

# 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 Probenahmeinheit	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 $^1\text{H}$ -NMR . . . . .	50
5.3.5	$^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -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 $^1\text{H}$ -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 $^1\text{H}$ -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	Glukosepulsexperimente mit L-Phenylalanin Produktionsstämmen . . . . .	120
6.7.1	Glukosepulsexperiment 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	Glukosepulsexperiment 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	Glukosepulsexperiment 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	Pulsperiment mit <i>E. coli</i> 4pF20 . . . . .	144
6.8.2	Pulsperiment 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>

*Inhaltsverzeichnis*

---

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>