>9</b>
3.1	Biologische Grundlagen . . . . .	9
3.1.1	Charakterisierung des Bakteriums <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) . . . . .	9
3.1.2	Substrataufnahmemechanismen . . . . .	9
3.1.3	Glukose Aufnahme via Phosphotransferase–System (PTS) . . . . .	10
3.1.4	Stoffwechsel in <i>E. coli</i> mit Glukose als Substrat . . . . .	12
3.1.5	Glykolyse . . . . .	13
3.1.6	Pentose–Phosphat–Weg . . . . .	13
3.1.7	Zitratzyklus . . . . .	13
3.1.8	Biosynthese aromatischer Aminosäuren in <i>E. coli</i> . . . . .	15
3.1.9	Deregulation der Aromatenbiosynthese und Konstruktion eines <i>E. coli</i> L–Phenylalanin Produktionsstammes . . . . .	18
3.2	Verfahrenstechnische Grundlagen . . . . .	19
3.2.1	Bioprozessführung . . . . .	19
3.2.2	Satzverfahren (Batch) . . . . .	19
3.2.3	Zulaufverfahren (Fed–Batch) . . . . .	21
3.2.4	Zulaufverfahren mit wachstumsentkoppelter Produktionsphase . . . . .	22
3.3	Analytische Grundlagen . . . . .	22
3.3.1	LC–MS Kopplung . . . . .	22
3.3.2	Elektrosprayionisation (ESI) . . . . .	23
3.3.3	Ionenfallen MS . . . . .	25
3.3.4	Triple Quadrupol MS . . . . .	27
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
4.1	Biologisches System . . . . .	29
4.1.1	Charakterisierung der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme . . . . .	29
4.1.2	Stammhaltung . . . . .	31
4.1.3	Vorkultivierung . . . . .	31
4.2	Aufbau und Durchführung der Fermentationsexperimente im 2,5 L Bioreaktor	32
4.3	Aufbau und Durchführung der Fermentationsexperimente im 20 L Bioreaktor	35
4.3.1	Bioreaktor und Fed–Batch Kultivierung . . . . .	35
4.3.2	Glukose Pulssystem und schnelle Probenahmereinheit . . . . .	37
4.4	Extraktion intrazellulärer Metabolite . . . . .	40
4.4.1	Perchlorsäure (HClO <sub>4</sub> ) . . . . .	40

4.4.2	Ultrafiltration der Zellextrakte . . . . .	40
4.5	Aufarbeitung von Metaboliten der Aromatenbiosynthese . . . . .	40
4.5.1	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) und 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat (DAH) . . . . .	40
4.5.2	3-Dehydroquinat (DHQ) . . . . .	41
4.5.3	3-Dehydroshikimat (DHS) . . . . .	42
4.5.3.1	Extraktion mit Ethylacetat . . . . .	42
4.5.3.2	Ionenchromatographie . . . . .	42
4.5.4	Shikimat-3-phosphat (S3P) . . . . .	42
<b>5</b>	<b>Analytische Methoden</b> . . . . .	<b>45</b>
5.1	Biomassekonzentration . . . . .	45
5.2	Zellzahl und Zellgrößenverteilung mittels CASY-Counter . . . . .	45
5.3	Extrazelluläre Analytik . . . . .	46
5.3.1	Organische Säuren mittels HPLC . . . . .	46
5.3.2	Aminosäuren mittels HPLC . . . . .	47
5.3.3	Glukose . . . . .	47
5.3.4	Quantitative Metabolit-Messungen mit <sup>1</sup> H-NMR . . . . .	50
5.3.5	<sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR Messungen . . . . .	50
5.3.6	Thiobarbiturat-Nachweis von DAH und DAHP . . . . .	50
5.3.7	Phosphat Nachweis . . . . .	51
5.4	Intrazelluläre Analytik . . . . .	51
5.4.1	Enzymatische Nachweismethoden . . . . .	51
5.4.2	Enzymatische Bestimmung von 6-Phosphoglukonat (6PG) . . . . .	53
5.4.3	HPLC-Methode für die MS-Kopplung . . . . .	53
5.4.4	Ionenfallen LC-MS . . . . .	54
5.4.5	Triple Quadrupol LC-MS . . . . .	55
5.4.6	Durchführung der Standard-Additions-Methode für die Quantifizierung der HPLC-MS Messung . . . . .	59
<b>6</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> . . . . .	<b>61</b>
6.1	Entwicklung und Etablierung der analytischen Techniken . . . . .	61
6.1.1	Quantitative <sup>1</sup> H-NMR für die Fermentationsanalytik . . . . .	61
6.1.1.1	Probenvorbereitung . . . . .	61
6.1.1.2	Einfluss der biologischen Matrix und der Trocknungsdauer . . . . .	62
6.1.1.3	Bestimmung der Nachweisgrenze und des Linearitätsbereiches . . . . .	63
6.1.1.4	Direkter Vergleich zwischen <sup>1</sup> H-NMR und HPLC mit realen Fermentationsproben . . . . .	63
6.1.2	HPLC-MS (Triple Quadrupol) für die intrazelluläre Analytik . . . . .	66
6.1.2.1	Optimierung der ESI Parameter . . . . .	66
6.1.2.2	Optimierung der substanzspezifischen MS/MS Parameter . . . . .	68
6.1.2.3	Quantifizierung mit der HPLC-MS (Triple Quadrupol) . . . . .	74
6.1.3	Direkter Vergleich der beiden MS Detektoren . . . . .	77
6.2	Darstellung und Isolierung der Metaboliten der Aromatenbiosynthese . . . . .	78
6.2.1	Darstellung von 3-Dehydroshikimat (DHS) . . . . .	79
6.2.2	Darstellung von Shikimat-3-phosphat (S3P) . . . . .	81
6.2.3	Darstellung von 3-Dehydroquinat (DHQ) . . . . .	82

6.2.4	Darstellung von 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) und 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat (DAH) . . . . .	83
6.3	Einsatz der <sup>1</sup> H-NMR Metabolit Analytik für die <i>E. coli</i> L-Phe Stammentwicklung . . . . .	87
6.3.1	<i>E. coli</i> 4pF20 . . . . .	88
6.3.2	<i>E. coli</i> 4pF26 . . . . .	90
6.3.3	<i>E. coli</i> 4pF69 . . . . .	90
6.3.4	<i>E. coli</i> 4pF79 . . . . .	90
6.3.5	<i>E. coli</i> 4pF81 . . . . .	92
6.3.6	Zusammenfassung der Stammentwicklung der L-Phe Produzenten . .	94
6.4	Identifizierung weiterer Nebenprodukte mit LC-MS . . . . .	96
6.5	Untersuchungen zu Methanol-Quenching- und Zellextraktionsverfahren . . .	101
6.5.1	Stabilität der Metaboliten bei der Extraktion mit Perchlorsäure (HClO <sub>4</sub> )	101
6.5.2	Zellintegrität beim Methanol-Quenching-Verfahren . . . . .	102
6.5.3	Durchlässigkeit der Zellen für Metaboliten beim Methanol-Quenching-Verfahren . . . . .	102
6.6	Entwicklung eines Fed-Batch Fermentationsverfahrens mit Glukosepuls . . . .	105
6.6.1	Experimente mit <i>E. coli</i> DAH(P) . . . . .	108
6.6.2	Experimente mit <i>E. coli</i> DHS . . . . .	110
6.6.3	Experimente mit <i>E. coli</i> S3P . . . . .	110
6.6.4	Direkter Vergleich der Experimente mit <i>E. coli</i> DAH(P), <i>E. coli</i> DHS und <i>E. coli</i> S3P . . . . .	114
6.6.5	Transfer des Fed-Batch Glukosepuls Verfahrens in den 20 L Bioreaktor für die schnelle Probenahme mit <i>E. coli</i> L-Phe Produzent . . . . .	116
6.7	Glukosepuls experimente mit L-Phenylalanin Produktionsstämmen . . . . .	120
6.7.1	Glukosepuls experiment mit <i>E. coli</i> 4pF49 . . . . .	120
6.7.1.1	Enzymatische und Ionenfallen LC-MS Daten . . . . .	120
6.7.1.2	Triple Quadrupol LC-MS Daten . . . . .	122
6.7.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse mit <i>E. coli</i> 4pF49 . . . . .	127
6.7.2	Glukosepuls experiment mit <i>E. coli</i> 4pF20 . . . . .	127
6.7.2.1	Enzymatische Ergebnisse . . . . .	128
6.7.2.2	Triple Quadrupol LC-MS Ergebnisse . . . . .	132
6.7.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse mit <i>E. coli</i> 4pF20 . . . . .	136
6.7.3	Glukosepuls experiment mit <i>E. coli</i> 4pF78 . . . . .	137
6.7.3.1	Triple Quadrupol LC-MS Ergebnisse . . . . .	138
6.7.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse mit <i>E. coli</i> 4pF78 . . . . .	142
6.8	Analyse des Produktstoffwechsels von <i>E. coli</i> 4pF20 und <i>E. coli</i> 4pF78 mit statistischen Methoden . . . . .	143
6.8.1	Puls experiment mit <i>E. coli</i> 4pF20 . . . . .	144
6.8.2	Puls experiment mit <i>E. coli</i> 4pF78 . . . . .	147
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>155</b>
<b>8</b>	<b>Ausblick</b>	<b>159</b>
<b>A</b>	<b>Fermentationsmedien</b>	<b>161</b>

A.1	Luria-Bertani Medium (LB) . . . . .	161
A.2	Spurenelementlösung . . . . .	161
A.3	Vorkulturmedium Nr. I . . . . .	162
A.4	Vorkulturmedium Nr. II . . . . .	162
A.5	Hauptkulturmedium Nr. I . . . . .	163
A.6	Hauptkulturmedium Nr. II . . . . .	164
A.7	Zulaufmedien und sonstige Medienbestandteile . . . . .	164
A.7.1	Glukose . . . . .	164
A.7.2	L-Tyrosin . . . . .	164
A.7.3	pH-Korrekturmittel, Antischaummittel, Induktionsmittel . . . . .	164
A.8	Chemikalienverzeichnis . . . . .	165
A.9	Geräteverzeichnis . . . . .	165
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>167</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Trefferzahlen der ISI CURRENT CONTENTS connect <sup>®</sup> Datenbank . . . . .	2
1.2	Fotomontage der Anregung des Stoffwechsels durch einen Glukosepuls . . . . .	4
3.1	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von <i>E. coli</i> Zellen mit einer Bildbreite von 9,5 $\mu\text{m}$ [129]. . . . .	10
3.2	Funktionsprinzip des PEP-PTS Glukoseaufnahmesystems . . . . .	11
3.3	Glukosestoffwechsel über Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und TCA- Zyklus in <i>E. coli</i> mit anaplerotischen Reaktionen . . . . .	14
3.4	Schematische Darstellung der Reaktionen des Aromatenbiosynthesewegs mit den beteiligten Metaboliten, Enzymen und Kofaktoren . . . . .	16
3.5	Typische Wachstumskurve des Batch-Verfahrens . . . . .	20
3.6	Prinzip der Ionenbildung im Elektrosprayverfahren (Bildquelle: <a href="http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.htm">http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.htm</a> ) . . . . .	24
3.7	Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers mit Ionenfal- lentechnik (LCQ Classic, Thermo Finnigan) . . . . .	26
3.8	Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers mit Triple Quadrupoltechnik (TSQ Quantum, Thermo Finnigan) . . . . .	27
4.1	Foto des 2,5 L Labfors Bioreaktors mit Peripherie und Prozessrechner . . . . .	33
4.2	Anlagenskizze des 2,5 L Labfors Bioreaktors . . . . .	33
4.3	Foto des 20 L Infors Bioreaktors mit Prozessrechner (rechts), Pulsaufgabe- system (links) und schneller Probenahmeinheit im Vordergrund . . . . .	36
4.4	Anlagenskizze des 20 L Infors Bioreaktors . . . . .	36
4.5	Schema des 20 L Bioreaktors mit Pulsaufgabesystem, schneller Probenahme- und zentraler Pulssteuerungseinheit . . . . .	39
5.1	Glukose-Konzentrationsmessung mit Enzymassay und Accutrend Biosen- sorchip in Fed-Batch Fermentation mit L-Phe Produktionsstamm <i>E. coli</i> 4pF49 (links); Phasenauftragung mit Korrelationskoeffizient R (rechts) . . . . .	49
5.2	Foto des Pipettierroboters Biomek 2000. . . . .	52
5.3	Foto der Ionenfallen LC-MS Anlage. . . . .	55
5.4	Foto der Triple Quadrupol LC-MS Anlage. . . . .	56
6.1	Probenvorbereitung mittels Gefriertrocknung und Vakuumzentrifugati- on (links); Test verschiedener Probenvolumina bei Vakuumzentrifugation (rechts), Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung einer Dreifach- bestimmung . . . . .	62
6.2	Nachweisgrenze für Shikimat in Abhängigkeit von der Pulsanzahl N (links) und lineare Kalibrationsfunktion einer Shikimat Standardreihe (rechts) . . . . .	63

---

6.3	Vergleich zwischen $^1\text{H}$ -NMR und HPLC Daten mit realen Fermentationsproben von <i>E. coli</i> 4pF20; Konzentrationen im Fermentationsverlauf (links) mit Phasendiagrammen (rechts) . . . . .	65
6.4	Abnehmende LC-MS Peakflächen der Mehrfachinjektion mit Volumenfluss von $500\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$ in die ESI-Quelle . . . . .	68
6.5	Konstante LC-MS Peakflächen der Mehrfachinjektion nach Einbau des Flussteilers mit einem Volumenfluss von $100\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$ in die ESI-Quelle . .	69
6.6	Phosphatabspaltung von Zuckerphosphat-Molekülonen am Beispiel des G6P	71
6.7	Peakflächen der Kontrollanalyten G6P/F6P, 6PG und FBP der Quality Control (QC)-Proben einer 5-tägigen Sequenz aus 111 Proben . . . . .	75
6.8	Beispiele für Kalibrationsgeraden der StdAddM; Geradengleichungen durch lineare Regression bestimmt (Probe Nr. 0 ist die Ursprungsprobe, Proben 1-5 wurden sukzessive steigende Mengen an Standard zugesetzt) . . . . .	76
6.9	Kalibrationsgerade StdAddM G6P/F6P, Funktion durch lineare Regression bestimmt. (Probe Nr. 0 ist die Ursprungsprobe, Proben 1-5 wurden in Schritten von $30\ \mu\text{M}$ sukzessiv Standard zugesetzt) . . . . .	76
6.10	Retrosynthetischer Zugang zu Metaboliten der Aromatenbiosynthese mit gentechnisch geblockten <i>E. coli</i> Stämmen als Syntheseroute und Glukose als universellem Synthesebaustein . . . . .	79
6.11	Fermentationsverlauf für <i>E. coli</i> DHS Produzent, Zeitabschnitt 15-24 h ohne Probenahme, Linien Darstellung interpoliert . . . . .	80
6.12	Fermentationsverlauf für <i>E. coli</i> S3P Produzent . . . . .	82
6.13	Fermentationsverlauf für <i>E. coli</i> DAH(P) Produzent . . . . .	84
6.14	LC-MS Messung Fermentationsprobe <i>E. coli</i> DAH(P) Produzent (links), Phosphatase behandelte Fermentationsprobe (rechts) . . . . .	85
6.15	$^1\text{H}$ -NMR Daten der Fermentation mit <i>E. coli</i> 4pF20 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz dargestellt . . . . .	89
6.16	$^1\text{H}$ -NMR Daten der Fermentation mit <i>E. coli</i> 4pF26 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet . . . . .	89
6.17	$^1\text{H}$ -NMR Daten der Fermentation mit <i>E. coli</i> 4pF69 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet . . . . .	91
6.18	$^1\text{H}$ -NMR Daten der Fermentation mit <i>E. coli</i> 4pF79 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet . . . . .	91
6.19	$^1\text{H}$ -NMR Daten der Fermentation mit <i>E. coli</i> 4pF81 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet . . . . .	93
6.20	Integrale Kohlenstoff-Bilanz <i>E. coli</i> 4pF79 . . . . .	95

---

6.21	Prinzipielle Ablaufskizze bei der Identifizierung unbekannter Metabolite in Fermentationsproben . . . . .	97
6.22	UV-Daten der organischen Säure HPLC mit unbekanntem Peak bei 16,9 min	98
6.23	UV-Daten der HPLC-MS Messung der Peak-Fraktion 16,9 min (Nucleodex- $\beta$ -OH Phase) . . . . .	98
6.24	MS-Daten der HPLC-MS Messung der Peak-Fraktion 16,9 min (Nucleodex- $\beta$ -OH Phase) . . . . .	99
6.25	Wiederfindung nach Perchlorsäure-Zellaufschlussverfahren, gemessen mit Triple Quadrupol LC-MS . . . . .	101
6.26	Wiederfindung von <i>E. coli</i> Zellen nach Methanol-Quenching; Einfluss von Temperatur (links) und Verweildauer (rechts) . . . . .	103
6.27	Links: AMP und PEP in Zellextrakten (schwarze Quadrate) und in methanolischen Quenching Überständen (graue Kreise), die aus der Kalibration berechneten Konzentrationsniveaus der MS-Peakfläche sind mit einem Sternchen markiert und als horizontale Linien eingetragen; Rechts: PEP und AMP Anteil im Zellextrakt bezogen auf die Gesamtmenge . . . . .	104
6.28	Linearer erster Teil der Aromatenbiosynthese mit den drei verwendeten Stämmen und ihrer Einordnung in den Biosyntheseweg . . . . .	107
6.29	Fed-Batch Fermentationsprozess mit Glukosepuls und Einteilung des Prozesses in drei Phasen . . . . .	107
6.30	Biomassespezifische Produktkonzentration von <i>E. coli</i> DAH(P) in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit (A) 25 %, (B) 50 % und (C) 75 % Glukoselimitierung; Proben der ersten ( $\circ$ ), zweiten ( $\triangle$ ) und dritten ( $\square$ ) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt; Grafik (D) zeigt den Flussunterschied in die Aromatenbiosynthese für die drei Limitierungsstufen . . . . .	109
6.31	Biomassespezifische Produktkonzentration von <i>E. coli</i> DHS in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit (A) 50 % und (B) 75 % Glukoselimitierung; Proben der ersten ( $\circ$ ), zweiten ( $\triangle$ ) und dritten ( $\square$ ) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt; Grafik (C) zeigt den Flussunterschied in die Aromatenbiosynthese für die zwei Limitierungsstufen . . . . .	111
6.32	Biomassespezifische Produktkonzentrationen von <i>E. coli</i> S3P in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit 50 % Glukoselimitierung; S3P in erster ( $\circ$ ), zweiter ( $\triangle$ ) und dritter ( $\square$ ) Phase, Shikimat in erster ( $\bullet$ ), zweiter ( $\blacktriangle$ ) und dritter ( $\blacksquare$ ) Phase und DHS in erster (+), zweiter ( $\nabla$ ) und dritter ( $\diamond$ ) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt; . . . . .	113

6.33	Biomassespezifische Produktkonzentrationen von <i>E. coli</i> S3P in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit 75 % Glukoselimitierung; S3P in erster (○), zweiter (△) und dritter (□) Phase, Shikimat in erster (●), zweiter (▲) und dritter (■) Phase und DHS in erster (+), zweiter (▽) und dritter (◇) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt; . . . . .	113
6.34	Gegenüberstellung der relativen Fluss Differenzen (relatives $\Delta\pi_{DHS}$ , $\Delta\pi_{Shikimat}$ , $\Delta\pi_{S3P}$ ) zwischen Glukose limitierten und nicht limitierten Verhältnissen für die Experimente mit 50 und 75 % Limitierung mit <i>E. coli</i> S3P. . . . .	114
6.35	Gegenläufiger Trend zwischen notwendiger Pulsintensität und Abnahme der Signal Transmission durch den Stoffwechselweg . . . . .	115
6.36	Sauerstoffsättigung (pO <sub>2</sub> ) nach Zugabe des Glukosepulses im 50 % Experiment mit <i>E. coli</i> DAH(P) . . . . .	116
6.37	Fed-Batch Glukosepuls Fermentation mit <i>E. coli</i> 4pF49 in 20 L Bioreaktor für die schnelle Probenahme; Prozessdaten links, biomassespezifische Produktkonzentrationen rechts . . . . .	117
6.38	Metabolitbilanz der Glukose limitierten und gesättigten Phase der Fermentation mit <i>E. coli</i> 4pF49 . . . . .	118
6.39	Fluss in den Aromatenbiosyntheseweg in <i>E. coli</i> 4pF49 unter Glukose gesättigten Bedingungen; Abzweigung von Metabolitflüssen vor limitierenden enzymatischen Schritten (schwarz unterlegt) . . . . .	118
6.40	Pulsexperiment <i>E. coli</i> 4pF49: Enzymatische Messung intrazellulärer Metaboliten des Zentralstoffwechsels . . . . .	121
6.41	Pulsexperiment <i>E. coli</i> 4pF49: AMP als einziger Metabolit mit Ionenfallen LC-MS detektiert . . . . .	122
6.42	Pulsexperiment <i>E. coli</i> 4pF49: Triple Quadrupol LC-MS Messung intrazellulärer Metaboliten Teil I; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar . . . . .	124
6.43	Pulsexperiment <i>E. coli</i> 4pF49: Triple Quadrupol LC-MS Messung intrazellulärer Metaboliten Teil II; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar . . . . .	125
6.44	Fermentationsverlauf des Pulsexperimentes mit <i>E. coli</i> 4pF20 . . . . .	128
6.45	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF20: Enzymatische Messungen . . . . .	129
6.46	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF20: Enzymatische Messungen nach Ultrafiltration der Proben . . . . .	130
6.47	Zunahme der fiktiven G6P Konzentration im Enzymtest durch Matrixeinfluss einer <i>E. coli</i> K12 Probe . . . . .	131
6.48	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF20: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Zentralstoffwechselmetaboliten; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar . . . . .	133
6.49	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF20: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Nukleotiden; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar . . . . .	134
6.50	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF20: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Metaboliten der Aromatenbiosynthese; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar . . . . .	135

---

6.51	Fermentationsverlauf des Pulsexperimentes mit <i>E. coli</i> 4pF78 . . . . .	138
6.52	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF78: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Zentralstoffwechselmetaboliten; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar . . . . .	139
6.53	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF78: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Nukleotiden; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar .	140
6.54	Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF78: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Metaboliten der Aromatenbiosynthese; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar . . . . .	141
6.55	Vergleich der intrazellulären Metabolitkonzentrationen während der letzten 2,5 bis 5 Sekunden vor der Glukosepulszugabe in <i>E. coli</i> 4pF20 und <i>E. coli</i> 4pF78 . . . . .	144
6.56	Metabolitdynamiken im Aromatenbiosyntheseweg nach dem Glukosepuls, ausgelöst durch die Vorläufermetaboliten PEP und P5P in <i>E. coli</i> 4pF20 (links) und <i>E. coli</i> 4pF78 (rechts); der Liniengraph repräsentiert die mittels eines FFT-Filters (5 Punkte) geglätteten Daten; in der Mitte der zugehörige Verlauf des Biosynthesewegs . . . . .	145
6.57	Verläufe der berechneten normierten Poolgeschwindigkeiten (NPG) für das Experiment mit <i>E. coli</i> 4pF20 (oben) und <i>E. coli</i> 4pF78 (unten) vor und nach der Pulszugabe; gestrichelte Linien zeigen die Abnahme der in-Phase Schwingung von DHQ und DHS in <i>E. coli</i> 4pF78 an . . . . .	148
6.58	Ermitteltes Pool-Effluxkapazitäts-Kriterium (PEK) von <i>E. coli</i> 4pF20 und 4pF78 nach der Glukosepulszugabe; in der Mitte der zugehörige Verlauf des Biosynthesewegs mit Metaboliten und Enzymen; grau hinterlegte Metabolitpools indizieren den darauf folgenden limitierenden Reaktionsschritt (Bottleneck) . . . . .	149
6.59	Korrelationsanalyse der Metaboliten der Aromatenbiosynthese DHQ, DHS, Shikimat und S3P mit den anregenden Vorläufermetaboliten PEP und P5P im Pulsexperiment mit <i>E. coli</i> 4pF78. Die kreisförmigen Symbole zeigen die Ergebnisse basierend auf den vollständigen Daten nach dem Puls (links), die dreieckigen und mit einem Stern gekennzeichneten Symbole berücksichtigen nur Datenpunkte später als 17.5 Sekunden (rechts). . . . .	152

# Tabellenverzeichnis

4.1	Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> Stämme für die L-Phenylalanin Produktion . . . . .	30
4.2	Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> Stämme für die Metabolit Produktion . . . . .	30
5.1	Methodenparameter der HPLC Analytik für organische Säuren . . . . .	46
5.2	Alkalischer Phosphatase Assay für die Umsetzung von Shikimat-3-phosphat zu Shikimat . . . . .	47
5.3	Methodenparameter der HPLC Analytik für Aminosäuren . . . . .	48
5.4	Enzymatischer Glukose Assay . . . . .	49
5.5	Thiobarbiturat Assay für den DAH und DAHP Nachweis . . . . .	51
5.6	Phosphat Nachweis . . . . .	51
5.7	Enzymatischer Assay zur Bestimmung von 6-Phosphoglukonat . . . . .	53
5.8	Methodenparameter der HPLC für die HPLC-MS Kopplung . . . . .	54
5.9	Methodenparameter des Ionenfallen MS . . . . .	56
5.10	Methodenparameter des Triple Quadrupol MS . . . . .	57
5.11	Substanzspezifische MS/MS Parameter des Triple Quadrupol MS . . . . .	58
6.1	<sup>1</sup> H-NMR Daten der Metaboliten des L-Phe Biosynthesewegs . . . . .	64
6.2	Optimierte ESI-Parameter für das Triple Quadrupol MS . . . . .	69
6.3	Substanzspezifische MS/MS Fragmente mit Triple Quadrupol MS . . . . .	70
6.4	Intensivste MS/MS Übergänge mit Triple Quadrupol bzw. Ionenfallen MS mit Bezug zum 30 % Limit der Ionenfalle . . . . .	72
6.5	Richtigkeit der LC-MS Methode in realer Matrix Probe durch Quantifizierung der Wiederfindung der einzelnen Schritte der StdAddM . . . . .	77
6.6	Analytik für Fermentationsproben zur L-Phe Stammentwicklung mit HPLC und <sup>1</sup> H-NMR; Metaboliten sind nach Position im Biosyntheseweg geordnet . . . . .	88
6.7	Erweiterte Analytik für Fermentationsproben zur L-Phe Stammentwicklung mit HPLC und <sup>1</sup> H-NMR nach Isolierung der Referenz-Standards von Metaboliten der L-Phe Biosynthese; Metaboliten sind nach Position im Biosyntheseweg geordnet . . . . .	95
6.8	Datenbank-Abfrage ECOCYC für den Molekulargewichtsbereich 153-159 (Nr. 1-8) und 251-257 g/mol (Nr. 9-13); Treffer mit korrekter Molmasse hervorgehoben . . . . .	100
6.9	Ergebnisse <i>E. coli</i> DAH(P); Biomassespezifische DAH(P) Bildungsrate $\pi_{DAH(P)}$ [mmol/(g · h)], Mittelwert $\bar{\pi}_{DAH(P)}$ , Standardabweichung (sd), Differenz zum 0 % Wert $\Delta\pi_{DAH(P)}$ . . . . .	109

6.10 Ergebnisse <i>E. coli</i> DHS; Biomassespezifische DHS Bildungsrate $\pi_{DHS}$ [mmol/(g·h)], Mittelwert $\bar{\pi}_{DHS}$ , Standardabweichung (sd), Differenz zum 0 % Wert $\Delta\pi_{DHS}$ . . . . .	111
6.11 Ergebnisse <i>E. coli</i> S3P; Biomassespezifische Bildungsrate für DHS ( $\pi_{DHS}$ ), Shikimat ( $\pi_{Shikimat}$ ) und S3P ( $\pi_{S3P}$ ) in [mmol/(g·h)], Differenz zum 0 % Wert $\Delta\pi_{DHS,Shikimat,S3P}$ mit relativem Änderungsfaktor . . . . .	112
6.12 Biomassespezifische Bildungsrate für <i>E. coli</i> 4pF49 im Fed-Batch Verfahren mit Glukosepuls . . . . .	118
6.13 Übersicht über Werte aus <i>in-vitro</i> Studien von <i>E. coli</i> Enzymen; $K_m$ Werte für Michaelis-Menten und $S_{0,5}^*$ Werte für sigmoidale Kinetiken dargestellt; für AroE konnten keine Literaturdaten gefunden werden . . . . .	146



# Abkürzungen und Symbole

Abk.	Abkürzung
Abb.	Abbildung(en)
amu	atomic mass unit
APCI	Atmosphärendruck Chemische Ionisierung
API	Atmosphärendruck-Ionisation
AU	Absorptionseinheit, UV-Detektor
BTM	Biotrockenmasse
CE	Kapillarelektrophorese
$\bar{c}_i$	Mittelwert der Konzentration des Metaboliten i in der Zeit vor dem Puls
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
CRP	cAMP Rezeptor Protein
DAD	Dioden-Array-Detektor
$d_l$	Wegstrecke des Lichts
Da	Dalton
$\delta$	chemische Verschiebung [ppm]
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
ESI	Elektrospray-Ionisation
FFT	Fast-Fourier-Transformation
<i>fbr</i> (-Index)	Feedback-resistente Variante des Gens/Proteins
GC	Gaschromatographie
GlF	Glukose Facilitator
G6P-DH	G6P Dehydrogenase
HK	Hexokinase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPAE	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie
$I_0 / I_t$	Lichtintensität der eingestrahlten Wellenlänge
IBT	Institut für Biotechnologie (der Forschungszentrum Jülich GmbH)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISTD	interner Standard
Kap.	Kapitel
KE	Kollisionsenergie der MS/MS-Fragmentierung
$K_m$	Sättigungskonstante des Enzyms für den Metaboliten m
$K_s$	Sättigungskonstante des limitierenden Substrats
LB	Luria-Bertani
LC	s. HPLC
LOD	Nachweisgrenze (engl. limit of detection)

Fortsetzung nächste Seite

---

Abk.	Abkürzung
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung eines Ion
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Ausschlussgrenze des Molekulargewichts
$\mu_{max}$	maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
$\mu$	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NPG	normierte Poolgeschwindigkeit des Metaboliten i
OD <sub>650</sub>	Optische Dichte, $\lambda = 650$ nm
OPA	o-Phthaldialdehyd
$\pi_i$	biomassespezifische Produktbildungsrate des Metaboliten i [mmol/(g · h)]
$\bar{\pi}_{DAH(P)}$	Mittelwert von $\pi_i$
$\Delta\pi_{DAH(P)}$	Differenz von $\pi_i$ zwischen Glukose limitierten und gesättigten Bedingungen
PAD	gepulste amperometrische Detektion
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PES	Polyethersulfon
$P_i$	anorganisches Phosphat
pO <sub>2</sub>	Gelöstsauerstoff-Konzentration
PTS	Phosphotransferasesystem
PFT-NMR	Gepulstes Fourier-Transform NMR
PEP-PTS	Phosphoenolpyruvat abhängiges Phosphotransferasesystem
PEK	Pool-Effluxkapazitäts-Kriterium
6PG-DH	6-Phosphoglukonat Dehydrogenase
QC	Quality Control Probe
$S_l$	Konzentration des limitierenden Substrats
S	Substratkonzentration
sd	Standardabweichung
SMP	Siemens Mikroprozessor Peripherie
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasen-Extraktion)
SPS	speicherprogrammierbare Steuerung
SRM	selected reaction monitoring
StdAddM	Standard-Additions-Methode
t	Zeit
TA	Transaldolase
TK	Transketolase
Tab.	Tabelle
TSP	3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-d-propionsäure
Tyr <sub>3</sub>	Peptid mit drei Tyr Einheiten
Tyr <sub>6</sub>	Peptid mit sechs Tyr Einheiten
$u_{max}(t)$	maximale Amplitude zur Zeit t
$u_0$	Amplitude zur Zeit t = 0
UV	Ultraviolett
$v_i$	normierte Poolgeschwindigkeit des Metaboliten i
VVM	Begasungsrate pro Reaktorvolumen

---

Fortsetzung nächste Seite

---

Abk.	Abkürzung
<i>wt</i> (-Index)	Wildtyp-Variante des Gens/Proteins

---

Abk.	Metaboliten
Acetyl-KoA	Acetyl-KoenzymA
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
c-AMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DAH	3-Deoxy-D-arabino-heptulose-7-phosphat
DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulose-7-phosphat
DAH(P)	Summenpool von DAH und DAHP
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHS	3-Dehydroshikimat
DHQ	3-Dehydroquinat
EPSP	Enol-pyruvyl-shikimat-3-phosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat
FBP	Fruktose-1,6-bisphosphat
F6P	Fruktose-6-Phosphat
G6P	Glukose-6-phosphat
GAP	Glyceraldehyd-3-phosphat
NAD	Nicotinamid-adeninucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adeninucleotid
NADP	Nicotinamid-adeninucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adeninucleotidphosphat
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Trp	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosin
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pyr	Pyruvat
P5P	Gemeinsamer Pool der Pentose-5-phosphate
6PG	6-Phosphoglukonat
SHI / SHIK	Shikimat
S3P	Shikimat-3-phosphat

---

Abk.	Gene
Gen/Protein <sup><i>wt</i></sup>	Wildtyp-Variante des Gens/Proteins
Gen/Protein <sup><i>fbr</i></sup>	Feedback-resistente Variante des Gens/Proteins
<i>aroA</i>	EPSP Synthase
<i>aroB</i>	3-Dehydroquinat Synthase
<i>aroC</i>	Chorimat Synthase
<i>aroD</i>	3-Dehydroquinat Dehydratase
<i>aroE</i>	Shikimat Dehydrogenase
<i>aroF</i>	L-Tyr sensitive DAHP Synthase

---

Fortsetzung nächste Seite

---

Abk.	Gene
<i>aroG</i>	L-Phe sensitive DAHP Synthase
<i>aroH</i>	L-Trp sensitive DAHP Synthase
<i>aroK</i>	Shikimat Kinase I
<i>aroL</i>	Shikimat Kinase II
<i>pheA</i>	L-Phe sensitive Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase
<i>pps</i>	PEP Synthase
<i>ptac</i>	gentechnisch modifizierter lac-Promotor von <i>E. coli</i>
<i>shiA</i>	Shikimat-Transporter
<i>tktA</i>	Transketolase A
<i>tyrA</i>	L-Tyr sensitive Chorismat Mutase/Prephenat Dehydrogenase

---

# 1. Einleitung

Die Nutzung der biologischen Stoffwechselleistung der Mikroorganismen durch den Menschen hat eine lange Tradition, wobei die Entwicklung der ersten Herstellungsverfahren lediglich auf empirischen Grundlagen beruhte. Die ersten biotechnologischen Produkte wie z.B. Bier, Wein, Essig und Sauerteig waren bereits lange etabliert, bevor Antonie van Leeuwenhoek 1676 zum ersten Mal über die Entdeckung der "ganz kleinen Thierchen" berichtete. Die Fertigkeit zur Bierherstellung besaßen die Babylonier bereits um ca. 6000 Jahre v. Chr. [173] und sie müssen zweifellos als Biotechnologen bezeichnet werden, da sie es verstanden, die Biologie der mikrobiellen Stoffwechselleistung mit der Technologie eines Herstellungsverfahrens zu verbinden. Die Unwissenheit, dass und in welcher Form der mikrobielle Stoffwechsel an der alkoholischen Gärung beteiligt ist, schließt sie sicher nicht aus den Reihen der Biotechnologen aus. Schließlich gibt uns der mikrobielle Stoffwechsel heute immer noch Rätsel auf, obwohl er, vielleicht mehr denn je, zum Gegenstand aktueller Forschung geworden ist.

Die Europäische Föderation Biotechnologie definierte die moderne Biotechnologie als die integrierte Anwendung von Natur- und Ingenieurwissenschaften mit der Zielsetzung, Organismen, Zellen, Teile daraus und molekulare Analoge technisch zu nutzen. Der Einsatz von Mikroorganismen in biotechnologischen Produktionsprozessen ist heute nicht mehr nur in der klassischen Lebensmittelbiotechnologie zu finden, sondern auch in der Pharma- und Futtermittelherstellung, sowie in der Umwelttechnologie zur Sanierung belasteter Böden. Die Produktpalette ist vielfältig, und im Bereich der Aminosäureproduktion können z.B. L-Glutamat (Geschmacksverstärker), L-Lysin und L-Threonin (Futtermittelzusatz) und L-Phenylalanin genannt werden, das für die Herstellung des Zuckeraustauschstoffs Aspartam benötigt wird. Daneben werden Enzyme, Vitamine, Antibiotika, Aromastoffe, Impfstoffe, chirale Synthesestufen und viele weitere Produkte und Substanzklassen mit Hilfe der Biotechnologie überhaupt erst verfügbar gemacht, oder biotechnologische Verfahren stellen eine kostengünstigere Alternative zu den klassischen biologischen oder chemischen Verfahren dar.

Die Gentechnik hat hier entscheidenden Einfluss gehabt. Mit der Entwicklung ihrer Methoden war die Beeinflussung der Mikroorganismen auf molekularbiologischer Ebene möglich. So konnten die natürlichen Eigenschaften des mikrobiellen Stoffwechsels so verändert werden, dass die Produktionseigenschaften für ein gewünschtes Produkt gesteigert und optimiert werden konnten. Die Gentechnik erlaubte aber nicht nur die Verbesserung der im Mikroorganismus bereits vorhandenen natürlichen Produktionseigenschaften, vielmehr konnten durch die Einbringung neuer DNA Abschnitte auch neue Syntheseeigenschaften in den Mikroorganismus eingebracht werden. Heute wird z.B. Humaninsulin mit einem rekombinanten *E. coli* Stamm hergestellt, wobei der natürliche Stoffwechsel von *E. coli* dabei als Lieferant der für das Insulinmolekül benötigten Aminosäurebausteine fungiert. Die Konstruktion eines Humaninsulin produzierenden *E. coli* Stammes in den 70er Jahren ist sicherlich als Meilenstein zu bezeichnen, und 1982 kam dieses Humaninsulin als erstes

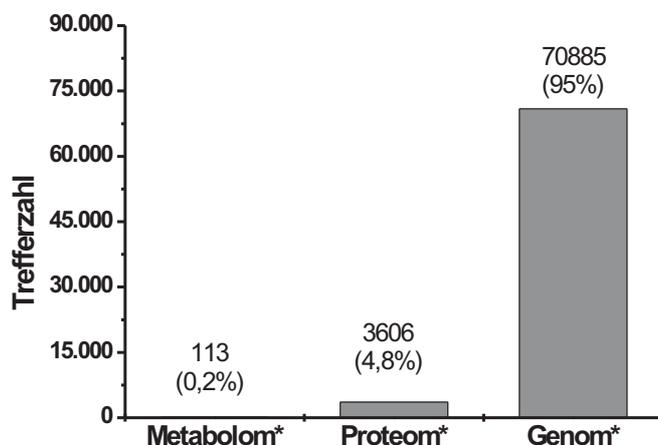


ABBILDUNG 1.1.: Trefferzahlen der ISI CURRENT CONTENTS connect® Datenbank

gentechnisches Medikament auf den Markt. In zunehmendem Maße vollzieht sich also der Wandel von der Nutzung des natürlichen Stoffwechsels der Mikroorganismen zur konstruierten Stoffwechselleistung in mitunter synthetischen Stoffwechselwegen [146].

Woher wird jedoch die Information für die Optimierung der Produktionseigenschaften erhalten? Die zunehmende Zahl der genetischen Fertigkeiten und Techniken, um einen Mikroorganismus zu verändern, schließt jedoch die Notwendigkeit ein, zuvor die Stelle im Stoffwechsel zu identifizieren, die für die unzureichende Leistungsfähigkeit verantwortlich ist. Die traditionelle Methode, dieses Problem zu lösen und eine Verbesserung der Produktionseigenschaften zu erzielen, folgt dem Prinzip der Mutation und Selektion. Dabei werden durch Mutation zufällige Veränderungen im Genotyp verursacht, und diese veränderten Organismen werden auf ihre Produktivität hin getestet. Die erfolgreichsten (produktivsten) Mutanten werden dann wieder zufällig mutiert und erneut getestet, um eine weitere Verbesserung zu erzielen. Obwohl mit solchen Verfahren durchaus erfolgreich gearbeitet werden kann, sind sie aufgrund der extrem hohen Zahl von zu testenden Mutanten meist nur noch automatisiert<sup>1</sup> durchführbar und wurden schon früh als "Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen" bezeichnet [36].

Mit einem verbesserten Verständnis für die Funktion und Regulation des Stoffwechsels versucht man auf der anderen Seite, Stoffwechselengpässe auf dem Weg zu dem gewünschten Produkt zu identifizieren und durch gezielte genetische Modifikation, z.B. durch Deletion oder Überexpression eines Gens oder Mutation eines Proteins, zu beseitigen. Der veränderte Stoffwechsel des Mikroorganismus wird danach auf seine hoffentlich verbesserten Pro-

---

<sup>1</sup>Dr. Scott Nichols, DuPont (USA) berichtete in seinem Vortrag vom 06.03.2003 am Institut für Biotechnologie 2 über eine vollautomatisierte Hochdurchsatz Screening Anlage mit massenspektrometrischer Detektion und einer Leistungsfähigkeit von 50.000 Mutanten pro Tag ( $\approx 34$  pro Minute)

---

duktionseigenschaften untersucht. Diese zielgerichtete Vorgehensweise der systematischen Optimierung eines Mikroorganismus wurde in Analogie zum "process engineering" als "metabolic engineering" [10, 159] bezeichnet. Dadurch können Stämme von Mikroorganismen mit verbesserten Produktionseigenschaften, aber eindeutig definiertem genetischem Hintergrund konstruiert werden. Gerade für die Aufstellung von Technologieplattformen oder die systematische Erschließung ganzer Produktbäume durch den Ausbau und die Erweiterung natürlicher Biosyntheserouten ist die eindeutige genetische Definition des Stammes sehr wichtig.

Die Information über die notwendigen spezifischen Modifikationen zur Optimierung der Produktbildungseigenschaften des Stoffwechsels können dabei entweder auf Untersuchungen des Genoms, des Proteoms oder des Metaboloms der Zelle basieren. In der Vergangenheit wurde die Information aus diesen drei möglichen Quellen aber offenbar nicht mit der gleichen Intensität herangezogen. In Abb. 1.1 sind die erhaltenen Trefferzahlen einer Abfrage der ISI CURRENT CONTENTS connect<sup>®</sup> Datenbank<sup>2</sup> [86] für die letzten drei Jahre abgebildet, die eine deutliche Gewichtung zeigen. Bislang dominiert offenbar die Forschung an Genom und Proteom, während das Metabolom nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Diese Entwicklung ist vermutlich durch die enormen Technologiesprünge im DNA- und Proteinsegment beschleunigt worden, obwohl die Frage diskutiert werden kann, warum die lebenswissenschaftliche Forschung über den Stoffwechsel, d.h. den Metabolismus, so deutlich von der Genom- und Proteom-Seite dominiert wird. Das Metabolom, als essentielle Schnittstelle im Metabolismus, spielt bisher nur eine Nebenrolle.

Die Metabolomanalyse gewinnt jedoch zunehmend an Interesse, was sich z.B. durch die Anwendung von Techniken des *metabolic fingerprinting* [63, 64] oder *metabolic footprinting* [3] im Bereich der Hochdurchsatz Klassifizierungen verschiedener Phänotypen durch massenspektrometrische Analysetechniken ausdrückt. Die großen technologischen Verbesserungen im Bereich der HPLC-MS Kopplungstechniken haben hier sicherlich ihren Teil zu dieser Entwicklung beigetragen und werden auch in der Zukunft ein wichtiges Element der Metabolomanalyse darstellen.

Eine Variante der Stoffwechselanalyse zur Messung der Stoffflüsse in der Zelle ist die stationäre Stoffflussanalyse. Dabei werden die Zellen in Gegenwart von <sup>13</sup>C-markierten Substraten kultiviert, und dabei die <sup>13</sup>C-Markierung über die Metaboliten in die Biomasse eingebaut. Nach der Zellernte und der Totalhydrolyse des Zellproteins können die <sup>13</sup>C-Atome aus dem Substrat als Markierungsmuster in den Aminosäuren wieder gefunden und mit NMR [43, 116, 161, 162] oder GC-MS [35, 40] gemessen werden. Aus dem Verteilungsmuster der Markierungen und der Stöchiometrie des Stoffwechsels können die Stoffflüsse zum Zeitpunkt der Probenahme berechnet werden. Die Anwendung dieser quasi-stationären Methode zeigt jedoch nur die gemittelte Stoffflussverteilung während der Markierungszeit und stellt somit eine gemittelte Momentaufnahme des Stoffwechsels dar.

Eine andere, dynamische Variante der Stoffwechselanalyse ist die Durchführung von Glukosepulsexperimenten, die auf die Identifizierung der intrazellulären *in-vivo* Enzymkinetik abzielt. Dazu wird eine Glukose limitierte Kultur durch Zugabe eines Glukosepulses ruckartig aus ihrem Stoffwechselgleichgewicht ausgelenkt. Die Kombination von Stoffwechsellinaktivie-

---

<sup>2</sup>ISI Web of KNOWLEDGE, <http://isi1.isiknowledge.com/portal.cgi>

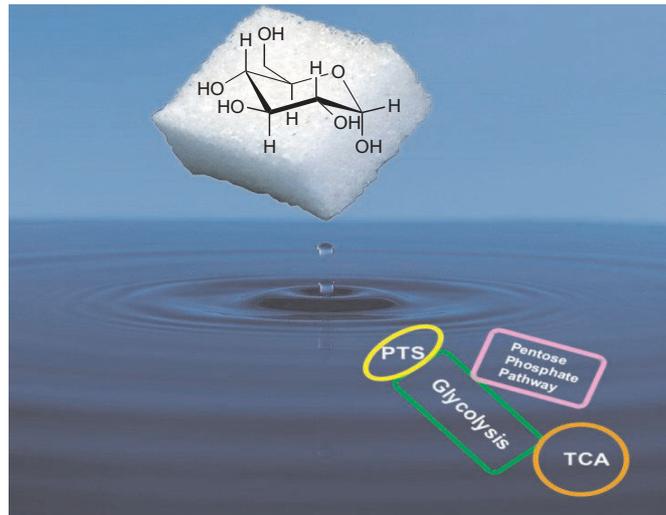


ABBILDUNG 1.2.: Fotomontage der Anregung des Stoffwechsels durch einen Glukosepuls

zung mit einer schnellen Probenahme von 4–5 Hz [144] kann die metabolische Antwort der Zellen aufzeichnen und die intrazellulären Metabolitkonzentrationen analysieren. Die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet wurden mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt [140, 167], Untersuchungen anderer Organismen wie *Zymomonas mobilis* [182, 183] und *E. coli* [33, 144] folgten daraufhin. In Abb. 1.2 ist das Prinzip eines solchen Glukosepuls-experiments dargestellt. Durch die spontane Glukosezugabe wird ein Impuls bei der Substrataufnahme initiiert, der sich im ganzen Stoffwechselnetzwerk ausbreitet, und die Messung der sich ändernden Metabolitkonzentrationen ist die Quelle der Information über die kinetischen Eigenschaften des Netzwerkes.

Die Daten aus diesen dynamischen Glukosepuls-experimenten können in einem einfachen phänomenologischen Ansatz für die Identifizierung potenzieller Engpässe auf dem Weg zum Zielprodukt genutzt werden. Weiterhin kann versucht werden, ausgehend von den dynamischen Daten, ein strukturiertes mathematisches Stoffwechselmodell der Zelle oder des untersuchten Stoffwechselwegs aufzustellen. Mit diesem Modell kann dann das Verhalten der Zelle unter verschiedenen Aspekten simuliert werden, und die Schritte mit der höchsten Limitierung können identifiziert werden. Mit der Identifizierung dieser Stellen liegen dann konkrete Ansatzpunkte für eine Verbesserung vor, z.B. der Erhöhung der Biosyntheseleistung für das gewünschte Produkt. Nach Einführung der Veränderung können die Auswirkungen im Stoffwechsel durch ein neues Glukosepuls-experiment überprüft werden und weitere Verbesserungen erwogen werden.

Im Hinblick auf die Entwicklung einer *in-silico* Zelle, also einer durch den Computer vollständig kalkulierbaren Zelle fordert H.V. Westerhoff [180], Zitat: „*Metabolic engineering needs to enter the living cell*“. Die Anwendung der Glukosepuls-Technik mit schneller Probenahme, zusammen mit der quantitativen intrazellulären Metabolitanalyse (*metabolic profiling* [64]), bietet eben eine solche Möglichkeit, den Stoffwechsel in einer lebenden Zelle zu beobachten und zu studieren.

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

Experimente unter Verwendung der Glukosepulstechnik wurden bisher immer nur zur Beobachtung des Zentralstoffwechsels in *Saccharomyces cerevisiae* [28, 101, 117, 128, 167, 168, 172, 174], *Zymomonas mobilis* [182, 183] und *E. coli* [22, 33, 142, 144] eingesetzt, d.h. für die Glykolyse, den Zitratzyklus und den Pentose-Phosphat-Weg. Die Untersuchungen blieben also lediglich auf den katabolen Teil des Stoffwechsels beschränkt, und der anabole Teil wurde nicht berücksichtigt. Das ist insofern überraschend, da besonders die anabolen Stoffwechselteile zu den industriell interessanten Produkten wie z.B. Aminosäuren oder Vitaminen führen und daher stark im Fokus des *metabolic engineering* stehen. Zudem wurden die Untersuchungen bisher immer an den Wildtyp Stämmen durchgeführt und nicht mit den gentechnisch veränderten Produktionsstämmen, obwohl der Stoffwechsel in den Produktionsorganismen veränderte Eigenschaften besitzen wird.

**Daher soll das Ziel dieser Arbeit die Durchführung von Glukosepulsexperimenten mit gentechnisch veränderten *E. coli* L-Phenylalanin Produktionsstämmen sein, wobei die Pulsstimulation auch in der anabolen Aromatenbiosynthese, d.h. im Produktionsstoffwechselweg, durch intrazelluläre Metabolitmessung verfolgt werden soll.**

Die L-Phenylalaninbiosynthese ist genetisch und biochemisch sehr gut charakterisiert [80, 135, 177]. Die drei aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (L-Phe), L-Tyrosin (L-Tyr) und L-Tryptophan (L-Trp), drei wichtige Produkte der Aromatenbiosynthese, repräsentieren Verbindungen von großem industriellem Interesse [105]. Während L-Trp und L-Tyr im Jahr 1998 in Mengen von 500 bzw. 140 Tonnen produziert wurden [26], lag die L-Phe Produktion 1998 bei 11.000 Tonnen und das L-Phe Marktvolumen für 2004 wurde auf 850 Millionen US \$ geschätzt [68, 121].

Der Biosyntheseweg zum L-Phe ist ein weitgehend linearer Stoffwechselweg. Besonders dem ersten Abschnitt, dem sogenannten Shikimat-Weg, kommt hier besonderes Interesse zu, da er den Verknüpfungspunkt mit dem Zentralstoffwechsel darstellt. Aufgrund seiner Linearität, d.h. dem Fehlen weiterer Schnittpunkte mit anderen Stoffwechselrouten, wird ein potenzielles Pulssignal im Shikimat-Weg direkt von einem Metaboliten zum nächsten übertragen. Daher stellt die L-Phe Biosynthese ein bevorzugtes Ziel eines anabolen Stoffwechselwegs zur Identifizierung dieses Glukosepulssignals dar.

Die Ergebnisse sollen dabei auch zur Verbesserung der L-Phe Produktivität umgesetzt werden. Durch Kooperation mit Arbeiten zur fermentativen L-Phe Prozessentwicklung können einerseits Informationen über limitierende Schritte in der L-Phe Biosynthese zur

Verbesserung der L-Phe Produzenten genutzt werden. Gleichzeitig bietet sich durch die Kooperation der Zugang zu interessanten und prozesstechnisch relevanten *E. coli* L-Phe Produzenten für die Glukosepulsexperimente.

Die Erweiterung des Fokus der Glukosepulsexperimente von den katabolischen Reaktionen des Zentralstoffwechsels zu einer kombinierten Fragestellung zusammen mit einem anaboli-schen Produktionsstoffwechselweg (L-Phe Biosynthese) wirft neue Fragestellungen auf. Im Vergleich zu den bisher durchgeführten Experimenten unter Einsatz von *E. coli* Wildtyp [22, 33, 144] Stämmen sind hier im besonderen der analytische Zugang zu den Metaboliten, eine potenzielle Signalverdünnung des Glukosepulses im Stoffwechselnetzwerk und eine Veränderung des Fermentationsverfahrens für den Einsatz rekombinanter *E. coli* Stämme anzuführen.

**Analytischer Zugang :** In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene analytische Verfahren, wie z.B. GC-MS [79, 91, 194], NMR [43, 127, 166], HPLC-UV [113, 120], HPAE-PAD [16, 77, 88, 154], CE-MS [156] und enzymatische Messmethoden [14] zur Bestimmung intrazellulärer Metaboliten eingesetzt. Für die quantitative Bestimmung von Metaboliten des Zentralstoffwechsels, also der katabolen Reaktionen, wurden in der Vergangenheit vielfach die enzymatischen Messmethoden angewendet, obwohl auch bereits über sehr viel versprechende Methoden der Bestimmung mit Hilfe der LC-MS Technologie berichtet wurde [23, 39].

Sowohl die Metaboliten als auch die zugehörigen Enzyme des Zentralstoffwechsels sind kommerziell erhältlich. Für einen anabolen Stoffwechselweg, wie z.B. die Aromatenbiosynthese die Gegenstand dieser Untersuchungen ist, ist die Situation eine völlig andere. Weder die Metaboliten noch die Enzyme aus der Aromatenbiosynthese sind kommerziell verfügbar, und auch analytische Methoden für die intrazelluläre Messung sind nicht vorhanden. Obwohl die LC-MS Technologie einen relativ universellen Ansatz für die Entwicklung einer neuen Analytik bietet, wird ihr Einsatz durch das Fehlen der entsprechenden analytischen Standards verhindert. Bevor also mit der Entwicklung einer intrazellulären Analytik begonnen werden kann, müssen die Metaboliten der Aromatenbiosynthese überhaupt erst isoliert und als Standard zur Verfügung stehen. Diese arbeitsaufwendige Prozedur kann entweder über chemische Synthesen oder durch Produktion und Aufreinigung aus dem Fermentationsüberstand spezieller gentechnisch geblockter *E. coli* Mutanten erfolgen.

Aufgrund der Universalität der Detektionsmethode über die Masse der Metaboliten und einer vorgeschalteten Flüssigkeitschromatographie stellt die LC-MS Technologie den viel versprechendsten analytischen Messansatz dar [160]. Unter Verwendung dieser Technologie soll eine analytische Methode zur intrazellulären Messung der Metaboliten der Aromatenbiosynthese in *E. coli* erarbeitet werden.

**Signalverdünnung :** In Bezug auf die Detektion der dynamischen Antwort nach der Stimulation durch einen Glukosepuls profitieren die Metaboliten des Zentralstoffwechsels von ihrer relativen Nähe zum Aufgabepunkt des Signals. Für einen anabolen Stoffwechselweg ist diese Strecke signifikant länger, was zu einer Verdünnung bzw. Abschwächung der Signaldynamik führen kann, bevor das Signal überhaupt das beabsichtigte Ziel erreicht. Die Aromatenbio-

---

synthese hat hier möglicherweise einen entscheidenden Vorteil, da die beiden Vorläufermetaboliten Erythrose-4-phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) im Stoffwechsel nur 7 bzw. 8 Schritte entfernt von Glukose noch dicht am Startpunkt des Signals liegen. Besonders gilt das für PEP, das mit dem PTS-System als PEP verbrauchende Reaktion, unmittelbar an die Glukoseaufnahme gekoppelt ist.

**Fermentationsverfahren** : Die Glukosepulsexperimente wurden bisher immer in chemostatischen, d.h. kontinuierlichen Fermentationsverfahren durchgeführt, wobei meist 5 Verweilzeiten für die Gleichgewichtseinstellung festgelegt wurden. Solch eine Vorgehensweise ist mit einem genetisch instabilen L-Phe Produktionsstamm nicht möglich. Die Pulsexperimente sollen daher in einem Fed-Batch Verfahren durchgeführt werden, das noch etabliert werden muss und sich nach Möglichkeit am realen L-Phe Produktionsprozess orientieren sollte.

Die Zielsetzung der Arbeit kann daher in folgende Punkte gegliedert werden :

- Entwicklung und Etablierung einer quantitativen Analysenmethode für die Messung der Metaboliten der Aromatenbiosynthese im Fermentationsüberstand. Das Verfahren sollte nicht auf die Verwendung von Standards angewiesen sein, da diese zunächst nicht zur Verfügung stehen. Die Methode soll bei der Isolierung der Metaboliten und für die Charakterisierung der L-Phe Produzenten eingesetzt werden.
- Isolierung der kommerziell nicht verfügbaren Metaboliten der Aromatenbiosynthese als Referenzstandards für die Entwicklung der intrazellulären Analytik. Dazu können speziell geblockte *E. coli* Mutanten oder chemische Synthesen in Kombination mit einem geeigneten Verfahren zur Aufarbeitung verwendet werden.
- Charakterisierung der L-Phe Produzenten der Prozessentwicklung in Bezug auf das Produkt- und Nebenproduktspektrum. Diese Information dient der Weiterentwicklung der L-Phe Produzenten und liefert gleichzeitig erste wichtige Informationen über mögliche intrazellulär limitierende Schritte.
- Identifizierung weiterer bisher unbekannter Nebenprodukte in den Fermentationen mit L-Phe Produzenten, neben den Metaboliten der Aromatenbiosynthese.
- Entwicklung einer intrazellulären Analysentechnik für die Metaboliten der Aromatenbiosynthese, sobald die Standards dafür zur Verfügung stehen. Aufgrund der viel versprechenden Ansätze soll die LC-MS Technik als Methode der Wahl getestet werden.
- Testen der chemischen Stabilität der Metaboliten der Aromatenbiosynthese während der Zellextraktion.
- Untersuchung der Zellintegrität und der Durchlässigkeit der Zellen für Metaboliten beim Methanol-Quenching-Verfahren.
- Untersuchung ob das Glukosepulssignal ein geeigneter Signalgeber für die Stimulation des anabolen Produktstoffwechselwegs zum L-Phe ist, d.h. ob es den Fluss in den Stoffwechselweg ändern kann. Bei einem negativen Ergebnis sollen Alternativen überprüft werden.

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

---

- Entwicklung eines Fed-Batch Fermentationsverfahrens mit Glukosepuls zur Untersuchung der L-Phe Produzenten. Die experimentellen Bedingungen sollten sich dabei am realen L-Phe Fermentationsprozess orientieren.
- Durchführung eines Glukosepulsexperiments mit einem rekombinanten L-Phe Produzenten, und intrazelluläre Messung der Metabolitkonzentrationen im Zentralstoffwechsel und des L-Phe Biosynthesewegs.
- Identifizierung potenziell limitierender Schritte im Aromatenbiosyntheseweg anhand der intrazellulären Daten. Nach Überexpression des identifizierten Gens soll dann in einem neuen Pulsexperiment die Konsequenz dieser Überexpression intrazellulär untersucht werden.
- Analyse der gemessenen katabolen und vor allem der anabolen Stoffwechseldaten sowohl phänomenologisch als auch durch statistische Auswertung. Dabei soll auch der Einfluss der Versorgung des Aromatenbiosynthesewegs aus dem Zentralstoffwechsel mit den Vorläufermetaboliten PEP und E4P diskutiert werden.

# 3. Theoretische Grundlagen

## 3.1. Biologische Grundlagen

### 3.1.1. Charakterisierung des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*)

*Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zur Gattung der Prokaryonten und in die Familie der fakultativ anaeroben, gram-negativen, nicht sporulierenden *Enterobacteriaceae*<sup>1</sup>. Für diese physiologische Gruppe ist die gemischte Säuregärung (Ameisensäuregärung) charakteristisch, bei der unter anderem Formiat als Produkt gebildet wird. Erstmals wurde *E. coli* im Jahre 1885 von dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich (1857–1911) als *Bacterium coli commune* beschrieben [58]. In Abb. 3.1 ist die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* Zellen dargestellt.

Durch peritrich insertierte Geißeln sind diese Bakterien gut bewegliche gerade Stäbchen. Hinsichtlich ihrer Ernährung sind sie prototroph und lassen sich auf einfachen synthetischen Nährlösungen, die aus einer Kohlenstoffquelle, Mineral- und Ammonium-Salzen bestehen, leicht kultivieren. Die optimalen Bedingungen hinsichtlich der Temperatur und des pH-Wertes liegen um 37°C (mesophil) und zwischen 6,5 und 7,3 (neutrophil). Auf komplexen Medien, das heißt Nährlösungen, die einen oder mehrere nicht definierte Bestandteile wie Hefeextrakt oder Pepton enthalten, kann unter diesen Bedingungen die Generationszeit (Verdopplungszeit) bei 20 Minuten liegen. *E. coli* vermag sowohl durch Atmung (aerob) als auch durch Gärung (anaerob) Energie zu gewinnen [145].

Der Organismus ist sowohl molekularbiologisch als auch genetisch sehr gut untersucht. *E. coli* ist ein vielseitig eingesetzter Produzent für rekombinante Proteine und Feinchemikalien in der industriellen Produktion [134].

### 3.1.2. Substrataufnahmemechanismen

Um in die Zelle zu gelangen, müssen die Nährstoffe zunächst durch die äußeren Zellgrenzschichten hindurchtreten. Die Zellwand läßt kleine Moleküle nahezu ungehindert passieren, Makromoleküle mit Molekularmassen größer als  $\approx 600 \text{ g mol}^{-1}$  hält sie dagegen zurück [61, 145]. Eine entscheidende Schnittstelle für den Nährstofftransport in die Zelle ist die Cytoplasmamembran. Hier können **vier verschiedene Transportmechanismen** unterschieden werden.

Mittels der **einfachen Diffusion** können Stoffe unspezifisch eindringen, wobei die Transportgeschwindigkeit vom Molekulargewicht und der Lipophilie des Moleküls abhängt. Da die Cytoplasmamembran lipophil ist, setzt sie hydrophilen Stoffen einen größeren diffusiven Widerstand entgegen als lipophilen. Bei der **erleichterten Diffusion** ist, genauso wie bei der normalen Diffusion, die treibende Kraft ein Konzentrationsgradient. Der Transport wird aber durch eine substratspezifische Permease, die in der Membran lokalisiert ist, erleichtert. Solche katalysierten Diffusionsmechanismen finden sich z.B. bei der Glycerolaufnahme in *E. coli*

---

<sup>1</sup> *enteron* (griechisch) = Darm

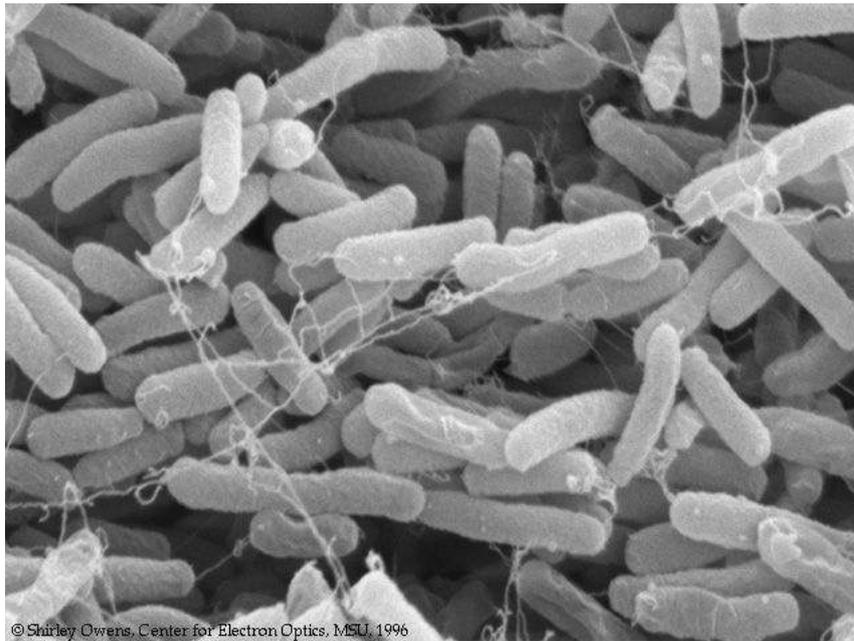


ABBILDUNG 3.1.: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von *E. coli* Zellen mit einer Bildbreite von 9,5  $\mu\text{m}$ [129].

oder bei der Glukoseaufnahme in *Zymomonas mobilis*, wo der Glukose Facilitator (Glf) den Transport durch die Cytoplasmamembran vermittelt. Für beide Diffusionsmechanismen gilt jedoch, dass die zellinterne Konzentration immer kleiner gleich der äußeren Konzentration bleibt. Beim **aktiven Transport** wird das zu transportierende Molekül durch ein spezifisches Transportprotein in der Membran unter Energieverbrauch in die Zelle geschleust. Das Molekül bleibt dabei chemisch unverändert und kann auch gegen den Konzentrationsgradienten in die Zelle transportiert werden. Die **Gruppentranslokation** ist dem aktiven Transport sehr ähnlich, nur wird das Substrat beim Transport modifiziert und chemisch verändert in die Zelle eingebracht. Das ist z.B. bei Glukose in *E. coli* der Fall, die durch ein spezifisches Phosphoenolpyruvat:Glukose Phosphotransferasesystem (PEP-PTS) als aktiviertes Zuckerphosphat in die Zelle gelangt. Wie beim aktiven Transport erfolgt auch die Gruppentranslokation unter Energieverbrauch und kann gegen einen Gradienten verlaufen [145]. Beim aktiven Transport, wie auch bei der Gruppentranslokation, kann daher die zellinterne Konzentration größer sein als die äußere Konzentration. *E. coli* verfügt über eine Vielzahl von PTS-Systemen, mit denen eine Reihe von Kohlenhydraten selektiv aufgenommen werden können.

#### 3.1.3. Glukose Aufnahme via Phosphotransferase-System (PTS)

Der Transport von Glukose wie auch von anderen Kohlenhydraten in die Zelle erfolgt über das Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängige Phosphotransferase System, bei dem es sich mechanistisch um eine Gruppentranslokation handelt. In *E. coli* sind bisher 16 Phosphotransferase Systeme bekannt [137]. Sie sind nicht nur für den Transport von Kohlenhydrat-Substraten verantwortlich, sondern übernehmen auch regulatorische Funk-

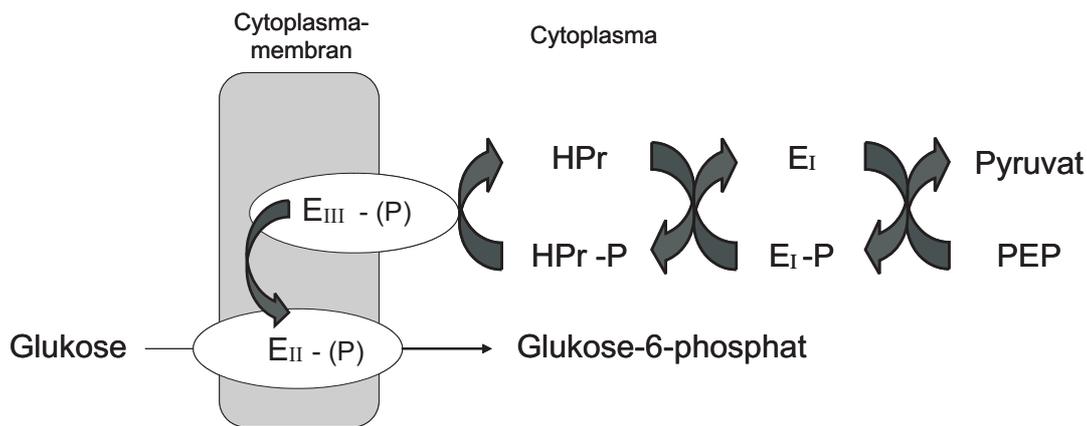


ABBILDUNG 3.2.: Funktionsprinzip des PEP-PTS Glukoseaufnahmesystems

tionen für deren Verstoffwechslung, da sich die Anforderungen an den Stoffwechsel stark verändern, je nachdem ob ein PTS-Substrat wie Glukose oder ein nicht PTS-Substrat wie Glycerol oder Acetat als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Während des Transports in die Zelle wird die Phosphat-Gruppe von PEP auf das Glukose-Molekül übertragen, und das so aktivierte Glukose-6-phosphat (G6P) Molekül steht für den Metabolismus zur Verfügung. In der Netto-Reaktion wird 1 mol PEP benötigt um 1 mol Glukose als G6P in die Zelle zu transportieren, wobei 1 mol Pyruvat aus PEP gebildet wird. Die Phosphat-Gruppe wird jedoch nicht direkt von PEP auf Glukose übertragen, sondern über eine gekoppelte enzymatische Kaskade (Abb. 3.2).

PEP phosphoryliert zunächst das Enzym  $E_I$ , das die Phosphat-Gruppe dann auf das HPr Protein überträgt. Von dem phosphorylierten HPr-P Protein wird die Phosphat-Gruppe dann auf das periphere Membran-Protein  $E_{III}$  transferiert, das es an das integrale Membran-Protein  $E_{II}$  weitergibt, von dem dann die Phosphorylierung der Glukose während des Transports durchführt wird. Während die nicht substratspezifischen PTS Komponenten  $E_I$  und HPr im Cytoplasma vorliegen, sind die substratselektiven Proteine  $E_{III}$  und  $E_{II}$  an bzw. in der Cytoplasmamembran lokalisiert [136, 145]. Die vorgeschaltete Phosphorylierung der PTS Komponenten durch PEP kann als energetische Aufladung des Transportsystems verstanden werden. In Gegenwart von Glukose oder eines anderen PTS Substrates wird die gleichzeitige Aufnahme und Verstoffwechslung anderer Kohlenstoffquellen unterdrückt (Katabolit-Repression), d.h. die Zelle bevorzugt PTS Substrate gegenüber anderen Kohlenstoffquellen.

Ist im Umfeld der *E. coli* Zelle aber keine Glukose (oder ein anderes PTS Substrat) vorhanden, wird das PTS sehr hoch aufgeladen, und die Erhöhung des Phosphorylierungsgrades löst eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase aus, wodurch cyclisches Adenosinmonophosphat (c-AMP) im Cytoplasma gebildet wird. c-AMP ist ein wichtiges Signalmolekül, und die Bildung des CRP-cAMP Komplexes (CRP = cAMP Rezeptor Protein) kann zur Aufhebung der Katabolit-Repression und damit zur Transkriptionsfreigabe bisher reprimierter Operons führen, die eine Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen ermöglichen [75].

In Anwesenheit von Glukose ist der Phosphorylierungsgrad des PTS und damit auch die c-AMP Konzentration geringer. Dadurch wird die Verstoffwechslung anderer Substrate reprimiert. Aus entwicklungshistorischer Sicht ist die evolutive Entstehung solcher Substrataufnahmesysteme sehr aufschlussreich. Die Tatsache, dass die Aufnahme unter Energieverbrauch erfolgt und damit unter Erniedrigung der energetischen Effizienz des Substrats, ist im Gesamtbild offenbar kein Nachteil. Der Vorteil, hochwertige Kohlenstoff- und Energiequellen in geringer Konzentration entgegen des Gradienten aufnehmen zu können, überkompensiert offenbar die Reduzierung der Energieeffizienz, so dass ein Vorteil für das Gesamtsystem entsteht. Das deutet darauf hin, dass im mikrobiellen Habitat von *E. coli* die Schnelligkeit der Substrataufnahme einen höheren Stellenwert hatte als die Energieeffizienz der Substrataufnahme. Das Fehlen von alternativen, nicht energieabhängigen Kohlenhydrat Transport-Systemen für z.B. Glukose unterstreicht dies [179].

#### 3.1.4. Stoffwechsel in *E. coli* mit Glukose als Substrat

Glukose stellt für *E. coli* ein bevorzugtes Substrat dar, das selektiv über das PTS-System aufgenommen wird (Kap. 3.1.3) und als G6P für den zentralen Stoffwechsel zur Verfügung gestellt wird. Die Metabolisierung von G6P kann über drei verschiedene Stoffwechselwege erfolgen, die letztlich zu Pyruvat führen. Für *E. coli* wird die Glykolyse als der wichtigste Abbauweg beschrieben. Daneben spielt der Pentose-Phosphat-Weg eine große Rolle, wogegen der Entner-Doudoroff Abbauweg in *E. coli* unbedeutend zu sein scheint [145].

Das Pyruvat kann dann in den Zitratzyklus eingeschleust und unter Abspaltung des Wasserstoffs zu  $\text{CO}_2$  oxidiert werden. Hierbei wird der Wasserstoff auf Koenzyme übertragen. In der Atmungskette kann dieser Wasserstoff dann zur Erzeugung von Adenosintriphsphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) durch die Elektronentransportphosphorylierung eingesetzt werden. *E. coli* verfügt aber nur über zwei Phosphorylierungsmöglichkeiten in seiner Atmungskette, d.h. in einer aeroben Kultur können aus dem von reduziertem Nicotinamid-adenindinukleotid (NADH) bereitgestellten Wasserstoff nur zwei Moleküle ATP aus ADP regeneriert werden ( $\text{P/O-Quotient} = 2$ ). Für andere Bakterienarten und Mitochondrien kann jedoch ein  $\text{P/O} = 3$  beobachtet werden [145]. Wie schon beim PTS System beobachtet, scheint dieser Mangel an energetischer Effizienz kein Entwicklungsnachteil für *E. coli* zu sein. Vielmehr deutet er wiederum darauf hin, dass der Stoffwechsel von *E. coli* in erster Linie nicht durch Energiemangel charakterisiert wird.

Hauptaufgabe der katabolen Abbauwege und des Intermediärstoffwechsels ist die Bereitstellung von Synthesestufen und Energie in Form von ATP für die anabolen Stoffwechselwege, mit denen dann die Bausteine für die Synthese neuer Biomasse gebildet werden. Damit der katabole Teil des Stoffwechsels unter stark variierenden Bedingungen und wechselndem Nährstoffangebot in der Lage ist, die Nachfrage des Anabolismus nach Synthesestufen und Energie zu decken, verfügt der Stoffwechsel nicht nur über einen einzigen katabolen Stoffwechselweg, sondern kann zwischen den verschiedenen Wegen flexibel umschalten.

Der Abzweig von Metabolit-Flüssen aus dem Zentralstoffwechsel in einen gentechnisch verstärkten Produktstoffwechselweg, z.B.  $2 \text{ PEP} + \text{Erythrose-4-phosphat (E4P)}$  für die L-Phenylalaninbiosynthese, stellt einen besonderen Anspruch an das Stoffwechselnetzwerk, das

Freiheitsgrade besitzen muss, um den Abfluss aus diesen beiden Metaboliten zu kompensieren, ohne dass das Netzwerk zusammenbricht. Im Zusammenspiel und der Abstimmung zwischen den Stoffwechselwegen fällt der Regulation daher hohe Bedeutung zu. Obwohl die generellen Mechanismen der Stoffwechselregulation bekannt zu sein scheinen, ist die vollständige und richtige Beschreibung der Netzwerkeigenschaften des Stoffwechsels von *E. coli* bisher noch nicht möglich gewesen [180].

### 3.1.5. Glykolyse

Dieser Abbauweg von Glukose zu Pyruvat, der auch Fruktose-1,6-bisphosphat-Weg oder Embden-Meyerhof-Parnas-Weg genannt wird, ist der am weitesten verbreitete Stoffwechselweg und wird von *E. coli* zu 70 % für den Hexose-Abbau benutzt [175] (Abb. 3.3). Ausgehend von Glukose liefert er Pyruvat, Energie und Reduktionsäquivalente in Form von ATP und NADH (Gleichung 3.1). Bis auf die 6-Phosphofruktokinase, die Glukosephosphorylierung und die Pyruvat Kinase werden die Reaktionen als völlig reversibel angenommen [145].



### 3.1.6. Pentose-Phosphat-Weg

Der Pentose-Phosphat-Weg ist an drei Stellen mit der Glykolyse verknüpft, und seine Funktion im Stoffwechsel ist die Bereitstellung von Pentosephosphaten als Vorstufen für Nukleotide und Nucleinsäuren sowie reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADPH), das als Reduktionsäquivalent für Biosyntheseprozesse vorgesehen ist (Abb. 3.3). Er kann zu einem Zyklus geschlossen werden, in dem G6P umgewandelt wird in Fruktose-6-phosphat (F6P), Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP), NADPH und CO<sub>2</sub> (Gleichung 3.2). Untersuchungen in *E. coli* zeigten, dass der Pentose-Phosphat Weg mit bis zu 28 % an der Verstoffwechslung von Glukose beteiligt ist [175].



Im ersten Teil wird G6P zu Ribulose-5-Phosphat umgewandelt, das dann in den folgenden Schritten zu den beiden anderen Pentose-Phosphaten reversibel isomerisiert. Durch die ebenfalls reversiblen Reaktionen von Transketolase (TK) und Transaldolase (TA) wird dann wieder die Verbindung zwischen den Pentosephosphaten und den glykolytischen Metaboliten F6P und GAP hergestellt. Im Hinblick auf die L-Phe Biosynthese kommt dem Pentose-Phosphat-Weg besondere Bedeutung zu, da er E4P bereitstellt, einen der benötigten Vorläufer-Metaboliten für den Aromatenbiosyntheseweg. Damit diese Bereitstellung nicht zwangsläufig an eine stöchiometrische NADPH-Bildung gekoppelt sein muss, bieten die TK- und TA-Reaktionen auch die Möglichkeit, in der umgekehrten Richtung E4P aus den glykolytischen Metaboliten F6P und GAP zu bilden.

### 3.1.7. Zitratzyklus

Im Zitratzyklus, auch TCA- oder Zitronensäure-Zyklus genannt, findet nicht nur der oxidative Endabbau der Kohlenstoffquelle zu CO<sub>2</sub> statt. Vielmehr stellt dieser Stoffwechselzyklus

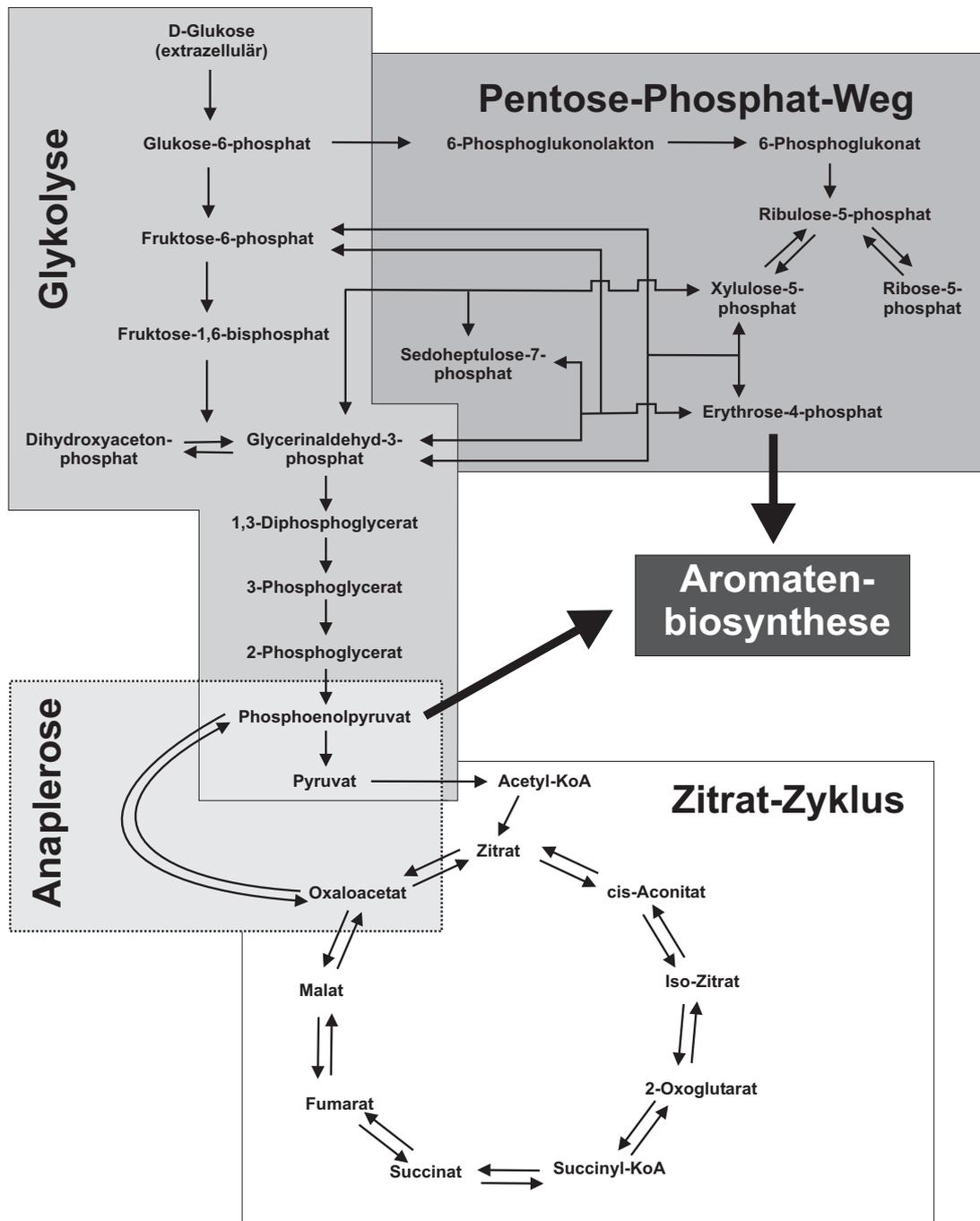
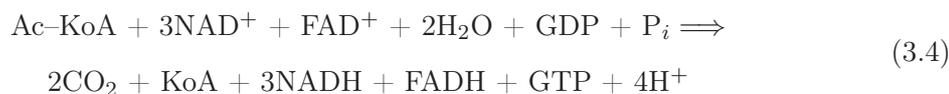


ABBILDUNG 3.3.: Glukosestoffwechsel über Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg und TCA-Zyklus in *E. coli* mit anaplerotischen Reaktionen

wichtige Metaboliten zur Verfügung, die als Biosynthesestufen für eine Vielzahl von anabolischen Reaktionen verwendet werden. Bei einmaligem Durchlaufen des Zyklus werden die beiden Kohlenstoffatome des von Acetyl-KoenzymA (Acetyl-KoA) in den Zyklus eingebrachten Acetyl-Restes zu  $\text{CO}_2$  oxidiert und dem Zyklus dabei entzogen, der Wasserstoff wird dabei auf Nucleotide übertragen, die als Energie- und Reduktionsäquivalente bereitstehen (Abb. 3.3). Das Acetyl-KoA wird dabei hauptsächlich durch die Pyruvat Dehydrogenase bereitgestellt (Gleichung 3.3). Die Gesamtreaktion für eine Rotation des Zitratzyklus ist in der Gleichung 3.4 zusammengefasst.



Damit dem Zitratzyklus auch Kohlenstoff in Form von Metaboliten bzw. Biosynthesestufen entnommen werden kann, existieren Auffüllungsreaktionen für den Zitratzyklus, die sogenannten anaplerotischen Reaktionen. Sie haben insbesondere die Funktion, Oxalacetat als Akzeptor für das Acetyl-KoA nachzubilden. Die wichtigste anaplerotische Reaktion in *E. coli* ist die nahezu irreversible PEP-Carboxylase-Reaktion, bei der PEP zu Oxalacetat carboxyliert wird. Dadurch werden dem Zitratzyklus 4 Kohlenstoffatome zugeführt, die dann als Biosynthesestufen wieder entnommen werden können. Besonders während der Wachstumsphase, in der viele Biosynthesestufen aus dem Zitratzyklus benötigt werden, spielen solche anaplerotischen Reaktionen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel. Ein Indiz dafür ist die Verlängerung der lag-Phase nach Überimpfen einer *E. coli* Kultur, wenn eine sehr hohe Begasungsrate eingestellt wird. Dabei wird  $\text{CO}_2$  aus der Flüssigphase gestrippt und geht dadurch dieser wichtigen anaplerotischen Reaktion verloren, und das Anwachsen der Kultur wird verzögert [31].

### 3.1.8. Biosynthese aromatischer Aminosäuren in *E. coli*

Die Biosynthese der drei aromatischen Aminosäuren (L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Tryptophan) erfolgt zunächst über eine gemeinsame Syntheseroute, die häufig als Shikimat-Weg bezeichnet wird, benannt nach Shikimat<sup>2</sup>, dem ersten identifizierten Intermediat im Aromatenbiosyntheseweg [41, 135]. Dieser gemeinsame Weg, der aus 7 Schritten besteht, führt zu Chorismat, das den Knotenpunkt in diesem Stoffwechselweg darstellt. Hier verzweigen sich die weiteren Biosyntheserouten zu den drei aromatischen Aminosäuren, aber auch zu anderen Verbindungsklassen (Abb. 3.4) [80, 96, 135].

Die Vorläufer-Metaboliten für die Eingangsreaktion in den Aromatenbiosyntheseweg sind PEP und E4P, die aus der Glykolyse bzw. dem Pentose-Phosphat-Weg bereitgestellt und durch die 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat Synthase (DAHP Synthase) zu 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) kondensiert werden. Zusammen mit der Enol-pyruvoyl-shikimat-3-phosphat Synthase (EPSP Synthase) werden 2 mol PEP und 1 mol E4P verbraucht, um 1 mol Chorismat zu bilden. Atkinson berechnete die

<sup>2</sup>Shikimat wurde 1885 von J.F. Eykman aus den Früchten von *Illicium religiosum* (japanisch: shiki-no-ki) isoliert, die bis zu 20 % Shikimat enthalten.

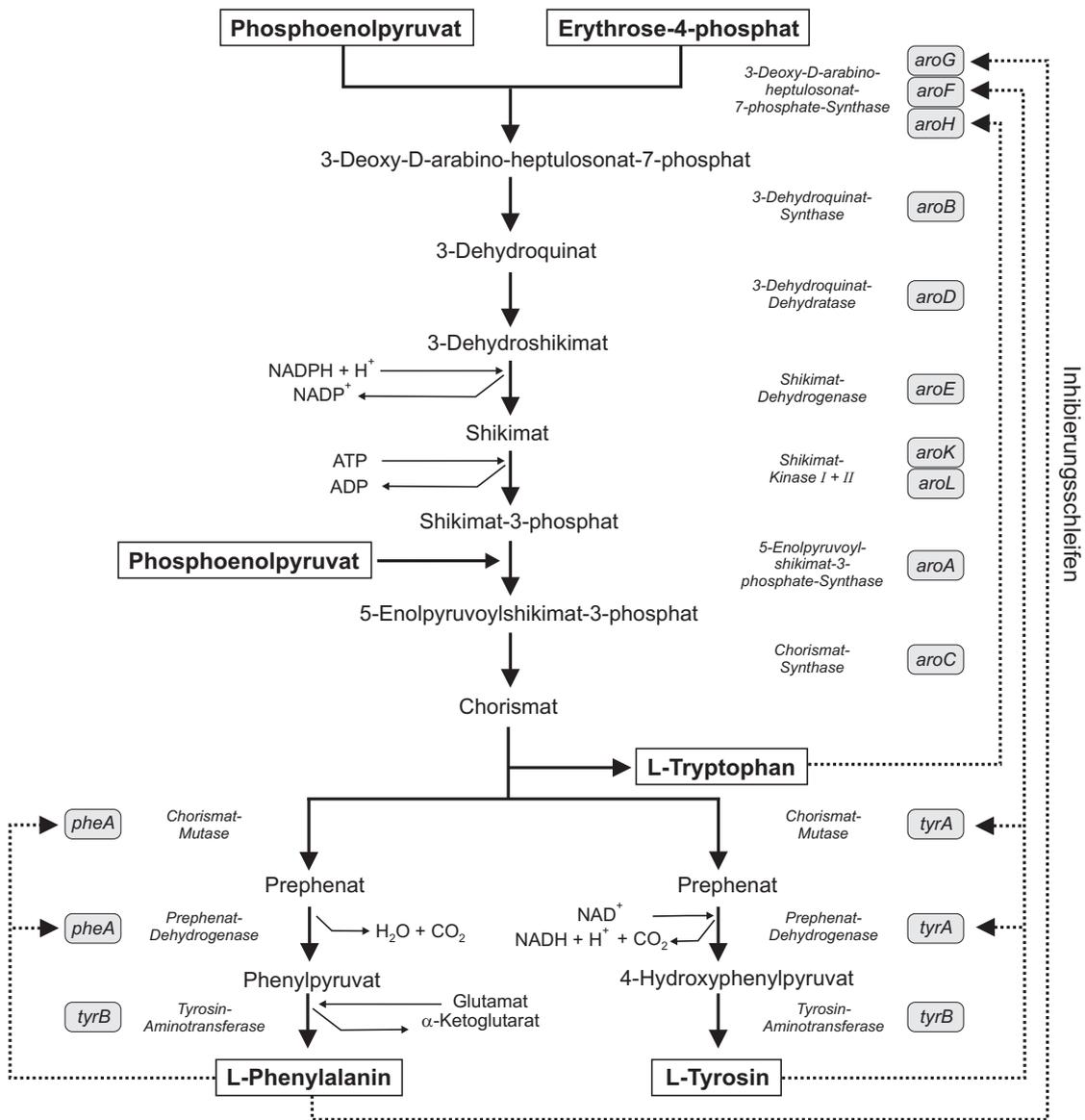


ABBILDUNG 3.4.: Schematische Darstellung der Reaktionen des Aromatenbiosynthesewegs mit den beteiligten Metaboliten, Enzymen und Kofaktoren

metabolischen Kosten für die Synthese der  $\alpha$ -Aminosäuren in ATP-Äquivalenten und fand, dass L-Phe (65 ATP), L-Tyr (62 ATP) und L-Trp (78 ATP) die *teuersten* sind im Vergleich zu billigeren wie z.B. L-Serin (18 ATP) oder L-Glutamat (30 ATP) [7].

Der Aromatenbiosyntheseweg ist daher ein auf mehreren Ebenen hoch reguliertes System, das die Bereitstellung von aromatischen Aminosäuren und anderen Metaboliten an den Bedarf und damit dem Wachstum der Zelle anpasst. Für die Regulation des Flusses in und durch den Aromatenbiosyntheseweg sind zwei zentrale Punkte entscheidend, nämlich die Eingangsreaktion (DAHP Synthase) und der Knotenpunkt Chorismat, an dem der Fluss auf die abzweigenden Syntheserouten verteilt wird. Für die DAHP Synthase Reaktion stehen *E. coli* 3 isofunktionelle Enzyme (AroF, AroG, AroH) zur Verfügung, deren Aktivität und Expression jeweils von der Verfügbarkeit einer der aromatischen Aminosäuren kontrolliert wird [135].

Das Gen *aroF* codiert für die L-Tyrosin sensitive, *aroG* für die L-Phenylalanin sensitive und *aroH* für die L-Tryptophan sensitive DAHP Synthase. Die Aktivität der Enzyme wird durch Feedback-Inhibierung kontrolliert, d.h. das AroF Enzym wird durch L-Tyrosin inhibiert, AroG und AroH entsprechend durch L-Phenylalanin bzw. L-Tryptophan. Auf der Ebene der Transkription erfolgt die Kontrolle ebenfalls über die Konzentration der drei aromatischen Aminosäuren.

Die weiteren Gene bis zum Chorismat (3-Dehydroquinat Synthase *aroB*, 3-Dehydroquinat Dehydratase *aroD*, Shikimat Dehydrogenase *aroE*, Shikimat Kinase I *aroK*, EPSP Synthase *aroA*, Chorismat Synthase *aroC*) sind alle konstitutiv exprimiert, und die Aktivitäten der codierten Enzyme unterliegen keiner Regulation [170]. Einzige Ausnahme davon ist die durch *aroL* codierte Shikimat Kinase II, deren Bildung bei Überschuss von L-Tyrosin oder L-Tryptophan auf 1/10 des Normalen reduziert wird [57]. Für die beiden isofunktionellen Shikimat Kinasen werden deutliche Aktivitätsunterschiede gefunden. Die konstitutive Shikimat Kinase I (AroK) hat für Shikimat einen  $K_m = 5$  mM, im Vergleich zur wesentlich aktiveren, jedoch kontrollierten Shikimat Kinase II (AroL)  $K_m = 200$   $\mu$ M [135]. Es wird vermutet, dass die Shikimat Kinase II unter normalen physiologischen Bedingungen vermutlich die Hauptlast der Synthesearbeit leistet. Welche Funktion zwei isofunktionelle Shikimat Kinasen in *E. coli* haben, konnte bisher nicht vollständig beantwortet werden. Es wird vermutet, dass Shikimat ein möglicher Schnittpunkt mit einem anderen Syntheseweg ist [177], oder dass Shikimat eine Bedeutung als Substrat für die Bildung von aromatischen Aminosäuren und anderen Aromaten hat. Ein Indiz dafür ist die Identifizierung eines Shikimat Transporters (Import), der durch *shiA* codiert wird [184].

Eine Auffälligkeit zeigt auch der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der EPSP Synthase (AroA) und der Chorismat Synthase (AroC). Bei Aktivitätsmessungen konnte für AroC nur 10–20 % der Aktivität im Vergleich zu AroA gemessen werden. Obwohl die Messung im Zellextrakt erfolgte und daher aufgrund der Matrix fehlerbehaftet sein könnte, ist es interessant, dass das letzte Enzym auf dem Weg zum Chorismat möglicherweise langsamer ist als das vorhergehende [73, 170].

Analog zur DAHP Synthase Reaktion unterliegen die Reaktionen, die Chorismat umsetzen, einer Feedback-Inhibierung durch die Endprodukte der Synthesewege. L-Phe inhibiert

die durch *pheA* codierte Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase und L-Tyr inhibiert die durch *tyrA* codierte Chorismat Mutase/Prephenat Dehydrogenase. Die Kontrolle der *pheA* bzw. *tyrA* Expressionsraten findet dabei über Attenuation statt. Aufgrund der strengen Regulation der Aromatenbiosynthese sollte der Fluss in den Stoffwechselweg genau an den Bedarf der Zelle angepasst sein, durch gentechnische Eingriffe kann die Produktbildung jedoch erhöht werden.

#### 3.1.9. Deregulation der Aromatenbiosynthese und Konstruktion eines *E. coli* L-Phenylalanin Produktionsstammes

Der Einsatz rekombinanter DNA-Technologien erlaubt die gezielte Veränderung von Mikroorganismen auf genetischer Ebene. Durch den Einsatz dieser gentechnischen Werkzeuge kann eine gerichtete Verbesserung der genetischen Eigenschaften zu mikrobiellen Produktionsstämmen mit höheren Ausbeuten und Raten führen [15, 55, 65, 111]. Die zielgerichtete Verbesserung der Eigenschaften der Zelle durch die Modifikation spezifischer biochemischer Reaktionen oder die Einführung von neuen unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologie wird dabei als *metabolic engineering* definiert [10]. Das Ziel ist die Konstruktion verbesserter Stämme mit höherer Ausbeute und Produktivität [157, 158].

Für die Konstruktion eines *E. coli* L-Phe Produktionsstammes müssen die im Abschnitt 3.1.8 beschriebenen Mechanismen der metabolischen Kontrolle des Stoffwechselwegs ausgeschaltet oder umgangen werden [18]. Der Fluss zum Produkt L-Phe darf nicht mehr von dem Bedarf der Zelle kontrolliert werden und soll möglichst hoch sein. Konkret bedeutet das, dass die Expressionsraten der Schlüsselenzyme nicht mehr der nativen regulativen Kontrolle unterliegen dürfen, sondern dass sie stark exprimiert werden, um in höherer Konzentration in der Zelle zu agieren. Das gelingt durch Klonierung dieser Gene in ein Plasmid, das in hoher Kopienzahl vorliegt (high copy plasmid) und unter der Kontrolle eines Fremdpromotors (*p<sub>tac</sub>*, modifizierter lac-Promotor) steht. Die effektive Induktion dieser plasmidischen Gene erfolgt durch den Induktor IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid), einem Laktose-Imitat, das von *E. coli* nicht verstoffwechselt wird und daher eine gleichbleibend starke Induktion erlaubt.

Auf der anderen Seite muss die Feedback-Inhibierung der Schlüsselenzyme für L-Phe aufgehoben oder umgangen werden. Das kann durch Enzyme erfolgen, die nicht der nativen Feedback-Inhibierung unterliegen. Solche Enzyme tragen in der Regel eine Mutation, die eine Resistenz gegenüber der Feedback-Inhibierung bewirken. Diese Enzyme werden als Feedback-resistent bezeichnet und tragen das Kürzel "fbr" als hochgestellten Index. Mit AroF<sup>fbr</sup> [89] existiert eine nicht L-Tyr sensitive Variante der DAHP Synthase (AroF) und PheA<sup>fbr</sup> ist eine nicht L-Phe sensitive Variante der Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase (PheA) [124]. Bei unphysiologisch hohen L-Phe Konzentrationen wird jedoch bei AroF<sup>fbr</sup> eine zusätzliche Inhibierung durch L-Phe beobachtet [8].

L-Tyr und L-Phe werden über eine fast identische Syntheseroute gebildet, daher wird im L-Phe Produzenten die Biosynthese für L-Tyr durch Deletion der von *tyrA* codierten Chorismat Mutase/Prephenat Dehydrogenase unterbrochen. Diese Auxotrophie hat weiterhin den Vorteil, dass sie die Kontrolle der Biomassebildung über die Dosierung der L-Tyr Menge erlaubt.

Durch die Überexpression der beiden Feedback-resistenten Enzyme (*aroF<sup>fbr</sup>*, *pheA<sup>fbr</sup>*) von einem Plasmid in dem L-Tyr auxotrophen Grundstamm gelingt es, einen *E. coli* Stamm zu generieren, dessen Aromatenbiosyntheseweg in Bezug auf L-Phe dereguliert ist und der L-Phe in einer Konzentration von  $> 30 \text{ g L}^{-1}$  im Überstand akkumulieren kann [70, 72]. Unter Einsatz einer L-Tyrosin Regelungsstrategie, bei der der Bioprozess unter L-Tyr limitierten Bedingungen verläuft, gelingt sogar der Einsatz des Wildtypenzym AroF<sup>wt</sup>, obwohl es L-Tyr sensitiv ist. Wegen der höheren Aktivität von AroF<sup>wt</sup> kann der Produkttiter von  $> 30 \text{ g L}^{-1}$  L-Phe sogar schneller erreicht werden [70, 71].

Die Aufhebung der nativen Flusskontrolle innerhalb des Aromatenbiosyntheseweg zum Produkt L-Phenylalanin ist aber nicht gleichbedeutend mit der Elimination der Flusskontrolle. Aufgrund des unphysiologisch hohen Flusses durch den Stoffwechselweg ist es möglich, dass ein oder mehrere enzymatische Schritte geschwindigkeitslimitierend werden. Diese Reaktion(en) kontrollieren nun den Fluss durch den Stoffwechselweg und bestimmen somit die Produkt-Ausbeute an L-Phe. Für viele Enzyme des Shikimat-Weges ist solch eine Limitierung bei Untersuchungen mit *E. coli* Produzenten beobachtet worden, und für die Beseitigung dieser Limitierung wurde die Überexpression der Gene empfohlen. Neben der 3-Dehydroquinat Synthase (*aroB*) [49, 110] und der Shikimat Kinase II (*aroL*) [49, 102] wurden die EPSP Synthase (*aroA*) und die Chorismat Synthase (*aroC*) als limitierende Schritte beschrieben [49].

## 3.2. Verfahrenstechnische Grundlagen

### 3.2.1. Bioprozessführung

Bioreaktoren werden bezüglich ihrer Betriebsführung in drei Verfahren unterschieden. Der Satz- oder Batch-Betrieb wird als geschlossenes, der kontinuierliche Betrieb als offenes und das Zulaufverfahren als teiloffenes System beschrieben. Die Betriebsführung hat dabei großen Einfluss auf die Zeitprofile der Substrat- und Produktkonzentrationen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Bioreaktoren können vereinfachend als ideale Rührkessel [125] betrachtet werden.

### 3.2.2. Satzverfahren (Batch)

Außer Luft, Antischaummittel und pH-Korrekturmittel wird dem Bioreaktor in dieser Betriebsart nichts hinzugefügt und außer geringen Probenvolumina auch nichts entzogen. Batch-Verfahren zeichnen sich daher meist durch einen geringen apparativen Aufwand aus. Die für die pH-Regelung und Antischaumzugabe in den Bioreaktor eingebrachten Volumina sowie die entnommenen Probevolumina werden vernachlässigt [56], und der Reaktor wird als geschlossenes System beschrieben. Im Bioreaktor wird das Nährmedium vorgelegt und mit der Vorkultur beimpft. Die Zellen beginnen zu wachsen und bilden Biomasse, bis eine Limitierung z.B. durch das Substrat, ein Spurenelement oder die Gelöstsauerstoff-Konzentration ( $pO_2$ ) einsetzt und das Wachstum begrenzt. Daneben kann auch die Inhibierung durch ein gebildetes toxisches Produkt zu einer Verringerung oder zum Stillstand des Zellwachstums führen. Batch-Verfahren können typischerweise durch die in Abb. 3.5 dargestellte Wachstumskurve charakterisiert werden [38].

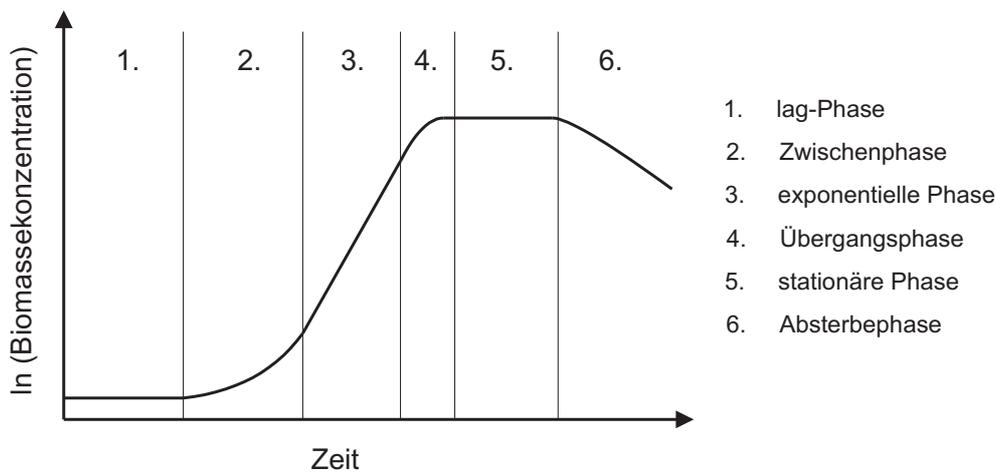


ABBILDUNG 3.5.: Typische Wachstumskurve des Batch-Verfahrens

**Lag-Phase** Wenn Zellen von einem Medium in ein anderes überführt werden, benötigen sie in aller Regel Zeit, um sich den neuen Kulturbedingungen anzupassen. In dieser sogenannten lag-Phase findet kein Zellwachstum statt. Wachstumsbedingungen, die sich bei der Überimpfung ändern können, sind z.B. pH-Wert des Mediums, Nährstoffangebot (Kohlenstoffquelle), Wegfall limitierender Faktoren (Wachstumsinhibitor, Sauerstofflimitierung), diffusiver Verlust essentieller Kofaktoren und die Temperatur. Je geringer die Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen sind, desto kürzer ist die lag-Phase. Ist das Impfgut schon in die stationäre Phase eingetreten, so wird eine längere Adaptionszeit zur Induktion von Transport- oder Stoffwechselwegen benötigt, als wenn eine noch exponentiell wachsende Kultur überimpft wird, bei welcher der Zellstoffwechsel stark aktiv ist.

**Zwischenphase** Nach der Adaption an die Kulturbedingungen beginnt das Zellwachstum. Da nicht alle Zellen der Population gleichzeitig mit dem Wachstum beginnen und nicht sofort mit der maximalen Geschwindigkeit wachsen, resultiert daraus die ansteigende Form der Funktion in Richtung der exponentiellen Wachstumsphase.

**Exponentielle Phase** Die Zellen sind an die Kulturbedingungen optimal angepasst und wachsen mit maximaler Geschwindigkeit. Das Zellwachstum wird in dieser Phase nur durch zellinterne Faktoren begrenzt und folgt einer Kinetik 1. Ordnung, die in Gleichung 3.5 dargestellt ist. Der Wert für  $\mu_{max}$  entspricht der Geradensteigung im Bereich der exponentiellen Phase bei einer halblogarithmischen Auftragung (Abb. 3.5).

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

- $\mu_{max}$  : maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [ $\text{h}^{-1}$ ]
- $x$  : Biomassekonzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]
- $t$  : Zeit [h]

**Übergangsphase** Da die Wachstumsgeschwindigkeit eine Funktion der Substratkonzentration ist, tritt schon vor dem vollständigen Verbrauch des Substrats eine Verlangsamung des Zellwachstums ein, das heißt, die Gerade aus dem Bereich des exponentiellen Wachstums flacht in Richtung  $\mu = 0$  ab (Abb. 3.5). Unter der Annahme, dass die Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleistet ist und nur eine Substanz das Wachstum limitiert, kann die sogenannte Monod-Gleichung [122] (Gleichung 3.6) als Hilfsmittel zur Beschreibung der Übergangsphase verwendet werden.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S_l}{S_l + K_s} \quad (3.6)$$

- $\mu_{max}$  : maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [ $\text{h}^{-1}$ ]
- $\mu$  : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [ $\text{h}^{-1}$ ]
- $K_s$  : Sättigungskonstante des limitierenden Substrats [ $\text{g L}^{-1}$ ]
- $S_l$  : Konzentration des limitierenden Substrats [ $\text{g L}^{-1}$ ]

Ist  $S_l \gg K_s$ , folgt aus der Monod-Gleichung, dass  $\mu$  gegen  $\mu_{max}$  strebt und das Wachstum nur durch zellinterne Faktoren limitiert und daher exponentiell ist. Für  $S_l = K_s$  folgt aus Gleichung 3.6, dass die Substratlimitierung die Wachstumsgeschwindigkeit halbiert und das Wachstum nun durch einen externen Faktor kontrolliert wird. Besonders für Substrate mit kleinen  $K_s$ -Werten, wie bei Glukose, ist die Übergangsphase sehr kurz ( $K_s = 4\text{--}7 \mu\text{M}$  für Pts-G, Glukose spezifisches PEP-PTS in *E. coli* [61, 126, 137]).

**Stationäre Phase** Sobald das Hauptsubstrat verbraucht ist oder ein anderer Faktor limitierend wirkt, setzt die stationäre Phase ein, bei der kein Wachstum der Population mehr stattfindet. Die Energie für den Erhaltungsstoffwechsel wird durch Verbrauch von intrazellulären Speicherstoffen erhalten. Lysierte Zellen dienen als Substrat für die verbleibenden Zellen, wodurch die Überlebensfähigkeit der Gesamtpopulation verbessert wird.

**Absterbephase** Die Energieressourcen der Biomasse sind aufgebraucht. Analog zur exponentiellen Wachstumsphase ist das Sterben der Zellen als Gerade in der halblogarithmischen Auftragung zu erkennen.

### 3.2.3. Zulaufverfahren (Fed-Batch)

Das Zulaufverfahren basiert auf dem Satz-Verfahren, jedoch werden bei diesem Verfahren ein oder mehrere Medienbestandteile während der Fermentation nachdosiert. Dadurch kann die Phase des Wachstums und/oder die der Produktbildung verlängert werden. Die Verlängerung des Wachstums führt zu einer höheren Biomassekonzentration im Reaktor, dadurch kann eine höhere Produktbildungsrate erwartet werden. Durch die Verlängerung der Phase der Produktbildung kann eine höhere Produktkonzentration am Ende des Prozesses erwartet werden. Das Zulaufverfahren bietet also die Möglichkeit, den Fermentationsprozess länger zu betreiben und damit die biosynthetische Gesamtleistung der Biomasse zu erhöhen bzw. so weit wie möglich auszuschöpfen.

#### 3.2.4. Zulaufverfahren mit wachstumsentkoppelter Produktionsphase

Die in diesem Verfahren eingesetzten Produktionsstämme sind aufgrund einer gentechnischen Veränderung auxotroph für einen bestimmten Nährstoff, z.B. eine Aminosäure. Nur wenn dieser Nährstoff im Prozess zugefüttert wird, können die Zellen wachsen. Dieser Nährstoff kann entweder vollständig im Fermentationsmedium vorgelegt oder im Verlauf der Fermentation zudosiert werden, um die Bildung der Biomasse zu ermöglichen. Ein ungehindertes Wachstum der Biomasse und eine damit verbundene zu große Biomassekonzentration kann zu verfahrenstechnischen Problemen in Bezug auf die Nährstoffversorgung und vor allem den unzureichenden Sauerstoffeintrag in den Bioreaktor führen. Daher wird das Wachstum im Fermentationsverlauf über die Zugabe des Nährstoffes kontrolliert, der die Auxotrophie komplementiert. Sobald er nicht mehr zur Verfügung steht, endet die Wachstumsphase der Biomasse. Da sie aber immer noch ein hohes biosynthetisches Potenzial bereitstellt, wird das gewünschte Produkt in dieser Phase immer noch gebildet, ohne noch Substrat für das Wachstum der Biomasse aufwenden zu müssen. Diese Phase wird als wachstumsentkoppelte Produktionsphase verstanden. Dieses Entkopplungsprinzip von Zellwachstum und Produktbildung ist auch Grundlage für die Prozessentwicklung eines *E. coli* basierten L-Phe Produktionsprozesses gewesen [70].

### 3.3. Analytische Grundlagen

#### 3.3.1. LC–MS Kopplung

Im Vergleich zur Gaschromatographie–Massenspektrometrie Kopplung (GC–MS) hat sich die Verbindung zwischen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, kurz LC) und der MS bei weitem nicht so schnell in der Analytik etabliert. Der Grund liegt im drastischen Unterschied der physikalischen Umgebungen, in denen die jeweiligen Verfahren arbeiten, d.h. in der Schwierigkeit, die Analyt–Moleküle aus einer Lösung bei Normaldruck ins Hochvakuum des MS als gasförmige Ionen zu transferieren [95, 164]. Die Problematik dieser Situation wurde treffend mit der ungleichen Liebe zwischen einem Fisch (LC) und einem Vogel (MS) charakterisiert [5]. Mit der Entwicklung von Atmosphärendruck–Ionisations–Verfahren (API) kann die MS heute als leistungsfähiger Detektor für die LC eingesetzt werden. Im Vergleich zu anderen klassischen LC–Detektoren, wie UV, RI oder elektrochemischen Detektoren eröffnen die MS–Detektoren eine weitere Dimension der Trennung, nämlich nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ )<sup>3</sup>. Der MS–Detektor ist in der Lage, Substanzen mit gleicher oder überlappender Retentionszeit zu unterscheiden, sofern sie nicht isobar sind, d.h. die gleiche Masse besitzen.

Die enormen Vorteile der MS–Detektion sind jedoch auch mit Nachteilen gekoppelt. Auf der Seite der LC ist man auf die Verwendung MS–kompatibler flüchtiger Puffersubstanzen wie Ammoniumacetat, Ammoniumformiat oder Essigsäure und kompatibelem Lösungsmittel wie Methanol, Acetonitril oder 2–Propanol angewiesen. Das bedeutet also den Ausschluss von phosphathaltigen Puffern und Ionenpaar–Reagenzien. Dadurch verringern sich die chromatographischen Freiheitsgrade für die LC Trennung, was jedoch in der Regel durch den Einsatz des MS–Detektors mehr als kompensiert wird. Die LC hat daher nicht mehr

---

<sup>3</sup>Im Sprachgebrauch der Massenspektrometrie wird der Begriff der "Masse" in der Regel synonym mit dem Verhältnis aus Masse zu Ladung  $m/z$  verwendet [150].

primär die Aufgabe, das analytische Trennproblem zu lösen, sondern dient eher als Probenvorbereitung für den MS-Detektor. Diese Aufgabe der LC ist nicht zu unterschätzen, da die Ionisierung der Analyten bei API-Verfahren sehr sensibel auf Verunreinigungen und Bestandteile der Probenmatrix reagiert. In ungünstigen Fällen kann das Signal des Analyten nahezu vollständig von der Matrix unterdrückt werden, dieses Ereignis wird als Ionensuppression bezeichnet und unterstreicht die Notwendigkeit einer vernünftigen chromatographischen Aufbereitung der Probe. Gelingt es mit der LC Methode nicht, die Analyten von störenden Teilen der Probenmatrix zu separieren, so wird keine zuverlässige und empfindliche MS-Detektion möglich sein.

In der Praxis haben sich zwei API-Verfahren für die LC-MS durchgesetzt, die Elektrosprayionisation (ESI) [29, 164] und die Atmosphärendruck Chemische Ionisierung (APCI) [164]. Obwohl die Grenzen zwischen beiden Verfahren fließend sind, gilt die Faustregel, dass ESI in der Regel für sehr polare Verbindungen gut geeignet ist, die bereits in Lösung leicht Ionen bilden oder bereits ionisch vorliegen (z.B. Proteine, Aminosäuren, Zuckerphosphate, Karbonsäuren) und APCI in der Regel bei den weniger ionischen schwach polaren Analyten eingesetzt wird. Bei den Messungen zu dieser Arbeit wurde die ESI in Kombination mit zwei unterschiedlichen MS-Detektor Varianten verwendet. Das erste MS besitzt eine Ionenfalle (Ionenfallen MS) als massenselektiven Filter, das zweite benutzt einen dreistufigen Quadrupol-Massenfilter (Triple Quadrupol MS) für die Messung.

### 3.3.2. Elektrosprayionisation (ESI)

Die ersten Experimente mit dieser Technik wurden von Chapman in den späten dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts unternommen [32]. Die Umsetzung in eine praktikable Ionisationsmethode basiert auf Arbeiten von Dole [50], und der Begriff Elektrosprayionisation wurde letztlich durch Fenn 1984 etabliert [60, 188], dem für seine Arbeiten an weichen Ionisationsmethoden zur massenspektrometrischen Analyse im Jahr 2002 der Nobelpreis für Chemie<sup>4</sup> verliehen wurde [59].

Beim Elektrospray-Verfahren wird eine Lösung des Analyten bei Atmosphärendruck aus einer Kapillare mit einem Durchmesser von ca. 0,1 mm in ein starkes elektrisches Feld versprüht (Abb. 3.6). Die zwischen der Kapillarspitze und einer Gegenelektrode angelegte Spannung von einigen Kilovolt sorgt für eine Zerstäubung der aus der Kapillare austretenden Lösung, wobei je nach Polarität positive oder negative Ionen gebildet werden. Zur Unterstützung der Vernebelung und zur Desolvatisierung der geladenen Tröpfchen wird ein coaxialer, trockener Stickstoffstrom eingesetzt. Zur vollständigen Desolvatation der ladungstragenden Flüssigkeitstropfen und zur effektiven Ionenbildung wird in den in dieser Arbeit verwendeten ESI-Quellen eine beheizte Transferkapillare eingesetzt.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Stickstoffstrom selbst zu beheizen und/oder ein dem Spray entgegengerichteten beheizten Stickstoffstrom einzusetzen. Je nach LC Flussrate und Lösungsmittelzusammensetzung müssen die ESI-Parameter optimiert werden, um ein stabiles und effizientes Elektrospray zu erhalten. Im Vergleich zu EI-Ionisationstechniken kann unter ESI-Bedingungen eine höhere Ionenbildungseffizienz von ca. 0.01 bis 0.1 % (vergl. EI ca.  $10^{-4}$ ) erzielt werden. Die gebildeten Ionen werden durch eine Öffnung im

<sup>4</sup>John B. Fenn – Nobel Vortrag "Electrospray Wings for Molecular Elephants", Dezember 2002, Aula Magna, Universität von Stockholm.

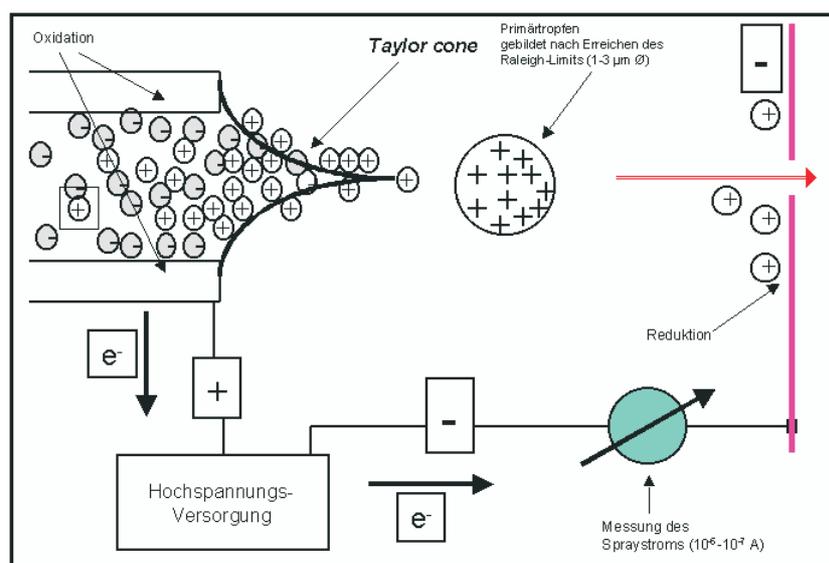


ABBILDUNG 3.6.: Prinzip der Ionenbildung im Elektrosprayverfahren (Bildquelle: <http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.htm>)

Zentrum der Gegenelektrode in den Analysatorteil des Massenspektrometers überführt. Auf dem Weg zum Massenanalysator finden die abschließenden Desolvatisierungsschritte statt, und der Druck fällt von Atmosphärendruck bis in den Bereich von  $10^{-5}$  Torr.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ESI-Quellen unterscheiden sich wesentlich bezüglich des Winkels, den die Kapillarspitze des Spray-Kopfes und die Öffnung im Zentrum der Gegenelektrode zueinander einnehmen. Das ältere Ionenfallen MS hat ein sogenanntes direktes Spray, d.h. der Winkel beträgt  $0^\circ$ . Bei stark mit Matrix belasteten Proben führt das zu einer zunehmenden und raschen Verschmutzung der ESI-Quelle. Das Triple Quadrupol MS ist neuerer Bauart und zeichnet sich durch einen Winkel von  $90^\circ$  in der ESI-Quelle aus, was entscheidende Vorteile aufweist. Diese orthogonale Spray-Anordnung bewirkt eine höhere Empfindlichkeit der ESI-Quelle bei größerer Toleranz gegenüber Verschmutzungen durch stark mit Matrix belasteten Proben.

Der Mechanismus der Ionenbildung bei der ESI ist immer noch Gegenstand aktueller Forschung, und die Entwicklung immer leistungsfähigerer ESI-Quellen in den letzten 5–10 Jahren trägt dem Rechnung. Der Mechanismus geht von der Bildung ladungstragender Tropfen aus, die durch Verdampfen des Eluenten kleiner werden und aus denen dann gasförmige Ionen gebildet werden (Abb. 3.6). Im Elutionsmittel gelöst gelangen die Analytmoleküle aus der ESI-Kapillare in das angelegte Hochspannungsfeld, wobei eine Ladungstrennung erfolgt. Bei positiver Ionisierung wird die Kapillarspitze als Anode geschaltet, d.h. negativ geladene Ionen wandern zur positiv geladenen Kapillarspitze und werden entladen bzw. oxidiert. Positive Ladungsträger dagegen reichern sich auf der Flüssigkeitsoberfläche an und werden zur Gegenelektrode, die als Kathode geschaltet ist, beschleunigt. Die Anreicherung der Ladungsträger an der Oberfläche führt zur Ausbildung des für ESI typischen Taylor-Konus [165].

Ab einer bestimmten Distanz zum Kapillarende erfolgt eine zunehmende Destabilisierung des Taylor-Konus, und es werden Primärtröpfchen mit positiver Überschussladung in einem stabilen Spray emittiert [92] und zur Gegenelektrode beschleunigt. Diese Tropfen verlieren durch Verdampfen Lösungsmittelmoleküle, und bei Erreichen des Rayleigh Limits (elektrostatische Abstoßung der Oberflächenladungen  $>$  Oberflächenspannung) zerfallen sie in viel kleinere Tropfen, sogenannte Mikrotropfen. Diese kleineren Tropfen bilden sich aus Ausstülpungen, die durch elastische Oberflächenvibrationen auf den größeren Tröpfchen entstehen. Sie tragen nur etwa 2 % der Masse des Muttertropfens, jedoch etwa 15 % der Ladung. Bei solchen Zyklen erhöht sich daher die Zahl der Ladungsträger pro Zahl gepaarter Ionen im Tropfen sehr stark, und nur diese Mikrotropfen tragen letztendlich zur Bildung von isolierten Ionen bei, während die größeren weniger stark geladenen Tropfen einen Großteil der gepaarten Ionen, d.h. der Salzfracht und der Matrixanteile tragen. Das erklärt auch, weshalb die ESI-Quelle mit orthogonaler Spray Geometrie robuster in Bezug auf Verschmutzungen ist, denn diese liegen vornehmlich in den größeren Tropfen vor, die wenig zur Bildung von Ionen beitragen und aufgrund des  $90^\circ$  Winkels Schwierigkeiten haben, in die Öffnung des Massenanalysators zu fliegen. Für die isolierten gasförmigen Ionen ist die  $90^\circ$  Anordnung dagegen kaum ein Hindernis.

Für die Bildung dieser isolierten Ionen werden zwei Modelle diskutiert. Das ältere Modell des geladenen Rückstandes (charged residue model, CRM) von Dole [50] geht von einem extrem kleinen Tropfen aus, der nur noch ein Analyt-Ion enthält, von dem die verbleibenden Moleküle des Eluenten verdampfen. Das Modell der Ionenemission (ion emission model, IEM) von Iribane und Thomson beschreibt die Bildung gasförmiger Ionen aus hochgeladenen Mikrotropfen [87]. Die damit verbundene Verringerung der Oberflächenladung stabilisiert den Mikrotropfen. Die Ionenemission aus den Mikrotropfen ist dabei als Konkurrenzreaktion zum weiteren Zerfall der Tropfen aufgrund des Rayleigh-Limits zu sehen. Die ESI ist eine sehr sanfte Variante der Ionisierung, bei der in der Regel die Molekülionen erhalten werden. Bei negativer Ionisierung beobachtet man  $[M-H]^-$  Anionen und bei positiver Ionisierung  $[M+X]^+$  Kationen. Gerade bei positiver Ionisierung ist die Interpretation der Spektren nicht immer einfach, da X nicht zwangsläufig ein Proton ist und es auch zur Anlagerung anderer Kationen wie  $X = Na, K$  oder  $NH_4$  kommt.

### 3.3.3. Ionenfallen MS

Der Ionenfallen-Massenfilter arbeitet nach dem Prinzip der Paul'schen Flasche<sup>5</sup>, in der geladene Teilchen (Ionen) für kurze Zeit gespeichert werden können (Abb. 3.7) [115]. Der von der ESI-Quelle erzeugte kontinuierliche Ionenstrom wird durch magnetische Linsensysteme auf die Öffnung in der Endkappe der Ionenfalle fokussiert. Durch Anlegen einer variablen Spannung an der Ringelektrode werden die einfliegenden Ionen im Potenzialminimum in der Mitte der Ionenfalle gesammelt, wobei sie ihre vorhandene kinetische Energie durch elastische Stöße mit Heliumatomen abgeben, die als Dämpfungsgas durch eine feine Kapillare in den Bereich der Ionenfalle einströmen. Nach der Sammelphase wird die Falle magnetisch verschlossen und die Ionen durch Frequenz-Modulation über die Endkappen ausgelesen. Dabei werden die Ionen entsprechend ihres  $m/z$  Verhältnisses (kleine  $m/z$

<sup>5</sup>Wolfgang Paul – Nobel Vortrag "Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles", Dezember 1990, Aula Magna, Universität von Stockholm.

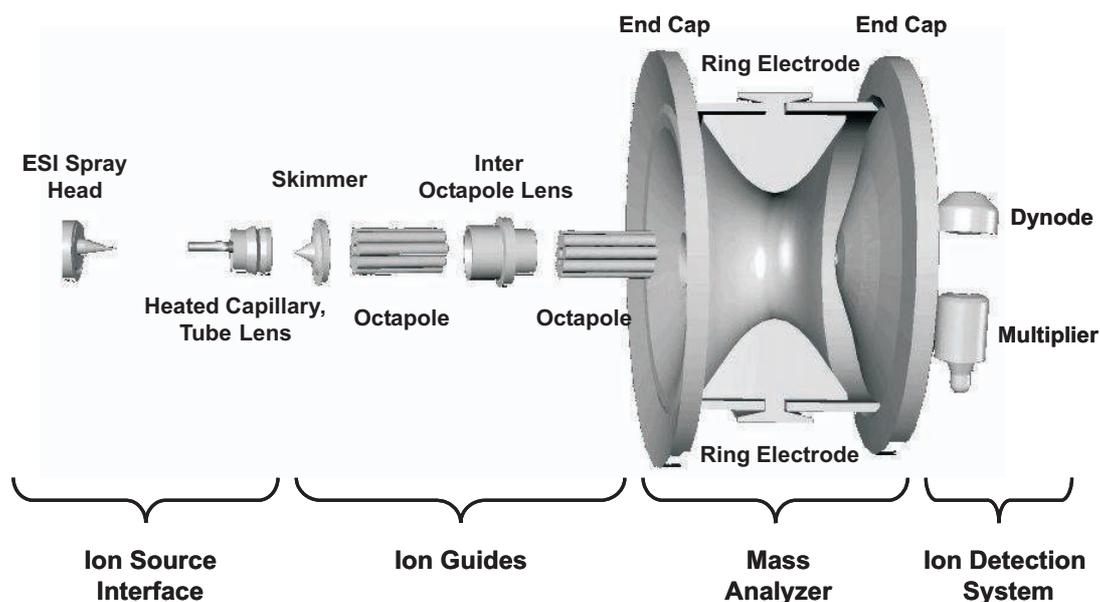


ABBILDUNG 3.7.: Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers mit Ionenfallentechnik (LCQ Classic, Thermo Finnigan)

zuerst) zu Schwingungen angeregt, deren Amplitude so groß wird, dass sie aus der Falle herausschwingen und vom Detektionssystem (Dynode + Multiplier) aufgezeichnet werden.

Die in der Falle gesammelten Ionen besitzen alle die gleiche Polarität und stoßen sich daher ab. Aus diesem Grund ist die Beladungskapazität der Falle durch ihre Geometrie begrenzt, denn gleichgeladene Ionen lassen sich nicht beliebig dicht im Zentrum der Falle konzentrieren. Sie bilden eine räumlich vergrößerte Ladungswolke, die zu verringerter Massenauflösung beim Auslesen der Falle führt. Je größer die Ladungswolke, umso geringer die erzielbare Auflösung.

Nach der Sammelphase muss die Ionenfalle aber nicht direkt ausgelesen werden. Ihr großer Vorteil ist die Möglichkeit der mehrstufigen selektiven Fragmentierung einer gewählten Masse. Bis auf die zu untersuchende Masse werden hierbei zunächst alle anderen Massen aus der Ionenfalle ausgeschlossen und die in der Falle verbleibende Masse energetisch angeregt. Durch die energetische Anregung kommt es zu reaktiven Stößen mit den Helium-Atomen in der Ionenfalle, wodurch Massenfragmente entstehen, die anschließend wieder aus der Ionenfalle ausgelesen werden können. Dadurch erhält man das MS/MS oder MS<sup>2</sup> Spektrum. Durch Wiederholung der Ionenausschluss- und Anregungssequenz kann das MS/MS Spektrum eines MS/MS Fragmentes erhalten werden, was als MS<sup>3</sup> beschrieben wird. Somit lässt sich der vollständige Fragmentierungsbaum einer Komponente aufschlüsseln, was für die Identifizierung unbekannter Massenpeaks sehr wichtig ist. Mit jedem MS/MS Schritt wird die Selektivität der Detektion erhöht. Gleichzeitig sinkt jedoch die Empfindlichkeit der Ionenfalle, da mit jedem MS/MS Schritt mehr als 90 % der Gesamt-Ionenzahl in der Falle verloren geht, außerdem sind aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Ionenfalle kleinere Massen weit weniger stabil als schwerere. Aus den gleichen Gründen erlauben es die mathematischen Stabilitätskriterien nicht, Fragmente aus MS/MS Experimenten zu

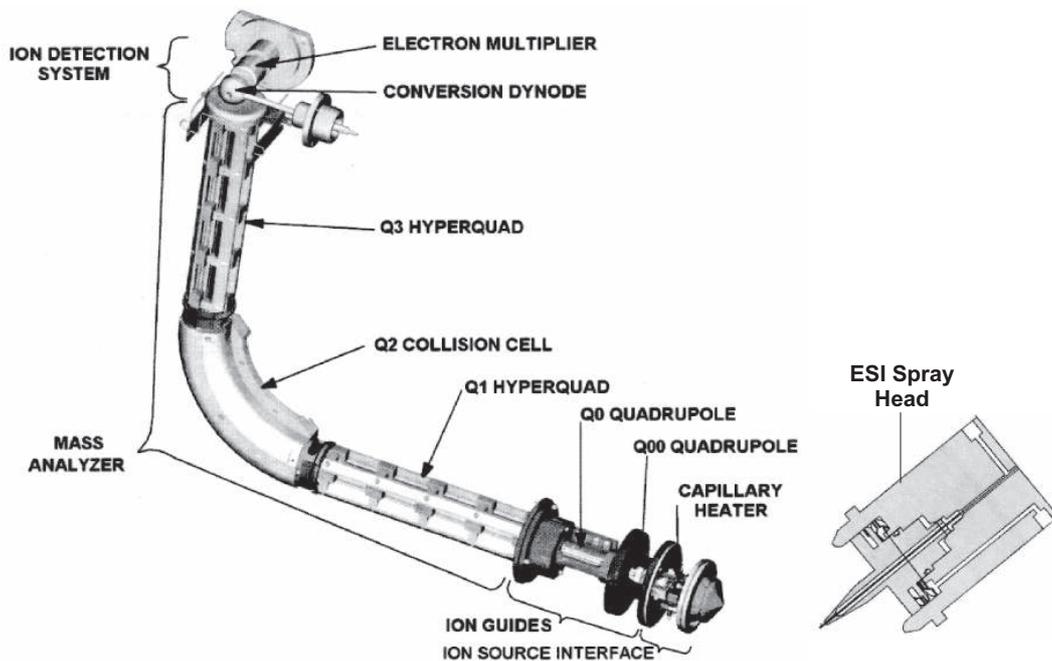


ABBILDUNG 3.8.: Schematischer Aufbau des verwendeten Massenspektrometers mit Triple Quadrupoltechnik (TSQ Quantum, Thermo Finnigan)

sammeln, deren Masse kleiner als  $1/3$  der Ausgangsmasse ist.

Die hohe Flexibilität der Ionenfalle macht sie aber zu einem MS-Detektor mit breitem Leistungsspektrum, vor allem für die Aufklärung unbekannter Strukturen. Aufgrund der physikalisch bedingten verringerten Stabilität kleinerer Massen in der Ionenfalle und ihrer sequentiellen Arbeitsweise im MS/MS Modus hat die Ionenfalle jedoch große Nachteile im Bereich der Empfindlichkeit und Quantifizierung, ganz besonders im Bereich kleiner Massen.

### 3.3.4. Triple Quadrupol MS

Bei diesem Detektor werden drei Quadrupol Systeme (Q1, Q2, Q3) zur Selektion verwendet (Abb. 3.8). Im Vergleich mit der Ionenfalle können mit dem Triple Quadrupol MS keine  $MS^3$ - oder  $MS^n$ -Experimente<sup>6</sup> durchgeführt werden, sondern er ist beschränkt auf die MS/MS Fähigkeit. Hier zeichnet sich das Triple Quadrupol MS aber durch entscheidende Vorteile aus, da es die hohe Selektivität der MS/MS-Fragmentierung mit hoher Empfindlichkeit verbindet.

Der Q2 ist nicht als Massenfilter geschaltet, sondern dient als Stoßzelle für die Fragmentierung, in die Argon (1,5 mTorr) als Kollisionsgas für die reaktiven Stöße eingelassen wird. Die Q1 und Q3 Quadrupole dienen zur Massenselektion, und entsprechend der elektromagnetischen Einstellung des Quadrupols sind nur Ionen mit einem bestimmten  $m/z$

<sup>6</sup>Die  $MS^3$ -Information ist bei einem Triple Quadrupol MS jedoch mit einem kleinen Trick zugänglich, indem die erste MS/MS Fragmentierung durch erhöhten Energieeintrag bei der Ionisierung erfolgt (z.B. Erhöhung der Temperatur oder der Beschleunigungsspannung an den magnetischen Linsen vor dem Q1)

in der Lage, den Quadrupol zu passieren. Der Q1 wird auf die Masse des Vorläufer-Ions (precursor ion) und der Q3 auf die Masse des Produkt-Ions (product ion) vor bzw. nach der Fragmentierung eingestellt. Dieser Operationsmodus wird als *selected reaction monitoring* (SRM) bezeichnet und zeichnet sich durch die höchste Empfindlichkeit aus.

Am Beispiel von Glukose-6-phosphat (G6P) soll dies erläutert werden. G6P bildet bei negativer ESI das Molekül-Ion mit  $m/z = 259,1$ . Bei energetischer Anregung zerfällt G6P in mehrere Fragmente, wobei die Abspaltung des Phosphat-Ions energetisch am günstigsten und daher bevorzugt ist, da die Phosphat-Gruppe sehr gut in der Lage ist, die negative Ladung zu stabilisieren. In MS/MS Experimenten von G6P und einigen anderen Zuckerphosphaten ist die Phosphat-Abspaltung die bevorzugte MS/MS Reaktion.

Die Ionen werden von der ESI-Quelle kontinuierlich erzeugt und durch magnetische Linsen-Systeme (u.a. Q00 und Q0) zum Q1 fokussiert, dessen Einstellung es nur den Ionen mit  $m/z = 259,1$  erlaubt, ihn zu passieren. Diese Ionen werden dann im Q2 fragmentiert, und durch die Einstellung des Q3 wiederum können nur Fragment-Ionen mit  $m/z = 97,1$  passieren. Am Detektor hinter dem Q3 können daher nur die Fragment-Ionen detektiert werden, die sowohl die Bedingung für den Q1 als auch für den Q3 erfüllen.

Im Vergleich zur Ionenfalle ist die Detektion genauso spezifisch, da aber das Triple Quadrupol MS pro Zeiteinheit viel länger aus einem MS/MS Experiment Daten sammelt, kann mit diesem Detektortyp die höchste Empfindlichkeit in einem großen dynamischen Bereich erzielt werden. In Bezug auf die Messung im Bereich kleiner Massen hat das Triple Quadrupol MS im Vergleich zur Ionenfalle keine physikalische Einschränkung, was die Stabilität der Massen im Detektor betrifft, und auch die MS/MS Fragmente mit einer Masse kleiner als  $1/3$  der Ausgangsmasse unterliegen keiner Beschränkung.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Biologisches System

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden mit dem Prokaryonten *E. coli* durchgeführt. Die verwendeten gentechnisch veränderten Stämme zur Produktion von Vorläufer-Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs und die L-Phe Produktionsstämme wurden am Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH und bei der DSM Biotech GmbH (Jülich) hergestellt. Die Stämme mit der AB-Nomenklatur und vierstelliger numerischer Codierung wurden freundlicherweise vom *E. coli* Genetic Stock Center der Yale University zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.1. Charakterisierung der verwendeten *E. coli* Stämme

Die verwendeten Stämme von *E. coli* lassen sich anhand der von ihnen produzierten Metaboliten in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe wird von den L-Phe Produktionsstämmen repräsentiert, die in Tab. 4.1 dargestellt sind. Diese Stämme basieren alle auf dem Grundstamm 4, der auch Ausgangspunkt für die bei der Entwicklung eines L-Phe Fermentations- und Aufarbeitungsprozesses verwendeten Stämme war [70, 139]. Der Stamm *E. coli* 4 wurde, ausgehend von Stamm *E. coli* LJ110 [192], durch chromosomale Deletion der Gene der Chorismat Mutase/Prephenat Dehydrogenase (*tyrA*), Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase (*pheA*) und der L-Tyrosin sensitiven 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat Synthase (*aroF*) erzeugt. Dadurch ist der Stamm 4 auxotroph in Bezug auf L-Tyr und L-Phe.

Die relevanten Gene für die L-Phe Produktion sind auf den Plasmiden enthalten, mit denen der Stamm 4 transformiert wurde. Das Plasmid basiert auf dem Expressionsvektor pJF119EH, der einen IPTG induzierbaren, glukoseresistenten, synthetischen tac-Promotor enthält und eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker trägt [69]. Das Plasmid pF20 enthält zwei gentechnisch veränderte Varianten der Gene *aroF* und *pheA*. Diese zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, dass die von ihnen codierten Enzyme nicht mehr ihrer nativen Feedback-sensitiven Regulation unterliegen. Sie werden daher als Feedback-resistente (*fbr*) Varianten bezeichnet. AroF<sup>fbr</sup> ist auch in Gegenwart von L-Tyr und PheA<sup>fbr</sup> in Gegenwart von L-Phe noch aktiv. Das Plasmid pF78 enthält zusätzlich noch das für die 3-Dehydroquinat Synthase codierende Gen *aroB*, und pF26 enthält zusätzlich das Gen der Shikimat Kinase II (*aroL*). Das Plasmid pF49 enthält das native Wildtyp *aroF*<sup>wt</sup> Gen in Kombination mit der Feedback-resistenten Variante der Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase (*pheA*<sup>fbr</sup>). Dadurch ist die L-Phe Biosynthese in dem Stamm 4pF49 dereguliert, sofern die L-Tyr Konzentration gering bleibt und die *aroF*<sup>wt</sup> Aktivität aufgrund der Feedback-Inhibierung nicht gedrosselt wird. Durch die Expression der Gene für die L-Phe Produktion wird natürlich auch die L-Phe Auxotrophie des Stammes *E. coli* 4 aufgehoben.

TABELLE 4.1.: Übersicht über die verwendeten *E. coli* Stämme für die L-Phenylalanin Produktion

<i>E. coli</i> Stammbezeichnung	Produkt	Genotyp
LJ110		<i>E. coli</i> K12 W3110
4		LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$
4 pF20	L-Phe	LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$ pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> — <i>pheA</i> <sup>fbr</sup> (amp <sup>R</sup> )
4 pF26	L-Phe	LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$ pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> — <i>pheA</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroL</i> (amp <sup>R</sup> )
4 pF49	L-Phe	LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$ pJF119EH <i>aroF</i> <sup>wt</sup> — <i>pheA</i> <sup>fbr</sup> (amp <sup>R</sup> )
4 pF69	L-Phe	LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$ pJF119EH <i>aroF</i> <sup>wt</sup> — <i>pheA</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroL</i> (amp <sup>R</sup> )
4 pF78	L-Phe	LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$ pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> — <i>pheA</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroB</i> (amp <sup>R</sup> )
4 pF79	L-Phe	LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$ pJF119EH <i>aroF</i> <sup>wt</sup> — <i>pheA</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroB</i> (amp <sup>R</sup> )
4 pF81	L-Phe	LJ110, $\Delta(pheA, tyrA, aroF)$ pJF119EH <i>aroF</i> <sup>wt</sup> — <i>pheA</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroB</i> — <i>aroL</i> (amp <sup>R</sup> )

TABELLE 4.2.: Übersicht über die verwendeten *E. coli* Stämme für die Metabolit Produktion

<i>E. coli</i> Stamm (Kurzbezeichnung)	Produkt	relevanter Genotyp
5 pF15 ( <i>E. coli</i> DAHP)	DAH(P)	LJ110 <i>aroB</i> 351 pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> (amp <sup>R</sup> )
AB1359 pF42 ( <i>E. coli</i> DHQ)	DHQ	$\lambda$ - <i>glnV</i> 44(AS) <i>tsx</i> -29 <i>aroD</i> 5 pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroB</i> (amp <sup>R</sup> )
AB2834 pF42 ( <i>E. coli</i> DHS)	DHS	$\lambda$ - <i>glnV</i> 42(AS) <i>tsx</i> -352 <i>malT</i> 352( $\lambda^R$ ) <i>aroE</i> 353 pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroB</i> (amp <sup>R</sup> )
AB2829 pF84 ( <i>E. coli</i> S3P)	S3P	$\lambda$ - <i>glnV</i> 42(AS) <i>aroA</i> 354 pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroB</i> — <i>aroL</i> (amp <sup>R</sup> )
AB2849 pF39 ( <i>E. coli</i> EPSP)	EPSP	$\lambda$ - <i>glnV</i> 42(AS) <i>tsx</i> -357 <i>aroC</i> 355 pJF119EH <i>aroF</i> <sup>fbr</sup> — <i>aroL</i> (amp <sup>R</sup> )

Die zweite Gruppe von *E. coli* Stämmen lässt sich als Gruppe der Produzenten von Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs zusammenfassen und ist in Tab. 4.2 dargestellt. Jeder dieser Stämme trägt eine chromosomale Punktmutation in unterschiedlichen Genen des Aromatenbiosynthesewegs. Diese Punktmutation bewirkt eine vollständige Inaktivierung der katalytischen Aktivität des mutierten Enzyms und stellt somit einen genetischen Block im Aromatenbiosyntheseweg dar. Die Inaktivierung eines enzymatischen Schrittes innerhalb des linearen Aromatenbiosynthesewegs führt zu einer Unterbrechung, der Metabolit direkt vor diesem Schritt kann nicht mehr enzymatisch umgesetzt werden. Daher sind alle diese Stämme nicht nur auxotroph für die drei aromatischen Aminosäuren, sondern auch für andere aromatische Metaboliten dieses Stoffwechselwegs, die dem Medium zugesetzt werden müssen, um Wachstum zu ermöglichen. Der Metabolit vor dem genetischen Block kann als Endprodukt des veränderten Biosynthesewegs bezeichnet werden. In Tab. 4.2 sind die *E. coli* Stämme daher mit den Endprodukten ihrer geblockten Aromatenbiosynthese dargestellt.

Auch in diesen Stämmen sind die für die Produktion relevanten Gene auf einem Plasmid codiert. Dabei handelt es sich ebenfalls um den pJF119EH Expressionsvektor, der bereits bei den L-Phe Produktionsstämmen erläutert wurde. Alle Plasmide enthalten die Feedback-resistente Variante des *aroF* Gens, *aroF<sup>fbr</sup>*, auch zusammen in unterschiedlichen Kombinationen mit Genen für die 3-Dehydroquinat Synthase (*aroB*) und die Shikimat Kinase II (*aroL*). Der Stamm *E. coli* 5 [99] ist ausgehend vom Grundstamm *E. coli* 4 konstruiert worden und enthält ein punktmutiertes katalytisch inaktives *aroB* Gen und wird als *aroB* negativer Stamm (*aroB<sup>-</sup>*) bezeichnet. Dieser Nomenklatur folgend handelt es sich bei den Stämmen AB1359 und AB2834 um *aroD* (3-Dehydroquinat Dehydratase) bzw. *aroE* (Shikimat Dehydrogenase) negative Mutanten (*aroD<sup>-</sup>* bzw. *aroE<sup>-</sup>*) und bei den Stämmen AB2829 und AB2849 um *aroA* (EPSP Synthase) bzw. *aroC* (Chorismat Synthase) negative Mutanten (*aroA<sup>-</sup>* bzw. *aroC<sup>-</sup>*).

#### 4.1.2. Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte als Glycerolkryokultur. Dazu wurde von einer ausgestrichenen und kultivierten Luria-Bertani (LB) Agar-Platte (Anhang A.1) zunächst eine 5 mL Röhrenkultur beimpft und über Nacht kultiviert. Aus der Röhrenkultur wurde dann 2%ig (1 mL) in 50 mL frisches LB-Medium in einen 500 mL Schüttelkolben überimpft. Die Kultur wurde bis zu einer  $OD_{650} \approx 3$  (ca. 5 h) kultiviert. Nach mikroskopischer Kontrolle auf Kontamination wurden 50 mL Glycerol zugesetzt, in Kryokulturröhrchen zu je 2 mL aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung eingefroren. Der Zusatz von Glycerol hat eine schützende Funktion während des Einfrier- und späteren Tauvorgangs, damit die Bakterienzellen nicht durch die Bildung von Eiskristallen geschädigt werden und die Kultur diesen Vorgang in möglichst vitalem Zustand überdauert.

#### 4.1.3. Vorkultivierung

Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte aus den Glycerolkryokulturen der Stammhaltung unter Verwendung von Vorkulturmedium. Der Bioreaktor wurde dabei 10%ig inokuliert, wobei die Vorkultur in möglichst stoffwechselaktivem Zustand in den Bioreaktor überführt werden sollte, um ein rasches Anwachsen zu ermöglichen. Für die Fermentationen im 20 L Bioreaktor wurden je 233 mL Vorkulturmedium Nr. I (Anhang A.3) in drei 1 L Schüttelkolben mit 0,5–1

mL Glycerolkryokultur beimpft und bis zu einer  $OD_{650} \approx 4$  kultiviert. Die Kultivierungszeiten betragen stammabhängig 15–20 h. Für die Fermentationen im 2,5 L Bioreaktor wurden 150 mL Vorkulturmedium Nr. II (Anhang A.4) in einem 1 L Schüttelkolben mit 2 mL einer Glycerolkryokultur beimpft und bis zu einer  $OD_{650} \approx 4$  kultiviert. Die Kultivierungszeiten betragen stammabhängig 12–15 h. Die Kultivierung der Schüttelkolben erfolgte in einem Schüttelkolbeninkubator (3033, GLF) bei 37 °C mit 160 U min<sup>-1</sup>.

### 4.2. Aufbau und Durchführung der Fermentationsexperimente im 2,5 L Bioreaktor

Die Fermentationen wurden in einem 2,5 L Rührkessel-Bioreaktor (Labfors, Infors AG) mit einem Anfangsvolumen von 1,5 L durchgeführt (Abb. 4.1). Der Bioreaktor besteht aus einem doppelt ummantelten nach oben offenen Glasgefäß, auf dem der Edelstahldeckel befestigt wird. Im Deckel sind Vorrichtungen für die Anschlüsse von Messsonden, Zulauf-Strecken und das Rührorgan integriert. Die Thermostatisierung erfolgt über den Wasserkreislauf im Doppelmantel. Das Rührorgan besteht aus zwei Scheibenrührern, die an der im Deckel verbauten Rührwelle befestigt sind. Die Rührwelle des Bioreaktors wird durch einen aufsteckbaren Elektromotor angetrieben. Die Anlagenskizze des 2,5 L Bioreaktors ist in Abb. 4.2 dargestellt.

Die Prozessparameter wurden durch eine Software (Medusa 1.2, IBT-2, Wolfgang Boos 1998) erfasst und gespeichert (Speicherfrequenz 0,1 Hz). Die Werte für Temperatur, Rührerdrehzahl, Zuluft, Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) und pH wurden direkt aus der Steuereinheit des Bioreaktors ausgelesen und an den Prozessrechner übertragen. Die Messung des pH-Wertes erfolgt über eine Gel-pH-Einstabmesskette (Mettler-Toledo), die Regelung wird von der Steuereinheit des Bioreaktors durch Ansteuerung einer integrierten Peristaltikpumpe mit 25%iger Ammoniak-Lösung übernommen. Die Temperaturmessung erfolgte über ein PT-100 Widerstandsthermometer, und die Messung des  $pO_2$  erfolgte mittels einer amperometrischen Elektrode (Mettler-Toledo). Die Sollwerte für Rührerdrehzahl und Zuluft wurden per Hand an der Steuereinheit des Bioreaktors vorgegeben, von der auch die Regelung dieser Parameter durchgeführt wurde. Der Abluftstrom aus dem Bioreaktor wurde gekühlt (M&C Cooler, ECP Analystechnik), und mit einem Analysegerät (Binos100 2M, Fisher-Rosemount) wurde der  $O_2$  Anteil über eine paramagnetische und der  $CO_2$  Anteil über eine Nah-Infrarot Messung erfasst. Die pH-Elektrode wurde mit zwei Pufferlösungen (pH = 7 und 4,01) kalibriert. Zusammen mit den anderen Messsonden wurde sie in entsprechende Stutzen im Edelstahldeckel des Bioreaktors eingebaut.

$$VVM[\text{min}^{-1}] = \frac{\text{Zuluftvolumenstrom} [\text{L min}^{-1}]}{\text{Fermentationsvolumen} [\text{L}]} \quad (4.1)$$

Vor jeder Fermentation wurden der Bioreaktor, seine Peripherie mit Zulaufstrecken und Vorratsbehältern, Medienbestandteile und Vorkulturmaterialien 30 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Über eine autoklavierte Sterilfilterstrecke wurde der Bioreaktor mit 1,35 L des Hauptkulturmediums Nr. II (Anhang A.6) befüllt, anschließend wurde die  $pO_2$ -Elektrode mit Stickstoff und Luft drucklos bei 1 VVM (Gleichung 4.1) und einer Rührerdrehzahl von 950 Umin<sup>-1</sup> für 0 % und 100 % kalibriert. Die Kalibration der  $CO_2$ -Abgasanalytik erfolgte mit reinem Stickstoff und einem Kalibriergas mit 5 %  $CO_2$  (Linde). Zu Beginn der Fermentation wurde die Rührerdrehzahl auf 300 Umin<sup>-1</sup> eingestellt,

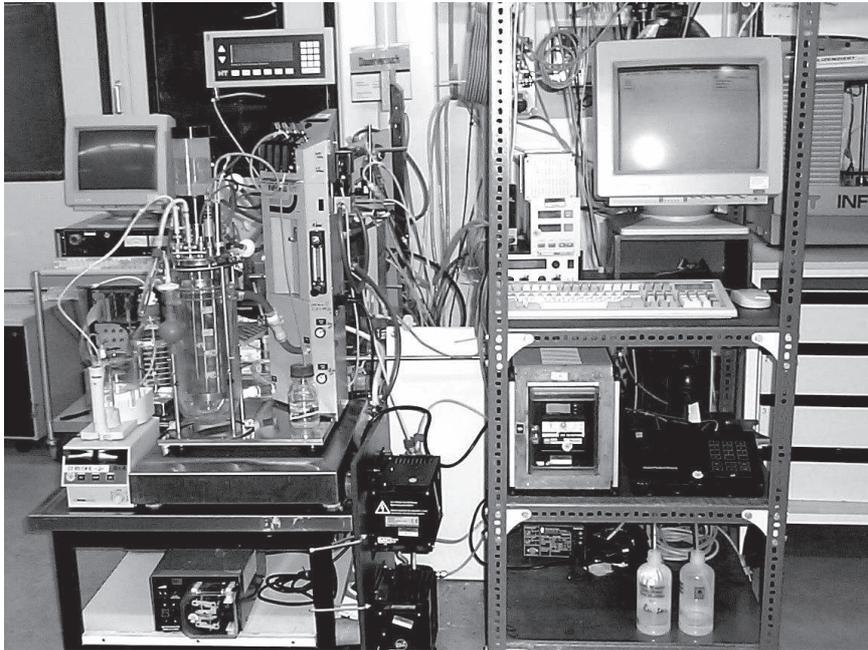


ABBILDUNG 4.1.: Foto des 2,5 L Labfors Bioreaktors mit Peripherie und Prozessrechner

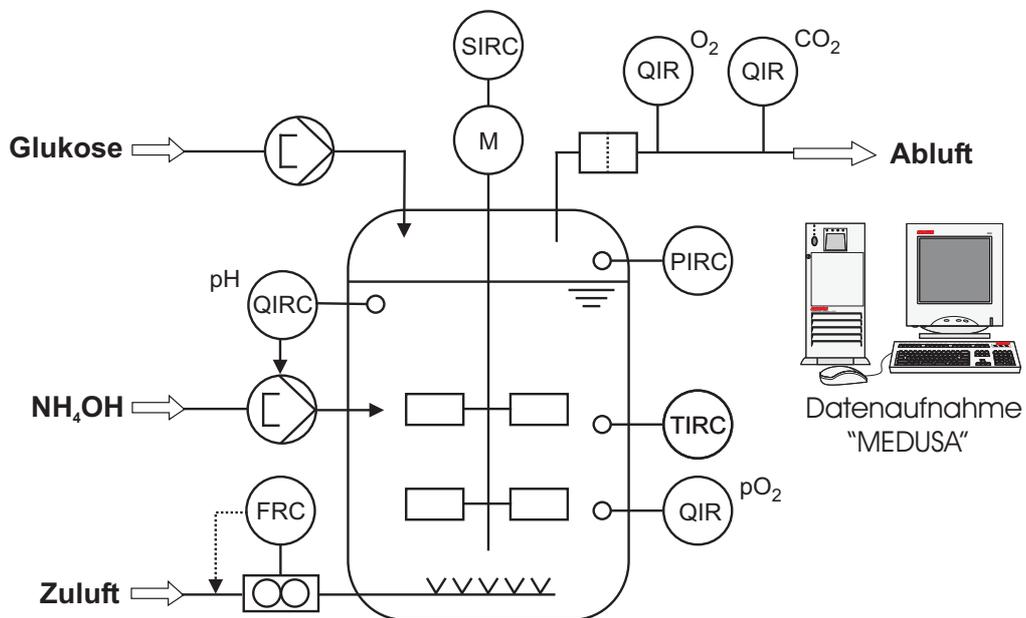


ABBILDUNG 4.2.: Anlagenskizze des 2,5 L Labfors Bioreaktors

die Datenaufnahme gestartet und die Zuluft auf  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  reduziert, um ein Ausstrippen von  $\text{CO}_2$  aus dem Fermentationsmedium und damit ein verzögertes Anwachsen der Biomasse zu vermeiden [31]. Über einen autoklavierbaren Kupplungsverschluss<sup>1</sup> wurde der Bioreaktor mit dem Volumen aus dem Vorkultur Schüttelkolben (150 mL) beimpft. Um den steigenden Sauerstoffbedarf der Bakterien im Verlauf der Fermentation zu decken, wurden sukzessiv zunächst die Rührerdrehzahl und dann auch die Zuluft erhöht, sobald der  $\text{pO}_2$  auf etwa 20–30 % gefallen war.

Im Fermentationsverlauf wurden in regelmäßigen Intervallen Proben gezogen, um den pH-Wert, die Biomassekonzentration und die Substratkonzentration zu bestimmen. Gleichzeitig wurde der zellfreie Überstand der Fermentationsproben für spätere Analytik bei  $-28 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Dosierung von Glukose im Zulaufverfahren wurde über eine gravimetrische Dosierstrecke (IP65/YFC01Z, Sartorius) mit angeschlossener peristaltischer Pumpe (101U, Watson–Marlow) realisiert, mit der variable Dosiermengen manuell eingestellt wurden. Für die Fermentationen mit Glukosepuls wurde für die Glukosedosierung auf eine Dosimat–Dosierstrecke (Dosimat665, Metrohm) zurückgegriffen, da sie eine gleichmäßigere Dosierung in der Glukose limitierten Phase erlaubt als die gravimetrische Dosierstrecke mit peristaltischer Pumpe. Zusätzlich wurde die Dosierungsöffnung auf 0,5 mm verkleinert und unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche im Bioreaktor positioniert, um beobachtete Schwingungen des  $\text{pO}_2$  aufgrund intermittierender Effekte bei der Dosierung in der limitierten Phase zu vermeiden. Dadurch wurde eine gleichmäßige Dosierung und ein konstantes  $\text{pO}_2$ –Signal erreicht [85].

Für die Fermentationen im 2,5 L Bioreaktor sind ausschließlich die in Tab. 4.2 dargestellten *E. coli* Stämme verwendet worden, die auxotroph für die aromatischen Aminosäuren und andere Produkte des Aromatenbiosynthesewegs sind. Um Wachstum zu ermöglichen, wurden die fehlenden Nährstoffe dem Medium zugesetzt. Es wurde das Fermentationsmedium Nr. II für alle Experimente im 2,5 L Bioreaktor verwendet. Während des Experimentes wurden in regelmäßigen Zeitabständen von 1 bis 2 h 5 mL Probe entnommen. Gemessen wurden pH–Wert, Glukosekonzentration,  $\text{OD}_{650}$  und die Biotrockenmasse (BTM). Jeweils 2 mL Zellsuspension wurden 10 min bei 13000 g zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus) und der Überstand für spätere Analytik bei  $-28 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die vorgelegten Mengen der drei aromatischen Aminosäuren leiten sich aus Daten von dreifach auxotrophen *E. coli* Mutanten aus der Literatur [109, 110] sowie aus Arbeiten des IBT–2 für die L–Phe Prozessentwicklung [98] ab und sind für eine Biomassekonzentration von  $\text{OD}_{650} = 60$  kalkuliert. Nach ihrem Verbrauch stoppte das Wachstum der Biomasse, während weiterhin Glukose zugefüttert wurde, um die wachstumsentkoppelte Produktionsphase einzuleiten (Kap. 3.2.4). Der Zeitpunkt der  $100 \mu\text{M}$  IPTG–Induktion war für alle Fermentationen gleich und erfolgte bei einer Biomassekonzentration von  $\text{OD}_{650} = 10$ –12 mittels steriler Injektion.

Bei den Experimenten mit Glukosepulsen wurde die Glukosedosierung nach Eintritt in die stationäre Phase auf ein zuvor berechnetes limitierendes Niveau reduziert und für 3–4 h konstant gelassen. Die Limitierung wurde durch die Zugabe des Glukosepulses beendet. Dazu wurde eine Lösung von 7 g Glukose in 20 mL Wasser steril in die Fermentationslösung

---

<sup>1</sup>Idee und Konstruktionsvorlage von Dipl.–Ing. A. Kreutzer, IBT–2

injiziert. Gleichzeitig wurde die Glukosedosierung auf ein zuvor experimentell bestimmtes nicht limitierendes Niveau erhöht und das Experiment für 3–4 h unter Glukosesättigung weitergeführt. Sowohl in der limitierten wie auch in der Glukose gesättigten Phase wurde die Probenfrequenz auf  $3\text{--}4\text{ h}^{-1}$  erhöht.

### 4.3. Aufbau und Durchführung der Fermentationsexperimente im 20 L Bioreaktor

#### 4.3.1. Bioreaktor und Fed–Batch Kultivierung

Die Experimente wurden in einem 20 L Rührkessel–Bioreaktor (ATGU 503, Infors AG) mit einem Arbeitsvolumen von 7 L durchgeführt (Abb. 4.3, 4.4). Im unteren Drittel des Edelstahlzylinders sowie im Deckel des Bioreaktors sind Vorrichtungen zur Aufnahme von Messsonden integriert. Das Rührwerk besteht aus zwei Scheibenrührern und wird durch eine Welle von oben angetrieben. Über die Steuereinheit können die Sollwerte verschiedener Prozessparameter (z.B. Rührerdrehzahl, Temperatur, Druck, Begasungsrate) eingestellt und geregelt werden. Die Prozessdaten (Ist–Werte für Temperatur, Druck, Rührerdrehzahl, Begasungsrate,  $\text{pO}_2$ , pH–Wert,  $\text{CO}_2$  im Abgas) wurden durch ein SMP–Interface (Siemens Mikroprozessor Peripherie) an den Prozessrechner übertragen. Dort erfolgte die Datenerfassung mit Hilfe der Software (Labview 5.1, National Instruments) mit einer Speicherfrequenz von 0,1 Hz.

Die Messung des pH–Wertes erfolgte über eine pH–Gel–Elektrode (Broadley James). Ein integrierter PID–Regler steuerte eine Laugenpumpe an und führte bei einem Abfall des pH–Wertes durch Säurebildung 25%ige Ammoniaklösung zu. Die Temperaturmessung im Bioreaktor erfolgte über ein PT–100 Widerstandsthermometer, der Reaktorinnendruck wurde über einen piezoelektronischen Druckaufnehmer bestimmt. Zur Messung des  $\text{pO}_2$  wurde eine amperometrische Elektrode (Ingold) verwendet. Der Abluftstrom aus dem Bioreaktor wurde gekühlt (M&C Cooler, ECP Analysetechnik), und mit einem Analysgerät (Binos100 2M, Fisher–Rosemount) wurde der  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  Gehalt gemessen. Die definierte Zufuhr von Medienbestandteilen wurde durch den Einsatz von Dosierstrecken realisiert. Diese erfassen den aktuellen Volumenstrom durch den Gewichtsverlust eines Medium–Vorratsgefäßes, welches sich auf einer Waage befindet. Durch die Regelung von Dosierpumpen ließen sich die gewünschten Volumenströme einstellen. Die Anlagenskizze des 20 L Bioreaktors ist in Abb. 4.4 dargestellt.

Vor Beginn jeder Kultivierung wurde die Peripherie des Bioreaktors sterilisiert, d.h. alle Dosierstrecken, das Probenahmeventil, Vorratsbehälter für Lauge, Vorkultur und das Fermentationsmedium. Die pH–Elektrode wurde kalibriert und in den vorgesehenen Stutzen am Bioreaktor neben der bereits montierten Sauerstoffelektrode eingebaut. Anschließend wurden alle Anstechvorrichtungen mit Septen verschlossen, der Bioreaktor mit 7 L bidestilliertem Wasser befüllt und bei  $121\text{ °C}$  für 20 min sterilisiert. Nach dem Autoklavieren wurde das Wasser abgelassen und 6,3 L des Hauptkulturmediums Nr. I (Anhang A.5) über einen Sterilfilter in den Bioreaktor gepumpt. Nachdem die Prozessparameter für die Fermentation (Temperatur =  $37\text{ °C}$ , Druck = 0,23 bar und pH–Wert = 6,5) im Bioreaktor eingestellt waren, konnte die Sauerstoffelektrode mit Stickstoff und Raumluft bei 1 VVM (Gleichung

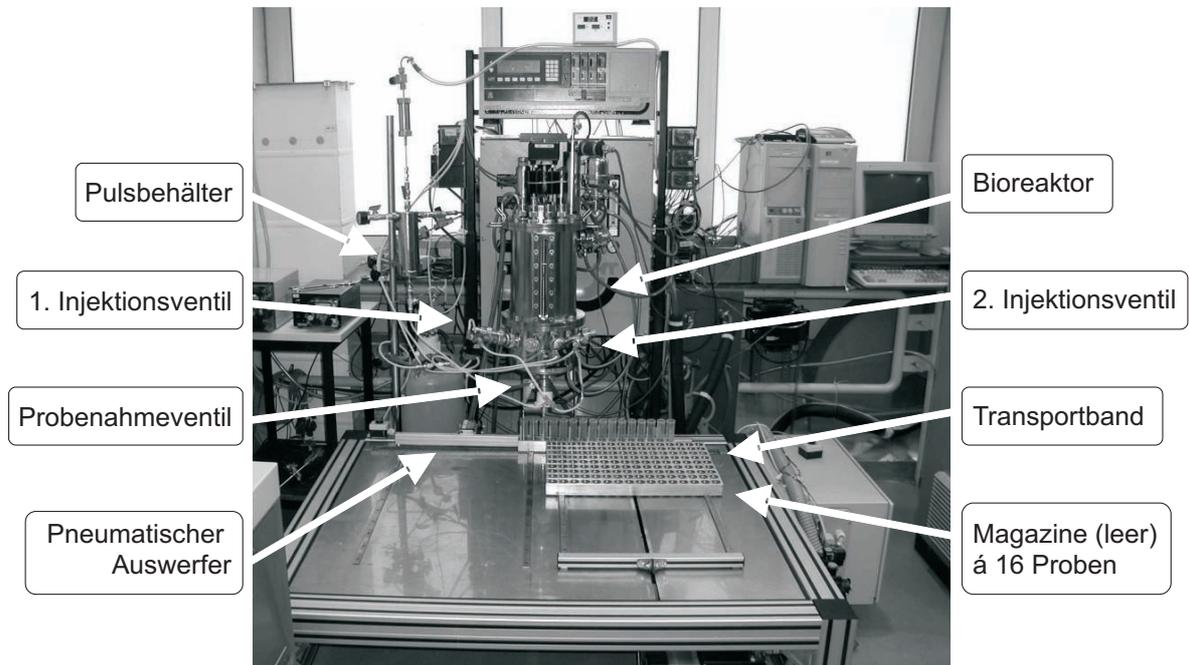


ABBILDUNG 4.3.: Foto des 20 L Infors Bioreaktors mit Prozessrechner (rechts), Pulsaufgabesystem (links) und schneller Probenahmeeinheit im Vordergrund

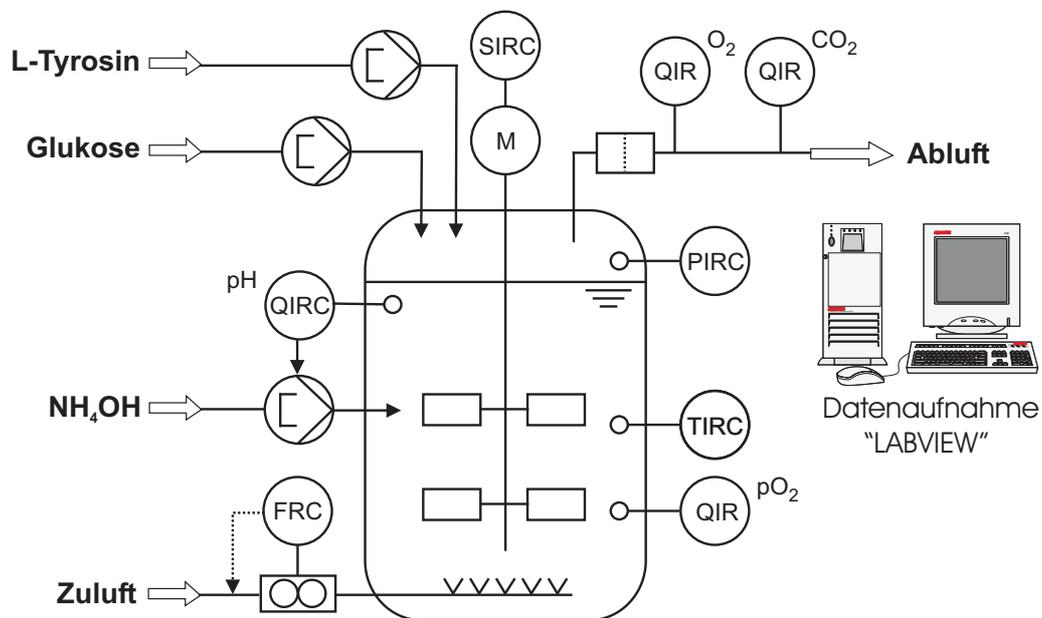


ABBILDUNG 4.4.: Anlagenskizze des 20 L Infors Bioreaktors

4.1) und einer Rührerdrehzahl von  $1000 \text{ Umin}^{-1}$  kalibriert werden. Die Kalibration der  $\text{CO}_2$ -Abgasanalytik erfolgte mit reinem Stickstoff und einem Kalibriergas mit 10 %  $\text{CO}_2$  (Linde).

Alle benötigten Dosierstrecken (Ammoniak-, Glukose- und L-Tyrosinzufuhr) wurden an den Bioreaktor steril angeschlossen. Zu Beginn der Fermentation wurde die Rührerdrehzahl auf  $300 \text{ Umin}^{-1}$  eingestellt und die Zuluft auf  $1 \text{ Lmin}^{-1}$  reduziert, um ein Ausstrippen von  $\text{CO}_2$  und damit ein verzögertes Anwachsen der Biomasse zu vermeiden [31]. Anschließend erfolgte das Beimpfen mit 0,7 L der Vorkultur über eine Impfstrecke. Die Datenaufnahme wurde gestartet, und die Batch-Phase der Kultivierung begann. Um den steigenden Sauerstoffbedarf der wachsenden Bakterienkultur zu decken, wurden schrittweise die Rührerdrehzahl und die Begasungsrate erhöht, sobald der  $\text{pO}_2$  auf etwa 30 % gefallen war. Während des Experimentes wurden in regelmäßigen Zeitabständen von 1 bis 2 h 10 mL Probe entnommen. Gemessen wurden pH-Wert, Glukosekonzentration,  $\text{OD}_{650}$  und die Biotrockenmasse (BTM). Jeweils 2 ml Zellsuspension wurden 10 min bei  $13000 \text{ g}$  zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus) und der Überstand für spätere Analytik bei  $-28 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

Bei einer  $\text{OD}_{650}$  von rund 10–12 wurden 7 mL 0,1 M IPTG-Lösung als Induktor zur Bakterienkultur zugegeben, um die Expression der Plasmidgene zu starten. Außerdem wurde die Glukosezufütterung mit einer  $500 \text{ gL}^{-1}$  Glukoselösung (Anhang A.7) über eine gravimetrische Dosierstrecke (IP65/YFC01Z, Sartorius) gestartet, um während der gesamten Wachstumsphase im Fermentationsmedium eine Glukosekonzentration von 2–5  $\text{gL}^{-1}$  sicherzustellen. Außerdem wurde mit der L-Tyrosinzufuhr ( $18,75 \text{ gL}^{-1}$ , Anhang A.7) über eine Dosimat-Dosierstrecke (Dosimat665, Metrohm) begonnen. Bei den Experimenten mit L-Tyr Limitierung betrug der Anfangswert der Tyrosindosierung  $1 \text{ mLmin}^{-1}$  und wurde während der Wachstumsphase schrittweise auf  $3 \text{ mLmin}^{-1}$  erhöht, insgesamt wurden 149 mL L-Tyr Lösung zudosiert. Danach wurde die Dosierung auf  $3 \text{ mLh}^{-1}$  reduziert, was einen leichten Erhaltungsstoffwechsel, aber kein Wachstum mehr ermöglichte. Bei den Experimenten mit L-Tyr Überschuss wurde die L-Tyr Dosierung ebenfalls mit  $1 \text{ mLmin}^{-1}$  gestartet und während der Wachstumsphase schrittweise auf  $3 \text{ mLmin}^{-1}$  erhöht, so dass der Kultur bis zur Einleitung der Glukoselimitierungsphase 300 mL L-Tyrosinlösung zugegeben wurden. Um eine potenzielle Schädigung bzw. Aktivitätseinbußen von  $\text{AroF}^{wt}$  durch unphysiologisch hohe L-Tyr Konzentrationen zu vermeiden, wurde die L-Tyr Menge im Prozess so zugefüttert, dass die Konzentration nie über das Anfangsniveau hinausging.

Nach Erreichen einer  $\text{OD}_{650}$  von etwa 50 (entspricht einer BTM von etwa  $16\text{--}20 \text{ gL}^{-1}$ ) wurde durch das Herabsetzen der Glukosezufuhr auf  $50 \text{ gh}^{-1}$  die Limitierungsphase eingeleitet. Nachdem die gesamte Glukose im Medium verbraucht war, blieb die Kultur für rund 30 min limitiert. Anschließend erfolgte die Auslösung des Glukosepulses und der Start der schnellen Probenahme, in dessen Verlauf der Stoffwechsel der Zellen durch das Methanol-Quenching-Verfahren [48] gestoppt wurde (Kapitel 4.3.2).

#### 4.3.2. Glukose Pulssystem und schnelle Probenahmeeinheit

Das Pulssystem besteht aus einem Pulsbehälter für die Aufnahme der Glukosepulslösung und den zwei Pulsventilen mit dazugehörigen Anstechnadeln, die über Druckleitungen miteinander verbunden sind (Abb. 4.5). Durch das Öffnen der beiden Pulsventile, die von

der Software angesteuert wurden, strömte die Pulslösung durch die zwei Anstechnadeln in den Bioreaktor. Der Pulsbehälter wurde mit einem Überdruck von 4 bar beaufschlagt. Die zwei Anstechnadeln wurden am Bioreaktor an zwei verschiedenen Seiten in Höhe des Rührblattes verschraubt und nahmen zueinander einen Winkel von ca.  $90^\circ$  ein. Mit dieser Anordnung konnten Mischungszeiten von  $\Theta_{90} = 630$  ms erreicht werden [25]. Damit war ein schneller Wechsel vom Glukose limitierten zum nicht limitierten Zustand gewährleistet.

Die schnelle Probenahme erfolgte über ein magnetisches Schlauchquetschventil, welches am Boden des Bioreaktors angebracht war (Abb. 4.5). Aufgrund des Überdrucks von 0,23 bar im Reaktor floss die Zellsuspension in die Probenahmegefäße, die in Aluminiummagazinen plziert waren. Die mit je 16 Probenröhrchen befüllten Magazine wurden taktweise unter der Öffnung des Probenahmeventils vorbeigeführt, so dass alle 220–230 ms (4–5 Proben pro s) ein neues Probengefäß unter der Ventilöffnung positioniert wurde und aufgrund der Verweilzeit des Probengefäßes 5 mL Zellsuspension in das Probenröhrchen gelangten.

Der schrittweise Transport der Magazine erfolgte von rechts nach links über einen Zahnriemen, der von einem Schrittmotor bewegt wurde (Abb. 4.3, 4.5). Sobald ein Probenmagazin mit Proben befüllt war, wurde es auf der linken Seite von einem pneumatischen Auswerfer zurück auf den Probenahmetisch geschoben. Gleichzeitig wurde auf der rechten Seite ein neues Magazin auf das Transportband (Zahnriemen) geladen. Es können maximal 10 Magazine (max. 160 Proben) verwendet werden.

Kurz vor dem Pulsexperiment wurden die zwei Pulsventile durch Anstechnadeln an den Bioreaktor angeschlossen. Der Vorratsbehälter für die Pulsflüssigkeit wurde mit 1 L einer  $420 \text{ g L}^{-1}$  Glukoselösung befüllt und die Pulsleitungen mehrfach mit der Glukoselösung gespült, um Luftblasen aus dem System zu entfernen. Die Injektionsventile für die Pulszugabe und die schnelle Probenahmeinheit wurden vollständig von einer speicherprogrammierbaren Steuerung (SPS) mit zugehöriger Software (B&R Automation Studio) kontrolliert bzw. angesteuert [13], d.h. nach dem Startbefehl durch den Experimentator verlief das Experiment vollständig automatisiert. Die Auslösung des Pulses, d.h. die Öffnung des Pulsventils, erfolgte zwischen dem ersten und dem zweiten Magazin (zwischen Probe 16 und 17). Damit wurde gewährleistet, dass das erste Magazin nur Proben aus der Limitierungsphase enthält, welche als Referenzwerte für die spätere Analyse dienen.

Die Probenahmegefäße mit einem Gesamtvolumen von 50 mL wurden mit 15 mL 70 mM HEPES enthaltende 60%ige wässrige Methanollösung (Quenchingflüssigkeit) gefüllt. Kurz vor Beginn der Probenahme wurden die Probengefäße aus einer  $-80^\circ\text{C}$  kalten Tiefkühltruhe entnommen, in die vorgesehenen Magazine gesteckt und auf dem Probenahmetisch positioniert. Bei der Probenahme wurden 5 mL der  $37^\circ\text{C}$  warmen Zellsuspension mit der inzwischen auf  $-50^\circ\text{C}$  erwärmten Quenchingflüssigkeit vermischt, d.h. nach der Probenahme lag die Temperatur bei  $\leq -20^\circ\text{C}$  [25]. Anhand von Modellrechnungen kann dabei die Abkühlzeit bei der Probenahme mit ca. 50 ms abgeschätzt werden, d.h. es kann mit diesem Verfahren ein effektives Stoppen des Stoffwechsels gewährleistet werden [181]. Nach erfolgter Probenahme wurden die befüllten Probenröhrchen manuell verschlossen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-28^\circ\text{C}$  gelagert. Die gequenchten Zellproben wurden innerhalb der nächsten 8 h wie in Kap. 4.4.1 beschrieben aufgearbeitet.

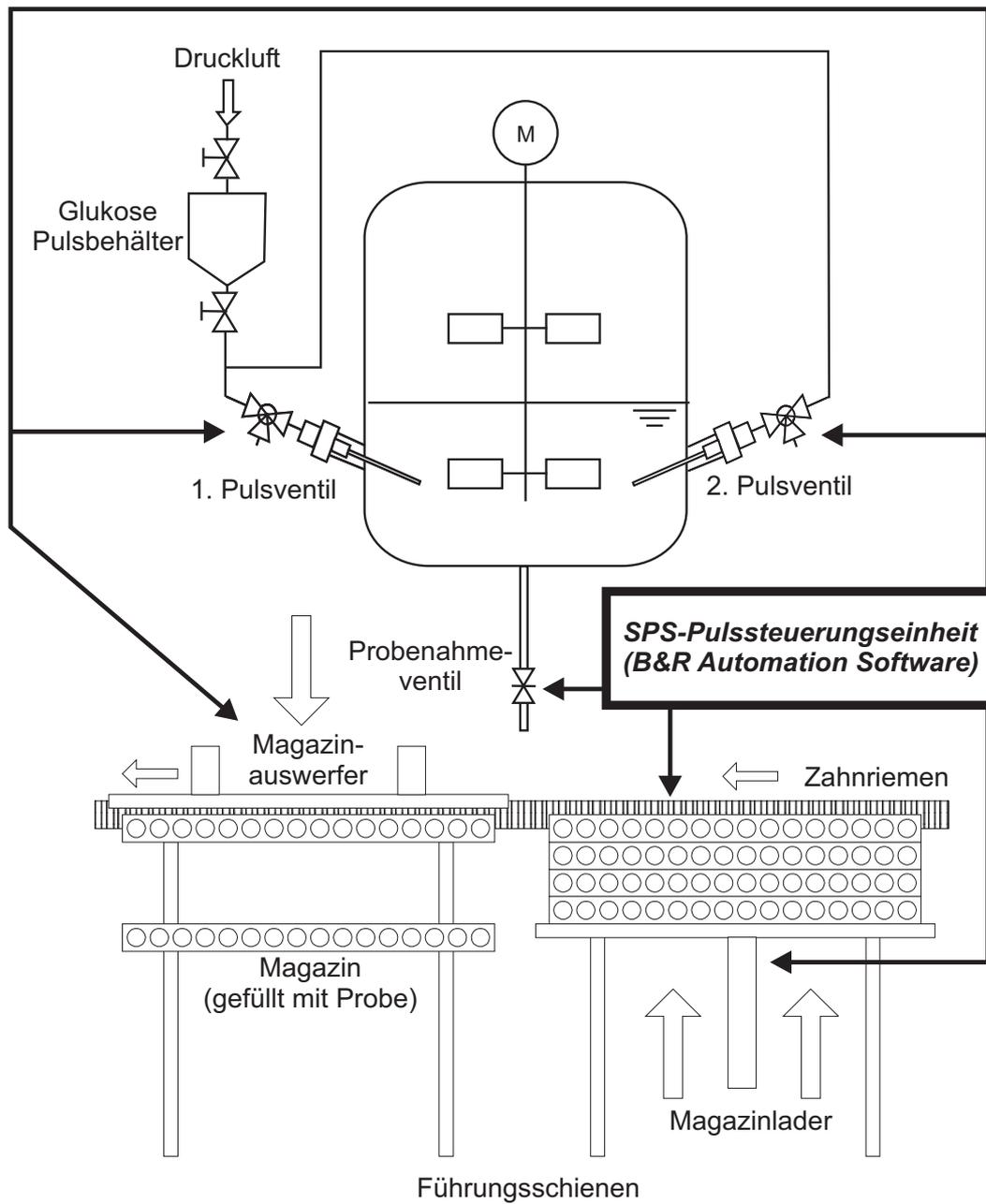


ABBILDUNG 4.5.: Schema des 20 L Bioreaktors mit Pulsaufgabesystem, schneller Probenahme- und zentraler Pulssteuerungseinheit

## 4.4. Extraktion intrazellulärer Metabolite

### 4.4.1. Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>)

Die bei  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben der automatisierten schnellen Probenahmeinheit wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $10\,286\text{ g}$  für  $5\text{ min}$  zentrifugiert (Avanti30, Beckman). Der methanolische Überstand wurde dekantiert und Flüssigkeitsreste am Zellpellet wurden mit einer Pipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit  $1\text{ mL}$  einer 50%igen auf  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten wässrigen Methanollösung resuspendiert (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Zur Kühlung der Proben wurden die Röhrchen kurz in flüssigen Stickstoff getaucht. Zur Extraktion der Zellen wurden dann  $4\text{ mL}$  einer  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalten 43,75%igen (w/v) Perchlorsäure zugesetzt. Die Mischung wurde homogenisiert (Vortex Genie 2, Scientific Industries) und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Entsprechend den Ergebnissen von Buchholz [25] wurde nach dem Auftauen auf einen Ultrazentrifugationsschritt der Proteine und Zelltrümmer verzichtet und die Proben mitsamt der Zelltrümmer durch Zugabe von  $2400\text{ }\mu\text{L}$  frisch hergestellter gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung bis  $\text{pH} = 7$  neutralisiert. Um das intensive Schäumen der Proben bei der Neutralisation zu verzögern, wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Nach der Neutralisation wurden die Proben im Eisbad auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Der Niederschlag in den Proben wurde bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $10\,286\text{ g}$  für  $5\text{ min}$  zentrifugiert (Avanti30, Beckman), und der klare, leicht gelbe Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.4.2. Ultrafiltration der Zellextrakte

Wenn angegeben, wurden die Zellextrakte vor den Messungen ultrafiltriert. Dazu kamen Ultrafiltrationseinheiten (VivaSpin PES5000, VivaScience) mit einer Ausschlussgrenze (MWCO) von  $5000\text{ Da}$  zur Anwendung. Die Filtration wurde in einer Zentrifuge (Avanti30, Beckman) bei  $18\,845\text{ g}$  durchgeführt.

## 4.5. Aufarbeitung von Metaboliten der Aromatenbiosynthese

### 4.5.1. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) und 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat (DAH)

Die Fermentationslösung aus dem Bioreaktor wurde zunächst für  $20\text{ min}$  bei  $15\,900\text{ g}$  zur Separation der Zellen zentrifugiert (Avanti J-20XP, Beckman Instruments) und danach mit Ionenchromatographie aufgereinigt [67, 119]. Der zellfreie Fermentationsüberstand ( $1400\text{ mL}$ ) passierte zunächst eine Kationenaustauschersäule, die mit  $700\text{ mL}$  Dowex 50 X8 (mesh 100-200) in der  $\text{H}^+$ -Form gefüllt war, mit einem Fluss von  $100\text{ g h}^{-1}$  bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nach dem Waschen der Säule mit  $500\text{ mL}$  Wasser wurde das vereinigte Eluat mit  $2\text{ M}$  LiOH-Lösung auf  $\text{pH} = 8$  titriert und das Wasser im Vakuum entfernt. Zu diesem Feststoff wurde  $1\text{ L}$  Methanol zugesetzt und eine Stunde bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kräftig gerührt. Nach Filtration des weißlich-gelben Rückstands, der nach Analyse nahezu kein Produkt enthält, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Der produktthaltige Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit Wasser verdünnt, bis die Leitfähigkeit  $< 1,5\text{ mS}$  betrug. Der pH-Wert wurde mit  $5\text{ M}$  LiOH-Lösung auf  $\text{pH} = 7,8$  eingestellt. Die Lösung wurde mit  $100\text{ g h}^{-1}$  auf eine Säule aufgebracht, die mit  $500\text{ mL}$  präzyklisiertem und mit Triethylammonium-Hydrogencarbonat-Lösung äquilibriertem

und mit 500 mL Wasser gewaschenem DE-52 Anionenaustauscher (Whatman) gefüllt war. Nach Waschen der Säule mit 400 mL Wasser erfolgte die Elution mit  $100 \text{ g h}^{-1}$  eines linearen Triethylammonium Hydrogencarbonat Gradienten von 100–400 mM (4 L 100 mM + 4 L 400 mM), wobei Fraktionen von 10 mL gesammelt wurden. Die Fraktionskontrolle für DAH und DAHP erfolgte mit dem Thiobarbiturat-Assay (Kap. 5.3.6), und Phosphat wurde mit dem Test nach Ames überprüft (Kap. 5.3.7). Die Produkt-Fraktionen (20–58 für DAH) wurden vereinigt und im Vakuum eingengt. Der Puffer wurde durch azeotrope Destillation mit 5 x 100 mL 2-Propanol im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und über eine Kationenaustauschersäule mit Dowex 50 X8 (mesh 100–200) in der  $\text{H}^+$ -Form eluiert. Durch Lyophilisation wurde ein blass-gelber Rückstand von DAH (freie Säure) erhalten, dessen stark hygroskopisches Verhalten die Handhabung erschwerte. Durch Neutralisation mit 0,25 M LiOH-Lösung und anschließender Lyophilisation wurde das Lithium Salz als ebenfalls blass-gelber Feststoff erhalten, der aber weniger hygroskopisch ist. Für DAHP konnten nur sehr geringe Mengen in den Fraktionen 90–95 mit LC-MS festgestellt werden, die folgende Produktisolierung war nicht erfolgreich. Fraktionen, die DAHP enthielten, und das DAH wurden bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

#### 4.5.2. 3-Dehydroquinat (DHQ)

Die Synthese erfolgte durch Oxidation von Chinasäure mit konzentrierter Salpetersäure [76]. Dazu wurden 20 g Chinasäure in einem 50 mL Kolben mit Doppelmantel in 12 mL Wasser aufgeschlämmt, über einen Kryostaten auf  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und mit einem Magnetprüher durchmischt. 27 mL 65%ige Salpetersäure wurden hinzugefügt. Zum Starten der Reaktion wurden der Reaktionslösung weitere 3 mL 65 %ige Salpetersäure zugesetzt und auf  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach kurzer Zeit war das Anspringen der Reaktion durch die Entwicklung nitroser Gase und der damit verbundenen gelb-grünen Färbung der Reaktionsmischung zu beobachten, und die Temperatur wurde daraufhin sofort wieder auf  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  herabgesetzt. Der Reaktionsfortschritt ließ sich über  $^1\text{H-NMR}$  und HPLC verfolgen und wurde nach 24 h durch Ausblasen der nitrosen Gase und Verdünnung der Reaktionslösung mit Wasser auf 4 L gestoppt.

Die saure Produktlösung wurde ionenchromatographisch aufgearbeitet [81]. Dazu wurde eine Anionenaustauschersäule mit 300 mL Dowex 1 X8 (mesh 100–200) verwendet, die mit Acetat als Gegenion äquilibriert wurde. Danach wurden 100 mL Produktlösung mit  $50 \text{ g h}^{-1}$  auf die Säule aufgetragen und anschließend mit 1 L Wasser ( $50 \text{ g h}^{-1}$ ) gewaschen. Die Elution erfolgte mit  $75 \text{ g h}^{-1}$  durch einen nicht-linearen Essigsäure-Gradienten von 0,5–6,0 M (4 L 6 M + 1 L 0,5 M), und Fraktionen von 10 mL wurden gesammelt. Die Fraktionskontrolle erfolgte mit HPLC (Kap. 5.3.1), die Produkt-Fraktionen wurden vereinigt und bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  im Rotationsverdampfer eingengt. Die Kristallisation des Produkts aus Aceton gelang nicht, daher wurde das Produkt in Wasser aufgenommen und die Konzentration der Produktlösung mit  $^1\text{H-NMR}$  gemessen. Die so erhaltene standardisierte Lösung wurde bis zur Verwendung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.5.3. 3-Dehydroshikimat (DHS)

#### 4.5.3.1. Extraktion mit Ethylacetat

Die Fermentationslösung aus dem Bioreaktor wurde zunächst für 20 min bei 15 900 g zur Separation der Zellen zentrifugiert (Avanti J-20XP, Beckman Instruments). Die nun zellfreie Produktlösung wurde mit 6 N HCl auf pH = 2,5 angesäuert. Die kontinuierliche Extraktion wurde mit einem 1 L Perforator für leichte Extraktionsphasen unter Einsatz von 500 mL Produktlösung und ca. 700 mL Ethylacetat sowohl mit als auch ohne vorhergehende Ultrafiltration (Ausschlussgrenze 10 kDa) durchgeführt. Wegen mangelnder Phasentrennung mussten beide Versuche bereits nach einer Laufzeit von rund 30 min abgebrochen werden. Stattdessen wurden 500 mL der angesäuerten Produktlösung mehrmals mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und die vereinigten organischen Phasen im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von etwa 100 mL reduziert. Nach 1 Woche bei 5 °C war ein Teil des Produkts in der Lösung kristallisiert. Zur Reduzierung des Lösungsmittelanteils wurde das blass-beige farbige Produkt fünf Tage lang im Vakuum getrocknet und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 4.5.3.2. Ionenchromatographie

Die zellfreie Fermentationslösung wurde ionenchromatographisch aufgearbeitet [81]. Dazu wurde eine Anionenaustauschersäule mit 300 mL Dowex 1 X8 (mesh 100-200) verwendet, die mit Acetat als Gegenion äquilibriert wurde. Danach wurden 100 mL Produktlösung mit 50 g h<sup>-1</sup> auf die Säule aufgetragen und anschließend mit 1 L Wasser (50 g h<sup>-1</sup>) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 75 g h<sup>-1</sup> durch einen nicht linearen Essigsäure-Gradienten von 0,5-6,0 M (4 L 6 M + 1 L 0,5 M) und Fraktionen von 10 mL wurden gesammelt. Die Fraktionskontrolle erfolgte mit HPLC (Kap. 5.3.1), die Produkt-Fraktionen 195-220 wurden vereinigt, bei 30 °C im Rotationsverdampfer eingengt und im Vakuum für 5 Tage lang getrocknet. Es wurde ein blass-beige farbiges, teils kristallines Produkt erhalten, das bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert wurde.

#### 4.5.4. Shikimat-3-phosphat (S3P)

Die Fermentationslösung aus dem Bioreaktor wurde zunächst für 20 min bei 15 900 g zur Separation der Zellen zentrifugiert (Avanti J-20XP, Beckman Instruments) und mit Ionenchromatographie aufgereinigt [37, 49]. Der zellfreie Fermentationsüberstand (1400 mL) passierte zunächst eine Kationenaustauschersäule, die mit 700 mL Dowex 50 X8 (mesh 100-200) in der H<sup>+</sup>-Form gefüllt war, mit einem Fluss von 100 g h<sup>-1</sup> bei 4 °C. Nach dem Waschen der Säule mit 500 mL Wasser wurde das vereinigte Eluat mit 2 M LiOH-Lösung auf pH = 8 titriert und das Wasser im Vakuum entfernt. Zu diesem Feststoff wurde 1 L Methanol zugesetzt und eine Stunde bei 4 °C kräftig gerührt. Nach Filtration des weißlich-gelben Rückstands, der nach Analyse nahezu kein Produkt enthält, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Der produktthaltige Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit Wasser verdünnt, bis die Leitfähigkeit < 1,5 mS betrug. Der pH-Wert wurde mit 5 M Ammoniak-Lösung auf pH = 8,5 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C mit 100 g h<sup>-1</sup> auf eine Säule aufgebracht, die mit 700 mL präzyklisiertem und mit Ammoniumhydrogencarbonat äquilibriertem DE-52

Anionenaustauscher (Whatman) gefüllt war. Nach Waschen der Säule mit 400 mL Wasser folgte die Elution mit  $100 \text{ g h}^{-1}$  mittels eines linearen Ammoniumhydrogencarbonat Gradienten von 20–400 mM (3,5 L 20 mM + 3,5 L 400 mM), wobei Fraktionen von 10 mL gesammelt wurden. Die Fraktionskontrolle erfolgte mit HPLC (Kap. 5.3.1), die Produkt-Fraktionen 60–175 wurden vereinigt und das Wasser durch Lyophilisation entfernt. Shikimat-3-phosphat wurde als leicht bräunlicher, hygroskopischer Feststoff erhalten und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.



## 5. Analytische Methoden

### 5.1. Biomassekonzentration

Der Brechungsindex von Mikroorganismen unterscheidet sich sehr stark von dem der sie umgebenden Phase. Deshalb streuen sie das Licht und ihre Suspensionen erscheinen trüb. Die optische Dichte ist daher ein Maß für die Konzentration der Biomasse. Dieser Zusammenhang wird durch das Lambert–Beer´sche Gesetz beschrieben (Gleichung 5.1).

$$\log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon \times d_l \quad (5.1)$$

- $I_0$  : Intensität der eingestrahlten Wellenlänge
- $I_t$  : Intensität der von der Bakteriensuspension durchgelassenen Wellenlänge
- $\log \frac{I_0}{I_t}$  : Optische Dichte,  $\lambda = 650$  nm, Abk. OD<sub>650</sub>
- $x$  : Biomassekonzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]
- $d_l$  : Wegstrecke des Lichts durch die Probe [cm]
- $\varepsilon$  : molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]

Die optische Dichte wurde mittels eines Photometers (UV–160A, Shimadzu) bei einer Wellenlänge von 650 nm gegen Wasser gemessen. Der Faktor  $\varepsilon$  ist konstant für eine Wellenlänge, nimmt aber mit höheren Bakterienkonzentrationen aufgrund sekundärer Strahlungen in der Suspension ab [56]. Der lineare Messbereich für die photometrische Messung der OD<sub>650</sub> liegt zwischen 0,03 und 0,3. Die Proben wurden für diesen Messbereich entsprechend verdünnt.

Zur gravimetrischen Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 2,5 – 5 mL der Fermentationsprobe durch einen zuvor bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrockneten und gewogenen Celluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert und der Filter mit einem äquivalenten Volumen von bidestilliertem Wasser gespült, um Bestandteile des Mediums zu entfernen. Der Filter wurde wiederum bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und erneut gewogen. Die Biotrockenmasse entsprach der Differenz beider Messungen.

### 5.2. Zellzahl und Zellgrößenverteilung mittels CASY–Counter

Das Verfahren der Partikelmesstechnik für die Zellzahl– und Zellgrößenbestimmung mit dem CASY1 TT (Schärfe System GmbH) beruht auf dem Widerstandsmessprinzip, die gemessenen Signale werden mit der Pulsflächenanalyse ausgewertet. Für die Messung wurden die Zellen in CASYTon, einem vom Hersteller bereitgestellten isotonen schwachen Elektrolyten suspendiert bzw. verdünnt. Bei der Wahl der richtigen Verdünnung kann von einem Faktor von 1:10 000 pro gemessener optischer Dichte ausgegangen werden. Die Verdünnung wurde in Schritten von 1:10 (1 mL Probe + 9 mL CASYTon) durchgeführt. Bei der Messung

TABELLE 5.1.: Methodenparameter der HPLC Analytik für organische Säuren

Säule	Aminex HPX-87H, Bio-Rad, 300x7,8 mm
Temperatur	40°C
Flussrate	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Injektionsvolumen	100 µL
Detektion	215 nm
Elution	0,1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

strömt die zellhaltige Probelösung durch einen angelegten Unterdruck mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch einen Kapillarkörper, in dem eine aus Rubin gefertigte Messpore enthalten ist, deren Durchmesser 45 µm beträgt. Entlang der Kapillarstrecke wird über zwei Platin-Elektroden eine Spannung angelegt, wodurch die elektrolytgefüllte Messkapillare einen definierten elektrischen Widerstand darstellt. Da die intakte Bakterienzelle in erster Näherung als Isolator betrachtet werden kann, wird beim Durchtritt einer Zelle durch die Messpore der elektrische Widerstand erhöht. Dieses Signal ist ein Maß für das Volumen der Zelle, wobei jedoch die geometrische Information über die Struktur bzw. die Form der Zelle verloren geht. Die Messdaten wurden über die serielle Schnittstelle des Geräts an ein von A. Franz im IBT-2 programmiertes LabView Programm auf einen Messrechner übertragen.

### 5.3. Extrazelluläre Analytik

#### 5.3.1. Organische Säuren mittels HPLC

Die Methode basiert auf der Ionen-Ausschluss-Chromatographie. Durch den sauren Eluenten werden die organischen Säuren positiv polarisiert und wechselwirken mit der stationären Phase, einem Kationenaustauscher, wodurch unterschiedliche Retentionzeiten erzielt werden. Mit dieser Methode wurden die organischen Säuren Acetat, Zitrat, Fumarat, Malat, Chinasäure, 3-Dehydroquinat, 3-Dehydroshikimat, Shikimat, Phenylpyruvat, Chorismat, Uracil, Orotsäure und Phenyllactat gemessen. Die Messungen wurden mit wässrigen Standardlösungen und nach Zentrifugation der Zellen bei 13 000 U min<sup>-1</sup> und 10 min (Biofuge pico, Heraeus) mit dem entsprechend verdünnten Fermentationsüberstand durchgeführt.

Es wurde eine Chromatographiesäule (Aminex HPX-87H, Bio-Rad) mit 300 mm Länge und 7,8 mm Durchmesser verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch bei 40 °C (Ofen S4110, Sykam) mit 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und einem Eluentenfluss von 0,5 mL min<sup>-1</sup> (Pumpe S1000, Sykam). Die Injektion der Proben erfolgte mit einem Injektionsvolumen von 100 µL durch einen auf 10 °C temperierten programmierbaren Autosampler (S5200, Sykam). Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor (UVD340S, Dionex) von 200–595 nm. Die Datenaufnahme und die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Chromeleon 6.4 Chromatographie Software (Dionex). Die quantitative Auswertung wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 215$  nm durchgeführt. Die Methodenparameter sind in Tab. 5.1 zusammengefasst.

Shikimat-3-phosphat (S3P) kann ebenfalls über diese HPLC Methode gemessen werden. Durch eine alkalische Phosphatase wird die Phosphatgruppe abgespalten, und es wird Shikimat als Produkt dieser enzymatischen Reaktion erhalten. Zu 450 µL Probelösung wurde

TABELLE 5.2.: Alkalischer Phosphatase Assay für die Umsetzung von Shikimat-3-phosphat zu Shikimat

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Zeit [min]	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]
Probelösung	450		
Tris-EDTA-Puffer	50		
alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu\text{L}$ )	4	60	37
Tris-EDTA-Puffer :	500 mM Tris HCl pH 8.5, 1 mM EDTA		

50  $\mu\text{L}$  Tris-EDTA-Pufferlösung pipettiert, die Reaktion durch Zugabe von 4  $\mu\text{L}$  der alkalischen Phosphatase-Lösung (Roche Diagnostics) initiiert und 1 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert (Tab. 5.2). Durch die Bestimmung von Shikimat vor und nach der Phosphatasereaktion kann aus der Differenz die S3P Konzentration berechnet werden.

### 5.3.2. Aminosäuren mittels HPLC

Die Methode basiert auf einer Derivatisierung der Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd (OPA) als Derivatisierungsreagenz. Die Carbonylfunktionalität des OPA reagiert mit den primären Aminogruppen in Gegenwart von Mercaptoethanol (Ethanthiol) zu fluoreszierenden Isoindolen, die hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase (Reversed-phase C18-Material) eingehen. Das Ammonium-Ion reagiert hier analog zu den Aminosäuren und kann auch im Chromatogramm identifiziert werden. Unter dem Ammonium-Peak befindet sich im Chromatogramm auch eine Grundemission des OPA, die zwar die absolute Quantifizierung behindert, die aber trotzdem gute qualitative Aussagen über die Ammonium-Konzentration in der Probe zulässt.

Mit dieser Methode wurden die Aminosäuren Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Glutaminsäure gemessen. Die Messungen erfolgten mit wässrigen Standardlösungen und mit dem entsprechend verdünnten Fermentationsüberstand nach Zentrifugation der Zellen bei 13 000  $\text{U min}^{-1}$  und 10 min (Biofuge pico, Heraeus). Dazu wurde eine Chromatographiesäule (LiChrospher 100RP 18-5EC, Merck) mit einer Länge von 125 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm benutzt. Die Injektion des Probenvolumens von 10  $\mu\text{L}$  und die Vorsäulen-Derivatisierung der Probelösung erfolgte durch einen programmierbaren Autosampler (Promis, Spark). Die Elution erfolgte bei 0,9  $\text{mL min}^{-1}$  (Pumpe S1000, Sykam) mit einem Gradienten (Mixer S8110, Sykam) bei 40  $^{\circ}\text{C}$  (Ofen S4110, Sykam). Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor mit Xenon-Lampe (RF535, Shimadzu) mit einer Anregung bei 330 nm und Detektion bei 450 nm. Die Datenaufnahme und die Auswertung der Messung erfolgte mit der Chromeleon 6.4 Chromatographie Software (Dionex). Die Methodenparameter sind in Tab. 5.3 zusammengefasst.

### 5.3.3. Glukose

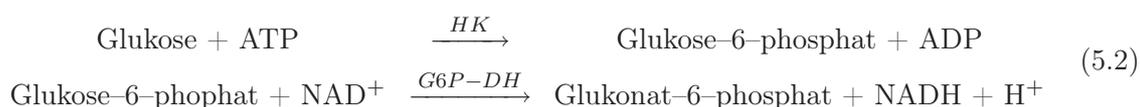
Die Bestimmung der Glukose-Konzentration in den Fermentationsproben geschah mit einem Accutrend Testsystem (Roche Diagnostics). Auf dem Teststreifen befindet sich das immobilisierte Enzym Glukoseoxidase, das Glukose zu Glukonolaktone und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) umsetzt. Die gebildete Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist dabei proportional zur Glukose-Konzentration und

TABELLE 5.3.: Methodenparameter der HPLC Analytik für Aminosäuren

Säule	LiChrospher 100RP 18-5EC, 125x4.0, Merck
Temperatur	40 °C
Flussrate	0,9 mL min <sup>-1</sup>
Injektionsvolumen	10 µL
Detektion	Fluoreszenz 450 nm (Anregung bei 330 nm)
Eluent A	10 mM Phosphatpuffer, pH = 7,2 , 0,5 % Tetrahydrofuran
Eluent B	50 % Eluent A ohne THF + 35 % Methanol + 15 % Acetonitril
Gradient	0 min 75 % B, 7 min 90 % B, 8.5 min 100 % B, 13 min 100 % B, 14 min 75 % B

wird amperometrisch gemessen. Der Messbereich dieses Biosensors liegt zwischen 0,1 und 6 g L<sup>-1</sup> Glukose. Zur Messung wurden etwa 10 µL Lösung auf den Sensor aufgebracht, und nach etwa einer halben Minute wurde der Wert auf dem Gerät angezeigt. Für jede Probe wurde ein neuer Biosensor verwendet. Der Vorteil dieses Systems liegt in der schnellen und leichten Verfügbarkeit des Ergebnisses.

Um auch die Richtigkeit dieses schnellen Verfahrens zu zeigen, wurde er mit dem gekoppelten enzymatischen Glukosetest [14] verglichen. Bei diesem Test wird Glukose durch das Enzym Hexokinase (HK) in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) zu Glukose-6-phosphat (G6P) phosphoryliert und dann durch das Enzym G6P Dehydrogenase (G6P-DH) zu Glukonat-6-phosphat (6PG) umgesetzt (Gleichung 5.2). Dabei wird NAD zu NADH reduziert, dessen Bildung aufgrund der UV-Aktivität bei  $\lambda = 340$  nm verfolgt werden kann. Die gebildete NADH Menge ist dabei proportional zur Glukose-Konzentration. Die verwendeten Reagenzien sind in Tab. 5.4 dargestellt.



Die Messung wurde in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Beckman Instruments) als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte über eine 8-Punkt Standardreihe mit Konzentrationen von 0,05 bis 0,5 g L<sup>-1</sup>. Zu 40 µL Probelösung wurden 220 µL NAD und ATP enthaltende Pufferlösung und je 20 µL der verdünnten Enzymlösungen pipettiert (Tab. 5.4). Die Mikrotiterplatte wurde 15 min geschüttelt, 45 min bei 37 °C inkubiert und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Thermomax, Molecular Devices) gemessen.

In Abb. 5.1 ist der Vergleich zwischen den mit dem Enzymassay und mit dem Accutrend Biosensorchip gemessenen Glukose-Konzentrationen in einem Fed-Batch Experiment mit dem L-Phe Produzenten *E. coli* 4pF49 dargestellt. Sowohl bei Glukose limitierten Bedingungen in der Zeit von 9–13,5 h, als auch in der Glukose gesättigten Phase von 13,5–18 h zeigen beide Methoden gute Übereinstimmung. Die über den Accutrend Biosensorchip innerhalb von 30 s zugängliche Glukose-Konzentration kann daher als zuverlässig und richtig betrachtet und diese Methode als semi-online Glukose-Analytik verwendet werden.

TABELLE 5.4.: Enzymatischer Glukose Assay

Assay-Komponente	Reagenzien	Konzentration
Tris-Maleat-Puffer	Tris-hydroxymethyl-aminomethan	12,1 g/L
	Maleinsäure	11,6 g/L
MgCl <sub>2</sub> Lösung	pH-Wert mit NaOH auf 6,8 einstellen	
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,0 g
	Tris-Maleat-Puffer	50 mL
NAD / ATP Mix	NAD	95,4 mg
	ATP	73,5 mg
	MgCl <sub>2</sub> Lösung	5 mL
	Tris-Maleat Puffer	120 mL
G6P-DH	G6P-DH, 1000 U/mL	1:40 in H <sub>2</sub> O
	HK, 3000 U/mL	1:40 in H <sub>2</sub> O

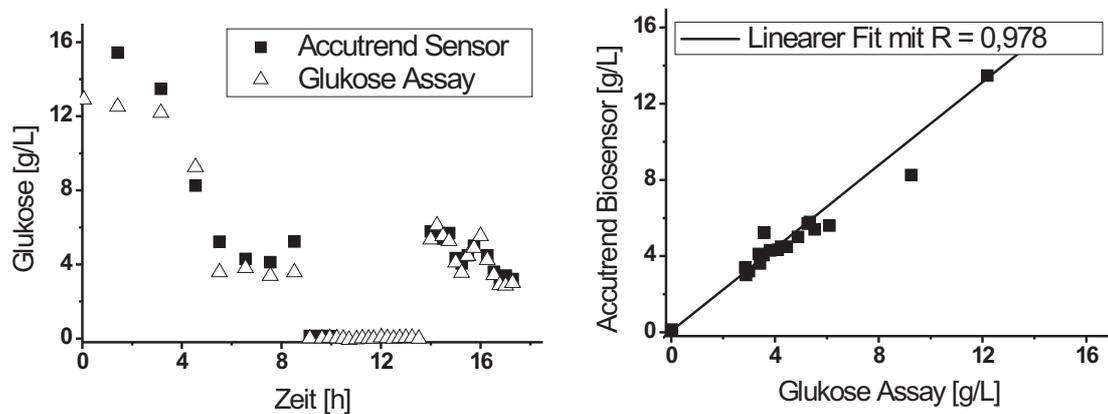


ABBILDUNG 5.1.: Glukose-Konzentrationsmessung mit Enzymassay und Accutrend Biosensorchip in Fed-Batch Fermentation mit L-Phe Produktionsstamm *E. coli* 4pF49 (links); Phasenauftragung mit Korrelationskoeffizient R (rechts)

### 5.3.4. Quantitative Metabolit-Messungen mit $^1\text{H}$ -NMR

Die quantitative  $^1\text{H}$ -NMR Analytik wurde an einem PFT-NMR Spektrometer (AMX300, Bruker) mit einer Messfrequenz von 300 MHz durchgeführt. Dabei wurde ein auf dem Gerät hinterlegter Satz von Messparametern für die  $^1\text{H}$ -NMR Messung verwendet. Auswertung und Integration der Messungen erfolgte durch die XWIN-NMR Software (Bruker). Als Lösungsmittel wurde  $\text{D}_2\text{O}$  (Sigma) verwendet. Als Referenzverbindung und als interner Standard für die quantitative Auswertung wurde 3-Trimethylsilylpropion-2,2,3,3-d-säure (TSP, Lancaster Synthesis) benutzt. Die Messungen erfolgten mit wässrigen Standardlösungen und mit zellfreiem Fermentationsüberstand nach Zentrifugation der Zellen bei  $13.000 \text{ Umin}^{-1}$  und 10 min (Biofuge pico, Heraeus). Dazu wurden  $400 \mu\text{L}$  des zellfreien Fermentationsüberstands ca. 2–2,5 h in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Backofer) bis zur Trockenheit eingengt und danach in  $800 \mu\text{L}$  einer 4 mM TSP (entspricht  $9 \cdot 4 = 36 \text{ mM}$  für das Signal der Protonen der Trimethylsilyl-Gruppe) enthaltenden  $\text{D}_2\text{O}$  Lösung wieder aufgenommen. Diese Probelösung wurde in NMR Messröhrchen überführt und mit 96 Scans gemessen [191]. Bei der Integration der Signale wurde die Fläche des TSP-Signals auf 9 Protonen gesetzt, d.h. für das Signal eines Protons des zu messenden Analyten kann die Konzentration in der Probe nach Gleichung 5.3 berechnet werden. Die Messungen mit 400 MHz wurden an einem PFT-NMR Spektrometer (AMX400, Bruker) durchgeführt.

$$\text{Konzentration Analyt} = \text{Signalfläche Analyt} \cdot 2 \cdot 4 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \quad (5.3)$$

### 5.3.5. $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR Messungen

Die in dieser Arbeit dargestellten  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Experimente wurden alle an einem PFT-NMR Spektrometer (AMX300, Bruker) durchgeführt. Für die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, DEPT90-, DEPT135- und HH-COSY-NMR Messungen wurden die auf dem Gerät hinterlegten Sätze von Messparametern verwendet. Auswertung und Integration der Messungen erfolgte durch die XWIN-NMR Software (Bruker). Als Lösungsmittel wurde  $\text{D}_2\text{O}$  (Sigma) verwendet. Als Referenzverbindung und als interner Standard für die  $^1\text{H}$ -NMR Messungen wurde 3-Trimethylsilylpropion-2,2,3,3-d-säure (TSP, Lancaster Synthesis) und Acetonitril als Referenz für die  $^{13}\text{C}$ -NMR benutzt.

### 5.3.6. Thiobarbiturat-Nachweis von DAH und DAHP

Dieser Nachweis wurde für die Kontrolle der ionenchromatographischen Fraktionen verwendet und beruht auf der Periodat-Oxidation von DAH und DAHP zu Formylpyruvat, das mit Thiobarbiturat zu einem pinken Addukt reagiert, andernfalls bleibt die Lösung farblos [74]. Sowohl DAH als auch DAHP reagieren in diesem Test in gleicher Art und Weise, so dass sie nicht unterschieden werden können. Zu  $50 \mu\text{L}$  der Probelösung wurden  $50 \mu\text{L}$  der Lösung I gegeben und 5 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Dazu wurden  $250 \mu\text{L}$  der Lösung II gegeben, bei Raumtemperatur 5 min inkubiert, und danach wurden  $1,5 \text{ mL}$  der Lösung III zugesetzt und 15 min im kochenden Wasserbad erhitzt (Tab. 5.5). Als Nullprobe wurde Wasser und als Positivprobe der Fermentationsüberstand des DAHP-Produzenten *E. coli* 5pF15 verwendet. Die Nullprobe bleibt farblos und die Positivprobe färbt sich intensiv pink.

TABELLE 5.5.: Thiobarbiturat Assay für den DAH und DAHP Nachweis

Komponente	Reagenzien	Volumen	Zeit	T
		[ $\mu\text{L}$ ]	[min]	[ $^{\circ}\text{C}$ ]
Probelösung		50		
Lösung I	0,2 M Natriumperiodat in 9 M $\text{H}_3\text{PO}_4$	50	5	37
Lösung II	0,8 M Natriumarsenat, 0,5 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ in 0,1 M $\text{H}_2\text{SO}_4$	250	5	20
Lösung III	0,6% Thiobarbiturat in 0,5 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$	1500	15	100

TABELLE 5.6.: Phosphat Nachweis

Komponente	Reagenzien	Volumen	Zeit	T
		[ $\mu\text{L}$ ]	[min]	[ $^{\circ}\text{C}$ ]
Probe		300		
Lösung III	Lösung I + Lösung II (1 + 6 Teile)	700	20	45
Lösung I	Ascorbinsäure 10% (m/v)			
Lösung II	Ammoniummolybdat 0,42 % (m/v) in 1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$			

### 5.3.7. Phosphat Nachweis

Dieser Nachweis wurde für die Kontrolle der ionenchromatographischen Fraktionen verwendet und beruht auf der Reduktion des gebildeten Phospho-Molybdat Komplexes durch Ascorbinsäure [4]. Zu 300  $\mu\text{L}$  Probelösung wurden 700  $\mu\text{L}$  der Lösung III pipettiert und 20 Minuten bei 45  $^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert (Tab. 5.6). Der Nachweis von Phosphat wird durch eine blaue Färbung angezeigt oder kann bei 820 nm photometrisch verfolgt werden. Der Test detektiert nur freies anorganisches Phosphat, Phosphatgruppen die in organischen Molekülen stabil gebunden sind, reagieren in diesem Test nicht. Die Ascorbinsäurelösung (Lösung I) kann für eine Woche bei 7  $^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, die Lösung III ist aufgrund ihrer Unbeständigkeit nur einen Tag bei 0  $^{\circ}\text{C}$  verwendungsfähig.

## 5.4. Intrazelluläre Analytik

### 5.4.1. Enzymatische Nachweismethoden

Die enzymatischen Nachweisverfahren basieren auf den experimentellen Vorschriften von Bergmeyer [14] und sind bereits in früheren Arbeiten [24, 169] für den Einsatz mit Mikrotiterplatten (96 Kavitäten) adaptiert und eingesetzt worden. Die Grundlage aller Enzymtests ist die Endpunktbestimmung der UV-Absorption von NADH oder NADPH, die im Verlauf der enzymatischen Umsetzung des zu untersuchenden Metaboliten gebildet oder verbraucht werden. Die Substratspezifität des dabei verwendeten Enzyms ist der Grund für die hohe Selektivität, die diese Tests auch in komplexer Probenmatrix auszeichnen sollen. Ein Nachteil der enzymatischen Verfahren ist das hohe benötigte Probevolumen von etwa 300  $\mu\text{L}$ . Am Beispiel des Nachweises von Glukose-6-phosphat (G6P) wird das Funktionsprinzip der enzymatischen Messverfahren erläutert. Dabei wird G6P durch die G6P Dehydrogenase (G6P-

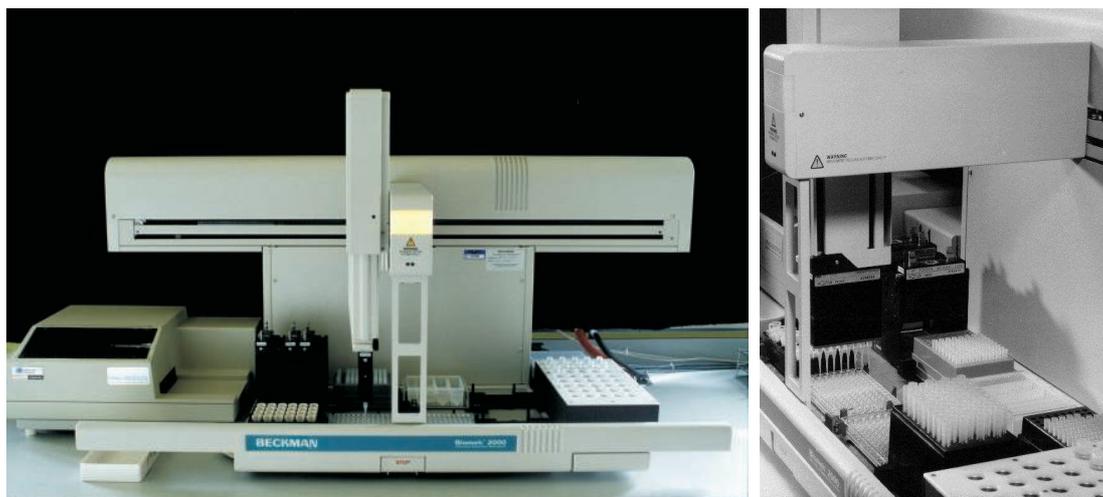


ABBILDUNG 5.2.: Foto des Pipettierroboters Biomek 2000.

DH) spezifisch in Glukonat-6-phosphat umgesetzt und äquimolare Mengen NADH gebildet (Formel 5.4).



In Fällen, bei denen die geeignete substratspezifische enzymatische Umsetzung nicht direkt im gleichen enzymatischen Schritt mit einem Verbrauch oder der Bildung von NADH oder NADPH erfolgt, wählt man eine gekoppelte Reaktion, d.h. man koppelt eine zweite Enzymreaktion dahinter. Die Substratspezifität kann dabei durch die erste oder zweite oder beide Umsetzungen gegeben sein. Ein Beispiel für diesen Typ ist der gekoppelte Nachweis für Glukose, der in Formel 5.2 dargestellt ist. Dabei wird Glukose durch Hexokinase (HK) zunächst unter ATP-Verbrauch in G6P umgewandelt, das dann durch die G6P-DH wieder äquimolare Mengen NADH bildet. Bei solchen gekoppelten Reaktionen ist die Reihenfolge der Enzymzugabe sehr wichtig. Hier muss zunächst die G6P-DH zugegeben werden, damit das möglicherweise in der Probe vorhandene G6P abreagiert. Erst danach kann durch Zugabe der HK die Glukose-Messung initiiert werden. Andernfalls kann der Test zu einem falschen, zu hohen Ergebnis führen, da die gebildete Menge NADH sowohl durch Reaktion der Glukose wie auch des G6P entstanden sein könnte. Besonders bei solchen gekoppelten Nachweisreaktionen muss mit einer erhöhten Messunsicherheit gerechnet werden.

Die Enzymtests wurden mit Hilfe eines Biomek 2000 Laborroboters (Beckman Instruments) durchgeführt, der in Abb. 5.2 zu sehen ist. Sowohl die Standardreihen wie auch die vollständige Pipettierung der Enzymtests in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten erfolgten durch den Roboter. Dazu ist in der Bioworks 2.0 Software (Beckman Instruments) für jeden Enzym-Assay ein Programm hinterlegt, in der die genaue Anordnung der Proben und Reagenzien, sowie der experimentelle Ablauf des Tests programmiert ist. Jedes Programm ist spezifisch für einen Enzymtest. Nach dem Start des Enzymtest-Programms wird zunächst eine Meldung über die benötigten Reagenzien und die vorgesehenen Positionen am Bildschirm

TABELLE 5.7.: Enzymatischer Assay zur Bestimmung von 6-Phosphoglukonat

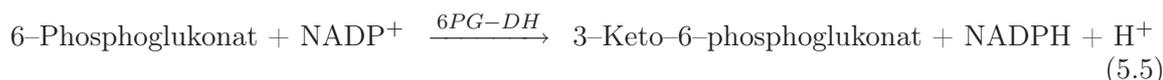
Komponente	Reagenzien	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Probe		125
Glycylglycin-MgCl <sub>2</sub> -Puffer	Glycylglycin 14,8 g L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 1,574 g L <sup>-1</sup> pH-Wert mit KOH auf 8,0	155
NADP	NADP 19,3 mg mL <sup>-1</sup>	10
6PG-DH	19 mg mL <sup>-1</sup> (41 U/mg) 1:125 in Glycylglycin-MgCl <sub>2</sub> -Puffer	10

angezeigt. Als erstes werden die Puffer-Lösungen, eventuell zusätzliche Salze und Kofaktoren in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Danach werden die Standardlösungen und Proben pipettiert und die Mikrotiterplatte homogenisiert (Titrimax, Heidolph). Vor der Zugabe der Enzyme wird der Nullwert im Mikrotiterplattenphotometer (Thermomax, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm gemessen. Nach der Zugabe der Enzyme wird die Platte wiederum homogenisiert und für 2 h bei 25 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wird die Platte erneut bei 340 nm gemessen und die Absorptionsänderung zur Berechnung der Konzentration in den Proben verwendet. Auf jeder Platte werden Standardlösungen im Bereich von 5–150  $\mu\text{M}$  pipettiert, die zur Aufstellung der Kalibriergeraden verwendet werden. Die Testbedingungen und die experimentelle Durchführung der Enzymtests für die Metaboliten Glukose-6-phosphat (G6P), Fruktose-6-phosphat (F6P), Fruktose-1,6-bisphosphat (FBP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (Pyr) sind den Arbeiten von Buchholz [24] und Kunze [100] zu entnehmen.

#### 5.4.2. Enzymatische Bestimmung von 6-Phosphoglukonat (6PG)

Bei diesem Test wird 6PG durch das Enzym 6-Phosphoglukonat Dehydrogenase (6PG-DH) zu 3-Keto-6-phosphoglukonat umgesetzt (Gleichung 5.5). Dabei wird NADP zu NADPH reduziert, dessen Bildung aufgrund der UV-Aktivität bei  $\lambda = 340$  nm verfolgt werden kann. Die gebildete NADPH Menge ist dabei proportional zur 6PG-Konzentration. Die Messung wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (Beckman Instruments) als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zu 155  $\mu\text{L}$  Glycylglycin/MgCl<sub>2</sub> Pufferlösung wurden 10  $\mu\text{L}$  NADP-Lösung, 125  $\mu\text{L}$  Probe und 10  $\mu\text{L}$  der verdünnten 6PG-DH Lösung pipettiert (Tab. 5.7). Nach 2 h Inkubationszeit bei 30 °C wurde die Absorption im Mikrotiterplattenphotometer (Thermomax, Molecular Devices) gemessen.



#### 5.4.3. HPLC-Methode für die MS-Kopplung

Für die Chromatographie vor der massenspektrometrischen Detektion wurde weitgehend auf das von Buchholz [23] verwendete System zurückgegriffen. Für die Chromatographie wurden

TABELLE 5.8.: Methodenparameter der HPLC für die HPLC–MS Kopplung

Säule	2 x Nucleodex beta–OH 250 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ , Macherey–Nagel)
Temperatur	25 $^{\circ}\text{C}$
Flussrate	0,5 $\text{mL min}^{-1}$
Injektionsvolumen	20 $\mu\text{L}$
Detektion	MS
Eluent A	12 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$
Eluent B	20 % Eluent A; 80 % Methanol (LC-MS Qualität CHROMASOLV, Riedel-de-Haen)
Gradient	0 min 2 % B, 15 min 2 % B, 30 min 100 % B, 45 min 100 % B 47 min 2 % B, 60 min 2 % B

zwei Säulen (Nucleodex beta–OH, Macherey–Nagel) mit einer Länge von 250 mm und einem Innendurchmesser von 4.6 mm und einer Teilchengröße von 5  $\mu\text{m}$  in Serie geschaltet (Tab. 5.8).

#### 5.4.4. Ionenfallen LC–MS

Das System besteht aus einer HPLC Anlage (Gynkotek/Dionex), die an ein LCQ Massenspektrometer (ThermoFinnigan) mit Ionenfallen–Massenfilter (Kap. 3.3.3) und ESI–Quelle (Kap. 3.3.2) gekoppelt ist (Abb. 5.3). Die verwendete Chromatographie–Methode ist in Kap. 5.4.3 beschrieben. Die Injektion des Probevolumens erfolgte durch einen programmierbaren Autosampler (ASI100–T, Dionex) und die Gradienten–Elution (Pumpe M480, Gynkotek) bei 25  $^{\circ}\text{C}$  (Säulenofen, Gynkotek). Vor dem Massendetektor ist ein Dioden–Array–Detektor (UVD, Dionex) zur UV–Messung im Wellenlängenbereich von 200–595 nm geschaltet. Die Datenaufnahme, die HPLC Steuerung und die Auswertung der UV–Daten erfolgte mit der Chromeleon 6.4 Chromatographie Software (Dionex). Die Datenaufnahme, Steuerung und Auswertung des MS Systems erfolgte mit der Software Xcalibur 1.0 (ThermoFinnigan).

Die Verbindung zum LCQ Massendetektor erfolgte über ein T–Stück, das als Flussteiler fungierte und 40  $\mu\text{Lmin}^{-1}$  des Elutionsvolumens zum Massendetektor leitete, die anderen 460  $\mu\text{Lmin}^{-1}$  wurden verworfen. Über eine externe HPLC–Pumpe (PU1585, JASCO) wurde Methanol mit einem Fluss von 25  $\mu\text{Lmin}^{-1}$  über den "sheath liquid" Anschluss direkt in den Kopf der ESI–Quelle dosiert. Nach Buchholz [25] diente das der Unterstützung der Ionisation. Als "sheath gas" und "auxiliary gas" wurde Stickstoff verwendet, der durch einen ölfreien Luft–Kompressor (2000–40, Jun–Air) mit nachgeschalteter Membranfilteranlage (ECO–Inert ESP2, DWT) bereitgestellt wurde.

Die Parameter für die ESI–Quelle wurden durch manuelle Injektionen aus einer 10  $\mu\text{L}$  Probenschleife in den gesplitteten HPLC–Eluenten ermittelt. Die optimalen Kollisionsenergien wurden mit einer Standard–Lösung (Eluent A 98 %, Eluent B 2 %) und die Werte für die Tune–Parameter (tube lens offset, first + second octapole offset, interoctapole lens offset) wurden mit einer 500  $\mu\text{M}$  G6P Standard–Lösung (Eluent A 98 %, Eluent B 2 %) bestimmt. Dazu wurde die Spritzenpumpe mit einem Fluss von 40  $\mu\text{Lmin}^{-1}$  eingestellt und die semi–automatische Software–Routine benutzt. In beiden Fällen wurde der "sheath li-



ABBILDUNG 5.3.: Foto der Ionenfallen LC-MS Anlage.

quid" Fluss von  $25 \mu\text{Lmin}^{-1}$  eingestellt, um diese Parameter unter realistischen Bedingungen zu ermitteln. Eine Übersicht über die Methodenparameter gibt Tab. 5.9. Die Kalibrierung des LCQ Massendetektors erfolgte regelmäßig nach 4–6 Monaten entsprechend den Vorgaben des Herstellers unter Verwendung einer vorgegebenen Kalibrationslösung (Ultramark1621, MR-FA, Koffein)<sup>1</sup>. Zur Überprüfung der Kalibration und der spezifizierten Empfindlichkeit des Detektors, wurden Schleifeninjektionen mit Reserpin als Referenzsubstanz unter den vom Hersteller vorgegebenen Standardbedingungen durchgeführt.

#### 5.4.5. Triple Quadrupol LC-MS

Das System besteht aus einer Agilent 1100 HPLC Anlage (Agilent Technologies), gekoppelt an ein TSQ Quantum Massenspektrometer (ThermoFinnigan) mit einem Triple Quadrupol Massenfilter (Kap. 3.3.4) und einer ESI-Quelle (Kap. 3.3.2) als Interface (Abb. 5.4). Die verwendete Chromatographie-Methode ist in Kap. 5.4.3 dargestellt. Die Injektion des Probevolumens von  $20 \mu\text{L}$  erfolgte durch einen programmierbaren HTC Pal Autosampler (CTC Analytics). Die MS-Datenaufnahme, die Steuerung des LC-MS Systems und die Auswertung der MS-Daten erfolgte mit der Software Xcalibur 1.3 (ThermoFinnigan). Die Verbindung der HPLC zum Massendetektor erfolgte über ein T-Stück, das als Flussteiler fungierte und  $100 \mu\text{Lmin}^{-1}$  des Elutionsvolumens zum Massendetektor leitete, die anderen  $400 \mu\text{Lmin}^{-1}$  wurden verworfen. Als "sheath gas" und "auxiliary gas" wurde Stickstoff verwendet, der durch einen ölfreien Luft-Kompressor (2000-40, Jun-Air) mit nachgeschalteter Membranfilteranlage (ECO-Inert ESP2, DWT) bereitgestellt wurde.

Die Parameter für die ESI-Quelle wurden durch manuelle Injektionen aus einer  $10 \mu\text{L}$  Probenschleife in den gesplitteten HPLC-Eluenten ermittelt. Die optimalen Kollisions-

<sup>1</sup>Ultramark1621 ist ein perfluorierter Massenstandard; MRFA ist ein Tetrapeptid

TABELLE 5.9.: Methodenparameter des Ionenfallen MS

MS-Fluss	40 $\mu\text{Lmin}^{-1}$
Ionenquelle	ESI
Sheath liquid	25 $\mu\text{Lmin}^{-1}$ MeOH
Sheath gas	80 Einheiten Stickstoff
Auxiliary gas	0 Einheiten Stickstoff
Capillary Voltage	4,5 kV
Capillary Temp	250 °C
MS Scan Modus	Full Scan $m/z = 100-810$
Polarität	negativ (-)
Datentyp	centroid
MS Tune Parameter	semi-automatische Software Tuning Routine mit G6P Lösung
MS <sup>n</sup> -Kollisionsenergien	semi-automatische Software Routine mit Standard-Lösung
ESI Parameter	Optimierung durch 10 $\mu\text{L}$ Schleifeninjektion (manuell)



ABBILDUNG 5.4.: Foto der Triple Quadrupol LC-MS Anlage.

TABELLE 5.10.: Methodenparameter des Triple Quadrupol MS

MS-Fluss	100 $\mu\text{Lmin}^{-1}$
Ionenquelle	ESI
Sheath gas	50 Einheiten Stickstoff
Auxiliary gas	15 Einheiten Stickstoff
Capillary Voltage	4,0 kV
Capillary Temp	375 °C
MS Scan Modus	multiple reaction monitoring (MRM)
Polarität	negativ (-)
Datentyp	centroid
ESI Parameter	Optimierung durch 10 $\mu\text{L}$ Schleifeninjektion (manuell)
Tube Lens Offset	automatische Software Optimierung nach manueller 10 $\mu\text{L}$ Schleifeninjektion mit G6P
MS Kalibrations-Parameter	automatische Software Tuning Routine mit Polytyrosin Lösung
MS <sup>2</sup> -Kollisionsenergien	automatische Software Optimierung unter Verwendung der auto-loop injection Software Option
Q2 Kollisionsgas	Argon 1,5 mTorr
Isolierungsbreite	1.5 amu (atomic mass unit)
Scan Zeit	150 ms je SRM
Q1 + Q3 Peakbreite	0.7 amu
MS-Ventilschaltung	MS (0–13,5 und 20–40 min); Verwurf (13,5–20 und 40–60 min)

energien wurden durch Injektion aus einer 10  $\mu\text{L}$  Probenschleife mit einer Standard-Lösung (Eluent A 98 %, Eluent B 2 %) unter Verwendung der auto-loop injection Software Option bestimmt. Die Optimierung der tube lens offset Spannung wurde nach manueller Injektion aus der 10  $\mu\text{L}$  Probenschleife mit einer 100  $\mu\text{M}$  G6P Standard-Lösung (Eluent A 98 %, Eluent B 2 %) von der Software automatisch durchgeführt. Obwohl die tube lens offset Spannung einen massenabhängigen Parameter darstellt, wird die Optimierung nur für eine Masse durchgeführt, da die Software eine entsprechende Korrektur für die Transmission anderer Massen automatisch vornimmt.

Um unnötige Verunreinigungen vom Detektor fernzuhalten, wurden die zeitlichen Abschnitte von 13,5–20 und von 40–60 Minuten des chromatographischen Laufes direkt verworfen. Dazu wurde das am Gerät integrierte schaltbare Mehrwege-Ventil benutzt. Tab. 5.10 gibt eine Übersicht über die MS Methodenparameter, die substanzspezifischen MS/MS Parameter sind in Tab. 5.11 dargestellt. Die Kalibrierung des TSQ Quantum Massendetektors erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers unter Verwendung einer Poly-Tyrosin Kalibrationslösung (Tyr, Tyr<sub>3</sub>, Tyr<sub>6</sub>). Zur Überprüfung der Kalibration und der spezifizierten Empfindlichkeit des Detektors wurden Schleifeninjektionen mit Reserpin als Referenzsubstanz unter den vom Hersteller vorgegebenen Standardbedingungen durchgeführt.

TABELLE 5.11.: Substanzspezifische MS/MS Parameter des Triple Quadrupol MS

Analyt	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)	Kollisionsenergie [eV]
Pyr	87,1	43,0	10
PEP	167,0	79,0	13
DHAP/GAP	169,1	97,0	10
2PG/3PG	185,1	79,0	35
P5P	229,1	97,0	15
G6P/F6P	259,1	97,0	17
6PG	275,1	97,0	17
FBP	339,1	97,0	20
AMP	346,2	79,0	35
ADP	426,2	134,0	25
ATP	506,2	158,9	33
NAD	662,4	540,1	17
NADP	742,4	620,0	17
PP	163,2	91,0	10
L-Phe	164,2	147,0	12
DHS	171,1	127,0	12
SHI	173,1	93,0	17
L-Tyr	180,2	162,9	15
DHQ	189,1	170,8	12
L-Trp	203,2	116,0	17
DAH	207,2	87,0	12
S3P	253,1	97,0	17
DAHP	287,1	79,0	45

#### 5.4.6. Durchführung der Standard-Additions-Methode für die Quantifizierung der HPLC-MS Messung

Die Quantifizierung mit der Standard-Additions-Methode wurde nicht für jede einzelne Probe, sondern für eine ganze Sequenz durchgeführt (= 1 Pulsexperiment mit schneller Probenahme). Die Standard-Additions-Methode wird bei Matrix belasteten Proben zur Korrektur der Einflüsse der Probenmatrix während der quantitativen Messung eingesetzt [9]. Dazu wurde ein Gemisch von Probenmaterial aus der Zeit vor dem Glukosepuls als Matrix-Hintergrund verwendet, der als sogenannte Null-Probe (Nr. 0) fungierte. Zu 6 Proben von je 100  $\mu\text{L}$  des Matrix-Gemisches wurden 0, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{L}$  einer Standard-Lösung zugesetzt und die Proben bis zu einem Volumen von 150  $\mu\text{L}$  mit Wasser aufgefüllt<sup>2</sup>.

Die Auftragung der gemessenen Peakfläche über der Probennummer der Standard-Addition ergab einen linearen Zusammenhang, und aus den Parametern der ermittelten Geradengleichung konnte die Konzentration in der Null-Probe berechnet werden. Damit konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration und der gemessenen Peakfläche abgeleitet werden, und diese Kalibrierfunktion wurde für die Berechnung der Metabolit-Konzentration in den Proben der Sequenz verwendet. Dabei war zu beachten, dass die Konzentration, die in der Nullprobe ermittelt wurde, der Konzentration vor der Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Wasser entsprach. Nach der Zugabe besaß die real gemessene Probe eine um  $\frac{150 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} = 1,5$  kleinere effektive Konzentration [47]. Dieser Umstand musste bei der Aufstellung der Korrelation zwischen Konzentration und Peakfläche berücksichtigt werden.

---

<sup>2</sup>Verfahren der kontinuierlichen Variation des Standards bei konstantem Gesamtvolumen.



## 6. Ergebnisse und Diskussion

### 6.1. Entwicklung und Etablierung der analytischen Techniken

#### 6.1.1. Quantitative $^1\text{H}$ -NMR für die Fermentationsanalytik

Für die Chemie stellt die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) ein wichtiges, wenn nicht das wichtigste Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung von Syntheseprodukten, Naturstoffisolaten und anderen strukturellen Fragestellungen dar [21]. Sie kann jedoch auch für die Untersuchung biologischer und biotechnologischer Fragestellungen eingesetzt werden [43, 49, 93, 147, 161]. Die chemische Verschiebung der Signale und die Signal-Multiplizität enthalten Informationen über die Struktur der gemessenen Verbindung. Durch den Bezug auf das Signal einer Referenzsubstanz (interner Standard), wie z.B. Tetramethylsilan, stellt die chemische Verschiebung eine von der Messfrequenz bzw. Magnetfeldstärke unabhängige Größe dar, die für den betrachteten Kern in seiner chemischen Umgebung charakteristisch ist [83]. Neben dieser qualitativen bietet die  $^1\text{H}$ -NMR auch eine quantitative Information. Die Fläche unter der Absorptionskurve eines Protonensignals ist ein Maß für die Intensität des Übergangs und wird zur Bestimmung der dem Signal zugrunde liegenden Protonenzahl herangezogen. Bei bekannter Konzentration und Protonenzahl eines internen Standards kann nun auch die Konzentration der in der Probe enthaltenen Substanzen einfach berechnet werden.

Umgekehrt betrachtet, erlaubt die  $^1\text{H}$ -NMR Technik die qualitative und quantitative Behandlung von Fragestellungen, bei denen die zu untersuchenden Verbindungen nicht als Standard verfügbar sind und daher nicht zur Kalibration herangezogen werden können. Die substanzspezifischen Daten der  $^1\text{H}$ -NMR Spektren für die Qualifizierung können der Literatur entnommen werden, und die Quantifizierung erfolgt über die Konzentration des internen Standards. Mit diesem Ansatz wurde von Zaja [191] eine quantitative Fermentationsanalytik für die Bestimmung von Metaboliten der Aromatenbiosynthese im Fermentationsüberstand von *E. coli* etabliert [49, 51]. Mit Ausnahme von Shikimat ist kein Metabolit des Shikimat-Weges kommerziell erhältlich, und ihre Darstellung ist aufgrund der hohen chemischen Funktionalisierung aufwendig und zeitintensiv. Dennoch war ein rascher analytischer Zugang notwendig, um der Stammentwicklung für die L-Phe Prozessentwicklung neue Impulse zu geben.

##### 6.1.1.1. Probenvorbereitung

Um das unerwünschte  $\text{H}_2\text{O}$  Signal bei der NMR-Messung der wässrigen Proben zu unterdrücken, wird bei der Probenvorbereitung das  $\text{H}_2\text{O}$  aus der Probe gegen Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ausgetauscht [176]. Das  $\text{D}_2\text{O}$  enthält eine Konzentration von 4 mM TSP (3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-d-propionsäure) als internen Standard [51]. Für die Entfernung von  $\text{H}_2\text{O}$  aus den Proben wurden Versuche mit Gefriertrocknung und Vakuumzentrifugation durchgeführt.

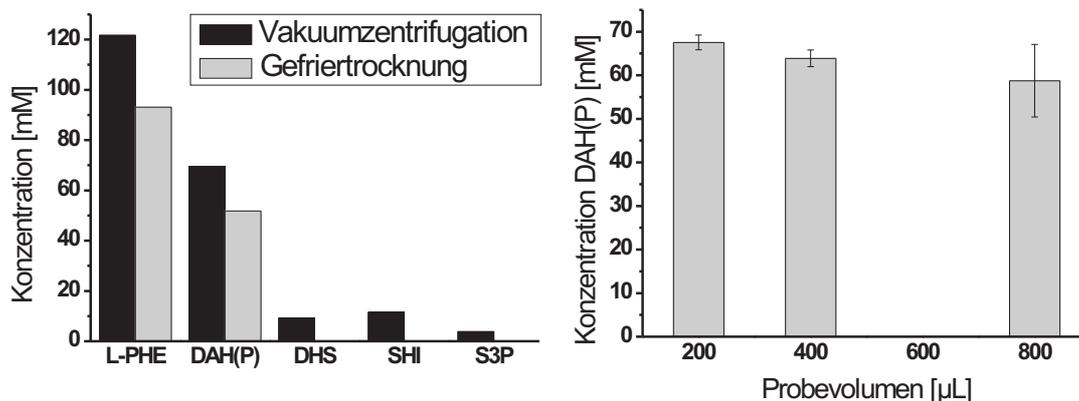


ABBILDUNG 6.1.: Probenvorbereitung mittels Gefriertrocknung und Vakuumentrifugation (links); Test verschiedener Probenvolumina bei Vakuumentrifugation (rechts), Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung einer Dreifachbestimmung

Als Probe wurde ein Fermentationsüberstand des L-Phe Produktionsstammes 4pF26 verwendet (Abb. 6.1, links). In den Proben der Vakuumentrifugation konnten eine höhere Konzentration des Hauptprodukts L-Phe, sowie Shikimat (SHI), DHS, DAH(P)<sup>1</sup> und S3P als Nebenprodukte identifiziert werden. Die gemessenen Konzentrationen von L-Phe und Shikimat stimmten mit denen der HPLC Messungen überein. Darüber hinaus hat das Verfahren der Vakuumentrifugation den Vorteil der einfacheren Durchführung in der Laborpraxis und wurde im Folgenden für die Probenvorbereitung verwendet.

#### 6.1.1.2. Einfluss der biologischen Matrix und der Trocknungsdauer

Obwohl der Fermentationsüberstand zentrifugiert und damit zellfrei war, stellte er eine komplexe biologische Probenmatrix dar, die z.B. noch Proteine enthielt, und deren Einfluss auf die <sup>1</sup>H-NMR Messung getestet werden sollte. Dazu wurden 200, 400 und 800 µL DAH(P) haltiger Fermentationsüberstand aus der Fermentation von *E. coli* 5pF15 bis zur Trockenheit in der Vakuumentrifuge eingeengt, in 800 µL D<sub>2</sub>O/TSP Lösung aufgenommen und dreifach gemessen. Die Mittelwerte der bestimmten Konzentrationen aller drei Proben lagen innerhalb eines Bereiches von etwa 10 % (Abb. 6.1, rechts).

Bei den Proben mit 200 und 400 µL zeigte sich eine verbesserte Reproduzierbarkeit ( $\leq 3\%$ ) im Vergleich zu der unverdünnten 800 µL Probe (14 %). Die Verdünnung der Probe führte zwar zu einer höheren Präzision der Messung, gleichzeitig war eine Anhebung der Nachweisgrenze damit verbunden, wodurch Nebenprodukte in kleinerer Konzentration vielleicht nicht mehr erfasst wurden. Um beide Aspekte zu berücksichtigen, wurde das Probenvolumen daher auf 400 µL festgelegt. Aus Experimenten, bei denen die Trocknungsdauer in der Vakuumentrifuge untersucht wurde (Ergebnisse nicht dargestellt), ging hervor, dass die Trocknungszeit in der Vakuumentrifuge für ein Probenvolumen von 400 µL in der Regel 2 h betrug. Innerhalb dieses Zeitraums wurde keine signifikante Abnahme der Wiederfindungsrate verschiedener

<sup>1</sup>Gemeinsamer Pool von DAHP und seinem dephosphorylierten Derivat DAH

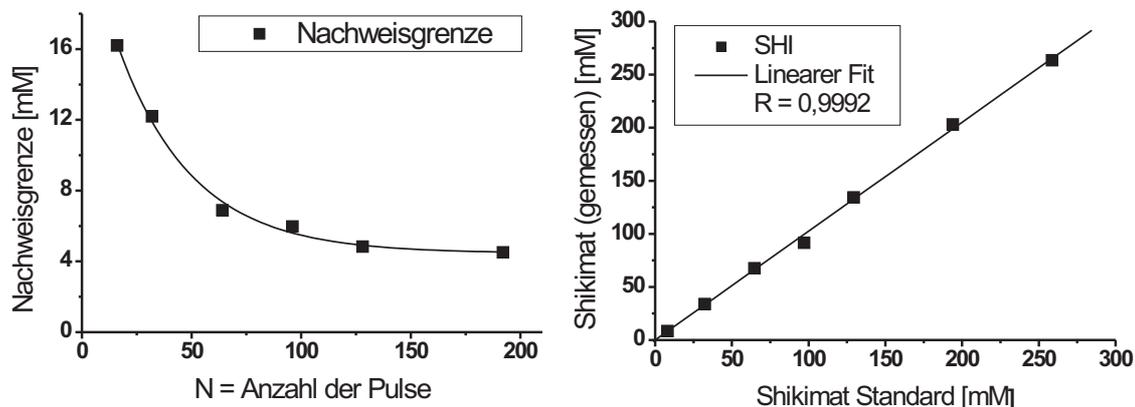


ABBILDUNG 6.2.: Nachweisgrenze für Shikimat in Abhängigkeit von der Pulsanzahl N (links) und lineare Kalibrationsfunktion einer Shikimat Standardreihe (rechts)

Metaboliten beobachtet.

#### 6.1.1.3. Bestimmung der Nachweisgrenze und des Linearitätsbereiches

Die erzielbare Nachweisgrenze für die  $^1\text{H}$ -NMR Messung hängt sehr stark von der Magnetfeldstärke bzw. Messfrequenz des Gerätes und von der Anzahl der Pulse (N) ab, mit der die Probe vermessen wird. Außerdem spielt natürlich die Signalmultiplizität des zugrunde liegenden Signals eine Rolle, da die Signalhöhe mit der Anzahl der Aufspaltungen sinkt. Die Magnetfeldstärke/Messfrequenz ist technisch durch das Gerät, die Signalmultiplizität durch die chemische Struktur des Analyten vorgegeben, jedoch sinkt die Nachweisgrenze durch Vergrößerung der Pulszahl pro Messung, da das Signal mit N zunimmt, das Rauschen jedoch nur mit  $\sqrt{N}$ . Als Nachweisgrenze wurde ein Signal zu Rausch Verhältnis von drei festgelegt.

Der Verlauf der ermittelten Nachweisgrenze für eine Shikimat-Lösung in Abhängigkeit von N zeigt, dass die Nachweisgrenze mit zunehmendem N sinkt (Abb. 6.2, links). Die Nachweisgrenze sinkt dabei aber nicht linear, so dass zwischen 96 und 192 Pulsen nur eine sehr geringe Verbesserung zu erzielen ist, und so wurde für die weiteren Messungen mit einer Pulszahl von  $N = 96$  ein Kompromiss zwischen Nachweisgrenze und benötigter Messzeit gewählt. Die Linearität der  $^1\text{H}$ -NMR Messung wurde durch Aufnahme einer Shikimat Wasserstandardreihe im Konzentrationsbereich von 10–260 mM überprüft und ist als Phasendiagramm dargestellt (Abb. 6.2, rechts.)

#### 6.1.1.4. Direkter Vergleich zwischen $^1\text{H}$ -NMR und HPLC mit realen Fermentationsproben

Die Konzentrationen der Metaboliten Shikimat, Acetat und L-Phe können in Fermentationsproben durch die bereits existierenden HPLC Methoden bestimmt werden (Kap. 5.3.1, 5.3.2). Dadurch bietet sich die Möglichkeit, die eingeführte  $^1\text{H}$ -NMR Methode durch vergleichende Messungen mit einem alternativen, unabhängigen Messverfahren zu überprüfen. Dazu wurden Proben der Fermentation des L-Phe Produzenten *E. coli* 4pF20 als Testsystem

TABELLE 6.1.:  $^1\text{H}$ -NMR Daten der Metaboliten des L-Phe Biosynthesewegs

Metabolit	Quelle der NMR-Daten	Verwendetes Signal für Quantifizierung
DAHP / DAH	[67] [12]	$\delta = 1.83$ und $2.28$
DHQ	[82]	nicht detektiert
DHS	[51]	$\delta = 3.93$ und $6.35$
SHI	kommerzieller Standard	$\delta = 2.75$ und $4.4$
S3P	[11]	nicht detektiert
EPSP	[19]	nicht detektiert
Chorismat	kommerzieller Standard	nicht detektiert
Prephenat	kommerzieller Standard	nicht detektiert
Phenylpyruvat	kommerzieller Standard	nicht detektiert
L-Phenylalanin	kommerzieller Standard	nicht detektiert

gewählt und mit beiden Methoden gemessen (Abb. 6.3). Für L-Phe und das Nebenprodukt Acetat zeigen die Ergebnisse eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Verfahren, für Shikimat ist im Bereich bis etwa 15 h eine deutliche Abweichung festzustellen. Aufgrund von überlagernden Signalen in der NMR Messung wurde dort fälschlicherweise eine zu hohe Konzentration gemessen, für Shikimat wurde deshalb keine lineare Regressionsgerade im Phasendiagramm dargestellt. Dieser Unterschied ist im späteren Fermentationsverlauf (nach 15 h) nicht mehr von Bedeutung, und die Daten zeigen auch hier eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren.

Die Problematik der Überlagerung von Signalen in der NMR Messung und damit verbundene Schwierigkeiten bei der Auswertung war bei vielen der zu untersuchenden Metaboliten der Aromatenbiosynthese gegeben. Neben der Probenmatrix der Fermentationsproben war ihr Gehalt an Glukose ein zusätzliches Problem. Glukose wurde als Substrat in den Fermentationen eingesetzt, und seine Signale machten die Auswertung im Bereich der chemischen Verschiebung von  $\delta = 3.3$ – $4$  nahezu unmöglich. Für die Identifizierung und vor allem die Quantifizierung mussten aus den Literatur NMR-Daten der zu untersuchenden Metaboliten daher diejenigen identifiziert werden, deren chemische Verschiebung in einem möglichst "freien" Bereich der NMR-Spektren der Fermentationsüberstände lagen. Diese Bereiche lagen häufig unterhalb von  $\delta = 3.3$ , zwischen  $\delta = 3.3$  und dem HDO-Signal ( $\delta = 4.8$ ) und jenseits des HDO-Signals. Dementsprechend sind die ausgewählten substanzspezifischen Signale für die Quantifizierung in diesen Bereichen zu finden.

In Tab. 6.1 sind die untersuchten Metaboliten zusammen mit der Quelle der NMR Literaturdaten und den für die Quantifizierung verwendeten Signalen dargestellt. Mit der Etablierung dieser quantitativen Analytik zur Untersuchung der Fermentationsproben der L-Phe Produktionsstämme und durch die Bestimmung des Nebenproduktspektrums bot sich die Möglichkeit, limitierende Schritte im Aromatenbiosyntheseweg durch Messung der akkumulierten Intermediate im Fermentationsüberstand zu identifizieren, und damit Impulse für eine gezielte Verbesserung der Produktionseigenschaften der Stämme zu geben (Kap. 6.3).

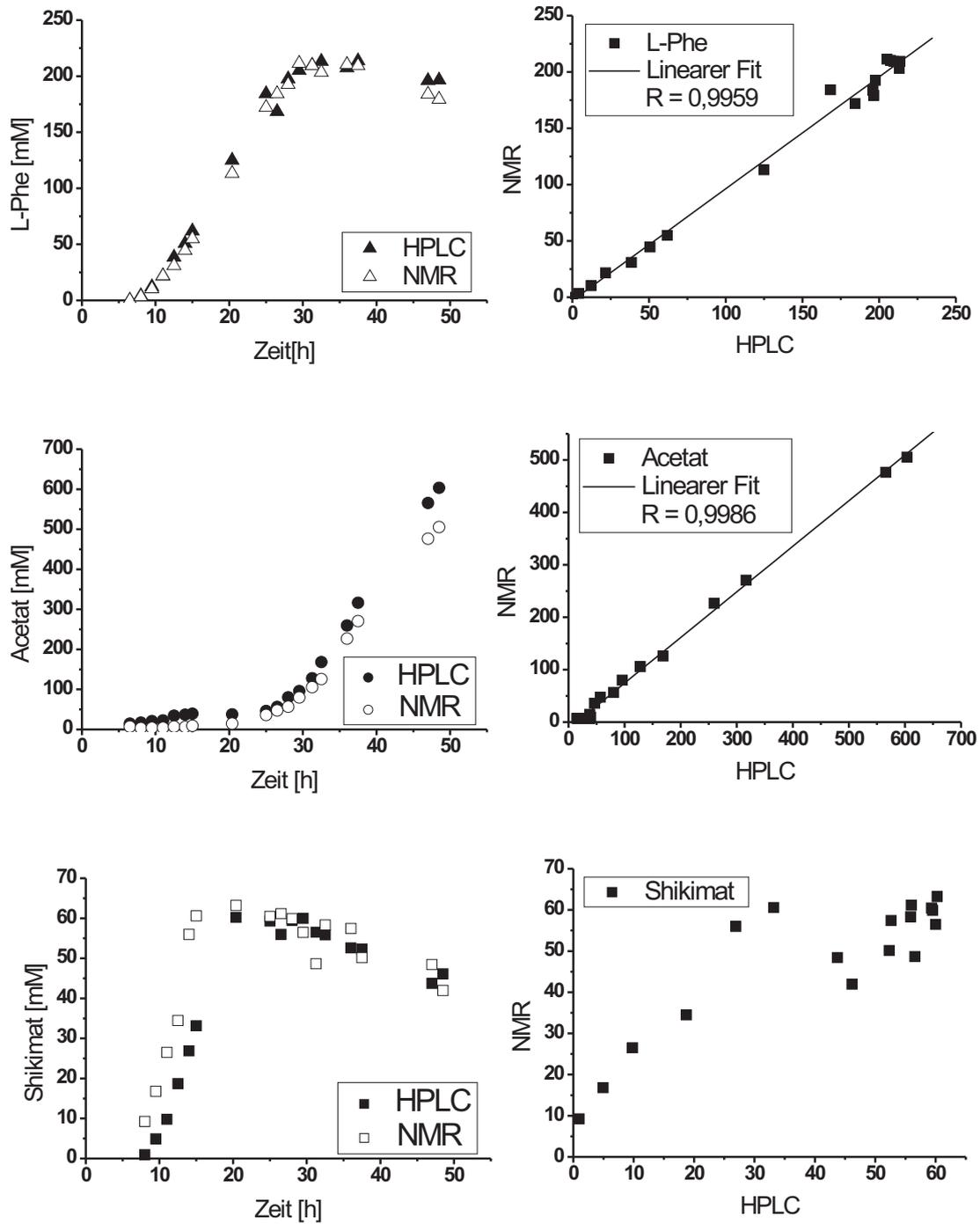


ABBILDUNG 6.3.: Vergleich zwischen  $^1\text{H}$ -NMR und HPLC Daten mit realen Fermentationsproben von *E. coli* 4pF20; Konzentrationen im Fermentationsverlauf (links) mit Phasendiagrammen (rechts)

### 6.1.2. HPLC–MS (Triple Quadrupol) für die intrazelluläre Analytik

Die Einsatzmöglichkeiten eines HPLC–MS Systems für die intrazelluläre Analytik von Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel sind bereits mit einem Ionenfallen MS–System untersucht worden [23]. Wie bereits in Kap. 3.3.3 dargestellt, kann mit der Ionenfallentechnik im Vergleich zu MS–Geräten mit Triple Quadrupol Technik nur eine geringere Empfindlichkeit erzielt werden, und daher zeigen sie Nachteile im Bereich der Quantifizierung. Besonders gravierend wirken sich diese Aspekte im Bereich kleiner Metaboliten ( $< 400 \text{ g mol}^{-1}$ ) aus. Gerade für die Metabolitanalytik ist das jedoch ein problematischer Aspekt, da viele Metaboliten des Zentralstoffwechsels (Glykolyse, Pentose–Phosphat–Weg) und auch von anabolen Biosynthesewegen (z.B. Aromatenbiosynthese) eine Molmasse im Bereich von  $< 400 \text{ g mol}^{-1}$  haben.

In ersten Untersuchungen mit der Ionenfallen LC–MS wurde deutlich, dass das MS System voraussichtlich keine ausreichende Empfindlichkeit besitzen würde, um die Metaboliten der Aromatenbiosynthese auf intrazellulärem Niveau erfassen zu können. Mit der Triple Quadrupol MS Technik (Kap. 3.3.4) können die höchsten Empfindlichkeiten erreicht werden, daher wurde die neue Analytik mit diesem System aufgebaut. Auf der Seite der HPLC wurde auf die von Buchholz *et al.* [23] etablierte Methode zurückgegriffen (Kap. 5.4.3), da die Metaboliten der L–Phe Biosynthese unter diesen Bedingungen vergleichbare Retentionszeiten wie die bereits in der Methode etablierten Metaboliten des Zentralstoffwechsels zeigten. Auf der Seite der MS wurden zunächst die Parameter der ESI–Quelle an die Bedingungen der HPLC adaptiert. Anschließend wurden die substanzspezifischen MS/MS Parameter der Metaboliten des Zentralstoffwechsels für das Triple Quadrupol MS etabliert und im zweiten Schritt durch die Parameter der Metaboliten der L–Phe Biosynthese erweitert.

#### 6.1.2.1. Optimierung der ESI Parameter

Die Optimierung der Parameter der ESI ist von großer Bedeutung für die Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Quantifizierbarkeit der Messungen. Die Ionenbildung im Elektrospray sollte sehr gleichmäßig erfolgen (= stabiles Spray) und dabei eine möglichst hohe Ionisierungseffizienz aufweisen. Als wichtige Einfluss–Parameter für die Ionisierung an dem verwendeten Triple Quadrupol MS sind zu nennen: Volumenfluss von der HPLC, Stickstoff–Ströme des ‘sheath’–(Mantel) und ‘auxiliary’–Gases für die Vernebelung, die Spannung an der ‘tube lens’ und die Spannung bzw. Temperatur an der Kapillare. Die beiden letzten Parameter kontrollieren maßgeblich die Überschuss–Ladung auf den gebildeten Tropfen bzw. den Temperatur bedingten Energieeintrag bei der Ionenbildung.

Außer der ‘tube lens’ Spannung handelte es sich um klassische ESI–Quellen Parameter, die weitgehend unabhängig vom  $m/z$  Verhältnis der Analyt–Ionen waren. Die ‘tube lens’ Spannung hatte sowohl die Aufgabe, verbliebene Ionencluster durch Stöße mit Gasmolekülen zu zerschlagen, als auch ein Maximum aller bis dahin bereits gebildeten Ionen in Richtung auf die Quadrupole zu transmittieren. Die optimalen Transmissionseigenschaften dieser elektromagnetischen Linse waren aber vom  $m/z$  Verhältnis der Ionen abhängig. Es genügte hierbei jedoch die Kalibrierung für ein  $m/z$ , aus der dann der optimale Wert für den vollständigen  $m/z$  Bereich von der Software abgeleitet werden konnte. Die Eigenschaft der Entclusterung stellt in erster Näherung eine Energiezufuhr dar, weshalb zwischen der

Kapillartemperatur und der 'tube lens' Spannung eine starke Korrelation bestand, dessen Abhängigkeit im Verlauf der Optimierung nicht vernachlässigt werden durfte. Die Erhöhung der Kapillartemperatur führte unabhängig von  $m/z$  oder den Eigenschaften des Analyten zu einer signifikanten Verringerung der optimalen Einstellung für die 'tube lens' Spannung.

Der vollständige Optimierungszyklus für jeden Parameter wurde daher in der Regel dreimal durchlaufen, um den optimalen Wert für alle Parameter zu erzielen und die Korrelationen der Parameter untereinander zu berücksichtigen. Nach drei Zyklen konnte in der Praxis ein nahezu optimaler Parametersatz für die ESI-Quelle ermittelt werden. Die Optimierung geschah dabei durch wiederholte Messung der MS-Peakfläche nach Injektion einer Standardlösung aus einer 10  $\mu\text{L}$  Probenschleife, wobei nach jeder Injektion ein Parameter variiert wurde. Obwohl in der Software eine Teilautomatisierung dieses Schrittes vorgesehen war, sollte die Optimierung eines Parametersatzes wenigstens einmal *von Hand* erfolgen, da die Ionenbildung letztlich vom Verständnis über die Chemie im Tropfen des Elektrosprays abhängt.

Aufgrund der neuen orthogonalen Spraygeometrie der ESI-Quelle und der Vorgabe des MS Herstellers ThermoFinnigan, dass die Quelle auch mit höheren HPLC Flüssen von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  betrieben werden konnte, wurde die Optimierung der Quellenparameter mit diesem HPLC Fluss begonnen und mit dem ermittelten optimalen Parametersatz eine LC-MS Methode erstellt. Die neue LC-MS Methode wurde als erstes mit einem Reproduktionstest durch wiederholte Injektion einer Standard-Lösung (6PG, FBP, P5P, AMP) überprüft (Abb. 6.4). Die Ergebnisse zeigten eine sukzessive Abnahme der Empfindlichkeit für alle untersuchten Metabolite. In einem Zeitraum von 24 h (= 24 Proben) wurde für alle Analyten eine Abnahme der MS Peakfläche um den Faktor 2 verzeichnet. Es wurde vermutet, dass der für ESI sehr hohe HPLC Fluss von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  in Verbindung mit einem hohen Wasseranteil des Eluenten von bis 98 % zu einer zunehmenden Kontamination des Hochvakuums im Massendetektor führte.

Der hohe Wasseranteil ist nachteilig für die ESI, da Wasser im Vergleich zu typischen organischen LC-MS Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonitril und Isopropanol eine höhere Verdampfungsenthalpie besitzt<sup>2</sup>. Weiterhin ist die von Wasser ausgeübte Oberflächenspannung um den Faktor 3 größer als z.B. die von Methanol<sup>3</sup>. Beide Effekte, vor allem jedoch die sehr hohe Oberflächenspannung von Wasser, stehen der effizienten Vernebelung des Eluenten in der ESI-Quelle und damit der effektiven Ionisierung durch Elektrospray entgegen und zeichneten sich vermutlich hier für die sukzessiv abnehmende Empfindlichkeit des MS verantwortlich.

Zur Lösung des Problems wurde die Teilung des HPLC Flusses durch ein T-Stück getestet. Für ein Teilungsverhältnis von 1:5, d.h. einem Fluss von  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  in das MS, konnten reproduzierbare Messungen ermöglicht werden (Abb. 6.5). Bei  $n = 15$  Messungen wurden Standardabweichungen im Bereich von 5–8 % erzielt. Im Anschluss wurden die ESI Parameter erneut optimiert, um einen optimalen Parametersatz unter den durch den Flussteiler geänderten Flussbedingungen zu ermitteln. Dieser Parametersatz, der in Tab. 6.2 aufgeführt

---

<sup>2</sup>Verdampfungsenthalpie [6] :  $\Delta H_{\text{Wasser}} = 41$  bzw.  $\Delta H_{\text{Methanol}} = 35 \text{ kJ mol}^{-1}$

<sup>3</sup>Oberflächenspannung [6] :  $\gamma_{\text{Wasser}} = 7.3$  bzw.  $\gamma_{\text{Methanol}} = 2.3 \cdot 10^{-2} \text{ N m}^{-1}$

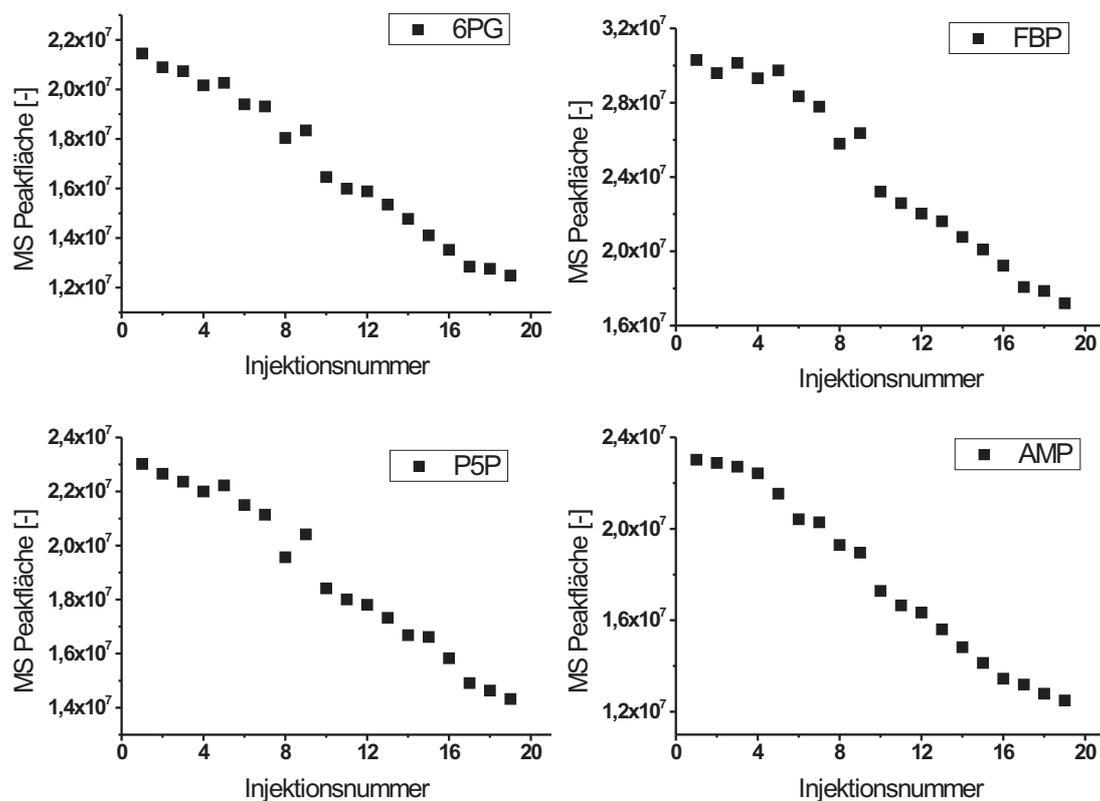


ABBILDUNG 6.4.: Abnehmende LC–MS Peakflächen der Mehrfachinjektion mit Volumenfluss von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  in die ESI–Quelle

ist, wurde in die LC–MS Methode übernommen.

#### 6.1.2.2. Optimierung der substanzspezifischen MS/MS Parameter

Neben der Optimierung der ESI Parameter mussten auch die substanzspezifischen Kollisionsenergien (KE) für die MS/MS Messung für jeden zu untersuchenden Analyten bestimmt werden. Im Q2, der Kollisionszelle des MS, werden die im Q1 selektierten Vorläufer–Ionen energetisch angeregt, was zum Bindungsbruch im Molekül führt. Die Ladung des Vorläufer–Ions geht dabei auf das Fragment über, das sie am besten stabilisieren kann, das andere elektrisch neutrale Bruchstück wird vom Vakuumsystem abgepumpt. In Abhängigkeit von der Anregungsenergie kann ein Spektrum verschiedener Fragment–Ionen für einen Analyten gefunden werden. Die Aufgabe der Optimierung bestand nun darin, für jeden Analyten das Fragment–Spektrum zu ermitteln und die für jedes Fragment optimale Kollisionsenergie zu bestimmen. In der Regel wurde das MS/MS Fragment selektiert, dessen Übergang die höchste Effizienz und damit das intensivste Signal lieferte. Die substanzspezifischen MS/MS Fragmente, der für die LC–MS Methode selektierte MS/MS Übergang und die dafür optimale KE für alle Analyten sind in Tab. 6.3 dargestellt.

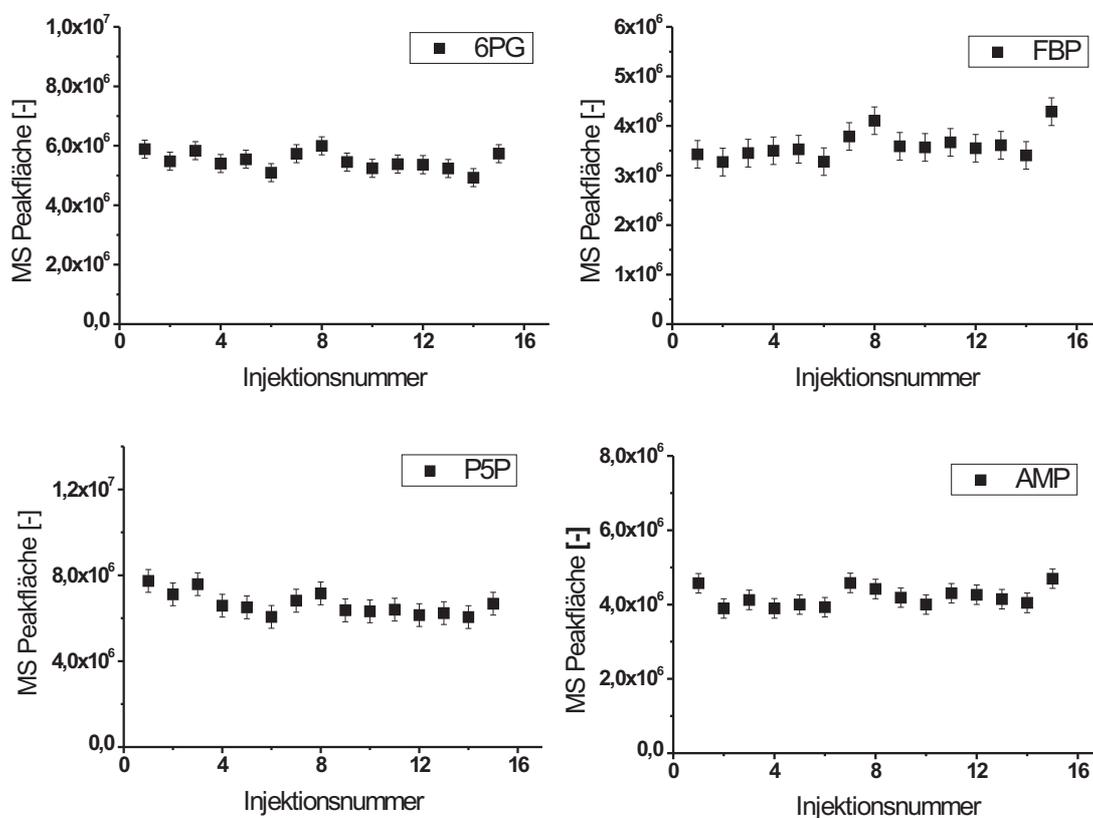


ABBILDUNG 6.5.: Konstante LC–MS Peakflächen der Mehrfachinjektion nach Einbau des Flussteilers mit einem Volumenfluss von  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  in die ESI–Quelle

TABELLE 6.2.: Optimierte ESI–Parameter für das Triple Quadrupol MS

MS–Fluss	$100 \mu\text{Lmin}^{-1}$
Ionenquelle	ESI
Sheath gas	50 Einheiten Stickstoff
Auxiliary gas	15 Einheiten Stickstoff
Capillary voltage	4,0 kV
Capillary temperature	$375 \text{ }^\circ\text{C}$
Tube lens offset	automatische Software Optimierung nach manueller $10 \mu\text{L}$ Schleifeninjektion mit G6P

TABELLE 6.3.: Substanzspezifische MS/MS Fragmente mit Triple Quadrupol MS

Analyt	$[M-H]^-$ (m/z)	intensive MS/MS Fragmente des Analyt-Ions (m/z)	selektiertes MS Fragment (m/z)	Optimale KE [eV]
PEP	167,0	79,0	79,0	13
Pyr	87,1	43,0	43,0	10
2PG/3PG	185,1	97,1 / 79,0	79,0	35
DHAP/GAP	169,1	97,1	97,1	10
FBP	339,1	97,1 / 79,0	97,1	20
6PG	275,1	97,1 / 79,0	97,1	17
P5P	229,1	97,1 / 79,0	97,1	15
G6P/F6P	259,1	97,1 / 79,0	97,1	17
ATP	506,2	407,8 / 158,8	158,8	33
ADP	426,2	158,9 / 134,1 / 79,0	134,1	25
AMP	346,2	133,9 / 97,1 / 79,0	79,0	35
NAD	662,4	540,2 / 328,3 / 273,2	540,2	17
NADP	742,4	620,0 / 408,2 / 272,6	620,0	17
DAHP	287,1	79,0	79,0	45
DAH	207,2	87,0	87,0	12
DHQ	189,1	170,8 / 152,9 / 127,2	170,8	12
DHS	171,1	152,9 / 127,0 / 109,2	127,0	12
Shikimat	173,1	154,9 / 143,0 / 137,0 / 129,1 / 111,0 / 93,0	93,0	17
S3P	253,1	234,9 / 155,0 / 97,1 / 79,0	97,1	17
PP	163,2	90,9	90,9	10
L-Phe	164,2	147,0 / 103,1	147,0	12
L-Tyr	180,2	162,9 / 119,0	162,9	15
L-Trp	203,2	186,1 / 159,0 / 141,9 / 116,0 / 74,1	116,0	17

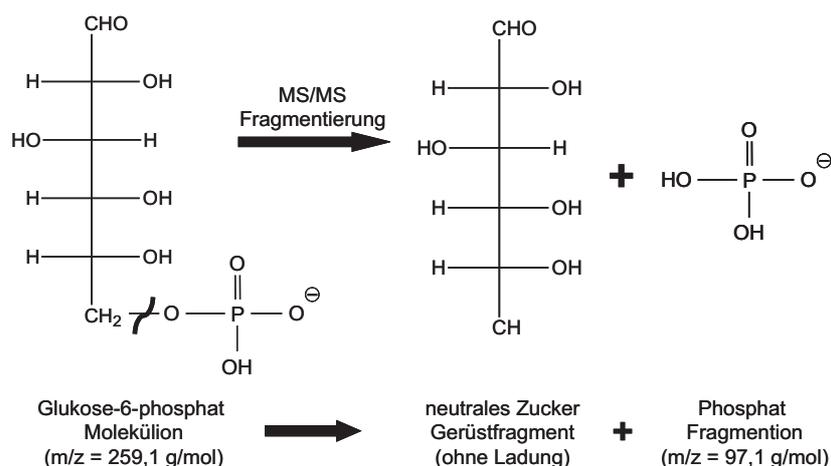


ABBILDUNG 6.6.: Phosphatabspaltung von Zuckerphosphat-Molekulationen am Beispiel des G6P

### Fragmentierungsmuster der Substanzklassen

An der Entstehung der Fragmentierungsmuster waren in der Regel nur eine begrenzte Zahl von unterschiedlichen Fragmentierungsreaktionen beteiligt. Für die Klasse der Zuckerphosphate (z.B. G6P, P5P, FBP, DAHP,...) wurde dabei als bevorzugte Fragmentierung die **Phosphat-Abspaltung** beobachtet. Der Zuckerrest wurde dabei sehr selten als Ladungsträger beobachtet, da die Phosphat-Gruppe aus energetischen Gründen viel geeigneter ist, die negative Ladung des Vorläufer-Ions zu stabilisieren. Eine sehr typische, jedoch eher untergeordnete Fragmentierung von Zuckerphosphaten ist die **Retro-Aldol-Reaktion**, bei der das Kohlenstoffgerüst zwischen zwei Hydroxy-Gruppen gespalten wird [62]. Die **Dehydratisierung** spielte bei den Zuckerphosphaten ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Alle drei Reaktionen wurden jedoch in aller Regel bei Zuckerphosphaten beobachtet, wodurch bereits sechs mögliche Fragmente entstanden. Unter Berücksichtigung aller möglichen Kombinationen von Fragmentierungsreaktionen, entstanden so mehr als zehn mögliche Fragmente für einen Analyten. Diese scheinbare Komplexität des Fragmentierungsmusters war jedoch meist relativ leicht durch die Kombination einfacher Einzelreaktionen zu rekonstruieren.

Die Klasse der organischen Säuren zeigte die **Decarboxylierung** als bevorzugte Fragmentierungs-Reaktion, sind im Molekül gleichzeitig noch Hydroxy-Gruppen enthalten (z.B. bei Shikimat, DHS, DHQ), konkurrierte sie mit der Dehydratisierung. Die Retro-Aldol-Reaktion wurde bei Molekülen wie Shikimat, DHS oder DHQ auch bei sehr hohen Anregungsenergien nicht beobachtet, obwohl diese Moleküle ebenfalls eine Anordnung von vicinalen Hydroxy-Gruppen tragen. Die bei der Retro-Aldol-Fragmentierung von G6P entstehenden Bruchstücke sind nur noch durch die halbacetalische C-O Bindung verbunden. Diese ist vermutlich leichter zu brechen, während bei den Bruchstücken der carbocyclischen Systeme noch eine weitere C-C Bindung für die Retro-Aldol-Fragmentierung gebrochen werden muss.

TABELLE 6.4.: Intensivste MS/MS Übergänge mit Triple Quadrupol bzw. Ionenfallen MS mit Bezug zum 30 % Limit der Ionenfalle

Analyt	$[M-H]^-$ (m/z)	30 % Limit (m/z)	optimales MS Fragment Ionenfalle (m/z)	optimales MS Fragment Triple Quadrupol (m/z)
FBP	339,1	101,7	241,0	97,1
AMP	346,2	103,9	211,1	79,0
DAHP	287,1	86,1	269,1	79,0
6PG	275,1	82,5	177,0	97,1
ATP	506,2	151,9	408,0	158,8
ADP	426,2	127,9	328,0	134,1

### Unterschiede der optimalen MS/MS Fragmente zwischen Triple Quadrupol und Ionenfallen MS

Wenn man die ermittelten optimalen Fragment-Ionen zwischen den beiden MS Systemen vergleicht, dann fallen einige Unterschiede auf. Im vorigen Abschnitt wurde aufgezeigt, dass die Phosphat-Abspaltung bei Zuckerphosphaten die bevorzugte Reaktion ist. Das Phosphat-Ion kann die Ladung des Vorläufer-Ions leichter stabilisieren als der Zuckerrest, und daher wurde das Phosphat-Ion mit  $m/z = 97,0$  als intensivster Übergang mit dem Triple Quadrupol MS detektiert. Legte man FBP als Beispiel zugrunde, so stimmte das für das Triple Quadrupol MS, jedoch wurde für die Ionenfalle der intensivste Übergang von  $m/z = 339,1$  zum Fragment mit  $m/z = 241,0$  ( $\Delta m/z = 98,1 \text{ g mol}^{-1}$ ) anstatt des Phosphat-Ions mit  $m/z = 97,0$  beobachtet. Dieser Unterschied ist nicht dadurch zu begründen, dass FBP in der Ionenfalle anders fragmentiert, die Reaktion ist (fast) die gleiche, nur wird hier Phosphorsäure (= 98 g/mol) abgespalten, und der Zuckerrest fungiert als Ladungsträger.

Die Ursache für diesen entscheidenden Unterschied liegt in den physikalischen Gesetzmäßigkeiten, denen das Funktionsprinzip der Ionenfalle unterliegt. In Kap. 3.3.3 wurde bereits darauf hingewiesen, dass nach der Fragmentierung in der Ionenfalle nur Fragment-Ionen stabil (speicherbar) sind, deren  $m/z$  nicht kleiner ist als etwa  $1/3$  des Vorläufer-Ions. Die Phosphat-Abspaltung ist für FBP auch in der Ionenfalle die bevorzugte Reaktion, sie kann aber vom Detektor nicht erfasst werden. Das Phosphat-Ion besitzt nur 28,6 % der Masse des FBP-Vorläuferions und ist damit zu klein, um nach der Fragmentierung in der Ionenfalle gespeichert zu werden, folglich kann es auch nicht detektiert werden. Das gleiche Problem existiert auch bei anderen Verbindungen (Tab. 6.4), wie z.B. FBP, AMP und DAHP, deren intensivstes Fragment-Ion unterhalb des 30 % Limits liegt. Jedoch auch bei Analyten deren intensivste Fragmente rein rechnerisch knapp über 30 % liegen, wie z.B. 6PG, ATP und ADP, findet man diese Fragmente nicht. Offenbar ist die Stabilität ihrer Fragmente in der Ionenfalle bereits so gering, dass sie nicht mehr den intensivsten MS/MS-Übergang darstellen. Diese Einschränkung der Ionenfallen MS gegenüber der Triple Quadrupol MS führt zu system-immanenten Nachteilen in Bezug auf die Empfindlichkeit und Quantifizierung.

### Spezielle Probleme bei der substanzspezifischen Fragment–Selektion

**Isobare Metaboliten :** Bei einigen Analyten aus dem Zentralstoffwechsel trat das Problem auf, dass sie sowohl in der Vorläufer–Masse, als auch im Fragmentierungsmuster nicht durch das MS zu unterscheiden waren (z.B. G6P/F6P). Auch bei Verwendung des Nucleodex  $\beta$ –OH Materials als stationäre Phase in der HPLC konnte keine chromatographische Trennung zwischen diesen strukturell sehr ähnlichen Analyten erzielt werden. Unter Verwendung einer Hypercarb–Phase konnten diese isobaren Metaboliten zwar chromatographisch getrennt werden, doch lag der Fokus der vorliegenden Forschungsarbeit nicht auf dem Zentralstoffwechsel, sondern auf der Analyse des Aromatenbiosynthesewegs. Daher wurde der Ansatz über die Hypercarb–Phase auch im Hinblick auf das hohe Probenaufkommen und die dafür benötigte Messzeit nicht weiter verfolgt. Aus diesem Grund war aus der LC–MS Messung nur die Gesamtkonzentration der isobaren Metaboliten G6P/F6P, DHAP/GAP sowie der Pool der drei Pentose–Phosphate (P5P)<sup>4</sup> zugänglich.

**DHQ und DHS :** In Bezug auf die LC–MS Messung von DHQ und DHS war eine wichtige fragmenttechnische Besonderheit zu beachten. Das MS/MS Fragment von DHQ folgt aus einer Dehydratisierung und entspricht DHS. Die ermittelte Kollisionsenergie von 12 zeigte, dass die Fragmentierungsreaktion offenbar sehr leicht abläuft und daher vielleicht bereits durch thermische Induktion in der ESI–Quelle erfolgte. Das würde zu einer falsch positiven Detektion von DHS führen. Die DHQ Messung blieb davon unbeeinflusst. Durch die Messung eines DHQ Standards konnte jedoch gezeigt werden, dass es zwar zu einer thermischen Reaktion in der ESI–Quelle kommt (parallele Identifizierung von DHS und DHQ), ein Vergleich der Peakflächen zeigte jedoch, dass diese Reaktion mit <5 % nur eine untergeordnete Rolle spielt. Von signifikanter Bedeutung wird sie erst, wenn in den gemessenen Proben die  $c_{DHQ} \gg c_{DHS}$  ist. Die intrazellulären Konzentrationen zeigen jedoch, dass  $c_{DHS} \geq c_{DHQ}$  ist, und daher kann für diese Nebenreaktion ein vernachlässigbarer Einfluss auf die Ergebnisse abgeleitet werden (Kap. 6.7.2, 6.7.3). Eine Variante, diese unerwünschte Dehydratisierung zu unterdrücken, ist die Verringerung der Kapillartemperatur in der ESI–Quelle, was jedoch zu einer deutlichen Verschlechterung der Ionisierungseffizienz der ESI–Quelle führte und deshalb nicht umgesetzt wurde.

**ATP und ADP:** Ein ähnliches Problem existierte bei ATP und ADP. Ebenfalls thermisch induziert reagierte ATP zu ADP, die Messung zeigte auch in diesem Fall, dass die Reaktion mit < 3 % lediglich eine untergeordnete Rolle spielte. Weiterhin waren ATP und ADP durch einen Retentionszeitunterschied von ca. 0,5 min chromatographisch separiert, und daher konnte bei der Auswertung zwischen dem ADP aus der Probe und dem potenziell thermisch induzierten ADP (aus ATP) unterschieden werden.

**SHI und Pyr:** Die Messung von Shikimat und Pyruvat wurde durch überlagernde Signale aus dem Untergrund der Probe beeinträchtigt, bei Pyruvat war die Störung so schwerwiegend, dass überhaupt keine Messung mittels der LC–MS möglich war. Die Störung wurde dabei nicht durch die Probe oder die Probenmatrix verursacht, sondern die Quelle schien eine Verunreinigung im Eluenten oder aus einem Bauteil der HPLC–Anlage gewesen zu sein.

<sup>4</sup>Die Abkürzung P5P repräsentiert den gemeinsamen Pool der Pentose-5-phosphate (Ribulose–5–phosphat, Ribose–5–phosphat, Xylulose–5–phosphat)

Für die Shikimat Messung stellte sich das Problem ähnlich dar, auch hier war eine Verunreinigung im System vorhanden, die im MS/MS Modus nahezu die gleichen Fragmente bildete wie das Shikimat. Einzige Ausnahme bildete das Fragment mit  $m/z = 93,0$ , das nur von Shikimat, aber nicht von der Verunreinigung gebildet wurde. Dieser MS/MS Übergang war nicht sehr effizient, aber er bot die Möglichkeit, das Untergrundsignal zu eliminieren, wodurch die Shikimat-Messung möglich wurde.

### 6.1.2.3. Quantifizierung mit der HPLC-MS (Triple Quadrupol)

Die LC-MS hat sich als hervorragendes Tool für die Bestimmung des Molekulargewichts und Fragmentierungsmusters von Analyten im Hinblick auf die Strukturaufklärung von Metaboliten bewährt [27]. Der Einsatz der LC-MS auch für die Quantifizierung ist unweigerlich mit der Problematik der Matrixefflüsse verknüpft. "Ion Suppression" ist hier der am häufigsten beobachtete negative Effekt, bei dem eine Abnahme des Analytsignals (z.B. Peakfläche) aufgrund der Wechselwirkung mit anderen Bestandteilen aus der Probe verursacht wird. Diese Effekte werden von Verunreinigungen in der Probenmatrix hervorgerufen und daher auch als Matrix-Effekte bezeichnet. Anders als bei der LC-UV Messung, bei der die Analyt-Signale bis zur Unkenntlichkeit von Matrix überlagert sein können, werden die Analyt-Signale bei der LC-MS nicht überlagert, sondern unterdrückt oder völlig eliminiert.

Um unter diesen Umständen eine zuverlässige Quantifizierung zu ermöglichen, kann ein interner Standard (ISTD) [193] verwendet werden. Dieser ISTD sollte dem Analyten chemisch soweit wie möglich ähneln, und in der LC-MS finden häufig Analyten mit stabiler Isotopenmarkierung (z.B.  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) Anwendung als ISTD. Er wird der Probelösung in bekannter Konzentration zugefügt, und aus dem Verhältnis der Peakflächen wird die Analyt-Konzentration berechnet. Sollen mehrere Analyten quantitativ bestimmt werden, so wird für jeden Analyten ein eigener ISTD benötigt. Spätestens hier ist man mit dem Problem konfrontiert, dass diese ISTD's in der Regel nicht kommerziell verfügbar sind und dass es in vielen Fällen, wie z.B. bei den Metaboliten der L-Phe Biosynthese, bereits schwierig ist, überhaupt die nicht markierten Analyten als Standard zu gewinnen.

Ein alternativer Ansatz zur Kompensation aller Matrix-Effekte für eine quantitative Messung ist die Anwendung der Standard-Additions-Methode (StdAddM) [9]. Dazu wird der Probelösung wiederholt eine Menge des Analyten zugesetzt (Spiken) und die Probe nach jeder Standard-Zugabe erneut gemessen. Aus dem Zusammenhang zwischen gemessener Peakfläche und zugefügtem Standard kann auf die Konzentration in der Probe vor der ersten Zugabe zurückgerechnet werden (Kap. 5.4.6). Im Vergleich mit dem ISTD-Verfahren hat die StdAddM den Nachteil, dass neben der eigentlichen Probe noch weitere Proben gemessen werden müssen, d.h. der Zeitbedarf für Messung und Auswertung ist größer als mit dem ISTD-Verfahren, bei dem eine einzige Messung genügt<sup>5</sup>. Mit Blick auf die Richtigkeit der Quantifizierung hat die StdAddM keine Nachteile und ist ein anerkanntes Verfahren bei matrixbelasteten Proben in der quantitativen Analyse (z.B. Photometrie, Atomabsorptionsspektroskopie, Polarographie) [153].

---

<sup>5</sup>Im Gegensatz zur ISTD-Quantifizierung ist die StdAddM nicht in den normalen Software Paketen der MS Hersteller implementiert, daher wird neben dem vergrößerten Messaufwand auch ein höherer Auswertungsaufwand notwendig.

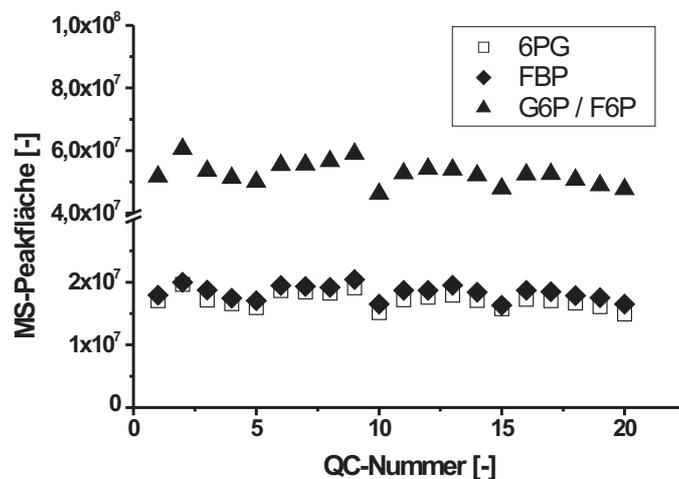


ABBILDUNG 6.7.: Peakflächen der Kontrollanalyten G6P/F6P, 6PG und FBP der Quality Control (QC)–Proben einer 5–tägigen Sequenz aus 111 Proben

Die Reproduzierbarkeit und Robustheit der Messung bilden die Grundlage für eine quantitative Messung. Im Verlauf einer Probensequenz darf die Empfindlichkeit der LC–MS Anlage daher nicht schwanken. Zur Kontrolle wurde nach jeder 5. bzw. 10. Probe einer Sequenz eine sog. Quality Control Probe (QC = gespikter Zellextrakt) programmiert, um die Funktion des Systems anhand der Kontrollanalyten G6P/F6P, 6PG und FBP zu überprüfen. In Abb. 6.7 sind die repräsentativen Peakflächen der drei Kontrollanalyten im Verlauf einer Sequenz mit 111 Proben über den Zeitraum von 5 Tagen dargestellt. Die Peakflächen waren über die gesamte Messzeit von insgesamt fünf Tagen konstant, die relative Standardabweichung für 6PG, FBP und G6P/F6P betrug 7.3, 6.4 und 7.0 %. Der Matrixhintergrund für die QC–Proben setzt sich aus Zellextrakten der aktuellen Probensequenz zusammen.

Die Quantifizierung mit der StdAddM wurde jedoch nicht für jede einzelne Probe, sondern für die ganze Sequenz durchgeführt, da es andernfalls zu einer Verfünffachung der Probenzahl gekommen wäre, die bzgl. der Messzeit nicht mehr zu bewältigen gewesen wäre. Innerhalb einer Probensequenz (= 1 schnelles Probenahmeexperiment, d.h. etwa 120 Proben) konnte jedoch in guter Näherung von einer unveränderten Probenmatrix ausgegangen werden, so dass diese Vorgehensweise gerechtfertigt war. Für die StdAddM wurden insgesamt sechs Proben gemessen (1 Probe + 5 Additionsschritte), mit denen dann eine lineare Regression durchgeführt und auf die Konzentration in der Ursprungsprobe zurückgerechnet wurde. In Abb. 6.8 sind Beispiele für die erhaltenen Korrelationen zwischen Ursprungsprobe (Nr. 0) und den Proben mit Zusätzen an Standard (Nr. 1–5) für die Metaboliten 6PG, DHQ, DHS und Shikimat dargestellt. Die vollständige experimentelle Durchführung und Auswertung der StdAddM ist in Kap. 5.4.6 dargestellt.

Mit der StdAddM konnte auch die Richtigkeit der LC–MS Analytik gezeigt werden, was

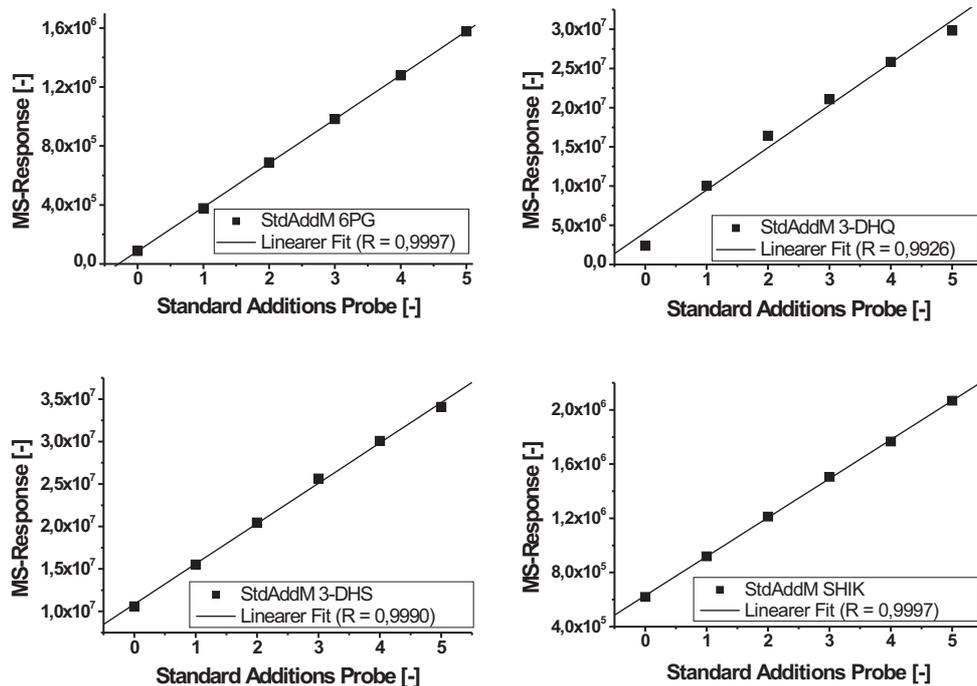


ABBILDUNG 6.8.: Beispiele für Kalibrationsgeraden der StdAddM; Geradengleichungen durch lineare Regression bestimmt (Probe Nr. 0 ist die Ursprungprobe, Proben 1–5 wurden sukzessive steigende Mengen an Standard zugesetzt)

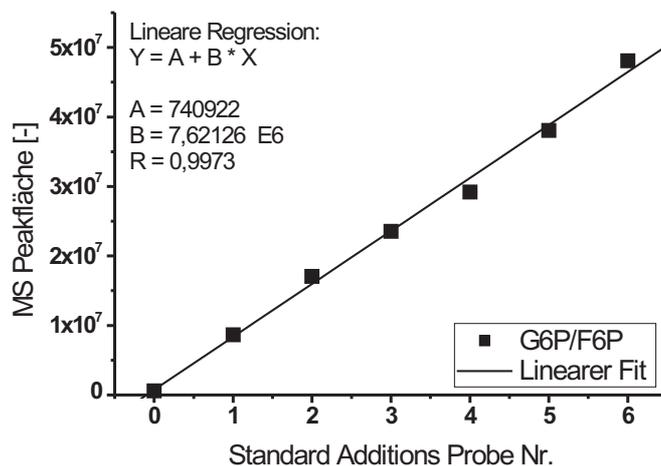


ABBILDUNG 6.9.: Kalibrationsgerade StdAddM G6P/F6P, Funktion durch lineare Regression bestimmt. (Probe Nr. 0 ist die Ursprungprobe, Proben 1–5 wurden in Schritten von 30  $\mu\text{M}$  sukzessiv Standard zugesetzt)

TABELLE 6.5.: Richtigkeit der LC-MS Methode in realer Matrix Probe durch Quantifizierung der Wiederfindung der einzelnen Schritte der StdAddM

Probe (G6P/F6P)	Peakfläche MS	StdAdd Stufe [ $\mu\text{M}$ ]	Konzentration Soll[ $\mu\text{M}$ ]	Konzentration Ist[ $\mu\text{M}$ ]	Wiederfindung [%]
0	593713	0	= 6,94	6,94	
1	8673408	30	36,94	39,90	107.6
2	17053917	60	66,94	72,07	107.3
3	23564134	90	96,94	97,46	100.5

am Beispiel G6P/F6P aufgezeigt werden soll. Zunächst wurde die StdAddM wie vorher beschrieben auf eine Zellextraktprobe unbekannter Konzentration angewendet und die Konzentration in der Probe bestimmt. Der mit LC-MS ermittelte Zusammenhang zwischen den Proben ist in Abb. 6.9 dargestellt. Hier entspricht die Probe Nr. 0 wieder der unbekanntem Ursprungsprobe und die Nr. 1 – 6 stellen die Standard-Additions Schritte dar, die 30  $\mu\text{M}$  je Schritt betragen. Die Konzentration in der Probe wurde mit G6P/F6P = 6,9  $\mu\text{M}$  über die StdAddM bestimmt. Um die Richtigkeit zu testen, wurde die Probe 0 nun herausgelassen und die erste StdAdd Probe mit der Nr. 1 als Unbekannte gesetzt und mit Hilfe der verbleibenden Standards (Nr. 2–6) die Konzentration bestimmt (sog. Kreuzvalidierung). Diese sollte rein rechnerisch  $6,9 + 30 = 36,9 \mu\text{M}$  betragen. Nach demselben Verfahren wurden nun die Konzentrationen der Proben mit der Nr. 2 + 3 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.5 dargestellt und zeigen die Richtigkeit der LC-MS Methode und der Quantifizierung mittels der StdAddM.

### 6.1.3. Direkter Vergleich der beiden MS Detektoren

Für die Strukturaufklärung ist die Ionenfallen MS geeigneter, da sie der universellere Detektor ist, besonders im Hinblick auf die Bestimmung des Fragmentierungsmusters mit der  $\text{MS}^n$ -Option. Dieser Vorzug der Ionenfalle für die Aufklärung unbekannter Substanzen wird in Kap. 6.4 bei der Metabolit-Aufklärung in Fermentationsproben dargestellt. Die Universalität des Ionenfallen MS Detektors geht aber zu Lasten der Empfindlichkeit und der Quantifizierung. Die Ionenfalle arbeitet diskontinuierlich, und bei der MS/MS Messung kommt es zu einem hohen Intensitätsverlust (= Empfindlichkeitsverlust), wobei die Nutzbarkeit der optimalen Fragmente durch die untere 30 % Ausschlussgrenze eingeschränkt ist (Tab. 6.4).

Für den Bereich der MS/MS Messung ist die Triple Quadrupol MS leistungsfähiger, weil der Detektor ein quasi-kontinuierliches MS/MS Signal erzeugt. Die optimale Fokussierung bzw. Einstellung des Triple Quadrupol MS auf einen selektiven MS/MS Übergang erzeugt ein viel stärkeres Detektorsignal pro Zeiteinheit als die Ionenfalle, daher können mit dieser Technik die höchsten Empfindlichkeiten erzielt werden [193]. Die Triple Quadrupol MS Technik kombiniert die Selektivität der MS/MS Messung mit optimaler Empfindlichkeit und stellt damit ein leistungsfähiges Werkzeug zur Quantifizierung dar und wurde in dieser Arbeit für die intrazelluläre Metabolit-Analytik verwendet.

## 6.2. Darstellung und Isolierung der Metaboliten der Aromatenbiosynthese

Im Gegensatz zu den Metaboliten des Zentralstoffwechsels, die kommerziell erhältlich sind, gilt dies nicht unbedingt für Metaboliten aus anderen anknüpfenden Stoffwechselwegen. Die Metaboliten der Aromatenbiosynthese bilden hier keine Ausnahme, und so ist mit Shikimat<sup>6</sup> nur einer der ersten 7 Metaboliten kommerziell erhältlich. Neben der Extraktion der Früchte von *Illicium religiosum* kann Shikimat auch durch einen genetisch geblockten rekombinanten *E. coli* Stamm in Konzentrationen von > 50 g/L fermentativ aus Glukose synthetisiert werden [30, 97]. Das Produkt Shikimat wird von den Zellen freigesetzt und akkumuliert im Kulturüberstand.

Durch den Einsatz von *E. coli* Stämmen, die an verschiedenen Stellen des Aromatenbiosynthesewegs durch genetische Manipulation geblockt sind, bot sich hier, analog zum Shikimat, die Möglichkeit einer generellen Zugangstechnik auch zu den anderen Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs. Als gemeinsame Syntheseroute wurde der Stoffwechsel in gentechnisch geblockten *E. coli* Stämmen genutzt und als Edukt, d.h. als Substrat für die *E. coli* Stämme wurde preisgünstige Glukose für alle Metaboliten (Produkte) verwendet. Der zugrunde liegende Retrosyntheseansatz für die Metaboliten ist in Abb. 6.10 dargestellt. Nach der fermentativen Synthese konnte dann die Aufreinigung der Substanzen aus dem Kulturüberstand erfolgen. Der Literatur kann entnommen werden, dass viele Metaboliten der Aromatenbiosynthese in Kulturüberständen von *E. coli* Mutanten nachgewiesen wurden [37, 42, 49, 67, 97, 110, 178], so dass dieser Ansatz viel versprechend war. Der besondere Vorteil dieses Ansatzes war die Verwendung der *E. coli* Zelle für eine chirale Multistep-Synthese, ausgehend von Glukose. Die Kontrolle der anspruchsvollen Stereochemie der sehr stark funktionalisierten Metaboliten (Abb. 6.10) erfolgte durch die biosynthetischen Enzyme in der *E. coli* Zelle.

Bei einem Vergleich der Darstellungsmöglichkeiten dieser Metaboliten zwischen der fermentativen Route (d.h. 1 Schritt ausgehend von Glukose) und der klassisch chemischen Route (z.B. 8 Schritte zu DAH / DAHP) wird der Vorteil der fermentativen Synthese deutlich (Zitat: "...it is probable that the microbiological route will be preferred, in that less skill and less time is required.") [67]. Bei dieser Einschätzung über die notwendigen Fertigkeiten wird jedoch unterschlagen, dass auch für die Konstruktion der geblockten *E. coli* Stämme sehr wohl Fertigkeiten im Bereich der Molekularbiologie vorhanden sein müssen, ohne die der fermentative Zugang zu diesen Metaboliten verwehrt bleibt. Durch Kooperation mit dem Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH und der DSM Biotech GmbH stand dieses Know-How<sup>7</sup> zur Verfügung, und die Darstellung der Metaboliten der Aromatenbiosynthese sollte über den Weg der Ganzzellbiotransformation erfolgen.

Die Fermentationen wurden im Zulaufverfahren (Fed-Batch) mit wachstumsentkoppelter Produktionsphase (Kap. 3.2.4) und Glukose als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Durch den

---

<sup>6</sup>Shikimat wurde 1885 von J.F. Eykmann aus den Früchten von *Illicium religiosum* (japanisch: shiki-no-ki) isoliert, die bis zu 20 % Shikimat enthalten.

<sup>7</sup>Der Autor möchte sich an dieser Stelle nochmals für die wertvolle Kooperation bedanken, ohne die der Zugang zu diesen Substanzen noch steiniger gewesen wäre.

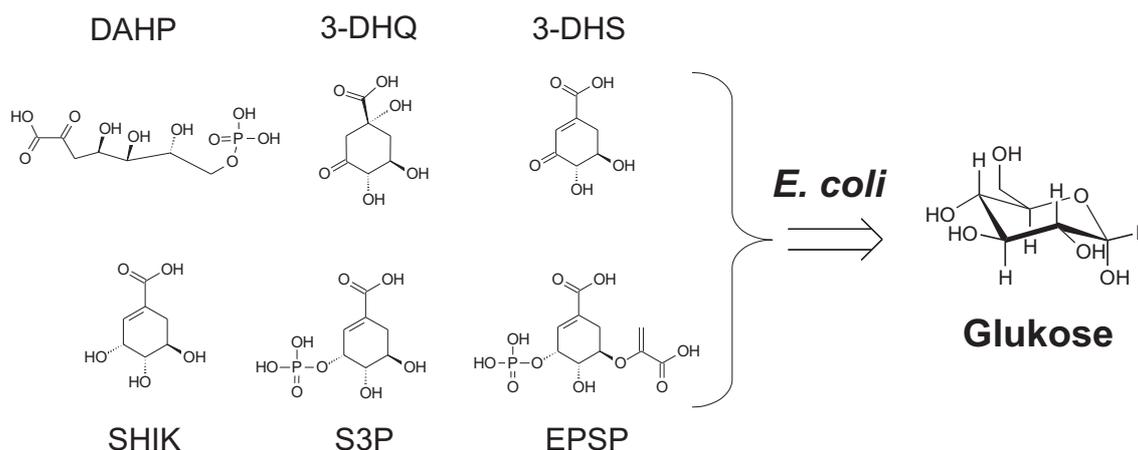


ABBILDUNG 6.10.: Retrosynthetischer Zugang zu Metaboliten der Aromatenbiosynthese mit gentechnisch geblockten *E. coli* Stämmen als Syntheseroute und Glukose als universellem Synthesebaustein

genetischen Block, der die Produktion eines Metaboliten ermöglichen sollte, sind die *E. coli* Stämme automatisch auxotroph für die aromatischen Aminosäuren (L-Phe, L-Trp, L-Tyr), die im Fermentationsmedium vorgelegt wurden. Die Durchführung der Fermentationsexperimente ist in Kap. 4.2 dargestellt und Tab. 4.2 enthält die Übersicht über die genetischen Eigenschaften der eingesetzten geblockten *E. coli* Stämme. Für die Produktanalytik der Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs in den Fermentationsüberständen und im Verlauf der Aufarbeitung wurde vor allem die quantitative  $^1\text{H-NMR}$  Methode (Kap. 6.1.1), aber auch die HPLC für organische Säuren (Kap. 5.3.1) eingesetzt. Für einige der in dieser Arbeit isolierten Metaboliten der Aromatenbiosynthese wurden lediglich sehr kleine Mengen in zum Teil sehr geringen Ausbeuten erzielt. Das Hauptanliegen dieser Aktivitäten war jedoch, überhaupt einen Zugang zu diesen Metaboliten zu schaffen und sie als authentische Referenz-Substanzen für die Analytik in der Stammentwicklung der L-Phe Produzenten und im besonderen Maße für die intrazelluläre Analytik in *E. coli* zur Verfügung zu stellen.

### 6.2.1. Darstellung von 3-Dehydroshikimat (DHS)

Die mikrobielle Synthese von DHS wurde mit dem Stamm *E. coli* DHS wie in Kap. 4.2 dargestellt durchgeführt. Eine Darstellung des Fermentationsverlaufs befindet sich in Abb. 6.11. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde eine maximale Wachstumsrate von  $\mu_{max} = 0,39 \text{ h}^{-1}$  und eine maximale Biomassekonzentration im Bereich von  $\text{OD}_{650} = 60 - 65$  erzielt. Der genaue Zeitpunkt der Wachstumslimitierung durch die Aminosäuren konnte nicht bestimmt werden, da in dieser Phase keine Proben genommen wurden. Anhand der Aminosäurebestimmung in der stationären Phase konnten geringe Restmengen von L-Phe und L-Trp, jedoch kein L-Tyr gemessen werden (Ergebnisse nicht dargestellt), d.h. die Limitierung wurde durch L-Tyr ausgelöst. Bei einer  $\text{OD}_{650} = 10$  wurden  $100 \mu\text{M}$  IPTG zugesetzt, was zu einer anschließenden Akkumulation von DHS im Fermentationsüberstand führte. Nach einer Prozesszeit von 32 h wurde eine Konzentration von rund  $133,6 \text{ mM}$  ( $23 \text{ g L}^{-1}$ ) mittels  $^1\text{H-NMR}$  gemessen. Mit der Aufarbeitung des produkthaltigen Überstands wurde nach der Zentrifugation der Zellen begonnen.

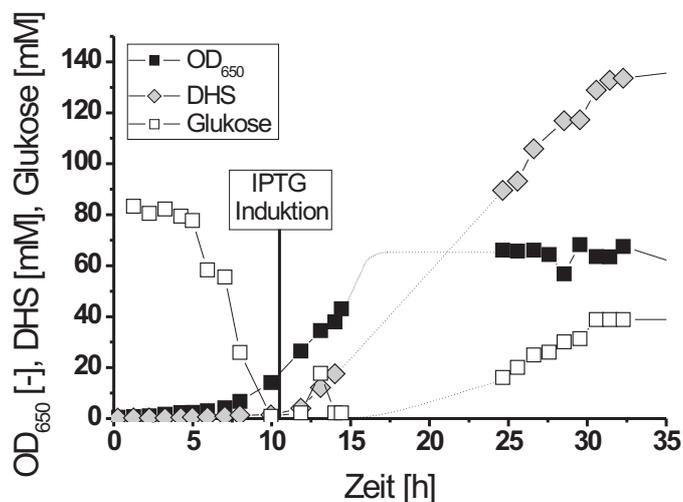


ABBILDUNG 6.11.: Fermentationsverlauf für *E. coli* DHS Produzent, Zeitabschnitt 15–24 h ohne Probenahme, Linien Darstellung interpoliert

Die von Dell *et al.* [49] beschriebene kontinuierliche Extraktion des Produkts mit Ethylacetat aus dem mit 6N HCl auf pH = 2,5 eingestellten Fermentationsüberstands wurde in einem 1 L Perforator für leichte Extraktionsmittel versucht, musste jedoch bereits nach kurzer Laufzeit wegen unzureichender Phasentrennung unterbrochen werden. Vermutlich waren Bestandteile der extrazellulären Matrix wie z.B. Proteine oder Lipopolysaccharide für dieses Verhalten verantwortlich. Weder der Zusatz von Antischaumreagenzien, noch die Ultrafiltration des Fermentationsüberstands mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa führten zu einer Verbesserung.

Stattdessen wurden 0,5 L ultrafiltrierter Fermentationsüberstand mehrfach mit Ethylacetat im Scheidetrichter extrahiert, das Volumen im Vakuum reduziert, und nach einer Woche bei 5 °C konnten 1,1 g (9,6 % Ausbeute) blass-beiges kristallines Produkt in hoher Reinheit (91,2 % DHS + 11,5 % Ethylacetat = 102,4 %) <sup>8</sup> erhalten werden. Die gemessenen <sup>1</sup>H-NMR Daten stimmen mit der Literatur [19, 51] überein und die mit LC-MS (ESI) bestimmte Molekularmasse und das MS/MS Fragmentierungsmuster <sup>9</sup> passen zur Struktur von DHS. Der Unterschied zu der Literatur Ausbeute von 40 % wird in der schlechteren Extraktionsleistung des Scheidetrichters im Vergleich zur kontinuierlichen Extraktion mit dem Perforator gesehen. Die Probleme der schlechten Phasentrennung bei der Perforation könnten durch den Einsatz eines Zentrifugal-Extraktors, wie er bei der Reaktiv-Extraktion von L-Phe eingesetzt wurde [139], wirkungsvoll eliminiert werden. Das würde eine rasche Aufarbeitung auch größerer Mengen dieser hochfunktionalisierten Verbindung erlauben.

<sup>8</sup>Wiederfindung in einer Probeneinwaage mit <sup>1</sup>H-NMR quantifiziert.

<sup>9</sup>Dazu konnten bis dato keine Daten in der Literatur gefunden werden.

Parallel zu den Extraktionsversuchen wurde die Aufarbeitung von DHS mittels Ionenchromatographie an einem Dowex-Harz und Elution über einen Essigsäure-Gradienten untersucht [81]. Im Vergleich zu der Extraktion mit Ethylacetat im Scheidetrichter war diese Aufarbeitung mit höherem apparativen und zeitlichen Aufwand verbunden, stellte jedoch die zuverlässigere Methode im Labormaßstab dar. Nach Einengen der Produktfraktionen wurde blass-beiges kristallines DHS mit einer Reinheit  $> 90\%$  erhalten, das noch Spuren von Acetat aus der Aufarbeitung enthielt.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , TSP) :  $\delta = 2.63$  (ddd,  $J = 18, 10, 3$  Hz, 1H, H-6a  $\text{CH}_2$ ), 3.12 (dd,  $J = 18, 5$  Hz, 1H, H-6b  $\text{CH}_2$ ), 4.00 (ddd,  $J = 11, 10, 5$  Hz, 1H, H-5  $\text{CHOH}$ ), 4.28 (d,  $J = 11$  Hz, 1H, H-4  $\text{CHOH}$ ), 6.74 (d,  $J = 3$  Hz, 1H, H-2  $\text{CH}$ ).

LC-MS (ESI negativ) : 171,1  $[\text{M-H}]^-$   
 MS/MS : 152,9  $[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$ , 127,0  $[\text{M-H-CO}_2]^-$ , 109,2  $[\text{M-H-CO}_2-\text{H}_2\text{O}]^-$   
 3-Dehydroshikimat  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_5$  ( $172,14 \text{ g mol}^{-1}$ )

### 6.2.2. Darstellung von Shikimat-3-phosphat (S3P)

Die mikrobielle Synthese von S3P wurde mit dem Stamm *E. coli* S3P durchgeführt (Kap. 4.2). In Abb. 6.12 ist der Fermentationsverlauf dargestellt. Der Stamm zeigte zu Beginn der Fermentation eine ausgeprägte mehrstündige lag-Phase, bereits die Vorkulturzeit im Schüttelkolben war länger. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde lediglich eine maximale Wachstumsrate von  $\mu_{max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$  und insgesamt eine maximale Biomassekonzentration im Bereich von  $\text{OD}_{650} = 45$  erzielt.

Anhand der Aminosäurebestimmung in der stationären Phase konnten geringe Restmengen von L-Phe und L-Trp jedoch kein L-Tyr gemessen werden (Ergebnisse nicht dargestellt), d.h. die Limitierung wurde durch L-Tyr ausgelöst. Bei einer  $\text{OD}_{650} = 10$  wurden  $100 \mu\text{M}$  IPTG zugesetzt, was zu einer anschließenden Akkumulation von S3P im Fermentationsüberstand führte. Nach einer Prozesszeit von 30,6 h ließ sich eine Konzentration von  $27,6 \text{ mM}$  ( $7,1 \text{ g L}^{-1}$ ) messen. Gleichzeitig wurden  $6,8 \text{ mM}$  DHS ( $1,2 \text{ g L}^{-1}$ ) und  $1,4 \text{ mM}$  SHI ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) als Nebenprodukte gefunden. Nach Zentrifugation der Zellen konnte mit der Aufarbeitung des produkthaltigen Überstands begonnen werden.

Die Aufarbeitung des Produktes aus dem zellfreien Fermentationsüberstand wurde wie in Kap. 4.5.4 aufgezeigt durchgeführt. Im Vergleich zu dem von Dell *et al.* [49] beschriebenen Verfahren wurde die Elution des Anionenaustauschers nicht mit Triethylammonium Hydrogencarbonat Lösung, sondern mit Ammonium-Hydrogencarbonat Lösung [37] mit gleichem Erfolg durchgeführt. Die leichtere Verdampfbarkeit der verwendeten Ammonium-Hydrogencarbonat-Lösung vereinfachte die weitere Behandlung der Produktfraktionen.

Am Ende der Aufarbeitung wurden  $1,3 \text{ g}$  des Triammoniumsalzes von S3P ( $18,2\%$  Ausbeute) isoliert. Die Reinheit des leicht braunen Feststoffs wurde über die HPLC

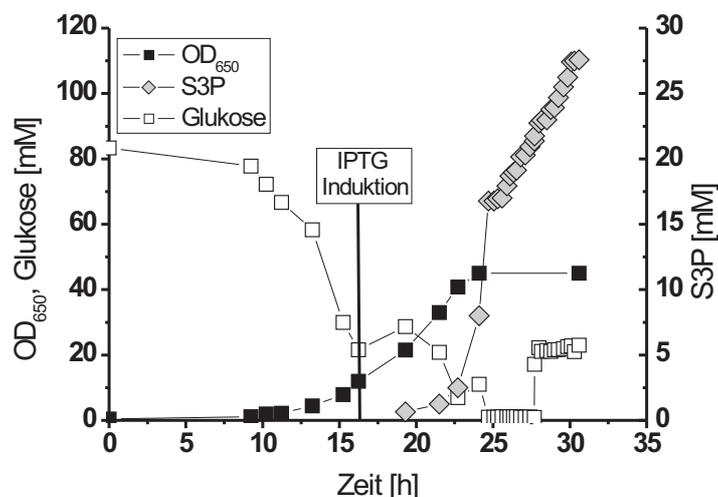


ABBILDUNG 6.12.: Fermentationsverlauf für *E. coli* S3P Produzent

mit 56,9 % und mit 62,4 % über die  $^1\text{H}$ -NMR bestimmt<sup>10</sup>. Die geringe Reinheit des S3P-Produkts ist bedingt durch anorganische Salze, die in der Aufarbeitung nicht abgetrennt werden konnten. Die gemessenen  $^1\text{H}$ -NMR Daten stimmen mit der Literatur [11] überein. Das mittels LC-MS (ESI) bestimmte Molekülion stimmt mit der Literatur überein [130], das MS/MS Fragmentierungsmuster<sup>11</sup> passt ebenfalls zu der Struktur von S3P.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , TSP) :  $\delta = 2,22$  (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $2,69$  (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $3,84$  (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ),  $4,09$  (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ),  $6,48$  (dd, 1H,  $\text{CH}$ ), 1 weiteres Protonensignal unter dem HDO-Signal.

LC-MS (ESI negativ) :  $253,1$   $[\text{M}-\text{H}]^-$

MS/MS :  $234,9$   $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ,  $155,3$   $[\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4]^-$ ,  $136,9$   $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4-\text{H}_2\text{O}]^-$ ,  $110,9$   $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4-\text{CO}_2]^-$ ,  $96,9$   $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ ,  $79,1$   $[\text{PO}_3]^-$ .

Shikimat-3-phosphat  $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_8\text{P}$  ( $254,132$   $\text{g mol}^{-1}$ )

### 6.2.3. Darstellung von 3-Dehydroquinat (DHQ)

Die mikrobielle Synthese von DHQ wurde mit dem Stamm *E. coli* DHQ wie in Kap. 4.2 dargestellt versucht, konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Bereits kurz nach der IPTG-Induktion der Plasmid-Gene stoppte das Wachstum der Biomasse, und sowohl der Glukoseverbrauch wie auch die  $\text{CO}_2$  Bildung gingen stark zurück, was auf eine reduzierte Stoffwechselaktivität schließen ließ. DHQ konnte zu keinem Zeitpunkt in Fermentationsproben nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte in einem genetischen Problem des Stammkonstrukts liegen oder vielleicht auf eine Inhibierung (Toxizität) durch

<sup>10</sup>Wiederfindung in einer Probeneinwaage mit HPLC und  $^1\text{H}$ -NMR quantifiziert.

<sup>11</sup>Dazu konnten bis dato keine Daten in der Literatur gefunden werden.

das Produkt DHQ hindeuten. DHQ wurde zwar bereits als Nebenprodukt in Fermentationsproben mit Konzentrationen von rund 47 mM ( $8,9 \text{ g L}^{-1}$ ) beobachtet [109], jedoch könnte der Fluss in den Pool von DHQ aufgrund der Expression der Feedback-resistenten DAHP Synthase (*aroF<sup>fbr</sup>*) und des genetischen Blocks der 3-Dehydroquinat Dehydratase (*aroD*) so hoch sein, dass es nach der Induktion zu einer toxischen intrazellulären Akkumulation kommt.

Dafür spricht die Tatsache, dass DHQ in der Literatur nahezu ausschließlich durch chemische Oxidation von Chinasäure mit Salpetersäure [76] oder durch Reaktion an Platin [81, 84] dargestellt wurde und keine präparative Methode mit einer geblockten *E. coli* Mutante gefunden werden konnte.

Die von Grewe und Jeschke [76] beschriebene Variante der Oxidation von Chinasäure mit konzentrierter Salpetersäure führte zu DHQ als einem der Oxidationsprodukte, die Kontrolle der sehr drastischen Reaktionsbedingungen bereitete aber Probleme. Die Reaktion startete zu Beginn nur bei Erhöhung der Temperatur oder/und weiterer Säurezugabe, im weiteren Reaktionsverlauf verlief sie aber häufig zu heftig und zu schnell, was zu einem stark verbreiterten unbekanntem Nebenproduktspektrum, zu schlechter Ausbeute und Schwierigkeiten bei der ionenchromatographischen Aufarbeitung führte. Die Salpetersäure Oxidation von Chinasäure zu DHQ konnte mit 88 % Umsatz in 30 % Ausbeute durchgeführt werden. Die Aufarbeitung erfolgte mit Ionenchromatographie (Kap. 4.5.2). Es konnten 26,6 mg DHQ mit einer Reinheit von 90 % in wässriger Lösung erhalten werden<sup>12</sup>. Die gemessenen <sup>1</sup>H-NMR Daten stimmen mit der Literatur [19, 103] überein. Die über LC-MS (ESI) bestimmte Molekularmasse und das MS/MS Fragmentierungsmuster<sup>13</sup> stimmt mit der Struktur von DHQ ebenso überein.

In der Literatur wurden kürzlich 2 alternative Verfahren zur DHQ-Darstellung beschrieben, beide gehen von Chinasäure als Edukt aus. Ein Verfahren nutzt Pyridiniumchlorochromat als selektives Oxidationsmittel [103], das zweite Verfahren beschreibt eine Biotransformation mit Stämmen von *Gluconobacter oxydans* [1]. Für folgende Arbeiten, bei denen die Darstellung von DHQ nötig ist, könnten diese Varianten eine ernsthafte Alternative zum beschriebenen Salpetersäure-Verfahren darstellen.

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, TSP) :  $\delta = 2,33$  (m, 2H, H-6a,b), 2,58 (dd, 1H, H-2), 3,16 (dd, 1H, H-2), 3,92 (ddd, 1H, H-5), 4,32 (dd, 1H, H-4).

LC-MS (ESI negativ) : 189,14 [M-H]<sup>-</sup>

MS/MS : 170,9 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 153,0 [M-H-2H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,  
127,0 [M-H-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 109,0 [M-H-2H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>.

3-Dehydroquinat C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> (190,152 g mol<sup>-1</sup>)

#### 6.2.4. Darstellung von 3-Deoxy-d-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) und 3-Deoxy-d-arabino-heptulosonat (DAH)

Die mikrobielle Synthese von DAHP und seinem dephosphorylierten Derivat DAH wurde mit dem Stamm *E. coli* DAHP wie in Kap. 4.2 dargestellt durchgeführt. In Abb. 6.13 ist

<sup>12</sup>Standardlösung durch <sup>1</sup>H-NMR quantifiziert. Vergleichsmessung durch D. Schippers bei DSM in den Niederlanden bestätigte das Resultat.

<sup>13</sup>Dazu konnten bis dato keine Daten in der Literatur gefunden werden.

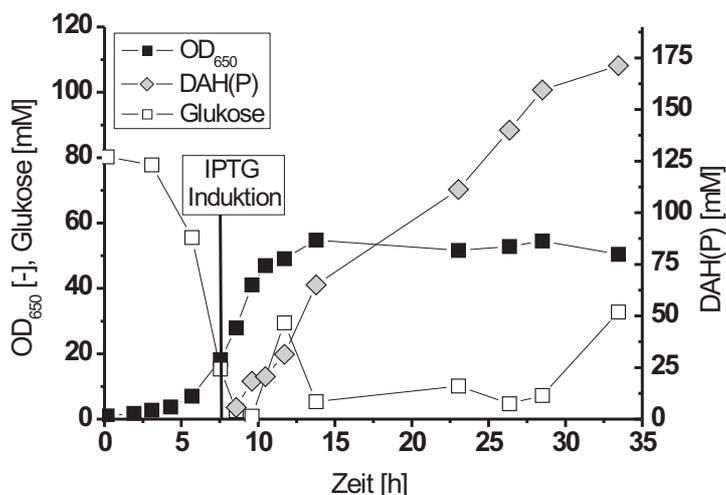


ABBILDUNG 6.13.: Fermentationsverlauf für *E. coli* DAH(P) Produzent

der Fermentationsverlauf dargestellt. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde eine maximale Wachstumsrate von  $\mu_{max} = 0,40 \text{ h}^{-1}$  erzielt, und insgesamt wurde eine maximale Biomassekonzentration im Bereich von  $\text{OD}_{650} = 50 - 55$  erreicht. Anhand der Aminosäurebestimmung in der stationären Phase konnten geringe Restmengen von L-Phe und L-Trp jedoch kein L-Tyr gemessen werden (Ergebnisse nicht dargestellt), d.h. die Limitierung wurde durch L-Tyr ausgelöst. Bei einer  $\text{OD} = 15$  wurden  $100 \mu\text{M}$  IPTG zugesetzt, was zu einer anschließenden Akkumulation von DAH(P) im Fermentationsüberstand führte. Nach einer Prozesszeit von 33,5 h wurde eine Konzentration von rund 171 mM DAH(P) mittels  $^1\text{H}$ -NMR gemessen<sup>14</sup>. Über die  $^1\text{H}$ -NMR war nur die Gesamtmenge von DAH + DAHP = DAH(P) zugänglich. In der Literatur wurde der Anteil von DAHP an der Gesamtmenge von DAH(P) mit 17–35 % beschrieben [67]. Nach Zentrifugation der Zellen wurde mit der Aufarbeitung des produkthaltigen Überstands begonnen.

Die Aufarbeitung des Produktes aus dem zellfreien Fermentationsüberstand wurde wie in Kap. 4.5.1 beschrieben durchgeführt. Nach der Anionenchromatographie konnten jedoch nur DAH enthaltende Produkt-Fraktionen und keine mit DAHP identifiziert werden. Die laut Literatur nach dem DAH eluierenden DAHP Fraktionen konnten nicht positiv mit dem Thiobarbiturat-Assay (Kap. 5.3.6) getestet werden. D.h. entweder wurde kein DAHP in der Fermentation gebildet oder es gab ein Problem im Verlauf der Aufarbeitung, das die Isolierung von DAHP verhindert hat. Zunächst wurde versucht, das DAHP über eine  $^{31}\text{P}$ -NMR Messung in der Fermentationsprobe mit einem 400 MHz Gerät<sup>15</sup> anhand der Literaturdaten nachzuweisen, was jedoch nicht gelang. Auch eine Messung bei DSM in den Niederlanden mit einem 600 MHz Gerät<sup>16</sup> fiel nicht positiv aus. Möglicherweise ist die

<sup>14</sup>171,3 mM würden  $35,5 \text{ g L}^{-1}$  DAH bzw.  $49,2 \text{ g L}^{-1}$  DAHP entsprechen

<sup>15</sup>Messung wurde von Albert deGraaf am IBT 1 durchgeführt.

<sup>16</sup>Messung wurde von Dick Schippers bei DSM in den Niederlanden durchgeführt

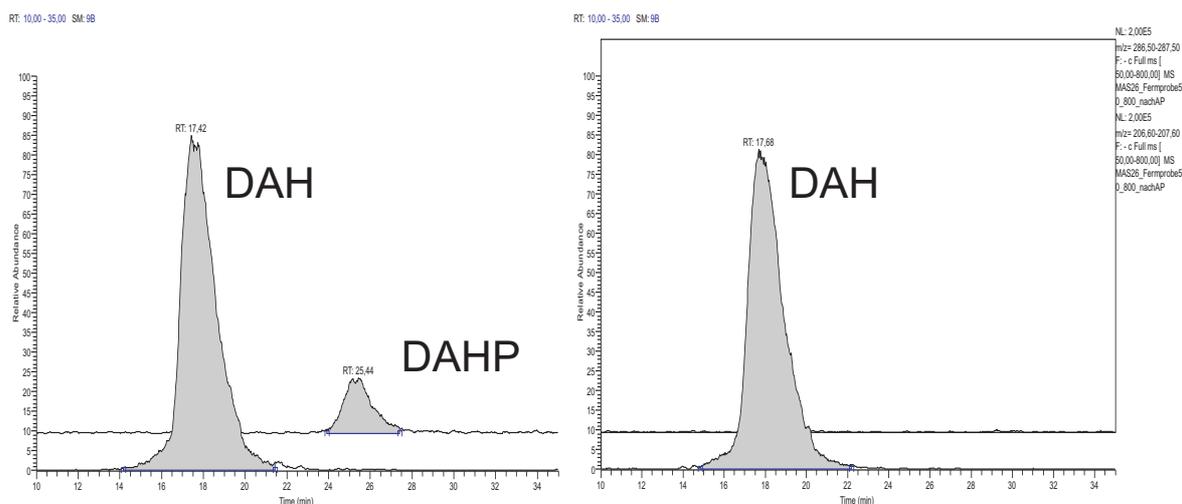


ABBILDUNG 6.14.: LC-MS Messung Fermentationsprobe *E. coli* DAH(P) Produzent (links), Phosphatase behandelte Fermentationsprobe (rechts)

NMR-Methode nicht sensitiv genug, um das DAHP in den Proben nachzuweisen.

Daher wurden sowohl eine Fermentationsprobe als auch Fraktionen aus der Aufarbeitung mit LC-MS auf DAH und DAHP untersucht. Die Fermentationsprobe wurde dazu zu einem mit dem Phosphatase-Assay (Kap. 5.3.1) behandelt, zum anderen unbehandelt mit der LC-MS gemessen (Abb. 6.14). In der unbehandelten Probe ist ein deutlicher Peak für DAH und ein sehr kleiner Peak in der DAHP-Massenspur zu erkennen, der nach der Phosphatase-Reaktion verschwunden ist. Offenbar wurde das in der Probe vorhandene DAHP enzymatisch zu DAH dephosphoryliert, jedoch konnte keine Zunahme der DAH Peakfläche gemessen werden. Damit konnte der Schluss gezogen werden, dass DAHP in der Fermentationsprobe vorhanden war, jedoch im Vergleich zu DAH in sehr geringer Menge. Da die DAH-Peakfläche unverändert geblieben war, fiel der DAHP Anteil in den Bereich des Gerätefehlers (etwa  $< 4\%$ ) und blieb daher weit unter dem in der Literatur beschriebenen Anteil von 17–34 % DAHP.

In den Fraktionen aus der Aufarbeitung konnte mit den LC-MS Messungen DAHP in den Fraktionen 90–95 nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der Literatur liegen die DAHP Fraktionen hinter den DAH-Fraktionen (Nr. 20–58). Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass das Aufarbeitungsverfahren der Fermentationslösung erfolgreich verlaufen war, dass jedoch weder der Thiobarbiturat-Assay noch die NMR-Methode sensitiv genug waren, um die DAHP-haltigen Produktfraktionen zu identifizieren. Das gelang erst unter Einsatz der LC-MS.

Eine mögliche Ursache für das ungünstige Verhältnis von DAH zu DAHP in der Fermentationslösung könnte eine Limitierung durch Phosphat ( $P_i$ ) im Fermentationsverlauf gewesen sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine weitere Fermentation mit dem Stamm *E. coli* DAHP durchgeführt, bei der die  $P_i$ -Konzentration gemessen (Kap.

5.3.7) und durch Zugabe einer konzentrierten  $P_i$ -Lösung im Bereich von 1,5–3,0 g/L im Verlauf der Fermentation gehalten wurde. Auch nach der präparativen Aufarbeitung dieser Fermentation konnte DAHP in den Fraktionen nur mit LC-MS und auch nur in vergleichbar kleiner Menge nachgewiesen werden. Eine Limitierung durch  $P_i$  war daher als Ursache für das ungünstige Verhältnis von DAH zu DAHP unter diesen Bedingungen auszuschließen. Die Phosphatase-Aktivität der *E. coli* Zellen, die für die Umwandlung von DAHP in DAH verantwortlich sein musste, ist offenbar durch einen  $P_i$ -Überschuss nicht zu unterdrücken gewesen und Frost [67] berichtet, dass auch Zusätze von potenziellen Phosphatase-Inhibitoren zu keiner Erhöhung des beobachteten DAHP Anteils führten. Die Dephosphorylierung setzte offenbar bereits nach der DAHP Bildung in der Zelle ein.

Eine Möglichkeit, diese vermutlich eher unspezifische Aktivität zu drosseln, könnte der Zusatz von komplexen Medienbestandteilen wie z.B. Hefeextrakt sein, obwohl sich dadurch die Aufarbeitung schwieriger gestalten könnte. Die Fermentation sollte außerdem vor Erreichen der stationären Phase abgebrochen werden, da die Ergebnisse aus der L-Phe Prozessentwicklung eine Induktion von Phosphatase-Aktivität beim Übergang in die stationäre Phase nahelegen (Kap. 6.3.6). Dieser Ansatz wurde jedoch in dieser Arbeit nicht mehr realisiert, da die gesammelten DAHP Produkt-Fraktionen ausreichend Referenz-Material für die LC-MS Charakterisierung von DAHP darstellten. Leider stand aber nicht genug Material zur Herstellung eines quantifizierten Referenz-Standards für die intrazelluläre Analytik zur Verfügung. Trotzdem konnte DAHP als Referenz-Standard für die Analytik bereitgestellt werden, um diesen Metaboliten wenigstens qualitativ in den Pulsexperimenten mit schneller Probenahme erfassen zu können.

Die Fraktionen, die DAH enthielten, wurden wie in Kap. 4.5.1 beschrieben aufgearbeitet. Am Ende wurden 1,4 g des Lithiumsalzes von DAH (26,6 % Ausbeute) erhalten. Die Reinheit des blass-gelben Feststoffs wurde mit 75,8 % über die  $^1\text{H}$ -NMR bestimmt<sup>17</sup>. Die gemessenen  $^1\text{H}$ -NMR Daten stimmen mit der Literatur [67, 171] überein. Mit LC-MS (ESI) wurden sowohl DAH als auch DAHP charakterisiert. Die bestimmten Molekularmassen und die MS/MS Fragmentierungsmuster<sup>18</sup> stimmen mit den Strukturen von DAH und DAHP überein.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , TSP) :  $\delta = 1,78$  (dd, 1H, H-2ax), 2,20 (dd, 1H, H-2eq), 3,45 (pt, 1H, H-4), 3,75 (m, 1H, H-5), 3,83 (dd, 2H, H-7), 3,94 (ddd, 1H, H-3).

LC-MS (ESI negativ) : 207,1  $[\text{M}-\text{H}]^-$

MS/MS : 188,9  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ,

128,9  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 \text{ (RetroAldolTyp)}]^-$ ,

110,8  $[\text{M}-\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 \text{ (RetroAldolTyp)}]^-$ ,

86,9  $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4 \text{ (RetroAldolTyp)}]^-$ ,

84,8  $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 \text{ (RetroAldolTyp)}-\text{CO}_2]^-$ .

3-Deoxy-D-arabino-heptulose  
(208,167 g mol<sup>-1</sup>)

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7$

<sup>17</sup>Wiederfindung in einer Probeneinwaage mit  $^1\text{H}$ -NMR quantifiziert.

<sup>18</sup>Dazu konnten bis dato keine Daten in der Literatur gefunden werden.

LC-MS (ESI negativ) :	287,1 [M-H] <sup>-</sup>
MS/MS :	268,9 [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,
	198,9 [M-H-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> (RetroAldolTyp)] <sup>-</sup> ,
	189,0 [M-H-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,
	170,9 [M-H-H <sub>2</sub> O-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,
	153,0 [M-H-2H <sub>2</sub> O-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,
	96,9 [H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> .
	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>10</sub> P (288,146 g mol <sup>-1</sup> )

### 6.3. Einsatz der $^1\text{H}$ -NMR Metabolit Analytik für die *E. coli* L-Phe Stammentwicklung

In dem ersten Stamm, der in der L-Phe Prozessentwicklung eingesetzt wurde (*E. coli* 4pF20), sind die normalen regulatorischen Flusskontrollen des Aromatenbiosynthesewegs (Kap. 3.1.8) auf der Route zum L-Phe dereguliert worden. Mit diesem Stamm konnten innerhalb von 50 h rund 30 g L<sup>-1</sup> L-Phe mit Glukose als Substrat produziert werden [70]. Die Metabolit-Bilanz für diesen Stamm konnte jedoch zunächst nicht geschlossen werden, die Bilanz-Lücke betrug ca. 10–15 %. Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur über eine unzureichende Aktivität der Shikimat Kinasen (AroK/L) [49] konnte Shikimat als ein Nebenprodukt identifiziert werden [70], was aber nicht zur vollständigen Schließung der Metabolit-Bilanz führte und auf weitere Nebenprodukte hindeutete. Die Tatsache, dass Shikimat überhaupt positiv identifiziert werden konnte, verdankte es seiner Verfügbarkeit als kommerzieller Standard.

Die Vermutung lag nahe, dass der fehlende Kohlenstoffanteil in der Metabolit-Bilanz durch weitere Nebenprodukte verursacht wurde, wobei typische fermentative Nebenprodukte von *E. coli* wie Aminosäuren und organische Säuren (z.B. Acetat, Zitrat, Alanin, u.a.) bereits von der HPLC Analytik in Fermentationsproben erfasst wurden. In Arbeiten der Gruppe von J.W. Frost ist beschrieben, dass reaktionslimitierende Schritte im Aromatenbiosyntheseweg durch die Messung extrazellulärer Nebenprodukte beobachtet wurden [49, 66, 110, 155]. Die Untersuchung wurde daher auf die anderen Metaboliten der Aromatenbiosynthese auf der Route zum L-Phe konzentriert, um weitere limitierende Schritte im Stoffwechselweg aufzudecken. Bisher existierte jedoch kein analytischer Zugang zu diesen Metaboliten, so dass zur Lösung dieser analytischen Fragestellung zwei Wege eingeschlagen wurden.

Auf der einen Seite wurden die einzelnen Metaboliten als Referenz-Standards isoliert (Kap. 6.2), was aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes nicht innerhalb kurzer Zeit möglich war. Auf der anderen Seite wurde parallel dazu mit dem Aufbau einer quantitativen  $^1\text{H}$ -NMR Analytik für Fermentationsproben begonnen, bei der die Signale der Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs anhand von Literaturdaten identifiziert und über den internen Standard (TSP) quantifiziert werden konnten (Kap. 6.1.1). Die dazu etablierte  $^1\text{H}$ -NMR Methode war innerhalb weniger Wochen einsatzfähig, um alle Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs qualitativ und auch quantitativ in den Fermentationsproben zu erfassen. Tab. 6.6 zeigt den Stand der Analytik zum Startzeitpunkt der Untersuchung.

TABELLE 6.6.: Analytik für Fermentationsproben zur L-Phe Stammentwicklung mit HPLC und  $^1\text{H-NMR}$ ; Metaboliten sind nach Position im Biosyntheseweg geordnet

Metabolit	HPLC	$^1\text{H-NMR}$
3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP)		+
3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat (DAH)		+
3-Dehydroquinat (DHQ)		+
3-Dehydroshikimat (DHS)		+
Shikimat (SHI)	+	+
Shikimat-3-phosphat (S3P)		+
5-Enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphat (EPSP)		+
Chorismat	+	+
Prephenat	(+)	+
Phenylpyruvat	(+)	+
L-Phenylalanin (L-Phe)	+	+

Mit den HPLC Verfahren (Kap. 5.3.2 und 5.3.1) waren lediglich die wenigen kommerziellen Metaboliten messbar, während die  $^1\text{H-NMR}$  Methode die Messung aller Metaboliten ermöglichen konnte. Besonders im ersten Abschnitt des Biosynthesewegs stellte sie eine wertvolle Ergänzung dar, da hier bislang mit der HPLC keine Messung möglich war. Damit sollten der Stammentwicklung der L-Phe Produzenten neue Impulse für die Optimierung der Stämme gegeben werden. Die in den folgenden Kapiteln untersuchten Fermentationsproben der L-Phe Produktionsstämme stammen aus Fermentationen, die Marc Gerigk und Nicole Ruffer am IBT 2 im Rahmen ihrer Dissertationen [70, 139] durchgeführt haben und mit denen auf dem Gebiet der Stammentwicklung kooperiert wurde. Die analytischen Arbeiten zu den  $^1\text{H-NMR}$  Messungen wurden von Silvia Zaja im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt [191].

### 6.3.1. *E. coli* 4pF20

Die erweiterte Analytik für die Metaboliten der Aromatenbiosynthese wurde als erstes für die Untersuchung von *E. coli* 4pF20 angewendet, dem ersten Stamm-Konstrukt für die L-Phe Produktion. Von dem Plasmid pF20 wurden die Feedback-resistenten Varianten der DAHP Synthase (*aroF<sup>br</sup>*) und der Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase (*pheA<sup>br</sup>*) überexprimiert, um die Aromatenbiosynthese auf der Route zum L-Phe zu deregulieren. In Abb. 6.15 sind die in der Fermentation gemessenen Metaboliten dargestellt.

Neben dem gewünschten Produkt L-Phe und dem bereits bekannten Nebenprodukt Shikimat, das auf eine Limitierung durch die Shikimat Kinase (AroK/L) hinweist, zeigt die Messung zusätzlich DAH(P) und DHS als Nebenprodukte. DAH(P) lässt auf eine Limitierung durch die 3-Dehydroquinat Synthase (AroB) schließen und DHS auf eine mangelnde Aktivität der Shikimat Dehydrogenase (AroE). Die Nebenproduktbildung setzte parallel zur L-Phe Bildung nach der Induktion der plasmid-codierten Gene ein.

Die Deregulation der Aromatenbiosynthese in diesem Stamm führte zu einer erfolgreichen Produktion von L-Phe. Allerdings wurde die Ausbeute und die Selektivität durch die gebildeten drei Nebenprodukte geschmälert. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten von Frost et al. [49, 110] müssen für einen ungehinderten Fluss zum L-Phe offenbar noch weitere

6.3. Einsatz der  $^1\text{H-NMR}$  Metabolit Analytik für die *E. coli* L-Phe Stammentwicklung

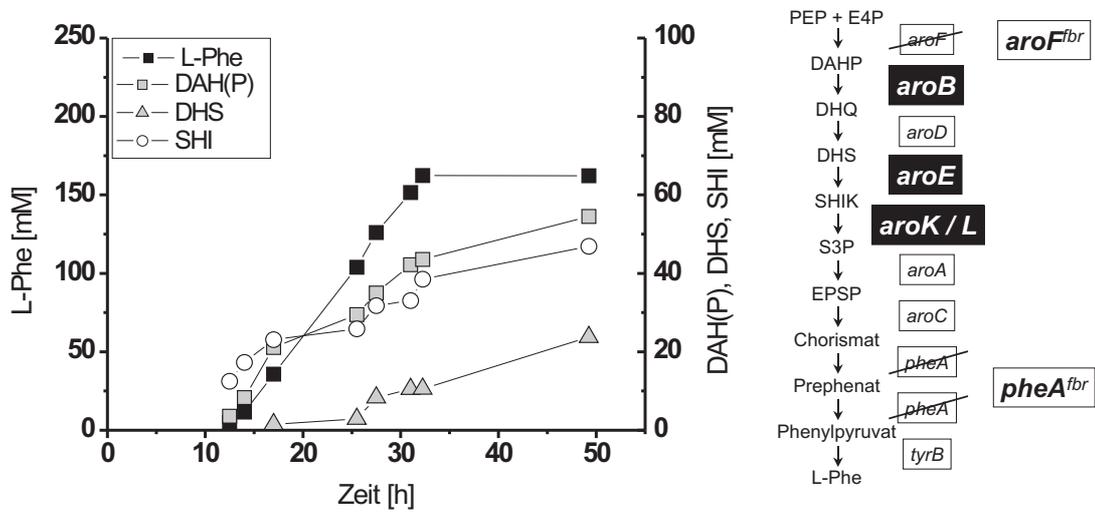


ABBILDUNG 6.15.:  $^1\text{H-NMR}$  Daten der Fermentation mit *E. coli* 4pF20 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz dargestellt

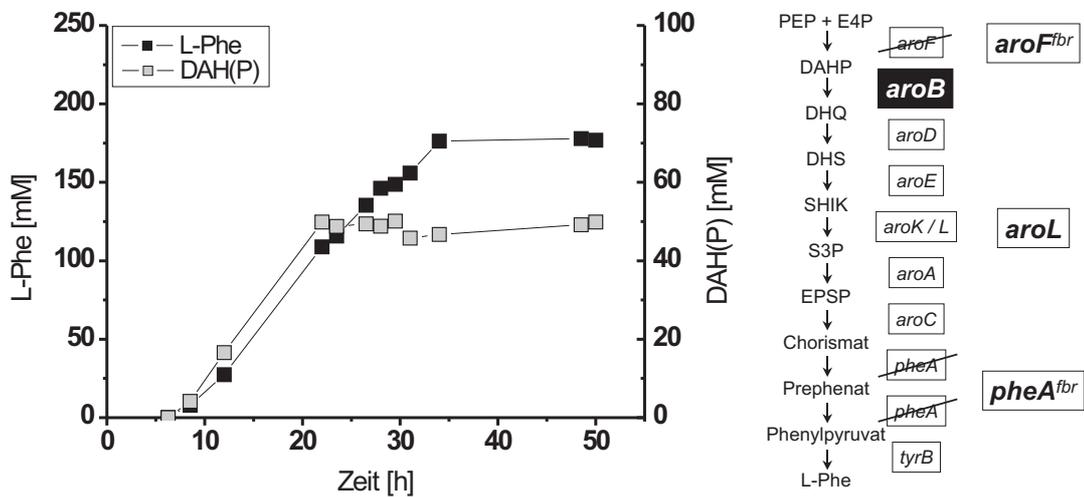


ABBILDUNG 6.16.:  $^1\text{H-NMR}$  Daten der Fermentation mit *E. coli* 4pF26 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet

Gene überexprimiert werden, als potenziell limitierende Reaktionsschritte wurden für *E. coli* 4pF20 AroK/L, AroB und AroE identifiziert. Die Metabolit-Bilanz für *E. coli* 4pF20 konnte unter Einbeziehung der gemessenen Nebenprodukte DAH(P), DHS und SHI zu 97-102% geschlossen werden.

### 6.3.2. *E. coli* 4pF26

Der Stamm *E. coli* 4pF26 enthält die Gene *aroF<sup>fbr</sup>*, *pheA<sup>fbr</sup>* und *aroL* auf dem Plasmid pF26. Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen von *E. coli* 4pF20, wurde in den Stamm *E. coli* 4pF26 zusätzlich das Gen für die Shikimat Kinase II (*aroL*) auf dem Plasmid eingefügt. Die Überexpression dieses Gens sollte die Akkumulation von Shikimat verhindern und so zu einer höheren L-Phe Bildung führen. Die Ergebnisse dieses Stammes sind in Abb. 6.16 dargestellt.

Die Bildung von Shikimat konnte verhindert werden, interessant ist hierbei, dass auch keine Bildung von DHS mehr beobachtet wurde. Das lässt den Schluss zu, dass die intrazelluläre Konzentration von Shikimat offenbar Einfluss auf die Bildung von DHS hatte. Für die Shikimat Dehydrogenase (AroE) wird von Dell *et al.* [49] über eine Feedback-Inhibierung durch Shikimat berichtet. Das bedeutet, dass im Stamm 4pF26 die intrazelluläre Shikimat-Konzentration durch die Überexpression von *aroL* offensichtlich so stark herabgesetzt wurde, dass diese Feedback-Schleife inaktiv war und dass neben Shikimat auch kein DHS mehr gebildet wurde. DAH(P) war das einzige Nebenprodukt aus der Aromatenbiosynthese, was analog zu den Ergebnissen mit *E. coli* 4pF20 auf eine Limitierung durch die 3-Dehydroquinat Synthese (AroB) hindeutete [110]. Da dieser enzymatische Schritt vor DHS und Shikimat liegt, hatte die Überexpression von *aroL* keinen Einfluss auf die DAH(P) Bildung, die mit *E. coli* 4pF20 vergleichbar ist. Unter Einbeziehung von DAH(P) konnte die Metabolit-Bilanz für 4pF26 geschlossen werden. Im nächsten Schritt sollte neben *aroL* zusätzlich das *aroB* Gen überexprimiert werden, um die L-Phe Bildung weiter zu erhöhen.

### 6.3.3. *E. coli* 4pF69

Der Stamm *E. coli* 4pF69 enthält die Gene *aroF<sup>wt</sup>*, *aroL* und *pheA<sup>fbr</sup>* auf dem Plasmid pF69. Im Vergleich zu *E. coli* 4pF26 wurde in *E. coli* 4pF69 das Gen für *aroF<sup>fbr</sup>* gegen das Wildtypgen *aroF<sup>wt</sup>* ausgetauscht. Die Verwendung des natürlichen Wildtyp-Gens hatte Vorteile in Bezug auf die Stabilität und Aktivität des Enzyms. Durch prozesstechnische Regelung der L-Tyr Konzentration in der Fermentation wurde die Feedback-Inhibierung des Enzyms durch L-Tyr erfolgreich umgangen [70]. Die Ergebnisse dieses Stammes sind in Abb. 6.17 dargestellt.

Analog zu *E. coli* 4pF26 wurde auch hier keine DHS oder Shikimat Bildung beobachtet, nur DAH(P) wurde als Nebenprodukt gemessen. Im Vergleich zu 4pF26 wurde die maximale L-Phe Konzentration hier früher erreicht, was auf eine höhere Aktivität von AroF<sup>wt</sup> hinweist. Die Bildung und die maximale Konzentration von DAH(P) waren jedoch in beiden Fällen sehr ähnlich.

### 6.3.4. *E. coli* 4pF79

Der Stamm *E. coli* 4pF79 enthält *aroF<sup>wt</sup>*, *aroB* und *pheA<sup>fbr</sup>* auf dem Plasmid pF79 und stellte eine Weiterentwicklung von pF69 dar. Da es zunächst aufgrund von Klonierungsproblemen nicht gelang, *aroB* als viertes Gen mit auf das Plasmid pF69 zu integrieren, wurde

6.3. Einsatz der  $^1\text{H-NMR}$  Metabolit Analytik für die *E. coli* L-Phe Stammentwicklung

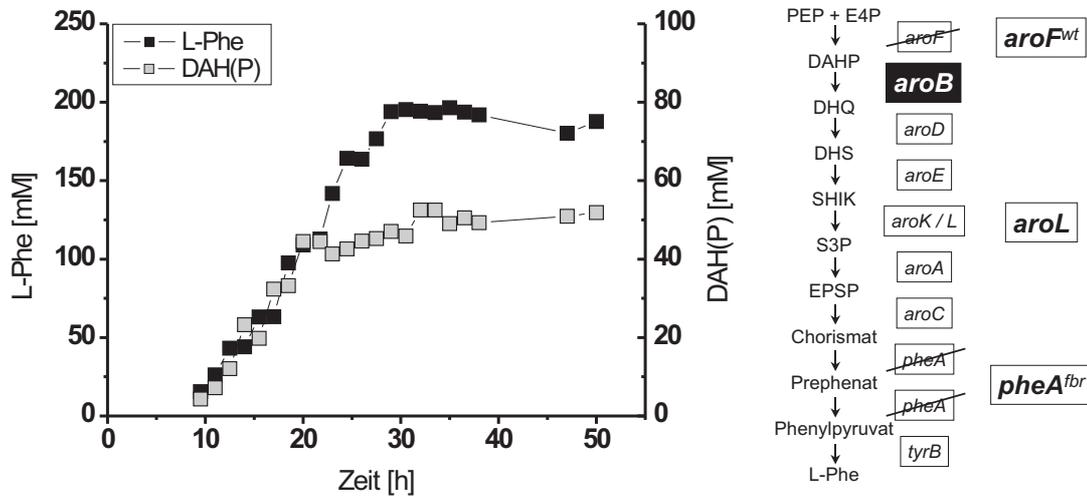


ABBILDUNG 6.17.:  $^1\text{H-NMR}$  Daten der Fermentation mit *E. coli* 4pF69 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet

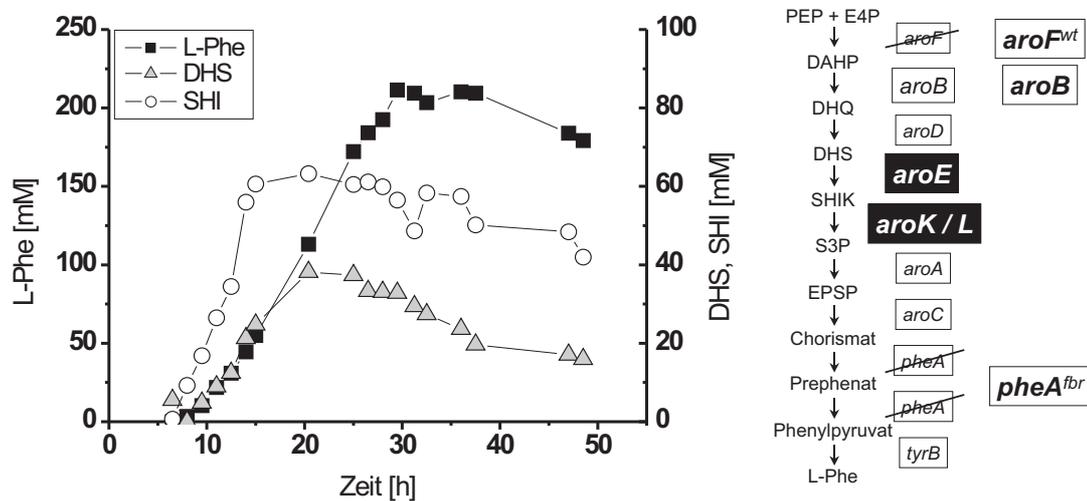


ABBILDUNG 6.18.:  $^1\text{H-NMR}$  Daten der Fermentation mit *E. coli* 4pF79 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet

es im Austausch gegen *aroL* auf das pF69 kloniert. Damit sollte der limitierende Charakter von *aroB* nachgewiesen werden, die Ergebnisse sind in Abb. 6.18 dargestellt.

Es konnte kein DAH(P) in den Proben gemessen werden, d.h. die Überexpression von *aroB* verhinderte die Akkumulation von DAH(P), und damit konnte der limitierende Charakter bewiesen werden. In der Enzymdatenbank BRENDA<sup>19</sup> wird DAH zusätzlich als Inhibitor für das AroB Enzym ausgewiesen [114]. Das bedeutet, dass die limitierende Aktivität von AroB durch DAH zusätzlich gehemmt wurde. Wenn die Überexpression von *aroB* die DAH(P) Akkumulation verhinderte, dann wird das vermutlich zu einer verringerten intrazellulären DAHP-Konzentration geführt haben. Die in Kapitel 6.7 dargestellten intrazellulären DAHP Messungen konnten diese Verringerung des DAHP Pools in den Zellen nachweisen. Aufgrund der dadurch veränderten Gleichgewichtslage der DAHP Synthase Reaktion könnte die Reaktionsgeschwindigkeit der DAHP Synthase erhöht worden sein, was eine Erhöhung des Gesamtflusses vom Zentralstoffwechsel in die Aromatenbiosynthese zur Folge gehabt hätte. Es würde somit nicht nur der bisher im DAH(P) verlorengegangene Kohlenstoff weiter in Richtung L-Phe fließen, sondern auch noch mehr PEP und E4P aus dem Zentralstoffwechsel in Richtung L-Phe abgezweigt werden. Obwohl diese Argumentation nur spekulativ ist, lässt sich ein Indiz dafür in den Daten finden.

Im Vergleich zu *E. coli* 4pF20 wurde für *E. coli* 4pF79 eine stark erhöhte Bildungsgeschwindigkeit für DHS und Shikimat festgestellt, was nicht nur durch das fehlende Nebenprodukt DAH(P) begründet sein könnte, sondern vielleicht ein Indiz für den höheren Gesamtfluss darstellt. Da in 4pF79 nun wieder das *aroL* Gen den Fluss zum L-Phe limitiert, sollte versucht werden, die beiden Gene *aroB* und *aroL* auf einem Plasmid zu integrieren.

### 6.3.5. *E. coli* 4pF81

Der Stamm *E. coli* 4pF81 trägt die Gene *aroF*<sup>wt</sup>, *pheA*<sup>fbr</sup>, *aroB* und *aroL* auf dem Plasmid pF81. Es gelang hier die zusätzliche Integration von *aroB* und *aroL* zusammen auf einem Plasmid, d.h. aller bis dato als limitierend identifizierten Gene der L-Phe Biosynthese. Dieser Stamm sollte daher weder DAH(P), DHS oder SHI als Nebenprodukte zeigen. Die Ergebnisse zu diesem Stamm zeigt Abb. 6.19.

Für diesen Stamm konnte die höchste L-Phe Konzentration im Fermentationsverlauf gemessen werden. Es konnte zwar keine Bildung von DAH(P) und DHS im Stamm 4pF81 gemessen werden, jedoch waren Shikimat und S3P als Nebenprodukte nachzuweisen. Shikimat war in diesem Zusammenhang ein eher überraschendes Nebenprodukt, da die Überexpression des Gens *aroL* in den vorausgehenden Experimenten mit *E. coli* 4pF26 bzw. 4pF69 die Shikimat-Bildung verhindern konnte.

Eine detailliertere, zeitliche Betrachtung der Shikimat und S3P Verläufe zeigte, dass Shikimat kein echtes Nebenprodukt war, sondern vollständig durch Dephosphorylierung aus S3P während der Fermentation gebildet wurde. Besonders interessant ist die Tatsache, dass der Zeitpunkt, der den Beginn der Dephosphorylierungsreaktion markierte, den Übergang von der L-Tyr limitierten Wachstums- in die sehr stark L-Tyr limitierte wachstumsentkoppelte Produktionsphase darstellte. In dieser Phase wiesen die Zellen anscheinend eine erhöhte unspezifische Phosphatase-Aktivität auf. Die vorausgehende Bildung von S3P wurde hier offenbar durch eine unzureichende Aktivität der EPSP Synthase (AroA) ausgelöst. Der Fluss durch den Biosyntheseweg ist offenbar so stark erhöht worden, dass nun die EPSP Synthase

---

<sup>19</sup>BRENDA, <http://www.brenda.uni-koeln.de>; 5 mM DAH führt zu einer 72%igen Inhibierung von AroB

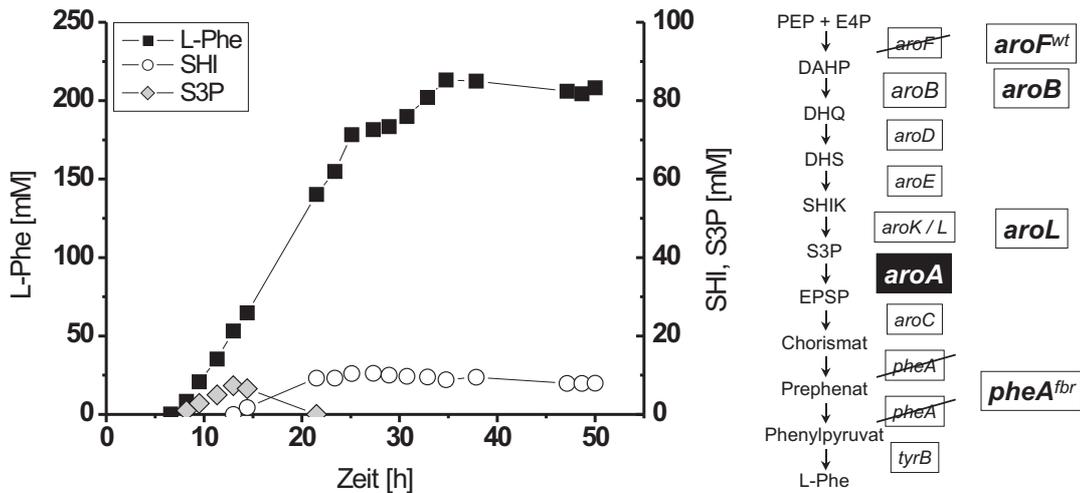


ABBILDUNG 6.19.:  $^1\text{H-NMR}$  Daten der Fermentation mit *E. coli* 4pF81 (links), Nebenproduktachse ist 2,5-fach überhöht dargestellt, L-Phe Biosynthese mit Genen bzw. gentechnischen Veränderungen (rechts), limitierende Gene weiß auf schwarz abgebildet

S3P und PEP nicht mehr schnell genug zu EPSP und  $\text{P}_i$  umsetzen kann. Alternativ könnte auch eine mangelnde PEP Versorgung die EPSP Synthase gedrosselt haben, da sie PEP als zweites Substrat benötigt und folglich mit der DAHP Synthase und dem PTS-System um PEP konkurrieren musste.

Die aus *in-vitro* Experimenten für PEP ermittelten Werte von  $K_m = 16 \mu\text{M}$  für die EPSP Synthase [108] und  $K_m \approx 80 \mu\text{M}$  für die DAHP Synthase [152] können diese Hypothese jedoch nicht stützen, da der EPSP Synthase eine höhere Affinität zu PEP zugesprochen wurde. Das gilt natürlich nur, sofern die Überexpression von *aroF<sup>wt</sup>* keinen Einfluss auf die maximalen Aktivitätsverhältnisse hatte. Allerdings wurde die EPSP Synthase als reversible Reaktion charakterisiert, deren Gleichgewicht zu 75–80 % auf der Seite von EPSP liegt [106, 107], jedoch wurde mit einem  $\text{P}_i$ -Überschuss auch die Rückreaktion von EPSP zu S3P und PEP beobachtet. Wenn nun die EPSP Synthase nicht durch die Verfügbarkeit von PEP eingeschränkt wurde, dann vielleicht durch eine zu hohe EPSP-Konzentration, die den Fluss über das Enzym verringerte. Diese hohe EPSP-Konzentration könnte in diesem Fall durch die Limitierung bei der Chorismat Synthase (AroC) verursacht werden, deren Reaktionsgeschwindigkeit ihrerseits nicht mehr ausreichte, um den Fluss durch den genetisch aufgebohrten Biosyntheseweg zu Chorismat umzusetzen. Gestützt wird diese Annahme durch Aktivitätsmessungen im Zellextrakt von *E. coli*, bei denen die spezifische Aktivität der Chorismat Synthase (AroC) nur 10–20 % der Aktivität der EPSP Synthase (AroA) betrug [73]. Arbeiten von Frost *et al.* konnten zeigen, dass zwar die Überexpression von *aroA* und *aroC* jeweils alleine zu einer leicht erhöhten L-Phe Produktbildung führte, dass jedoch die gemeinsame Überexpression beider Gene zu einer noch größeren L-Phe Produktbildung führte [49, 155].

In der späteren Produktionsphase wurde kein S3P mehr als Nebenprodukt gebildet, möglicherweise sank der Fluss in den Aromatenbiosyntheseweg unter das kritische Niveau. Für eine weitere gentechnische Verbesserung von *E. coli* 4pF81 könnte die Überexpression des *aroA* oder *aroC* Gens empfohlen werden. Angesichts der angesprochenen EPSP-Chorismat Thematik könnte die alternative Überexpression beider Gene ebenfalls diskutiert werden, da weder AroA noch AroC als Ursache für die S3P-Nebenproduktbildung eindeutig identifiziert werden konnten und der gemeinsamen Überexpression der stärkste Einfluss auf die L-Phe Bildung zugesprochen wurde [49, 155].

### 6.3.6. Zusammenfassung der Stammentwicklung der L-Phe Produzenten

Durch den Einsatz der  $^1\text{H}$ -NMR Methode konnten neben Shikimat auch DHS, DAH(P) und S3P als Nebenprodukte im Fermentationsüberstand nachgewiesen werden. Insbesondere bei den mittels NMR quantifizierten Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs wurden limitierende enzymatische Schritte, sogenannte Flaschenhälse (bottlenecks) identifiziert. Nach der zusätzlichen Überexpression der limitierenden Gene *aroB* und *aroL* in *E. coli* 4pF81 wurden DAH(P), DHS oder Shikimat nicht mehr als Nebenprodukte beobachtet. Die Bildung von S3P als Nebenprodukt in *E. coli* 4pF81 könnte sowohl durch die Limitierung von AroA verursacht worden sein, wahrscheinlicher jedoch durch AroC, deren zusätzliche Überexpression empfohlen wird.

Die Einbeziehung der Nebenprodukte in die Metabolit-Bilanz der Fermentationsprozesse führte zu einer geschlossenen Kohlenstoffbilanzierung in den dargestellten L-Phe Produktionsstämmen [70, 139]. Die Bilanz für den Fermentationsverlauf von *E. coli* 4pF79 ist beispielhaft in Abb. 6.20 gezeigt. Auf der Y-Achse ist die Wiederfindung der Glukosemenge aufgetragen, die im Fermentationsprozess zugesetzt wurde. Dieser Wert ist ausgedrückt in C-mol, d.h. mol Kohlenstoffatome. Der 100 % Wert entspricht der bis zu diesem Zeitpunkt zugesetzten Glukosemenge. Die Segmente der Diagrammflächen stellen die Wiederfindung des Kohlenstoffs in den verschiedenen Stoffwechselprodukten dar.

Der zeitliche Verlauf von Shikimat und S3P in *E. coli* 4pF81 deutete auf eine Zunahme der Phosphatase-Aktivität beim Übergang von der Wachstums- zur stationären Produktionsphase hin. Diese erhöhte Aktivität könnte auch eine Rolle bei den Schwierigkeiten der mikrobiellen Produktion und Isolierung von DAHP als Referenz-Standard mittels einer *E. coli* Mutante gespielt haben (Kap. 6.2.4).

Nach ihrer Isolierung und Aufreinigung (Kap. 6.2) standen viele Metaboliten der L-Phe Biosynthese als analytisches Referenzmaterial zur Verfügung und konnten vielfach in die HPLC Analytik für organische Säuren (Kap. 5.3.1) integriert werden (Tab. 6.7) [123]. Da die HPLC-Methode eine Routine-Analytik für alle Fermentationsproben darstellte, wurde damit die Evaluierung neuer L-Phe Produktionsstämmen im Hinblick auf das Nebenproduktspektrum erleichtert.

Die Anwendung der kombinierten und damit teilweise redundanten Information von HPLC und  $^1\text{H}$ -NMR Analytik blieb dabei nicht nur in der Anwendung auf L-Phe Produktionsstäm-

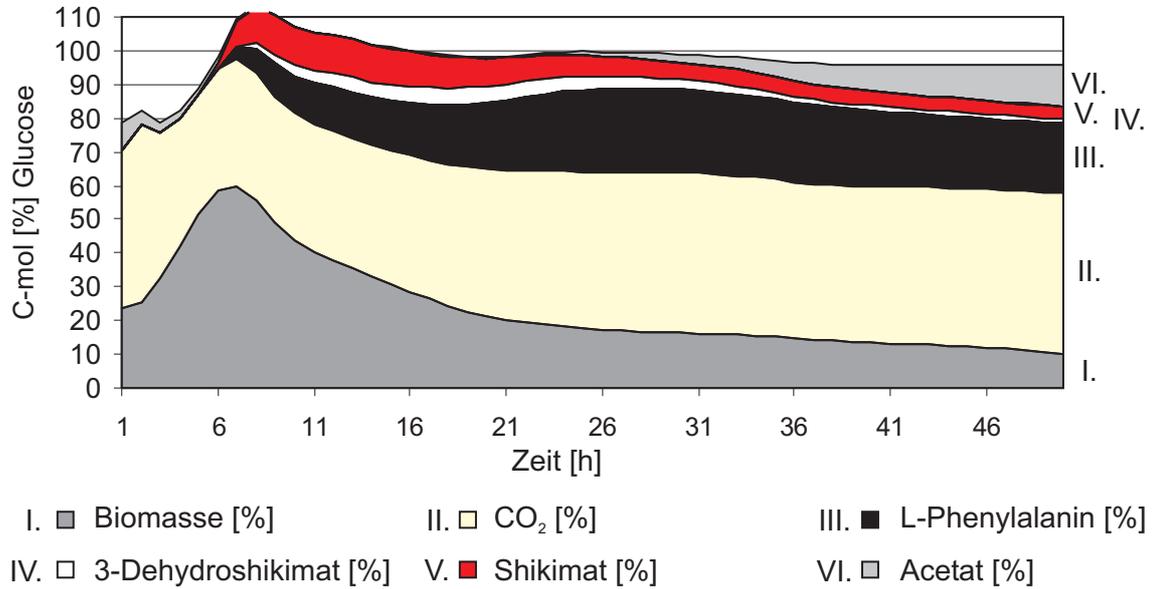


ABBILDUNG 6.20.: Integrale Kohlenstoff-Bilanz *E. coli* 4pF79

TABELLE 6.7.: Erweiterte Analytik für Fermentationsproben zur L-Phe Stammentwicklung mit HPLC und  $^1\text{H-NMR}$  nach Isolierung der Referenz-Standards von Metaboliten der L-Phe Biosynthese; Metaboliten sind nach Position im Biosyntheseweg geordnet

Metabolit	HPLC	$^1\text{H-NMR}$
3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP)	+	+
3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat (DAH)	+	+
3-Dehydroquinat (DHQ)	+	+
3-Dehydroshikimat (DHS)	+	+
Shikimat (SHI)	+	+
Shikimat-3-phosphat (S3P)	+	+
5-Enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphat (EPSP)		+
Chorismat	+	+
Prephenat	(+)	+
Phenylpyruvat	(+)	+
L-Phenylalanin (L-Phe)	+	+

me beschränkt. Auch die Arbeiten für das CHORUS-Projekt<sup>20</sup>, bei dem der Shikimat-Weg in *E. coli* zur Bereitstellung von Chorismat benutzt wird, können von der erweiterten Nebenproduktanalytik profitieren, da das Produkt- und vor allem das Nebenproduktspektrum der Produktionsstämme rasch zugänglich sind. Die Messung der extrazellulären Konzentrationen konnten wertvolle Informationen zur Verbesserung der L-Phe Produzenten beitragen, jedoch lassen sie nur sehr bedingt Rückschlüsse über die intrazellulären Verhältnisse in den Zellen zu. Wenn überhaupt könnten lediglich die zeitlichen Änderungen der extrazellulären Metabolitkonzentrationen, d.h. die Raten, einen Beitrag dafür liefern (Kap. 6.6).

### 6.4. Identifizierung weiterer Nebenprodukte mit LC-MS

Mit der <sup>1</sup>H-NMR Analytik konnten Nebenprodukte in den Fermentationsproben erfasst werden, und mit ihr gelang auch eine deutliche Verbesserung der L-Phe Produktionsstämme. Die Methode gelangte jedoch an ihre Grenze, als die Kohlenstoffbilanzen der Stämme geschlossen werden konnten und in den <sup>1</sup>H-NMR Daten keine weiteren Signale potenzieller Nebenprodukte mehr identifiziert werden konnten. Obwohl sie mit vielen Vorzügen ausgestattet ist, schränkte die begrenzte Empfindlichkeit ihre Anwendung ein. Außerdem war es bei den oft recht komplexen Spektren der Fermentationsproben, die zusätzlich durch die Glukose überlagert waren, sehr schwierig eine unbekannte Substanz als Nebenprodukt zu identifizieren, da ihr komplettes Signal-Spektrum wegen Überlagerung vermutlich nicht zugänglich sein würde oder Signale fälschlich zugeordnet würden. Vor diesem Hintergrund war die <sup>1</sup>H-NMR nicht das richtige Werkzeug für die Identifizierung weiterer unbekannter Nebenprodukte in den Fermentationsproben.

Obwohl sich keine weiteren Nebenproduktsignale mit <sup>1</sup>H-NMR nachweisen ließen und obwohl die Kohlenstoffbilanz geschlossen werden konnte, konnten mit der organischen Säure HPLC Methode (Kap. 5.3.1) weitere Peaks unbekannter Substanzen in den Fermentationsproben detektiert werden. Dabei musste es sich um Metaboliten handeln, deren Konzentration nicht mehr von der NMR erfasst werden konnte und die daher auch keinen signifikanten Einfluss auf die Kohlenstoffbilanz hatten.

Obwohl das UV-Spektrum der unbekannt Peaks über den Dioden-Array-Detektor der HPLC leicht zugänglich war, blieb die korrekte Identifizierung des Peaks sehr unwahrscheinlich, da die UV-Information alleine nicht spezifisch genug ist. Die ECOCYC-Datenbank<sup>21</sup> enthält z.Zt. 864 Einträge bekannter Metabolite der *E. coli* Zelle, die KEGG Datenbank<sup>22</sup>, in der die Informationen von einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Systeme hinterlegt sind, enthält sogar rund 9740 bekannte Einträge. Eine Möglichkeit, die Identifizierungswahrscheinlichkeit deutlich zu verbessern, könnte in der Bestimmung des Molekulargewichts des unbekannt Peaks liegen. Die Molekularmasse ist ein Kriterium, nach der in zunehmendem Maße in frei zugänglichen Internet-Datenbanken wie ECOCYC gesucht werden kann und die den Schlüssel zur Aufklärung der unbekannt Substanzen darstellen könnte.

Sie sollte mit Hilfe der HPLC-MS ermittelt werden und, da es sich um eine Frage

---

<sup>20</sup>CHORUS = Chorismat als universeller Synthesebaustein

<sup>21</sup>ECOCYC, Encyclopedia of *Escherichia coli* Genes and Metabolism

<sup>22</sup>KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

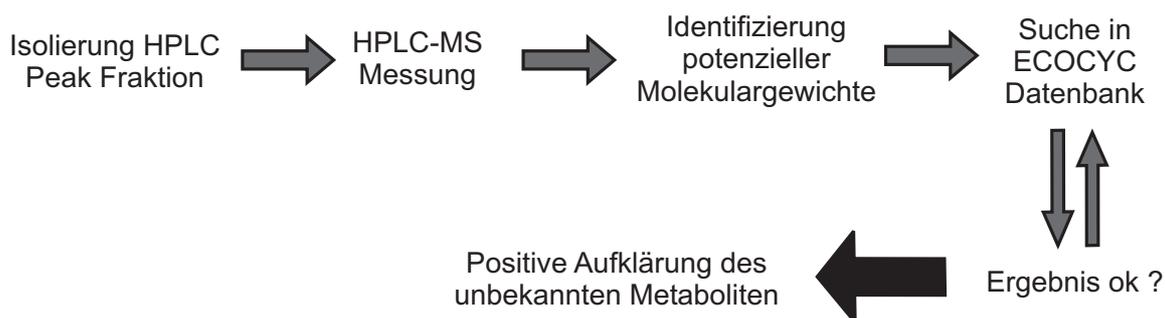


ABBILDUNG 6.21.: Prinzipielle Ablaufskizze bei der Identifizierung unbekannter Metabolite in Fermentationsproben

der Strukturaufklärung einer unbekanntem Verbindung handelte, wurde der Ionenfallen MS Detektor für die Messungen verwendet. Aufgrund der kompletten Inkompatibilität des Schwefelsäure-Eluenten konnte die organische Säure HPLC nicht direkt an das MS angeschlossen werden. Daher wurden Elutionsvolumina (Fraktionen) der unbekanntem Peaks nach dem UV-Detektor manuell aufgefangen und danach als Probe in die HPLC-MS injiziert (Abb. 6.21). Bei der LC-MS wurden zwei Analysen mit unterschiedlichen stationären Phasen durchgeführt, ein Lauf mit der Nucleodex- $\beta$ -OH Phase und einer mit der Hypercarb-Phase<sup>23</sup>.

Auf der Hypercarb-Phase zeigten Substanzen mit aromatischen oder olefinischen Bindungen in aller Regel sehr starke Retention, wogegen auf der Nucleodex-beta-OH Phase in der Regel eine sehr schwache Retention für die meisten kleinen, schwach polaren und auch polaren Verbindungen erzielt werden konnte. Vielleicht konnte so eine zusätzliche chemische Information über die Substanz erhalten werden. Den HPLC-Lauf, aus dem die Peak Fraktion gesammelt wurde, zeigt die Abb. 6.22. Auf der rechten Seite ist die Information des Dioden-Array-Detektors (DAD) mit der Retentionszeit auf der X-Achse und der Wellenlänge auf der Y-Achse gezeigt. Auf der linken Seite ist das UV-Spektrum der unbekanntem Substanz dargestellt. Die Retentionszeit der Verbindung ist  $t = 16,9$  min und die UV-Absorptionsmaxima wurden mit  $\lambda = 203, 282, 564, 595$  nm bestimmt.

In den beiden Probeläufen der LC-MS wurde in den UV-Daten nach dem unbekanntem Peak gesucht. In dem Lauf mit der Hypercarb-Phase war kein UV-Peak und kein Peak in den MS-Daten zu erkennen, möglicherweise wurde die Substanz vollständig auf der Säule zurückgehalten. In dem Probenlauf mit der Nucleodex Phase wurden passende UV-Signaturen mit Retentionszeiten von 8–9 min gefunden, wie Abb. 6.23 zeigt. Für die Wegstrecke vom UV- zum MS-Detektor wurden 1,1 min benötigt, daher wurde in den MS-Daten im Zeitfenster von 9–10 Minuten nach potenziellen Massenkandidaten gesucht. Ein Ausschnitt der gemessenen MS-Daten zeigt Abb. 6.24. Auf der X-Achse ist hier die Retentionszeit und auf der Y-Achse das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) aufgetragen. Die Intensität der Massenpeaks in diesem 3D-Plot wird farbig bzw. durch den Grauton ausgewiesen.

<sup>23</sup>Phase aus sphärischen graphitisierten Kohlenstoffpartikeln

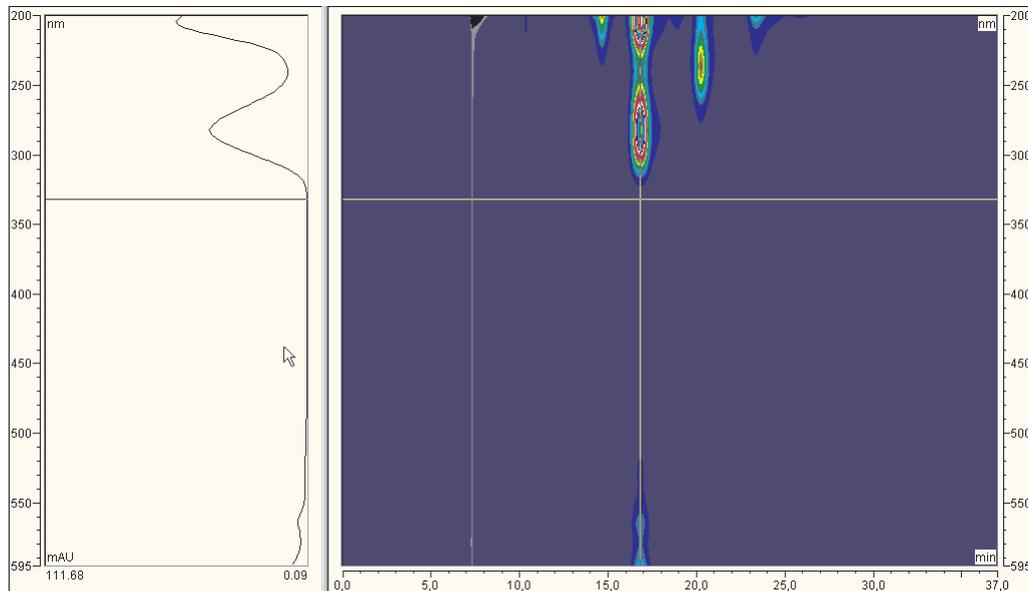


ABBILDUNG 6.22.: UV-Daten der organischen Säure HPLC mit unbekanntem Peak bei 16,9 min

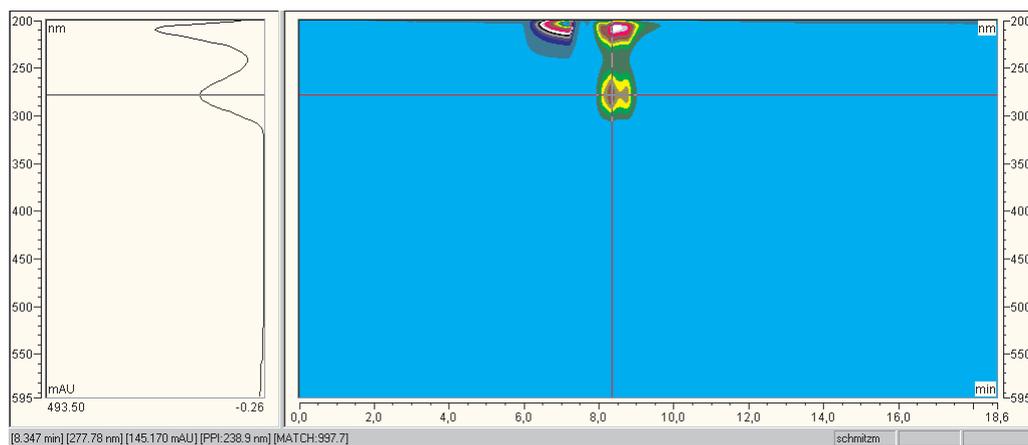


ABBILDUNG 6.23.: UV-Daten der HPLC-MS Messung der Peak-Fraktion 16,9 min (Nucleodex- $\beta$ -OH Phase)

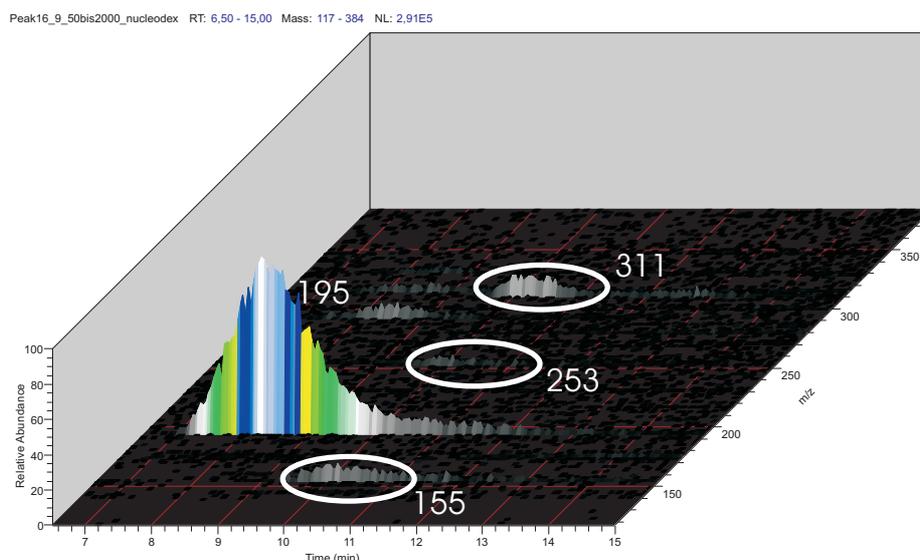


ABBILDUNG 6.24.: MS-Daten der HPLC-MS Messung der Peak-Fraktion 16,9 min (Nucleodex- $\beta$ -OH Phase)

Die Schwierigkeit bestand nun darin, dass in diesem Zeitfenster nicht nur eine einzige Masse vorhanden war. Daher wurden zunächst alle gefundenen Massen als potenzielle Kandidaten betrachtet und ausgewertet (Tab. 6.8). Der sehr große, deutliche Peak bei  $m/z = 195$  war kein unbekannter Peak, sondern das einfach geladene Dimer-Ion der Schwefelsäure aus der Probelösung. Von den gefundenen Kandidaten passten drei sehr gut in das erwartete Retentionszeitfenster. Auffällig war, dass zwei der Massen eine rechnerische Verbindung zueinander hatten, da  $m/z = 311$  und  $155$  beide auf die gleiche Molekülmasse von  $156 \text{ g/mol}$  zurückgeführt werden können, sofern es sich bei ihnen um eine Monomer  $[M-H]^-$ -Dimer  $[2M-H]^-$  Kombination handelt. Solche Monomer-Dimer Dubletten wurden auch für andere Substanzen in dieser Arbeit beobachtet und lassen darauf schließen, dass es sich bei diesen beiden Peaks mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um Artefakte handelte.

Neben der  $m/z = 155$  und  $311$  wurde eine Masse von  $m/z = 253$  im passenden Zeitfenster identifiziert und mit den zugehörigen potenziellen Molekularmassen von  $156$  und  $254 \text{ g/mol}$  Suchläufe gegen die ECOCYC Datenbank durchgeführt. Die erhaltenen Treffer sind in Tab. 6.8 dargestellt. Lediglich bei 4 Substanzen war eine korrekte Massenübereinstimmung gefunden worden, wobei 2-Phosphoglycolat und Shikimat-3-phosphat überhaupt nicht mit dem UV-Spektrum der gesuchten Substanz übereinstimmen konnten. Es blieben nur 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat und Orot-Säure als potenzielle Treffer übrig. Beide Verbindungen waren kommerziell erhältlich, und über eine Referenz-Messung konnte Orotsäure eindeutig als Substanz unter dem Peak 16,9 min in der organischen Säure HPLC identifiziert werden.

Mit dem gleichen methodischen Vorgehen (Abb. 6.21) wurde ein weiterer unbekannter Peak mit einer Retentionszeit von 25 min untersucht. Durch die Verwendung der UV-Daten

TABELLE 6.8.: Datenbank-Abfrage ECOCYC für den Molekulargewichtsbereich 153–159 (Nr. 1–8) und 251–257 g/mol (Nr. 9–13); Treffer mit korrekter Molmasse hervorgehoben

Treffer Nr.	Name	Molekülmasse
1	3-Sulfinoalanine	153,15
2	2,3-Dihydroxybenzoate	154,12
3	L-Histidin	155,16
<b>4</b>	<b>2-Phosphoglycolate</b>	<b>156,03</b>
<b>5</b>	<b>Orotsäure</b>	<b>156,10</b>
<b>6</b>	<b>2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat</b>	<b>156,14</b>
7	Allantoin	158,12
8	Dihydroorotsäure	158,11
9	5'-Deoxyadenosine	251,24
10	Deoxyadenosine	251,24
11	Deoxyinosine	252,23
<b>12</b>	<b>Shikimate-3-phosphate</b>	<b>254,13</b>
13	Dihydro-neo-pterin	255,23

wurde der Peak in einem LC-MS Lauf ermittelt, anhand der MS-Daten das Molekulargewicht bestimmt und durch die ECOCYC Datenbank als Uracil identifiziert. Über die Referenzmessung mit einem kommerziellen Standard konnte das verifiziert werden. Die ermittelten maximalen Konzentrationen der beiden Substanzen in Fermentationen mit L-Phe Produzenten liegen im Bereich von  $0,6\text{--}1\text{ g L}^{-1}$  (Uracil) und  $0,2\text{--}0,8\text{ g L}^{-1}$  (Orotsäure). Damit lagen sie auf dem erwarteten niedrigen Niveau, auf dem sie in der Metabolit-Bilanz nicht signifikant ins Gewicht fallen und auch von der in dieser Arbeit verwendeten  $^1\text{H-NMR}$ -Methode nicht erfasst werden konnten.

Beide Substanzen waren in der Literatur bereits als fermentative Nebenprodukte von *E. coli* beschrieben worden [187], wobei es jedoch vom verwendeten *E. coli* Stamm abhängig war, welches der beiden beobachtet wurde. Während der Phase exponentiellen Wachstums wurde im Medium einiger *E. coli* K12 Stämme Orotsäure und in anderen K12 Stämmen, sowie den *E. coli* B Stämmen Uracil als Nebenprodukt in Konzentrationen von  $< 1\text{ g L}^{-1}$  beschrieben. Ein Literaturhinweis auf die Ursache der Uracil Bildung als Nebenprodukt konnte bisher nicht gefunden werden, für die Bildung von Orotsäure anstatt Uracil in einigen K12 Stämmen wird ein Gen-Defekt der Oritidin-5-phosphate Decarboxylase, einem Enzym in der Pyrimidin-Biosynthese, vermutet [187].

Im Unterschied zur Literatur wurde in vielen der hier verwendeten *E. coli* Stämmen sowohl Uracil als auch Orotsäure als Nebenprodukt beobachtet, unabhängig ob es sich um einen L-Phe Produzenten oder Metabolit-Produzenten handelte (Kap. 4.1.1). Die Orotsäurebildung war dabei hauptsächlich an das Wachstum gekoppelt, während die Uracilbildung erst nach IPTG Induktion der plasmid-codierten Gene begann und die zuvor gebildete Orotsäure im selben Zeitraum teilweise wieder abnahm. Möglicherweise ist hierfür nicht nur ein genetischer Defekt verantwortlich, sondern ein Mechanismus der metabolischen Regulation in der Zelle.

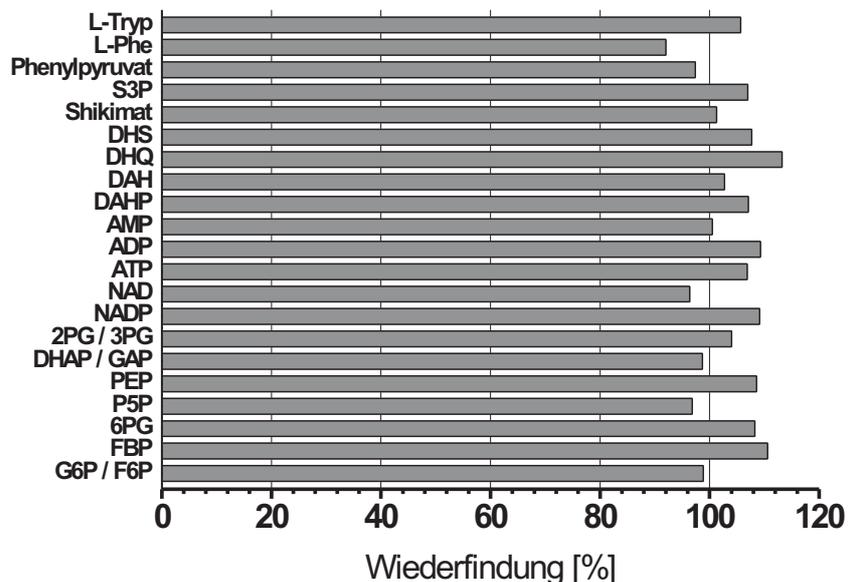


ABBILDUNG 6.25.: Wiederfindung nach Perchlorsäure–Zellaufschlussverfahren, gemessen mit Triple Quadrupol LC–MS

## 6.5. Untersuchungen zu Methanol–Quenching– und Zellextraktionsverfahren

### 6.5.1. Stabilität der Metaboliten bei der Extraktion mit Perchlorsäure ( $\text{HClO}_4$ )

Vor der Bestimmung der intrazellulären Metaboliten werden die Zellen mit 43,75%iger Perchlorsäure aufgeschlossen, um die Metaboliten aus den Zellen zu extrahieren. Aufgrund der stark sauren und oxidierenden Eigenschaften der Perchlorsäure bestand die Gefahr, dass Metaboliten unter diesen Bedingungen teilweise oder vollständig zerstört werden. Die anhand der Analytik gemessenen Werte dieser Metaboliten wären verfälscht, da sie geringere Konzentrationen suggerieren würden, als tatsächlich in der Zelle vorhanden waren.

Zur Kontrolle der Stabilität der Metaboliten wurde eine Standardlösung mit dem in Kap. 4.4.1 beschriebenen Perchlorsäure–Zellaufschlussverfahren behandelt und mit der Triple Quadrupol LC–MS Methode vermessen. Die Daten zur Wiederfindung der Metaboliten in den Proben nach der Zellextraktion sind in Abb. 6.25 dargestellt. Neben Metaboliten und Nucleotiden aus dem Zentralstoffwechsel wurden auch die Metaboliten der Aromatenbiosynthese in diese Untersuchung mit einbezogen. **Das Ergebnis zeigt, dass für alle untersuchten Metaboliten die Stabilität bei der Perchlorsäure–Extraktion gegeben ist.** Für die meisten Metaboliten lag die gemessene Wiederfindung zwischen 95 und 105 % und damit innerhalb des Messfehlers.

### 6.5.2. Zellintegrität beim Methanol–Quenching–Verfahren

In einem Glukosepulsexperiment mit schneller Probenahme werden die Zellproben aus dem Bioreaktor in eine  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalte 70 mM HEPES enthaltende 60%ige wässrige Methanollösung injiziert, um den Stoffwechsel der Zellen durch die Temperaturerniedrigung zu stoppen. Dieser Prozess wird als Methanol–Quenching–Verfahren bezeichnet. Bei dem abrupten Wechsel der Bedingungen bestand die Möglichkeit, dass die Integrität der *E. coli* Zellstruktur Schaden nimmt, d.h. ein Teil der Zellen könnte zerstört worden sein und das hätte die zu ermittelnde intrazelluläre Konzentration systematisch erniedrigt. Durch die Messung der Zellzahl sollte untersucht werden, ob es bei dem Methanol–Quenching zu einer Zerstörung der *E. coli* Zellen kommt. Die Messungen wurden mit einem CASY1 Modell TT Zellzähler, wie unter Kap. 5.2 beschrieben, durchgeführt. Entsprechend des Messprinzips des Gerätes können damit nur intakte Zellen nachgewiesen werden, die in erster Näherung einen Isolator darstellen.

Die Untersuchungen wurden sowohl mit *E. coli* K12 Wildtyp, als auch mit dem rekombinanten L–Phe Produktionsstamm 4pF81 durchgeführt. In den Messungen konnten keinerlei Unterschiede zwischen dem Verhalten beider Zelltypen erkannt werden. Zunächst wurde der Einfluss der Quenching Flüssigkeit und der Temperatur untersucht. Dazu wurden Zellproben aus Fermentationen im 20 L Bioreaktor mit dem Methanol–Quenching–Verfahren behandelt (Kap. 4.3.2) und die gemessene Zellzahl in der Fermentation und nach dem Quenchen in Relation gesetzt. Die Temperatur der Quenchingflüssigkeit betrug in den beiden kalten Proben  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  und in den beiden warmen Proben  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Abb. 6.26, links). Die Ergebnisse der beiden Probensätze zeigen, dass weder die methanolische Quenchingflüssigkeit allein, noch ihre Kombination mit der beim Quenching vorherrschenden Temperatur von  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine Auswirkung auf die Wiederfindung der Zellen im Vergleich zur Fermentationslösung hatte.

Weiterhin wurde untersucht, ob es möglicherweise zu einem zeitabhängigen Verlust von *E. coli* Zellen nach dem Methanol–Quenching in dem Zeitraum bis zur Aufarbeitung der Proben kam. Dazu wurde eine weitere Serie von Zellproben dem Methanol–Quenching unterworfen und die Wiederfindung der Zellen zu verschiedenen Zeiten bestimmt (Abb. 6.26, rechts). Aus den Daten konnte der Schluss gezogen werden, dass es innerhalb des Zeitraums bis 19,5 h keine Zerstörung von *E. coli* Zellen in den untersuchten Proben gab, die Wiederfindung der Zellen lag im Bereich von 100–105 %.

### 6.5.3. Durchlässigkeit der Zellen für Metaboliten beim Methanol–Quenching–Verfahren

Die Rückhaltung der Metaboliten in den Zellen während des Methanol–Quenching–Verfahrens wurde untersucht. Nach dem Stoppen des Stoffwechsels durch die  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalte methanolische Lösung könnten Metabolite durch die Zellmembran in den methanolischen Überstand gelangt sein. Das hätte Einfluss auf die intrazelluläre Messung der Metaboliten, die dadurch mit einem systematischen Fehler behaftet wäre und damit zu kleineren gemessenen Konzentrationen führen würde.

Um diesen Effekt eines potenziellen Metabolitverlustes aus den Zellen in den Überstand zu untersuchen, wurden sowohl die methanolischen Überstände aus dem Methanol–Quenching–Verfahren (Kap. 4.3.2) als auch die dazugehörigen Zellextrakte mit der Triple Quadrupol

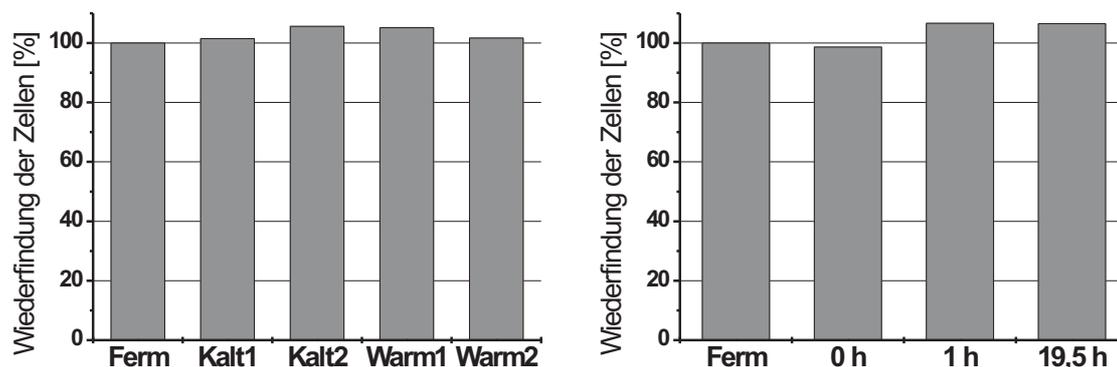


ABBILDUNG 6.26.: Wiederfindung von *E. coli* Zellen nach Methanol-Quenching; Einfluss von Temperatur (links) und Verweildauer (rechts)

LC-MS vermessen, wobei mit PEP und AMP zwei Metaboliten mit unterschiedlichem Molekulargewicht und chemischer Struktur als Referenz für die Untersuchung gewählt wurden.

In den Zellextraktproben konnten PEP und AMP nachgewiesen und quantifiziert werden (Abb. 6.27, links). In den meisten methanolischen Überstandsproben konnten zwar Peaks detektiert werden, die jedoch nur eine sehr geringe Peakfläche aufwiesen und nicht eindeutig als Metabolitsignale interpretiert werden konnten. Lediglich in der ersten bzw. den ersten drei Proben konnten stärkere Peaks in den Massenspuren von AMP bzw. PEP detektiert werden. Für die gemessenen potenziellen Metabolitpeaks wurde die Quantifizierung durchgeführt, wobei die Konzentrationsbestimmung vor allem bei den sehr kleinen Peakflächen aufgrund der notwendigen Extrapolation nur eine Näherungslösung darstellen konnte.

Ungeachtet dieser Problematik konnten nun die absoluten Metabolitanteile im Zellextrakt und in der methanolischen Quenching Lösung gegenübergestellt werden (Abb. 6.27, rechts). In den meisten Proben befand sich mehr als 95 % der bilanzierten Gesamtmenge der Metaboliten in den Zellextrakten. Lediglich in der ersten bzw. den ersten drei Proben konnte ein höherer Anteil potenzieller Metabolite im methanolischen Überstand beobachtet werden.

Es fällt auf, dass es gerade die Proben aus dem quasi steady-state vor dem Glukosepuls waren, in denen ein potenziell höherer Anteil von Metaboliten detektiert wurde. Es könnte also in diesem Fall möglicherweise über eine Veränderung der Zellen nach dem Glukosepuls spekuliert werden, die ein Austreten von Metaboliten nach dem Puls erschweren könnten. Das könnten z.B. Veränderungen der Zellmembran oder der Zelloberfläche sein. Auf der anderen Seite zeigen PEP und AMP in den Überstandsproben vor dem Puls kein einheitliches Verhalten. Bei AMP ist nur in der ersten Probe eine höhere Konzentration

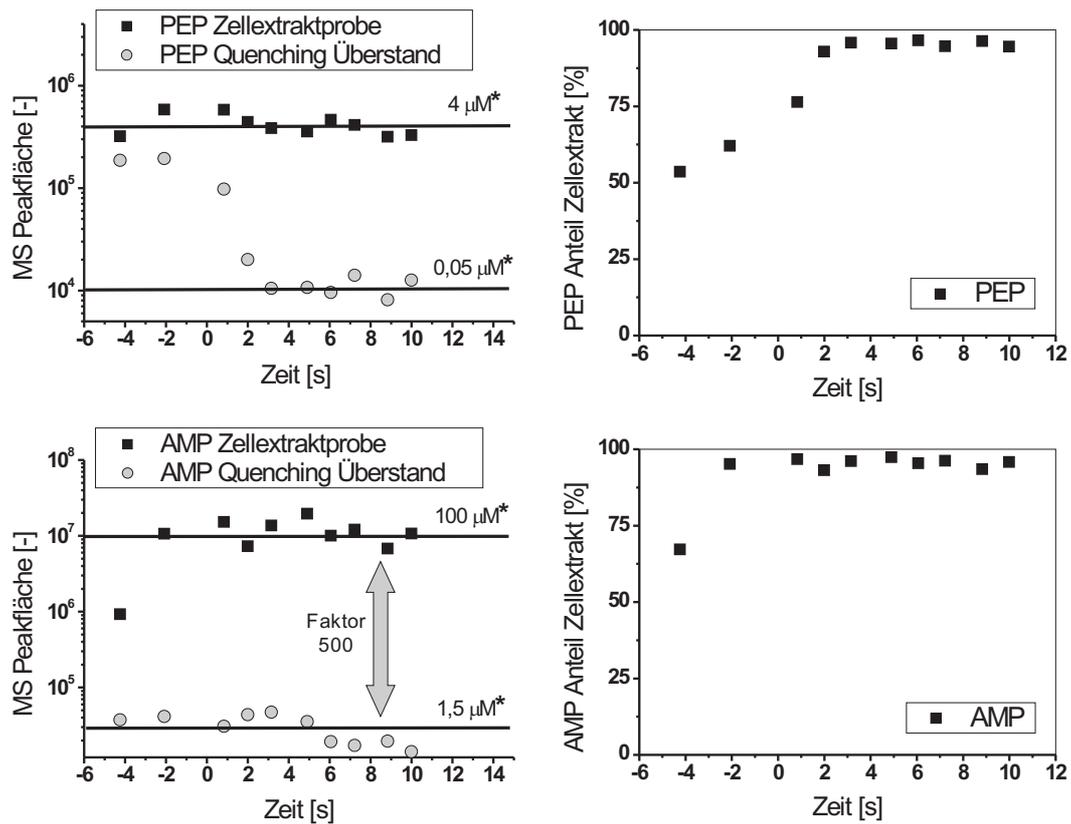


ABBILDUNG 6.27.: Links: AMP und PEP in Zellextrakten (schwarze Quadrate) und in methanolischen Quenching Überständen (graue Kreise), die aus der Kalibration berechneten Konzentrationsniveaus der MS-Peakfläche sind mit einem Sternchen markiert und als horizontale Linien eingetragen; Rechts: PEP und AMP Anteil im Zellextrakt bezogen auf die Gesamtmenge

bestimmt worden, bei PEP dagegen kann ein Trend in den ersten drei Proben beobachtet werden. Diese Unterschiede deuten daher nicht auf eine generelle Veränderung der Zelleigenschaften nach dem Puls hin, da sie sonst für AMP und PEP gleich sein sollten. Daher sollte auch die Möglichkeit von Messartefakten in diesen Proben in Betracht gezogen werden.

In Untersuchungen mit einer Ionenchromatographie–Triple Quadrupol MS Kopplung am Institut für Biotechnologie 1, konnten in vergleichbaren Proben keine Metabolitpeaks (d.h. auch keine schwachen) für AMP oder PEP in den methanolischen Überstandsproben identifiziert werden [20]. Anhand der Ergebnisse für die gewählten Referenzmetabolite AMP und PEP lassen die Daten den Schluss zu, dass es nicht zu einem Metabolitverlust aus der Zelle in den methanolischen Überstand bei der Anwendung des Methanol–Quenching–Verfahrens mit *E. coli* Zellen kam. Obwohl in Proben vor dem Puls potenzielle Peaks von PEP und AMP detektiert wurden, konnten solche Beobachtungen bei Messungen mit einer Ionenchromatographie Triple Quadrupol MS Kopplung nicht bestätigt werden.

## 6.6. Entwicklung eines Fed–Batch Fermentationsverfahrens mit Glukosepuls

In der Vergangenheit wurden Glukosepulsexperimente mit *Saccharomyces cerevisiae* [101, 117, 128, 167, 168, 172], *Zymomonas mobilis* [182, 183] und *E. coli* [22, 33, 142, 144] durchgeführt, um die dynamische Antwort in den Metaboliten des Zentralstoffwechsels (Glykolyse, Pentose–Phosphat–Weg, Zitratzyklus) mittels einer schnellen Probenahme und gleichzeitigem Quenchen des Stoffwechsels aufzuzeichnen. Dabei wurden bisher jedoch ausschließlich Wildtyporganismen verwendet, und die Zellen wurden in einem Chemostaten, d.h. in einer kontinuierlichen Kultur fermentiert. Um das ganze Potenzial dieser Pulsexperimententechnik auszuschöpfen, sollte sie nicht nur auf die Beobachtung des katabolen Zentralstoffwechsels beschränkt bleiben, sondern auch Anwendung auf verzweigende anabole Biosynthesewege finden. In dieser Arbeit soll die Glukosepulstechnik auf die Untersuchung der Aromatenbiosynthese in einem gentechnisch veränderten L–Phe Produktionsstamm angewendet werden. Um dies zu erreichen, musste die bisher etablierte experimentelle Vorgehensweise verändert und ihre Einsatzmöglichkeiten für diese erweiterte Fragestellung überprüft werden [85, 148].

- Wegen der Problematik der genetischen Instabilität der L–Phe Produktionsstämme konnte keine kontinuierliche Fermentationsführung eingesetzt werden, selbst bei geringen Verweilzeiten wurden in Experimenten mit L–Phe Produzenten große genetische Instabilitätsprobleme beobachtet [70]. Daher sollte auf ein Fed–Batch Verfahren zurückgegriffen werden.
- Das Fed–Batch Verfahren sollte mehr experimentelle Freiheitsgrade erlauben, da nun die Vielfalt der zur Verfügung stehenden plasmid–basierten *E. coli* Stämme voll ausgeschöpft werden konnte, und dadurch eine große Zahl möglicher genetischer Kombinationen zur Auswahl stand.
- Es musste geklärt werden, ob und wie das Glukosepulssignal, das den Zentralstoffwechsel anregt, auch in den Produktstoffwechselweg weitergeleitet wird. Die Verwendung von Glukose als Signalgeber sollte auch hier gute Voraussetzungen bieten, da PEP sowohl als Phosphat–Donor an der Glukose–Aufnahme über das PTS–System, als auch

als Vorläufermetabolit der Aromatenbiosynthese fungiert. Daher wurde für den Fluss in die Aromatenbiosynthese kurzfristig (Sekunden-Bereich) ein Abfall, d.h. ein negatives Signal, erwartet. Langfristig sollte die Erhöhung der Glukosebereitstellung jedoch zu einem höheren Fluss in die Aromatenbiosynthese führen. Besonderes Interesse galt hier nicht nur der Pulsweiterleitung in die Aromatenbiosynthese, sondern auch dem Pulsverhalten im linearen ersten Teil, d.h. der Fortpflanzung des Signals im Stoffwechselweg.

- Bisher lagen auch keine Informationen darüber vor, in welchem Zeitraum die Signalweiterleitung des Pulses in den Produktstoffwechsel erfolgen würde, und es sollte zumindest eine Abschätzung getroffen werden, ob diese Veränderung im Bereich von Sekunden oder Minuten zu erwarten war, um das Zeitfenster für eine intrazelluläre Signalverfolgung abschätzen zu können.

Zur Etablierung der Fed-Batch Fermentationstechnik mit Glukosepuls wurde der *aroB* negative Stamm *E. coli* DAH(P) verwendet. Ziel der Untersuchung war es, eine experimentelle Pulsprozedur in die Fed-Batch Fermentation zu integrieren und zu untersuchen, ob ein Glukosepuls in einer Glukose limitierten Kultur zu einer Anregung des Flusses in die Aromatenbiosynthese führt. Die Messung des Puls-Signals, d.h. die Änderung des Flusses in die Aromatenbiosynthese erfolgte dabei durch Messung der extrazellulären Produktbildungsraten der Metabolite, die aufgrund des genetischen Blocks nicht weiter umgesetzt werden konnten und im Fermentationsüberstand akkumulierten.

Nach der Etablierung des Verfahrens wurden zusätzlich Experimente mit *E. coli* DHS, einer *aroE* negativen Mutante und *E. coli* S3P, einer *aroA* negativen Mutante durchgeführt, um den Verlauf des Pulssignals im Stoffwechselweg zu beleuchten. Abb. 6.28 gibt einen Überblick über die drei verwendeten Stämme und ihre Einordnung in den Biosyntheseweg. Alle drei Stämme trugen das *aroF<sup>fbr</sup>* Gen auf dem Plasmid, um den Fluss in die Aromatenbiosynthese zu deregulieren. Wegen ihres limitierenden Charakters wurden zusätzlich *aroB* und *aroB* in Verbindung mit *aroL* in *E. coli* DHS bzw. *E. coli* S3P exprimiert, um die unerwünschte Akkumulation von Zwischenmetaboliten zu vermeiden. Diese drei Stämme wurden gewählt, da *E. coli* DAH(P) nur den ersten, *E. coli* DHS die ersten drei und *E. coli* S3P die ersten fünf Schritte der Aromatenbiosynthese ausführen konnte, und gerade bei den Metaboliten am Anfang des Stoffwechselwegs sollte das Pulssignal am deutlichsten zu beobachten sein.

Ein exemplarisches Beispiel des entwickelten Prozesses zeigt Abb. 6.29, die Durchführung der Experimente ist in Kap. 4.2 dargestellt. Der Fermentationsprozess konnte in drei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase (I) wurde die Biomasse gebildet, bis die im Medium vorgelegten aromatischen Aminosäuren verbraucht waren. IPTG wurde in dieser Phase zugesetzt, um die Expression der plasmid-codierten Gene zu initiieren und den Kohlenstofffluss in die Aromatenbiosynthese zu erhöhen. In der zweiten Phase (II) wurde der Glukosezulauf auf ein limitierendes Niveau reduziert, bevor er in der dritten Phase wieder erhöht wurde, um eine gesättigte Glukoseversorgung zu gewährleisten. Aufgrund der Auxotrophie dieser *E. coli* Stämme für die bereits in Phase I verbrauchten aromatischen Aminosäuren fand in Phase II und III kein Wachstum der Biomasse statt.

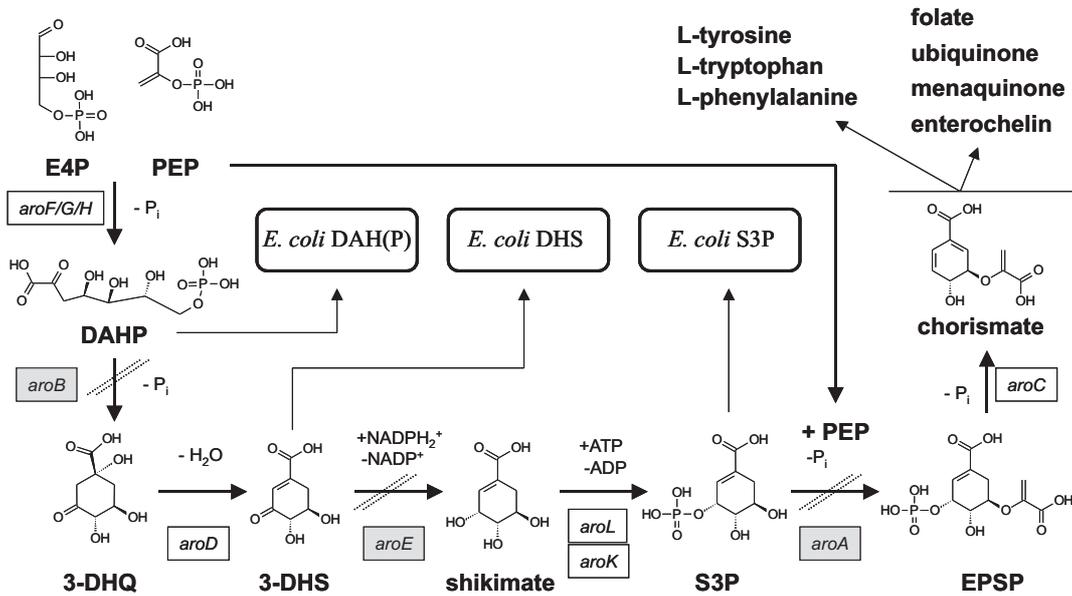


ABBILDUNG 6.28.: Linearer erster Teil der Aromatenbiosynthese mit den drei verwendeten Stämmen und ihrer Einordnung in den Biosyntheseweg

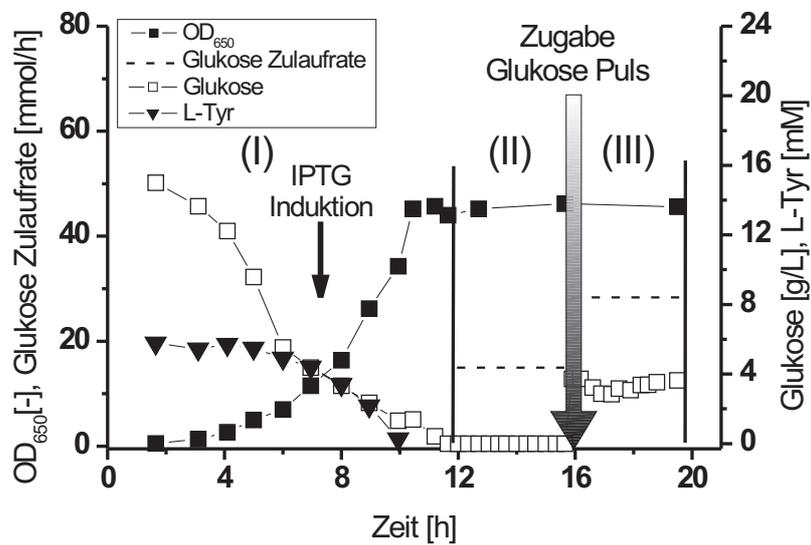


ABBILDUNG 6.29.: Fed-Batch Fermentationsprozess mit Glukosepuls und Einteilung des Prozesses in drei Phasen

Um in Phase II kontrollierte und definierte Niveaus der Glukoselimitierung einstellen zu können, wurde die stammspezifische maximale Glukoseverbrauchsrate für jeden Stamm in einem separaten Experiment vorweg ermittelt. Für *E. coli* DAHP wurde eine Glukoseverbrauchsrate von  $37,9 \text{ mmol h}^{-1}$ , für *E. coli* DHS von  $78,8 \text{ mmol h}^{-1}$  und  $30,3 \text{ mmol h}^{-1}$  für *E. coli* S3P bestimmt. Alle drei Stämme erreichten nahezu die gleiche Biomassekonzentration von rund  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Die im Vergleich zu den beiden Stämmen *E. coli* DAHP und *E. coli* S3P stark erhöhte Glukoseverbrauchsrate von *E. coli* DHS hat ihre Ursache in einer höheren  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate dieses Stammes [85].

Legte man nun die für *E. coli* DAHP ermittelte Glukose Verbrauchsrate von  $37,9 \text{ mmol h}^{-1}$  zugrunde, ließen sich Glukose limitierte Fütterungsraten mit 0 %, 25 %, 50 % und 75 % Limitierung berechnen, die  $37,9$ ,  $28,4$ ,  $19,0$ , und  $9,5 \text{ mmol h}^{-1}$  entsprachen und im Experiment in Phase II eingestellt wurden. Nach etwa 4 h wurden 25 mL einer Glukoselösung zugesetzt, die die Glukosekonzentration unmittelbar auf  $27,6 \text{ mM}$  ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) erhöhte und damit die limitierende Phase II beendete. Zur selben Zeit wurde die Glukoseversorgung auf das zuvor bestimmte Maximum der Glukoseaufnahme erhöht (0 % Limitierungswert), um eine ausreichende Glukose Versorgung in der Phase III zu sichern. Die Auswirkung des Glukosepuls auf den Fluss in den Aromatenbiosyntheseweg wurde durch die extrazelluläre Akkumulation der Intermediate gemessen.

### 6.6.1. Experimente mit *E. coli* DAH(P)

Mit dem Stamm *E. coli* DAH(P) wurden Fermentationsexperimente durchgeführt, bei denen 25, 50 und 75 % Glukoselimitierung in der Phase II eingestellt wurden, wobei jedes Experiment einfach reproduziert wurde. Der Stamm *E. coli* DAH(P) trägt eine Mutation im Gen der 3-Dehydroquinat Synthase (*aroB*), die die katalytische Enzymaktivität vollständig inaktiviert. Dieser Stamm kann daher nur noch die erste Reaktion im Aromatenbiosyntheseweg zum DAHP ausführen. In Abb. 6.30 ist die biomassenspezifische Produktbildung von DAH(P) vor (Phase I), während (Phase II) und nach (Phase III) der Glukoselimitierung dargestellt. Die Daten weisen eindeutig auf einen Zusammenhang zwischen der DAH(P) Bildungsrate und der Stärke der Glukoselimitierung hin. Es konnte festgestellt werden, dass, je schwächer die Glukoselimitierung in der Phase II war, desto größer war die DAH(P) Produktbildung und damit der Fluss in die Aromatenbiosynthese. Da in der Phase III Glukose gesättigte Bedingungen herrschten, konnte in Übereinstimmung damit die höchste DAH(P) Produktbildung beobachtet werden. Tab. 6.9 fasst die gemessenen Bildungsraten für *E. coli* DAH(P) zusammen.

Aus den variierenden Werten der DAH(P) Bildung konnte der Schluss gezogen werden, dass das Glukosepulsexperiment in der Lage war, den Fluss in die Aromatenbiosynthese signifikant zu erhöhen, wobei die DAH(P) Bildungsrate ( $\pi_{DAH(P)}$ ) von der Versorgung mit Glukose abhing. Je stärker die Glukoselimitierung vor dem Puls eingestellt wurde, umso größer war die beobachtete Flusserhöhung  $\Delta\pi_{DAH(P)}$  in die Aromatenbiosynthese, was Grafik (D) in Abb. 6.30 zeigt. In der Phase III, also nach dem Puls, konnten in allen Experimenten reproduzierbare Werte für  $\pi_{DAH(P)}$  erhalten werden (Tab. 6.9), unabhängig von der Stärke der zuvor gewählten Limitierung. Offenbar wurde der Stoffwechsel nicht irreversibel von einer starken Glukoselimitierung in Phase II beeinträchtigt. In allen Experimenten wurden

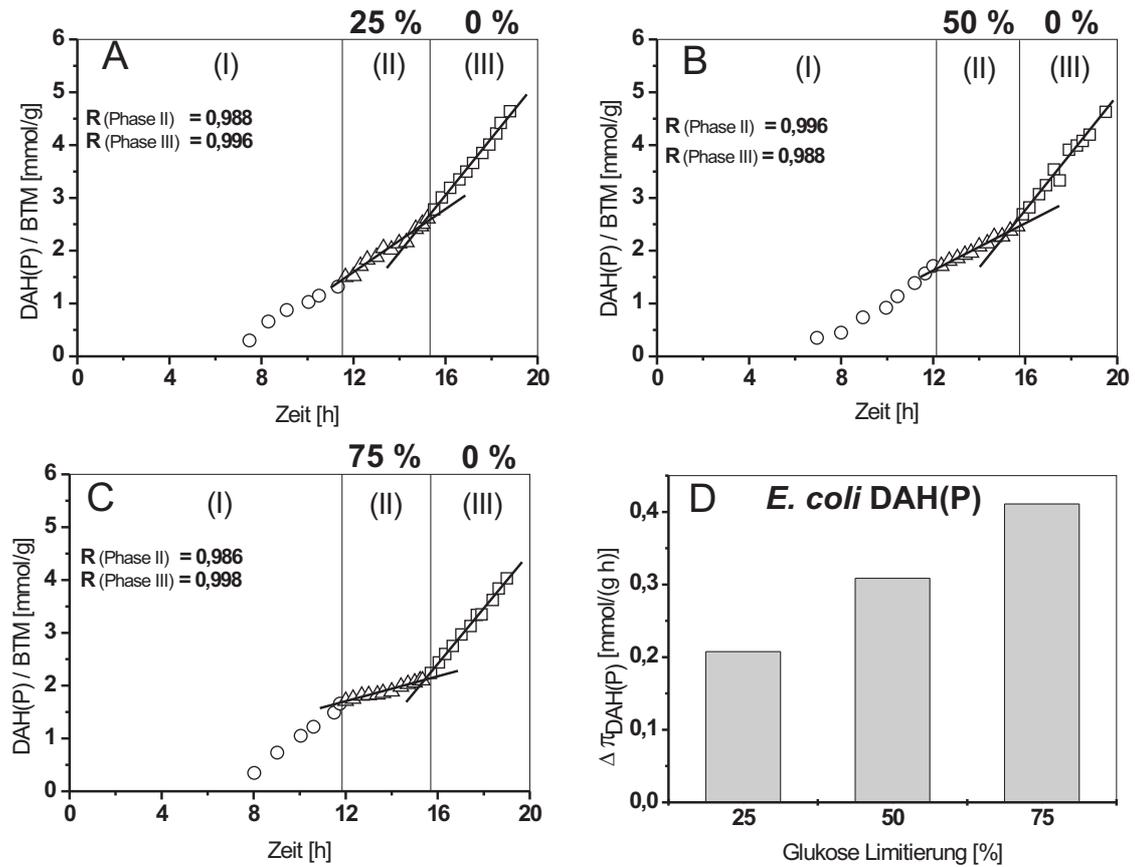


ABBILDUNG 6.30.: Biomassespezifische Produktkonzentration von *E. coli* DAH(P) in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit (A) 25 %, (B) 50 % und (C) 75 % Glukoselimitierung; Proben der ersten (○), zweiten (△) und dritten (□) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt; Grafik (D) zeigt den Flussunterschied in die Aromatenbiosynthese für die drei Limitierungsstufen

TABELLE 6.9.: Ergebnisse *E. coli* DAH(P); Biomassespezifische DAH(P) Bildungsrate  $\pi_{\text{DAH}(P)}$  [mmol/(g · h)], Mittelwert  $\bar{\pi}_{\text{DAH}(P)}$ , Standardabweichung (sd), Differenz zum 0 % Wert  $\Delta\pi_{\text{DAH}(P)}$

	Limitierung [%]			
	75	50	25	0
$\pi_{\text{DAH}(P)}$	0,118	0,224	0,299	0,531 <sup>a</sup>
$\bar{\pi}_{\text{DAH}(P)}$	0,122	0,221	0,348	
sd	0,003	0,002	0,035	0,014 <sup>a</sup>
$\Delta\pi_{\text{DAH}(P)}$	0,411	0,309	0,208	

<sup>a</sup> Mittelwert für Phase III aus allen 6 Experimenten

mit  $0,531 \pm 0,014 \text{ mmol}_{DAH(P)}(\text{g} \cdot \text{h})$  nahezu die gleichen Werte für  $\pi_{DAH(P)}$  erhalten. Unter Einbeziehung der hier beobachteten Parameter hat die Glukoselimitierung in der Phase II offenbar keinen negativen Einfluss auf den Zellstoffwechsel gezeigt. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass das etablierte reproduzierbare Fed–Batch Pulsexperiment eingesetzt werden konnte, um den Fluss in die Aromatenbiosynthese anzuregen und den Einfluss dieser Stimulation im Stoffwechselweg zu verfolgen.

### 6.6.2. Experimente mit *E. coli* DHS

Um die Auswirkung der Glukosedynamik nicht nur an der Eingangsreaktion in die Aromatenbiosynthese, sondern auch innerhalb des Stoffwechselwegs zu untersuchen, wurden Fed–Batch Pulsexperimente mit dem Stamm *E. coli* DHS durchgeführt. Wie bereits angesprochen, enthält der Stamm eine durch Mutation katalytisch inaktive Shikimat Dehydrogenase (AroE), daher kann der Stamm nur die ersten drei enzymatischen Schritte der Aromatenbiosynthese ausführen.

Es wurden Experimente mit 50 und 75 % Glukoselimitierung durchgeführt, jedes Experiment wurde einfach reproduziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.31 und Tab. 6.10 dargestellt. In Bezug auf die Korrelation zwischen Glukosepulsintensität und DHS Bildungsrate konnte das gleiche Resultat wie bei dem *E. coli* DAH(P) Stamm gefunden werden. Je stärker die Glukoselimitierung vor dem Puls eingestellt wurde, umso größer war die Differenz der Produktbildungsrate in der Glukose gesättigten Phase III, was Grafik (C) in Abb. 6.31 besonders hervorhebt. Werden nun die Produktbildungsraten von *E. coli* DHS und *E. coli* DAH(P) bei 50 % Limitierung jeweils mit dem maximalen Wert bei 0 % verglichen, so wird eine relativ hohe DHS Bildung von etwa 74 % des Maximums gefunden. Die DAH(P) Bildung erreichte lediglich etwa 40 % des Maximalwertes. Es war daher sehr wahrscheinlich, dass eine weitere Reduktion der Limitierung auf 25 % keinen weiteren Unterschied der DHS Bildung verursachen würde, und daher wurde kein Experiment mit einer Limitierung von 25 % für *E. coli* DHS durchgeführt. Wie bereits bei *E. coli* DAH(P) beobachtet, sind die Bildungsraten in der dritten Phase mit  $0,647 \pm 0,017 \text{ mmol}_{DHS}/(\text{g} \cdot \text{h})$  am höchsten und zeigen ebenfalls eine hohe Reproduzierbarkeit.

### 6.6.3. Experimente mit *E. coli* S3P

Weitere Untersuchungen wurden mit *E. coli* S3P, ebenfalls unter Verwendung der Fed–Batch Strategie mit Glukosepuls unternommen. Dieser Stamm trägt ein mutiertes Gen der EPSP Synthase (*aroA*), die dadurch keinerlei enzymatische Aktivität mehr besitzt. Daher konnten in *E. coli* S3P nur die ersten fünf Schritte im Aromatenbiosyntheseweg ablaufen. Ziel ist die Untersuchung der Signaltransmission des Glukosepulses im weiteren Verlauf durch den Aromatenbiosyntheseweg bis zum S3P. Es wurden Experimente mit 50 und 75 % Glukoselimitierung durchgeführt, auf ein Experiment mit 25 % wurde aufgrund der Ergebnisse mit *E. coli* DHS verzichtet, da für *E. coli* S3P eher noch eine schwächere Anregung als bei *E. coli* DHS zu erwarten war.

Während die beiden Stämme *E. coli* DAH(P) und *E. coli* DHS nur einen Metaboliten aus der Aromatenbiosynthese produzierten, nämlich genau den vor dem katalytisch inaktiven

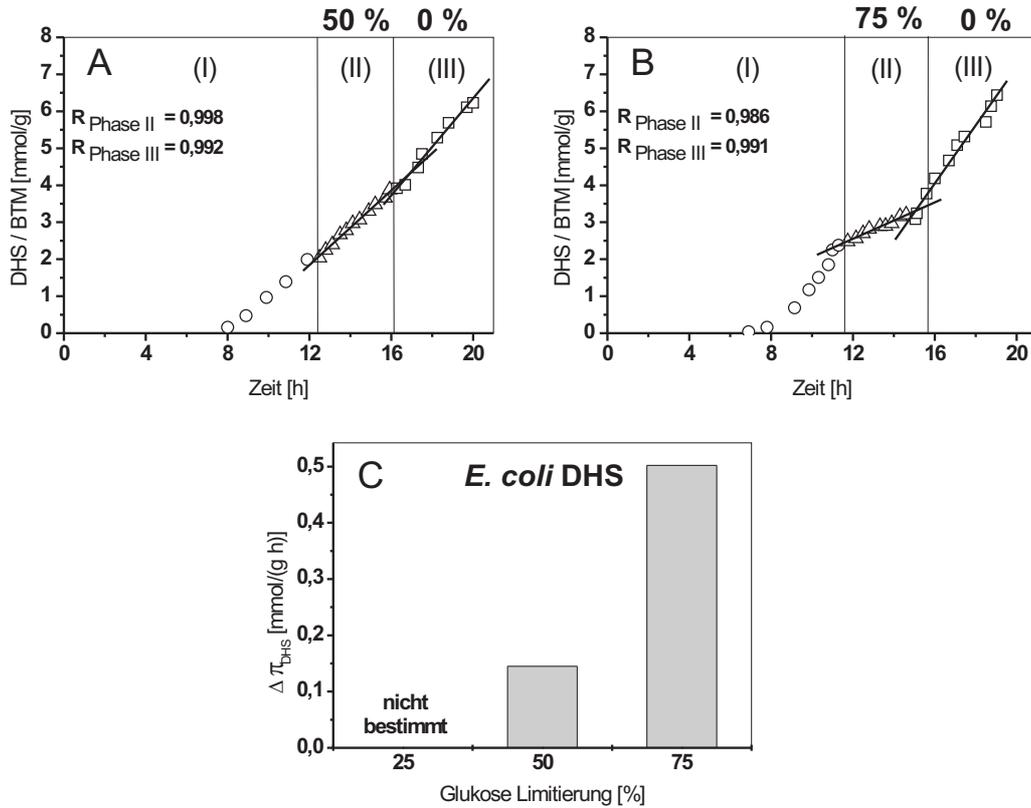


ABBILDUNG 6.31.: Biomassspezifische Produktkonzentration von *E. coli* DHS in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit (A) 50 % und (B) 75 % Glukoselimitierung; Proben der ersten (○), zweiten (△) und dritten (□) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt; Grafik (C) zeigt den Flussunterschied in die Aromatenbiosynthese für die zwei Limitierungsstufen

TABELLE 6.10.: Ergebnisse *E. coli* DHS; Biomassspezifische DHS Bildungsrate  $\pi_{DHS}$  [mmol/(g · h)], Mittelwert  $\bar{\pi}_{DHS}$ , Standardabweichung (sd), Differenz zum 0 % Wert  $\Delta\pi_{DHS}$

	Limitierung [%]			
	75	50	25	0
$\pi_{DHS}$	0.183	0.488	n.b. <sup>b</sup>	0,647 <sup>a</sup>
$\bar{\pi}_{DHS}$	0,145	0,502	n.b. <sup>b</sup>	0,647 <sup>a</sup>
sd	0,054	0,020		0,017 <sup>a</sup>
$\Delta\pi_{DHS}$	0,502	0,145		

<sup>a</sup> Mittelwert für Phase III aus allen 4 Experimenten

<sup>b</sup> nicht bestimmt

TABELLE 6.11.: Ergebnisse *E. coli* S3P; Biomassespezifische Bildungsraten für DHS ( $\pi_{DHS}$ ), Shikimat ( $\pi_{Shikimat}$ ) und S3P ( $\pi_{S3P}$ ) in [mmol/(g · h)], Differenz zum 0 % Wert  $\Delta\pi_{DHS,Shikimat,S3P}$  mit relativem Änderungsfaktor

	(Experiment 1)		(Experiment 2)	
	Limitierung [%]			
	75	0	50	0
$\pi_{DHS}$	0,005	0,059	0,018	0,062
$\pi_{Shikimat}$	0,023	0,045	0,005	0,005
$\pi_{S3P}$	0,026	0,146	0,099	0,105
$\Delta\pi_{DHS}$ (relativer Änderungsfaktor)	0,054	(11,8)	0,044	(3,4)
$\Delta\pi_{Shikimat}$ (relativer Änderungsfaktor)	0,022	(1,9)	0	(1,0)
$\Delta\pi_{S3P}$ (relativer Änderungsfaktor)	0,120	(5,6)	0,006	(1,1)

Enzym, zeigte *E. coli* S3P hier ein abweichendes Verhalten. Neben S3P wurden auch Shikimat und DHS als Produkte gemessen. Die Shikimatbildung könnte die Konsequenz einer unspezifischen Phosphataseaktivität sein, bei der S3P als Substrat fungiert. Das Auftreten von DHS könnte durch eine relativ geringe Aktivität der Shikimatdehydrogenase (AroE) erklärt werden, ausgelöst durch eine Feedback–Inhibierung durch Shikimat [49].

In dem Experiment mit 75 % Glukoselimitierung stiegen die Produktbildungsraten von S3P, Shikimat und DHS nach dem Glukosepuls an (Tab. 6.11, Abb. 6.33). Besondere Aufmerksamkeit ist der Tatsache zu schenken, dass die Signifikanz der Erhöhung stark mit der Position des Metaboliten im Aromatenbiosyntheseweg verknüpft war. Bei Metaboliten, die weiter stromabwärts im Stoffwechselweg lokalisiert sind, war die relative Änderung weniger signifikant als bei den weiter stromaufwärts liegenden. Zum Beispiel stieg  $\pi_{DHS}$  signifikant stärker als  $\pi_{Shikimat}$ , was eine Folge der Feedback–Inhibierung bei höheren Shikimat Konzentrationen sein könnte. Des Weiteren ist die relative Änderung von  $\pi_{DHS}$  viel stärker als die von  $\pi_{S3P}$ . Im Experiment mit 75 % Limitierung dominierte daher die  $\pi_{DHS}$  Änderung, die eine Erhöhung um das 11,8–fache nach dem Puls verzeichnete. Für  $\pi_{S3P}$  wird ein Anstieg um das 5,6–fache beobachtet, während sich  $\pi_{Shikimat}$  lediglich verdoppelt.

Auch bei dem Experiment mit 50 % Glukoselimitierung war die relative Ratenänderung stark mit der Position des Metaboliten im Syntheseweg verbunden (Tab. 6.11, Abb. 6.32). In Übereinstimmung mit dem 75 % Limitierungsexperiment war die signifikanteste Änderung der Produktbildungsrate für  $\pi_{DHS}$  zu beobachten. Sie stieg um das 3,4–fache nach dem Puls, während  $\pi_{Shikimat}$  und  $\pi_{S3P}$  fast unverändert blieben. In beiden Experimenten wurde die signifikanteste Änderung für  $\pi_{DHS}$  gemessen, das von der Lage im Stoffwechselweg am weitesten stromaufwärts positioniert ist. Deutlich geringere relative Änderungen der Produktbildungsraten wurden in beiden Experimenten für die weiter stromabwärts liegenden Metaboliten S3P und Shikimat beobachtet. In Abb. 6.34 sind die relativen Änderungen für alle drei Metaboliten aus beiden Experimenten aufgetragen.

Der gemessene quantitative Unterschied bzgl. der erreichbaren maximalen Werte für  $\pi_{Shikimat}$  in beiden Experimenten war ein überraschendes Ergebnis. Vermutlich waren dafür

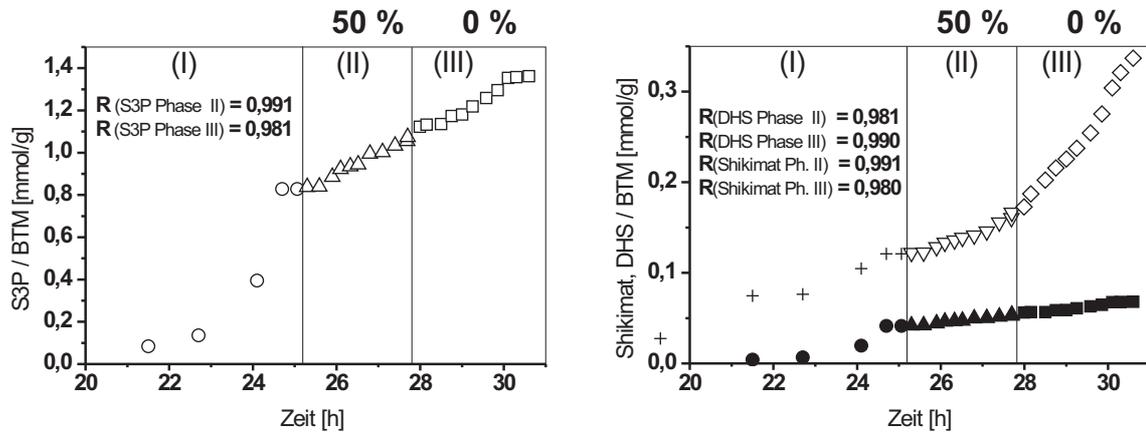


ABBILDUNG 6.32.: Biomassespezifische Produktkonzentrationen von *E. coli* S3P in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit 50 % Glukoselimitierung; S3P in erster (○), zweiter (△) und dritter (□) Phase, Shikimat in erster (●), zweiter (▲) und dritter (■) Phase und DHS in erster (+), zweiter (▽) und dritter (◇) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt;

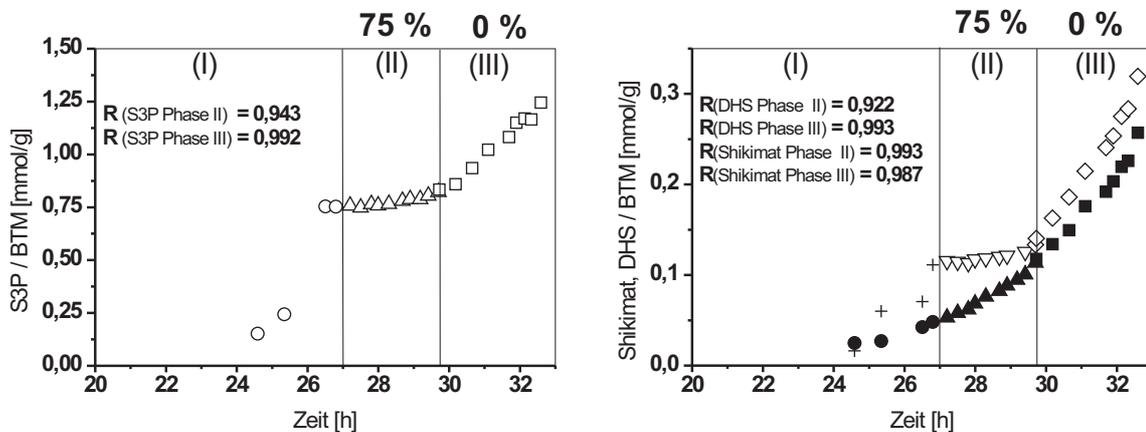


ABBILDUNG 6.33.: Biomassespezifische Produktkonzentrationen von *E. coli* S3P in Fed-Batch Experimenten mit Glukosepuls mit 75 % Glukoselimitierung; S3P in erster (○), zweiter (△) und dritter (□) Phase, Shikimat in erster (●), zweiter (▲) und dritter (■) Phase und DHS in erster (+), zweiter (▽) und dritter (◇) Phase durch Symbole unterschieden; Liniengraphen durch lineare Regression für Phase II und III ermittelt, Korrelationskoeffizient (R) für jede Phase dargestellt;

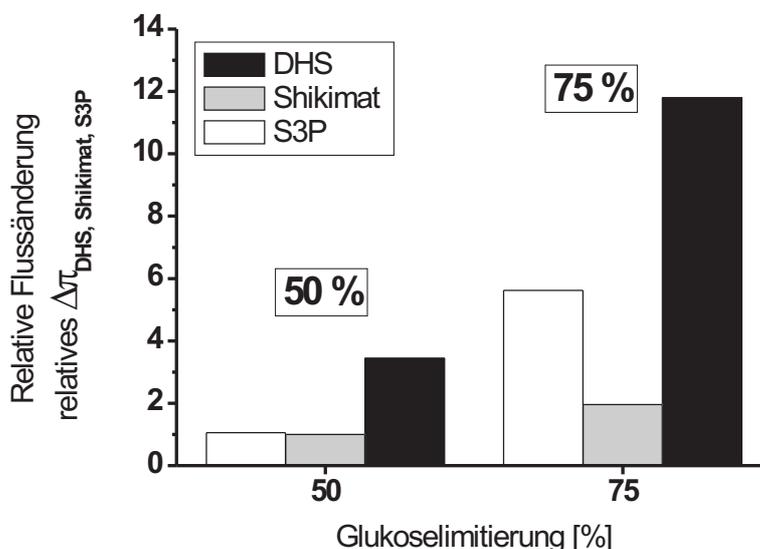


ABBILDUNG 6.34.: Gegenüberstellung der relativen Fluss Differenzen ( $\text{relatives } \Delta\pi_{DHS}$ ,  $\Delta\pi_{Shikimat}$ ,  $\Delta\pi_{S3P}$ ) zwischen Glukose limitierten und nicht limitierten Verhältnissen für die Experimente mit 50 und 75 % Limitierung mit *E. coli* S3P.

veränderte Konzentrationsverhältnisse im Innern der Zelle verantwortlich, die die extrazellulär gemessene Produktionsrate beeinflussten. Allein auf der Basis der Metabolitmessung im Überstand konnte das unterschiedliche Verhalten von  $\pi_{Shikimat}$  nicht erklärt werden. Erst die intrazelluläre Messung der Metaboliten könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten aufzeigen (Kapitel 6.7).

#### 6.6.4. Direkter Vergleich der Experimente mit *E. coli* DAH(P), *E. coli* DHS und *E. coli* S3P

Anhand der ermittelten Daten mit den drei dargestellten *E. coli* Stämmen wurde deutlich, dass Glukosepulse in der Lage waren, den Fluss in die Aromatenbiosynthese zu stimulieren. Die Intensität der Stimulation war aber sehr stark mit der Position des beobachteten Metaboliten im Stoffwechselweg verknüpft. Während für DAH(P) lediglich eine kleine 25%ige Anregung nötig war, wurde eine starke 75%ige Stimulation benötigt, um eine Veränderung im S3P zu detektieren. In Abb. 6.35 ist genau dieser gegenläufige Trend zwischen erforderlicher Pulsintensität und der Abnahme der Transmission dieses Signals durch den Stoffwechselweg dargestellt. Es hatte durchaus den Anschein, als ob das Pulssignal im Verlauf des Stoffwechselwegs abgedämpft wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass Glukosepulseexperimente reproduzierbar im Fed-Batch Verfahren mit drei verschiedenen rekombinanten *E. coli* Stämmen durchgeführt werden konnten. Die Definition von Limitierungsstufen, ausgehend von einer vorher ermittelten maximalen Glukoseverbrauchsrate, hat sich als nützliches Werkzeug für den Vergleich der

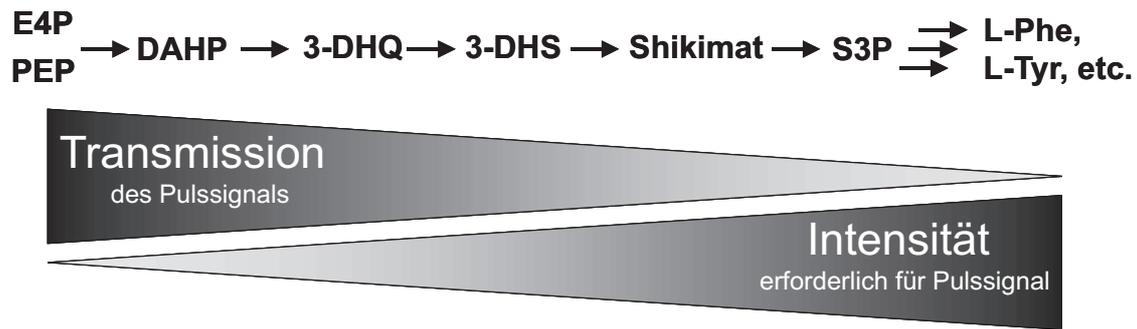


ABBILDUNG 6.35.: Gegenläufiger Trend zwischen notwendiger Pulsintensität und Abnahme der Signal Transmission durch den Stoffwechselweg

Stämme untereinander erwiesen, und mit der Messung der Produktbildungsraten stand ein einfacher Zugang zur Verfügung, um den Einfluss der Glukosepulse zu messen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Fluss in die Aromatenbiosynthese durch den Puls erhöht wurde, die Stärke der Anregung jedoch abhängig von der Position im Stoffwechselweg war. Unter den gewählten Bedingungen zeigte die 4-stündige Phase mit kleiner (25 %), mittlerer (50 %) und starker (75 %) Glukoselimitierung keine irreversible Schädigung der Zellen, daher konnte für weitere Experimente die starke Limitierung verwendet werden. Das war vorteilhaft, um die resultierende Stoffwechselantwort zu maximieren, denn die Signalweitergabe des Pulses schien im Aromatenbiosyntheseweg durch Dämpfung abzunehmen.

Im Hinblick auf die Auslegung eines Glukosepulsexperimentes mit intrazellulärer Messung der Metaboliten nach einem Puls war es außerdem wichtig, eine Abschätzung über die Geschwindigkeit der intrazellulären Antwort der Zellen auf den Glukosepuls zu erhalten, und damit festzulegen, ob eine schnelle Probenahme mit einer Frequenz von  $< 1$  Hz notwendig sein würde, um die dynamische Antwort der Zellen zu messen. Für diese Abschätzung wurde auf das  $pO_2$ -Signal nach dem Glukosepuls zurückgegriffen, denn es ist sehr direkt und schnell an die Sauerstoff- und Glukoseaufnahme gekoppelt [112]. Bei der hier verwendeten  $pO_2$  Messelektrode musste jedoch von einer Totzeit im Ansprechverhalten der Elektrode ausgegangen werden, die in der Größenordnung von wenigen Sekunden lag. D.h. das von der Elektrode gemessene Signal entsprach nicht exakt den tatsächlichen Verhältnissen im Bioreaktor, da es um die angesprochene Totzeit verzögert war.

Trotzdem nahm unmittelbar nach der Zugabe des Glukosepulses die Sauerstoffsättigung ( $pO_2$ ) im Medium rasch ab und zeigte damit eine beschleunigte Sauerstoff- und Glukoseaufnahme durch die Zellen an (Abb. 6.36). Nach etwa sieben Minuten wurde ein konstantes Niveau von 20 % erreicht, was auf die neue Gleichgewichtseinstellung des Stoffwechsels hindeutete. Der Vergleich der  $pO_2$  Daten nach einem Glukosepuls zwischen den rekombinanten *E. coli* Stämmen und *E. coli* K12 Wildtyp [143] zeigte eine große Übereinstimmung. Für *E. coli* K12 Wildtyp war bekannt, dass die Stimulation der Metabolit-Dynamiken im Sekundenbereich erfolgte [143], d.h. es konnte für die rekombinanten *E. coli* Stämme ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die Stimulation des Metabolismus im Bereich von Sekunden verlief. Da die Aromatenbiosynthese über E4P und PEP mit dem Zentralstoffwechsel

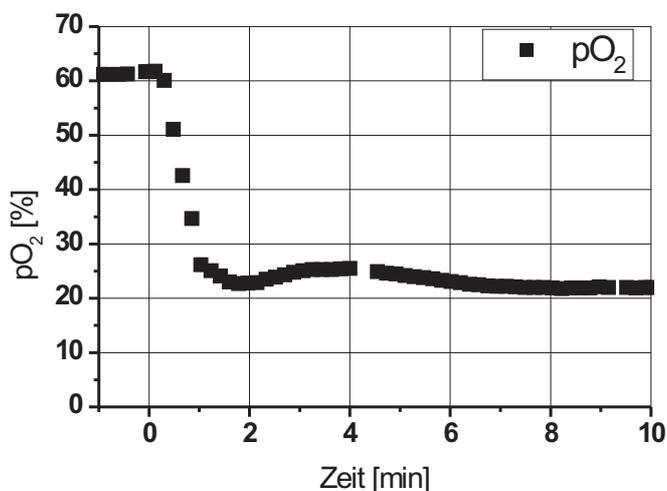


ABBILDUNG 6.36.: Sauerstoffsättigung (pO<sub>2</sub>) nach Zugabe des Glukosepulses im 50 % Experiment mit *E. coli* DAH(P)

verknüpft ist, sollte die Pulsstimulation der Aromatenbiosynthese ebenfalls im Sekundenbereich erfolgen und daher eine schnelle Probenahme im Subsekundenbereich [144] erforderlich machen.

#### 6.6.5. Transfer des Fed-Batch Glukosepuls Verfahrens in den 20 L Bioreaktor für die schnelle Probenahme mit *E. coli* L-Phe Produzent

Der Stamm *E. coli* 4pF49 diente als Ausgangspunkt für die Glukosepulsexperimente im Fed-Batch Verfahren. Der Stamm ist auxotroph in Bezug auf L-Tyr und trägt auf dem Plasmid pF49 das Wildtypgen der L-Tyr sensitiven DAHP Synthase (*aroF<sup>wt</sup>*) und die Feedback-resistente Variante der Chorismat Mutase/Prephenat Dehydratase (*pheA<sup>fbr</sup>*).

Die Wahl, einen Stamm mit *aroF<sup>wt</sup>* anstatt *aroF<sup>fbr</sup>* zu verwenden, trug der kombinierten L-Phe Prozess- und Stammentwicklung Rechnung [70, 139] (Kap. 6.3), da *aroF<sup>wt</sup>* nach Expression eine höhere Stabilität und Aktivität zeigte. Obwohl bei der Verbesserung der L-Phe Produktionsstämme (Kap. 6.3.6) Gene der Aromatenbiosynthese, wie z.B. *aroB* oder *aroL*, als limitierende enzymatische Schritte auf dem Weg zum L-Phe erkannt wurden, war in diesem Stamm, der als erster mittels der Glukosepuls-Technik untersucht werden sollte, auf ihre Expression verzichtet worden. Gerade die *in-vivo* Kinetik an diesen "limitierenden" Stellen könnte somit nach der Pulsstimulation studiert werden.

In Abb. 6.37 ist das Fermentationsexperiment mit dem Stamm *E. coli* 4pF49 dargestellt, die experimentelle Durchführung erfolgte wie in Kap. 4.3.1 dargestellt. Der Transfer des Fed-Batch Verfahrens mit Glukosepuls konnte erfolgreich in den 20 L Bioreaktor für die schnelle Probenahme übertragen werden. Die Tyrosin-Zufütterung wurde an den wachsenden Bedarf der Zellen angepasst, ohne dass es zu einer Limitierung oder zu einem hohen Überschuss

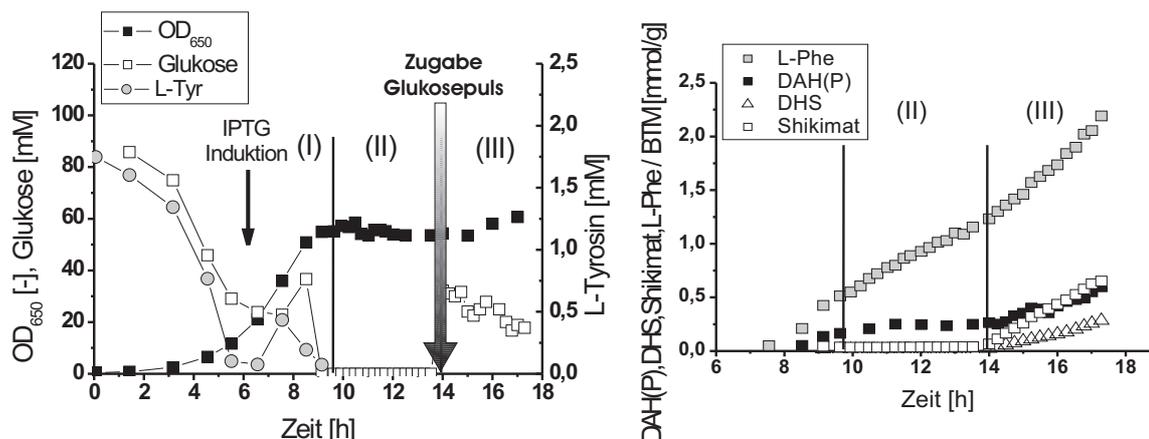


ABBILDUNG 6.37.: Fed-Batch Glukosepuls Fermentation mit *E. coli* 4pF49 in 20 L Bioreaktor für die schnelle Probenahme; Prozessdaten links, biomassespezifische Produktkonzentrationen rechts

während der Wachstumsphase kam. Nach einer Prozesszeit von ca. 10 h begann die Glukose und L-Tyr limitierte Phase II. Die L-Tyr Limitierung war aufgrund der Verwendung des Feedback-sensitiven *aroF<sup>w</sup>* zur Maximierung seiner Aktivität nötig. Der Glukosepuls wurde nach 14 h mittels des Pulsaufgabesystems (Kap. 4.3.2) ausgelöst, und entsprechend der Ergebnisse bezüglich der Entwicklung des Fed-Batch Pulsverfahrens (Kap. 6.6.4) wurde eine 75 % Pulsstimulation gewählt. D.h. es wurde eine 75%ige Glukoselimitierung in Phase II eingestellt, bezogen auf die maximale Glukoseverbrauchsrate von *E. coli* 4pF49. Zum Zeitpunkt der Pulsaufgabe waren die Zellen bereits 4 h lang unter der reduzierten Glukose und L-Tyr Versorgung kultiviert worden. In Tab. 6.12 sind die Bildungsraten für die Metaboliten der L-Phe Biosynthese dargestellt. Unter den Glukose limitierten Bedingungen in Phase II wird neben L-Phe kein weiterer Metabolit gebildet. Offenbar ist der Fluss durch die L-Phe Biosynthese so gering, das keine der normalen Wildtyp Enzymaktivitäten im Stoffwechselweg limitierend war.

In der Glukose gesättigten Phase III, nach dem Puls, ist der Fluss in die L-Phe Biosynthese so stark erhöht worden, dass die Metaboliten DAH(P), DHS und Shikimat als Nebenprodukte gebildet wurden. Diese waren bereits aus der Stammentwicklung der L-Phe Produzenten bekannt und haben ihre Ursache in der Limitierung durch *aroB*, *aroE* und *aroL* (Kap. 6.3). Unter Berücksichtigung der Metabolit- und CO<sub>2</sub> Bildungsraten in den Phasen II und III konnte die Metabolitbilanz zu > 90 % geschlossen werden (Abb. 6.38). Der Stamm 4pF49 wurde in den Arbeiten zur L-Phe Prozessentwicklung nicht charakterisiert, jedoch kann er mit dem Stamm 4pF20 (*aroF<sup>fbr</sup>*, *pheA<sup>fbr</sup>*) verglichen werden [70]. In Bezug auf die L-Phe Bildung wurde mit 4pF49 ein Wert von 0,283 mmol g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> in Phase III erzielt, und ist damit vergleichbar mit der für *E. coli* 4pF20 ermittelten maximalen L-Phe Bildungsrate von 0,333 mmol g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> [70]. Die Daten lassen weiterhin den Schluss zu, dass unter glukoselimitierten Bedingungen die Selektivität der L-Phe Bildung zu Lasten der

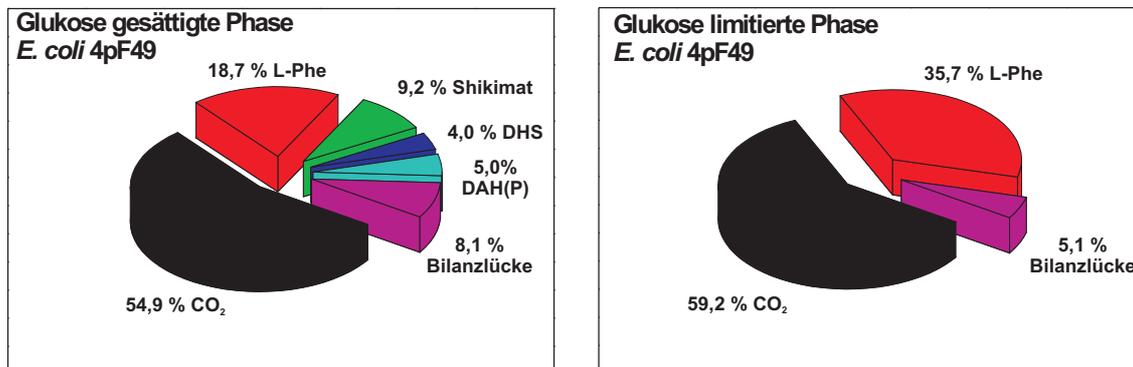


ABBILDUNG 6.38.: Metabolitbilanz der Glukose limitierten und gesättigten Phase der Fermentation mit *E. coli* 4pF49

TABELLE 6.12.: Biomassenspezifische Bildungsraten für *E. coli* 4pF49 im Fed-Batch Verfahren mit Glukosepuls

Metabolit	Phase	Bildungsrate [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Korrelationskoeffizient der linearen Anpassung
L-Phe	II	0,165	0,996
Gesamt $\Sigma$	II	0,165	
DAH(P)	III	0,098	0,972
DHS	III	0,077	0,994
Shikimat	III	0,179	0,999
L-Phe	III	0,283	0,996
Gesamt $\Sigma$	III	0,636	

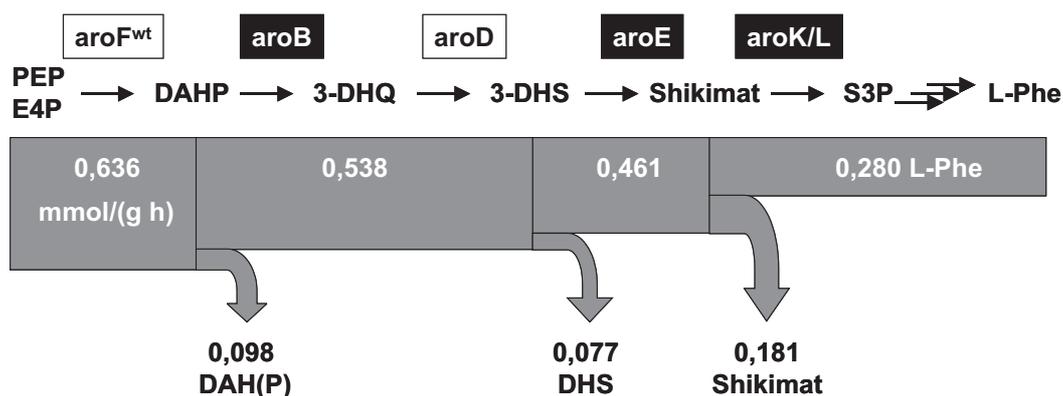


ABBILDUNG 6.39.: Fluss in den Aromatenbiosyntheseweg in *E. coli* 4pF49 unter Glukose gesättigten Bedingungen; Abzweigung von Metabolitflüssen vor limitierenden enzymatischen Schritten (schwarz unterlegt)

Raum-Zeit-Ausbeute erhöht werden kann.

Die Aktivität von AroF<sup>wt</sup> war durch die Wachstumsphase in Gegenwart von L-Tyr nicht beeinträchtigt worden, und das Pulsfermentationsverfahren konnte die Verhältnisse im Produktionsreaktor abbilden. Da der Aromatenbiosyntheseweg auf dem Weg zum L-Phe linear verläuft, konnte aus den gemessenen Bildungsraten der Gesamtfluss in den Biosyntheseweg berechnet werden. Zusammen mit den Bildungsraten für die akkumulierenden Metaboliten und das L-Phe, zeigt Abb. 6.39 den gemessenen Gesamtfluss in die L-Phe Biosynthese.

## 6.7. Glukosepulsexperimente mit L-Phenylalanin Produktionsstämmen

### 6.7.1. Glukosepulsexperiment mit *E. coli* 4pF49

Nach der Etablierung der Fermentationsführung und der Pulsaufgabe im 20 L Bioreaktor (Kap. 6.6.5), wurde das Experiment analog noch einmal durchgeführt, diesmal jedoch unter Einsatz der schnellen Probenahmetechnik bei der Pulsaufgabe. Wie bei der vorhergehenden Fermentation erreichte die Kultur nach rund 10 h die stationäre Phase und nach ca. 14 h wurde das schnelle Probenahmeexperiment, wie in Kap. 4.3.2 beschrieben, durchgeführt. Der Zeitpunkt der Glukosepulsaufgabe wurde zwischen Probe 16 und Probe 17, d.h. nach dem ersten Probenmagazin, festgelegt. Die Proben 1–16 stammten daher aus dem glukose- und L-Tyr limitierten quasi steady-state der stationären Produktionsphase, und erst ab Probe 17 sollte eine Stimulation aufgrund des Glukosepulses detektierbar sein.

Die Zeitachse des Experimentes wurde auf die Zugabe des Glukosepulses bezogen, d.h. bei  $t = 0$  s erfolgte die Glukosepulzzugabe. Nach der schnellen Probenahme wurden die Proben, wie unter Kap. 4.4.1 beschrieben, aufgearbeitet, und die Zellextrakte wurden mit den analytischen Methoden untersucht. Ziel des Experimentes sollte die Messung der Metabolitdynamik im Zentralstoffwechsel und der Aromatenbiosynthese des L-Phe Produktionsstammes als Antwort auf den Glukosepuls sein.

#### 6.7.1.1. Enzymatische und Ionenfallen LC-MS Daten

Zunächst wurden die Proben mit den etablierten enzymatischen Messmethoden auf ausgesuchte Metaboliten des Zentralstoffwechsels untersucht, um festzustellen, ob eine Stimulation nach der Pulsaufgabe in den Proben messbar war. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.40 dargestellt und zeigen keine Anregung in den gemessenen Metaboliten des Zentralstoffwechsels. Für Glukose-6-Phosphat (G6P) und Fruktose-6-Phosphat (F6P), die beiden ersten Metaboliten der Glykolyse, werden Konzentrationen im Bereich von 0 mM und teilweise sogar negative Werte (nicht dargestellt) gemessen. Negative Konzentrationen sind natürlich unmöglich, und die Ursache dafür musste in der Messmethodik vermutet werden. Offenbar war hier der Fehler der enzymatischen Bestimmung sehr viel größer als die in der Probe zu bestimmende Konzentration. Auch für 6-Phosphoglukonat (6PG) konnte keine Reaktion auf den Glukosepuls detektiert werden. Obwohl die für Pyruvat (Pyr) und Phosphoenolpyruvat (PEP) gemessenen Konzentrationen im Bereich von 0,4–0,6 mM liegen, konnte auch für diese Metaboliten kein Signal des Pulses ausgemacht werden. Vielmehr musste davon ausgegangen werden, dass die dort bestimmte Konzentration ein Mess-Artefakt war und lediglich auf den Zerfall von NADH im 2 stündigen Testverlauf zurückgeführt werden musste, da Kunze [100] zeigen konnte, dass der Verbrauch von NADH nicht auf der Nachweisreaktion mit der Laktat-Dehydrogenase beruhte. Daher muss hier von einer tatsächlich viel geringeren Pyr- und PEP-Konzentration in den Proben ausgegangen werden, die genau wie G6P, F6P und 6PG mit der Sensitivität der Enzymtests nicht zugänglich waren.

Die Proben wurden nun mit der Ionenfallen LC-MS [23] gemessen (Kap. 5.4.4). Obwohl diese Methode eine höhere Empfindlichkeit als die enzymatischen Messungen besitzen sollte, konnte in den gemessenen Daten aus dem Zentralstoffwechsel lediglich Adenosin-

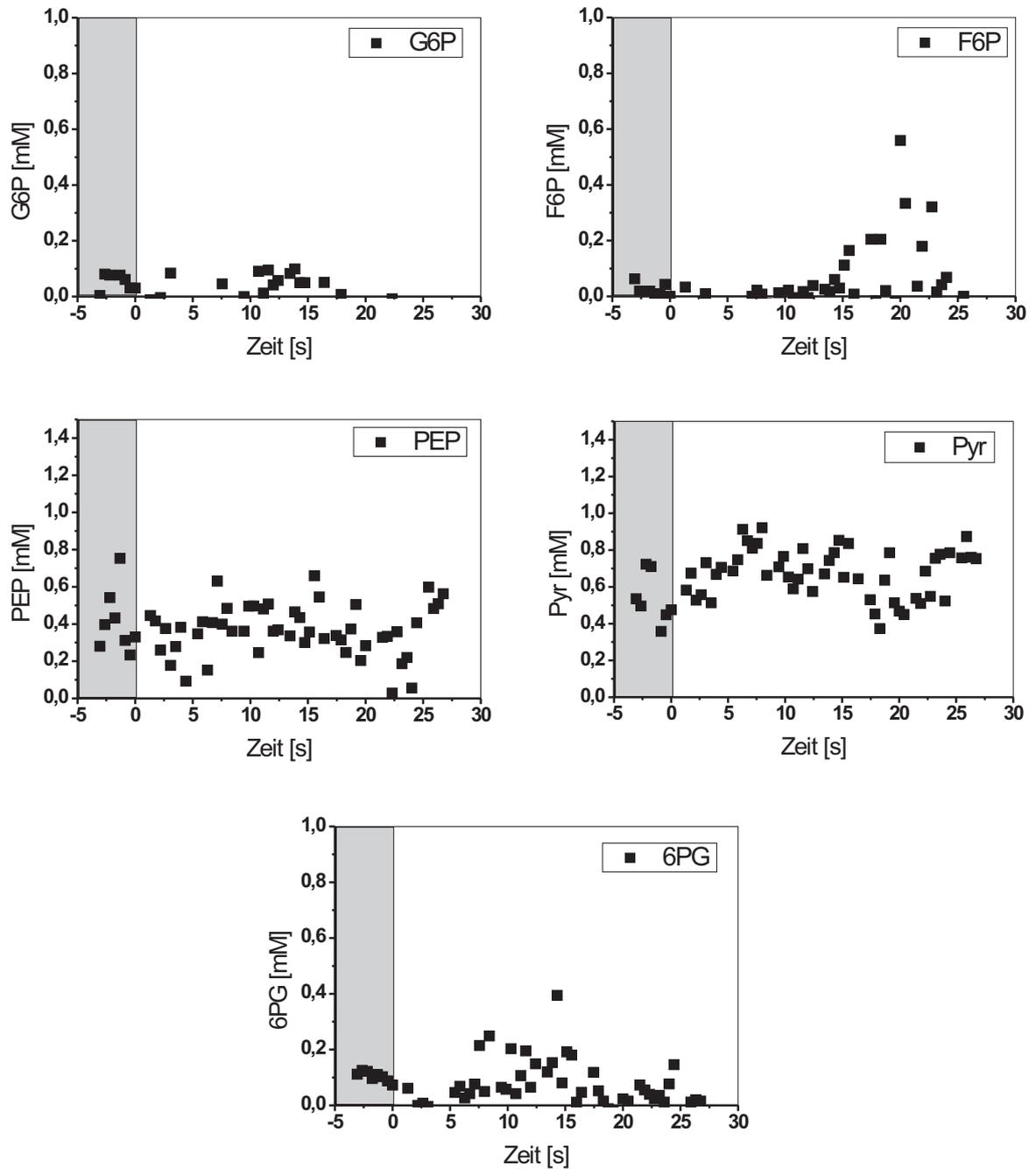


ABBILDUNG 6.40.: Pulsexperiment *E. coli* 4pF49: Enzymatische Messung intrazellulärer Metaboliten des Zentralstoffwechsels

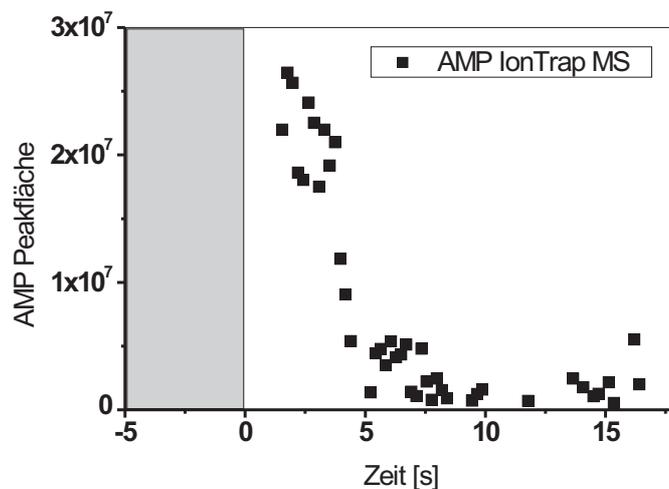


ABBILDUNG 6.41.: Pulsexperiment *E. coli* 4pF49: AMP als einziger Metabolit mit Ionenfallen LC-MS detektiert

monophosphat (AMP) in einigen Proben nachgewiesen werden (Abb. 6.41). Aus dem Aromatenbiosyntheseweg konnte kein Metabolit nachgewiesen werden. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass beide analytische Verfahren nicht sensitiv genug waren, um die intrazellulären Metaboliten in diesem Experiment nachzuweisen.

Einziges Ausnahme bildete hier das AMP, für das eine unmittelbare Antwort auf den Puls beobachtet wurde. Die AMP Peakfläche stieg nach dem Puls dramatisch an und fiel dann im weiteren Verlauf wieder. Obwohl bisher keine weiteren Daten über intrazelluläre Metaboliten aus diesem Experiment vorlagen, war der Verlauf des AMP-Pools ein klares Indiz, dass der Glukosepuls den Zentralstoffwechsel erreicht hatte, und dass die dynamische Stoffwechselantwort im AMP-Pool gemessen wurde.

#### 6.7.1.2. Triple Quadrupol LC-MS Daten

Die Proben wurden mit der in dieser Arbeit entwickelten Triple Quadrupol LC-MS Methode erneut vermessen. Mit der im Vergleich zu den enzymatischen Tests und der Ionenfallen LC-MS Messung deutlich sensitiveren Methode, sollte der Zugang zu den bisher nicht zugänglichen Metabolitdynamiken aus dem Zentralstoffwechsel und der Aromatenbiosynthese erhalten werden. Die Ergebnisse sind in den Abb. 6.42 und 6.43 dargestellt. Zur besseren Visualisierung der Trends in den Daten wurden sie mit einem FFT-Filter (5 Punkte) geglättet, der als Linie dargestellt ist. Die geglätteten Daten können die schnellen Trends einiger Metaboliten nach dem Puls zwar nicht völlig abdecken, vermitteln jedoch einen guten Überblick über den Gesamtverlauf.

Tatsächlich konnte die Pulsstimulation in Metaboliten des Zentralstoffwechsels nach dem Puls in dem L-Phe Produktionsstamm gezeigt werden. Das Pulssignal konnte aber

nicht nur im Zentralstoffwechsel, sondern auch im DAHP Pool, dem ersten Metabolit der Aromatenbiosynthese deutlich nachgewiesen werden (Abb. 6.43). Mit Ausnahme von AMP liegen die mit der Triple Quadrupol LC-MS bestimmten intrazellulären Konzentrationen im Bereich  $\leq 200 \mu\text{M}$ , für DHQ und FBP konnten sogar noch Konzentrationen im Bereich von  $5 \mu\text{M}$  detektiert werden. Diese geringen intrazellulär gemessenen Konzentrationen unterstreichen die Leistungsfähigkeit der entwickelten Triple Quadrupol LC-MS Methode im Vergleich zur Ionenfallen MS und den enzymatischen Nachweismethoden. Im Vergleich zu intrazellulären Literatur-Daten von Metaboliten des Zentralstoffwechsels von *E. coli* Wildtyp [25, 33] wurden für die in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten *E. coli* L-Phe Produktionsstämme geringere Konzentrationen (bis zu Faktor 10-100) dieser Metabolite gemessen. Lediglich für AMP wurden nach dem Glukosepuls vergleichbare Konzentrationen bestimmt.

In der Zeit vor dem Puls, d.h. dem quasi steady-state, wurde für die meisten Metaboliten eine akzeptable Fließgleichgewichtseinstellung erreicht, obwohl z.B. für G6P oder ATP ein leicht fallender Trend bis zum Puls beobachtet wurde. Nach dem Puls konnte für die meisten Metaboliten eine deutliche Veränderung der Konzentration gemessen werden, außer für DHAP/GAP, die durch den Puls wenig beeinflusst erschienen. Der G6P/F6P-Pool stieg nach dem Puls an, jedoch konnte für PEP kein direkter Abfall aufgrund der höheren Glukoseaufnahme über das PTS beobachtet werden, vielmehr stieg der PEP-Pool kurzfristig auf das 3- bis 4-fache an. Vielleicht war der erwartete PEP Abfall aufgrund der höheren Glukoseaufnahme über das PTS zeitlich nur sehr begrenzt, und die erste gemessene Probe nach dem Puls stellte bereits wieder die Erholung des PEP-Pools dar. Auf der anderen Seite könnte die Zelle über die PEP-Synthase (Pps) das gebildete Pyruvat direkt wieder in PEP rezyklieren, wodurch der Anstieg des PEP Pools verursacht worden sein könnte. Im weiteren Verlauf der Glykolyse wurde ein deutliches Pulssignal für FBP und 2PG/3PG beobachtet, jedoch nicht für DHAP/GAP, die in der Glykolyse dazwischen positioniert sind. Im Pentose-Phosphat-Weg zeigten 6PG und P5P einen Anstieg nach dem Puls, der P5P Pool stieg dabei um den Faktor 6-10.

Bei den Nukleotiden zeigte AMP die mit Abstand deutlichste Reaktion auf den Puls, hier wurden kurzfristig 3-4 mM erreicht. Diese hohe AMP-Konzentration nach dem Puls erklärt, warum es bei der Ionenfallen LC-MS als einzige Substanz detektiert werden konnte und der Vergleich der beiden AMP-Verläufe zeigte eine hohe qualitative Übereinstimmung. Jedoch konnten mit der sensitiveren Triple Quadrupol MS nun auch die niedrigen AMP Konzentrationen vor dem Puls gemessen werden. Die NADP Konzentration stieg nach dem Puls leicht an, NADP und NAD erschienen aber im Verlauf kaum verändert. Der ATP Pool stieg nach dem Puls um einen Faktor 2 an. Mit Bezug auf den PEP Anstieg nach dem Puls und einer möglichen Beteiligung der Pps-Reaktion konnte hieraus abgeleitet werden, dass für die Rezyklierung von PEP aus Pyruvat zumindest ein ausreichender ATP Pool bereitgestanden hatte.

Das bemerkenswerteste Ergebnis der Messungen war die Detektion von DAHP, dem ersten Metabolit des Aromatenbiosynthesewegs. Die DAHP-Peakfläche stieg unmittelbar nach dem Puls um einen Faktor 5 an. Der DAHP-Verlauf hat eine hohe Ähnlichkeit mit dem von PEP, einem der beiden Vorläufermetaboliten von DAHP. Das lässt den Schluss zu, dass die Erhöhung des PEP-Pools nach dem Puls zu einer Erhöhung des Flusses in den Aromatenbiosyntheseweg führte. Der andere Vorläufermetabolit E4P konnte in den Proben

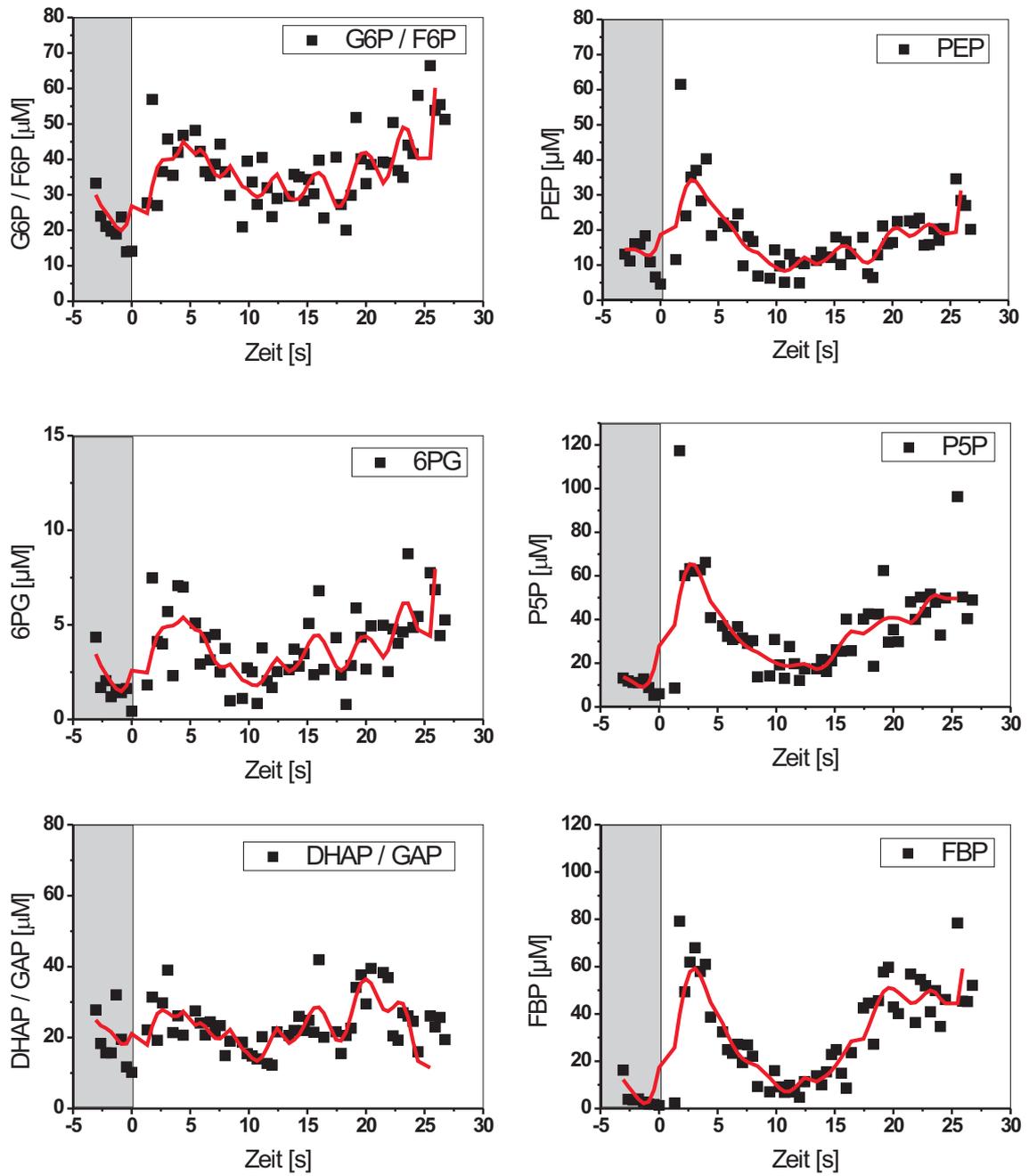


ABBILDUNG 6.42.: Pulsexperiment *E. coli* 4pF49: Triple Quadrupol LC-MS Messung intrazellulärer Metaboliten Teil I; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

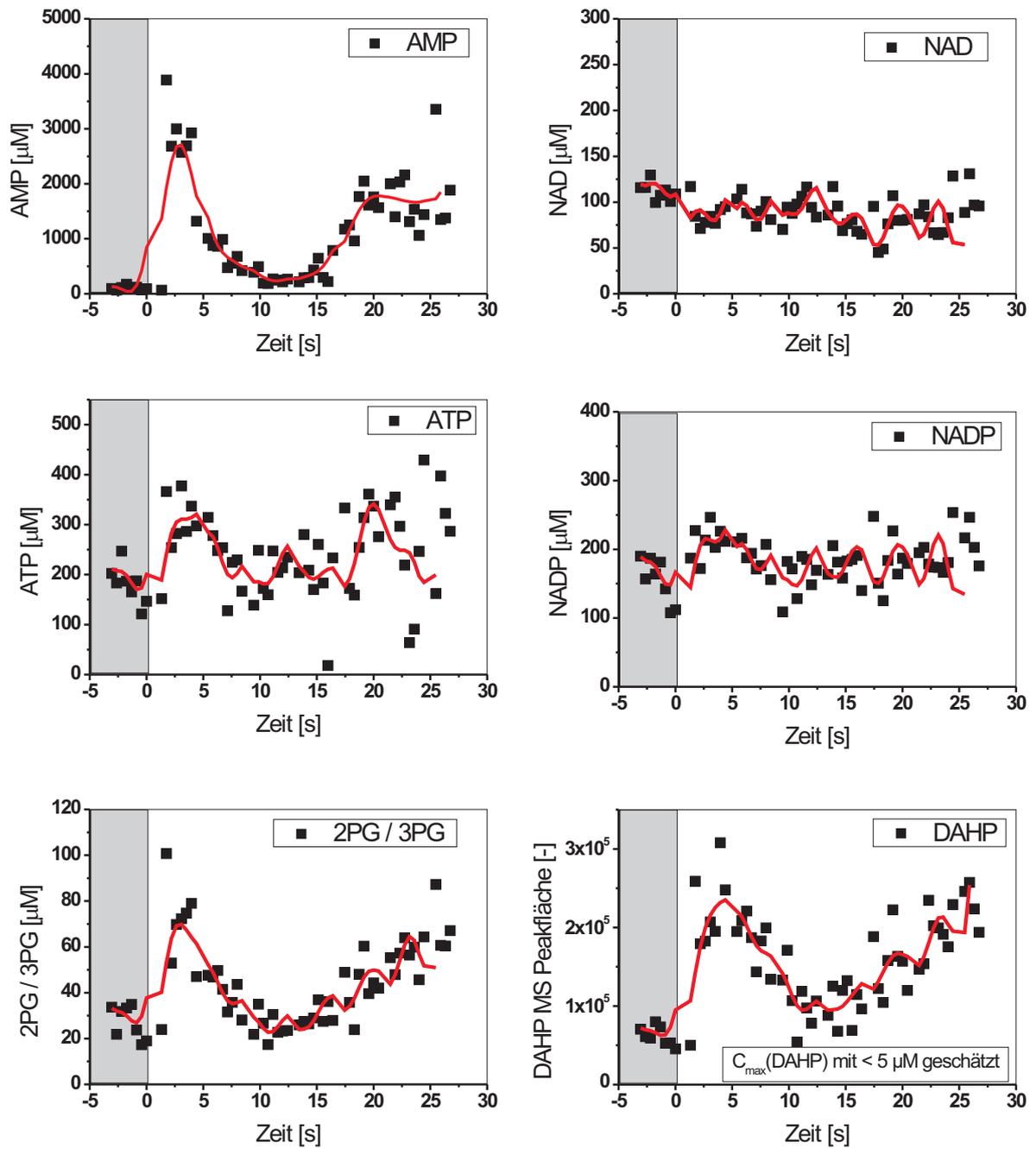


ABBILDUNG 6.43.: Pulsexperiment *E. coli* 4pF49: Triple Quadrupol LC-MS Messung intrazellulärer Metaboliten Teil II; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

nicht detektiert werden, so dass der direkte Zugang zur Information über dessen Verlauf nicht verfügbar war. Bisher konnte E4P noch in keinem biologischen Extrakt nachgewiesen werden [131, 141, 186], und auch über die Kinetik der E4P Bereitstellung ist bisher nichts beschrieben worden. Aus diesem Grund wurde der kombinierte Pool der Pentose-5-phosphate (P5P) anstelle des E4P als Referenz gewählt, da über die Transketolasereaktion zumindest eine Abschätzung bzw. Spekulation über die E4P Bereitstellung realisiert werden konnte.

Genau wie PEP stieg auch der P5P Pool nach dem Puls an und könnte daher als Erhöhung der E4P-Bereitstellung interpretiert werden, so dass hier das Pulssignal über beide Vorläufermetaboliten (PEP und E4P) in die Aromatenbiosynthese weitergeleitet wurde. Daher stieg die DAHP-Peakfläche nach dem Puls signifikant an. Da kein quantitativer DAHP-Standard verfügbar war, konnte keine exakte Quantifizierung für DAHP gemacht werden. Auf der Grundlage eines abschätzenden Vergleiches mit typischen MS-Peakflächen anderer Substanzen konnte die MS-Peakfläche von DAHP mit einer maximalen Konzentration im Bereich  $< 5\text{--}10\ \mu\text{M}$  eingeordnet werden<sup>24</sup>.

Neben DAHP konnte kein weiterer Metabolit der Aromatenbiosynthese nachgewiesen werden, was darauf hindeutete, dass das Pulssignal offenbar nicht weiter in den Stoffwechselweg vorgedrungen war. DAHP wird von der 3-Dehydroquinatsynthase (AroB) zu DHQ umgesetzt, und dieses Enzym wurde bei der L-Phe Stammentwicklung bereits als limitierend identifiziert. Offenbar war sein limitierender Einfluss in diesem Fall so stark, dass das dynamische Signal vollständig abklingt und die nachfolgenden Pools von DHQ, DHS und Shikimat nicht mehr erreichen konnte.

In der Voruntersuchung des Stammes 4pF49 in dem Experiment ohne schnelle Probenahme (aber unter sonst gleichen Bedingungen), konnte jedoch gezeigt werden, dass nach dem Puls DAHP, DHS und Shikimat als extrazelluläre Nebenprodukte gebildet wurden (Kap. 6.6.5). Hier liegt offenbar ein entscheidender Unterschied zwischen der schnellen intrazellulären Antwort nach dem Puls und der zeitlich längerfristigen Akkumulation von den Metaboliten DHS und Shikimat im Überstand vor. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Limitierung durch L-Tyr zu einer Verringerung der maximalen Glukoseaufnahme in *E. coli* L-Phe Produktionsstämmen führte [163]. Daher lag der Verdacht nahe, dass die maximale Glukoseaufnahme-Kapazität der Zellen durch die vorhergehende L-Tyr Limitierung so stark herabgesetzt war, dass das resultierende Glukosepulssignal in der Zelle nicht stark genug war, um über DAHP hinaus in den Aromatenbiosyntheseweg vorzudringen. Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen, die mit den verschiedenen geblockten Mutanten bei der Entwicklung des Fed-Batch Glukosepulssverfahrens gemacht wurden. Dort wurde festgestellt, dass die Stärke der Pulsintensität entscheidend dafür ist, wie weit das Signal in den Aromatenbiosyntheseweg vorzudringen vermag (Kap. 6.6.4).

Um diesem Problem zu begegnen, sollte der Glukosepuls daher auf eine nicht L-Tyr limitierte, d.h. wachsende Kultur aufgegeben werden. Das Wachstum wäre nur durch die Glukoselimitierung, aber nicht mehr durch L-Tyr eingeschränkt. Aufgrund der dadurch höheren maximalen Glukoseaufnahme sollte das Pulssignal auch zu einem stärkeren intrazellulä-

---

<sup>24</sup>Diese Abschätzung basiert lediglich auf den Eigenschaften anderer Metaboliten und muss keineswegs richtig sein. Die Einschätzung der Größenordnung im Umfeld von  $10\ \mu\text{M}$  erscheint aber realistisch.

ren Signal führen, das auch im weiteren Verlauf der Aromatenbiosynthese detektierbar sein sollte.

### 6.7.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse mit *E. coli* 4pF49

Das Fed-Batch Verfahren mit Glukosepuls und schneller Probenahme wurde auf den Stamm *E. coli* 4pF49 angewendet. Mit der neu etablierten Triple Quadrupol LC-MS Methode gelang die intrazelluläre Detektion der Pulsstimulation im Zentralstoffwechsel und auch im DAHP-Pool, dem ersten Metabolit der Aromatenbiosynthese. Bedingt durch die vorherige L-Tyr Limitierung der Zellen scheint die maximale Glukoseaufnahmerate aber so stark reduziert worden zu sein, dass das Pulssignal nicht stark genug war und durch die limitierende DHQ Synthase (AroB) gepuffert bzw. so stark gedämpft wurde, dass es keinen der folgenden Metabolitpools (DHQ, DHS oder Shikimat) mehr erreichen und stimulieren konnte. Die Fermentationsstrategie wurde nun dahingehend verändert, dass der Glukosepuls auf eine nicht L-Tyr limitierte, wachsende Kultur aufgegeben wurde, um eine erhöhte Glukoseaufnahmerate und damit ein stärkeres Pulssignal zu erzielen.

Aufgrund der mangelnden Sensitivität der Ionenfallen LC-MS wurde bei den weiteren Untersuchungen auf ihren Einsatz für die quantitative Metabolitanalytik verzichtet und ausschließlich die Triple Quadrupol LC-MS verwendet. Obwohl auch die enzymatischen Tests unter mangelnder Sensitivität litten, wurden sie weiter parallel zu der Triple Quadrupol LC-MS eingesetzt. Mit ihrer Hilfe sollen Metaboliten des Zentralstoffwechsels mit einer von der LC-MS unabhängigen alternativen Messmethode erfasst werden, um die Richtigkeit der Messungen zu bestätigen oder zu widerlegen.

### 6.7.2. Glukosepulsexperiment mit *E. coli* 4pF20

Als direkte Konsequenz der Ergebnisse aus dem Experiment mit *E. coli* 4pF49 aus dem vorhergehenden Abschnitt, wurde dieses Glukosepulsexperiment in Gegenwart eines L-Tyr Überschusses durchgeführt. Die Kultur war vor dem Puls einzig durch Glukose limitiert, d.h. es handelte sich um wachsende Zellen. Der L-Tyr Überschuss machte den Austausch von *aroF<sup>w</sup>* gegen das *aroF<sup>fbr</sup>*-Gen nötig, um eine hohe Aktivität der DAHP Synthase auch in Gegenwart von L-Tyr zu gewährleisten. Das Experiment wurde daher mit dem Stamm *E. coli* 4pF20 (*aroF<sup>fbr</sup> pheA<sup>fbr</sup>*) durchgeführt. Um den potenziellen negativen Effekt einer mehrstündigen Limitierungsphase auszuschließen, wurde diese Phase mit 20 Minuten hier deutlich kürzer gewählt. Aufgrund der hohen turn-over Raten der Metabolitpools sollte diese Zeit aber groß genug gewählt worden sein, um einen quasi-stationären Stoffwechselzustand zu erzielen.

Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 6.44 dargestellt, nach Erreichen einer  $OD_{650} = 50$  wurde die Glukosedosierung reduziert, und 20 Minuten nach Einsetzen der Glukoselimitierung wurde der Glukosepuls mit schneller Probenahme initiiert. Die relativ geringe L-Tyr Konzentration, die bei einer Prozesszeit von etwa 5,5 h kurzfristig aufgetreten war, hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Kultur und wurde durch den Beginn der L-Tyr Dosierung wieder abgefangen. Im weiteren Verlauf der Fermentation wurde ein L-Tyr Überschuss beibehalten, zum Zeitpunkt des Pulsexperimentes betrug die L-Tyr Konzentration ca. 1,6 mM ( $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ) und entsprach damit den Bedingungen zu Beginn der

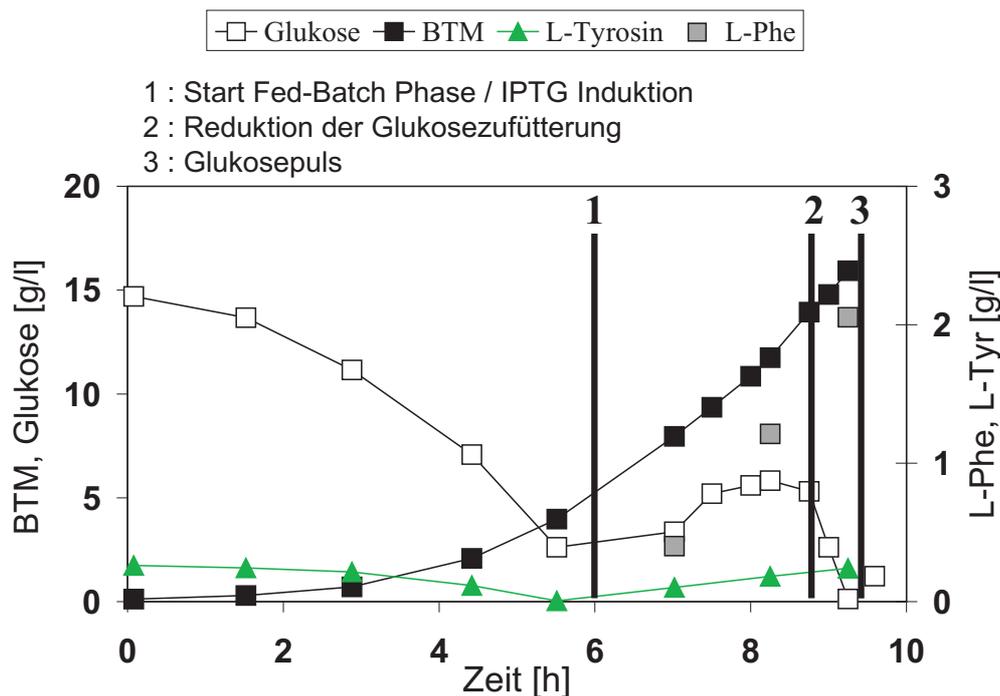


ABBILDUNG 6.44.: Fermentationsverlauf des Pulsexperimentes mit *E. coli* 4pF20

Fermentation.

### 6.7.2.1. Enzymatische Ergebnisse

Zunächst wurden die aus dem schnellen Probenahmeexperiment erhaltenen Zellextraktproben mit den enzymatischen Testmethoden untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.45 dargestellt. Außer für F6P wurde für alle untersuchten Metaboliten des Zentralstoffwechsels ein sehr deutlicher Anstieg nach Aufgabe des Pulses gemessen, wobei für DHAP, GAP, Pyr und PEP maximale Konzentrationen im Bereich von 4–10 mM beobachtet wurden. Für FBP wurden Werte von 2 mM gemessen, G6P stieg etwa auf 1–2 mM, und für F6P wurde keine Veränderung (außer in den negativen Bereich) gemessen. Aufgrund dieser enzymatischen Messungen könnte davon ausgegangen werden, dass die Änderung der Fermentations- und Pulsstrategie offenbar richtig gewesen war, und dass das Pulssignal nun sogar mit den weniger sensitiven enzymatischen Messungen zugänglich war.

Nachdem jedoch auch die Triple Quadrupol LC-MS Daten aus diesem Experiment zugänglich waren (Kap. 6.7.2.2), musste festgestellt werden, dass sowohl ein qualitativer als auch ein deutlicher quantitativer Unterschied zwischen den Datensätzen der beiden Methoden lag. Die enzymatischen Werte lagen mitunter um einen Faktor 10–15 über denen der Triple Quadrupol LC-MS. Mittels des Standard-Additions-Verfahrens konnte jedoch die Richtigkeit der Triple Quadrupol LC-MS Quantifizierung belegt werden (Kap. 6.1.2.3),

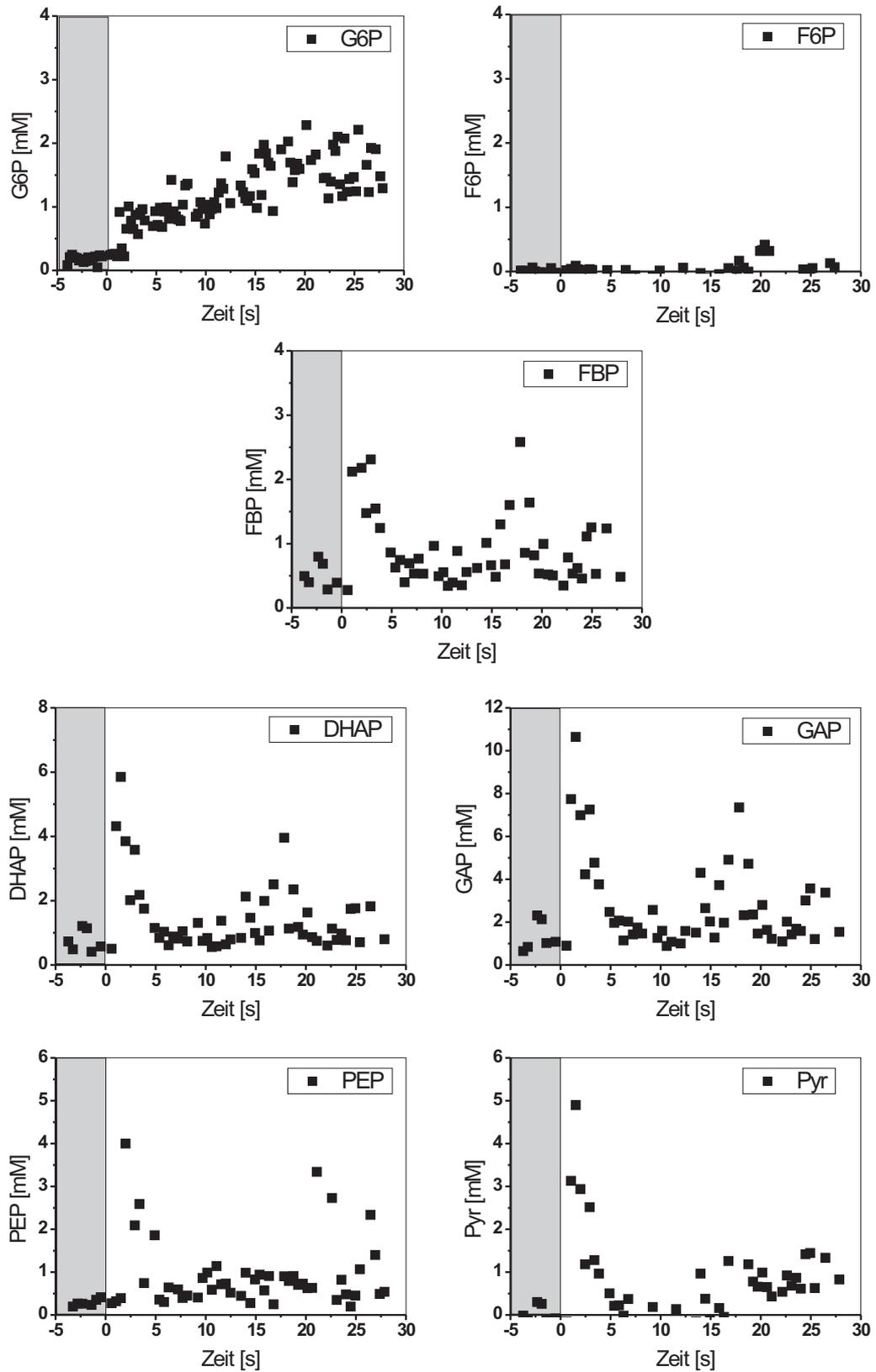


ABBILDUNG 6.45.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF20: Enzymatische Messungen

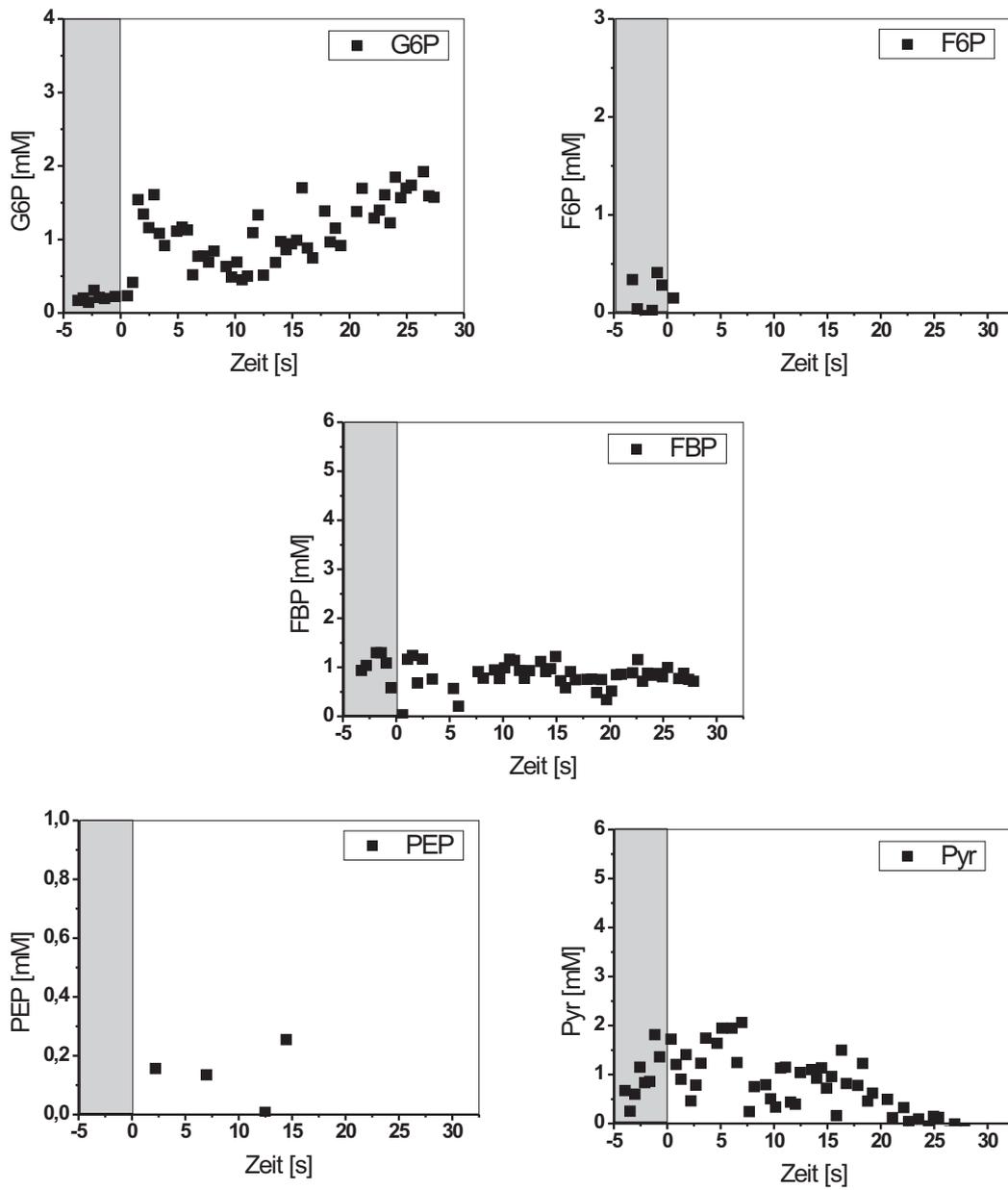


ABBILDUNG 6.46.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF20: Enzymatische Messungen nach Ultrafiltration der Proben

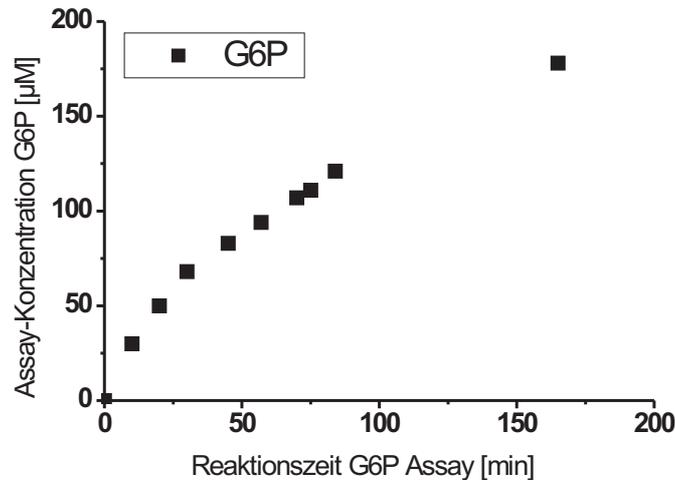


ABBILDUNG 6.47.: Zunahme der fiktiven G6P Konzentration im Enzymtest durch Matrixeinfluss einer *E. coli* K12 Probe

d.h. der Fehler sollte bei den enzymatischen Messungen zu suchen sein.

Um den Matrixanteil in den Zellextrakt Proben weiter zu verringern, wurden die Proben, wie unter Kap. 4.4.2 beschrieben, mit einer Ausschlussgrenze von 5000 Da ultrafiltriert. Mit diesen filtrierten Proben wurden die enzymatischen Messungen erneut durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abb. 6.46 dargestellt. In den ultrafiltrierten Proben kann neben G6P kein anderes Metabolitsignal als Antwort auf den Glukosepuls erkannt werden. Die Messungen für die Metabolite F6P und PEP ergeben für die meisten Proben sogar leicht negative Werte, die jedoch nicht in die Darstellung aufgenommen wurden.

Die Daten ließen den Schluss zu, dass es in den nicht filtrierten Proben einen Restanteil von aktivem Protein oder Proteinfragmenten gab, obwohl diese Proben mit Perchlorsäure behandelt wurden. Diese Restaktivität war offenbar in der Lage, mit den für die enzymatischen Messmethoden verwendeten Kofaktoren zu reagieren. Im Verlauf der Messung führte das zu einer schleichenden Umsetzung der für den Enzymtest zugesetzten Kofaktoren und damit zu einer verfälschten Messung, bei der zu hohe Metabolitkonzentrationen erzielt wurden. Besonders stark wurde dieser Effekt bei Enzymtests beobachtet, die auf einer NADH verbrauchenden Nachweisreaktion basieren (PEP-Pyr, DHAP-GAP-FBP), jedoch konnte er auch für die NADPH bildende Nachweisreaktion der G6P Bestimmung beobachtet werden (Abb. 6.47) [190].

Die Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass das vermeintliche Pulssignal in den nicht filtrierten Proben ausschließlich auf diese variierenden Matrixeffekte in den Proben zurückgeführt werden konnte [100]. In den ultrafiltrierten Proben ist G6P der einzige Metabolit, der eine Pulsreaktion zeigte. Um dieses Ergebnis der enzymatischen Messungen zu sichern, wurde die Standard-Additions-Methode zur Quantifizierung eingesetzt, um

die Matrixeffekte in den Proben auszuschließen. Als Ergebnis wurde festgestellt, dass in allen ultrafiltrierten Proben von *E. coli* 4pF20 kein G6P mit der Standard-Additions-Methode nachgewiesen wurde und daher auch das vermeintliche G6P-Puls signal lediglich ein Mess-Artefakt war. Auch für dieses Experiment waren die enzymatischen Messungen nicht sensitiv genug, um die intrazellulären Metaboliten erfassen zu können und wurden zudem noch sehr stark durch die variierende Zusammensetzung der Probenmatrix beeinflusst.

Werden nun die Ergebnisse der enzymatischen Messungen von *E. coli* 4pF20 und *E. coli* 4pF49 verglichen, so ist in beiden Fällen die Konzentration der untersuchten Metaboliten geringer als die Nachweisempfindlichkeit der Tests. Jedoch unterschieden sie sich sehr deutlich im Verhalten ihrer Probenmatrix. Bei *E. coli* 4pF20 wurde durch die Probenmatrix ein vermeintliches Pulssignal suggeriert, das bei *E. coli* 4pF49 in dieser Form nicht beobachtet wurde. Trotz der genetischen Ähnlichkeit beider Stämme unterschieden sie sich offenbar sehr deutlich in den Eigenschaften ihrer Probenmatrix.

Bezüglich der Unterschiede zwischen den enzymatischen und den Triple Quadrupol MS Messungen konnten die fehlerbehafteten enzymatischen Messmethoden als Ursache der Unterschiede der gemessenen Daten klar identifiziert werden. In den weiteren Untersuchungen wurde daher auf den Einsatz der enzymatischen Messungen verzichtet. Da die Enzymtests offenbar sehr stark von der Probenmatrix abhängen, sollte die Quantifizierungsstrategie für enzymatische Messungen in jedem Fall überdacht werden. Das bisher von Schäfer und Buchholz [25, 143] verwendete Konzept der externen Kalibrierung über eine Wasserstandardreihe ist zwar weniger arbeitsintensiv, berücksichtigt allerdings den Einfluss der Probenmatrix nicht adäquat. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass dieser Einfluss berücksichtigt werden muss, und daher wird auch hier die konsequente Anwendung der Standard-Additions-Methode für die Quantifizierung empfohlen. Die Ultrafiltration der Proben konnte einen weiteren Beitrag zur Reduktion der Matrixproblematik beisteuern.

### 6.7.2.2. Triple Quadrupol LC-MS Ergebnisse

Die Proben wurden mit der in dieser Arbeit entwickelten Triple Quadrupol LC-MS Methode erneut vermessen, die Ergebnisse sind in den Abb. 6.48, 6.49 und 6.50 dargestellt. Zur besseren Visualisierung der Trends in den Daten wurden sie mit einem FFT-Filter (5 Punkte) geglättet, der als Linie dargestellt ist. Die geglätteten Daten können die schnellen Trends einiger Metaboliten nach dem Puls zwar nicht völlig abdecken, vermitteln jedoch einen guten Überblick über den Gesamtverlauf. Die Pulsstimulation kann in Metaboliten des Zentralstoffwechsels und der Aromatenbiosynthese nach dem Puls detektiert werden. Das Pulssignal konnte nun jedoch auch im weiteren Verlauf der Aromatenbiosynthese deutlich nachgewiesen werden, d.h. in Metaboliten nach DAHP. Die Änderung der Fermentations- und Pulsstrategie führte offenbar zu einer Verstärkung des Signals in den Aromatenbiosyntheseweg.

In der Zeit vor dem Puls, d.h. dem quasi steady-state, wurde für einige Metaboliten des Zentralstoffwechsels eine akzeptable Gleichgewichtseinstellung erreicht, obwohl für z.B. G6P oder 6PG ein leicht fallender Trend bis zum Puls beobachtet wurde und ATP und ADP sogar stark fluktuierten. Nach dem Puls konnte im Zentralstoffwechsel für alle Metaboliten eine deutliche Veränderung der Konzentrationen gemessen werden.

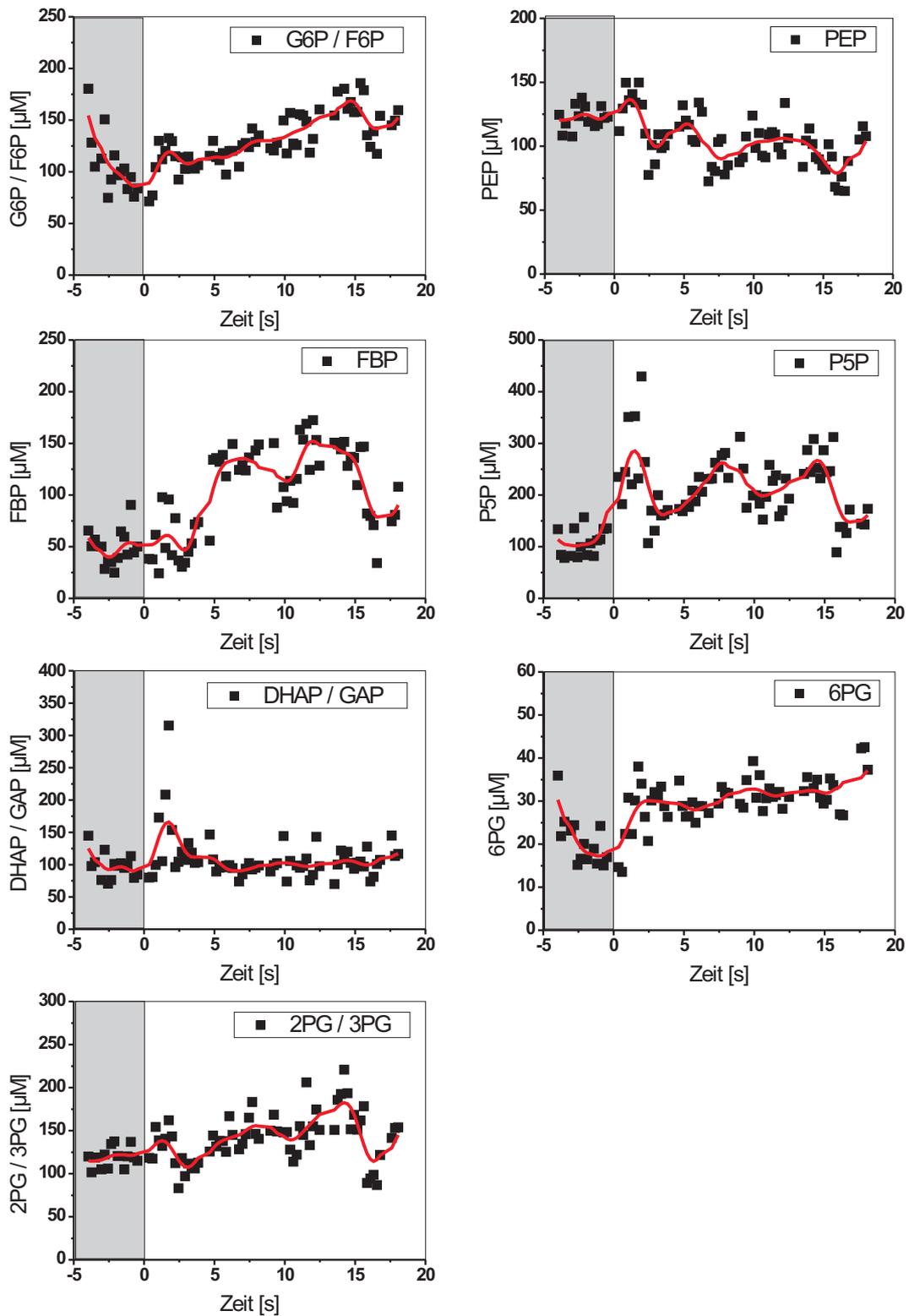


ABBILDUNG 6.48.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF20: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Zentralstoffwechselmetaboliten; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

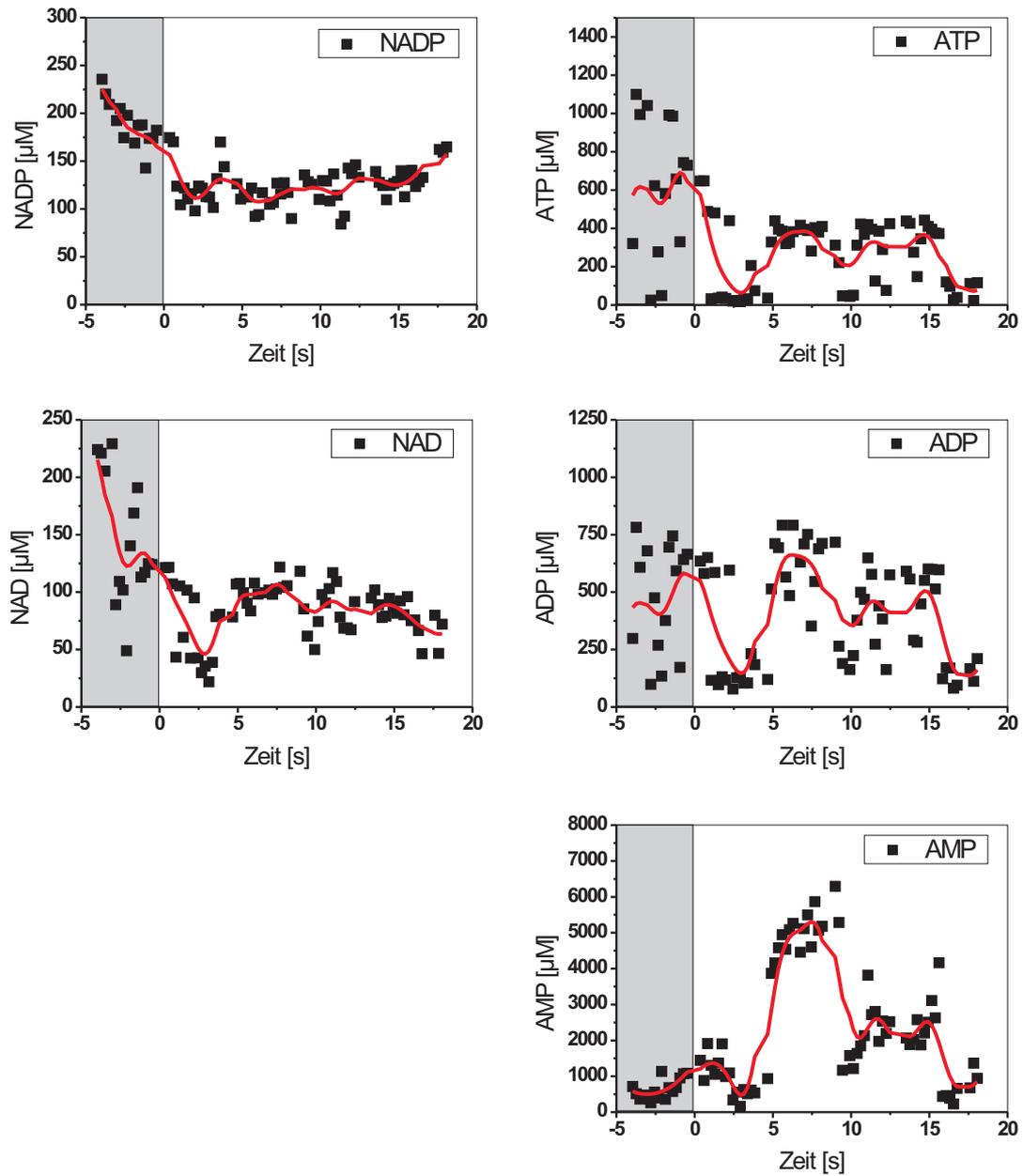


ABBILDUNG 6.49.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF20: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Nucleotiden; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

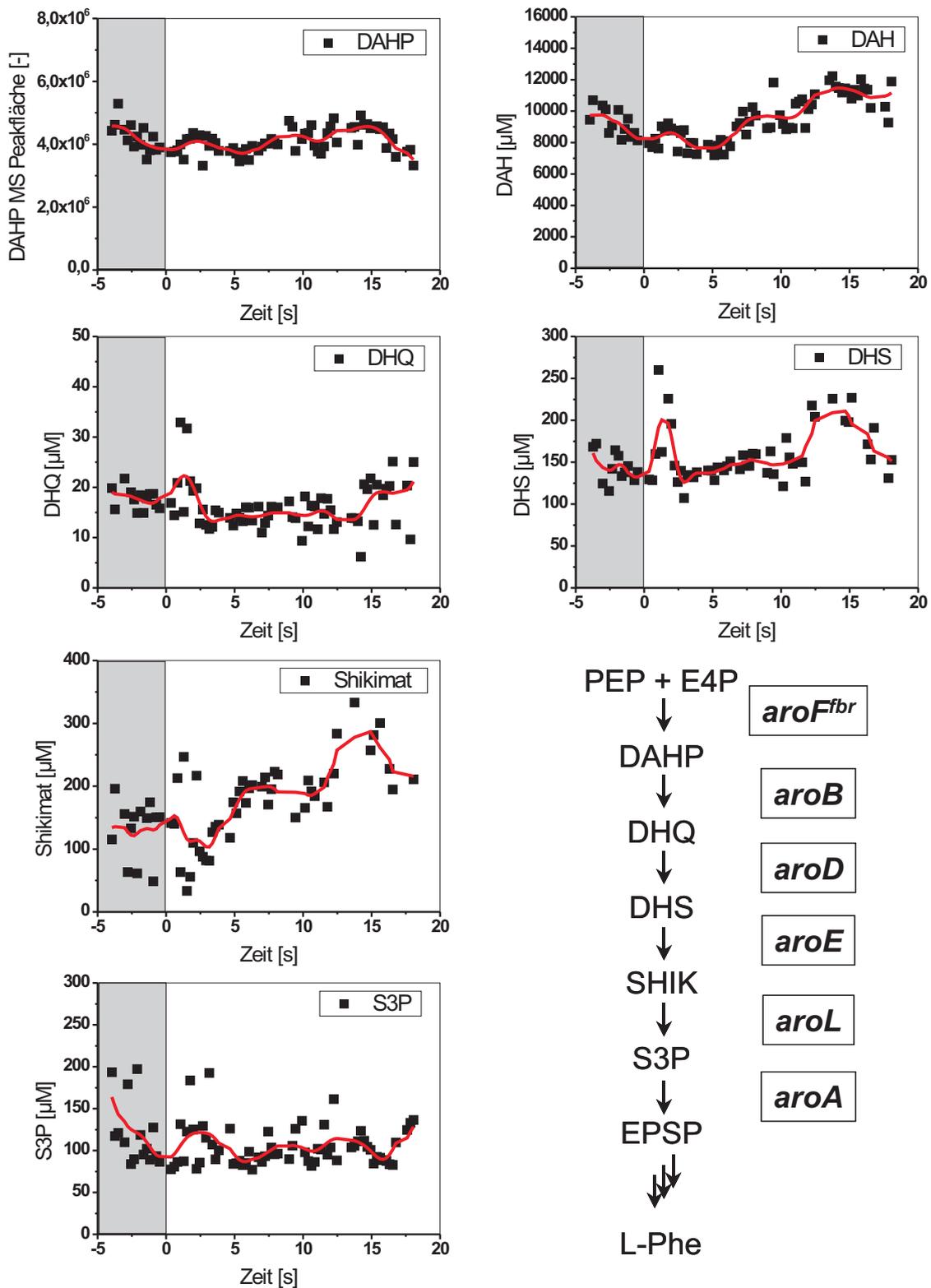


ABBILDUNG 6.50.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF20: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Metaboliten der Aromatenbiosynthese; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

Der G6P/F6P-Pool stieg nach dem Puls an, jedoch konnte auch für diesen Stamm analog zu *E. coli* 4pF49 kein direkter Abfall der PEP Konzentration aufgrund der höheren Glukoseaufnahme über das PTS beobachtet werden. Vielmehr stieg der PEP-Pool wiederum kurzfristig leicht an, fiel aber langfristig etwas unter das Vorpulsniveau. Der PEP-Anstieg nach dem Puls war nicht mehr so stark wie bei *E. coli* 4pF49, und der Abfall unter das Vorpulsniveau könnte auf einen höheren Verbrauch von PEP durch die Aromatenbiosynthese in diesem Experiment hindeuten.

Der P5P Pool stieg nach dem Puls schnell um einen Faktor von 4 an. Unter der Voraussetzung, dass P5P wiederum stellvertretend für E4P angenommen werden kann, würde das auf eine erhöhte E4P-Bereitstellung hindeuten. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass der Aromatenbiosyntheseweg durch ein positives Pulssignal über beide Vorläufermetaboliten PEP und P5P stimuliert wurde.

Mit Blick auf den Aromatenbiosyntheseweg bietet *E. coli* 4pF20 ein deutlich verändertes Bild im Vergleich zu *E. coli* 4pF49. Im vorliegenden Fall war bereits vor dem Puls ein höherer Pool von DAHP und zusätzlich auch von seinem dephosphorylierten Derivat DAH zu beobachten, die nach dem Puls nur eine relativ kleine Änderung erfuhren (Abb. 6.50). Grund dafür war die bereits hohe Poolgröße beider Metabolite vor dem Puls, d.h. die relative Änderung des Pools nach dem Puls fiel weniger signifikant aus. Trotzdem konnte für DAHP und DAH eine Erhöhung der Pools nach dem Puls gemessen werden. Für DAH wurde eine Poolgröße im Bereich von 8–10 mM quantifiziert und für DAHP wurde sie entsprechend der Vorgehensweise in Kap. 6.7.1.2 mit  $\approx 100 \mu\text{M}$  abgeschätzt<sup>25</sup>.

Die für *E. coli* 4pF20 gemessenen DAHP MS-Peakflächen waren um den Faktor 20 höher als für *E. coli* 4pF49, was mit einem signifikant höheren DAHP Niveau im Einklang stand. Anders als bei *E. coli* 4pF49 konnte das Pulssignal nun aber auch in den folgenden Metabolitpools von DHQ, DHS, Shikimat und S3P detektiert werden, wobei die Stärke des Signals in den verschiedenen Pools variierte. Für DHQ wurde nur eine sehr kurze Verdopplung des im Vergleich ohnehin kleinen Pools nach dem Puls beobachtet, was auf eine sehr schnelle Weiterreaktion in den nächsten Metabolitpool von DHS hindeutete. DHS zeigte ebenfalls eine kurze Verdopplung der Poolgröße und fiel dann zunächst wieder auf das Anfangsniveau zurück. Die weiterführende Auswertung und Interpretation der gemessenen Dynamik in den Metaboliten der Aromatenbiosynthese wurde mit statistischen Analysemethoden durchgeführt und ist in Kapitel 6.8 dargestellt.

### 6.7.2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse mit *E. coli* 4pF20

Die Veränderung der Fermentations- und Pulsstrategie konnte bei der Untersuchung des Stoffwechsels von *E. coli* 4pF20 erfolgreich angewendet werden. Durch die Pulsstimulation einer Glukose limitierten, jedoch nicht L-Tyr limitierten wachsenden Kultur konnte ein stärkeres Pulssignal in der Aromatenbiosynthese detektiert werden. Wie bereits nach dem Experiment mit *E. coli* 4pF49 vermutet, war das Problem des zu schwachen Pulssignals

---

<sup>25</sup>Genau wie bereits vorher dargestellt, basiert diese Abschätzung lediglich auf den Eigenschaften anderer Metaboliten und muss keineswegs richtig sein. Die Einschätzung der Größenordnung im Umfeld von  $100 \mu\text{M}$  erscheint aber realistisch.

offenbar durch die Verringerung der maximalen Glukoseaufnahme verursacht worden, deren Ursache in der *L*-Tyr Limitierung vermutet worden war. Trotz der auch bei *E. coli* 4pF20 vorliegenden Limitierung durch den AroB Schritt war die Pulsanregung stark genug, um die dahinter liegenden Metabolitpools von DHQ, DHS, Shikimat und S3P anzuregen.

Die großen Pools von DAHP und DAH zeigten deutlich, dass auch hier AroB sehr stark limitierend war. Die geringe Auswirkung im DHQ-Pool deutete daraufhin, dass die Reaktion von DHQ zu DHS sehr schnell verlief und dass AroD daher nicht limitierend war. Im Gegensatz dazu wies der Verlauf von DHS und Shikimat auf eine langsamere Reaktion von AroE bzw. AroL hin. Im S3P-Pool war daher eine im Vergleich schwächere Dynamik zu erkennen, die vermutlich ihre Ursache in der sequentiellen Dämpfung des Pulssignals durch die limitierenden Schritte von AroB, AroE und AroL hatte. Daraus ergab sich die Fragestellung, wie sich die Verhältnisse im Aromatenbiosyntheseweg nach einer Pulsstimulation ändern würden, wenn eines der limitierenden Gene überexprimiert würde. Im Gegensatz zu *aroE* und *aroL* bot *aroB* dafür ein hervorragendes Ziel, da es das zweite Gen des Stoffwechselwegs ist und die Wirkung seiner Überexpression in den nachfolgenden Pools von DHQ, DHS, Shikimat und S3P gut studiert werden könnte.

Die Messungen der Proben mit enzymatischen Methoden und mit der Triple Quadrupol LC-MS lieferten zwei sowohl qualitativ, als auch quantitativ unterschiedliche Datensätze. Die enzymatischen Daten zeigten Konzentrationen, die um einen Faktor von 10–15 höher lagen. Durch Experimente mit Ultrafiltration der Proben konnten die vermeintlich hohen Konzentrationen als Mess-Artefakte der Probenmatrix identifiziert werden. Daher wurde für weitere Experimente auf den Einsatz der enzymatischen Messungen verzichtet. Um Probleme mit Matrixeffekten bei zukünftigen enzymatischen Messungen auszuschließen, sollte die Standard-Additions-Methode anstatt der sonst üblichen externen Kalibration für die Quantifizierung von Zellextrakten Anwendung finden.

### 6.7.3. Glukosepulsexperiment mit *E. coli* 4pF78

Unter Verwendung der beim Glukosepulsexperiment mit *E. coli* 4pF20 erfolgreich eingesetzten Fermentations- und Pulstrategie wurde analog ein Glukosepulsexperiment mit *E. coli* 4pF78 durchgeführt. Zusätzlich zu *aroF<sup>fbr</sup>* und *pheA<sup>fbr</sup>* enthält das Plasmid pF78 das Gen der 3-Dehydroquinat Synthase *aroB*, um den limitierenden Charakter dieses enzymatischen Schritts in der Aromatenbiosynthese aufzuheben. Als Folge davon sollte die Bildung von DAHP und DAH vermieden worden sein und das Glukosepulssignal in den darauf folgenden Metabolitpools im Vergleich zu *E. coli* 4pF20 verstärkt worden sein. Der Fermentationsverlauf ist in Abb. 6.51 zu sehen. Ebenso wie beim Experiment mit *E. coli* 4pF20 wurde die *L*-Tyr Dosierung so gewählt, dass im gesamten Fermentationsverlauf immer in Gegenwart eines *L*-Tyr Überschusses gearbeitet wurde. Nach Erreichen einer  $OD_{650} = 50$  wurde die Glukosedosierung für die Limitierung reduziert. Aufgrund technischer Schwierigkeiten mit der schnellen Probenahme konnte die vorgesehene Dauer der Limitierung von 20 min nicht eingehalten werden, und das Glukosepulsexperiment konnte erst nach 45 min initiiert werden.

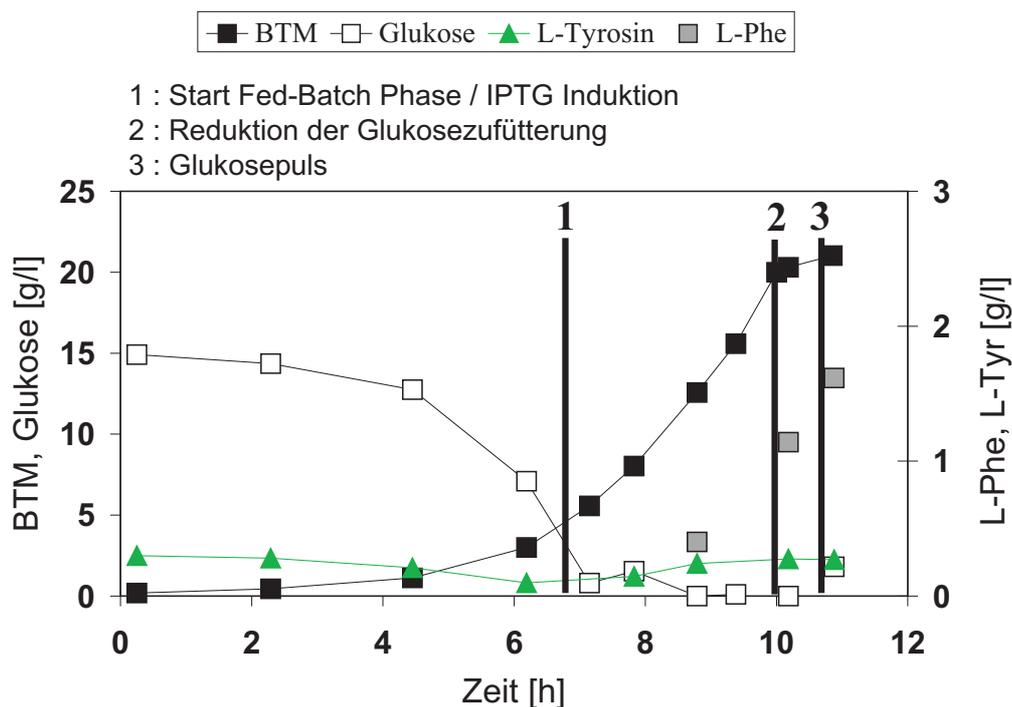


ABBILDUNG 6.51.: Fermentationsverlauf des Pulsexperimentes mit *E. coli* 4pF78

### 6.7.3.1. Triple Quadrupol LC-MS Ergebnisse

Die Proben aus dem Glukosepulsexperiment mit 4pF78 wurden mit der Triple Quadrupol LC-MS untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abb. 6.52, 6.53 und 6.54 dargestellt. Zur besseren Visualisierung der Trends in den Daten wurden sie mit einem FFT-Filter (5 Punkte) geglättet, der als Linie dargestellt ist. Die geglätteten Daten können die schnellen Trends einiger Metaboliten nach dem Puls zwar nicht völlig abdecken, vermitteln jedoch einen guten Überblick über den Gesamtverlauf. Auch bei diesem L-Phe Produktionsstamm konnte die Stimulation nach dem Puls sowohl in Metaboliten des Zentralstoffwechsels als auch der Aromatenbiosynthese aufgezeigt werden. Im Vergleich zum Experiment mit *E. coli* 4pF20 konnten durch die Überexpression von *aroB* die Pools der Metaboliten DAHP und DAH nicht mehr nachgewiesen werden, und die folgenden Pools von DHQ und DHS zeigten ein stark ausgeprägtes dynamisches Verhalten. Die Überexpression von *aroB* führte offenbar zu einer nunmehr ungehinderten Weitergabe des Pulssignals in die folgenden Metabolit-Pools.

Einen deutlichen Unterschied zu *E. coli* 4pF49 und 4pF20 zeigte der PEP-Pool. Nach dem Puls war kein Anstieg mehr zu erkennen, vielmehr fiel der Pool unmittelbar auf etwa ein Drittel der Konzentration vor dem Puls. Vermutlich führte die Überexpression von *aroB* zu einem höheren Fluss in die Aromatenbiosynthese. In Verbindung mit dem höheren PEP-Bedarf für das PTS nach dem Puls könnte das für die unmittelbare Erniedrigung des PEP Pools verantwortlich gewesen sein. Der P5P-Pool, der bereits als möglicher Vorläufer für E4P diskutiert wurde, zeigte wie bei den anderen beiden Experimenten unmittelbar

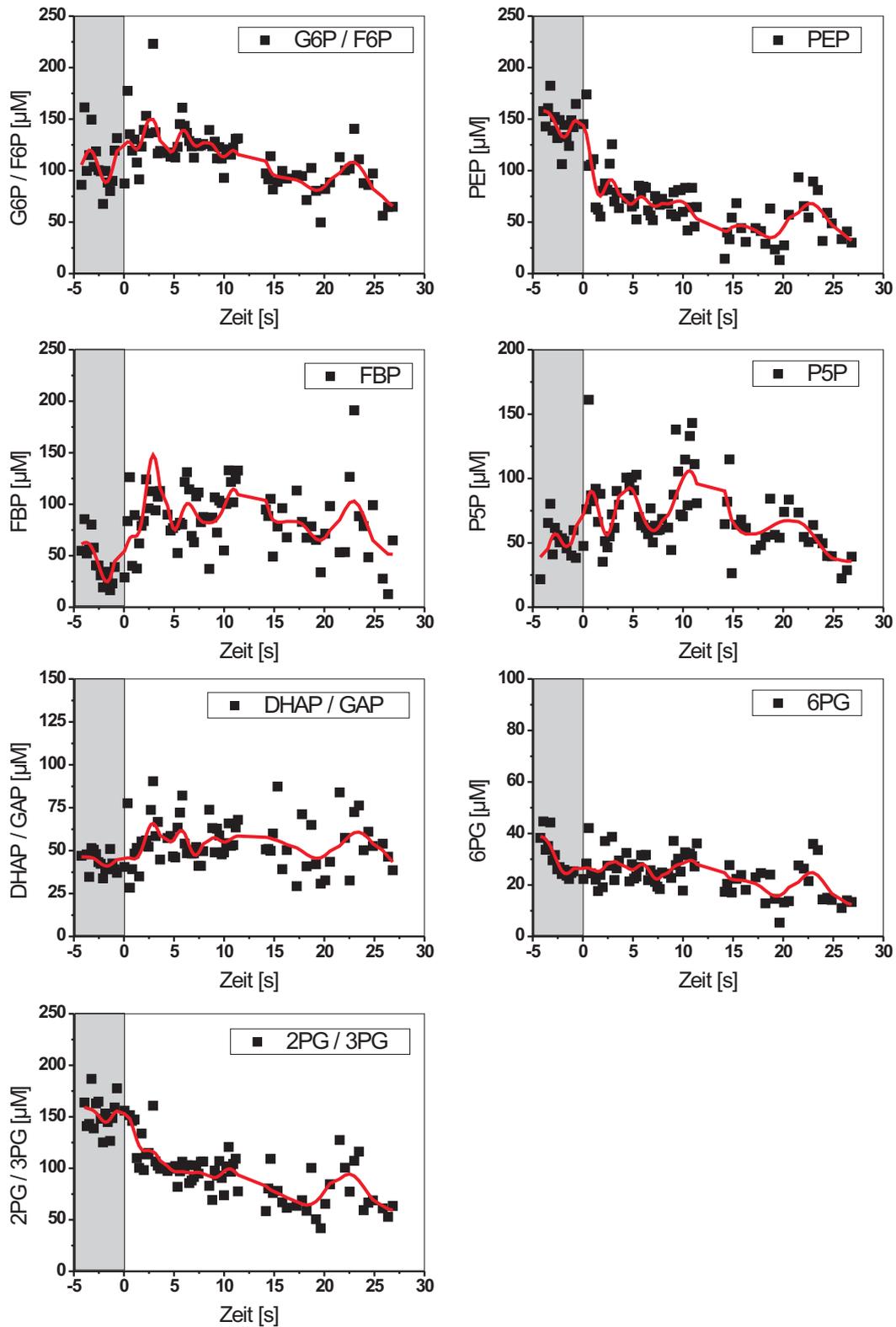


ABBILDUNG 6.52.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF78: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Zentralstoffwechselmetaboliten; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

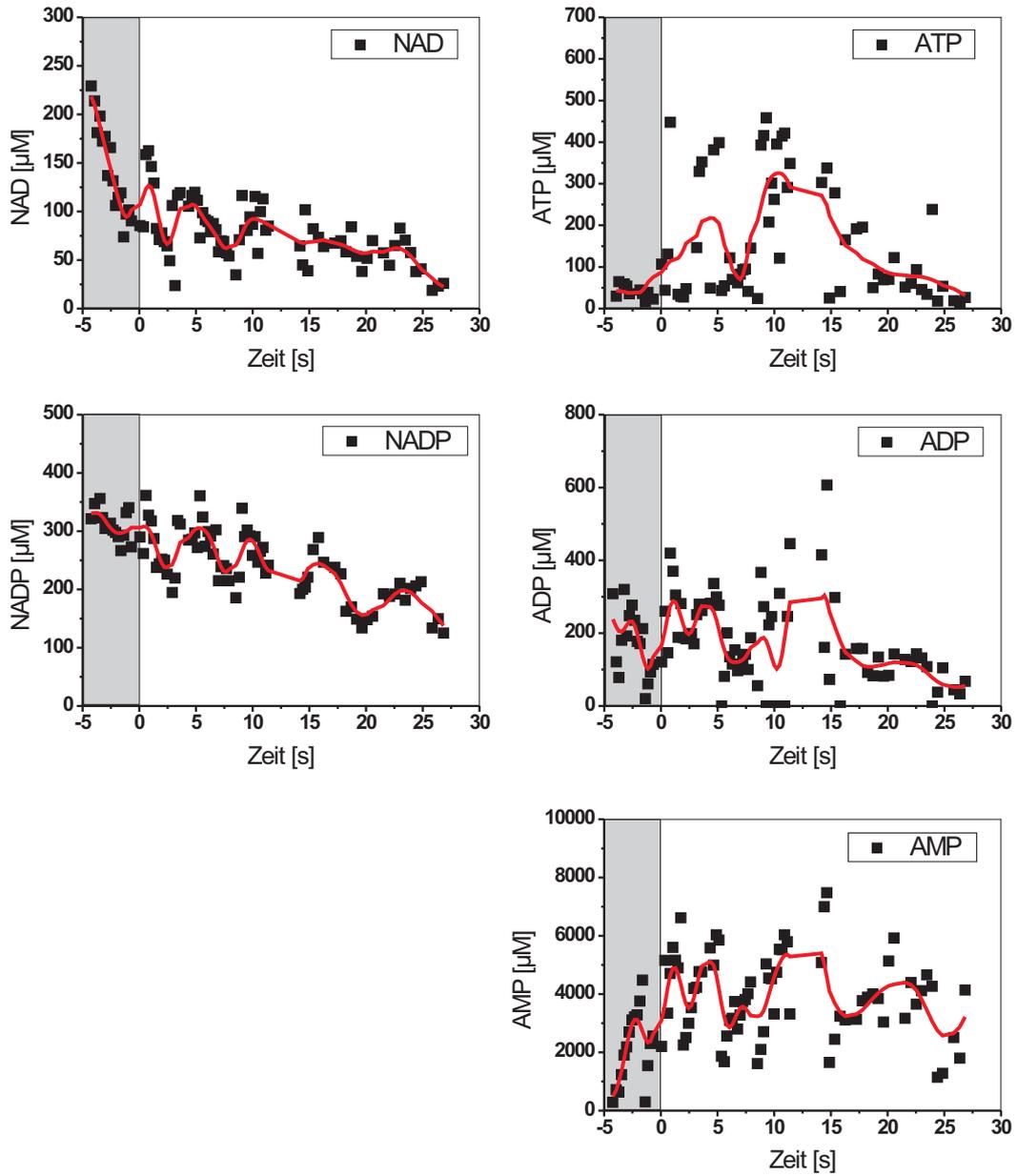


ABBILDUNG 6.53.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF78: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Nukleotiden; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

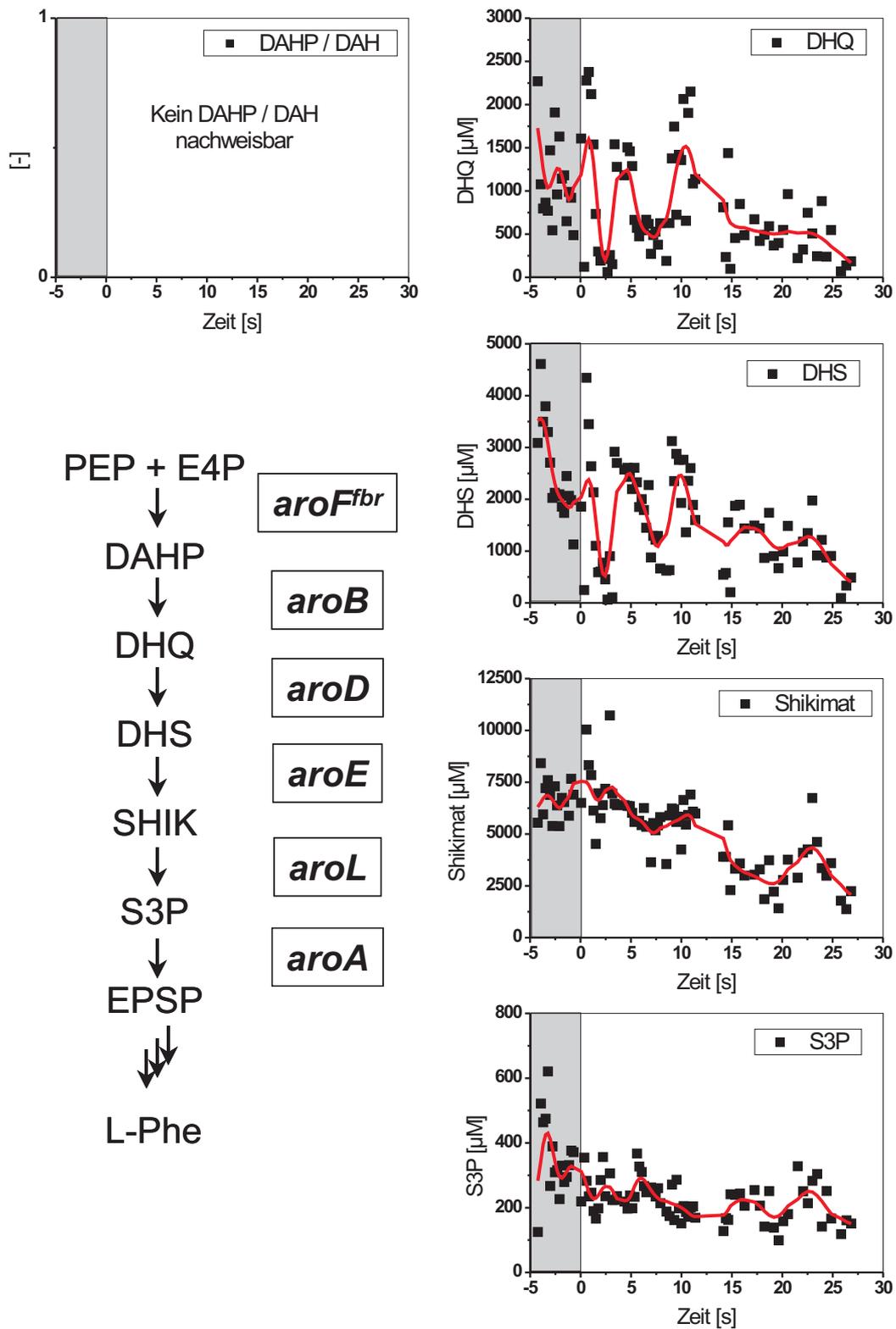


ABBILDUNG 6.54.: Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF78: Triple Quadrupol LC-MS Messung von Metaboliten der Aromatenbiosynthese; Linien stellen die mit dem FFT-Filter geglätteten Daten dar

nach dem Puls einen Anstieg der Konzentration.

Im Bereich des Aromatenbiosynthesewegs sind sehr deutliche Unterschiede zu *E. coli* 4pF20 zu erkennen, die eindeutig mit der Überexpression von *aroB* korrelieren. Als Folge der Überexpression ist die Geschwindigkeit der Umsetzung von DAHP zu DHQ offenbar so stark beschleunigt worden, dass kein DAHP-Pool mehr nachweisbar war. Das hatte zur Folge, dass die bisher nicht limitierende Reaktion der 3-Dehydroquinat Dehydratase (AroD) von DHQ zu DHS limitierend wird, was an dem deutlichen Anstieg des DHQ-Pools von etwa 500 auf 2500  $\mu\text{M}$  nach dem Puls zu erkennen ist. Der bereits als limitierend eingestufte Charakter der Reaktion von DHS zu Shikimat wurde dadurch weiter verstärkt, was an dem enormen Anstieg des DHS-Pools von etwa 500 auf 5000  $\mu\text{M}$  beobachtet werden konnte.

Im Vergleich zu 4pF20 sind die hier beobachteten Poolgrößen für DHQ und DHS um einen Faktor 10–200 größer, und auch die dynamische Änderung der Poolgrößen war mit einem Faktor 10 deutlich größer als bei *E. coli* 4pF20. Bei Shikimat und S3P war diese große, sehr stark ausgeprägte Dynamik nicht mehr erkennbar. Vielmehr konnte hier sogar ein leicht fallender Trend nachgewiesen werden, allerdings sind beide Pools im Vergleich zu *E. coli* 4pF20 deutlich erhöht. Durch die 30-fache Erhöhung der Shikimatkonzentration könnte eine Aktivierung der Feedback-Inhibierung der Shikimat Dehydrogenase (AroE) durch Shikimat verbunden gewesen sein [49]. Die durch die Inhibierung reduzierte Aktivität von AroE führte offenbar zu einer Dämpfung des Pulssignals, weswegen bei Shikimat und S3P die starke Dynamik aus den DHQ und DHS Pools nicht mehr zu erkennen war. Die weiterführende Auswertung und Interpretation der gemessenen Dynamik in den Metaboliten der Aromatenbiosynthese wurde mit statistischen Analysemethoden durchgeführt und ist in Kapitel 6.8 dargestellt.

### 6.7.3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse mit *E. coli* 4pF78

Die Messung der Proben aus dem Experiment mit *E. coli* 4pF78 erfolgte ausschließlich mit der Triple Quadrupol LC-MS. Die veränderte Fermentations- und Pulsstrategie konnte auf *E. coli* 4pF78 angewendet werden. Nach der Pulsstimulation der Glukose limitierten, jedoch nicht L-Tyr limitierten Kultur konnte das Pulssignal im Zentralstoffwechsel und in der Aromatenbiosynthese detektiert werden. Durch die Überexpression von *aroB* konnte kein DAHP-Pool mehr nachgewiesen werden, und das Signal in den folgenden Metabolitpools von DHQ und DHS wurde deutlich verstärkt. Der damit verbundene höhere Shikimat-Pool aktivierte offenbar die Feedback-Inhibierung der Shikimat Dehydrogenase (AroE) und dämpfte das Pulssignal so stark, dass es den Shikimat- und S3P-Pool nicht mehr erreichen konnte. Im Vergleich zu den beiden Experimenten mit *E. coli* 4pF49 und *E. coli* 4pF20 wurde für PEP kein Anstieg mehr nach dem Puls beobachtet, vielmehr fiel PEP nach dem Puls auf ein Drittel der Vorpulskonzentration, was auf einen erhöhten PEP-Verbrauch durch die Aromatenbiosynthese hindeuten könnte.

## 6.8. Analyse des Produktstoffwechsels von *E. coli* 4pF20 und *E. coli* 4pF78 mit statistischen Methoden

Die aus den beiden Pulsexperimenten mit *E. coli* 4pF20 und *E. coli* 4pF78 erhaltenen Daten wurden unter Zuhilfenahme von statistischen Ansätzen untersucht, um aus der Menge der gemessenen Daten einfache essentielle Informationen und biologische Zusammenhänge ableiten zu können. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in seiner "Einfachheit", d.h. es werden keine komplexen strukturierten Stoffwechselmodelle benötigt, um eine Information über das Zusammenspiel der einzelnen Schritte im beobachteten Stoffwechsellausschnitt erhalten zu können. Ihre Anwendung kann dabei als Voruntersuchung der Modellierung verstanden werden, da die Ergebnisse eine Richtung für den Aufbau der strukturierten Stoffwechselmodelle geben könnten, um das Zusammenspiel von Zentralstoffwechsel und Aromatenbiosynthese zu beschreiben<sup>26</sup> [46].

Die statistische Analyse wurde auf die gemessenen Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs und die beiden Vorläufermetaboliten PEP und E4P beschränkt, um Informationen über den Produktstoffwechselweg und seine Versorgung aus dem Zentralstoffwechsel abzuleiten. In diesem Kontext repräsentierte E4P einen problematischen Vorläufermetaboliten, da er in keinem der Experimente intrazellulär nachgewiesen werden konnte. Das steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Williams *et al.* [186], die *in-vivo* gemessene E4P Konzentrationen kritisch diskutiert haben und zu dem Schluss kamen, dass nur sehr geringe Konzentrationen (wenn überhaupt) in der Zelle vorkommen sollten, aufgrund der hohen Neigung von E4P zur Dimerbildung<sup>27</sup> [17, 53, 131].

Auch in neueren Untersuchungen [141] wurde kein E4P in Zellextrakten detektiert (LOD  $\simeq 0,1 \mu\text{M}$ ). Unter dem besonderen Gesichtspunkt, dass die hier verwendeten *E. coli* Stämme 4pF20 und 4pF78 ein durch Überexpression verstärktes AroF<sup>fbr</sup> tragen, war das Auftreten einer signifikanten Konzentration von E4P noch weniger zu erwarten. Aus diesem Grund wurde der kombinierte Pool der Pentose-5-phosphate (P5P) anstelle des E4P als Referenz gewählt, da über die Transketolasereaktion zumindest eine Abschätzung bzw. Spekulation über die E4P Bereitstellung realisiert werden konnte.

In den folgenden Betrachtungen wurde außerdem von einem gemeinsamen Pool von DAH(P) ausgegangen, der sich aus den quantitativen Werten für das dephosphorylierte Derivat, DAH, ableitete. Für den eigentlich aktiven Metaboliten DAHP lagen keine quantitativen Daten vor, da ein Standard zur Quantifizierung nicht verfügbar gewesen war. Die Entscheidung die DAH Daten repräsentativ als DAH(P) Pool zu interpretieren, wurde durch die Tatsache gerechtfertigt, dass das Verhältnis der gemessenen Konzentration von DAH zu der DAHP Peakfläche mit  $3.3 \pm 0.308 \text{ nM/Peakfläche}$  konstant war für die Messungen im Verlauf eines Experimentes.

---

<sup>26</sup>Der Autor möchte Herrn Dr. R. Takors ausdrücklich für die Unterstützung bei der statistischen Interpretation der Daten danken.

<sup>27</sup>E4P kann aufgrund der Stereokonfiguration keine stabile intramolekulare Halbacetalform bilden und stabilisiert sich daher durch eine intermolekulare Wechselwirkung.

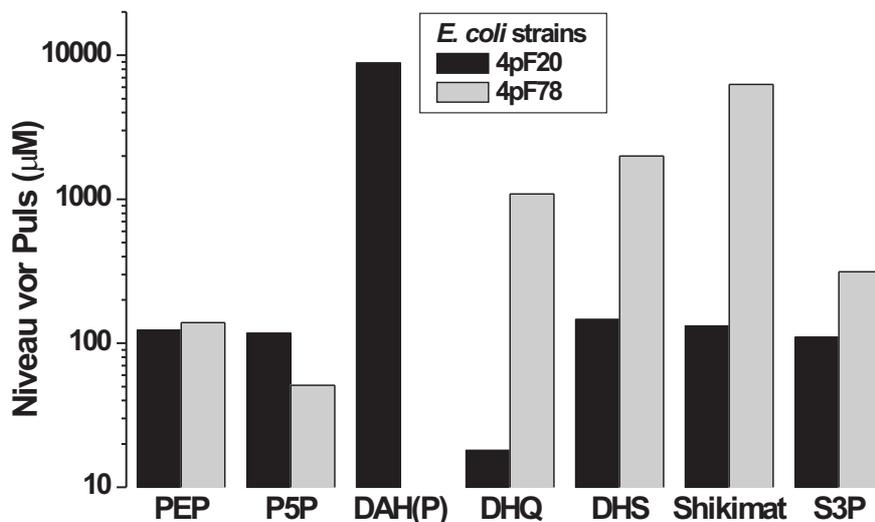


ABBILDUNG 6.55.: Vergleich der intrazellulären Metabolitkonzentrationen während der letzten 2,5 bis 5 Sekunden vor der Glukosepulszugabe in *E. coli* 4pF20 und *E. coli* 4pF78

### 6.8.1. Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF20

Die in Abb. 6.55 (linke Balken) dargestellten intrazellulären Konzentrationen vor dem Puls zeigten physiologische Werte von einigen 100  $\mu\text{M}$ , außer für DAH(P), das mit 10 mM eine sehr große Poolgröße aufwies. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass diese hohe Konzentration durch die Überexpression des Gens *aroF<sup>fbr</sup>* und dem damit verbundenen hohen Fluss in diesen Pool verursacht wurde, der nicht durch einen gleichzeitigen Abfluss aus dem Pool durch die folgende enzymatische Reaktion kompensiert werden konnte. Dadurch unterschieden sich die Pools von DAH(P) und seines folgenden Metaboliten, DHQ, um drei Größenordnungen.

In Abb. 6.56 (linke Spalte) sind die Ergebnisse des Pulsexperimentes mit *E. coli* 4pF20 dargestellt. Vor dem Puls waren die Pools von PEP und P5P im quasi steady-state und zeigten nach dem Puls signifikante Veränderungen in Form eines Anstiegs mit nachfolgendem Schwingungsverhalten. Diese beiden Pools lieferten die Substrate für die DAHP Synthasereaktion. Bezogen auf das PEP konnte festgehalten werden, dass keines der drei Isoenzyme der DAHP Synthase durch die Versorgung mit PEP limitiert sein sollte, da die gemessenen intrazellulären Konzentrationen von  $\sim 70\text{--}140\ \mu\text{M}$  über den in der Literatur beschriebenen  $K_m$  Werten liegen (Tab. 6.13).

Im Fall des E4P, für das keine Poolgröße messbar gewesen war, sollte auf den ersten Blick also eine nahezu vollständige Limitierung der DAHP Synthase Aktivität ( $K_{m,E4P} \sim 35\text{--}900\ \mu\text{M}$ ) vorgelegen haben. In Anbetracht der bereits angesprochenen starken Neigung von E4P zur Dimerbildung musste hier jedoch die Frage diskutiert werden, ob E4P wirklich als freier

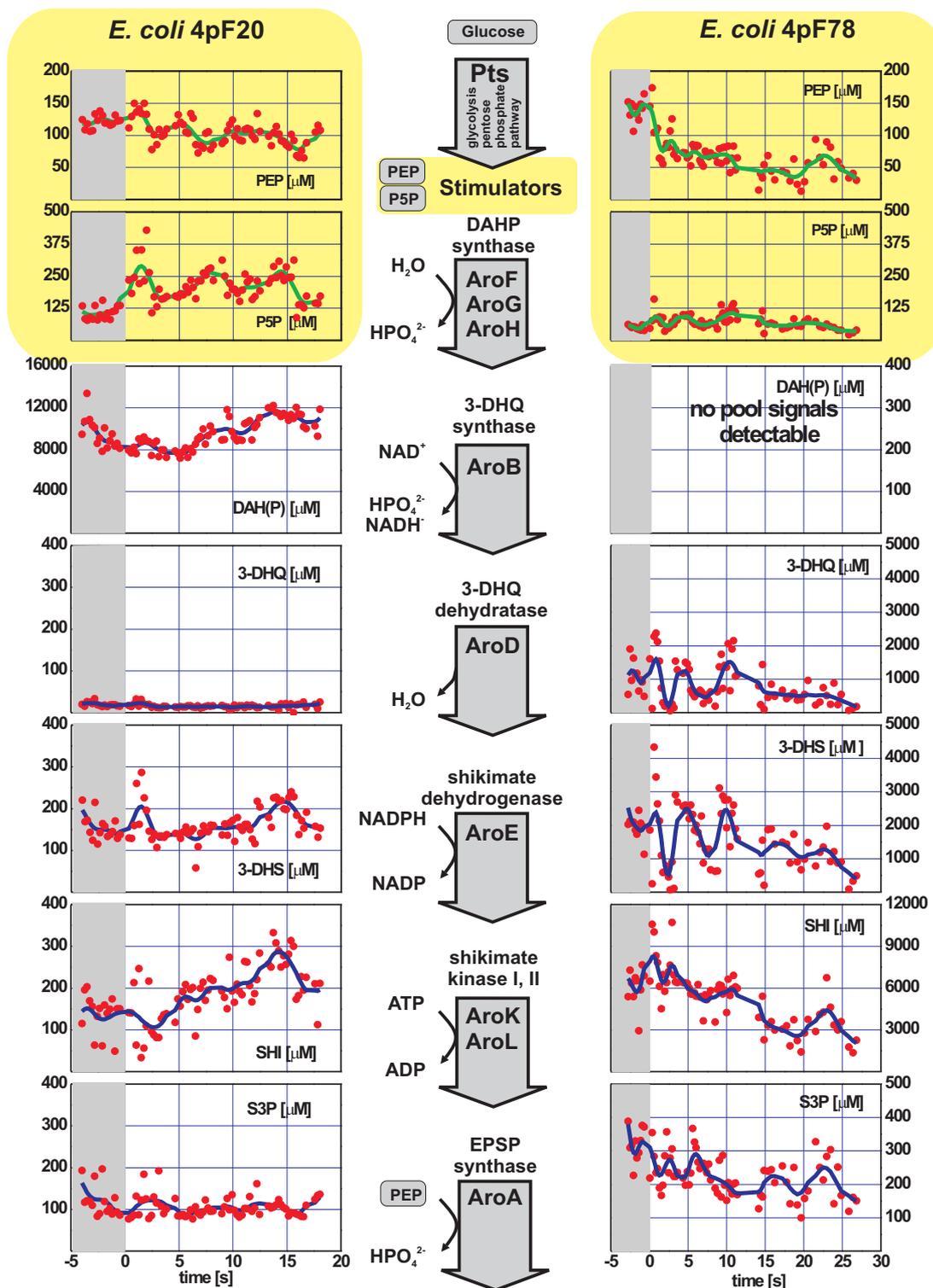


ABBILDUNG 6.56.: Metabolitdynamiken im Aromatenbiosyntheseweg nach dem Glukosepuls, ausgelöst durch die Vorläufermetaboliten PEP und P5P in *E. coli* 4pF20 (links) und *E. coli* 4pF78 (rechts); der Liniengraph repräsentiert die mittels eines FFT-Filters (5 Punkte) geglätteten Daten; in der Mitte der zugehörige Verlauf des Biosynthesewegs

TABELLE 6.13.: Übersicht über Werte aus *in-vitro* Studien von *E. coli* Enzymen;  $K_m$  Werte für Michaelis-Menten und  $S_{0,5}^*$  Werte für sigmoidale Kinetiken dargestellt; für AroE konnten keine Literaturdaten gefunden werden

Enzym	Substrat	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ] $S_{0,5}^*$ [ $\mu\text{M}$ ]	Referenz
AroF (L-Tyr sensitiv)	E4P	80–90	[138, 149]
	PEP	5,8–13	
AroG (L-Phe sensitiv)	E4P	$\sim 80$ ; 900	[151, 152]
	PEP	$\sim 5$ ; 80	
AroH (L-Tyr sensitiv)	E4P	35*	[2, 118]
	PEP	5,3*	
AroB	DAHP	4; 30–50	[104, 114, 119, 185]
AroD	DHQ	10–18	[34, 37, 94]
AroE	DHS		nicht bekannt
AroK	Shikimat	5000	[44, 45]
	ATP	160	
AroL	Shikimat	200	
	ATP	160	
AroA	S3P	2,5–3,6	[54, 78, 108]
	PEP	10–20	

Metabolit im Cytoplasma vorlag oder ob die Hypothese eines E4P "channeling" [186] durch die DAHP Synthase nicht eine wahrscheinlichere Alternative darstellte. Aufgrund der in der Literatur verfügbaren Information über die Problematik der *in-vivo* Konzentrationen von E4P, das nach aktuellem Literaturstand bisher nie in biologischen Extrakten gesichert nachgewiesen worden war, wurde der "channeling"-Hypothese daher in dieser Diskussion der Vorzug gegeben.

Aus diesem Grund konnte der Schluss gezogen werden, dass die Signalweiterleitung des Glukosepulses in die Aromatenbiosynthese nicht durch die Versorgung mit PEP oder E4P limitiert gewesen war, sondern durch den folgenden großen Pool von DAH(P) abgepuffert wurde. Offensichtlich war die Aktivität von AroB nicht ausreichend gewesen. Zusätzlich wurde die Aktivität von AroB durch eine signifikante Inhibierung in Gegenwart von 8–12 mM DAH vermutlich noch weiter verringert, da Maitra *et al.* [114] bereits für 5 mM DAH über eine 72%ige Inhibierung von AroB berichteten.

$$v_i = \frac{1}{\bar{c}_i} \frac{dc_i(t)}{dt} \quad (6.1)$$

Aus der reinen Analyse der Konzentrations-Zeit-Verläufe ließ sich allerdings nur ein begrenzter Einblick in die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen gewinnen. Aus diesem Grund wurde die zeitliche Veränderung der Pools (= Geschwindigkeit) berechnet und auf die Konzentration vor dem Puls normiert (Gleichung 6.1). Hohe positive Werte der normierten Poolgeschwindigkeit (NPG) repräsentierten eine schnelle Erhöhung des Pools, wogegen hohe

negative Werte eine rasche Abnahme des Pools anzeigten, wobei immer auf die Poolgröße vor dem Puls normiert wurde.

Entsprechend dieser Definition wurden die NPG aus den Konzentrations–Zeit–Verläufen der Metaboliten für das Experiment mit *E. coli* 4pF20 berechnet (Abb. 6.57, oben). Die stärksten Veränderungen erfährt hier der P5P Pool, der auch nach 18 Sekunden immer noch schwingt, für Shikimat gilt vergleichbares. Insgesamt konnte jedoch kein gemeinsames Verhalten, wie z.B. phasengleiche Oszillationen, in den Pools beobachtet werden, weder vor noch nach dem Puls. Genau wie bei den Konzentrations–Zeit–Verläufen fiel auch bei der Darstellung der NPG die sehr geringe Flexibilität des DAH(P) Pools auf, dessen NPG–Werte nahezu unverändert im Bereich von null lagen.

Aufgrund der offensichtlichen Unterschiede der NPG Verläufe für die einzelnen Metaboliten wurden sie nun entsprechend ihrer Amplitudengröße sortiert, da die Amplitudengröße eine Aussage über die Geschwindigkeit der Poolzu– bzw. abnahme erlaubte. Um potenziell limitierende enzymatische Schritte in der Reaktionssequenz zu identifizieren, wurde das Pool–Effluxkapazitäts–Kriterium (PEK) definiert. Es entspricht dem größten negativen NPG für jeden Metaboliten, d.h. es ist ein Maß für die Geschwindigkeit jedes einzelnen enzymatischen Schritts. Dieser Idee folgend wurden Pools mit einem hohen PEK (d.h. stark negatives NPG) von einem schnellen Enzym umgesetzt, gleichzeitig deuteten Pools mit einem kleinen PEK (d.h. schwach negatives NPG) auf ein langsames (limitierendes) Enzym hin, das als potenzielles Ziel für das *metabolic engineering* identifiziert war. Die Poolgröße der Metaboliten hatte keinen Einfluss auf das PEK, da die NPG bereits mit der Poolgröße normiert worden waren.

Für die Metaboliten DAH(P), DHQ, DHS, Shikimat und S3P wurden PEK Werte von 0.09, 0.42, 0.48, 0.41 und 0.22 [ $s^{-1}$ ] bestimmt (Abb. 6.58). Entsprechend der oben erläuterten Definition des PEK wurde der Metabolitpool mit dem geringsten PEK von dem am stärksten limitierenden Enzym umgesetzt. In diesem Fall hatte DAH(P) mit 0.09 [ $s^{-1}$ ] den geringsten Wert, folglich konnte die 3–Dehydroquinat Synthase (AroB) als vorrangiges Ziel für eine genetische Verbesserung des Stammes identifiziert werden. Dieses Ergebnis, das auf Basis der intrazellulären Metabolitmessungen erhalten wurde, deckt sich vollständig mit den Ergebnissen über limitierende enzymatische Schritte aus der Stammentwicklung der L–Phe Produzenten (Kap. 6.3) und früheren Untersuchungen aus der Literatur, bei denen extrazelluläre Daten verwendet wurden [109, 110, 155, 189].

### 6.8.2. Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF78

Aufgrund der im vorhergehenden Abschnitt erhaltenen Ergebnisse über den limitierenden Charakter von AroB in *E. coli* 4pF20 wurde in *E. coli* 4pF78 zusätzlich *aroB* überexprimiert, um die Limitierung aufzuheben. In Abb. 6.55 (rechte Balken) sind die intrazellulären Konzentrationen vor dem Puls dargestellt. Obwohl die PEP und P5P Werte vergleichbar mit denen von *E. coli* 4pF20 waren, konnte DAH(P) nicht mehr intrazellulär nachgewiesen werden. Offensichtlich war die AroB Limitierung aufgehoben worden. Gleichzeitig wurden aber erhöhte Konzentrationen für die auf DAH(P) folgenden Metaboliten beobachtet, was auf eine weitere Limitierung im späteren Verlauf des Stoffwechselwegs hindeutete. Außerdem wurden auch deutliche Unterschiede in den Konzentrations–Zeit–Verläufen der Metaboliten

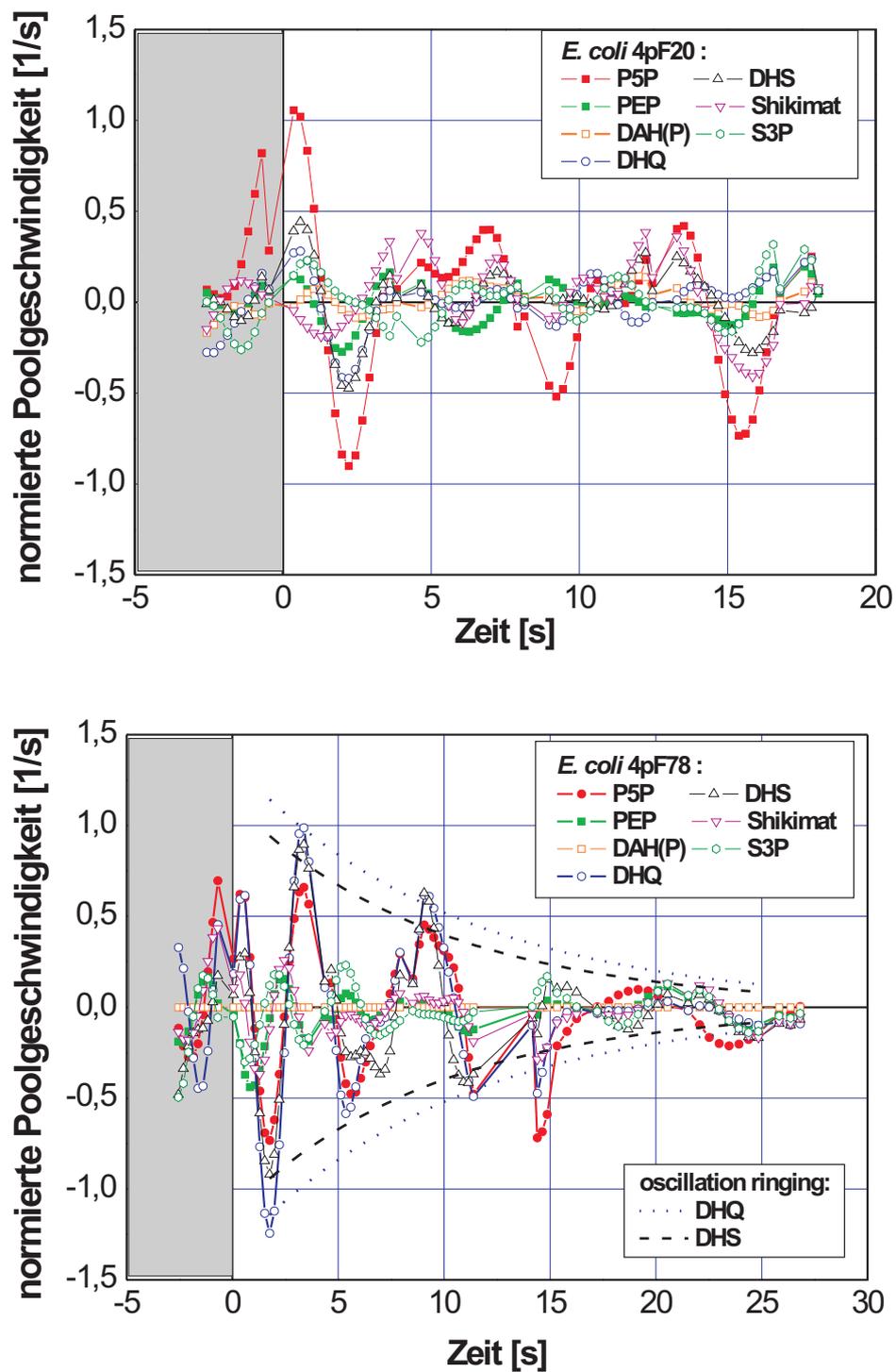


ABBILDUNG 6.57.: Verläufe der berechneten normierten Poolgeschwindigkeiten (NPG) für das Experiment mit *E. coli* 4pF20 (oben) und *E. coli* 4pF78 (unten) vor und nach der Pulszugabe; gestrichelte Linien zeigen die Abnahme der in-Phase Schwingung von DHQ und DHS in *E. coli* 4pF78 an

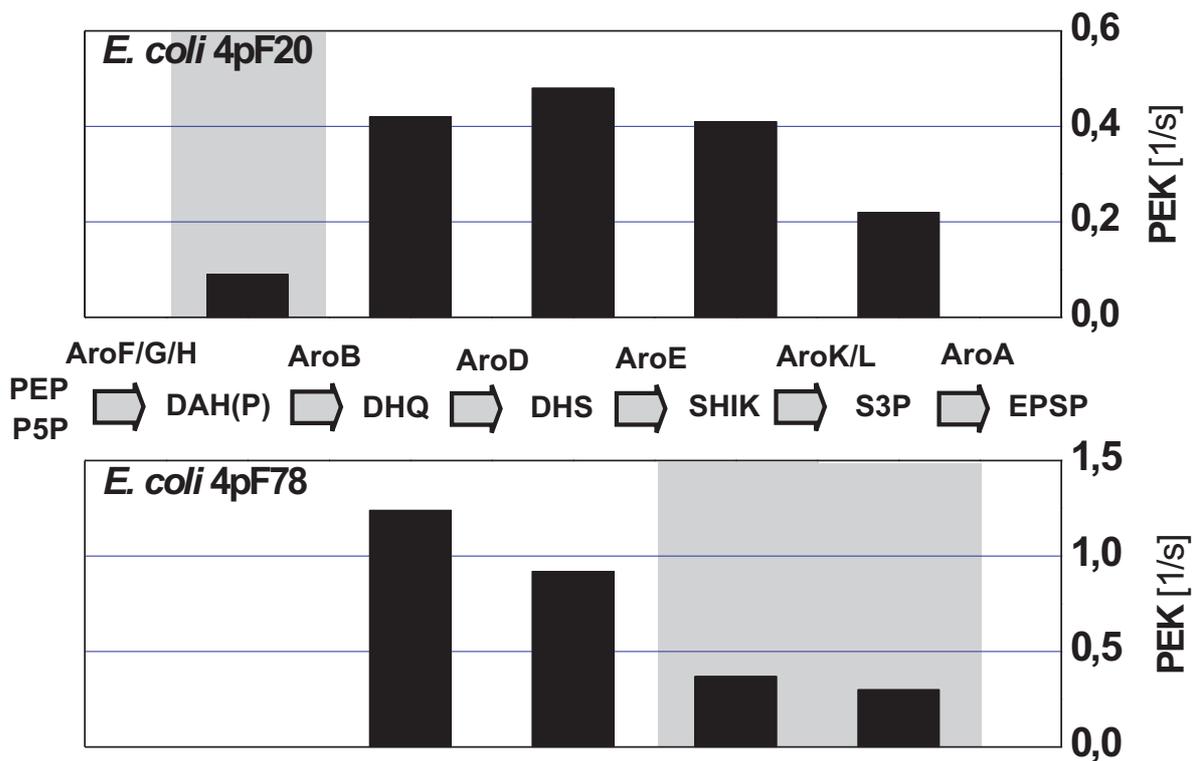


ABBILDUNG 6.58.: Ermitteltes Pool-Effluxkapazitäts-Kriterium (PEK) von *E. coli* 4pF20 und 4pF78 nach der Glukosepulszugabe; in der Mitte der zugehörige Verlauf des Biosynthesewegs mit Metaboliten und Enzymen; grau hinterlegte Metabolitpools indizieren den darauf folgenden limitierenden Reaktionsschritt (Bottleneck)

zwischen den beiden Stämmen beobachtet, die auch die beiden Vorläufermetaboliten PEP und P5P einschließen und was besonders für den abnehmenden PEP Pool zutrif (Abb. 6.56, rechts). Sehr starke Schwingungen wurden für die Pools von DHQ und DHS beobachtet, schwächere für Shikimat und S3P. Für die schnelle Reaktion von DAHP zu DHQ, d.h. dem Fehlen eines messbaren DAH(P) Pools, war vermutlich die Kombination aus der erhöhten AroB Konzentration und dem Fehlen des Inhibitors DAH verantwortlich. Es bleibt anzumerken, dass der erste dynamische Sprung der DHQ und DHS Pools von dem für die Glättung gewählten FFT-Filter nicht vollständig abgedeckt werden konnte.

Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen wurden erneut die normierten Poolgeschwindigkeiten (NPG) ermittelt, die in Abb. 6.57 (unten) dargestellt sind. Im Gegensatz zu den Daten von *E. coli* 4pF20 zeichneten sich die NPG Daten von 4pF78 durch signifikante phasengleiche, gedämpfte Schwingungen in den Metaboliten aus. Aufgrund des fehlenden DAH(P) Puffers wurde die Anregung aus den Vorläufermetaboliten direkt in die folgenden Pools von DHQ und DHS geleitet, die im gesamten weiteren Verlauf phasengleich schwangen. Diese Schwingungen schienen auch mit P5P phasengleich zu sein, wogegen P5P und PEP jedoch genau gegenläufig zu schwingen schienen. Für S3P konnte aus den Daten ein starke Ähnlichkeit mit dem Schwingungsverhalten von PEP abgeleitet werden, die möglicherweise mit der darauf folgenden stöchiometrischen Umsetzung von S3P und PEP zu EPSP durch die EPSP Synthase in Verbindung gebracht werden kann.

**Oszillationsanalyse** Das ausgeprägte Schwingungsverhalten der NPG-Daten von DHQ und DHS wurde im zeitlichen Verlauf gedämpft, und nach etwa 15 Sekunden nach dem Puls war nahezu keine Schwingung mehr zu erkennen. Mit einem Standardansatz zur Beschreibung von gedämpften Schwingungen (Gleichung 6.2), konnten die abnehmenden Amplituden von DHQ und DHS mit Regressionskoeffizienten von  $R_{DHQ}^2 = 0.91$  und  $R_{DHS}^2 = 0.89$  angepasst werden. Für DHQ wurden die Parameter mit  $u_{0DHQ} = 1.353 \pm 0.149s^{-1}$ ,  $\delta_{DHQ} = 0.096 \pm 0.019s^{-1}$  und für DHS mit  $u_{0DHS} = 1.133 \pm 0.138s^{-1}$ ,  $\delta_{DHS} = 0.105 \pm 0.019s^{-1}$  bestimmt, was einer Dämpfung von 38 % zwischen zwei aufeinander folgenden Amplituden entsprach. Damit wurde zwar ein Eindruck über die starke Dämpfung der anfänglich in der Reaktionssequenz initiierten Schwingung erhalten, ohne jedoch eine Erklärung dafür bereitzustellen. Für Shikimat und S3P wurde kein gleichwertiges Schwingungsverhalten beobachtet, was den Schluss zulassen konnte, dass diese beiden von einer anderen Stimulationsquelle angeregt worden waren als die Metaboliten DHQ und DHS.

$$u_{max}(t) = u_0 \exp(-\delta t) \quad (6.2)$$

**Korrelationsanalyse** Mit den NPG Daten von *E. coli* 4pF78 wurde eine Korrelationsanalyse in Bezug auf die Vorläufermetaboliten PEP und P5P durchgeführt, in der alle Daten nach dem Puls berücksichtigt wurden (Abb. 6.59). Das Ergebnis der Analyse zeigte, dass die Abhängigkeit von P5P mit fortschreitender Reaktionssequenz von DHQ über DHS zu Shikimat und S3P abnahm, während gleichzeitig die Abhängigkeit zu PEP zunahm. Der P5P Pool war sehr stark mit DHQ (0.92) und DHS (0.77) korreliert, jedoch mit PEP fast

nicht. Für S3P am Ende der Reaktionsfolge war die Situation ganz anders, da S3P negativ mit P5P ( $-0.60$ ) und positiv mit PEP ( $0.71$ ) korreliert war.

In Abb. 6.57 (unten) war eine starke positive Korrelation zwischen den Verläufen von DHQ und DHS ( $0.91$ ) festzustellen und ließ darauf schließen, dass die durch AroD katalysierte Dehydratisierung von DHQ zu DHS sehr schnell verlief. Das passte zu dem kleinen, *in-vitro* gemessenen  $K_m$ -Wert für DHQ ( $10\text{--}18\ \mu\text{M}$ , Tab. 6.13), der weit unterhalb des gemessenen intrazellulären DHQ Niveaus lag. Daher sollte eine konstante DHS Bildungsrate vorgelegen haben, woraus eine variable Reaktionsrate der Shikimat-Dehydrogenase (AroE) abgeleitet werden musste, um die beobachteten Schwingungen der DHS Konzentration zu erklären. Als Konsequenz könnten daraus hohe  $K_m$  Werte von DHS und NADPH für AroE angenommen werden.

Die Korrelationsanalyse bestätigte damit den bereits aus Abb. 6.57 gewonnenen qualitativen Eindruck, dass DHQ und DHS sehr stark mit dem Vorläufermetabolit P5P korreliert waren, während S3P (und auch Shikimat) eine höhere Korrelation mit der PEP Versorgung zeigten. Die hohe Abhängigkeit von S3P zu PEP konnte dabei durch die nachfolgende, als reversibel beschriebene EPSP Synthesereaktion [106, 107] erklärt werden, die PEP und S3P als Substrat benötigte. Entsprechend der *in-vitro* bestimmten  $K_m$ -Werte von  $10\text{--}20\ \mu\text{M}$  für PEP und  $2,5\text{--}3,6\ \mu\text{M}$  für S3P (Tab. 6.13) könnten die abnehmenden PEP Konzentrationen die *in-vivo* Aktivität der EPSP Synthase behindert haben.

Aufgrund der Überexpression der 3-Dehydroquinsynthese (*aroB*) und dem damit verbundenen Fehlen des DAHP Pools, sollten die Korrelationseigenschaften von DHQ somit die Eigenschaften der DAHP Synthase Reaktion abbilden können. Das warf natürlich die Frage auf, warum DHQ zwar sehr stark mit P5P, aber kaum mit PEP korreliert war und welche Rückschlüsse sich daraus auf die DAHP Synthesereaktion ziehen lassen konnten, da auch sie PEP als Substrat benötigte und mit DAHP das Substrat für die DHQ Versorgung bereitstellte.

In *E. coli* Wildtyp Zellen wird nahezu 80 % der DAHP Synthase Aktivität durch die L-Phe sensitive DAHP Synthase (AroG) und ein kleinerer Teil durch die L-Tyr sensitive DAHP Synthase (AroF) abgedeckt, während die L-Trp sensitive DAHP Synthase (AroH) nur eine untergeordnete Rolle spielt [135]. Der hier betrachtete Stamm *E. coli* 4pF78 exprimiert plasmidcodiertes *aroF<sup>fbr</sup>*, so dass davon ausgegangen werden kann, dass AroF<sup>fbr</sup> und AroG die Hauptlast der DAHP Synthaseaktivität trugen. Anhand von *in-vitro* Experimenten wurden die PEP Affinitäten von AroF ( $K_m \sim 13\ \mu\text{M}$ ) und AroG ( $K_m \sim 5\text{--}80\ \mu\text{M}$ ) bestimmt (Tab. 6.13). Unter der Voraussetzung dass die AroF<sup>fbr</sup> Variante ähnliche PEP Affinitäten aufwies wie AroF [89], bedeutet das, dass in der ersten Phase des Experimentes eine PEP Limitierung der DAHP Synthaseaktivität nicht aufgetreten sein musste, da die PEP Konzentration noch hoch genug war und daher nur eine schwache Korrelation mit PEP am Anfang resultierte. Im späteren Verlauf, bei gefallenem PEP Werten, könnte eine solche Limitierung und eine damit verbundene höhere PEP Korrelation durchaus aufgetreten sein.

In Abb. 6.57 (unten) konnte bei ca. 17 s für alle Metaboliten ein Schnittpunkt mit der X-Achse (Nulldurchgang) beobachtet werden, der den Start einer gemeinsamen Oszillation aller Metaboliten darstellte. Zu diesem Zeitpunkt war die PEP Konzentration bereits

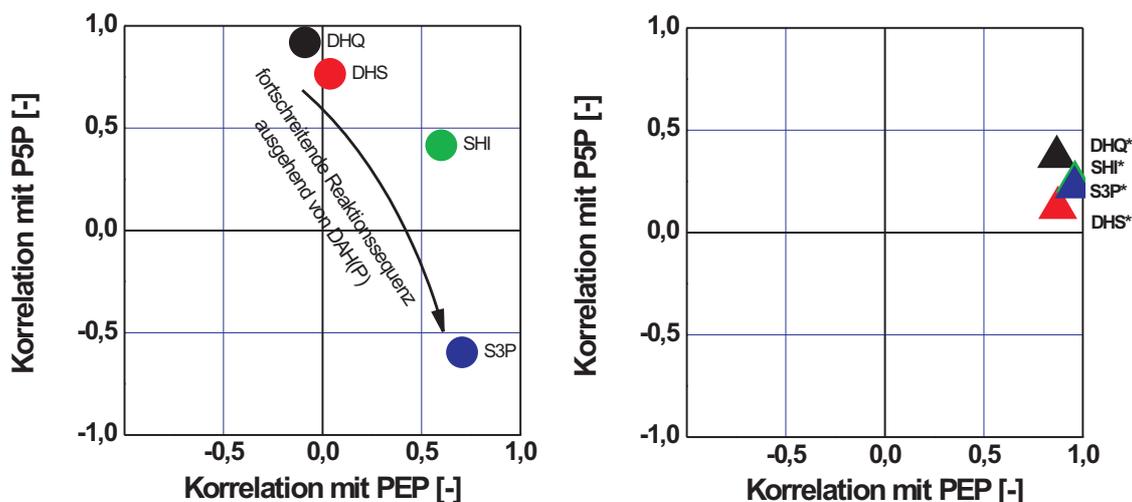


ABBILDUNG 6.59.: Korrelationsanalyse der Metaboliten der Aromatenbiosynthese DHQ, DHS, Shikimat und S3P mit den anregenden Vorläufermetaboliten PEP und P5P im Pulsexperiment mit *E. coli* 4pF78. Die kreisförmigen Symbole zeigen die Ergebnisse basierend auf den vollständigen Daten nach dem Puls (links), die dreieckigen und mit einem Stern gekennzeichneten Symbole berücksichtigen nur Datenpunkte später als 17.5 Sekunden (rechts).

auf 35  $\mu\text{M}$  gefallen. Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine weitere Korrelationsanalyse durchgeführt, bei der nun jedoch nur die Daten ab diesem Nulldurchgang bei ca. 17 s verwendet wurden. Diese Datenpunkte sind als dreieckige Symbole in Abb. 6.59 eingetragen. Die Metaboliten zeigten eine hohe Korrelation mit PEP (DHQ (0.87), DHS (0.87), Shikimat(0.96), S3P (0.96)) und nur eine geringe mit P5P (bis zu 0.37 für DHQ). Darüber hinaus waren alle Intermediate nun sehr stark miteinander korreliert, was anhand von Korrelationswerten von nicht kleiner als 0.74 deutlich wurde. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass die DAHP Synthaseaktivität (d.h. AroF<sup>br</sup>, AroG und zu geringem Teil AroH) in diesem Abschnitt offensichtlich PEP limitiert war. Das drückt sich in der Verlagerung der Abhängigkeit von P5P zu PEP bei den Metaboliten DHQ und DHS aus, die nun zusammen mit Shikimat in-Phase schwingen (Abb.6.57, unten).

Das Resultat, das die PEP Versorgung eine dominante Rolle bei den Schwingungen der Poolgeschwindigkeiten in der Aromatenbiosynthese spielte, kann als Hinweis für eine weitere Optimierung der L-Phe Produktionsstämme verstanden werden. Bereits in anderen Studien ist das Problem der angepassten und verbesserten Versorgung mit PEP und E4P diskutiert worden [15, 52, 65, 110, 132, 133, 189]. Von Karutz [90] wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Transketolase (*tktA*) in Kombination mit der PEP Synthase (*pps*) oder der Implementierung eines alternativen nicht PTS basierten Glukoseaufnahmesystems zu einer verbesserten Versorgung mit den beiden Vorläufermetaboliten führen konnte. Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse, die erstmalig auf der Messung intrazellulärer

Metabolitkonzentrationen in einem L-Phe Produktionsstamm basierten, ist der PEP Verfügbarkeit eine höhere Priorität zu zuordnen gewesen als der durch den P5P Pool repräsentierten E4P Versorgung.

Neben der optimierten Versorgung der Aromatenbiosynthese mit PEP und E4P ist natürlich auch die ungehinderte und nicht limitierte Reaktion durch den Aromatenbiosyntheseweg von Bedeutung. Daher wurde auch für *E. coli* 4pF78 das bereits eingeführte Pool-Effluxkapazitätskriterium (PEK) bestimmt, um potenzielle Limitierungen im Stoffwechselweg aufzuzeigen. Wie bereits erläutert wurden Pools mit einem hohen PEK von einem schnellen Enzym umgesetzt, gleichzeitig deuteten Pools mit einem kleinen PEK auf ein langsames (limitierendes) Enzym hin, das als potenzielles Ziel für das *metabolic engineering* identifiziert war. Für die Metaboliten wurden die PEK Werte mit 1.24 (DHQ), 0.92 (DHS), 0.37 (Shikimat) und 0.3 für S3P bestimmt (Abb. 6.58, unten). Für DAHP konnte natürlich kein PEK mehr bestimmt werden, da die DAHP Konzentration aufgrund der Überexpression von *aroB* von der Analytik nicht mehr erfasst werden konnte. Aufgrund der PEK Werte schieden AroB, AroD und AroE als limitierende Faktoren aus. Im direkten Vergleich mit dem Stamm 4pF20 wurde hier die Auswirkung der Überexpression von *aroB* im Stamm 4pF78 deutlich, da der Status von AroB von limitierend auf nicht limitierend gewechselt hatte.

Die geringsten PEK-Werte wurden für Shikimat und S3P beobachtet, wodurch die Shikimat Kinasen (AroK/L) und die EPSP Synthase (AroA) als Ziele für eine Optimierung erkannt wurden (Abb. 6.58, unten). Das ist in Übereinstimmung mit den Resultaten aus der L-Phe Stamm- und Prozessentwicklung (Kap. 6.3.6). Im Fall der Shikimat Kinasen sollte AroL aufgrund seiner höheren Shikimat Affinität bevorzugt werden (Tab. 6.13).

Die Identifizierung dieser Ziele ist weiterhin in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen von Dell *et al.* [49] und Snell *et al.* [155]. Die Anwendung des PEK zur Identifizierung potenziell limitierender Schritte konnte sogar die fälschliche Identifikation von AroE als potenzielles Ziel vermeiden. Das auf intrazellulär gemessenen Daten basierende PEK zeichnete sich daher durch eine verbesserte Prediktion der limitierenden Schritte im Aromatenbiosyntheseweg aus, im Vergleich zu den Untersuchungen in denen nur extrazelluläre Daten verfügbar waren [49, 155]. Obwohl das PEK seine Prediktionsfähigkeit für das Modellsystem der Aromatenbiosynthese gezeigt hat, sollte seine Anwendung auf lineare Stoffwechselsysteme beschränkt bleiben. Außerdem wird seine Anwendbarkeit dadurch geschmälert, dass weitere übergeordnete Effekte wie z.B. Substratlimitierungen bei bimolekularen Enzymkinetiken nur unzureichend oder gar nicht berücksichtigt werden.



## 7. Zusammenfassung

Am Beispiel der Aromatenbiosynthese in *E. coli* wurde das Prinzip des *metabolic profiling* erstmalig auf einen anabolen Stoffwechselweg in rekombinanten Produktionsstämmen (L-Phe Produzenten) angewendet.

Dazu wurde die Technik der Glukosepulseexperimente mit schneller Probenahme unter Verwendung von rekombinanten *E. coli* L-Phe Produzenten durchgeführt und das dynamische Signal der intrazellulären Metabolitkonzentrationen im Verlauf des Pulsexperimentes mittels einer neu entwickelten LC-MS Technik verfolgt. Die Pulsexperimente wurden im Fed-Batch Verfahren unter produktionsrelevanten Bedingungen durchgeführt, so dass die Ergebnisse Rückschlüsse auf den Produktionsprozess zulassen konnten. Die Stimulation des Stoffwechsels durch den Glukosepuls konnte dabei nicht nur im katabolen Stoffwechsel (Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg), sondern auch in Metaboliten der Aromatenbiosynthese auf dem Weg zum L-Phe nachgewiesen werden. Die bisher auf den Zentralstoffwechsel in Wildtyporganismen beschränkte Methodik der Glukosepulseexperimente konnte erstmals auch zur Beobachtung der Metabolit-Dynamiken in einem anabolen Stoffwechselweg eines rekombinanten *E. coli* Produzenten angewendet werden.

- Es wurde eine quantitative  $^1\text{H}$ -NMR Methode etabliert, um die Metaboliten der L-Phe Biosynthese in Fermentationsproben nachzuweisen. Die Methode erlaubte quantitative Metabolitmessungen, auch wenn kein Standard verfügbar war. Die in der Literatur zugänglichen  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der Metaboliten erlaubten die qualitative Identifizierung der Metaboliten, die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines internen Standards. Da nicht alle 11 Metaboliten der Aromatenbiosynthese (von den ersten 7 Metaboliten sogar nur einer) kommerziell verfügbar waren, zeichnete sich diese Methode hier besonders aus, obwohl sie mit einer Nachweisgrenze von etwa 5 mM keine hohe Sensitivität besaß, und somit nur Nebenprodukte in höherer Konzentration nachgewiesen werden konnten.
- Die nicht kommerziell verfügbaren Metaboliten DAH, DAHP, DHQ, DHS und S3P wurden als Referenzmaterial für die Entwicklung einer intrazellulären Analytik isoliert. Insbesondere für die Entwicklung einer Triple Quadrupol LC-MS basierten Methode musste ein Standard verfügbar sein, da sonst die substanzspezifischen MS/MS Fragmentierungsparameter nicht bestimmt werden konnten. Zur Synthese der benötigten analytischen Standards wurden hauptsächlich genetisch geblockte *E. coli* Mutanten eingesetzt und die Metaboliten aus dem Fermentationsüberstand isoliert.
- Unter Verwendung der  $^1\text{H}$ -NMR Methode konnten die 3-Dehydroquinat Synthase (AroB), die Shikimat Dehydrogenase (AroE) und die Shikimat Kinase II (AroL) als limitierende Schritte für die L-Phe Biosynthese in *E. coli* L-Phe Produzenten identifiziert werden. Durch die Quantifizierung dieser Nebenprodukte konnten die Metabolitbilanzen (Kohlenstoffbilanz) für die L-Phe Produzenten geschlossen werden, und durch

Überexpression der Gene *aroB* und *aroL* wurde ein leistungsfähigerer L-Phe Produzent konstruiert. In diesem L-Phenylalanin Produktionsstamm wurde daraufhin Shikimat-3-phosphat (S3P) als Nebenprodukt identifiziert, was auf eine neue Limitierung im späteren Verlauf des Stoffwechselwegs hindeutete. Als mögliche Ursache für diese Limitierung wurden die EPSP Synthase (*AroA*) oder die Chorismat Synthase (*AroC*) diskutiert.

- In den Fermentationsproben der L-Phe Produzenten konnten Uracil und Orotsäure in Konzentrationen von 0,2 bis 1,0 g/L ( $\sim 1 - 6$  mM) als Nebenprodukte identifiziert werden. Durch die Bestimmung der Molekularmasse der bisher unbekannt Metabolitpeaks mit der Ionenfallen LC-MS und einer anschließenden Abfrage der ECOCYC Metabolitdatenbank konnten diese beiden Metaboliten positiv in den Fermentationsproben identifiziert werden. Sie wurden aufgrund einer Mutation im *PyrF*-Gen als Nebenprodukte in verschiedenen *E. coli* Stammfamilien diskutiert.
- Es wurde eine Triple Quadrupol LC-MS Methode für die Messung von 17 Metaboliten des Zentralstoffwechsels und 10 Metaboliten der Aromatenbiosynthese etabliert. Im Vergleich zur bisher verwendeten Ionenfallen LC-MS zeichnete sich das Gerät durch eine höhere Robustheit (6–7 % sd bei 111 Proben in 5 Tagen) und größere Empfindlichkeit aus. Die höhere Robustheit war maßgeblich auf die Verwendung einer orthogonalen Anordnung in der Elektrospray-Ionisationsquelle zurückzuführen, die auch einen Beitrag für die Empfindlichkeitsverbesserung leistete. Mit dieser Methode konnten intrazelluläre Konzentrationen im Bereich weniger  $\mu\text{M}$  quantifiziert werden.
- Stabilitätsuntersuchungen der Metaboliten belegten, dass alle untersuchten Metaboliten während der Zellextraktionsprozedur mit Perchlorsäure und nachfolgender Neutralisation stabil waren. Die Wiederfindung lag im Bereich von 95–105 %. Bei Untersuchungen zur Zellintegrität während des Methanol-Quenching-Verfahrens wurde eine Zellwiederfindung von 98–106 % gemessen, woraus der Schluss gezogen wurde, dass es nicht zur Zerstörung der *E. coli* Zellen durch das Verfahren kam. In Bezug auf ein mögliches Auslaufen von Metaboliten aus den Zellen in die methanolische Quenchinglösung, konnte dieses Verhalten für die Referenzmetaboliten AMP und PEP nicht beobachtet werden. Mehr als 95 % der Gesamtmetabolitmenge wurde im Zellextrakt gemessen.
- Für die Untersuchung von rekombinanten L-Phe Produktionsstämmen wurde das Glukosepulsexperiment reproduzierbar in ein Fed-Batch Verfahren integriert. Aus den gemessenen Produktbildungsraten verschiedener im Aromatenbiosyntheseweg geblockter *E. coli* Mutanten wurde abgeleitet, dass das Glukosepulssignal im Verlauf durch den Biosyntheseweg abgeschwächt wurde. Je näher sich der Metabolit am Beginn der Aromatenbiosynthese befand, d.h. je näher seine Position zum Zentralstoffwechsel war, um so stärker war das Pulssignal zu beobachten.
- Es wurden drei L-Phe Produktionsstämme in Glukosepulsexperimenten mit schneller Probenahme untersucht und die intrazellulären Metabolit-Dynamiken des Zentralstoffwechsels und der Aromatenbiosynthese gemessen. In allen drei Stämmen wurde das Glukosepulssignal in Metaboliten des Zentralstoffwechsels und im Aromatenbiosyntheseweg detektiert. In den intrazellulären Daten von *E. coli* 4pF20 konnte die Limitierung der Aromatenbiosynthese durch die 3-Dehydroquinat-Synthase (*AroB*) aufgezeigt werden. Der um drei Größenordnungen höhere Pool von DAHP und DAH

---

(10 mM) im Vergleich zum 3-Dehydroquinat-Pool (20  $\mu$ M) deutete auf eine unzureichende enzymatische Umsetzung hin. Nach Überexpression von *aroB* im Stamm *E. coli* 4pF78 wurde kein Pool für DAH und DAHP mehr detektiert, woraus der Schluss gezogen wurde, dass die Limitierung durch AroB nicht mehr gegeben war. Als Folge davon konnte ein drastisch erhöhtes Pulssignal in den nachfolgenden Pools von DHQ und DHS gemessen werden.

- Durch die Berechnung von relativen Poolgeschwindigkeiten der intrazellulären Metaboliten des Aromatenbiosynthesewegs und der Definition des Pool-Efflux-Kapazitätskriteriums (PEK) gelang die korrekte Identifizierung der limitierenden enzymatischen Schritte (AroB, AroL) im Aromatenbiosyntheseweg. Das PEK war den auf extrazellulären Daten basierenden Analysen sogar überlegen, da es das AroE Enzym richtigerweise als nicht limitierend zuordnete.
- Auf der Grundlage der berechneten relativen Poolgeschwindigkeiten der intrazellulären Daten wurde mit einer Korrelationsanalyse die Abhängigkeit der Aromatenbiosynthese von den beiden Vorläufermetaboliten PEP und E4P (repräsentiert durch P5P) ermittelt. Für PEP (ca. 0.8) wurde eine hohe und für P5P (ca. 0.2) lediglich eine niedrigere Korrelation bestimmt. Mit Bezug auf die Entwicklung von L-Phe Produktionsstämmen mit optimierter Versorgung der Aromatenbiosynthese mit PEP und E4P, sollte der PEP Verfügbarkeit eine höhere Priorität zugeordnet werden, als der durch P5P repräsentierten E4P Versorgung.



## 8. Ausblick

- Basierend auf den gemessenen intrazellulären Konzentrationen, könnte die Aufstellung von strukturierten mathematischen Modellen zu einem besseren Verständnis des Aromatenbiosynthesewegs führen. Aus dem Modell könnten dann detailliertere Aussagen über den limitierenden Charakter einzelner enzymatischer Schritte abgeleitet werden, deren Aussagekraft über die hier dargestellte einfache statistische Auswertung hinausginge.
- Am Beispiel der Aromatenbiosynthese konnte die Glukosepulstechnik zur intrazellulären Untersuchung in einem anabolen Stoffwechselweg eingesetzt werden. Der Einsatz dieser Technik muss aber nicht auf die Aromatenbiosynthese beschränkt bleiben, vielmehr bietet sich die Möglichkeit weitere anabole Biosynthesewege zu untersuchen, die auch zu industriell interessanten Produkten führen. Hier wären sowohl Aminosäuren wie L-Lysin, L-Threonin, L-Leucin, L-Isoleucin oder L-Valin interessant, aber auch Biosynthesewege, die zu Vitaminen oder anderen Feinchemikalien führen.

Biosyntheserouten in denen Pyruvat als Vorläufermetabolit involviert ist (z.B. L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin), wären hier von besonderem Interesse, da über das PTS System nach dem Glukosepuls eine erhöhte Bereitstellung von Pyruvat zu erwarten ist, und daher ein positives Pulssignal in diesen Biosynthesewegen initiiert werden sollte.

- Die Entwicklung neuer Methoden zur Messung weiterer intrazellulärer Metaboliten bzw. die Weiterentwicklung bestehender Methoden der Triple Quadrupol LC-MS ist ein fortlaufender Prozess und wird daher nie abgeschlossen werden können. Die Vielzahl der verschiedenen Metaboliten, das hohe Probenaufkommen aus Pulsexperimenten und die Einschränkung der chromatographischen HPLC Bedingungen durch die Kopplung mit der Massenspektrometrie sind dabei vorrangige Probleme, die in zukünftigen Arbeiten untersucht werden müssen. Vor allem die Einschränkung der chromatographischen Freiheitsgrade führt zu Schwierigkeiten bei der Abtrennung der Matrixanteile in den Zellextraktproben.

Die fortwährende Suche nach neuen LC-MS kompatiblen stationären Phasen mit verbesserten Eigenschaften für die Analytik sehr polarer Metaboliten muss daher fortgeführt werden. Die Verwendung sog. HILIC-Phasen (Hydrophilic-Interaction-Liquid-Chromatography) könnte hier einen Beitrag zur Verbesserung der Chromatographie leisten, da die Wechselwirkung mit einer stark polaren stationären Phase die Retention der polaren intrazellulären Metaboliten verbessern könnte.

- Die Miniaturisierung der HPLC Methode, d.h. die Verwendung von HPLC Säulen mit kleinerem Innendurchmesser (ca. 1–2 mm) führt zu einer Verringerung des Volumenflusses zum MS und könnte damit zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit bei Elektrospray-Ionisation (ESI) führen. Besonders bei Matrix belasteten Proben steigt damit jedoch gleichzeitig die Gefahr von Verblockungen bzw. Verstopfungen im Sys-

tem aufgrund der geringen Volumenflüsse. Daher sollten die Gründe für und gegen eine Miniaturisierung sorgfältig erwogen werden.

- Der Aspekt der Probenvorbereitung ist bisher in den Arbeiten noch nicht aufgegriffen worden. Durch den Einsatz einer Festphasenextraktion (SPE = solid phase extraction) könnten zwei positive Aspekte kombiniert werden. Zum einen könnten damit Proben mit weniger Matrixbelastung erhalten werden, zum anderen bestände die Möglichkeit, die Proben im Verlauf der SPE zu konzentrieren. Problematisch ist aber auch hier wieder die hohe chemische Diversität der zu untersuchenden Analyten und damit die Auswahl der geeigneten stationären Phase und die Wahl der Bedingungen der Festphasenextraktion.

# A. Fermentationsmedien

## A.1. Luria-Bertani Medium (LB)

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Trypton (Pepton aus Casein)	10
Hefeextrakt	10
NaCl	5
Agar-Agar	15
Ampicillin	0,1

Die Substanzen wurden in Wasser gelöst und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Für die Herstellung von festen Kulturmedien in Petrischalen wurde Agar-Agar zugesetzt. Für die Kultivierung rekombinanter Stämme mit Ampicillin-Resistenz auf dem Plasmid wurde nach dem Abkühlen zusätzlich Ampicillin steril zugesetzt.

## A.2. Spurenelementlösung

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10,0
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10,0
AlCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	2,5
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2,5
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,75
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,5
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,125

Die Substanzen wurden in 5 M Salzsäure gelöst und die autosterile Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

**A.3. Vorkulturmedium Nr. I**

Komponente	Stammlösung [g L <sup>-1</sup> ]	Fermentation [g L <sup>-1</sup> ]	Zugabe Stammlösung pro L Medium [mL]
Wasser, H <sub>2</sub> O			913,5
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	300	0,3	1
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	15	0,015	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	3	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	600	12	20
NaCl	100	0,1	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250	5	20
Spurenelement-Lsg.			1,5
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O / Na <sub>3</sub> Zitrat · 2 H <sub>2</sub> O	7,5 / 100	0,075 / 1	10
Vitamin B1 (Thiamin · HCl)	7,5	0,0075	1
Glukose	500	5	10
L-Tyrosin		0,08	Einwaage 0,08 g
Ampicillin	100	0,1	1

Bis auf die stark saure Spurenelementlösung wurden die Stammlösungen nacheinander in das vorgelegte Wasser zugesetzt. Anschließend wurde die Spurenelementlösung und das L-Tyrosin zugegeben. Zur Lösung aller Bestandteile wurde das Medium für 2 h gerührt, der gepufferte pH-Wert des Mediums betrug 7,2. Das Medium wurde in eine autoklavierte Vorratsflasche steril filtriert und bei Bedarf entnommen.

**A.4. Vorkulturmedium Nr. II**

Komponente	Stammlösung [g L <sup>-1</sup> ]	Fermentation [g L <sup>-1</sup> ]	Zugabe Stammlösung pro L Medium [mL]
Wasser, H <sub>2</sub> O			913,5
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	300	0,3	1
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	15	0,015	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	3	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	600	12	20
NaCl	100	0,1	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250	5	20
Spurenelement-Lsg.			1,5
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O / Na <sub>3</sub> Zitrat · 2 H <sub>2</sub> O	7,5 / 100	0,075 / 1	10
Vitamin B1 (Thiamin · HCl)	7,5	0,0075	1
Glukose	500	5	10
L-Tyrosin		0,08	Einwaage 0,08 g
L-Phenylalanin		0,08	Einwaage 0,08 g
L-Tryptophan		0,08	Einwaage 0,08 g
4-Aminobenzoesäure		0,002	Einwaage 0,002 g
2,3-Dihydroxybenzoesäure		0,002	Einwaage 0,002 g
4-Hydroxybenzoesäure		0,002	Einwaage 0,002 g
Ampicillin	100	0,1	1

Bis auf die stark saure Spurenelementlösung wurden die Stammlösungen nacheinander in das vorgelegte Wasser zugesetzt. Anschließend wurden die Spurenelementlösung, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, 4-Aminobenzoesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzoesäure zugegeben. Zur Lösung aller Bestandteile wurde das Medium für 2 h gerührt, der gepufferte pH-Wert des Mediums betrug 7,2. Das Medium wurde in eine autoklavierte Vorratsflasche steril filtriert und bei Bedarf entnommen.

## A.5. Hauptkulturmedium Nr. I

Komponente	Stammlösung [g L <sup>-1</sup> ]	Fermentation [g L <sup>-1</sup> ]	Zugabe Stammlösung pro L Medium [mL]
Wasser, H <sub>2</sub> O			882,5
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	300	3	10
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	15	0,015	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	3	20
NaCl	100	1	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250	5	20
Spurenelement-Lsg.			1,5
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O / Na <sub>3</sub> Zitrat · 2 H <sub>2</sub> O	7,5 / 100	0,1125 / 1,5	15
Vitamin B1 (Thiamin · HCl)	7,5	0,075	10
Glukose	500	15	30
L-Tyrosin		0,3	Einwaage 0,3 g
Ampicillin	100	0,1	1

Alle Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in Wasser gegeben und nach Zugabe des festen L-Tyrosin für mehrere Stunden unter Rühren gelöst. Nach Überführung in den Bioreaktor wurde der pH des Mediums mit der pH-Regelung auf 6,5 eingestellt.

## A.6. Hauptkulturmedium Nr. II

Komponente	Stammlösung [g L <sup>-1</sup> ]	Fermentation [g L <sup>-1</sup> ]	Zugabe Stammlösung pro L Medium [mL]
Wasser, H <sub>2</sub> O			882,5
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	300	3	10
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	15	0,015	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150	3	20
NaCl	100	1	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250	5	20
Spurenelement-Lsg.			1,5
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O / Na <sub>3</sub> Zitrat · 2 H <sub>2</sub> O	7,5 / 100	0,1125 / 1,5	15
Vitamin B1 (Thiamin · HCl)	7,5	0,075	10
Glukose	500	15	30
L-Tyrosin		0,7	Einwaage 0,7 g
L-Phenylalanin		0,7	Einwaage 0,7 g
L-Tryptophan		0,35	Einwaage 0,35 g
4-Aminobenzoesäure		0,01	Einwaage 0,01 g
2,3-Dihydroxybenzoesäure		0,01	Einwaage 0,01 g
4-Hydroxybenzoesäure		0,01	Einwaage 0,01 g
Ampicillin	100	0,1	1

Alle Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in Wasser gegeben. Nach Überführung in den Bioreaktor wurde der pH des Mediums mit der pH-Regelung auf 6,5 eingestellt. Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit der drei aromatischen Aminosäuren wurden sie vollständig im Bioreaktor vorgelegt und zusammen mit ihm autoklaviert. Das Volumen für die anderen Medienbestandteile wurde entsprechend reduziert, so dass ein Gesamtvolumen von 1,35 L im Bioreaktor zu Beginn der Fermentation eingehalten wurde.

## A.7. Zulaufmedien und sonstige Medienbestandteile

### A.7.1. Glukose

Als Glukose-Zulaufmedium wurde eine autoklavierte Lösung mit einer Konzentration von 500 g L<sup>-1</sup> (553 g Glukose · H<sub>2</sub>O + 647 g Wasser) verwendet.

### A.7.2. L-Tyrosin

Als L-Tyrosin-Zulaufmedium wurde eine 5%ige NH<sub>3</sub>-Lösung mit einer Konzentration von 18,75 g L<sup>-1</sup> verwendet. Aufgrund des Gehaltes an Ammoniak ist die Lösung autosteril.

### A.7.3. pH-Korrekturmittel, Antischaummittel, Induktionsmittel

Für die Regelung des pH-Wertes wurde autosterile 25%ige NH<sub>3</sub>-Lösung und als Antischaumreagenz autoklaviertes (121 °C, 20 min) Sigma S289 verwendet. Zur Induktion der Plasmid-Gene wurde eine IPTG-Lösung über einen sterilen Spritzenfilter in den Bioreaktor zugesetzt.

Für die 100  $\mu$ M IPTG-Induktion wurden jeweils 1 mL einer 100 mM IPTG-Lösung je Liter Fermentationsvolumen zugesetzt.

## A.8. Chemikalienverzeichnis

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich, FLUKA und MERCK bezogen, darüber hinaus wurden Enzyme von Roche Diagnostics verwendet.

Weitere Chemikalien/Komponenten	Hersteller
Anionentauscher DE-52	Whatman
3-Trimethylsilyl-2,2,3,3-d-propionsäure (TSP)	Lancaster Synthesis

## A.9. Geräteverzeichnis

Die für die Durchführung der Experimente und analytischen Verfahren verwendeten Geräte sind zusammen mit den Verfahren und Methoden in den Kapiteln 4 und 5 aufgeführt. Geräte die zur allgemeinen Laborausstattung und zur Durchführung von Fermentationsexperimenten und deren Analysen notwendig sind, wurden nicht gesondert aufgeführt.



# Literaturverzeichnis

- [1] ADACHI, O. ; TANASUPAWAT, S. ; YOSHIHARA, N. ; TOYAMA, H. ; MATSUSHITA, K.: 3-Dehydroquinate production by oxidative fermentation and further conversion of 3-dehydroquinate to the intermediates in the shikimate pathway. In: *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67 (2003), Nr. 10, S. 2124–2131
- [2] AKOWSKI, J. P. ; BAUERLE, R.: Steady-state kinetics and inhibitor binding of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (tryptophan sensitive) from *Escherichia coli*. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 50, S. 15817–15822
- [3] ALLEN, J. ; DAVEY, H. M. ; BROADHURST, D. ; HEALD, J. K. ; ROWLAND, J. J. ; OLIVER, S. G. ; KELL, D. B.: High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. In: *Nature Biotechnology* 21 (2003), Nr. 6, S. 692–696
- [4] AMES, B.N.: *Methods in Enzymology*. Bd. VIII Complex Carbohydrates: Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. 1966
- [5] ARPINO, P.J.: On-Line Liquid Chromatography / Mass Spectrometrie? An Odd Couple. In: *Trends Anal. Chem.* 1 (1982), S. 154–158
- [6] ATKINS, P.W.: *Physikalische Chemie*. Weinheim : VCH Verl.Ges, 1990
- [7] ATKINSON, D.E.: *Cellular Energy Metabolism and its Regulation*. New York : Academic Press, 1977
- [8] BACKMAN, K. ; OCONNOR, M. J. ; MARUYA, A. ; RUDD, E. ; MCKAY, D. ; BALAKRISHNAN, R. ; RADJAI, M. ; DIPASQUANTONIO, V. ; SHODA, D. ; HATCH, R. ; VENKATASUBRAMANIAN, K.: Genetic-Engineering of Metabolic Pathways Applied to the Production of Phenylalanine. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 589 (1990), S. 16–24
- [9] BADER, M.: A Systematic-Approach to Standard Addition Methods in Instrumental Analysis. In: *Journal of Chemical Education* 57 (1980), Nr. 10, S. 703–706
- [10] BAILEY, J. E.: Toward a Science of Metabolic Engineering. In: *Science* 252 (1991), Nr. 5013, S. 1668–1675
- [11] BARTLETT, P. A. ; MCQUAID, L. A.: Total Synthesis of (+/-)-Methyl Shikimate and (+/-)-3-Phosphoshikimic Acid. In: *Journal of the American Chemical Society* 106 (1984), Nr. 25, S. 7854–7860

- [12] BARTON, D. H. R. ; LIU, W. S.: A new and concise synthesis of 3-deoxy-D-arabino-2-heptulopyranosonic acid (DAH) and derivatives through the radical chemistry of Barton esters. In: *Tetrahedron Letters* 38 (1997), Nr. 3, S. 367–370
- [13] BEHRENDT, C.: Forschungszentrum Jülich GmbH, Auszubildende zur MaTA, "Programmierung einer Probenahmeverrichtung auf einer Echtzeit-SPS". (2002)
- [14] BERGMAYER, H.: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bd. 6 and 7. 3rd. Weinheim : Verlag Chemie, 1984
- [15] BERRY, A.: Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. In: *Trends in Biotechnology* 14 (1996), Nr. 7, S. 250–256
- [16] BHATTACHARYA, M. ; FUHRMAN, L. ; INGRAM, A. ; NICKERSON, K. W. ; CONWAY, T.: Single-Run Separation and Detection of Multiple Metabolic Intermediates by Anion-Exchange High-Performance Liquid-Chromatography and Application to Cell Pool Extracts Prepared from *Escherichia-Coli*. In: *Analytical Biochemistry* 232 (1995), Nr. 1, S. 98–106
- [17] BLACKMORE, P. F. ; WILLIAMS, J. F. ; MACLEOD, J. K.: Dimerization of Erythrose 4-Phosphate. In: *Febs Letters* 64 (1976), Nr. 1, S. 222–226
- [18] BONGAERTS, J. ; KRAMER, M. ; MULLER, U. ; RAEVEN, L. ; WUBBOLTS, M.: Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. In: *Metabolic Engineering* 3 (2001), Nr. 4, S. 289–300
- [19] BORNEMANN, S. ; THEOCLITOU, M. E. ; BRUNE, M. ; WEBB, M. R. ; THORNELEY, R. N. F. ; ABELL, C.: A secondary beta deuterium kinetic isotope effect in the chorismate synthase reaction. In: *Bioorganic Chemistry* 28 (2000), Nr. 4, S. 191–204
- [20] BRÜCKNER, R.: Persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie 1. (2001)
- [21] BREITMAIER, E.: *Vom NMR Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen : ein kurzes Praktikum der NMR Spektroskopie*. Stuttgart : Teubner Verlag, 1992
- [22] BUCHHOLZ, A. ; HURLEBAUS, J. ; WANDREY, C. ; TAKORS, R.: Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. In: *Biomolecular Engineering* 19 (2002), Nr. 1, S. 5–15
- [23] BUCHHOLZ, A. ; TAKORS, R. ; WANDREY, C.: Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. In: *Analytical Biochemistry* 295 (2001), Nr. 2, S. 129–137
- [24] BUCHHOLZ, A.K.: Reaktionstechnische Untersuchungen zur Dynamik intrazellulärer Metabolite in glycerollimitierten *Escherichia coli* K12, Diplomarbeit Universität Bonn. (1998)
- [25] BUCHHOLZ, A.K.: Quantifizierung intrazellulärer Metabolitdynamiken zur Untersuchung mikrobieller Netzwerke, Dissertation, Universität Bonn. (2002)

- 
- [26] BUDZINSKI, A.: Aminosäuren, Peptide und die Chemie dazu. In: *Chemische Rundschau* (2001), Nr. 6, S. 10, ISSN 0009-2983
- [27] BUSCH, K.L. ; GLISH, G.L. ; MCLUCKEY, S.A.: *Mass Spectrometry / Mass Spectrometry Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*. Weinheim : VCH, 1988
- [28] BUZIOL, S. ; BASHIR, I. ; BAUMEISTER, A. ; CLAASSEN, W. ; NOISOMMIT-RIZZI, N. ; MAILINGER, W. ; REUSS, M.: New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. In: *Biotechnology and Bioengineering* 80 (2002), Nr. 6, S. 632-636
- [29] CECH, N. B. ; ENKE, C. G.: Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. In: *Mass Spectrometry Reviews* 20 (2001), Nr. 6, S. 362-387
- [30] CHANDRAN, S. S. ; YI, J. ; DRATHS, K. M. ; DAENIKEN, R. von ; WEBER, W. ; FROST, J. W.: Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. In: *Biotechnology Progress* 19 (2003), Nr. 3, S. 808-814
- [31] CHAO, Y. P. ; LIAO, J. C.: Alteration of Growth-Yield by Overexpression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Escherichia-Coli. In: *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993), Nr. 12, S. 4261-4265
- [32] CHAPMAN, S.: Carrier Mobility Spectra of Spray Electrified Liquids. In: *Physical Review* 52 (1937), Nr. 10, S. 184-190
- [33] CHASSAGNOLE, C. ; NOISOMMIT-RIZZI, N. ; SCHMID, J. W. ; MAUCH, K. ; REUSS, M.: Dynamic modeling of the central carbon metabolism of Escherichia coli. In: *Biotechnology and Bioengineering* 79 (2002), Nr. 1, S. 53-73
- [34] CHAUDHURI, S. ; LAMBERT, J. M. ; MCCOLL, L. A. ; COGGINS, J. R.: Purification and Characterization of 3-Dehydroquinase from Escherichia-Coli. In: *Biochemical Journal* 239 (1986), Nr. 3, S. 699-704
- [35] CHRISTENSEN, B. ; NIELSEN, J.: Isotopomer Analysis using GC-MS. In: *Metabolic Engineering* 1 (1999), S. 282-290
- [36] CLARK, P. H.: Mutant isolation. In: MACDONALD, K.D. (Hrsg.): *Second Int. Symp. Gent. Indust. Microorg.* London : Academic Press, 1976
- [37] COGGINS, J. R. ; BOOCOCK, M. R. ; CHAUDHURI, S. ; LAMBERT, J. M. ; LUMSDEN, J. ; NIMMO, G. A. ; SMITH, D. D. S.: The Arom Multifunctional Enzyme from Neurospora-Crassa. In: *Methods in Enzymology* 142 (1987), S. 325-342
- [38] CRUEGER, W. ; CRUEGER, A.: *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. 3. Auflage. Oldenbourg, 1989
- [39] DAM, J. C. van ; EMAN, M. R. ; FRANK, J. ; LANGE, H. C. ; DEDEM, G. W. K. van ; HEIJNEN, S. J.: Analysis of glycolytic intermediates in Saccharomyces cerevisiae using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection. In: *Analytica Chimica Acta* 460 (2002), Nr. 2, S. 209-218

- [40] DAUNER, M. ; SAUER, U.: GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. In: *Biotechnology Progress* 16 (2000), Nr. 4, S. 642–649
- [41] DAVIS, B. D.: Aromatic Biosynthesis .I. The role of shikimic acid. In: *Journal of Biological Chemistry* 191 (1950), S. 315–325
- [42] DAVIS, B. D. ; MINGIOLI, E. S.: Aromatic Biosynthesis .7. Accumulation of 2 Derivatives of Shikimic Acid by Bacterial Mutants. In: *Journal of Bacteriology* 66 (1953), Nr. 2, S. 129–136
- [43] DE GRAAF, A. A. ; STRIEGEL, K. ; WITTIG, R. M. ; LAUFER, B. ; SCHMITZ, G. ; WIECHERT, W. ; SPRENGER, G. A. ; SAHM, H.: Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose-, and xylose-fed continuous cultures as analysed by C-13- and P-31-NMR spectroscopy. In: *Archives of Microbiology* 171 (1999), Nr. 6, S. 371–385
- [44] DEFEYTER, R.: Shikimate Kinases from *Escherichia-Coli-K12*. In: *Methods in Enzymology* 142 (1987), S. 355–361
- [45] DEFEYTER, R. C. ; PITTARD, J.: Purification and Properties of Shikimate Kinase-II from *Escherichia-Coli K-12*. In: *Journal of Bacteriology* 165 (1986), Nr. 1, S. 331–333
- [46] DEGENRING, D.: Erstellung und Validierung mechanistischer Modelle für den mikrobiellen Stoffwechsel zur Auswertung von Substrat-Puls-Experimenten (laufende Dissertation), Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie 2.
- [47] DEGENRING, D.: Persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie 2. (2003)
- [48] DEKONING, W. ; VANDAM, K.: A Method for the Determination of Changes of Glycolytic Metabolites in Yeast on a Subsecond Time Scale Using Extraction at Neutral pH. In: *Analytical Biochemistry* 204 (1992), Nr. 1, S. 118–123
- [49] DELL, K. A. ; FROST, J. W.: Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose - Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino-Acid Biosynthesis. In: *Journal of the American Chemical Society* 115 (1993), Nr. 24, S. 11581–11589
- [50] DOLE, M. ; MACK, L. L. ; HINES, R. L.: Molecular Beams of Macroions. In: *Journal of Chemical Physics* 49 (1968), Nr. 5, S. 2240–2249
- [51] DRATHS, K. M. ; FROST, J. W.: Genomic Direction of Synthesis During Plasmid-Based Biocatalysis. In: *Journal of the American Chemical Society* 112 (1990), Nr. 26, S. 9630–9632
- [52] DRATHS, K. M. ; POMPLIANO, D. L. ; CONLEY, D. L. ; FROST, J. W. ; BERRY, A. ; DISBROW, G. L. ; STAVERSKY, R. J. ; LIEVENSE, J. C.: Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose - the Role of Transketolase. In: *Journal of the American Chemical Society* 114 (1992), Nr. 10, S. 3956–3962

- 
- [53] DUKE, C. C. ; MACLEOD, J. K. ; WILLIAMS, J. F.: Nuclear Magnetic-Resonance Studies of D-Erythrose 4-Phosphate in Aqueous-Solution - Structures of the Major Contributing Monomeric and Dimeric Forms. In: *Carbohydrate Research* 95 (1981), Nr. 1, S. 1–26
- [54] DUNCAN, K. ; LEWENDON, A. ; COGGINS, J. R.: The Purification of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase from an Overproducing Strain of Escherichia-Coli. In: *Febs Letters* 165 (1984), Nr. 1, S. 121–127
- [55] EGGELING, L. ; SAHM, H. ; GRAAF, A.A. d.: Quantifying and Directing Metabolic Flux: Application to Amino Acid Overproduction. In: SAHM, H. (Hrsg.) ; WANDREY, C. (Hrsg.): *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Metabolic Engineering* Bd. 54. Berlin : Springer Verlag, 1996
- [56] EINSELE, A. ; FINN, R.K. ; SAHMHABER, W.: *Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik*. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1985
- [57] ELY, B. ; PITTARD, J.: Aromatic Amino-Acid Biosynthesis - Regulation of Shikimate Kinase in Escherichia-Coli K-12. In: *Journal of Bacteriology* 138 (1979), Nr. 3, S. 933–943
- [58] ESCHERICH, T.: Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. In: *Fortschritte Med.* 3 (1885), S. 515–522 und 547–554
- [59] FENN, J. B.: Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). In: *Angewandte Chemie-International Edition* 42 (2003), Nr. 33, S. 3871–3894
- [60] FENN, J. B. ; MANN, M. ; MENG, C. K. ; WONG, S. F. ; WHITEHOUSE, C. M.: Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. In: *Science* 246 (1989), Nr. 4926, S. 64–71
- [61] FERENCI, T.: Adaptation to life at micromolar nutrient levels: The regulation of Escherichia coli glucose transport by endoinduction and cAMP. In: *Fems Microbiology Reviews* 18 (1996), Nr. 4, S. 301–317
- [62] FEURLE, J. ; JOMAA, H. ; WILHELM, M. ; GUTSCHE, B. ; HERDERICH, M.: Analysis of phosphorylated carbohydrates by high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry utilising a beta-cyclodextrin bonded stationary phase. In: *Journal of Chromatography A* 803 (1998), Nr. 1-2, S. 111–119
- [63] FIEHN, O.: Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. In: *Comparative and Functional Genomics* 2 (2001), Nr. 3, S. 155–168
- [64] FIEHN, O.: Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. In: *Plant Molecular Biology* 48 (2002), Nr. 1-2, S. 155–171
- [65] FLORES, N. ; XIAO, J. ; BERRY, A. ; BOLIVAR, F. ; VALLE, F.: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in Escherichia coli. In: *Nature Biotechnology* 14 (1996), Nr. 5, S. 620–623

- [66] FROST, J. W. ; DRATHS, K. M.: Biocatalytic Syntheses of Aromatics from D-Glucose - Renewable Microbial Sources of Aromatic-Compounds. In: *Annual Review of Microbiology* 49 (1995), S. 557–579
- [67] FROST, J. W. ; KNOWLES, J. R.: 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonic Acid 7-Phosphate - Chemical Synthesis and Isolation from Escherichia-Coli Auxotrophs. In: *Biochemistry* 23 (1984), Nr. 19, S. 4465–4469
- [68] FROST, J.W. ; DRATHS, K.M.: Sweetening Chemical Manufacture. In: *Chemistry in Britain* (1995), S. 206–210
- [69] FURSTE, J. P. ; PANSEGRAU, W. ; FRANK, R. ; BLOCKER, H. ; SCHOLZ, P. ; BAGDASARIAN, M. ; LANKA, E.: Molecular-Cloning of the Plasmid Rp4 Primase Region in a Multi-Host-Range Tacp Expression Vector. In: *Gene* 48 (1986), Nr. 1, S. 119–131
- [70] GERIGK, M.: Integrierte Prozessentwicklung zur Herstellung von L-Phenylalanin mit Escherichia coli, Dissertation Techn. Univ. Berlin D83; ISSN 0944-2952. (2001)
- [71] GERIGK, M. ; BUJNICKI, R. ; GANPO-NKWENKWA, E. ; BONGAERTS, J. ; SPRENGER, G. ; TAKORS, R.: Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant Escherichia coli strains. In: *Biotechnology and Bioengineering* 80 (2002), Nr. 7, S. 746–754
- [72] GERIGK, M. R. ; MAASS, D. ; KREUTZER, A. ; SPRENGER, G. ; BONGAERTS, J. ; WUBBOLTS, M. ; TAKORS, R.: Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant Escherichia coli by fully integrated reactive extraction. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (2002), Nr. 1, S. 43–52
- [73] GOLLUB, E. ; ZALKIN, H. ; SPRINSON, D. B.: Correlation of Genes and Enzymes and Studies on Regulation of Aromatic Pathway in Salmonella. In: *Journal of Biological Chemistry* 242 (1967), Nr. 22, S. 5323–5328
- [74] GOLLUB, E. ; ZALKIN, H. ; SPRINSON, D.B.: Assay for 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic Acid 7-phosphate Synthase. In: *Methods in Enzymology* 17A (1970), S. 349–350
- [75] GOTTSCHALK, G.: *Bacterial Metabolism*. 2nd Edition. New York : Springer-Verlag, 1986
- [76] GREWE, R. ; JESCHKE, J. P.: Die Synthese Der 5-Dehydro-Chinasäure. In: *Chemische Berichte-Recueil* 89 (1956), Nr. 9, S. 2080–2088
- [77] GROUSSAC, E. ; ORTIZ, M. ; FRANCOIS, J.: Improved protocols for quantitative determination of metabolites from biological samples using high performance ionic-exchange chromatography with conductimetric and pulsed amperometric detection. In: *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000), Nr. 9-10, S. 715–723
- [78] GRUYS, K. J. ; WALKER, M. C. ; SIKORSKI, J. A.: Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction-Mechanism for Epsp Synthase from Escherichia-Coli. In: *Biochemistry* 31 (1992), Nr. 24, S. 5534–5544

- [79] HARVEY, D. J. ; HORNING, M. G.: Characterization of Trimethylsilyl Derivatives of Sugar Phosphates and Related Compounds by Gas-Chromatography and Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. In: *Journal of Chromatography* 76 (1973), Nr. 1, S. 51–62
- [80] HASLAM, E.: *Shikimic Acid - Metabolism and Metabolites*. Chichester : John Wiley & Sons Ltd., 1993
- [81] HASLAM, E. ; HAWORTH, R. D. ; KNOWLES, P. F.: The Preparation and Identification of 5-Dehydroquinic and 5-Dehydroshikimic Acids. In: *Methods in Enzymology* 6 (1963), S. 498–504
- [82] HASLAM, E. ; TURNER, M. J. ; SARGENT, D. ; THOMPSON, R. S.: Shikimate Pathway .1. Introduction - Preparation of Stereospecifically Labelled 2-Deuterio-Derivatives of 3-Dehydroquinic Acid. In: *Journal of the Chemical Society C-Organic* (1971), Nr. 8, S. 1489–1495
- [83] HESSE, M. ; MEIER, H. ; ZEEH, B.: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 4. überarbeitete Auflage. Stuttgart : Thieme Verlag, 1991
- [84] HEYNS, K. ; GOTTSCHALCK, H.: Über katalytische Oxidationen: 15. Katalytische Oxidation von Chinasäure und Shikimisäure. In: *Chemische Berichte-Recueil* 94 (1961), Nr. 2, S. 343–348
- [85] HIRSCH, E.: Reaktionstechnische Untersuchungen zur Auswirkung von Glukose-Pulsen auf den Aromatenbiosyntheseweg bei Glukose limitierten Escherichia coli Stämmen, Diplomarbeit Fachhochschule Flensburg. (2001)
- [86] INTERNET: ISI Web of Knowledge, Current Contents Connect, <http://isi1.isiknowledge.com/portal.cgi>, Lizenzzugang über die Zentralbibliothek der Forschungszentrum Jülich GmbH.
- [87] IRIBARNE, J. V. ; THOMSON, B. A.: Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. In: *Journal of Chemical Physics* 64 (1976), Nr. 6, S. 2287–2294
- [88] JENSEN, N. B. S. ; JOKUMSEN, K. V. ; VILLADSEN, J.: Determination of the phosphorylated sugars of the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway in Lactococcus lactis using a fast sampling technique and solid phase extraction. In: *Biotechnology and Bioengineering* 63 (1999), Nr. 3, S. 356–362
- [89] JOSSEK, R. ; BONGAERTS, J. ; SPRENGER, G. A.: Characterization of a new feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase AroF of Escherichia coli. In: *Fems Microbiology Letters* 202 (2001), Nr. 1, S. 145–148
- [90] KARUTZ, M. ; KRAEMER, M. ; SAHM, H. ; SPRENGER, G.: Microbial preparation of substances from aromatic metabolism I. WO98/18936. Patent granted in the USA (6316232), ZA (9568/97) and pending for EP, CN, JP, KR and DE. (1998)
- [91] KATONA, Z. F. ; SASS, P. ; MOLNAR-PERL, I.: Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* 847 (1999), Nr. 1-2, S. 91–102

- [92] KEBARLE, P. ; TANG, L.: From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. In: *Analytical Chemistry* 65 (1993), Nr. 22, S. A972–A986
- [93] KEIFER, P. A.: NMR tools for biotechnology. In: *Current Opinion in Biotechnology* 10 (1999), Nr. 1, S. 34–41
- [94] KLEANTHOUS, C. ; DEKA, R. ; DAVIS, K. ; KELLY, S. M. ; COOPER, A. ; HARDING, S. E. ; PRICE, N. C. ; HAWKINS, A. R. ; COGGINS, J. R.: A Comparison of the Enzymological and Biophysical Properties of 2 Distinct Classes of Dehydroquinase Enzymes. In: *Biochemical Journal* 282 (1992), S. 687–695
- [95] KLINK, F.E.: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. In: MEYERS, R.A. (Hrsg.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry* Bd. 13. Chichester : John Wiley & Sons, 2000, S. 11804–11822
- [96] KNAGGS, A. R.: The biosynthesis of shikimate metabolites. In: *Natural Product Reports* 16 (1999), Nr. 4, S. 525–560
- [97] KNOP, D. R. ; DRATHS, K. M. ; CHANDRAN, S. S. ; BARKER, J. L. ; DAENIKEN, R. von ; WEBER, W. ; FROST, J. W.: Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. In: *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001), Nr. 42, S. 10173–10182
- [98] KREUTZER, A.: Persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie 2. (2000)
- [99] KRÄMER, M.: Investigations on the influence of increased availability of Erythrose 4-phosphate and phosphoenolpyruvate on the carbon flux into the aromatic amino acid pathway of *Escherichia coli*, Dissertation Universität Düsseldorf. (2000)
- [100] KUNZE, M.: Entwicklung und Anwendung von Pulsexperimenten in Fed-Batch Fermentationen zur Untersuchung des Stoffwechsels in *E. coli* L-Phenylalanin-Produzenten, Diplomarbeit Technische Universität Dresden. (2003)
- [101] LANGE, H. C. ; EMAN, M. ; ZUIJLEN, G. van ; VISSER, D. ; DAM, J. C. van ; FRANK, J. ; MATTOS, M. J. T. de ; HEIJNEN, J. J.: Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 75 (2001), Nr. 4, S. 406–415
- [102] LAWLEY, B. ; PITTARD, A. J.: Regulation of AroL Expression by TyrR Protein and Trp Repressor in *Escherichia-Coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 176 (1994), Nr. 22, S. 6921–6930
- [103] LE SANN, C. ; ABELL, C. ; ABELL, A. D.: A convenient method for the synthesis of dehydroquinic acid. In: *Synthetic Communications* 33 (2003), Nr. 4, S. 527–533
- [104] LEMARECHAL, P. ; FROUSSIOS, C. ; LEVEL, M. ; AZERAD, R.: Interaction of Phosphonate and Homophosphonate Analogs of 3-Deoxy-D-Arabinose 7-Phosphate with 3-Dehydroquinase Synthetase from *Escherichia-Coli*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 92 (1980), Nr. 4, S. 1104–1109

- [105] LEUCHTENBERGER, W.: Amino Acids - Technical Production and Use. In: REHM, H.J. (Hrsg.) ; REED, G. (Hrsg.) ; PÜHLER, A. (Hrsg.) ; STADLER, P. (Hrsg.): *Biotechnology Vol. 6: Products and Primary Metabolism*. 2. Auflage. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996, S. 465–502
- [106] LEVIN, J. G. ; SPRINSON, D. B.: The Formation of 3-Enolpyruvyl Shikimate 5-Phosphate in Extracts of Escherichia-Coli. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 3 (1960), Nr. 2, S. 157–163
- [107] LEVIN, J. G. ; SPRINSON, D. B.: Enzymatic Formation + Isolation of 3-Enolpyruvoylshikimate 5-Phosphate. In: *Journal of Biological Chemistry* 239 (1964), Nr. 4, S. 1142–1150
- [108] LEWENDON, A. ; COGGINS, J. R.: 3-Phosphoshikimate 1-Carboxyvinyltransferase from Escherichia-Coli. In: *Methods in Enzymology* 142 (1987), S. 342–348
- [109] LI, K. ; FROST, J. W.: Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: A comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources. In: *Biotechnology Progress* 15 (1999), Nr. 5, S. 876–883
- [110] LI, K. ; MIKOLA, M. R. ; DRATHS, K. M. ; WORDEN, R. M. ; FROST, J. W.: Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant Escherichia coli. In: *Biotechnology and Bioengineering* 64 (1999), Nr. 1, S. 61–73
- [111] LIAO, J. C. ; HOU, S. Y. ; CHAO, Y. P.: Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. In: *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996), Nr. 1, S. 129–140
- [112] LIN, H. Y. ; MATHISZIK, B. ; XU, B. ; ENFORS, S. O. ; NEUBAUER, P.: Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of Escherichia coli. In: *Biotechnology and Bioengineering* 73 (2001), Nr. 5, S. 347–357
- [113] MAILINGER, W. ; BAUMEISTER, A. ; REUSS, M. ; RIZZI, M.: Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cerevisiae* using a micro robotic sample preparation HPLC system. In: *Journal of Biotechnology* 63 (1998), Nr. 2, S. 155–166
- [114] MAITRA, U. S. ; SPRINSON, D. B.: 5-Dehydro-3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonic Acid 7-Phosphate - Intermediate in 3-Dehydroquinate Synthase Reaction. In: *Journal of Biological Chemistry* 253 (1978), Nr. 15, S. 5426–5430
- [115] MARCH, R.E.: Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. In: MEYERS, R.A. (Hrsg.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry* Bd. 13. Chichester : John Wiley & Sons, 2000, S. 11848–11872
- [116] MARX, A. ; DEGRAAF, A. A. ; WIECHERT, W. ; EGGELING, L. ; SAHM, H.: Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. In: *Biotechnology and Bioengineering* 49 (1996), Nr. 2, S. 111–129

- [117] MAUCH, K. ; VASEGHI, S. ; REUSS, M.: Quantitative Analysis of Metabolic and Signaling Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. In: SCHÜGERL, K. (Hrsg.) ; BELLGARDT, K.H. (Hrsg.): *Bioreaction Engineering*. Heidelberg : Springer-Verlag, 2000
- [118] MCCANDLISS, R. J. ; POLING, M. D. ; HERRMANN, K. M.: 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase - Purification and Molecular Characterization of Phenylalanine-Sensitive Isoenzyme from *Escherichia-Coli*. In: *Journal of Biological Chemistry* 253 (1978), Nr. 12, S. 4259–4265
- [119] MEHDI, S. ; FROST, J. W. ; KNOWLES, J. R.: Dehydroquinate Synthase from *Escherichia-Coli*, and Its Substrate 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonic Acid 7-Phosphate. In: *Methods in Enzymology* 142 (1987), S. 306–314
- [120] MEYER, S. ; NOISOMMIT-RIZZI, N. ; REUSS, M. ; NEUBAUER, P.: Optimized analysis of intracellular adenosine and guanosine phosphates in *Escherichia coli*. In: *Analytical Biochemistry* 271 (1999), Nr. 1, S. 43–52
- [121] MÜLLER, A.: Hartes Gerangel um den Futtertrog. In: *Chemische Rundschau* (2001), Nr. 6, S. 1, ISSN 0009–2983
- [122] MONOD, J.: The growth of bacterial cultures. In: *Ann. Rev. Microbiol.* 3 (1949), S. 371–394
- [123] MOUSDALE, D. M. ; COGGINS, J. R.: High-Performance Liquid-Chromatography of Shikimate Pathway Intermediates. In: *Journal of Chromatography* 329 (1985), Nr. 2, S. 268–272
- [124] NELMS, J. ; EDWARDS, R. M. ; WARWICK, J. ; FOTHERINGHAM, I.: Novel Mutations in the Phea-Gene of *Escherichia-Coli* K-12 Which Result in Highly Feedback Inhibition-Resistant Variants of Chorismate Mutase Prephenate Dehydratase. In: *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992), Nr. 8, S. 2592–2598
- [125] NIELSEN, J. ; VILLADSEN, J.: *Bioreaction Engineering Principles*. New York, London : Plenum Press, 1994
- [126] NUOFFER, C. ; ZANOLARI, B. ; ERNI, B.: Glucose Permease of *Escherichia-Coli* - the Effect of Cysteine to Serine Mutations on the Function, Stability, and Regulation of Transport and Phosphorylation. In: *Journal of Biological Chemistry* 263 (1988), Nr. 14, S. 6647–6655
- [127] OGINO, T. ; GARNER, C. ; MARKLEY, J. L. ; HERRMANN, K. M.: Biosynthesis of Aromatic Compounds - <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy of Whole *Escherichia Coli* Cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 79 (1982), Nr. 19, S. 5828–5832
- [128] OSTERGAARD, S. ; OLSSON, L. ; NIELSEN, J.: In vivo dynamics of galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolic fluxes and metabolite levels. In: *Biotechnology and Bioengineering* 73 (2001), Nr. 5, S. 412–425
- [129] OWENS, S.: Center for Electron Optics, Michigan State University, <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zah0700.html>.

- 
- [130] PAIVA, A. A. ; TILTON, R. F. ; CROOKS, G. P. ; HUANG, L. Q. ; ANDERSON, K. S.: Detection and identification of transient enzyme intermediates using rapid mixing, pulsed-flow electrospray mass spectrometry. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 49, S. 15472–15476
- [131] PAOLETTI, F. ; WILLIAMS, J. F. ; HORECKER, B. L.: Enzymatic Method for the Analysis of D-Erythrose 4-Phosphate. In: *Analytical Biochemistry* 95 (1979), Nr. 1, S. 250–253
- [132] PATNAIK, R. ; LIAO, J. C.: Engineering of Escherichia-Coli Central Metabolism for Aromatic Metabolite Production with near Theoretical Yield. In: *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994), Nr. 11, S. 3903–3908
- [133] PATNAIK, R. ; SPITZER, R. G. ; LIAO, J. C.: Pathway Engineering for Production of Aromatics in Escherichia-Coli - Confirmation of Stoichiometric Analysis by Independent Modulation of AroG, TktA, and Pps Activities. In: *Biotechnology and Bioengineering* 46 (1995), Nr. 4, S. 361–370
- [134] PÜHLER, A.: Prokaryotes and Man: Chances, Promises and Risks. In: LENGELER, J.W. (Hrsg.) ; DREWS, G. (Hrsg.) ; SCHLEGEL, H.G. (Hrsg.): *Biology of the Prokaryotes*. Stuttgart : Thieme Verlag, 1999
- [135] PITTARD, A.J.: Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium - Cellular and Molecular Biology*. Washington DC. : ASM press, 1996
- [136] POSTMA, P. W. ; LENGELER, J. W. ; JACOBSON, G. R.: Phosphoenolpyruvate - Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. In: *Microbiological Reviews* 57 (1993), Nr. 3, S. 543–594
- [137] POSTMA, P.W. ; LENGELER, J.W. ; JACOBSON, G.R.: Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium - Cellular and Molecular Biology*. Washington DC. : ASM press, 1996
- [138] RAMILO, C. A. ; EVANS, J. N. S.: Overexpression, purification, and characterization of tyrosine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase from Escherichia coli. In: *Protein Expression and Purification* 9 (1997), Nr. 2, S. 253–261
- [139] RÜFFER, N.: laufende Dissertation, Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 2.
- [140] RIZZI, M. ; BALTES, M. ; THEOBALD, U. ; REUSS, M.: In vivo analysis of metabolic dynamics in Saccharomyces cerevisiae .2. Mathematical model. In: *Biotechnology and Bioengineering* 55 (1997), Nr. 4, S. 592–608
- [141] RUIJTER, G. J. G. ; VISSER, J.: Characterization of Aspergillus niger phosphoglucose isomerase. Use for quantitative determination of erythrose 4-phosphate. In: *Biochimie* 81 (1999), Nr. 3, S. 267–272

- [142] SAUTER, T. ; KREMLING, A. ; BETTENBROCK, K. ; FISCHER, S. ; GILLES, E.D.: Analysis of the dynamics of the Escherichia coli PTS in different time windows. In: *Proceedings of the 5th German Workshop on Artificial Life*, IOS Press, 2002
- [143] SCHAEFER, U.: Automatisierte Probenahme zur Messung intrazellulärer Metabolitdynamiken, Dissertation Universität Bonn. (2000)
- [144] SCHAEFER, U. ; BOOS, W. ; TAKORS, R. ; WEUSTER-BOTZ, D.: Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. In: *Analytical Biochemistry* 270 (1999), Nr. 1, S. 88–96
- [145] SCHLEGEL, H.G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Stuttgart : Thieme Verlag, 1992
- [146] SCHLEGEL, H.G.: *Geschichte der Mikrobiologie*. Halle (Saale) : Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, 1999
- [147] SCHMIDT, K. ; NIELSEN, J. ; VILLADSEN, J.: Quantitative analysis of metabolic fluxes in Escherichia coli, using two-dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models. In: *Journal of Biotechnology* 71 (1999), Nr. 1-3, S. 175–189
- [148] SCHMITZ, M. ; HIRSCH, E. ; BONGAERTS, J. ; TAKORS, R.: Pulse experiments as a prerequisite for the quantification of in vivo enzyme kinetics in aromatic amino acid pathway of Escherichia coli. In: *Biotechnology Progress* 18 (2002), Nr. 5, S. 935–941
- [149] SCHONER, R. ; HERRMANN, K. M.: 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase - Purification, Properties, and Kinetics of Tyrosine-Sensitive Isoenzyme from Escherichia-Coli. In: *Journal of Biological Chemistry* 251 (1976), Nr. 18, S. 5440–5447
- [150] SCHRÖDER, E.: *Massenspektrometrie - Begriffe und Definitionen*. Berlin : Springer-Verlag, 1991
- [151] SIMMONDS, S.: The Metabolism of Phenylalanine and Tyrosine in Mutant Strains of Escherichia-Coli. In: *Journal of Biological Chemistry* 185 (1950), Nr. 2, S. 755–762
- [152] SIMPSON, R. J. ; DAVIDSON, B. E.: Studies on 3-Deoxy-D-Arabinoheptulosonate-7-Phosphate Synthetase(Phe) from Escherichia-Coli-K12 .3. Structural Studies. In: *European Journal of Biochemistry* 70 (1976), Nr. 2, S. 509–516
- [153] SKOOG, D.A. ; LEARY, J.J.: *Instrumentelle Analytik : Grundlagen, Geräte, Anwendungen*. Berlin : Springer, 1996
- [154] SMITS, H. P. ; COHEN, A. ; BUTTLER, T. ; NIELSEN, J. ; OLSSON, L.: Cleanup and analysis of sugar phosphates in biological extracts by using solid-phase extraction and anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. In: *Analytical Biochemistry* 261 (1998), Nr. 1, S. 36–42
- [155] SNELL, K. D. ; DRATHS, K. M. ; FROST, J. W.: Synthetic modification of the Escherichia coli chromosome: Enhancing the biocatalytic conversion of glucose into aromatic chemicals. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (1996), Nr. 24, S. 5605–5614

- [156] SOGA, T. ; UENO, Y. ; NARAOKA, H. ; OHASHI, Y. ; TOMITA, M. ; NISHIOKA, T.: Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 10, S. 2233–2239
- [157] STAFFORD, D. E. ; STEPHANOPOULOS, G.: Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. In: *Current Opinion in Microbiology* 4 (2001), Nr. 3, S. 336–340
- [158] STEPHANOPOULOS, G. ; STAFFORD, D. E.: Metabolic engineering: a new frontier of chemical reaction engineering. In: *Chemical Engineering Science* 57 (2002), Nr. 14, S. 2595–2602
- [159] STEPHANOPOULOS, G. ; ARISTIDOU, A. ; NIELSEN, J.: *Metabolic engineering: Principles and Methodologies*. Academic Press, 1998
- [160] STOBIECKI, M.: Applications of separation techniques hyphenated to mass spectrometer for metabolic profiling. In: *Current Organic Chemistry* 5 (2001), Nr. 3, S. 335–349
- [161] SZYPERSKI, T.: Biosynthetically Directed Fractional C-13 Labeling of Proteinogenic Amino-Acids - an Efficient Analytical Tool to Investigate Intermediary Metabolism. In: *European Journal of Biochemistry* 232 (1995), Nr. 2, S. 433–448
- [162] SZYPERSKI, T.: C-13-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 31 (1998), Nr. 1, S. 41–106
- [163] TAKAGI, M. ; NISHIO, Y. ; OH, G. ; YOSHIDA, T.: Control of L-phenylalanine production by dual feeding of glucose and L-tyrosine. In: *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996), Nr. 6, S. 653–660
- [164] TARR, M.A. ; ZHU, J. ; COLE, R.B.: Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. In: MEYERS, R.A. (Hrsg.): *Encyclopedia of Analytical Chemistry* Bd. 13. Chichester : John Wiley & Sons, 2000, S. 11597–11630
- [165] TAYLOR, G.I.: Disintegration of Water Drops in an Electric Field. In: *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 280 (1964), S. 383–397
- [166] TELEMAN, A. ; RICHARD, P. ; TOIVARI, M. ; PENTTILLA, M.: Identification and quantitation of phosphorus metabolites in yeast neutral pH extracts by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Analytical Biochemistry* 272 (1999), Nr. 1, S. 71–79
- [167] THEOBALD, U. ; MAILINGER, W. ; BALTES, M. ; RIZZI, M. ; REUSS, M.: In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* .1. Experimental observations. In: *Biotechnology and Bioengineering* 55 (1997), Nr. 2, S. 305–316
- [168] THEOBALD, U. ; MAILINGER, W. ; REUSS, M. ; RIZZI, M.: In-Vivo Analysis of Glucose-Induced Fast Changes in Yeast Adenine-Nucleotide Pool Applying a Rapid Sampling Technique. In: *Analytical Biochemistry* 214 (1993), Nr. 1, S. 31–37
- [169] TRENZ, U.: Enzymatische Analyse von katabolen Metaboliten in Perchlorsäureextrakten von *Escherichia coli*, Diplomarbeit Fachhochschule Aachen. (1996)

- [170] TRIBE, D. E. ; CAMAKARIS, H. ; PITTARD, J.: Constitutive and Repressible Enzymes of Common Pathway of Aromatic Biosynthesis in Escherichia-Coli K-12 - Regulation of Enzyme-Synthesis at Different Growth-Rates. In: *Journal of Bacteriology* 127 (1976), Nr. 3, S. 1085–1097
- [171] TURNER, N. J. ; WHITESIDES, G. M.: A Combined Chemical Enzymatic-Synthesis of 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonic Acid 7-Phosphate. In: *Journal of the American Chemical Society* 111 (1989), Nr. 2, S. 624–627
- [172] VASEGHI, S. ; BAUMEISTER, A. ; RIZZI, M. ; REUSS, M.: In Vivo Dynamics of the Pentose Phosphate Pathway in Saccharomyces cerevisiae. In: *Metabolic Engineering* 1 (1999), S. 128–140
- [173] VASIC-RACKI, D.: History of Industrial Biotransformations - Dreams and Realities (Kap. 2). In: LIESE, A. (Hrsg.): *Industrial Biotransformations*. Wiley - VCH, 2000, S. 3–29
- [174] VISSER, D. ; ZUYLEN, G. A. van ; DAM, J. C. van ; OUDSHOORN, A. ; EMAN, M. R. ; RAS, C. ; GULIK, W. M. van ; FRANK, J. ; DEDEM, G. W. K. van ; HEIJNEN, J. J.: Rapid sampling for analysis of in vivo kinetics using the BioScope: A system for continuous-pulse experiments. In: *Biotechnology and Bioengineering* 79 (2002), Nr. 6, S. 674–681
- [175] WANG, C. H. ; STERN, I. ; GILMOUR, C. M. ; KLUNGSOYR, S. ; REED, D. J. ; BIALY, J. J. ; CHRISTENSEN, B. E. ; CHELDELIN, V. H.: Comparative Study of Glucose Catabolism by the Radiorespirometric Method. In: *Journal of Bacteriology* 76 (1958), Nr. 2, S. 207–216
- [176] WEBER, H. ; BRECKER, L.: Online NMR for monitoring biocatalysed reactions. In: *Current Opinion in Biotechnology* 11 (2000), Nr. 6, S. 572–578
- [177] WEISS, U. ; EDWARDS, J.M.: *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. New York : Wiley-Interscience, 1980
- [178] WEISS, U. ; MINGIOLI, E. S.: Aromatic Biosynthesis .15. The Isolation and Identification of Shikimic Acid 5-Phosphate. In: *Journal of the American Chemical Society* 78 (1956), Nr. 12, S. 2894–2898
- [179] WEISSER, P. ; KRAMER, R. ; SAHM, H. ; SPRENGER, G. A.: Functional Expression of the Glucose-Transporter of Zymomonas-Mobilis Leads to Restoration of Glucose and Fructose Uptake in Escherichia-Coli Mutants and Provides Evidence for Its Facilitator Action. In: *Journal of Bacteriology* 177 (1995), Nr. 11, S. 3351–3354
- [180] WESTERHOFF, H. V.: The silicon cell, not dead but live! In: *Metabolic Engineering* 3 (2001), Nr. 3, S. 207–210
- [181] WEUSTER-BOTZ, D.: *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*. Schriften der Forschungszentrum Jülich GmbH, Reihe Lebenswissenschaften, 1999

- 
- [182] WEUSTER-BOTZ, D. ; DEGRAAF, A.A.: Reaction engineering methods to study intracellular metabolite concentrations. In: SCHEPER, T. (Hrsg.): *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* Bd. 54. Heidelberg : Springer-Verlag, 1996, S. 76–108
- [183] WEUSTERBOTZ, D.: Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics. In: *Analytical Biochemistry* 246 (1997), Nr. 2, S. 225–233
- [184] WHIPP, M. J. ; CAMAKARIS, H. ; PITTARD, A. J.: Cloning and analysis of the shiA gene, which encodes the shikimate transport system of Escherichia coli K-12. In: *Gene* 209 (1998), Nr. 1-2, S. 185–192
- [185] WIDLANSKI, T. ; BENDER, S. L. ; KNOWLES, J. R.: Dehydroquinate Synthase - a Sheep in Wolfs Clothing. In: *Journal of the American Chemical Society* 111 (1989), Nr. 6, S. 2299–2300
- [186] WILLIAMS, J. F. ; BLACKMORE, P. F. ; DUKE, C. C. ; MACLEOD, J. K.: Fact, Uncertainty and Speculation Concerning the Biochemistry of D-Erythrose-4-Phosphate and Its Metabolic Roles. In: *International Journal of Biochemistry* 12 (1980), Nr. 3, S. 339–344
- [187] WOMACK, J. E. ; ODOVONAN, G. A.: Orotic-Acid Excretion in Some Wild-Type Strains of Escherichia-Coli K-12. In: *Journal of Bacteriology* 136 (1978), Nr. 2, S. 825–828
- [188] YAMASHITA, M. ; FENN, J. B.: Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. In: *Journal of Physical Chemistry* 88 (1984), Nr. 20, S. 4451–4459
- [189] YI, K. ; LI, K. ; DRATHS, K. M. ; FROST, J. W.: Modulation of phosphoenolpyruvate synthase expression increases shikimate pathway product yields in E-coli. In: *Biotechnology Progress* 18 (2002), Nr. 6, S. 1141–1148
- [190] ZAJA, S.: Persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie 2.
- [191] ZAJA, S.: Entwicklung analytischer Methoden zur Quantifizierung ausgewählter Intermediate des Aromatenbiosynthesewegs in rekombinanten Stämmen des Organismus Escherichia coli, Diplomarbeit Fachhochschule München. (2001)
- [192] ZEPPENFELD, T. ; LARISCH, C. ; LENGELER, J. W. ; JAHREIS, K.: Glucose transporter mutants of Escherichia coli K-12 with changes in substrate recognition of IICBGlc and induction behavior of the ptsG gene. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), Nr. 16, S. 4443–4452
- [193] ZIMMER, D.: Introduction to quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). In: *Chromatographia* 57 (2003), S. 325–332
- [194] ZINBO, M. ; SHERMAN, W. R.: Gas Chromatography and Mass Spectrometry of Trimethylsilyl Sugar Phosphates. In: *Journal of the American Chemical Society* 92 (1970), Nr. 7, S. 2105–2114