

Inhaltsverzeichnis

Selbständigkeitserklärung	iii
Inhaltsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
Abbildungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
2 Problemstellung und Zielsetzung	3
3 Theoretische Grundlagen	5
3.1 Biologische Grundlagen	5
3.1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
3.1.2 Lysin- und Aminosäureproduktion	5
3.1.3 Biochemisches Netzwerk	6
3.2 Bioverfahrenstechnische Grundlagen	10
3.2.1 Betriebsweisen zur Kultivierung	10
3.2.2 Prozessbeschreibung	11
3.3 Analytische Grundlagen	14
3.3.1 Probenahme	14
3.3.2 LC-MS/MS	15
3.3.3 Quantifizierung und Markierungsmessung	17
3.4 Modellierungsgrundlagen	18
3.4.1 Stationäre ¹³ C Stoffflussanalyse	20
3.4.2 Stimulus-Response Experimente	21
4 Material und Methoden	23
4.1 Kultivierung	23
4.1.1 Medium und Stämme	23
4.1.2 Kultivierung 20L	24

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.3	Pulsexperimente & automatische Probenahme	25
4.1.4	Probenahme & Prozessanalytik	25
4.1.5	Master-Slave ¹³ C-Kultivierung	25
4.2	Metabolomanalyse	27
4.2.1	Methanolisches Quenching & Zellaufschluß	27
4.2.2	Effizienz des methanolischen Quenchens	28
4.2.3	LC-MS/MS Analytik	28
4.2.4	Stabilität der Intermediate	30
4.2.5	Isotope Dilution Mass Spectrometry	30
4.2.6	Wärmetauscher	31
4.2.7	Transkriptomanalyse	32
4.3	Modellierung	33
4.3.1	Modell der Lysin Biosynthese	33
4.3.2	¹³ C Stoffflussanalyse	37
4.3.3	Pool-Effluxkapazität	43
5	Metabolomanalysetechnologie	45
5.1	Effizienz des methanolischen Quenching	45
5.2	Charakterisierung des Zell- <i>leakage</i>	47
5.2.1	Quantifizierung für <i>Corynebacterium glutamicum</i>	47
5.2.2	Zeitliche Dimension des methanolischen Quenchings	52
5.2.3	Stoffwechsel bei 0°Celsius	53
5.3	Probenaufarbeitung	55
5.4	Isotopenverdünnte Massenspektrometrie	57
5.4.1	Stabilität der Intermediate	57
5.4.2	Herstellung eines IDMS Standards	59
5.4.3	Zugabe von IDMS	62
5.5	Fazit	64
6	LC-MS/MS für Biosynthese	67
6.1	Anwendung von LC-MS/MS für Lysinweg	67
6.2	Fazit	70
7	Glucose-Pulsexperimente	71
7.1	Charakterisierung der Pulsanlage	71
7.2	Motivation & Entwicklung des SRE Setups	72
7.3	Ergebnisse der Pulsexperimente	77
7.4	Fazit	79

INHALTSVERZEICHNIS

8	Metabolomanalyse	81
8.1	Kultivierung zur Metabolomanalyse	81
8.2	Zeitreihenbasierter Stammvergleich	83
8.3	Glycolyse	85
8.4	Pentosephosphatweg	87
8.5	Citratzyklus	89
8.6	Energiemetabolite und Redoxequivalente	92
8.7	Lysin- & Threonin-Biosynthese	94
8.8	Fazit	97
9	¹³C-Stoffflussanalyse	99
9.1	<i>Experimental Design</i>	99
9.2	Bestimmung der Raten	101
9.3	Stoffflusskarten in der Wachstumsphase	103
9.3.1	DM1730	104
9.3.2	DM1933	107
9.4	Stoffflusskarten der Produktionsphase	108
9.4.1	DM1730	108
9.4.2	DM1933	111
9.5	Vergleich der Stoffflusslagen	113
9.6	Genauigkeit der Stoffflusskarten	115
9.7	Überprüfung des Mischsubstrates	118
9.8	Fazit	120
10	Modellierung der Pulsdynamik	123
10.1	Modellgleichungen	123
10.2	Beschreibung der Co-Metabolitverläufe	127
10.3	Beschreibung des Referenzzustandes	130
10.4	Modellierung von DM1730	132
10.5	Modellierung von DM1933	137
10.6	Stammvergleich	142
10.7	Fazit	144
11	Vorschläge zur verbesserten Lysinproduktion	147
12	Zusammenfassung und Ausblick	149
	Literaturverzeichnis	153
A	Kohlenstoff-Transitionsnetzwerk	163
B	Flusswerte der Stoffflusskarten	169

INHALTSVERZEICHNIS

C Wissenschaftlicher Lebenslauf

183