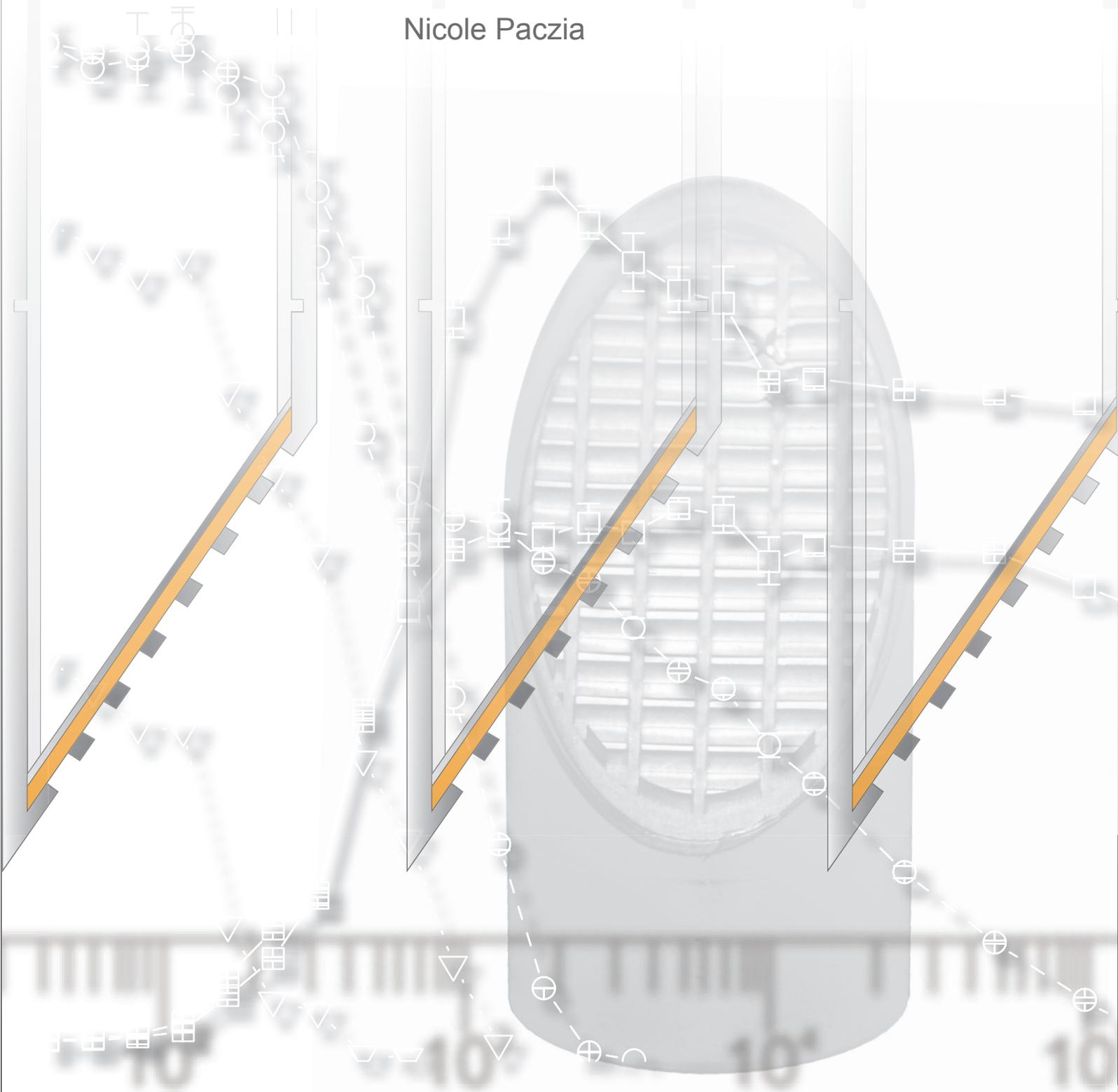


Metabolomanalyse von Mikroorganismen

Methodenentwicklung und
Konzepte zur Automatisierung

Nicole Paczia



Metabolomanalyse von Mikroorganismen

Methodenetablierung und
Konzepte zur Automatisierung

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Technischen Fakultät der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Nicole Paczia

geboren am 23.02.1983 in Düsseldorf

Januar 2012

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Noll
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Wiechert

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Wörtlich entlehnte Stellen wurde in dieser Arbeit als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Düsseldorf, der 31. Januar 2012

Nicole Paczia

„Ich kann freilich nicht sagen,

ob es besser werden wird,
wenn es anders wird;

aber soviel kann ich sagen,

es muss anders werden,
wenn es gut werden soll.“

Georg Christoph Lichtenberg, 1742 - 1799, Physiker und Autor

Kurzfassung

Metabolomanalyse von Mikroorganismen

Optimierung und Konzepte zur Automatisierung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Untersuchung und Optimierung der Probengenerierung zur quantitativen Metabolomanalyse von Mikroorganismen. Durch eine detaillierte Betrachtung aller Arbeitsschritte wie Biomassebestimmung, Probenahme, Quenching, Zellseparation, Analytik und Datenprozessierung konnten alle Einflussgrößen des Gesamtverfahrens charakterisiert werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die wesentlichen Grundlagen einer belastbaren Metabolomanalyse die Berücksichtigung der Heterogenität von bakteriellen Populationen und die differenzierte Erfassung des Biovolumens als Referenzgröße sind. Zudem belegt die vorliegende Arbeit, dass im Verlauf von Batch-Kultivierungen teilweise hohe extrazelluläre Metabolitkonzentrationen auftreten und damit ein simultanes Quenching nur in ausgewählten Fällen anwendbar ist. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Messmatrix bei der Durchführung von LC-ESI-MS/MS-Messungen auch unter Verwendung interner Standards einen erheblichen Einfluss besitzt.

Auf Basis eines umfangreichen Methodenvergleichs für die Durchführung jedes Teilschrittes und der daraus resultierenden Optimierung ausgewählter Einzelmethoden konnte ein Standardprozess zur Metabolomanalyse etabliert werden. Die Funktionalität des Standardprozesses wurde anhand einer vergleichenden Metabolomanalyse von vier *Corynebacterium glutamicum*-Stämmen erfolgreich nachgewiesen. Abschließend konnte ein Konzept zur automatisierten Anwendung des optimierten Protokolls erstellt werden. Für die Arbeitsschritte Quenching und Zellseparation wurden dazu eigene technische Lösungen entwickelt und umgesetzt.

Abstract

Metabolome analysis of microorganisms

Optimization and concepts for automatization

The present work deals with the investigation and optimization of the sample preparation procedure for quantitative metabolome analysis of microorganisms. Following a detailed examination of all single working steps like biomass determination, sampling, quenching, cell separation, analytics and data processing all influencing factors of the complete procedure were characterized. In particular it was shown that the consideration of population heterogeneity and the differentiated measurement of the biovolume as reference value are basic requirements for a reliable metabolome analysis. Moreover, the present work proves that during batch cultivation partly high extracellular metabolite concentrations can be detected and hence a simultaneous quenching is only suitable in rare cases. In addition it was found that the sample matrix has a strong influence on LC-ESI-MS/MS measurements even when internal standards are utilized.

Based on a comprehensive method comparison for the realization of each single working step and the resulting optimization of selected methods, a standard operation procedure for the metabolome analysis was established. The functionality of this procedure was successfully demonstrated via a comparative metabolome analysis of four *Corynebacterium glutamicum* strains. Finally, a concept for the automatization of the optimized protocol was formulated. Technical solutions for the working steps quenching and cell separation were developed and implemented.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Forschungszentrum Jülich im IBG 1:Biotechnologie angefertigt und hätte ohne die Unterstützung vieler Menschen nie umgesetzt werden können. Einigen von ihnen gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. Thomas Noll danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die Bereitschaft meine Arbeit als Doktorvater zu betreuen, sowie für viele Denkanstöße, die mir insbesondere in der Anfangsphase meiner Promotion sehr geholfen haben.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wiechert gilt mein Dank für die interessante Themenstellung, für die Übernahme des Koreferats und für die permanente Neugier und Begeisterung mit der er meine Arbeit und insbesondere die Entwicklung des SWUC verfolgt und unterstützt hat.

Für die hervorragende Betreuung danke ich Herrn Dr. Stephan Noack, der diese Arbeit durch sein Interesse und Engagement maßgeblich mitgeprägt hat und der mir aufgrund seiner kritischen Sicht auf Daten und Fakten ein Vorbild ist.

Herrn Prof. Dr. Marco Oldiges bin ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Arbeitsgruppe für Bio-prozesstechnik und Bioanalytik anfertigen zu können, ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Christian Schramm, Jasper Kruse, Tobias Lehmann, Stephan Mollyt und Anke Nilgen danke ich für die Arbeit, die sie im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten bzw. Ausbildung geleistet haben.

Jana Tillack möchte ich für die gute Zusammenarbeit und für das Verständnis und die Geduld danken, mit der sie Änderungswünschen, Vorschlägen und vor allem mathematischen Verständnisproblemen begegnet ist.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die Hilfsbereitschaft und tolle Atmosphäre. Insbesondere bedanke ich mich bei Petra Geilenkirchen, Kerstin Hage, Johannes Wichter und Steffen Ostermann für ihre Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für eine Unterstützung, für die ich keine passenderen Worte finde, als: Für Alles.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung der Arbeit	3
3. Theoretische Grundlagen	5
3.1 Metabolomanalyse	5
3.1.1. Bestimmung der Biomassekonzentration	5
3.1.2. Probenahme	13
3.1.3. Quenching	16
3.1.4. Zellseparation	19
3.1.5. Extraktion	21
3.1.6. Analytik	22
3.1.7. Fehlerfortpflanzung	25
3.2 Biologische Systeme	26
3.2.1 Zellwände und Zellgröße	26
3.2.2 Modellorganismen	27
3.2.3 Produktionsorganismen	28
4. Material und Methoden	29
4.1 Kultivierungen	29
4.1.1 Stämme	29
4.1.2 Medien	29
4.1.3 Stammhaltung	30
4.1.4 Kultivierungsbedingungen	30
4.2 Probenahme	31
4.2.1 Zellfreie Überstände	31
4.2.2 Biomassehaltige Proben	31
4.2.3 Vakuumfiltration	31
4.3 Online Prozessanalytik	32
4.4 Offline Prozessanalytik	32
4.4.1 Bestimmung der Biomasse	32
4.4.2 Überstandsanalytik	33
4.4.3 Gerichtete Analyse mittels LC-ESI-MS/MS	33
4.4.4 Ungerichtete Analyse mittels GC-TOF-MS	34
4.4.5 Phase Optimized-LC (POP-LC)	34
4.5 Probenprozessierung zur Metabolomanalyse	38
4.5.1 Ausgangsprotokoll zur Analyse intrazellulärer Metabolite	38
4.5.2 Optimiertes Protokoll zur Analyse intrazellulärer Metabolite	38

5. Biomassebestimmung	40
5.1 Offline Bestimmung der Biomasse	40
5.1.1 Biotrockenmasse und optische Dichte	40
5.1.2 Streulicht und Fluoreszenz	42
5.1.3 Zellzahl und Biovolumen	43
5.2 Online Bestimmung des Biovolumens	48
5.2.1 Untersuchung der Funktionalität	48
5.2.2 Detektion von Subpopulationen	50
5.3 Fazit Biomassebestimmung	51
6. Probenahme	52
6.1 Quantifizierung undefinierter Probenvolumina	52
6.1.1 Quantifizierung des Probenvolumens	52
6.1.2 Quantifizierung des Aliquotvolumens	53
6.2 Beprobung mittels Pipette	54
6.3 Fazit Probenahme	55
7. Quenching	56
7.1 Analyse des Exometaboloms	56
7.2 Ursachenforschung	62
7.2.1 Hypothese 1 – Zellyse	63
7.2.2 Hypothese 2 – Metabolitverlust bei der Probenahme	67
7.2.3 Hypothese 3 – Aktiver oder passiver Transport	69
7.2.4 Import extrazellulärer Metabolite	75
7.3 Fazit Quenching	78
8. Zellseparation	80
8.1 Extrazelluläre Restvolumina	80
8.2 Alternative Verfahren zur Zellseparation	83
8.2.1 Silikonöl-Zentrifugation	83
8.2.2 Vakuumfiltration	84
8.3 Fazit Zellseparation	86
9. Analytik	87
9.1 Optimierung der IDMS	87
9.1.1 Funktionalität der IDMS	87
9.1.2 Ionisierungseffizienz und Response Factor	89
9.1.3 Definition des linearen Messbereichs	90
9.1.4 Matrixeffekte	91
9.2 Verbesserung der Chromatographie mittels POP-LC	96
9.2.1 Erster Etablierungszyklus	97
9.2.2 Zweiter Etablierungszyklus	104
9.3 Validierung	111
9.4 Fazit Analytik	114

10. Fehlerfortpflanzung und Anwendung	115
10.1 Fehlerbehaftete Messgrößen und Fehlermodell	115
10.2 Vergleichende Metabolomanalyse	117
10.3.1 Prozesscharakterisierung.....	117
10.3.2 Intrazelluläre Konzentrationen.....	119
10.3 Fazit Fehlerfortpflanzung und Anwendung	120
11. Automatisierungskonzept	121
11.1 Ist- und Soll-Analyse	121
11.2 Entwicklung fehlender Komponenten	123
11.2.1 Automatisiertes Quenching - MIST (MIXing SecTion)	123
11.2.2 Automatisierte Zellabtrennung - SWUC (Sampling With the help of Underpressure Cell separation)	129
11.3 Konzeptionelle Umsetzung	134
11.4 Fazit Automatisierung	135
12. Zusammenfassung und Ausblick	136
Tabellenverzeichnis	138
Abbildungsverzeichnis	139
Literaturverzeichnis	143
Anhang	I-XXX

Variablen und Abkürzungen

Variablen

Variable	engl. Bezeichnung	dt. Bezeichnung	Einheit
V	Volume	Volumen	
V_{cs}	culture supernatant	Volumen des Kulturüberstands	[ml] bzw. [μl]
V_{qs}	quenching supernatant	Volumen des Quenchingüberstands	[ml] bzw. [μl]
V_{ext}	extract	Volumen des Extrakts	[ml] bzw. [μl]
V_{es}	extraction solution	Volumen des Extraktionsmittels	[ml] bzw. [μl]
V_{extra}	extra cellular	Extrazelluläres Volumen (Reaktorvolumen)	[ml] bzw. [μl]
V_{intra}	intra cellular	Intrazelluläres Volumen	[ml] bzw. [μl]
V_{intra_spec}	specific intracellular	Spezifisches Intrazelluläres Volumen	[μl g ⁻¹]
V_{exf}	extra cellular fluid	Extrazelluläres Restvolumen	[ml] bzw. [μl]
V_{bv}	biovolume	Biovolumen	[ml] bzw. [μl]
V_{bv_spec}	specific biovolume	Spezifisches Biovolumen	[ml ml ⁻¹]
V_{zyt}	cytoplasm	Zytoplasmavolumen	[ml] bzw. [μl]
V_{zyt_LIT}	cytoplasm by literature	Mittels Literaturdaten berechnetes zytoplasmatisches Volumen	[ml] bzw. [μl]
V_{zyt_CC}	cytoplasm by coulter-counter measurement	Mittels Coulter-Counter bestimmtes zytoplasmatisches Volumen	[ml] bzw. [μl]
V_{zyt_SC}	cytoplasm by silicon oil centrifugation	Mittels Silikonöl- Zentrifugation bestimmtes zytoplasmatisches Volumen	[ml] bzw. [μl]
m	mass	Masse	
m_{cdw}	cell dry weight	Biotrockenmasse	[g] bzw [mg]
m_{lys}	lysed cells	Masse von lysierte Zellen	[g] bzw [mg]
m_{exp}	experimental	Gravimetrisch bestimmte Masse	[g] bzw [mg]
m_{sc}	solid components	Masse der festen Zellbestandteile	[g] bzw [mg]
m_{zyt}	zytoplasm	Masse des Zytoplasmas	[g] bzw [mg]
m_{tot}	total	Masse des Gesamtansatzes	[g] bzw [mg]
m_{tara}	tara	Ausgangsmasse	[g] bzw [mg]
m_{tara_SC}	tara silicon oil	Ausgangsmasse inklusive Silikonöl	[g] bzw [mg]
m_{cells}	cells	Masse der Zellen	[g] bzw [mg]

Variable	engl. Bezeichnung	dt. Bezeichnung	Einheit
<i>c</i>	concentration	Konzentration	
<i>c_{cs}</i>	culture supernatant	Konzentration des Kulturüberstands	[mM] bzw. [μM]
<i>c_{qs}</i>	quenching supernatant	Konzentration des Quenchingüberstands	[mM] bzw. [μM]
<i>c_{ext}</i>	extract	Konzentration des Extrakts	[mM] bzw. [μM]
<i>c_{intra}</i>	intra cellular	Intrazelluläre Konzentration	[mM] bzw. [μM]
<i>c_{intra_spec}</i>	specific intracellula	Spezifische intrazelluläre Konzentration	[mol g ⁻¹]
<i>c_{leakage}</i>	leakage	Konzentration des Leakage	[mM] bzw. [μM]
<i>c_{cdw}</i>	cell dry weight	Konzentration an Biotrockenmasse	[g l ⁻¹]
<i>n</i>	—	Stoffmenge	
<i>n_{cs}</i>	culture supernatant	Stoffmenge im Kulturüberstand	[mol]
<i>n_{lys}</i>	lysed cells	Stoffmenge aus lysierten Zellen	[mol]
<i>n_{extra}</i>	extra cellular	Extrazellulär vorliegende Stoffmenge	[mol]
<i>k</i>	—	Retentionsfaktor	
<i>k_A</i>	analyte	Retentionsfaktor von Analyt A	[-]
<i>k_R</i>	reference	Retentionsfaktor der Referenzsubstanz	[-]
<i>k_{A_i}</i>	result	Analyt A auf Säule i	[-]
<i>k_{A_res}</i>		Retentionsfaktor von Analyt A auf einer heterologen Säule	[-]
<i>k_{R_res}</i>	result	Retentionsfaktor der Referenzsubstanz auf einer heterogenen Säule	[-]
<i>t</i>	—	Retentionszeit	
<i>t_A</i>	analyte	Retentionszeit des Analyten A	[min]
<i>t_R</i>	reference	Retentionszeit der Referenzsubstanz	[min]
<i>t_{A_i}</i>	result	Retentionszeit des Analyten A auf Säule i	[min]
<i>t_{A_res}</i>		Retentionszeit des Analyten A auf einer heterologen Säule	[min]
<i>t_{R_res}</i>	result	Retentionszeit der Referenzsubstanz auf einer heterologen Säule	[min]

Variable	engl. Bezeichnung	dt. Bezeichnung	Einheit
W	width	Peakbreite (Basis)	
W_A	analyte	Peakbreite des Analyten A	[min]
W_{A_i}	analyte	Peakbreite des Analyten A auf Säule i	[min]
$W_{A_{res}}$	result	Peakbreite des Analyten A auf einer heterologen Säule	[min]
WHM	Width at half maximum	Halbmaximale Peakbreite	
WHM_A	analyte	Halbmaximale Peakbreite des Analyten A	[min]
WHM_{A_i}	analyte	Halbmaximale Peakbreite des Analyten A auf Säule i	[min]
$WHM_{A_{res}}$	result	Halbmaximale Peakbreite des Analyten A auf einer heterologen Säule	[min]
N	—	Bodenzahl	
N_A	analyte	Bodenzahl des Analyten A	[min]
N_{A_i}	analyte	Bodenzahl des Analyten A auf Säule i	[min]
$N_{A_{res}}$	result	Bodenzahl des Analyten A auf einer heterologen Säule	[min]
A	—	Peakfläche	
A_A	analyte	Peakfläche des Analyten A	[counts]

Abkürzung	Bezeichnung
PSU	practical salinity units, Einheit der Salinität
cps	counts per second, Einheit der Signalintensität
rpm	rounds per minute, Rührerdrehzahl
t	Zeitpunkt
GC	Gaschromatographie
LC	Flüssigkeitschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
ESI	Elektrospray-Ionisation
TOF	Flug-Zeit-MS
MRM	multiple reaction monitoring
IDMS	Isotopen-Verdünnungs-MS
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
POP-LC	Phasen optimierte LC
CypecATN	Cyano-phenyl-C18-Säule
NIST	National Institute of Standards and Technology
GMD	Golm Metabolome Database
OD	Optische Dichte
BTM	Biotrockenmasse
PID-Regler	Proportional Integral Derivatv-Regler
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TE-Puffer	TRIS (10mM) -EDTA (1mM) -Puffer
PI	Propidoumioidid
MeOX	O-Methylhydroxylamine
MSTFA	N-acetyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid
TBA	Tributylamin
PTFE	Polytetrafluorethylen
BSA	Bovines Serumalbumin
AF	Anti-Schaum
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches AMP
NAD	Nicotinsäureamid -Adenin -Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinsäureamid -Adenin -Dinukleotid, reduzierte Form
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form

1. Einleitung

Die Biotechnologie wird definiert als „Wissenschaft von den Methoden und Verfahren, die zur technischen Nutzbarmachung biologischer Prozesse führen“ (Duden 2011). Die Definition beschreibt zum einen die Interdisziplinarität des Forschungsgebietes, das technische und biologische Komponenten vereinigt, und nennt zum anderen das Ziel jeder biotechnologischen Forschung: Die industrielle Nutzung von biologischen Stoffwechselprozessen.

Die Biotechnologie ist dabei keine junge Wissenschaft. Frühgeschichtliche Quellen weisen darauf hin, dass bereits um 5000 v.Chr. Mikroorganismen zum Erzeugen von alkoholischen Getränken oder für die Milchsäuregärung eingesetzt wurden, wobei der Einsatz ohne das Verständnis der genutzten Stoffwechselprozesse erfolgte. Seit dieser Zeit bilden biotechnologische Produkte einen festen Bestandteil des Alltags und spätestens seit der Mitte des 19. Jahrhunderts zudem einen eigenen Industriezweig mit Umsätzen die allein in Deutschland mehrere Milliarden Euro erreichen (vgl. Abbildung 1.1).

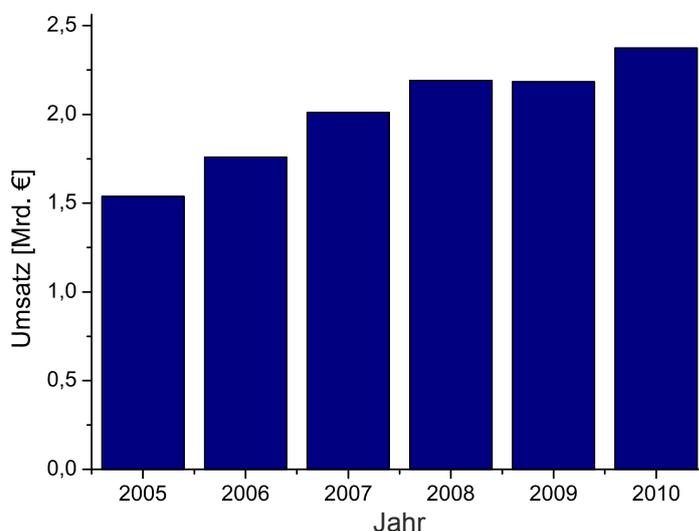


Abbildung 1.: Umsätze dedizierter Biotechnologieunternehmen in Deutschland in den Jahren 2005 bis 2010 (Biotechnologie.de 2011).

Um die Ausbeute eines Produktionsprozesses zu steigern, ist die Methode von Versuch-und-Irrtum heute nicht mehr zeitgemäß. Stattdessen wird die zielgerichtete Optimierung eines Prozesses verfolgt, die ein fundamentales Wissen über alle relevanten Systemkomponenten voraussetzt. Für die Optimierung biotechnologischer Prozesse bedeutet dies in erster Linie die ganzheitliche Beschreibung aller zellulären Funktionen des eingesetzten biologischen Systems.

Die Beschreibung eines solchen Systems ist vielschichtig und kann auf unterschiedlichen Ebenen (Gene, Transkripte, Proteine, Metabolite, Stoffflüsse) erfolgen. Aus diesem Grund haben sich in den letzten 20 Jahren die sogenannten „Omics“-Wissenschaften entwickelt, die sich explizit mit der Untersuchung jeweils einer Zellebene befassen. Der Term Metabolomics bezeichnet dabei die qualitative und quantitative Messung von Metaboliten in einem biologischen System.

Im Vergleich zu Genomics, Transkriptomics und Proteomics setzte die Methodenentwicklung zur Erfassung und Interpretation von Metabolitkonzentrationen später ein. In den letzten Jahren nahm das Interesse an dem Forschungsbereich allerdings deutlich zu (vgl. Abbildung 1.2).

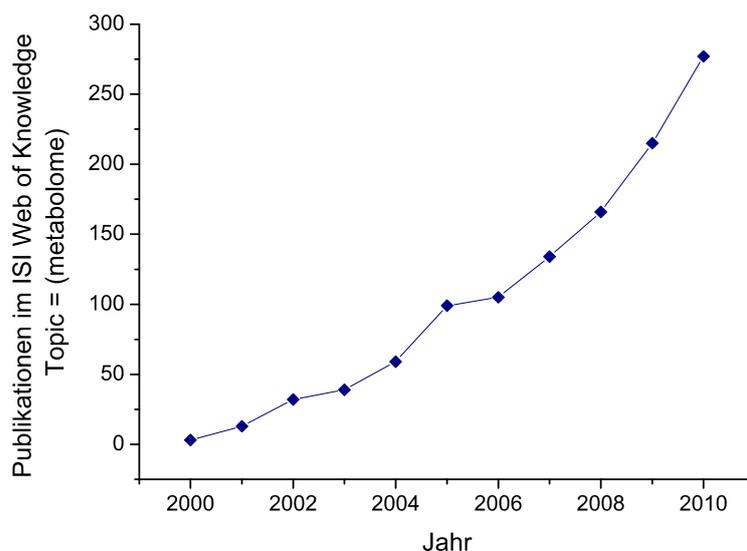


Abbildung 2.1: Publikationen im ISI Web of Knowledge unter dem Suchbegriff „metabolome“.

Neben der kontinuierlich steigenden Zahl an Publikationen mit dem Schlagwort „Metabolom“ zeigt sich der aktuelle Entwicklungsstand der Metabolomics besonders im Mangel an einheitlichen Standards. Dies betrifft sowohl die Erzeugung von reproduzierbaren Konzentrationsdaten als auch deren Darstellung und Interpretation.

Die Metabolomanalyse ist ein mehrstufiger Prozess. Sie setzt sich aus der Probenahme, dem Anhalten des Stoffwechsels (Quenching), der Separation der Zellen, der Extraktion und der Analyse der Metaboliten zusammen und kann zudem beliebig um Reinigungs- und Konzentrierungsschritte erweitert werden. Zudem herrscht Uneinigkeit darüber, in welcher Reihenfolge und ob einzelne Arbeitsschritte sinnvoll sind.

Hinzu kommt, dass für jeden erforderlichen Einzelschritt der Probengenerierung unterschiedliche methodische Lösungsansätze existieren, womit die potentiellen Möglichkeiten zur Generierung von Metabolomdaten nahezu unerschöpflich sind.

Der Suchbegriff „intracellular metabolome analysis“ liefert für das Jahr 2011 im ISI Web of Knowledge 17 Veröffentlichungen. Betrachtet man aus diesen 17 die elf Veröffentlichungen, die experimentelle Arbeiten an Suspensionszellen beschreiben, wenden die Autoren für das Erreichen eines identischen Ziels nicht weniger als zehn unterschiedliche Versuchsprotokolle an (vgl. Anhang A1).

Selbst unter der Annahme, dass jeder einzelne Arbeitsschritt das Endergebnis einer Metabolomanalyse nur geringfügig beeinflusst, wird deutlich, dass allgemeingültige und vergleichbare Daten auf diese Weise nicht generiert werden können.

2. Zielsetzung der Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Standardverfahrens zur Generierung von Metabolomdaten. Dieses soll insbesondere das Kriterium der Allgemeingültigkeit in Bezug auf das mögliche Spektrum an zu untersuchenden Organismen, Kultivierungsbedingungen und Metaboliten erfüllen.

Grundvoraussetzung für die Erfüllung dieser Anforderung ist die Eignung und Kompatibilität der Prozeduren und Methoden, die für die einzelnen Arbeitsschritte der Metabolomanalyse eingesetzt werden.

Um dies zu gewährleisten wird die Probengenerierung für die Metabolomanalyse zu Beginn der Arbeit in die Einzelschritte Biomassebestimmung, Probenahme, Quenching, Zellseparation, Extraktion, Analyse und Datenprozessierung aufgegliedert (vgl. Abbildung 2.1).

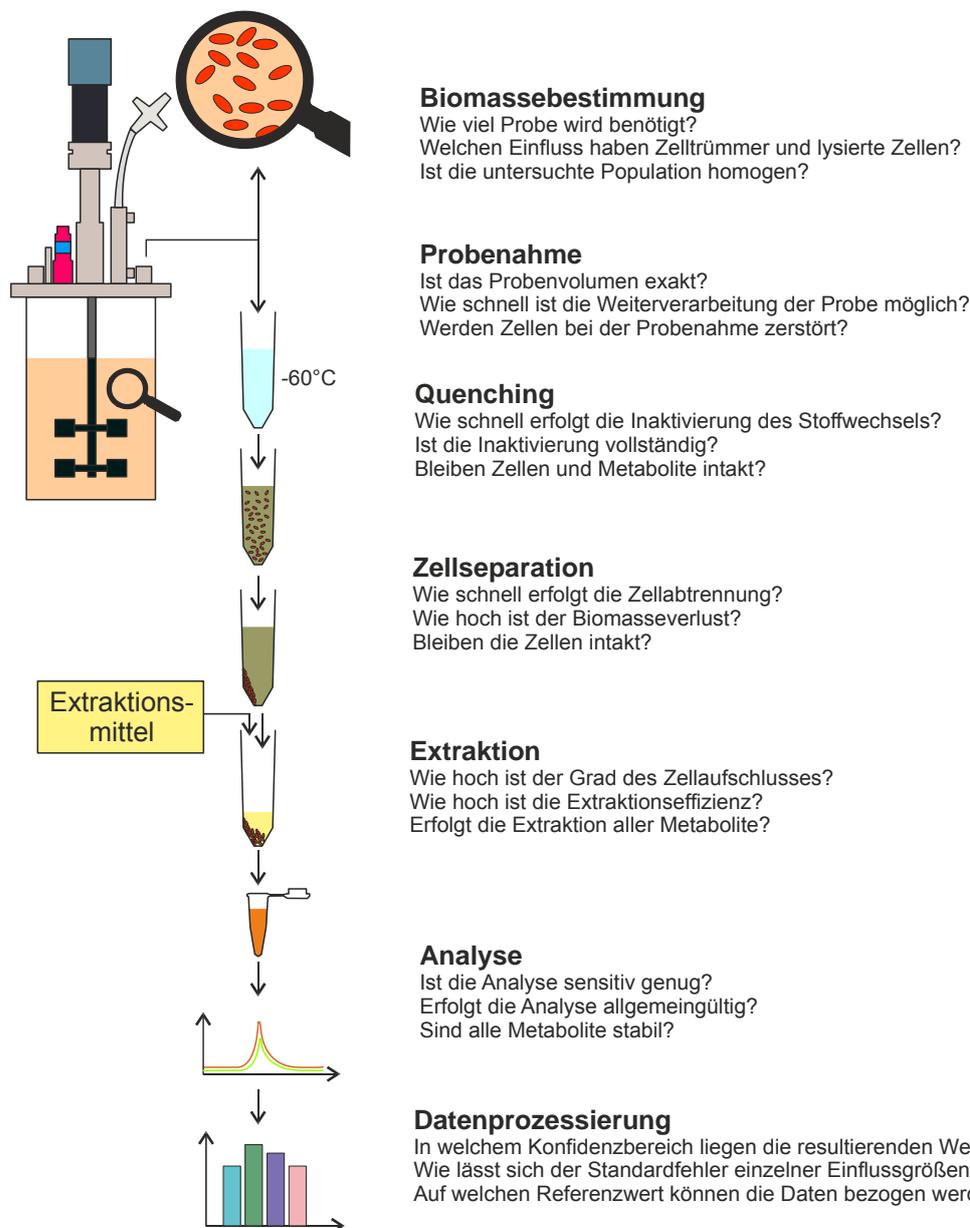


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Probengenerierung für die Metabolomanalyse. Potentielle Fragestellungen der Funktionalitätsprüfung und Optimierung einzelner Arbeitsschritte.

2. Zielsetzung der Arbeit

Für jeden Arbeitsschritt sollen mehrere Verfahren untersucht und hinsichtlich ihrer Funktionalität für die Metabolomanalyse bewertet werden. Die Methoden, welche bei erster Betrachtung die höchste Funktionalität aufweisen, sollen wenn möglich weiter optimiert werden.

Eine Ausnahme stellt in diesem Punkt der Arbeitsschritt der Extraktion dar. Aufgrund der umfangreichen Forschung in den letzten Jahren in Bezug auf Extraktionsmethoden und deren Einschränkungen, wird im Rahmen dieser Arbeit auf eine gezielte Untersuchung verzichtet. Die im Abschnitt 3.1.3 ausführlich dargestellten Ergebnisse früherer Arbeiten werden in diesem Punkt als gegeben hingenommen.

Nach der Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte sollen diese zu einem Standardprotokoll zusammengefügt werden, dessen Funktionalität anhand der Untersuchung einer biologischen Fragestellung gezeigt werden soll.

Abschließend ist es Ziel dieser Arbeit ein Konzept für die automatisierte Probengenerierung zur Metabolomanalyse zu entwickeln und die Voraussetzungen für dessen Umsetzung zu schaffen.

Die vorliegende Arbeit kann somit in die folgenden Abschnitte untergliedert werden:

1. Vergleich und Optimierung unterschiedlicher Methoden für die Biomassebestimmung, die Probenahme, das Quenching, die Zellseparation, die Analyse und die Datenprozessierung
2. Kombination der optimierten Einzelschritte zu einem funktionellen Standardprotokoll
3. Anwendung des Standardprotokolls auf eine biologische Fragestellung
4. Entwicklung eines Konzeptes für die automatisierte Probengenerierung zur Metabolomanalyse

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Metabolomanalyse

Das Metabolom bezeichnet die Gesamtheit an Stoffwechselintermediate einer Zelle. Abhängig davon, ob bei dieser Analyse intra- oder extrazelluläre Metabolite im Fokus einer Untersuchung stehen, wird dies als Metabolic Fingerprinting oder Footprinting bezeichnet.

Bei der Analyse intrazellulärer Metabolite handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess. Die einzelnen Arbeitsschritte dieses Prozesses sind in unterschiedlichem Maße technisch aufwendig und tragen alle signifikant zur Qualität der Gesamtanalyse bei. Im Folgenden sind die Arbeitsschritte einzeln beschrieben, um auf die jeweiligen Herausforderungen eingehen zu können.

3.1.1. Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Bestimmung der Biomasse ist zwar kein expliziter Arbeitsschritt der Probengenerierung, beeinflusst die Ergebnisse einer Metabolomanalyse aber gleich in zweifacher Hinsicht. Zum einen dient sie dazu, das Probevolumen festzulegen und zum anderen dazu, eine Bezugsgröße für die resultierenden intrazellulären Metabolitkonzentrationen zu schaffen.

Vitalität von Zellen

Nach Herbert (Herbert 1990) sollte es eine geeignete Methode zur Bestimmung der Biomasse ermöglichen, alle vorhandenen Organismen zu erfassen und zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellen zu unterscheiden. Für die Metabolomanalyse ist die letztgenannte Anforderung von besonderer Wichtigkeit, da deren alleiniges Ziel das Metabolom einer vitalen Zelle. Die Definition wirft allerdings die Frage auf, welche Charakteristika ein Mikroorganismus erfüllen muss, um das Prädikat „vital“ zu erhalten.

Die möglichen Kriterien zur Eingrenzung der Vitalität einer Zelle sind vielfältig. Eine etablierte Klassifizierung nutzt die im Folgenden aufgeführten vier Merkmale (Nebe-von-Caron, Stephens et al. 2000; Diaz, Herrero et al. 2010; Davey 2011).

- Wachstum
- Metabolische Aktivität
- Membranpotential
- Integrität der Zellmembran

Die Integrität der Zellmembran bildet dabei die Grundlage für die Erfüllung der übrigen Kriterien. Nur eine intakte Zelle ist in der Lage Gradienten und Potentiale zu bilden, um damit die Möglichkeit zur Energiegewinnung und letztlich zur Zellteilung zu schaffen. Der Umkehrschluss, alle intakten Zellen seien gleichzeitig vital, muss hingegen keine Gültigkeit besitzen (Diaz, Herrero et al. 2010).

Die messtechnische Erfassung der Zellvitalität wird dadurch erschwert, dass das Absinken der Vitalität nach gängiger Meinung ein fließender Übergang ohne absolute zu definierende Grenzen (abgesehen von der Integrität der Membran) ist (vgl. Abbildung 3.1).

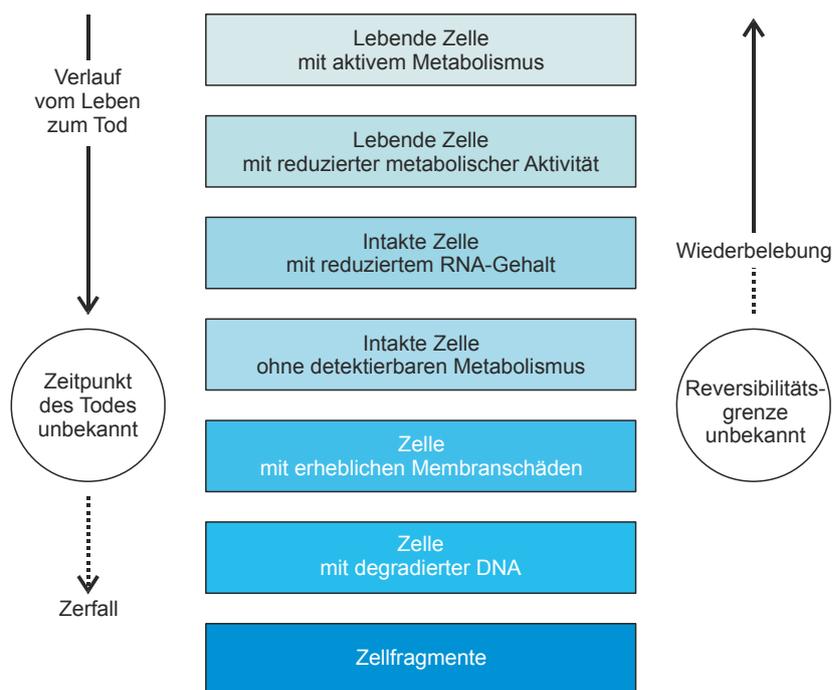


Abbildung 3.1: Grade der Vitalität einer Zelle. Der von oben nach unten dargestellte Vitalitätsverlust ist bis zum Zeitpunkt des Zelltodes vollständig umkehrbar. Der exakte Zeitpunkt des Todes ist unbekannt und geht mit erheblichen Schäden der Membran einher. (Modifiziert nach Davey 2011).

Populationsheterogenität

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass mikrobielle Kulturen nur in sehr seltenen Fällen homogene Populationen darstellen.

Ein von Diaz (Diaz, Herrero et al. 2010) veröffentlichtes Schema, dass von den oben genannten Kriterien lediglich Wachstum, enzymatische Aktivität und Zellintegrität nutzt, teilt eine heterogene Kultur in folgenden Subpopulationen ein (vgl. Abbildung 3.2):

- Vitale Zellen (VC, engl. viable cells)
- Vitale aber nicht teilungsfähige Zellen (VBNC, engl. viable but non-culturable cells)
- Beschädigte Zellen (DAC, engl. damaged cells)
- Tote Zellen (DEC, engl. dead cells)

Per Definition sind VC und VBNC die Zellen einer Kultur, die über eine intakte Membran verfügen, wobei nur VC in der Lage sind sich aktiv zu vermehren. Der Übergang zwischen VC und VBNC ist fließend und in vielen Fällen assoziiert mit einer Verringerung der Zellgröße und des Membranpotentials.

Die Teilung zwischen DAC und DEC beruht darauf, ob eine nicht-integre Zelle bei einem entsprechenden Test enzymatische Restaktivität zeigt (DAC) oder nicht (DEC) (Diaz, Herrero et al. 2010).

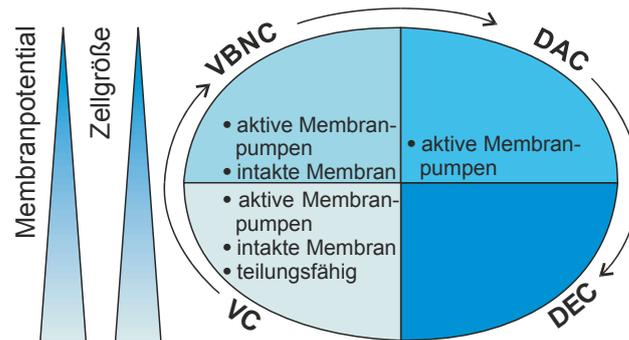


Abbildung 3.2: Schematische Unterteilung einer Kultur in die Subpopulationen vitale Zellen (VC), vitale aber nicht teilungsfähige Zellen (VBNC), beschädigte Zellen (DAC) und tote Zellen (DEC). (Modifiziert nach Diaz, Herrero et al. 2010).

Die einzig relevante Biomasse für die Metabolomanalyse ist diejenige, die über ein Metabolom verfügt. Dabei ist es nicht von Bedeutung, ob die metabolische Aktivität zur Reproduktion genutzt wird oder nicht. Die zu erfassende Biomasse entspricht nach obigem Schema folglich der Summe aus VC und VBNC, da davon ausgegangen werden kann, dass eine nicht-intakte Membran zur Mischung von Zytoplasma und extrazellulärem Raum führt und daher weder in DAC noch in DEC ein relevantes Metabolom vorliegt.

Eine geeignete Definition dieser Biomasse erfolgte 1986 durch Harris, welche die Prozessgröße „Biovolumen“ als das Volumen eines Kultivierungsraums beschreibt, welches von einer geschlossenen Zytoplasmamembran begrenzt wird (Harris, Todd et al. 1987). Als Bezugsgröße für die Metabolitmengen einer Zelle eignet sich das Biovolumen in besonderem Maße, da es sich um eine Volumenangabe handelt und damit die Angabe einer Konzentration ermöglicht.

In vielen Veröffentlichungen wird auf die Bestimmung des Biovolumens verzichtet und die absolute Metabolitmenge ungeachtet der Populationsheterogenität auf die Gesamtbiomasse bezogen. Die Angabe der Konzentration erfolgt in diesen Fällen in der Einheit $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Lange, Eman et al. 2001; Visser, van Zuylen et al. 2002; Wittmann, Kromer et al. 2004; Canelas, Ras et al. 2008).

Der Grund für die Verwendung einer biomassespezifischen Konzentrationsangabe liegt in der messtechnischen Erfassung des Biovolumens, zu der die etablierten Verfahren unterschiedlich gut geeignet scheinen.

Colony forming units (CFU)

Die am häufigsten angewendete Methode zur Bestimmung der „Lebendzellzahl“ einer Kultur ist das Ausplattieren einer Probe auf einem festen Nährboden und die Erfassung der Zellen, die zur Bildung einer Kolonie in der Lage sind. Bei der Anwendung der Methode, werden die Begriffe „Koloniebildend“ und „vital“ durch die Annahme gleichgesetzt, dass jede einzelne vitale Zelle zur Bildung genau einer Kolonie führt.

Vernachlässigt wird bei dieser Interpretation zum einen, dass auch eine Zusammenlagerung von zwei oder mehr Zellen zur Bildung einer einzigen Kolonie führen kann. Zum anderen setzt die Interpretation voraus, dass jede vitale Zelle unter den gegebenen Bedingungen und in derselben Geschwindigkeit in der Lage ist, eine Kolonie zu bilden. Die Möglichkeit, dass sich Teile einer Zellpopulation aufgrund von Stress oder Limitationen in einem „schlafenden“, „statischen“ oder „latenten“ Zustand befinden (VBNC) und aus diesem Grund nicht die Fähigkeit zur Teilung besitzen, wird bei der Gleichsetzung von „vital“ und „kolonie-bildend“ nicht berücksichtigt (Monod 1949; Sonnleitner, Locher et al. 1992; Davey 2011) (vgl. Abbildung 3.3).

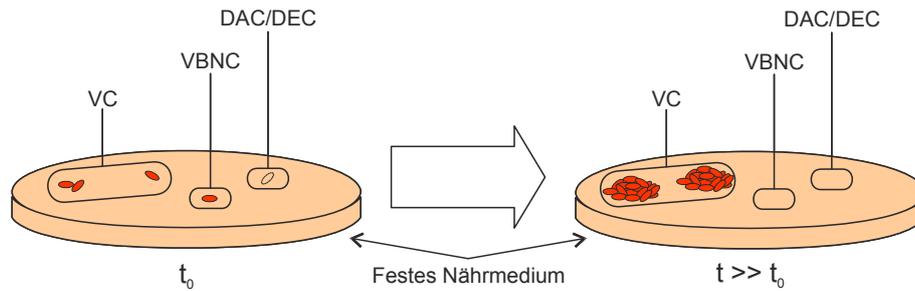


Abbildung 3.3: Koloniebildung unterschiedlicher Subpopulationen. Nach dem Aufbringen einer Probe auf ein festes Nährmedium sind nach einer definierten Inkubationszeit nur die vitalen Zellen (VC) in der Lage eine Kultur zu bilden. Zellen der Subpopulationen VBNC (vitale aber nicht teilungsfähige Zellen), DAC (beschädigte Zellen) und DEC (tote Zellen) sind unter den gegebenen Bedingungen nicht teilungsfähig.

Versteht man die CFU als Lebendzellzahl und setzt sie mit der Anzahl aller Zellen mit intakter Membran gleich, ist bei bekanntem Einzelzellvolumen die Bestimmung des Biovolumens als Produkt aus Einzelzellvolumen und CFU möglich. Mögliche Veränderungen des Einzelzellvolumens im Kultivierungsverlauf können bei dieser Berechnung aber nicht berücksichtigt werden.

Biotrockenmasse (BTM)

Eine weitere etablierte Methode stellt die Bestimmung der Biotrockenmasse dar. Dabei wird ein definiertes Probenvolumen entnommen, die Zellen durch Zentrifugation oder Filtration von der umgebenden Flüssigkeit getrennt und die Biomasse, nach Reinigung und Trocknung, gravimetrisch bestimmt. Abgesehen davon, dass das Verfahren erst bei relativ hohen Zelldichten oder entsprechend großen Probenvolumina akkurate Messergebnisse liefert, besitzt es keine Sensitivität gegenüber strukturellen Veränderungen der Mikroorganismen (Monod 1949).

Das Messsignal gibt keine Auskunft darüber, ob es maßgeblich von nicht-vitaler Biomasse (DAC und DEC) beeinflusst wird. Auch bei der Erfassung vitaler Zellen kann es zu einer starken Beeinflussung des Messsignals aufgrund von intrazellulären Speicherstoffen kommen. Da bei der Probenahme keine Inaktivierung der Zellen erfolgt, könnte der andauernde Stoffwechsel sowohl zu einer Überschätzung (aufgrund von Teilungen) als auch zu einer Unterschätzung (durch die Verstoffwechslung von Speicherstoffen) der tatsächlichen Biomasse führen (Sonnleitner, Locher et al. 1992). Zudem ist das Verfahren arbeits- und zeitintensiv und kann nicht eingesetzt werden, um aufgrund der Biomassekonzentration zum Probenahmezeitpunkt das Probevolumen zu bestimmen.

Die Bestimmung des Biovolumens auf Grundlage der Biotrockenmasse kann nur unter der Voraussetzung erfolgen, dass das spezifische intrazelluläre Volumen der untersuchten Mikroorganismen bekannt ist. Dieses bezeichnet das zytoplasmatische Volumen pro Gramm Biomasse und wird üblicherweise in der Einheit $\mu\text{l mg}^{-1}$ angegeben. Da es sich im Verlauf einer Kultivierung ändert, wäre es für die Erfassung des Biovolumens aufgrund der Biotrockenmasse notwendig, Werte zu verwenden, die den Kultivierungszeitpunkt widerspiegeln (Hiller, Franco-Lara et al. 2007). In der Regel wird für die Berechnung des Biovolumens zur Metabolomanalyse auf diese Anpassung verzichtet (Theobald, Mailingier et al. 1993; Ruijter und Visser 1996; Buziol, Bashir et al. 2002).

Optische Dichte (OD)

Die Messung der optischen Dichte oder Trübung einer Kultur stellt die einfachste und gleichzeitig indirekteste Methode zur Bestimmung der Biomasse in einer Kultur dar. Die Methode wird seit der Entwicklung von photoelektrischen Zellen für den Laborgebrauch 1935 eingesetzt und liefert für viele Anwendungen hinreichend akkurate Ergebnisse.

Eine Primärstrahl von definierter Intensität und Wellenlänge wird zur Messung durch ein definiertes Volumen einer ggf. verdünnten Probe geleitet und die Intensitätsabnahme photoelektrisch bestimmt. Die physikalische Grundlage des Messverfahrens bildet das Lambert-Beersche-Gesetz.

Beim resultierenden Messsignal handelt es sich um die relative Trübung, häufig gegenüber einer Negativkontrolle. Aus diesem Grund ist zur Bestimmung der Biomasse oder des Biovolumens eine Kalibrierung auf Basis einer absoluten Messmethode notwendig. Die oben beschriebene Messung der Biotrockenmasse zeigt in Kultivierungsphasen mit starkem Wachstum eine gute Korrelation zur optischen Dichte. In der Stationärphase oder bei sinkender Biomassekonzentration können aber starke Abweichungen auftreten, da die optische Dichte eine höhere Sensitivität gegenüber morphologischen Änderungen besitzt. Eine Kalibrierung mit der im folgenden Unterpunkt beschriebenen absoluten Zellzahl ist nur unter der Annahme möglich, dass die Kultur einzig von einer homogenen Population von Standardzellen gebildet wird, die identisch in Größe und Form sind und unabhängig von ihrer Ausrichtung bei der photometrischen Messung ein immer gleiches Signal erzeugen (Monod 1949; Bast 2001). Die Berechnung des Biovolumens auf Grundlage der optischen Dichte erfolgt analog zur Berechnung aufgrund der Biotrockenmasse.

Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Bei der direkten mikroskopischen Bestimmung der absoluten Zellzahl werden Zählkammern eingesetzt, die ein definiertes Volumen besitzen und so prinzipiell die Extrapolation der beobachteten Zellzahl auf das Kultivierungssystem ermöglichen. Das Verfahren ist allerdings mit einem starken Fehler behaftet, der vor allem aus der Schwankung des tatsächlichen Flüssigkeitsvolumens der Probe in der Zählkammer resultiert. Die Dicke des untersuchten Flüssigkeitsfilms kann aufgrund von Kapillarkräften um bis zu 50 % vom Sollwert abweichen und beeinflusst damit das Ergebnis. Zudem wird die Methode von Adsorptionseffekten der Zellen an der Oberfläche der Zählkammern beeinflusst (Bast 2001) und ist nur für solche Mikroorganismen einsetzbar, die keine Agglomerate bilden (Monod 1949).

Durchflusszytometrie (DZ)

Eine automatisierte Möglichkeit für die Bestimmung der absoluten Zellzahl, stellt das Durchflusszytometer dar. Das Gerät, das im Wesentlichen aus einem hydraulischen System, einer Lichtquelle, einem optischen System und mehreren Detektoren besteht, kann als „automatisiertes Mikroskop“ verstanden werden (Diaz, Herrero et al. 2010).

Nach der Aufnahme des Probenmaterials erfolgt während der hydraulischen Fokussierung die Umsetzung der Probe in einen linearen Strom von einzelnen Flüssigkeitstropfen, die jeweils eine Zelle oder einen Partikeln beinhalten. Diese sind von einem dünnen Film einer Isolationsflüssigkeit (Mantelstrom) umgeben, wobei es optimaler Weise nicht zu einer Vermischung von Proben- und Isolationsflüssigkeit kommt. Der lineare Strom von Einzelpartikeln passiert eine Messzelle, in der er mit Licht von definierter Intensität und Wellenlänge bestrahlt wird. Häufig dienen Laser als Lichtquellen. Ein System aus optischen Filtern und Photodioden detektiert das von den Partikeln im Probenstrahl gestreute Licht, sowie deren Fluoreszenz und die Gesamtanzahl von Zählereignissen (Events) (vgl. Abbildung 3.4).

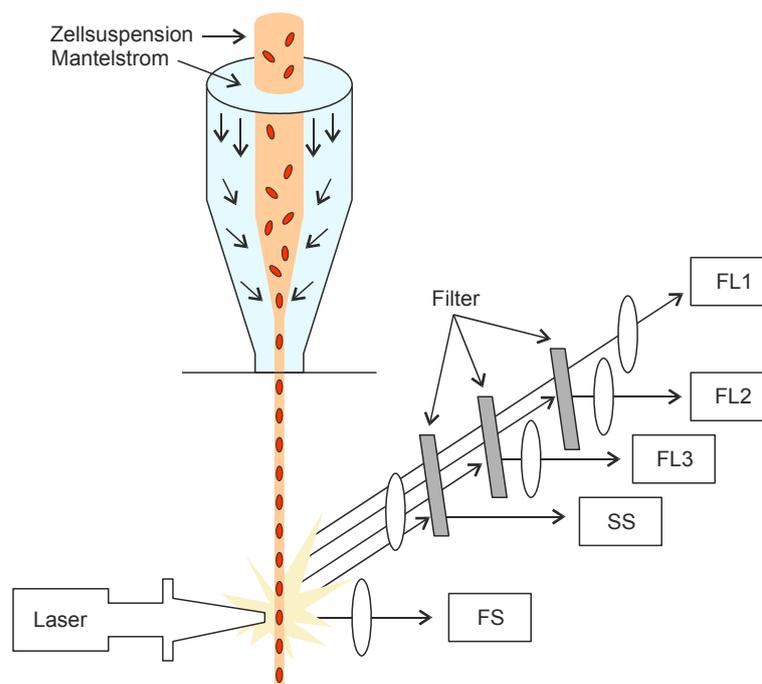


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Die Zellsuspension wird zunächst in einen Strom von Einzelzellen bzw. Partikeln umgewandelt (hydraulische Fokussierung). Jeder Partikel wird in der Messzelle von einer Lichtquelle (Laser) angeregt und erzeugt ein Signal, das mit Hilfe von Spiegeln und Filtern zu unterschiedlichen Detektoren gelangt. Mit Forward Scatter Detektor (FS), Side Scatter Detektor (SF) und Fluoreszenzdetektoren (FL1-FL3). (Modifiziert nach Diaz, Herrero et al. 2010).

Während die Fluoreszenz, abgesehen von selten auftretender Eigenfluoreszenz, vor allem auf selektive Fluoreszenzfärbung von beispielsweise DNS oder Membranbestandteilen beruht, liefert das Streulicht direkte Informationen über den Aufbau der nativen Zelle.

Allgemein wird zwischen Seitenstreulicht (SS, side scatter) und Vorwärtsstreulicht (FS, forward scatter) unterschieden. Es konnte gezeigt werden, dass das FS vor allem von der Partikelgröße abhängt, während das SS von der Zelloberfläche, der Anzahl von Organellen und der interzellulären Granularität beeinflusst wird (Diaz, Herrero et al. 2010).

Darüber hinaus ist es gelungen, auf der Grundlage von Partikelzahlen und FS-Daten sowohl die Biomasse, als auch das Biovolumen bei Kultivierungen von unterschiedlichen Spezies direkt zu bestimmen (Robertson, Button et al. 1998). Da aber das Verhältnis zwischen Biovolumen und FS-Signal nicht linear ist, mussten mathematische Modelle angewendet werden, um die Biomasse bzw. das -volumen bestimmen zu können. Für die Organismen, für die bisher keine Korrelation gezeigt werden konnte, besteht die alternative Möglichkeit aus der Partikelzahl analog zur CFU das Bio-volumen zu berechnen.

Die vollständige Automatisierung der Zellzählung ermöglicht es zudem, statistisch abgesicherte Aussagen auf Grundlage der Detektion von bis zu 10000 Zellen pro Probenahme zu treffen. Wird neben der Streulichtinformation die Möglichkeit genutzt, selektive Fluoreszenzfärbungen vorzunehmen und zu detektieren, kann das Durchflusszytometer dazu dienen, zwischen den oben genannten Subpopulationen zu unterscheiden.

Selektive Fluoreszenzfärbung und Analyse mittels DZ

Eine etablierte Methode zur Unterscheidung von Zellen mit intakter (VC und VBNC) und nicht-intakter Membran (DAC und DEC) ist die duale Färbung der Probe mit den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen Syto 9 und Propidiumiodid. Während der membrangängige Farbstoff Syto 9 alle Zellen penetriert, erfolgt die Färbung mit Propidiumiodid nur bei Zellen mit nicht-intakter Membran. Bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 485 nm emittieren folglich alle Zellen Licht der Wellenlänge 498 nm, während nur Zellen mit verringerter Integrität zusätzlich Licht der Wellenlänge 550 nm emittieren (Molecular Probes 1998).

Trotz des hohen Automatisierungsgrades und der von keiner anderen Methode erreichten Sensitivität scheitert der Einsatz des Durchflusszytometers häufig an der falsch positiven Detektion von Partikeln, die keine Zellen sind. Selbst unter Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen kann nicht ausgeschlossen werden, dass Zelltrümmer oder selbstassoziierte Farbstoffe zu einem Zählereignis führen. Zumal der Einsatz dieser Farbstoffe voraussetzt, dass alle in der Probe vorhandenen Zellen in der Lage sind den Farbstoff in identischer Weise aufzunehmen und der Farbstoff in allen Zellen zu einem Signal von identischer Höhe führt.

Coulter-Counter

Eine 1953 entwickelte Methode, die parallel die Zellzahl und das Biovolumen erfasst, ist die Messung nach dem Coulter-Counter-Prinzip (vgl. Abbildung 3.5).

Diese beruht darauf, dass zwischen zwei mit Elektrolytlösung gefüllten Messzellen, die über eine Messpore verbunden sind, ein elektrischer Strom fließt. Bei der Messung einer Probe wird diese in einer Elektrolytlösung verdünnt und in eine der Messzellen gegeben. Durch starke Pumpen wird ein definiertes Volumen von der einen Messzelle in die andere gezogen. Passiert dabei eine Zelle die Messpore, erhöht sich der elektrische Widerstand temporär und führt zu einem Zählereignis.

Die an den Elektroden anliegende Spannung ist während der Messung konstant, weshalb sich durch die Erhöhung des Widerstands temporär auch der resultierende Stromfluss verringert. Diese Verringerung ist direkt proportional zu dem Volumen an Messlösung, das durch eine Zelle verdrängt wird.

Das Messsignal eines Coulter-Counters ist folglich ein Histogramm, das die Anzahl der gezählten Partikel gegen das von ihnen verdrängte Volumen zeigt. Da der Großteil des von einer Zelle verdrängten Volumens nicht auf die festen Zellbestandteile, sondern auf das Zytoplasma zurückzuführen ist, verdrängen Zelltrümmer und nicht-intakte Zellen ein signifikant kleineres Flüssigkeitsvolumen als intakte Zellen. Dies ermöglicht die Trennung der Messsignale, die von intakten und nicht-intakten Zellen erzeugt werden (Sonnleitner, Locher et al. 1992).

Mit Hilfe des Coulter-Counters ist es ebenfalls möglich, dass durchschnittliche Einzelzellvolumen aus der Division des zytoplasmatische Gesamtvolumen einer Probe durch die Gesamtzellzahl zu berechnen. Unter der Annahme einer globulären Zellform berechnet der Coulter-Counter anhand des durchschnittlichen Einzelzellvolumens darüber hinaus den durchschnittlichen Zelldurchmesser.

Aufgrund der erforderlichen Verdünnung des Probenmaterials in einem Elektrolyten verändern sich bei der Messung die osmotischen Bedingungen der Mikroorganismen erheblich. Eine Volumenänderung der Zellen bis hin zur Lyse kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund der stabilen Zellwände bei Bakterien und Hefen unwahrscheinlich (Drake und Tsuchiya 1973).

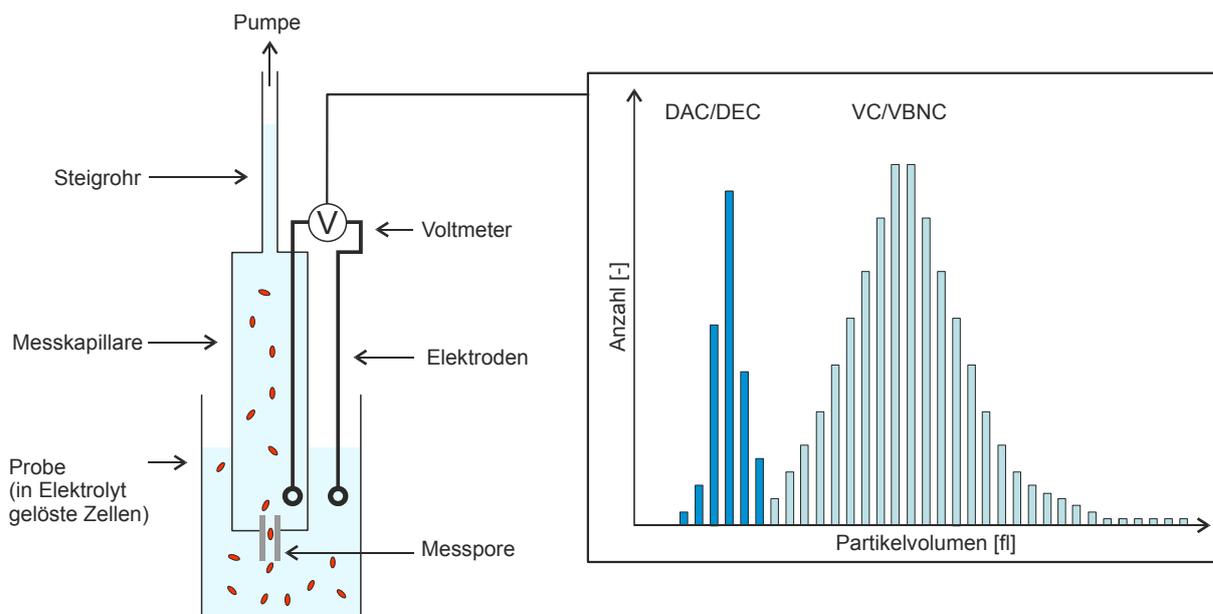


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau eines Coulter-Counters. Starke Pumpen ziehen ein definiertes Probenvolumen durch eine Messpore. Das beim Durchgang durch die Pore von Zellen verdrängte Flüssigkeitsvolumen erhöht den elektrischen Widerstand zwischen den beiden Messelektroden und erzeugt ein Signal. Durch die Messung wird ein Histogramm erzeugt, das die Zählereignisse nach dem Partikelvolumen klassifiziert und so die Trennung zwischen intakten (VC/VBNC) und nicht-intakten Zellen (DEC/DAC) ermöglicht. (Roche Diagnostics GmbH 2010).

Dielektrische Leitfähigkeitsmessung

Als weitere Methode zur Bestimmung des Biovolumens kann die dielektrische Leitfähigkeitsmessung (Permittivitätsmessung) eingesetzt werden (vgl. Abbildung 3.6). Das Verfahren nutzt die Eigenschaft von Membranen in einem elektrischen Feld als Kondensator zu wirken. Sowohl beim Zytoplasma als auch bei der extrazellulären Flüssigkeit handelt es sich um elektrisch leitende Medien, die durch eine isolierende Membran voneinander getrennt sind (Takashima, Soda et al. 1988). Wird in einer Probe ein elektrisches Feld angelegt, bewegen sich folglich alle Ionen in Zytoplasma und extrazellulärer Flüssigkeit entsprechend ihrer Ladung. Da die Zytoplasmamembran die Bewegung der Ionen begrenzt, kommt es zu einer Speicherung von elektrischer Energie, die als elektrische Kapazität bezeichnet wird. Die elektrische Kapazität eines Kondensators, in diesem Fall einer biomassehaltigen Probe, ist für eine gegebene Messanordnung direkt proportional zu deren elektrischer Leitfähigkeit.

Die Messung der Kapazität erfordert einen regelmäßigen Wechsel der Feldrichtung. Dieser bewirkt eine Neuordnung der Ionen und eine entgegen gesetzte Polarisierung der Zellmembranen. Da die Stärke der Polarisierung von der Zahl der Ionen abhängt, die die Membran erreichen, bevor die Feldrichtung erneut umgekehrt wird, ist die Kapazität einer Probe abhängig von der Messfrequenz, der Größe der untersuchen Organismen, sowie der intrazelluläre Ladungsdichte. Unter der Annahme einer konstanten Ladungsdichte sollte das Messsignal für eine gegebene Messfrequenz folglich direkt proportional zum Biovolumen sein. Die optimalen Messfrequenzen für Bakterien, Pilze und Zellkulturen können aufgrund der deutlichen Größenunterschiede allerdings stark variieren.

Da theoretisch weder Luftblasen, noch Zelltrümmer, beschädigte Zellen oder Öl-Tröpfchen eine elektrische Kapazität besitzen, sollte das Verfahren äußerst robust gegenüber Fehldetektionen sein (Drake und Tsuchiya 1973; Harris, Todd et al. 1987; Nipkow, Andretta et al. 1990; Fehrenbach, Comberbach et al. 1992; Yardley, Kell et al. 2000).

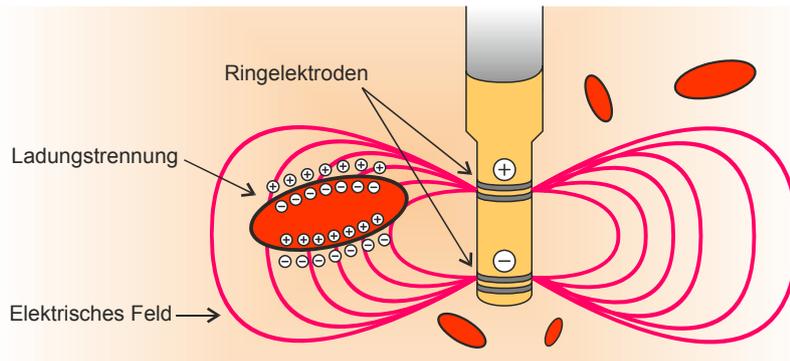


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau der Kapazitätssonde Futura (ABER Instruments). Die Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle ordnen sich entsprechend ihrer Ladung an, wodurch elektrische Energie gespeichert wird. Im Idealfall sollte die daraus resultierende dielektrische Kapazität unmittelbar mit dem Biovolumen korrelieren (Modifiziert nach Logan 2010).

3.1.2. Probenahme

Die Entnahme von Biomasse und extrazellulärem Medium aus einem Kultivierungssystem stellt den ersten Schritt einer Metabolomanalyse dar und gibt damit den Rahmen der Analyse vor. Sind die zur Probenahme eingesetzten Techniken unpräzise, beeinflusst dies alle nachfolgenden Schritte der Analyse und verfälscht die Messergebnisse nachhaltig. Aufgrund der hohen Relevanz der Probenahme für die Qualität der resultierenden Metabolomdaten wurde in den letzten zwanzig Jahren kontinuierlich an der technischen Verbesserung der Probenahmeverfahren gearbeitet. Eine Vielzahl von Systemen wurde entwickelt und eingesetzt, wobei ein allgemeines Standardverfahren bisher nicht gefunden werden konnte (Schadel und Franco-Lara 2009).

Allgemeine Anforderungen

Eine Probenahme, die zur Generierung von Metabolomdaten geeignet ist, zeichnet sich im Wesentlichen durch folgende Merkmale aus:

1. Sie ermöglicht die exakte Entnahme eines definierten Probenvolumens.
2. Die Weiterbearbeitung der Probe, insbesondere die Inaktivierung des biologischen Materials, wird durch sie nicht verzögert.
3. Es erfolgt keine Verunreinigung der Probe.

Wird die Kultivierung in einem Reaktor durchgeführt, erfolgt die Probenahme meist über ein im Deckel oder in der Seitenwand eingelassenes Ventil. Da das Totvolumen des jeweiligen Ventils die Probe verunreinigt, wurde bereits in einem 1981 von Iversen (Iversen 1981) veröffentlichten Ventil eine Möglichkeit integriert, dieses ohne Zeitverlust zu verwerfen. Spätere Entwicklungen konzentrierten sich hingegen vor allem auf die Minimierung des Totvolumens (Theobald, Mailingier et al. 1993). Die Beprobung kann sowohl manuell als auch semi-automatisch erfolgen.

Manuelle Beprobung

Da der Großteil der semi-automatischen Probenahmesysteme nur über eine geringe Mobilität (räumliche Flexibilität) verfügt, sind diese für den Einsatz in hoch variablen experimentellen Fragestellungen eher ungeeignet. Aus diesem Grund ist die manuelle Probenahme mittels Spritze das noch immer am häufigsten eingesetzte Verfahren (Bolten, Kiefer et al. 2007).

Das Verfahren ist innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne realisierbar, führt nicht zu einer Vergrößerung des Totvolumens und ermöglicht die unmittelbare Weiterbearbeitung des Probenmaterials.

Größter Nachteil der manuellen Beprobung ist die Gefahr von Volumenfehlern. Die verwendeten Spritzen verfügen meist nicht über eine geeichte Skalierung, normierte Handhabungsvorschriften existieren ebenfalls nicht.

Eine Alternative, die eine exakte manuelle Beprobung ermöglicht, stellt die Pipette dar. Der Einsatz einer Pipette erfordert bei der Kultivierung in einem Reaktorsystem zunächst die Entnahme eines nicht definierten Probenvolumens in ein Lagergefäß, von dem aus ein definiertes Probenahmevolumen in das eigentliche Probenahmegefäß pipettiert werden kann. Der notwendige Zwischenschritt führt zu einem zeitlichen Versatz, der die Inaktivierung des Stoffwechsels verzögert. Darüber hinaus ist es notwendig, die eingesetzten Pipetten bei der Temperatur des biologischen Materials zum Zeitpunkt der Probenahme zu kalibrieren, um exakte Ergebnisse zu erzielen (Ewald 2005).

Semi-automatische Beprobung

Die Entnahme eines definierten Probevolumens stellt auch für die semi-automatische Probenahme eine Herausforderung dar. Für diese ist nicht nur die genaue Steuerung der eingesetzten Ventile entscheidend, sondern auch die Triebkraft der Probenahme. Wird Über- oder Unterdruck eingesetzt, um einen Volumenstrom zu erzeugen, resultiert das Probevolumen aus der Öffnungszeit des Ventils und dem angelegten Druck (vgl. Abbildung 3.7).

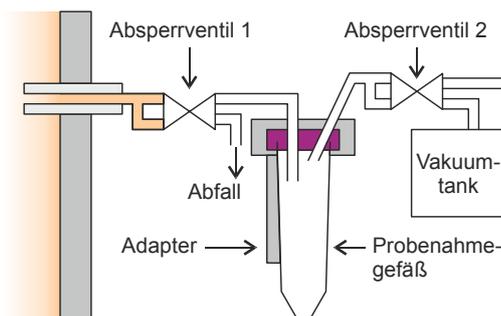


Abbildung 3.7: Semi-automatisches Probenahmesystem nach Lange. Triebkraft der Probenahme stellt ein in einem Tank erzeugtes Vakuum dar. Durch die Öffnung der Absperrventile 1 und 2 wird zunächst das Totvolumen der Probenahmestrecke verworfen. Nachfolgend wird die Probe direkt in ein Probenahmegefäß gezogen, das zur Inaktivierung des Stoffwechsels mit einer Quenchinglösung gefüllt werden kann (Modifiziert nach Lange, Eman et al. 2001).

Beim Einsatz dieser Systeme muss gewährleistet werden, dass der wirkende Druck bei jeder Probenahme identisch ist oder dass die Öffnungszeit den geänderten Druckverhältnissen angepasst wird. Für viele Kultivierungssysteme, die auf den Einsatz von Glasgefäßen angewiesen sind, birgt der Einsatz von Überdruck zudem ein Sicherheitsrisiko.

Der Einsatz eines Pumpensystems ermöglicht im Vergleich zu Über- oder Unterdrucksystemen zwar die exakte Beprobung, besitzt aber den Nachteil, dass die eingesetzten Schlauchleitungen meist große Totvolumina aufweisen und das Probenmaterial vergleichsweise lange im Probenahmesystem verbleibt (vgl. Abbildung 3.8).



Abbildung 3.8: Probenahmesystem SegFlow (Flownamics). Eine Probe wird mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe aus dem Kultivierungssystem gezogen und in ein Schlauchsystem geleitet. Von dort kann sie in bis zu sechs unterschiedliche Einzelvolumina aufgeteilt und weiterprozessiert werden (Flownamics Produktkatalog 2011)

Der zeitliche Versatz zwischen der Entnahme der Probe aus der Kultivierung und der weiteren Bearbeitung kann abhängig vom verwendeten Probenahmesystem mehrere Minuten betragen, was alle zum aktuellen Zeitpunkt etablierten Pumpensysteme für die Metabolomanalyse ungeeignet macht.

Erzeugung technischer Replikate

Eine weitere Frage, die sich bei der Probenahme für die Metabolomanalyse sowohl für die manuellen, als auch für die semi-automatischen Verfahren stellt, ist die Erzeugung technischer Replikate. Grundsätzlich existieren zwei unterschiedliche methodische Ansätze (vgl. Abbildung 3.9).

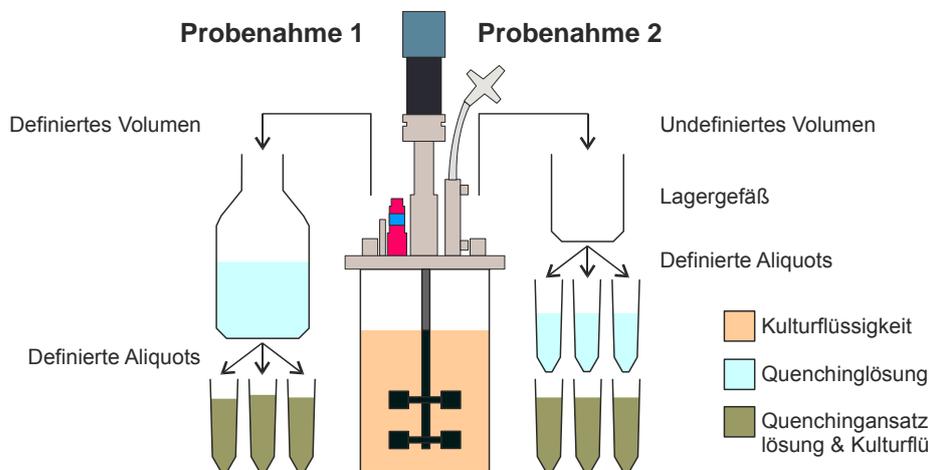


Abbildung 3.9: Erzeugung technischer Replikate zur Metabolomanalyse. Probenahme 1 zeigt Entnahme und unmittelbares Quenchen eines definierten Volumens, das nachfolgend in definierte Aliquots aufgeteilt wird. Probenahme 2 zeigt die Entnahme eines undefinierten Volumens, das vor dem Quenchen in definierte Einzelvolumina geteilt wird.

Zum einen kann ein Probenvolumen aus dem Kultivierungssystem entnommen werden, das für mehrere Proben ausreicht. Dieses wird nach der Inaktivierung (Quenchen) in mehrere Einzelvolumina aufgeteilt. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass die Inaktivierung aller Zellen zum gleichen Zeitpunkt erfolgt. Nachteilig ist hingegen, dass die Zellen im Gesamtansatz aufgrund des Dichteunterschieds zwischen Zellen und Quenchingflüssigkeit in kurzer Zeit sedimentieren und sich nur schwer gleichmäßig verteilen lassen. Dieser Umstand erschwert das Aliquotieren und führt zu einer verlängerten Inkubationszeit der Zellen mit der Quenchinglösung.

Alternativ ist es möglich mehrere Einzelvolumina aus dem Kultivierungssystem zu entnehmen und sukzessive zu inaktivieren. In diesem Fall erfolgt auch die Inaktivierung der Proben sukzessive und ein zeitlicher Versatz des Stoffwechsels zwischen den Replikaten ist nicht auszuschließen.

3.1.3. Quenching

Die besondere Herausforderung bei der Analyse intrazellulärer Metabolite besteht in ihrer geringen Konzentration und ihrer schnellen Umsetzung durch den untersuchten Stoffwechsel (Saez und Lagunas 1976). Die Analyse erfordert folglich die Inaktivierung des mikrobiellen Stoffwechsels in einem Zustand, der dem der vitalen Zelle so ähnlich wie möglich ist. Die Inaktivierung (Quenching) muss dazu in einer Geschwindigkeit erfolgen, die höher ist als die der schnellsten intrazellulären Umsetzungsreaktion (Lange, Eman et al. 2001).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Quenchingmethoden entwickelt und zur Generierung von Metabolomdaten eingesetzt. Die Inaktivierung wird dabei entweder durch eine rasche Änderung der Proben temperatur oder des pH-Wertes erreicht.

Quenching durch Temperaturänderung

Beim thermischen Quenching findet sowohl die Erhöhung der Temperatur auf unphysiologische Werte über 75°C, als auch die Abkühlung in den deutlich negativen Temperaturbereich zwischen -20°C und -80°C Anwendung.

Das Quenching bei hohen Temperaturen bietet den Vorteil, dass es aufgrund von Aggregation, Konformitätsänderung, Proteolyse oder chemischen Veränderungen von Aminosäuren zur irreversiblen Inaktivierung von Enzymen kommt (Schaub, Schiesling et al. 2006). Bei allen anschließenden Bearbeitungsschritten der Metabolomanalyse besteht folglich nicht die Gefahr einer weiteren Verstoffwechslung. Metabolite, die potentiell temperaturlabil sind, könnten allerdings ebenfalls zerfallen. Etablierte Methoden basieren auf dem Einsatz von Wärmetauschern (Schaub, Schiesling et al. 2006) oder kochenden Quenchinglösungen (Gonzalez, Francois et al. 1997; Winder, Dunn et al. 2008), wobei die Probe direkt in ein definiertes Volumen an Quenchinglösung gegeben wird.

Das für Hefen und Bakterien am häufigsten eingesetzte Quenchingverfahren nutzt die Temperaturenniedrigung unter Einsatz von kalten wässrigen Methanol-Lösungen (de Koning und van Dam 1992). Wie beim Quenching mit kochenden Lösungen wird die Probe direkt in ein definiertes Volumen an Quenching-Lösung gesprüht, die in diesen Fällen aus 50 – 100 % -igem Methanol mit abweichenden Supplementen besteht und vor der Zugabe der Probe auf -20°C bis -80°C gekühlt wird.

Quenching durch pH-Änderung

Die dritte verbreitete Methode ist das Quenching mit Perchlorsäure (Theobald, Mailinger et al. 1993; Weuster-Botz 1997). Auch bei diesem Verfahren wird die Probe unmittelbar in die Quenchinglösung gegeben, die Inaktivierung erfolgt allerdings aufgrund des Wechsels des pH-Wertes.

Die Methode besitzt den Nachteil, dass sie sich nur für säurestabile Metabolite eignet. Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Inaktivierung von Hefen allein durch den pH-Wechsel nicht erfolgreich ist (de Koning und van Dam 1992).

Abgesehen von der Art der Inaktivierung unterscheiden sich Protokolle zur Generierung von Metabolomdaten dahingehend, ob Quenching und Extraktion aufeinanderfolgende Arbeitsschritte sind oder parallel erfolgen (vgl. Abbildung 3.10).

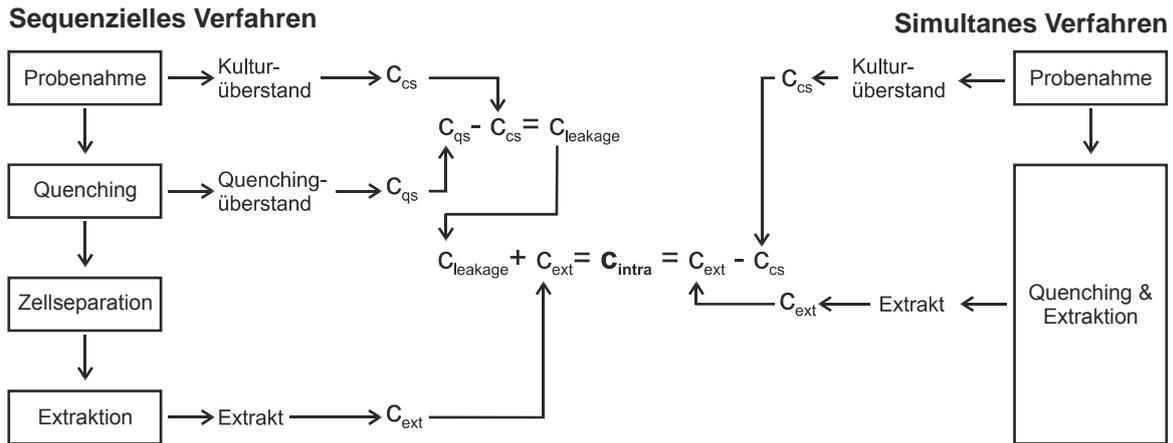


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Berechnung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen beim sequenziellen und simultanen Quenching. Das sequenzielle Quenching erfordert die separate Analyse des Kulturüberstandes (C_{cs}), des Quenchingüberstandes (C_{qs}) und des Extraktes (C_{ext}). Aus der Differenz der Metabolitkonzentration in Quenching- und Kulturüberstand ergibt sich das Leakage. Dieses muss zur Konzentration des Extraktes addiert werden, um die intrazelluläre Konzentration zu (C_{intra}) erhalten. Das simultane Quenching erfordert lediglich die Analyse des Kulturüberstandes und der kombinierten Quenching-/Extraktionslösung. Die intrazelluläre Konzentration ergibt sich aus der Differenz beider Konzentrationen.

Sequenzielles Quenching

Beim sequenziellen Quenching erfolgt im Anschluss an die Inaktivierung eine Zellabtrennung. Die Extraktion der Metabolite findet in einem Reaktionsraum statt, der im Optimalfall neben der Biomasse nur das Extraktionsmittel enthält (de Koning und van Dam 1992). Ein wesentlicher Nachteil des Verfahrens ist, dass die Veränderungen der Temperatur und des osmotischen Drucks sowie der Einfluss der organischen Lösungsmittels (wenn erforderlich) häufig zu einem Austritt von Metaboliten aus der Zelle in die umgebende Flüssigkeit führen kann.

Der als Leakage bezeichnete Effekt wird seit der ersten Beobachtung intensiv untersucht und kontrovers diskutiert. Für Hefen und Bakterien wurde beispielsweise nach Quenching mit kalten methanolischen Lösungen sowohl das Auftreten (Wittmann, Kromer et al. 2004; Bolten, Kiefer et al. 2007; Villas-Boas und Bruheim 2007; Wellerdiek, Winterhoff et al. 2009) als auch die Abwesenheit (de Koning und van Dam 1992; Gonzalez, Francois et al. 1997; Moritz, Striegel et al. 2000) von Leakage-Effekten berichtet. Eine Ursache der Widersprüchlichkeit könnte in der Anwendung unterschiedlich sensitiver Analysemethoden liegen (Canelas, Ras et al. 2008).

Eine Verringerung der Zellintegrität während des Quenchings wurde hingegen mehrfach bestätigt und ist aufgrund der drastischen Milieuänderungen, denen die Mikroorganismen ausgesetzt werden, nicht überraschend (Villas-Boas, Hojer-Pedersen et al. 2005; Schädel, David et al. 2011). In verschiedenen Ansätzen wurde daher bereits versucht, die Zellintegrität durch Additive zur Quenchinglösung aus dem Bereich der Cryo-, z.B. Glycerol (Link, Anselment et al. 2008), und Osmoprotektiva, z.B. Threalose oder Mannitol (Schädel, David et al. 2011), sowie durch Stabilisierung des pH-Wertes, z.B. HEPES (Hiller, Franco-Lara et al. 2007), zu erhöhen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist allerdings nach wie vor unklar, ob es beim Quenching zu einem partiellen Metabolitverlust aller Zellen kommt, oder ob ein Teil der Zellen ihre Integrität und damit ihr Metabolom vollständig verlieren (vgl. Abbildung 3.11).

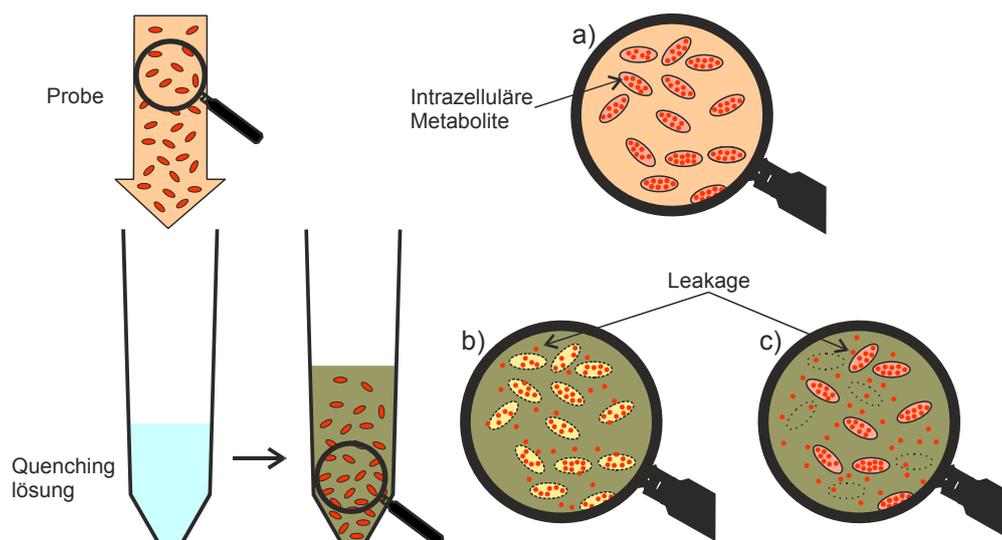


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung unterschiedlicher Theorien zum Leakage. Eine Probe mit intakten Zellen wird in eine Quenchinglösung gegeben. a) zeigt die Probe vor dem Quenching, in der alle Zellen intakt sind und der extrazelluläre Raum frei von Metaboliten ist. b) und c) zeigen die Probe nach dem Quenching. In b) wird das Leakage dadurch verursacht, dass die Integrität aller Zellen verringert wird und daher alle Zellen einen Teil ihrer Metabolite verlieren. In c) bewirkt das Quenching die vollständige Lyse einiger Zellen, während die restlichen Zellen intakt bleiben und keine Metabolite verlieren.

Der Annahme, dass Zellyse die einzige Ursache des Leakage ist, widerspricht die Beobachtung, dass der Effekt in vielen Fällen metabolitspezifisch aufzutreten scheint (Link, Anselment et al. 2008). Die Tatsache, dass die Verhältnisse der durch Leakage ausgetretenen Metabolite nicht den intrazellulären Verhältnissen entsprechen, deutet darauf hin, dass neben der zweifelsfrei auftretenden Verringerung der Integrität auch ungewollte Extraktion aus intakten Zellen erfolgt (Mashego, Gulik et al. 2007; Villas-Boas und Bruheim 2007). Tritt Leakage auf, ist ungeachtet des Ursache eine Detektion des Metabolitverlustes und dessen Einbeziehung in die Interpretation von Metabolomdaten unbedingt erforderlich (Mashego, Gulik et al. 2007).

Eine quantitative Bestimmung des Leakage kann durch die Differenzbildung zwischen der Metabolitkonzentration im Überstand bzw. Filtrat der Quenchinglösung nach dem Quenching und der extrazellulären Metabolitkonzentration vor dem Quenching erfolgen (Wittmann, Kromer et al. 2004). Wird das Leakage auf das absolute Biomassevolumen bezogen, ergibt sich die native intrazelluläre Metabolitkonzentration aus der Summe der Konzentration des Zellextraktes und dem Leakage (Link, Anselment et al. 2008).

Simultanes Quenching

Beim simultanen Quenching erfolgt vor der Extraktion keine Zellabtrennung. Die Metabolite gehen aus dem zytoplasmatischen Raum in eine Mischung aus Zytoplasma, extrazellulärem Kulturmedium und Extraktionsmittel über (Theobald, Mailing et al. 1993).

Der Leakage-Effekt besitzt bei der Anwendung simultaner Verfahren folglich keine Relevanz, da der Verlust der Zellintegrität und die Extraktion alle Metabolite unmittelbares Ziel sind. Ein Problem simultaner Verfahren stellt hingegen die große Verdünnung intrazellulärer Metabolite dar, die allein aufgrund des niedrigen Anteils des Zytoplasmavolumens an der Probe einen erheblichen Einfluss auf die Detektierbarkeit von Metaboliten besitzen kann (Villas-Boas, Hojer-Pedersen et al. 2005) (vgl. Abbildung 14).

Neben der hohen Verdünnung stellt die differenzierte Detektion von intra- und extrazellulären Metaboliten eine Herausforderung für simultane Quenchingverfahren dar. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung ist die sogenannte „Differentialmethode“ (Fajjes, Mars et al. 2007; Canelas, Ras et

al. 2008), bei der die extrazelluläre Metabolitkonzentration von der des Extraktes subtrahiert wird, um die intrazelluläre Konzentration zu berechnen.

Aufgrund der hohen Verdünnungsrate können allerdings bereits geringe extrazelluläre Konzentrationen die intrazellulären Metabolite vollständig überlagern (Faijes, Mars et al. 2007).

3.1.4. Zellseparation

Bei der Anwendung von simultanen Quenching-Extraktionsverfahren stellt die Zellabtrennung meist einen manuellen Filtrationsschritt dar, dessen Ziel die vollständige Entfernung von Feststoffen bei minimalem Zeitaufwand und Energieeintrag darstellt.

Für die Trennung von gequenchten Zellen und extrazellulärer Flüssigkeit bei Anwendung einer sequenziellen Methode gelten grundsätzlich identische Anforderungen, wobei deren Erfüllung eine weit höhere Priorität besitzt:

- Die Zeit, die zur Abtrennung benötigt wird, bedingt die Inkubationszeit der Zellen mit der Quenchinglösung und kann damit das Leakage erhöhen (Canelas, Ras et al. 2008).
- Mit steigender Separationszeit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die durchgehende Kühlung der Zellen (bei Anwendung von thermischen Quenchingverfahren) nicht gewährleistet werden kann.
- Die benötigte Separationszeit stellt eine Arbeitsbelastung für und potentielle manuelle Fehler durch den Experimentator dar (Schaub, Schiesling et al. 2006).
- Der physikalische Energieeintrag dem die Zellen während der Zellabtrennung ausgesetzt sind ist abhängig von der Methode der Abtrennung und stellt eine weitere mögliche Einflussgröße auf das Leakage dar.

Die Zellseparation für die Metabolomanalyse wird grundsätzlich entweder durch einen Zentrifugations- oder durch einen Filtrationsschritt erreicht.

Zentrifugation

Das klassische Verfahren zur Zellabtrennung ist die Zentrifugation (de Koning und van Dam 1992). Bei Einsatz dieses Verfahrens ist die Vollständigkeit der Zellabtrennung von den wirkenden g-Kräften und der Zentrifugationsdauer abhängig. Die Anforderungen Schnelligkeit, Vollständigkeit und niedriger Energieeintrag schließen sich bei Einsatz der Zentrifugation folglich aus.

Ein weiteres Problem der Zentrifugation ist das Probenvolumen. Die Zentrifugation ist aufgrund von Rotorgeometrien an den Einsatz von Standard-Reaktionsgefäßen gebunden. Gleichzeitig mit dem maximalen Probenvolumen wird damit das Biovolumen festgelegt, welches mindestens in einer Kultivierung erreicht werden muss, um eine Metabolomanalyse durchzuführen. Da für die vollständige Abbildung des Metaboloms die Extraktion aus einer bestimmte Menge an Biomasse erforderlich ist, muss die Biomassekonzentration zum Probenahmezeitpunkt so hoch sein, dass eine entsprechende Menge in einem Volumen enthalten ist, welches das Volumen eines Standard-Reaktionsgefäßes nicht übersteigt.

Mit Hilfe der Zentrifugation ist es daher nicht möglich bei einer geringen Konzentration die Zellen aus einem entsprechend größeren Volumen abzutrennen, um das erforderliche Biovolumen zu erreichen.

Filtration

Ein Alternativverfahren zur Zellabtrennung stellt die Filtration oder Vakuumfiltration dar (Saez und Lagunas 1976). Abhängig vom untersuchten Organismus werden dazu unterschiedliche Filter mit variierenden Porendurchmessern (z.B. Cellulosenitrat 0.45 µm Porendurchmesser für *C. glutamicum* (Wittmann, Kromer et al. 2004), A/D-Filter 3 µm Porendurchmesser für tierische Zellkulturen (Volmer, Northoff et al. 2011)) oder auch Glasfaserfilter (z.B. für *A. niger* (Ruijter und Visser 1996)) verwendet.

Die Filtration erfordert im Vergleich zur Zentrifugation einen höheren manuellen Einsatz, da Standardfiltermodule manuell mit geeigneten Membranen bestückt und nach der Beladung mit Biomasse sorgfältig behandelt werden müssen. Zudem ist die durchschnittliche Porengröße, die letztlich die Vollständigkeit der Biomasseabtrennung definiert, stark abhängig von der Temperatur des Filtermediums.

Extrazelluläres Restvolumen

Ein Qualitäts- oder Funktionalitätsmerkmal der Zellabtrennung ist, unabhängig vom Verfahren, das inter- bzw. extrazelluläre Restvolumen. Dieses bezeichnet nicht nur die Flüssigkeit, die sich nach der Zellabtrennung zwischen den Zellen befindet, sondern jegliche extrazelluläre Flüssigkeit. Zu dem Volumen zählt damit auch die Flüssigkeit, die an den Wänden von Reaktionsgefäßen haftet oder im Totraum von Filtermembranen verbleibt (vgl. Abbildung 3.12).

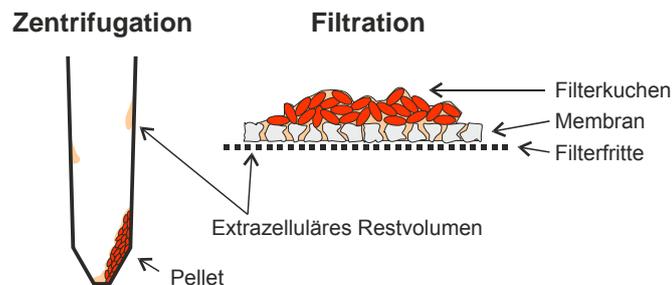


Abbildung 3.12: Extrazelluläres Restvolumen bei Zentrifugation und Filtration.

Bei der Generierung von Metabolomdaten ist das extrazelluläre Restvolumen aus zwei Gründen relevant:

1. Es enthält ggf. eine nicht zu vernachlässigende Konzentration an Metaboliten (Ishizaki, Yamamoto et al. 1995)).
2. Es erweitert das Volumen des Extraktionsmittels und führt so zu einem falsch-niedrigen Konzentrationswert.

Die Bestimmung des extrazellulären Restvolumens ist äußerst aufwendig. Mit Hilfe von gravimetrischen (Buchholz, Takors et al. 2001) und radioaktive Verfahren wurde das Volumen für konkrete Prozesse quantifiziert. Die ermittelten Volumina lagen dabei um bis zu 200 % über dem Volumen der abgetrennten Biomasse.

Nach aktuellem Kenntnisstand ist die vollständige Entfernung der extrazellulären Flüssigkeit ein mit Standardverfahren nicht erreichbarer Optimalzustand, der für die Metabolomanalyse theoretisch aber unverzichtbar ist (Ishizaki, Yamamoto et al. 1995; Buchholz, Takors et al. 2001; Wittmann, Kromer et al. 2004).

3.1.5. Extraktion

Da die Quantifizierung von Metaboliten gegenwärtig nicht *in vivo* erfolgen kann, erfordert jedes Analyseverfahren einen Extraktionsschritt. Für die Analyse von Metaboliten müssen diese aus dem Zytoplasma extrahiert werden, wobei Zellmembranen und Wände physikalische Barrieren für den Stoffübergang darstellen.

Die Extraktion von intrazellulären Metaboliten erfolgt meist über ein Extraktionsmittel, das vollständig mit dem Zytoplasma mischbar ist. Die Extraktion wird dabei unterstützt, indem die Integrität der Zellen physikalisch (Temperatur, Ultraschall, Mahlen, usw.), chemisch (Methanol, Chloroform, usw.) oder biologisch (enzymatisch) herabgesetzt wird.

Allgemeine Anforderungen

Optimaler Weise sollte die angewendete Methode die folgenden Anforderungen erfüllen:

- Sie sollte die Extraktion der vollständigen Menge eines Metaboliten bewirken (Maharjan und Ferenci 2003).
- Die Extraktion sollte für alle Metaboliten gleichermaßen erfolgen. Eine selektive Extraktion aufgrund von physikalischen und chemischen Eigenschaften einzelner Metaboliten oder Metabolitgruppen würde die Analyse stark verfälschen (Maharjan und Ferenci 2003).
- Die Extraktion darf nicht zum Zerfall oder zur Modifikation der Metabolite führen (Maharjan und Ferenci 2003).
- Die Kompatibilität der eingesetzten Lösungsmittel mit der anschließenden Analytik muss gewährleistet sein.

Aufgrund der physikalischen und chemischen Vielfalt des Metaboloms herrscht allerdings Einigkeit darüber, dass eine Methode, welche die obigen Kriterien vollständig erfüllt, zurzeit nicht verfügbar ist (Villas-Boas, Hojer-Pedersen et al. 2005).

Die etablierten Methoden zur Extraktion intrazellulärer Metabolite sind in vielen Fällen für eine bestimmte Stoffgruppe entwickelt worden und besitzen für diese eine besonders hohe Effizienz (Maharjan und Ferenci 2003). Der Vergleich von verschiedenen Extraktionsmethoden hinsichtlich der bestmöglichen Abbildung des gesamten Metaboloms führt daher häufig zu uneindeutigen Ergebnissen.

Extraktionsmethoden

Die am häufigsten eingesetzten Methoden zur Extraktion von Metaboliten nutzen als Extraktionsmittel kochendes Methanol (Shryock, Rubio et al. 1986), kochendes Ethanol (Gonzalez, Francois et al. 1997), kochendes Wasser (Bhattacharya, Fuhrman et al. 1995), kaltes Methanol (Grob, O'Brien et al. 2003), Methanol-Chloroform (de Koning und van Dam 1992), Kaliumhydroxyd (Hajjaj, Blanc et al. 1998) oder Perchlorsäure (Ryll und Wagner 1991).

Unter Anwendung unterschiedlicher Kriterien wurden diese und andere Methoden für Bakterien, z.B. *E. coli* (Maharjan und Ferenci 2003; Hiller, Franco-Lara et al. 2007; Winder, Dunn et al. 2008), *L. plantarum* (Faijes, Mars et al. 2007), *S. degradans* (Shin, Lee et al. 2010), Säugerzellen (Ritter, Genzel et al. 2008; Dietmair, Timmins et al. 2010), filamentöse Pilze (Hajjaj, Blanc et al. 1998) und Hefen (Canelas, Ras et al. 2008) verglichen. Die Ergebnisse der unabhängigen Studien bestätigen, dass keine der Extraktionsmethoden allgemeine Gültigkeit besitzt und demonstrieren, dass die Wahl der Extraktionsmethode einen erheblichen Einfluss auf die resultierenden Daten einer Metabolomanalyse besitzt.

Eine Methode, die unabhängig von Organismus in der Lage ist, ein breites Metabolitspektrum abzubilden, ist die Extraktion mit kalten methanolischen Lösungen (Maharjan und Ferenci 2003; Nasution, Van Gulik et al. 2006; Faijes, Mars et al. 2007). Dies könnte dadurch begründet sein, dass die meist polaren Metabolite eine gute Löslichkeit in dem polaren Lösungsmittel besitzen und dass es vollständig mit dem Zytoplasma mischbar ist. Zudem kann die Extraktion bei neutralen pH-Werten und niedrigen Temperaturen durchgeführt werden und führt so nicht zum Zerfall pH- oder thermolabiler Metabolite.

Extraktionseffizienz

Eine Schwierigkeit bei der Beurteilung von Extraktionsmitteln und -methoden besteht darin, dass die intrazelluläre Metabolitkonzentration theoretisch vor der Extraktion bekannt sein müsste, um die Effektivität aufgrund der Wiederfindung in den Extrakten beurteilen zu können. Da dies nicht möglich ist, werden zur Kontrolle beziehungsweise Korrektur in einigen Fällen interne Standards eingesetzt (Ruijter und Visser 1996; Hiller, Franco-Lara et al. 2007; Villas-Boas und Bruheim 2007). Dabei handelt es sich meist um isotonen-markierte Analoga der Zielmetabolite, die den Zellen vor der Extraktion zugegeben werden, und sich bei der Extraktion in identischer Weise verhalten, wie die zelleigenen Metabolite. Auf diese Weise soll eine Korrektur unspezifischer oder systematischer Effekte ermöglicht werden (thermische und chemische Instabilität, Verteilungsgleichgewichte, usw.).

Weitere Methoden, die zur Untersuchung der Extraktionseffizienz eingesetzt werden, basieren auf der Messung der Zellintegrität mit Hilfe selektiver Fluoreszenzfärbung (Schaub, Schiesling et al. 2006) oder der radioaktiven Markierung des Metaboloms und dem Vergleich der Ausgangsradioaktivität mit der Radioaktivität der Extrakte (Maharjan und Ferenci 2003). Während das erstgenannte Verfahren dazu neigt, auch bei einer selektiven Permeabilität von Zellen vollständigen Integrationsverlust zu detektieren (Davey und Hexley 2011), scheitert das Zweite daran, dass zwar Aussagen darüber gemacht werden können, wie viele Metabolite extrahiert wurde, aber nicht welche (Maharjan und Ferenci 2003).

Zum jetzigen Zeitpunkt kann die Aussage, dass jeder Organismus und jede Fragestellung ein eigenes Extraktionsprotokoll benötigt, nur bestätigt werden.

3.1.6. Analytik

Die Methoden, die zur Analyse intrazellulärer Metabolite eingesetzt werden, sind vielfältig. Während in der Vergangenheit vor allem enzymatische Assays eingesetzt wurden (Theobald, Mailinger et al. 1993), treten in den letzten zehn Jahren vermehrt Flüssigkeits- (LC) und Gaschromatographie (GC), häufig gekoppelt an Massenspektrometer, in der Vordergrund. Dabei wird die komplexe Probe zunächst aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften der Analyten chromatographisch getrennt und im Anschluss mit Hilfe eines Massenspektrometers (MS) detektiert. Gegenüber klassischer Flüssigkeitschromatographie besitzen LC- und GC-MS den Vorteil, spezifische Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) messen zu können und nicht auf unspezifische Detektionskriterien wie UV-Absorption zurückgreifen zu müssen.

Aufgrund ihres, verglichen mit anderen Verfahren, großen linearen Messbereichs und ihrer Vielfältigkeit bezüglich des möglichen Analytspektrums konnte sich in den letzten Jahren vor allem die Analyse mittels LC-ESI-MS/MS in der quantitativen Analytik durchsetzen. Exemplarisch wird auf dieses Verfahren im Folgenden kurz eingegangen.

Elektrospray-Ionisation (ESI)

Nach einer klassischen chromatographischen Trennung gelangen die unterschiedlich lang retardierten Analyten in der umgebenden mobilen Phase an die Ionenquelle des Massenspektrometers. Im Fall einer ESI erfolgt die Ionisierung der Analyten, indem diese kontinuierlich durch eine geladene, leitfähige Kapillare strömen. Zwischen der Kapillarspitze und dem Einlass des MS besteht ein elektrisches Feld, das auch die Analytlösung durchdringt und so zu einer Ionentrennung führt. Dabei

sammeln sich die Zielionen in der Kernströmung und an der Kapillarspitze, während die Gegenionen zur Kapillarwand gezogen werden. An der Flüssigkeitsoberfläche werden die Zielionen dem elektrischen Feld entsprechend zum Einlass des MS gezogen, wobei die Oberflächenspannung der Flüssigkeit dem entgegen wirkt. Es bildet sich ein charakteristischer Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus) von dessen Spitze ein kontinuierlicher Strom von wenigen Mikrometer großen Tröpfchen emittiert wird. Durch Verdampfung des Lösungsmittels schrumpfen die Tröpfchen bei konstanter Ladung, bis die Abstoßung gleich geladenen Teilchen die Oberflächenspannung übersteigt und die Tröpfchen explosionsartig in viele kleinere Tröpfchen zerfallen (Coulomb-Explosion) (vgl. Abbildung 3.13).

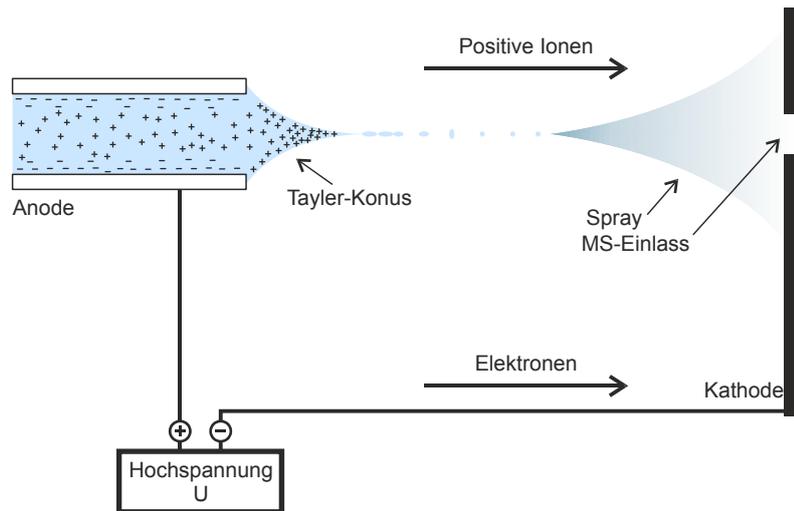


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation. Zwischen der Kapillare, welche die Analyten nach der chromatographischen Trennung erreichen, und dem Eingang des Massenspektrometers (MS) liegt eine Hochspannung an. Diese bewirkt, dass Flüssigkeitströpfchen mit positiv geladenen Ionen an der Spitze der Kapillare gebildet werden. Auf der Strecke zwischen dem Eingang des MS emittieren freie Ionen aus den Tröpfchen, während die Flüssigkeit verdampft. (Modifiziert nach Kebarle und Verkerk 2009).

Noch immer existieren zwei unterschiedliche Theorien dazu, wie die Freisetzung einzelner Ionen aus den geladenen Tröpfchen erfolgt (Lottspeich 1998). Das Charged-Residue-Model (Dole, Mack et al. 1968) geht davon aus, dass eine Serie von aufeinanderfolgenden Coulomb-Explosionen zur Bildung von Tröpfchen unter 1 nm Durchmesser führt und aus diesen durch Kollision mit Gegenstromionen freie Ionen emittieren. Das alternative Ion-Emission-Model (Iribarne und Thomson 1976) nimmt an, dass aus relativ großen geladenen Tröpfchen freie Ionen in die Gasphase übergehen. Neuer Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass beide Mechanismen auftreten und insbesondere abhängig von der Größe und der Ladung der ionisierten Partikel sind (Kebarle und Verkerk 2009).

Triple Quadrupol-MS

Von der Quelle gelangt der Strom aus Ionen in das MS. Beim Einsatz eines Quadrupol bringen vier parallel angeordnete, stabförmige Metallelektroden die Ionen eines bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnisses durch ein kombiniertes Wechsel- und Gleichspannungsfeld auf stabil oszillierende Bahnen. Der sogenannte Triple Quad ist eine Standardform des Massenspektrometers und bezeichnet eine Anordnung aus drei hintereinander geschalteten Quadrupolen und einem vorgeschalteten Quadrupol, der lediglich der Fokussierung des Gesamtionenstroms dient (vgl. Abbildung 3.14).

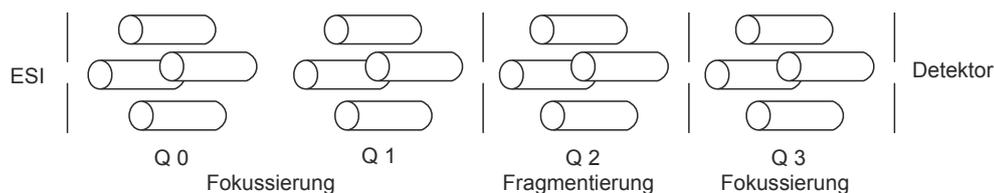


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung eines Triple Quad. Die Standardform dieses MS besteht aus insgesamt vier Quadrupolen (Q). Q0 fokussiert den Gesamtionenstrom, der von der Ionenquelle erzeugt wird. Q1 selektiert aus diesem Strom die Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladung-Verhältnis und fokussiert diese. Der Quadrupol Q2 ist mit einem Kollisionsgas gefüllt und dient der Fragmentierung der Produktionen. Die resultierenden spezifischen Fragmentionen werden im Q3 erneut fokussiert und zum Detektor geleitet. (Modifiziert nach Hage 2010)

Die häufigste Betriebsart des Triple Quad ist das Multiple Reaction Monitoring. Dabei selektiert der erste Quadrupol eine bestimmte Art von Produktionen welche im zweiten Quadrupol zur spezifischen Fragmentationen zerfallen. Die Identifikation und Detektion von Analyten erfolgt in diesem Fall folglich nicht allein aufgrund des m/z -Verhältnisses des Produktions, sondern aufgrund des Massenübergangs zwischen Produkt- und Fragmention. Dies bietet den Vorteil, dass auch solche Moleküle getrennt werden können, deren Produktionen identische m/z -Verhältnisse aufweisen.

Matrixeffekt und Ionensuppression

Beim Einsatz von LC-ESI-MS/MS zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite muss berücksichtigt werden, dass weder Peakhöhe, noch Peakfläche unmittelbar mit der Analytkonzentration korrelieren. Beide Größen werden von der absoluten Anzahl gemessener Moleküle definiert, die bei gleicher Konzentration abhängig von verschiedenen Faktoren stark variieren kann.

Die Probenmatrix beeinflusst die Ionisierung in zweifacher Hinsicht.

1. Sie beeinflusst die Retention aller Moleküle während der Flüssigkeitschromatographie und damit die Anzahl an Molekülen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt die Ionenquelle erreichen.
2. Abhängig von pH-Wert, Polarität und Salzkonzentration der Messmatrix ändern sich die chemischen Eigenschaften jedes Analyten und damit die Ionisierungseffizienz.

Da die Ionisierung am ESI eine Konkurrenzreaktion darstellt, konkurrieren alle ionisierbaren Substanzen in einer Lösung um die freien Ladungsstellen an der Ionenquelle. Zu den ionisierbaren Substanzen zählen die Analyten und ggf. vorhandene interne Standards, sowie alle unspezifischen Coeluenten und Ionen des Elutionsmittels (Enke 1997). Da Ionen, deren m/z -Verhältniss von dem des Zielions abweicht, aufgrund der Selektion des MS nicht den Detektor erreichen, führt die unspezifische Ionisierung nicht zu einem erhöhten Basisrauschen oder Störpeaks. Die absolute Anzahl an Metabolitmolekülen, die den Detektor erreichen wird durch sie aber verringert (Jessome und Volmer 2006).

Alle Effekte die unmittelbar bei der Ionisierung auftreten, können unter dem Begriff Ionensuppression zusammengefasst werden (Buhrman, Price et al. 1996). Um diese zu kompensieren, ist es notwendig, für jeden Analyten einen internen Standard einzusetzen, für den die Ionensuppression in gleicher Weise auftritt. Über die Verhältnisbildung zwischen Proben- und Standardpeak kann eine Quantifizierung erfolgen.

Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS)

Die IDMS bezeichnet ein Messverfahren, bei dem der Probe ein uniform ^{13}C -markiertes Analogon jedes Zielanalyten zugefügt und mitgemessen wird (Wu, Mashego et al. 2005) (vgl. Abbildung 3.15).

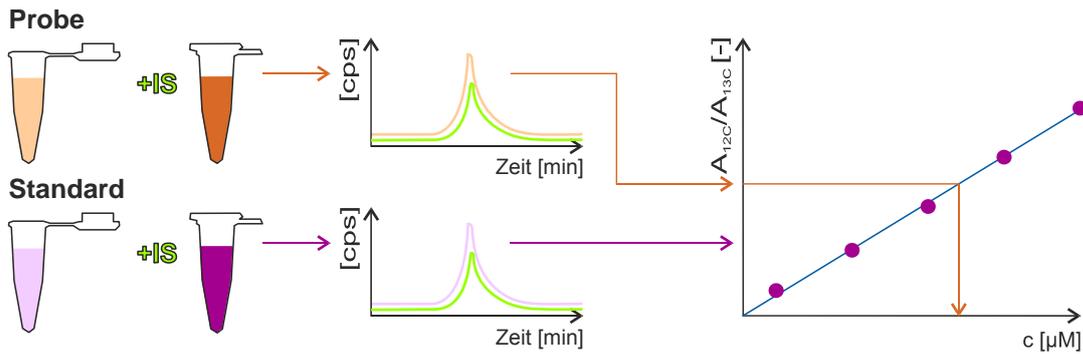


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Korrektur von Suppressionseffekten mittels IDMS. Die Probe und die zur Quantifizierung eingesetzten Standards werden vor der Messung gleichermaßen mit einem internen Standard versetzt. Der interne Standard wird von Matrixeffekten und Ionensuppression in gleicher Weise beeinflusst, wie die Analyten. So können beide Effekte durch die Verhältnisbildung des Analyt bzw. Standardsignals mit dem Signal des internen Standards korrigiert werden.

Die IDMS liefert nur unter der Voraussetzung belastbare Ergebnisse, dass ^{12}C -Analyt und ^{13}C -Analogon auf identische Weise ionisiert werden und der gleichen Ionensuppression unterliegen. Laut Liang trifft diese Annahme nur für den Konzentrationsbereich zu, in dem die Ionenquelle nicht mit ionisierbaren Substanzen abgesättigt ist (Liang, Foltz et al. 2003). Dabei ist es irrelevant welcher Art (^{12}C -Analyt, ^{13}C -Standard, Coeluent, Elutionsmittel) die ionisierbaren Substanzen sind (Jessome und Volmer 2006). In einem abgesättigten Konzentrationsbereich werden alle Moleküle mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit ionisiert.

Ein Maß für die Ionisierbarkeit einer Substanz ist der sogenannte Response-Faktor. Dieser ist in einem nicht abgesättigten Konzentrationsbereich für alle ionisierbaren Substanzen gleich 1. Dies bedeutet nicht, dass alle Analyten, welche die Ionenquelle erreichen, ionisiert werden, sondern lediglich, dass die Ionisierungswahrscheinlichkeit unabhängig vom Analyten immer gleich groß ist. Im Sättigungsbereich der Ionenquelle besitzen alle Analyten hingegen unterschiedliche Response-Faktoren (Sojo, Lum et al. 2003).

Es kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass auch ^{12}C - und ^{13}C -Analoge im Sättigungsbereich der Ionenquelle unterschiedliche Response-Faktoren besitzen. Im Bereich der Metabolomanalyse wird allgemein angenommen, dass in einem Konzentrationsbereich gearbeitet wird, in dem der Effekt keinen Einfluss besitzt.

3.1.7. Fehlerfortpflanzung

Die vielfältige Nutzung von Metabolomdaten, insbesondere in modellgestützten Analysen, erfordert eine exakte Kenntnis über die Genauigkeit der erzeugten Werte.

Da es sich bei der Metabolomanalyse um einen mehrstufigen Prozess handelt, ergibt sich die Genauigkeit bzw. der Fehler der erzeugten Werte aus einer Sequenz von fehlerbehafteten Einzelschritten und akkumuliert über den gesamten Prozessverlauf. Die Schätzung eines solchen akkumulierten Messfehlers erfordert eine genaue Kenntnis über die Teilschritte des Prozesses sowie die Berücksichtigung wesentlicher Einflussfaktoren und Fehlerquellen. Aus diesem Grund wird in vielen Fällen auf eine detaillierte Betrachtung der Fehlerfortpflanzung verzichtet.

Stattdessen erfolgt, wie in vielen anderen biologienahen Wissenschaften, die Angabe der Streuung nach der mehrfachen Durchführung einer Analyse von Replikaten (Bast 2001). Diese Streuung gibt allerdings lediglich den Vertrauensbereich des mehrmals durchgeführten Arbeitsschritts an und ist nicht mit dem Gesamtfehler eines Prozesses gleichzusetzen. Eine detaillierte Beschreibung der mathematischen Grundlagen von Streuung- und Gesamtfehlerberechnung ist im Anhang B1 aufgeführt.

Fehlerfortpflanzungsmodelle

Eine Möglichkeit den Verlauf voneinander unabhängiger Fehler in einer Analyse abzubilden bietet das Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz. Demnach ergibt sich der Gesamtfehler einer Analyse ΔG für voneinander unabhängige Messabweichungen aus den Standardfehlern der einzelnen Messgrößen (Δx , Δy , Δz , usw.), die in den Gesamtwert G einfließen. Die Standardfehler gehen dabei gewichtet mit den partiellen Ableitungen von G in die Berechnung ein:

$$\Delta G = \sqrt{\left(\frac{\partial G}{\partial x} * \Delta x\right)^2 + \left(\frac{\partial G}{\partial y} * \Delta y\right)^2 + \left(\frac{\partial G}{\partial z} * \Delta z\right)^2 + \dots} \quad (1)$$

Eine alternative Berechnung des Gesamtfehlers stellt die Monte Carlo Simulation dar, die auf dem Einsatz von Zufallszahlen beruht. Sind die Standardfehler aller fehlerbehafteten Größen bekannt, ist es möglich den Fehler des Endwerts zu bestimmen, indem im Rahmen der Standardfehler Zufallszahlen generiert und zur Berechnung verwendet werden. Wird dieser als Verrauschen bezeichnete Schritt gleichzeitig auf alle einfließenden Größen angewendet, streuen die resultierenden Werte um den wahren aber unbekanntem Erwartungswert. Bei einer hinreichend große Anzahl an Berechnungen, geht die Verteilung der Werte in einer Gauß'sche Form über und ermöglicht eine Aussage über den Vertrauensbereich des Mittelwerts (Papula 2006; Henze 2008; Kütting 2011).

3.2 Biologische Systeme

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, für den Prozess der Probengenerierung zur Metabolomanalyse ein allgemeingültiges Protokoll aufzustellen. Um diese Allgemeingültigkeit zu gewährleisten wurde die Mehrzahl aller Versuchsreihen mit unterschiedlichen Mikroorganismen durchgeführt. Die Kriterien für die Auswahl der Beispielorganismen waren deren Aufbau sowie ihre Relevanz in Forschung und Industrie.

3.2.1 Zellwände und Zellgröße

Für einige Arbeitsschritte der Probengenerierung (Quenching und Extraktion) wird vermutet, dass die Integrität der Zellen und die physikalische Stabilität von Zellwänden und Zytoplasmamembranen einen großen Einfluss besitzen (vgl. Abschnitt 3.1.3). Für den Arbeitsschritt der Zellseparation (vgl. Abschnitt 3.1.4) ist hingegen insbesondere die durchschnittliche Zellgröße entscheidend.

Betrachtet man den Aufbau der Zellwände von bakteriellen Systemen, können zwei allgemeine Gruppen unterschieden werden (vgl. Abbildung 3.16):

- Gram positive Bakterien
- Gram negative Bakterien

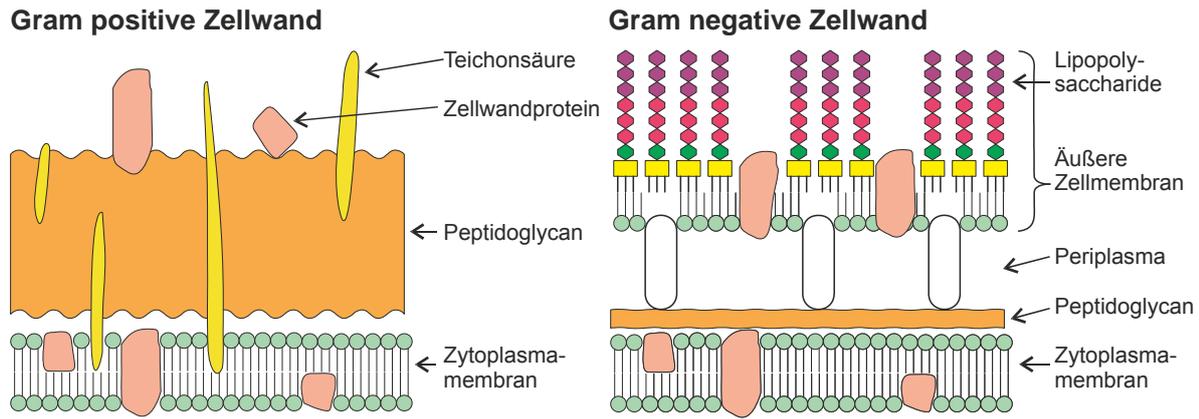


Abbildung 3.16: Schematischer Aufbau der Zellwände gram positiver und gram negativer Bakterien. (Modifiziert nach Madigan, Martinko et al. 2011).

Gram positive Bakterien besitzen lediglich eine Zellmembran auf die eine umfangreiche Peptidoglycanschicht aufgelagert ist. Ein weiterer Bestandteil von gram positiven Zellwänden ist die Teichonsäure, die bis zu 40 % der Zellwand bilden kann (Schlegel, Drews et al. 1999; Madigan, Martinko et al. 2011).

Gram negative Bakterien besitzen hingegen zusätzlich zur Zytoplasmamembran eine weitere, äußere Zellmembran, die aus Lipiden und Lipopolysacchariden gebildet wird. Zwischen den beiden Membranen befinden sich eine dünne Teichonsäure-freie Peptidoglycanschicht und das Periplasma (Schlegel, Drews et al. 1999; Madigan, Martinko et al. 2011).

Der Aufbau der Zellwände eukaryotischer Systemen unterscheidet sich grundsätzlich von den oben gezeigten. Betrachtet man beispielsweise die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, besitzt diese neben der Zellmembran eine bis zu 200 nm dicke Zellwand, die hauptsächlich aus Polysacchariden und Proteinen gebildet wird (vgl. Abbildung 3.17) (Walker 1998).

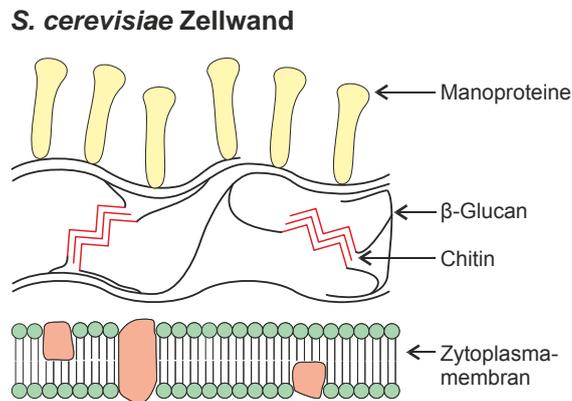


Abbildung 3.17: Schematischer Aufbau der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*. (Modifiziert nach Leung, Liu et al. 2006)

3.2.2 Modellorganismen

Die Hauptkriterien für die Wahl eines Modellorganismus in der biologischen Forschung sind die Übertragbarkeit von generierten Ergebnissen auf andere biologische Systeme, die Möglichkeit den Organismus mit geringem Aufwand zu kultivieren sowie die Verfügbarkeit eines breiten Methodenspektrums (analytisch, genetisch, usw.), welches auf den Organismus angewendet werden kann (Madigan, Martinko et al. 2011).

Escherichia coli

Im Bereich der Prokaryoten nimmt *Escherichia coli* (*E. coli*) die Position des am besten untersuchten Mikroorganismus ein (Madigan, Martinko et al. 2011). Bei dem 1888 vom deutschen Kinderarzt Theodor Escherich erstmals beschriebenen Organismus handelt es sich um ein gram negatives, stäbchenförmiges, nicht sporulierendes, peritrich begeißeltes Bakterium von 1 bis 4 µm Länge (Escherich 1988). *E. coli* gehört der Familie der Enterobacteriaceae an und ist fakultativ anaerob (Schlegel, Drews et al. 1999). Das Genom von *E. coli* wurde bereits 1997 vollständig sequenziert (Blattner, Plunkett et al. 1997). Darüber hinaus existiert mittlerweile eine Vielzahl von Datenbanken, die diesen Organismus betreffendes Fachwissen öffentlich zur Verfügung stellen.

Saccharomyces cerevisiae

Die Knospungshefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) nimmt für die Eukaryoten eine vergleichbare Rolle ein wie *E. coli* für die Prokaryoten. Aufgrund der geringen Ansprüche bei der Kultivierung und der Vielfalt an genetischen Manipulationsmöglichkeiten dient *S. cerevisiae* schon seit vielen Jahren als Modellorganismus. Das Genom von *S. cerevisiae* stellt das erste sequenzierte Eukaryotengenom dar (Goffeau, Barrell et al. 1996).

3.2.3 Produktionsorganismen

Organismen, die in erster Linie zur Produktion von Wertstoffen eingesetzt werden, zeichnen sich im Allgemeinen durch Besonderheiten in ihrem Stoffwechsel oder ihrem Aufbau aus. Diese Besonderheiten versetzen die Organismen in die Lage einen Wertstoff in hohen Mengen zu produzieren und diesen in vielen Fällen auch außerhalb der Zellen anzuhäufen.

Für die Metabolomanalyse stellt sowohl die erhöhte Konzentration eines Stoffes, als auch dessen gegebenenfalls vereinfachte Sekretion eine Herausforderung dar. Hohe intra- oder extrazelluläre Konzentrationen eines Stoffwechselintermediats können bei der Analyse Verdünnungen erforderlich machen, die dazu führen, dass andere Metabolite unter das Detektionslimit sinken. Der Einfluss, den Sekretionssysteme oder Porine bei Arbeitsschritten wie dem Quenching haben, ist zudem unklar.

Corynebacterium glutamicum

Das gram positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) zählt zu den am häufigsten eingesetzten Mikroorganismen für die industrielle Produktion von Aminosäuren. Es ist schnellwachsend, unbeweglich, Biotin-auxotroph, nicht-sporulierend und gehört zur Gruppe der mycolsäurehaltigen Actinomyceten. Die Einstufung als GRAS-Organismus (generally regarded as safe) vereinfacht die Aufarbeitung von Produkten, die mit *C. glutamicum* erzeugt wurden und macht das Bakterium damit besonders für die Produktion von Tierfuttermittelzusätzen wie z.B. Lysin interessant. als Produktionsorganismus (Van Ooyen 2010).

Bacillus licheniformis

Das ebenfalls gram positive Bakterium *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) wird aufgrund seiner effektiven Systeme zur Sekretion von Proteinen insbesondere für die Produktion von Proteasen und Amylasen zur Waschmittelherstellung eingesetzt. Zu seinen natürlichen Habitaten gehören sowohl Pflanzenteile, als auch Vogelfedern. *B. licheniformis* gehört zur Familie der Bacillaceae und besitzt viele Gemeinsamkeiten mit dem gut untersuchten Modellorganismus *B. subtilis* (Sonenshein, Hoch et al. 2002).

4. Material und Methoden

4.1 Kultivierungen

4.1.1 Stämme

Bei den eingesetzten Stämmen handelt es sich bei *E. coli* K12 W3110 (*E. coli*), *B. licheniformis* DSM 13D102 (*B. licheniformis*) und *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D (*S. cerevisiae*) um Wildtypen.

Der Stamm *C. glutamicum* DM 1800 ist ein konstitutiver Produzent der Aminosäure L-Lysin und basiert auf dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032. Er ist durch Punktmutationen in den Allelen der Enzyme Pyruvatcarboxylase (*pyc*) und Aspartokinase (*lysC*) gekennzeichnet. Aufgrund der Mutationen ist zum einen die katalytische Aktivität von *pyc* gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht und zum anderen unterliegt *lysC* keiner Feedback-Inhibierung durch L-Lysin oder L-Threonin.

Darüber hinaus wurden weitere Stammvarianten von *C. glutamicum* DM 1800 untersucht, die von J. van Ooyen (Forschungszentrum Jülich, IBG-1: Biotechnologie 1) im Rahmen seiner Promotionsarbeit erzeugt wurden (Van Ooyen 2010) (vgl. Tabelle 4.1). Diese Mutanten verfügen aufgrund von gezielten Promotoraustauschen über eine definiert verringerte Aktivität des Enzyms Citrat-Synthase.

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten biologischen Systeme.

Stamm	Genotyp/Phänotyp
<i>E. coli</i> K12 W3110	Wildtyp
<i>B. licheniformis</i> DSM13D102	Wildtyp
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D	Wildtyp
<i>C. glutamicum</i> DM 1800	ATCC 13032 <i>pyc</i> ^{P458S} <i>lysC</i> ^{T311I} Lysin-Produzent
<i>C. glutamicum</i> DM 1800'A16	DM 1800 mit 32 % CS-Aktivität Lysin-Produzent
<i>C. glutamicum</i> DM 1800'L1	DM 1800 mit 16 % CS-Aktivität Lysin-Produzent
<i>C. glutamicum</i> DM 1800'C76	DM 1800 mit 10 % CS-Aktivität Lysin-Produzent

4.1.2 Medien

Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Organismen so groß wie möglich zu halten, wurden ausschließlich Minimalmedien eingesetzt und weitgehend identische Puffersysteme und Regelmedien verwendet. Die Zusammensetzung der Medien ist im Folgenden angegeben.

Das Medium für *E. coli* zur Kultivierung in Schüttelkolben enthielt pro Liter: 5 g (NH₄)₂SO₄, 11.6 g K₂HPO₄, 9.63 g KH₂PO₄, 20 g Glucose, 98 mg MgSO₄*7H₂O, 70 mg CaCl₂*5H₂O, 50 mg FeSO₄*7H₂O, 17.1 mg MnSO₄*1H₂O, 15 mg ZnSO₄*7H₂O, 3 mg Na₂MoO₄*2H₂O, 2.5 mg CuSO₄*5H₂O, 1.7 mg NiCl₂*6H₂O, 0.75 mg AlCl₃*6H₂O, 0.6 mg CoCl₂*6H₂O und 0.5 mg H₃BO₃. Das Medium wurde mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt. Zusätzlich enthielt das Medium zur Kultivierung im Bioreaktor pro Liter 1 ml 10 % -iges (v v⁻¹) AF 204 (Sigma).

Das Medium für *B. licheniformis* zur Kultivierung in Schüttelkolben enthielt pro Liter: 15 g (NH₄)₂SO₄, 17.4 g K₂HPO₄, 14.45 g KH₂PO₄, 16 g Glucose, 0.49 g MgSO₄*7H₂O, 0.7 g CaCl₂*5H₂O, 50 mg FeSO₄*7H₂O, 57.6 mg MnCl₂*4H₂O, 0.67 NiSO₄*6H₂O, 0.65 mg Na₂MoO₄*2H₂O, 0.57 mg CoCl₂*6H₂O, 0.3 mg CuSO₄*5H₂O, 0.25 mg ZnCl₂ und 0.006 mg H₃BO₃. Das Medium wurde mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7.6 eingestellt. Zusätzlich enthielt das Medium zur Kultivierung im Bioreaktor pro Liter 1 ml 10 % -iges (v v⁻¹) AF 204 (Sigma).

Zur Kultivierung der Stämme *C. glutamicum* DM 1800, DM 1800'A16, DM 1800'L1 und DM 1800'C7 wurde in Schüttelkolben das Medium CGXII (Keilhauer, Eggeling et al. 1993) eingesetzt. Es enthielt pro Liter: 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 , 5 g Harnstoff, 10 g Glucose, 13,25 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,313 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Das Medium wurde mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zusätzlich enthielt das Medium zur Kultivierung im Bioreaktor pro Liter 1 ml 10 % -iges ($v v^{-1}$) AF 204 (Sigma) und 1 ml einer $0,2 \text{ g l}^{-1}$ Biotin-Stocklösung, die nach dem Autoklavieren steril zugegeben wurde.

Das Medium für Stamm *S. cerevisiae* zur Kultivierung in Schüttelkolben enthielt pro Liter: 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,8 g K_2HPO_4 , 4,8 g KH_2PO_4 , 20 g Glucose, 0,49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g $\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,03 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg H_3BO_3 , 0,01 mg KI, 15 mg Na_2EDTA , 0,05 mg D-Biotin, 1 mg Calciumpantothenat, 1 mg Thiaminhydrochlorid, 1 mg Pyridoxinehydrochlorid, 1 mg Nicotinsäure, 0,2 mg P-Aminobenzoessäure und 25 mg Myo-Inositol. Das Medium wurde mittels HCl auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt. Zusätzlich enthielt das Medium zur Kultivierung im Bioreaktor pro Liter 1 ml 10 % -iges ($v v^{-1}$) AF 204 (Sigma).

4.1.3 Stammhaltung

Cryokulturen aller Organismen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase einer Schüttelkolben-Kultivierung angefertigt, indem die Kulturen in dem jeweiligen Medium mit einem zusätzlichen Glycerolanteil von 20 % in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss bei -80°C gelagert wurden.

4.1.4 Kultivierungsbedingungen

Alle Schüttelkolben-Kultivierungen wurden in Schikanen-freien 1000 ml Glaskolben durchgeführt, die zu 10 % mit dem jeweiligen Medium gefüllt waren und mit 1 ml Cryokultur des jeweiligen Organismus inokuliert wurden. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 4.2 angegeben.

Tabelle 4.2: Kultivierungsbedingungen für Schüttelkolben-Kultivierungen.

Organismus	Temperatur [$^\circ\text{C}$]	Schüttelrate [rpm]
<i>E. coli</i>	30	180
<i>B. licheniformis</i>	39	200
<i>S. cerevisiae</i>	30	180
<i>C. glutamicum</i> DM 1800 und Mutanten	30	160

Alle Reaktor-Kultivierungen wurden im Batch-Verfahren in einem 1,5 l Kultivierungssystem (DASGIP AG, Jülich) mit einem Arbeitsvolumen von 1 l durchgeführt. Für die Inokulation der Reaktoren wurden bei den Kultivierungen von *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* Vorkulturen verwendet. Dazu wurden je zwei 1000 ml Schüttelkolben nach dem zuvor beschriebenen Protokoll vorbereitet, inokuliert und für 15 h (*E. coli*), 8 h (*B. licheniformis*) oder 15 h (*S. cerevisiae*) bei den jeweiligen Bedingungen inkubiert. Die Vorkulturen wurden vereinigt und für 5 min bei 25°C und 4500 g zentrifugiert (Labofuge 400, Heraeus). Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml frischem, warmem Medium resuspendiert, wobei Temperatur und Medium vom Organismus abhängen. 10 ml der Resuspension wurden eingesetzt, um das Arbeitsvolumen von 1 l zu inokulieren. Die Inokulation der Reaktorkultivierungen aller verwendeten Stämme von *C. glutamicum* erfolgte unmittelbar mit 2 ml der Cryokultur pro Liter Medium.

Die Kultivierungen wurden als Temperatur-, pH- und pO_2 -geregelt Prozesse durchgeführt, wobei die Steuerung mithilfe eines PID-Reglers erfolgte. Mittels eines heiz- und kühlbaren Thermoblocks wurde die Temperatur konstant gehalten. Die Regulation des pH-Wertes erfolgte in allen Kultivierungen über die Zugabe von 4 M HCl bzw. 4 M NaOH. Aerobe Prozessbedingungen ($pO_2 > 40\%$ für *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* bzw. $pO_2 > 30\%$ für alle *C. glutamicum*-Stämme) wurden erreicht, indem bei einem konstanten Volumenstrom an Luft ($1 \text{ v v}^{-1} \text{ h}^{-1}$) die Rührerdrehzahl zwischen 200 und 1200 rpm reguliert wurde.

4.2 Probenahme

4.2.1 Zellfreie Überstände

Für die Analyse des zellfreien Überstandes einer Reaktor-Kultivierung wurden zunächst 2 ml Kulturflüssigkeit in eine 2 ml Plastikspritze (Braun AG, Melsungen) gezogen und zur Entfernung des Totvolumens des Probenahmeventils verworfen. Im Anschluss wurden 2 ml Kulturflüssigkeit aus dem Kultivierungssystem gezogen und für 1 min bei 13000 g (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (Celluloseacetat-Filter $0.22 \mu\text{m}$, DIA Nielsen). Bei der Kultivierung in Schüttelkolben erfolgte die Entnahme mittels einer Kapillare durch ein Septum totvolumenfrei, weshalb der erste Arbeitsschritt entfiel.

4.2.2 Biomassehaltige Proben

Für die Analyse von Vollproben wurden zunächst 2 ml Kulturflüssigkeit in eine 2 ml Plastikspritze (Braun AG, Melsungen) gezogen und zur Entfernung des Totvolumens des Probenahmeventils verworfen. Im Anschluss wurde das benötigte Volumen in eine Spritze von entsprechendem Volumen gezogen und weiterbearbeitet. Bei der Kultivierung in Schüttelkolben entfiel der erste Arbeitsschritt analog zur zellfreien Probe.

4.2.3 Vakuumfiltration

Zur Zellabtrennung mittels Vakuumfiltration wurden zwei unterschiedliche Systeme eingesetzt. Zum einen erfolgt die Trennung unter Zuhilfenahme einer, in Anlehnung an etablierte Standardsysteme (Glas-Vakuum-Filtrationsgerät 50 mm, Sartorius Stedim), in eigener Produktion hergestellten Nutsche (vgl. Abbildung 4.1).

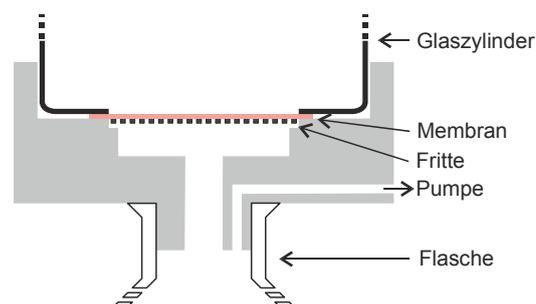


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung einer Standardnutsche. Ein Zylinder aus Duranglas fixiert eine kreisförmige Filtermembran auf einer Fritte aus perforiertem Polypropylen. Mit Hilfe einer Pumpe wird im Filtrationsraum ein Vakuum erzeugt.

Die eingesetzten Filter wurden dazu in eine runde Form von 47 mm Durchmesser geschnitten, auf die Filterfritte gelegt und über den Andruck eines Glaszylinders fixiert. Die so ausgestattete Nutsche wurde auf eine 250 ml Glasflasche (Schott, Duran) gesteckt, an die ein undefiniertes Vakuum angelegt wurde (Divac 2.4 L, Leybolt). Die Verbindung von Nutsche und Vakuumpumpe erfolgte über eine Woulfische Flasche.

Im Verlauf der Arbeit wurde ein alternatives System zur Vakuumfiltration entwickelt, das im Abschnitt 11.2.2 ausführlich beschrieben ist. Zum Einsatz des Systems wurde der entwickelte Adapter mit einem 50 ml Reaktionsgefäß (VWR International) und einem Filtermodul (SWUC, Forschungszentrum Jülich) bestückt. Wie bei der Standardnutsche erfolgte die Verbindung mit der Vakuumpumpe über eine Woulfische Flasche.

Unabhängig von System wurde das zu filternde Material mit einer Pipette auf die Filterfläche gegeben oder aus einem anderen Reaktionsgefäß auf die Filterfläche gegossen.

4.3 Online Prozessanalytik

Während der Reaktorkultivierungen wurden der pH-Wert (405-DPAS-SC-K80/225, Mettler Toledo), der Sauerstoffpartialdruck (Visiform DO 225, Hamilton) und der prozentuale Massenanteil an CO₂ und O₂ in der Abluft kontinuierlich gemessen (GA Modul, DAS AG, Jülich).

In einigen Kultivierungen erfolgt zusätzlich die Messung der dielektrischen Kapazität (Standard Remote Futura, ABER Instruments), die Messung der Leitfähigkeit (Standard Remote Futura, ABER Instruments), sowie die differenzierte Messung der prozentualen Massenanteile von ¹²C- und ¹³C-CO₂ mit Hilfe einer externen FT-IR-Analysestation (GASMET, Ansyco).

4.4 Offline Prozessanalytik

4.4.1 Bestimmung der Biomasse

Die optische Dichte von biomassehaltigen Proben wurde nach Verdünnung mit 0.9 % -iger Natriumchlorid-Lösung bei 600 nm gegen 0.9 % -ige Natriumchlorid-Lösung gemessen (Shimadzu, Pharma-Spec UV 1700).

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) bei 80°C für 48 h getrocknet (TG120, Heraeus), im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und gewogen (Research R 160P, Satorius). 2 ml Vollprobe wurde in den Reaktionsgefäßen von bekanntem Gewicht 2 min bei 13000 g (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewicht des Pellets nach der Trocknung gravimetrisch aus der Differenz des beladenen Reaktionsgefäßes zum leeren berechnet.

Zellzahl und Biovolumen wurden nach dem Coulter-Counter Prinzip mittels CASY TT1 (Schärfe Systems) bestimmt. Die für die Messung erforderlichen Verdünnungen der Vollproben wurden in sterilfiltriertem (Celluloseacetat-Filter 0.22 µm, DIA-Nielsen) CASYTon (Roche Diagnostics) durchgeführt.

Die Bestimmung des prozentualen Anteils an intakten Zellen erfolgte mittels selektiver Fluoreszenzfärbung und Detektion mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS Aria II, BD Biosciences). Dazu wurde das LIVE/DEAD-Vitalitätsassay (LIVE/DEAD BacLight Viabilitäts-Kit, Invitrogen) eingesetzt. 10 µl einer Vollprobe wurden mit 990 µl der nach Herstellerangaben vorbereiteten Färbelösung gemischt, wobei nur 20 % der vom Hersteller vorgeschlagenen Mengen an Farbstoffen eingesetzt wurden. Nach 15 min Inkubation im Dunkeln erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometer bei einem Threshold von 300 und den Standardeinstellungen von 200 bzw. 526 für Forward und Side Scatter. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte bei 450 bzw. 550 nm.

4.4.2 Überstandsanalytik

Die extrazelluläre Glucosekonzentration wurde enzymatisch ermittelt (EBIO compact, Eppendorf AG Hamburg). Die Ammoniumbestimmung in zellfreien Kulturüberstand erfolgte refraktometrisch (RQ Plus, Merck). Zur Bestimmung der Osmolalität wurde ein Gefrierpunktsosmometer (Osmomat 030, Gonotec) eingesetzt.

Die absolute Quantifizierung von Acetat, Pyruvat, Laktat, Shikimat und Citrat in zellfreien Kulturüberständen erfolgte auf einer organic acid column (CS-Chromatography) mittels HPLC (1200 Series, Agilent) unter Einsatz eines isokratischen Elutionsprofils bei einer Säulentemperatur von 40°C und einem Fluss von 0.5 ml min⁻¹ mit 0.1 M Schwefelsäure als mobiler Phase. Erforderliche Verdünnungen wurden mit 0.9 % -iger Natriumchlorid-Lösung durchgeführt.

4.4.3 Gerichtete Analyse mittels LC-ESI-MS/MS

Aminosäuren

Die Analyse von freien Aminosäuren in Kulturüberständen, Quenchingüberständen und Extrakten erfolgte auf einer Anionenaustauschsäule (Luna SCX, Phenomenex) bei einer Temperatur von 40°C und einem Fluss von 0.45 ml min⁻¹. Zur Korrektur von Matrixeffekten wurde ein ¹³C-markiertes Analogon jedes Analyten in Form eines vollmarkierten Zellextraktes von *E. coli* oder *B. licheniformis* zu den Proben gegeben (IDMS). Da für die Aminosäuren O-Acetyl-Serin, Homoserin und Methionin kein solches Analogon zur Verfügung stand, wurden sie anhand der internen Standards von Serin (O-Acetyl-Serin und Homoserin) und Alanin ausgewertet, deren strukturelle Ähnlichkeit bzw. ähnliches Retentionsverhalten die Analyse ermöglichte. Die Analyten wurden im MRM-Modus detektiert und mit Hilfe einer externen Kalibriergerade quantifiziert. Notwendige Verdünnungen wurden mit 50 % -igem Methanol durchgeführt. Das Elutionsprofil und die Zusammensetzung der Eluenten sowie eine Liste aller analysierten Aminosäuren sind in den Anhängen C1 und C2 angegeben.

Metabolite des Zentralstoffwechsels

Die Analyse der Metabolite des Zentralstoffwechsels in Kulturüberständen, Quenchingüberständen und Extrakten erfolgte auf einer C18-Säule (synergy hydro, Phenomenex) bei einer Temperatur von 60°C und einem Fluss von 0.45 ml min⁻¹. Da alle Analyten unter den in der Probe vorherrschenden Bedingungen einen stark ionischen Charakter aufwiesen, war die chromatographische Trennung nur unter Einsatz eines Ionenpaar-Bildners möglich. Tributylamin bildet elektrisch neutrale Paare mit den Analyten. Durch diese Maskierung war es möglich die Analyten anhand der Charakteristika Polarität oder Hydrophobizität zu trennen.

Auch für die Analyse der Zentralstoffwechselmetabolite wurde die IDMS angewendet. Da für ADP und ATP sowie NADH, NADPH und NADP keine internen Standards zur Verfügung standen, wurden sie anhand der internen Standards von AMP bzw. NAD ausgewertet. Auch hier erfolgte die Detektion mittels MRM und die Quantifizierung anhand einer externen Kalibriergerade. Notwendige Verdünnungen wurden mit 50 % -igem Methanol durchgeführt. Das Elutionsprofil und die Zusammensetzung der Eluenten sowie eine Liste aller analysierten Zentralstoffwechselmetabolite sind in den Anhängen C1 und C2 angegeben.

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde das Spektrum der Methode auf die Analyse von Zuckerphosphaten, Energiemetaboliten und Redoxäquivalenten beschränkt. Das Elutionsprofil wurde hinsichtlich dieser Metabolite optimiert und ist im Anhang C1 angegeben. Eine Liste des Analytenspektrums ist in Anhang C2 hinterlegt.

Organische Säuren

Für die Analyse von organischen Säuren in Kulturüberständen, Quenchingüberständen und Extrakten wurde im Verlauf der Arbeit eine neue Methode zur chromatographischen Trennung etabliert welche in Abschnitt 9.2 ausführlich beschrieben ist. Die Trennung erfolgt auf einer CyphecATN Säule (CS Chromatographie), deren Zusammensetzung aus einer Optimierung resultiert und die kundenspezifisch für das Forschungszentrum Jülich erzeugt wurde. Auch für die Analyse der organischen Säuren wurde die IDMS angewendet. Wobei für die Säure Glyoxylat aus Mangel eines internen Standards der interne Standard von Fumarat verwendet wurde.

Die Detektion erfolgte mittels MRM und die Quantifizierung anhand einer externen Kalibriergerade. Notwendige Verdünnungen wurden mit 50 % -igem Methanol durchgeführt. Die Elution der Analyten erfolgte bei der etablierten Methode isokratisch mit dem Eluenten 80 % H₂O, 20 % Methanol, 8 mM Tributylamin und 15 mM Essigsäure bei einem pH-Wert von 4.95, einer Säulentemperatur von 60°C und einem Fluss von 0.5 ml min⁻¹.

Eine Liste der mit dieser Methode quantifizierten Analyten ist in Anhang C2 wiedergegeben.

4.4.4 Ungerichtete Analyse mittels GC-TOF-MS

Für die ungerichtete Analyse mittels GC-TOF-MS wurden 130 µl zellfreier Überstand über Nacht lyophilisiert (Christ LT-105). Die getrockneten Proben wurden in 50 µl MeOX (20 mg ml⁻¹ O-methylhydroxylamine in Pyridin) für 90 min bei 30°C und 600 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) derivatisiert. Nachfolgend wurde die Derivatisierung mit 80 µl MSTFA (N-acetyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid) für 90 min bei 40°C und 600 rpm durchgeführt.

Für die Messung wurde ein GC (6890N, Agilent) gekoppelt mit einem Time-of-flight-MS (TOF-MS, Micromass GCT Premier, Waters) bei einem Injektionsvolumen von 1 µl bei 280°C eingesetzt, wobei abhängig von der Probe unterschiedliche Split-Modi verwendet wurden.

Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer 30 m FactorFour VF-5ms mit einer 10 m Vorsäule bei einem konstanten Helium-Fluss von 1 ml min⁻¹. Das angelegte Temperaturprofil besaß eine Starttemperatur von 60°C mit einer Haltezeit von 2 min und einem anschließenden Gradienten von 12°C min⁻¹ bis zur Endtemperatur von 300°C mit einer Haltezeit von 8 min.

Das verwendete TOF-MS wurde im positiven Modus betrieben. Die Ionisierung erfolgte bei einer Elektronenenergie von 70 eV und einer Temperatur von 180°C.

Für die Metabolitidentifikation wurden die institutseigene Datenbank JuPoD, die kommerzielle Datenbank NIST und die kostenlos verfügbare Datenbank GMD verwendet.

4.4.5 Phase Optimized-LC (POP-LC)

Die klassische Herangehensweise bei der Optimierung oder Neuentwicklung chromatographischer Verfahren ist das Anpassen der Prozessparameter und Eluenten nach der einmaligen Auswahl einer stationären Phase. Die Tatsache, dass die Optimierung der stationären Phase trotz ihres Einflusses auf die Trennung nur selten zur Optimierung herangezogen wird, beruht hauptsächlich darauf, dass sowohl die Prozessparameter, als auch die Eigenschaften und das Profil der mobilen Phase kontinuierlich verändert werden können, während die Änderung der stationären Phase aufwändige apparative Änderungen erfordert (Nyiredy, Szucs et al. 2007). Eine kontinuierliche oder graduelle Optimierung der stationären Phase einer Chromatographie-Säule erfordert entweder die Mischung unterschiedlicher Säulenmaterialien oder die serielle Kombination von Einzelsäulen.

Das in der vorliegenden Arbeit zur Etablierung einer neuen chromatographischen Methode eingesetzte System (POP-LC, Bischoff Chromatography, Leonberg) nutzt die zweitgenannte Möglichkeit (Lamotte 2006). Das System besteht aus einem Set von fünf Säulen, die sich in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden und mit Hilfe von Haltesegmenten totvolumenfrei gekoppelt werden können (vgl. Abbildung 4.2). Da die Einzelsäulen segmentiert sind, lässt sich mit dem System jede beliebige Säulenkombination und -länge erstellen.

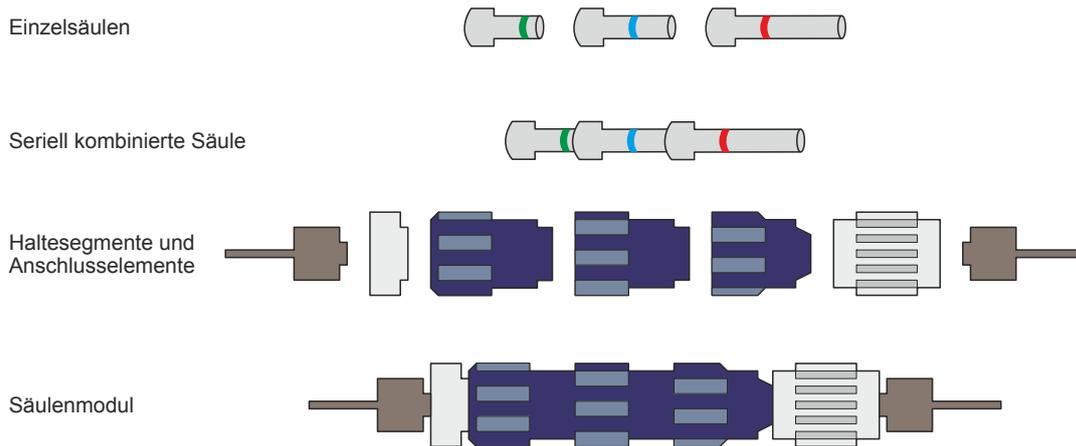


Abbildung 4.2: Personal Optimized Phase-LC Schema. Die segmentierten Einzelsäulen unterschiedlicher Spezifität können mit Hilfe von Haltesegmenten totvolumenfrei gekoppelt werden und ermöglichen so die graduelle Optimierung von stationären Phasen.

Aufgrund der unterschiedlichen Retentionsmechanismen besitzt ein betrachteter Analyt auf jeder Säule eine unterschiedliche Retentionszeit. Bei einer seriellen Kombination unterschiedlicher Säulenmaterialien ergibt sich die Gesamtretention eines Analyten aus der linearen Kombination der Retentionszeiten jedes einzelnen Säulenelements. Der resultierende Retentionsfaktor $k_{A,res}$ eines Analyten A auf einer heterogenen Säule, die sich aus den Säulenelementen $i = 1, 2, \dots, n$ zusammensetzt, kann aus den Retentionsfaktoren auf den Einzelementen $k_{A,i}$ und der Länge φ_i der Säulensegmente berechnet werden (Glajch, Gluckman et al. 1985):

$$k_{A,res} = \sum_{i=1}^n \varphi_i * k_{A,i} \quad (2)$$

Der Retentionsfaktor eines Analyten wird für eine gegebene Säule aus dessen Retentions- bzw. Durchflusszeit $t_{A,i}$ und der Durchflusszeit einer nicht-retardierten Referenzsubstanz $t_{R,i}$ berechnet und ist ein Maß für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Analyten in der mobilen bzw. stationären Phase (Lottspeich 1998):

$$k_{A,i} = \frac{t_{A,i} - t_{R,i}}{t_{R,i}} \quad (3)$$

Sind die Retentionsfaktoren einer Gruppe von Analyten auf jedem der untersuchten Säulenmaterialien bekannt, kann rechnerisch die Kombination von Säulensegmenten bestimmt werden, die zu einer größtmöglichen Selektivität α oder zu einer größtmöglichen Auflösung R_s führt.

Die Selektivität entspricht dem Quotienten der resultierenden Retentionsfaktoren zweier benachbarter Peaks $A1$ und $A2$ in einer Säulenkombination: Definitionsgemäß ist $\alpha \geq 1$, wobei die Qualität der Trennung mit zunehmenden Werten für α steigt.

$$\alpha = \frac{k_{A1,res}}{k_{A2,res}} \quad (4)$$

Während die Selektivität lediglich auf die Retentionszeit der betrachteten Analyten zurückzuführen ist, wird die Auflösung auch von deren Peakform beeinflusst. Abhängig von der Berechnungsart fließt diese in Form der Peakbreite an der Basis $W_{A,res}$ oder in Form der Peakbreite auf halber Peakhöhe $WHM_{A,res}$ in die Berechnung ein (Lottspeich 1998):

$$R_s = 2 * \frac{t_{A2,res} - t_{A1,res}}{W_{A2,res} + W_{A1,res}} \quad R_s = 1.18 * \frac{t_{A2,res} - t_{A1,res}}{WHM_{A2,res} + WHM_{A1,res}} \quad (5), (6)$$

In der vorliegenden Arbeit wurde die Software POP-LC-Optimizer (Bischoff Chromatographie) eingesetzt, um nach Bestimmung der Retentionszeiten der Zielmetabolite auf fünf unterschiedlichen Säulenmaterialien, die optimale Kombination von Säulen hinsichtlich der Auflösung zu ermitteln.

Die Peakgeometrie wurde bei der Berechnung anhand der Bodenzahl $N_{A,res}$ berücksichtigt, die aus der Peakbreite und der Retentionszeit für jeden Metaboliten berechnet wurde:

$$N_{A,res} = 16 * \left(\frac{t_{A,res}}{W_{A,res}} \right)^2 \quad (7)$$

Die im POP-LC-System standardmäßig vorhandenen Säulen besitzen unterschiedliche Selektivitäten, um einen möglichst weiten Raum an Wechselwirkungsmechanismen abbilden zu können (Lamotte 2006). Grundsätzlich erfolgt eine Methodenetablierung oder Optimierung auf Basis der Trennungseigenschaften einer C18-Säule mit eingebundener Amidgruppe, einer C30-Säule, einer Cyano-Säule, einer Phenyl-Säule und einer klassischen C18-Säule mit Endcapping (vgl. Abbildung 4.3).

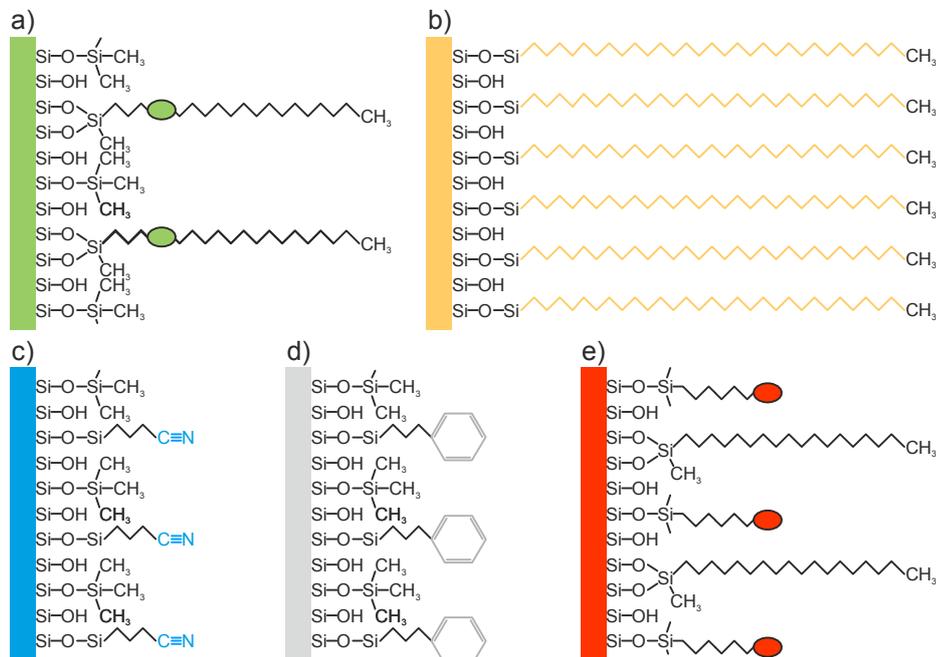


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Standardphasen der POP-LC. a) C18-Säule mit integrierter Amid-Gruppe. Trennung aufgrund von polaren und hydrophoben Wechselwirkungen. b) C30-Säule. Trennung aufgrund von molekularer Formerkennung. c) Cyano-Säule. Trennung aufgrund von polaren Wechselwirkungen. d) Phenyl-Säule. Trennung aufgrund von π - π -Wechselwirkungen. e) C18-Säule mit Endcapping. Trennung aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen

4.5 Probenprozessierung zur Metabolomanalyse

Die analytischen Verfahren, die zur Quantifizierung extra- und intrazellulärer Metabolite eingesetzt werden, sind in den Abschnitten 4.4.2, 4.4.3 und 4.4.4 ausführlich beschrieben. Im Folgenden wird daher lediglich auf die Probenvorbereitung und Bilanzierung für die Analyse intrazellulärer Metabolite eingegangen.

Im ersten Teil des Kapitels ist das Protokoll zur Metabolomanalyse beschrieben, das zu Beginn der Arbeit als Standardprotokoll am IBG-1:Biotechnologie 2 verwendet wurde. Das Protokoll stellt den Ausgangspunkt für alle durchgeführten Optimierungen dar und ist für das Verständnis der Arbeit unverzichtbar.

Im zweiten Teil ist das aus der Arbeit resultierende Protokoll angegeben, mit dem auch die in Abschnitt 10.2 beschriebene Metabolomanalyse durchgeführt wurde. Auf die einzelnen Optimierungen wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen.

4.5.1 Ausgangsprotokoll zur Analyse intrazellulärer Metabolite

Zunächst wurde entsprechend dem in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Verfahren mit einer Plastikspritze ein Volumen von 50 ml aus einer Kultivierung entnommen. Dieses Volumen wurde direkt in eine Schottflasche mit 150 ml 60 % -igem Methanol überführt. Die Quenchinglösung wurde zuvor für mindesten 48 h bei -80°C gelagert. Da die Quenchinglösung bei dieser Temperatur gefriert, wurde die Lösung vor dem Quenching auf Eis aufgetaut und hatte beim Quenching eine Temperatur zwischen -60 und -30°C . Quenchinglösung und Probe wurden gemischt und sechs Aliquote von je 20 ml in 50 ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Die Kontrolle des Volumens erfolgte anhand der Skalierung der Reaktionsgefäße.

Die Aliquote wurden bei -20°C und 10304 g für 10 min zentrifugiert (Avanti 30, Beckmann). Anschließend wurde 1 ml jedes Überstandes sterilfiltriert (Celluloseacetat-Filter 0.22 μm , DIA-Nielsen) und zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Der verbleibende Überstand wurde dekantiert und die Zellpellets in je 2 ml Chloroform, 1 ml Methanol und 1 ml TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.0) resuspendiert. Die Proben wurden zur Extraktion für 2 h bei -20°C im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph) inkubiert, bevor sie erneut für 10 min bei -20°C und 10304 g zentrifugiert wurden (Avanti 30, Beckmann). 1 ml der methanolischen Oberphase wurde abgenommen, sterilfiltriert (Celluloseacetat-Filter 0.22 μm , DIA-Nielsen) und zur späteren Analyse bei -20°C gelagert.

Während des ersten Zentrifugationsschritts wurden weitere 10 ml aus der Kultivierung entnommen. Dieses Volumen wurde zum einen zur Bestimmung der Biotrockenmasse nach der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Methode verwendet. Zum anderen wurde zur späteren Analyse der extrazellulären Metabolite nach dem in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Verfahren eine zellfreie Überstandsprobe generiert und bei -20°C gelagert.

100 μl der Extrakte, Quenchingüberstände und zellfreie Kulturüberstände wurden zur Analyse mittels LC-ESI-MS/MS in Vials abgefüllt und je 100 μl des internen Standards zugegeben. Die abgefüllten Proben wurden sowohl für die Analyse der Zentralstoffwechselmetabolite, als auch für die Analyse der freien Aminosäuren verwendet. Der lineare Bereich der Analytik reichte von 0.0025 bis 100 μM .

Das für die Berechnung der intrazellulären Konzentrationen angewandte Formelwerk ist im Anhang C3 angegeben. Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist in Anhang C4 zu finden.

4.5.2 Optimiertes Protokoll zur Analyse intrazellulärer Metabolite

In Abhängigkeit von der erwarteten Biomassekonzentration zum Zeitpunkt der Probenahme wird das Probevolumen so gewählt, dass jedes generierte Zellpellet ein Biovolumen von ca. 20 µl besitzt. Entsprechend diesem angenommenen Probenvolumen werden 50 ml Reaktionsgefäße mit dem dreifachen Volumen an 60 % -igem Methanol vorbereitet und bei –80°C gelagert. Sieben Minuten vor der Probenahme werden die vorbereiteten Reaktionsgefäße auf Eis aufgetaut und die Temperatur mit Hilfe eines Thermometers (Qtemp 200, VWR International GmbH) verfolgt. Das Quenching erfolgt bei einer Temperatur zwischen –60 und –50°C. Dazu wird entsprechend dem in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Verfahren mit einer Plastikspritze ein Volumen aus einer Kultivierung entnommen, das um 2 ml größer ist, als das benötigte Volumen für die angestrebte Zahl von Replikaten. Das Volumen wird in ein leeres Reaktionsgefäß gegeben und von dort mit einer auf Kultivierungstemperatur kalibrierten Pipette in die Reaktionsgefäße mit Quenchinglösung gegeben.

Die Ansätze werden bei –20°C und 10304 g für 5 min zentrifugiert (Avanti 30, Beckmann). Anschließend wird 1 ml jedes Überstandes sterilfiltriert (Cellulose Acetatfilter 0.22 µm, DIA-Nielsen) und zur späteren Analyse bei –20°C gelagert. Der verbleibende Überstand wird dekantiert und die Zellpellets in Chloroform resuspendiert, wobei das Volumen des Lösungsmittels dem 20-fachen Volumen des Biovolumens im Pellet entspricht. Nach erfolgter Resuspension werden dem Ansatz die Extraktionsmittel Methanol und TE-Puffer hinzugefügt. Das Gesamtvolumen beider Extraktionsmittel entspricht dabei dem Chloroformvolumen.

Parallel zum Quenching erfolgt die Bestimmung des Biovolumens mittels Coulter-Counter und die Generierung einer zellfreien Überstandsprobe nach dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verfahren. 250 µl des zellfreien Überstandes werden unmittelbar nach der Filtration in 750 µl –20°C 60 % -iges Methanol gegeben und bis zur späteren Analyse bei –20 °C gelagert.

Die Extraktion erfolgte wie im Ausgangsprotokoll für 2 h im Überkopfschüttler (Reax 2, Heidolph) bei –20°C. Nach der Extraktion wird der Ansatz in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 13000 g und –20°C zentrifugiert (Avanti 30, Beckmann). Wie im Ausgangsprotokoll wird 1 ml der methanolischen Oberphase abgenommen, sterilfiltriert (Celluloseacetat-Filter 0.22 µm, DIA-Nielsen) und zur späteren Analyse bei –20°C gelagert.

Die Analyse der Extrakte, Quenchingüberstände und 1:4 verdünnten Kulturüberstände erfolgt mittels LC-ESI-MS/MS. Erforderliche Verdünnungen werden mit –20°C kaltem 50 % -igem Methanol durchgeführt. Beim Abfüllen der Proben werden diese im Verhältnis von 1:2 mit internem Standard gemischt. Um die Proben temperatur bis zur Analyse ständig unter –10°C zu halten, werden alle Arbeitsschritte in kühlbaren Aluminium-Racks durchgeführt. Sollten mehrere Analyseverfahren angewendet werden, erfolgt entsprechend eine mehrmalige Abfüllung. Der lineare Bereich der Analytik reicht in Abhängigkeit des Analyten, des internen Standard und der Komplexität der Matrix von 0.0025 bis ca. 10 µM und wird bei jeder Analyse anhand der externen Standardgerade bestimmt.

Das zur Berechnung eingesetzte Formelwerk ändert sich durch die Optimierungen nur geringfügig und ist im Anhang C3 aufgeführt. Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist in Anhang C4 zu finden.

5. Biomassebestimmung

Die Bedingungen, die eine für die Metabolomanalyse geeignete Methode zur Bestimmung der Biomasse erfüllen sollte, sind Allgemeingültigkeit in Bezug auf Organismus und Kultivierungsbedingungen, eine hohe Reproduzierbarkeit und insbesondere die quantitative Abbildung des Biovolumens. Die Bestimmung sollte dabei robust gegenüber äußeren Einflüssen sein und eine zeitnahe Aussage über das Biovolumen ermöglichen.

Die Herausforderung bei der Beurteilung verschiedener Verfahren liegt im Mangel an einem allgemeingültigen Standard, der als Messreferenz geeignet ist. Im Gegensatz zu anderen messtechnischen Vergleichen besteht bei der Untersuchung des Biovolumens nicht die Möglichkeit eine Probe mit einem definierten Biovolumen zu erzeugen. Die Erzeugung würde immer die Messung mit einem der Verfahren erfordern, ohne dieses objektiv verifiziert zu haben.

Aus diesem Grund wurden die Verfahren BTM, OD, Coulter-Counter und dielektrische Kapazitätsmessung lediglich im direkten Vergleich zueinander beurteilt. Auf die Untersuchung der CFU wurde verzichtet, da diese sich aufgrund der in Abschnitt 3.1.1 genannten Einschränkungen nicht als Standardmethode eignet.

5.1 Offline Bestimmung der Biomasse

Um zu untersuchen, ob die eingesetzten Messverfahren in der Lage sind, Zellen mit intakter Membran differenziert zu detektieren, wurde Mischpopulationen erzeugt, die zu unterschiedlichen prozentualen Anteilen aus intakten und nicht-intakten Zellen bestanden.

Dazu wurden 30 ml einer *C. glutamicum* DM 1800 Kultur physikalisch aufgeschlossen (Ultraschall). Danach wurden weitere 30 ml aus der Ausgangskultur entnommen und durch Verdünnung mit Minimalmedium auf Kultivierungstemperatur auf die Zellzahl zum Zeitpunkt der ersten Probenahme eingestellt.

Unter der Annahme, dass die Zellen in der physikalisch aufgeschlossenen Probe zum Teil oder vollständig zerstörte Zellmembranen besitzen und die Zellen in der nachfolgend entnommenen Probe intakte Membranen aufweisen, wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Durch gezielte Mischung beider Ansätze entstanden Proben, die bei gleicher Gesamtzellzahl theoretisch zu unterschiedlichen prozentualen Anteilen Zellen mit intakten und nicht-intakten Membranen enthielten.

Die Proben wurden mit den Verfahren BTM, OD, Durchflusszytometer (Streulicht und Fluoreszenz) und Coulter-Counter (Zellzahl und Biovolumen) jeweils als Triplikat gemessen. Zusätzlich wurden Proben aller Ansätze sterilfiltriert und als Negativkontrollen gemessen.

5.1.1 Biotrockenmasse und optische Dichte

Die klassischen Verfahren zur Biomassebestimmung zeigen lediglich eine geringe Sensitivität für die Unterscheidung von intakten und nicht intakten Zellen (vgl. Abbildung 5.1).

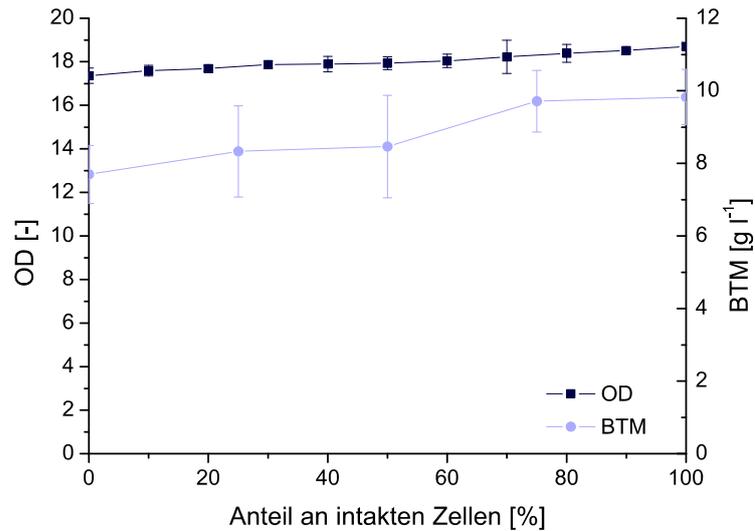


Abbildung 5.1: Optische Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) bei der Analyse von Mischpopulationen gegen den theoretischen Anteil an intakten Zellen in der Probe.

Für die optische Dichte ist ein linearer Zusammenhang zwischen dem Messsignal und dem theoretischen prozentualen Anteil an Zellen mit intakter Membran zu erkennen. Allerdings liegt das Signal, das von der Probe erzeugt wird, die theoretisch keine lebenden Zellen enthalten sollte, nicht bei Null. Dies könnte damit erklärt werden, dass auch zellfreies Medium eine Eigenabsorption besitzt. Mit einem Wert von 0.015 ± 0.005 wurde die Eigenabsorption des Mediums allerdings so niedrig bestimmt, dass sie das detektierte Signal nicht erklären kann. Eine wahrscheinlichere Ursache liegt darin, dass auch Zelltrümmer Licht adsorbieren. Darüber hinaus ist es möglich, dass der physikalische Energieeintrag nicht ausreichend war, um alle in der Lösung vorhandenen Zellen aufzuschließen und folglich auch in der mit 0 % bezeichneten Probe noch Zellen mit intakter Membran vorlagen.

Das Signal der Biotrockenmasse zeigt unabhängig vom theoretischen prozentualen Anteil intakter Zellen einen im Rahmen des Fehlers gleichbleibenden Wert. Dies ist insofern nicht überraschend, als dass die Biomasse in der Probe durch den Aufschluss nicht verringert wird, sondern lediglich die Integrität der Zellen sinkt. Gleichzeitig fällt auf, dass die Biotrockenmasse mit einem prozentualen Fehler zwischen 7 % und 17 % eine größere Standardabweichung aufweist als die Bestimmung der optischen Dichte. Bei vollständiger Vernachlässigung der beobachteten Fehler zeigt die Biotrockenmasse einen größeren dynamischen Bereich als die optische Dichte. Während diese bei einer Verringerung des prozentualen Anteils an intakten Zellen von 100 % auf 0 % um lediglich 7 % sinkt, verringert sich das Biotrockenmasse-Signal um 22 %.

Aufgrund der Ergebnisse kann geschlossen werden, dass sich die Bestimmung der Biotrockenmasse nicht als Methode zur Biomassebestimmung für die Generierung von Metabolomdaten eignet. Die Methode ist nicht in der Lage zwischen Zellen mit intakter und nicht-intakter Membran zu differenzieren. Das Messergebnis stellt ein Summensignal von Zellen jeglicher Integrität und Zelltrümmern dar und eignet sich aus diesem Grund nicht als Bezugsgröße für die Angabe von intrazellulären Konzentrationen.

Die Bestimmung der optischen Dichte bietet die Möglichkeit der zeitnahen Analyse der Biomasse. Sie scheint aber nur in sehr geringem Maße sensitiv gegenüber der Integrität von Zellen zu sein und ist daher als Bezugsgröße für die Angabe von intrazellulären Konzentrationen ebenfalls nicht geeignet.

5.1.2 Streulicht und Fluoreszenz

Für die Analyse der Mischpopulationen mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden die Proben zunächst einer Fluoreszenzfärbung unterzogen (vgl. Abschnitt 4.4.1). Bei der anschließenden Messung erfolgte gleichzeitig die Detektion des Seitenstreulichts, des Vorwärtsstreulichts und der Fluoreszenz bei 450 nm und 550 nm (vgl. Abbildung 5.2).

Eine Auftragung der Fluoreszenzen zeigt deutlich, dass in den Proben zwei Subpopulationen vorliegen. Betrachtet man hingegen die Signale von Vorwärts- und Seitenstreulicht, kann in allen Proben lediglich eine Population detektiert werden.

Die Ergebnisse belegen, dass auf Basis der Lichtstreuung keine Unterscheidung zwischen intakten und nicht-intakten Zellen erfolgen kann. Sie zeigen aber auch, dass die selektive Fluoreszenzfärbung diese Unterscheidung ermöglicht. Aufgrund des hohen manuellen Aufwands scheint das Durchflusszytometer als Standardmethode für die Metabolomanalyse allerdings ungeeignet.

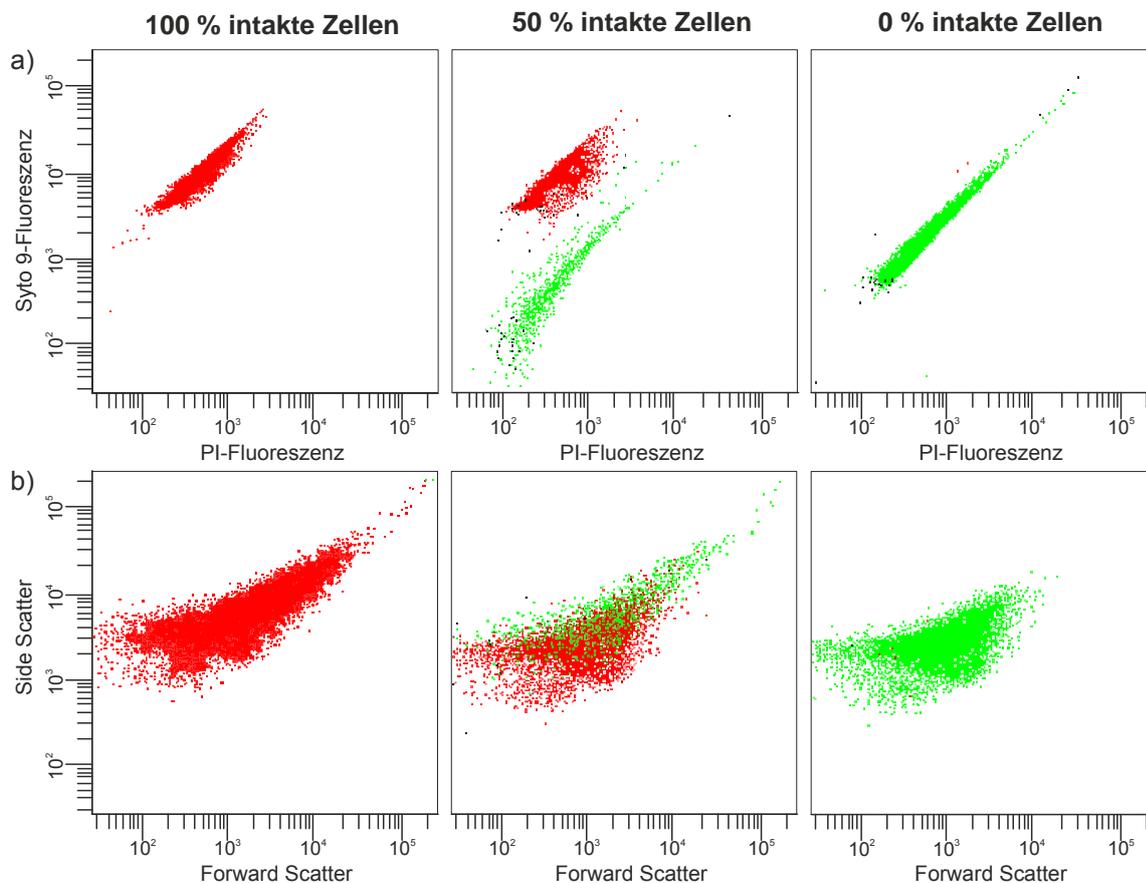


Abbildung 5.2: Signale eines Durchflusszytometers bei der Analyse von drei Mischpopulationen mit unterschiedlichen Anteilen an intakten Zellen. a) Intensität des Syto 9-Fluoreszenz gegen die Intensität der Propidiumiodid (PI)-Fluoreszenz b) Auftragung des Seitenstreulichts (Side Scatter) gegen das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter).

5.1.3 Zellzahl und Biovolumen

Die Analyse von Zellzahl und Biovolumen zeigt in dem gegebenen experimentellen Ansatz einen linearen Zusammenhang zwischen dem Messsignal und dem theoretischen prozentualen Anteil an intakten Zellen (vgl. Abbildung 5.3)

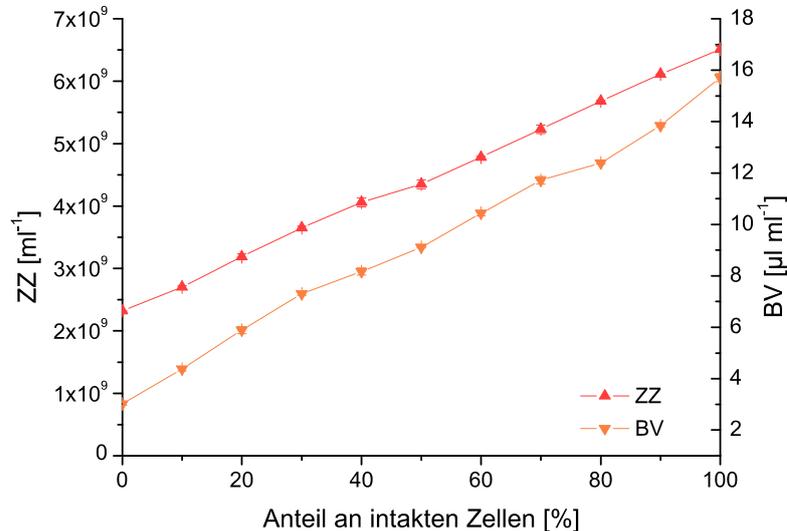


Abbildung 5.3: Zellzahl (ZZ) und Biovolumen (BV) bei der Analyse von Mischpopulationen gegen den theoretischen Anteil an intakten Zellen in der Probe.

Die Daten deuten darauf hin, dass es mit Hilfe der Messmethode möglich ist, intakte Zellen differenziert zu detektieren. Zudem stellt das System ein zeitnahes Analyseverfahren dar, das darüber hinaus die geringste Standardabweichung aller bisher untersuchten Verfahren aufweist.

Da beide Messgrößen (Zellzahl und Biovolumen) sich aufgrund der bisher erzeugten Daten gleichermaßen als Methode zur Biomassebestimmung für die Metabolomanalyse eignen, wurde in weiteren Untersuchungen die Robustheit beider Messgrößen gegenüber der äußeren Einflüssen verglichen.

Sowohl das Biovolumen, als auch die Zellzahl werden mittels Coulter-Counter über die Verdrängung von leitender Flüssigkeit (CASYTon) in einer Messzelle detektiert. Für die Messung ist eine Verdünnung der Proben mit dieser leitenden Flüssigkeit erforderlich, die abhängig von der Biomassekonzentration zwischen 1:1000 und 1:200000 liegen kann. Abgesehen von Fehlern, die durch die manuellen Verdünnungsschritte eingetragen werden, ist bisher nicht untersucht, inwieweit die Verdünnung der Zellsuspension mit CASYTon das Messsignal beeinflusst.

Während davon auszugehen ist, dass sich die absolute Zellzahl direkt proportional zur Verdünnung ändert, ist unklar, welchen Einfluss die Leitfähigkeit und die Osmolalität der zur Verdünnung verwendeten Salzlösung auf das Messsignal des Biovolumens besitzen.

Einfluss der Leitfähigkeit

In einer experimentellen Reihe wurde Biomasse vor der Messung in CASYTon von unterschiedlicher Prozentualität verdünnt. Durch die Verdünnung der Salzlösung mit entsalztem und steril filtriertem Wasser wurden die Leitfähigkeit und die Osmolalität des Lösungsmittels linear verändert.

Die Untersuchung wurde mit *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* aus Schüttelkolben-Kultivierungen durchgeführt, um den Einfluss bei Mikroorganismen mit unterschiedlichen Zellmembranen beobachten zu können. Der Zeitpunkt der Probenahme wurde dabei so gewählt, dass aufgrund von vorangegangenen Untersuchungen mit einem Biovolumen von ca. $10 \mu\text{l ml}^{-1}$ gerechnet werden konnte (vgl. Abbildung 5.4).

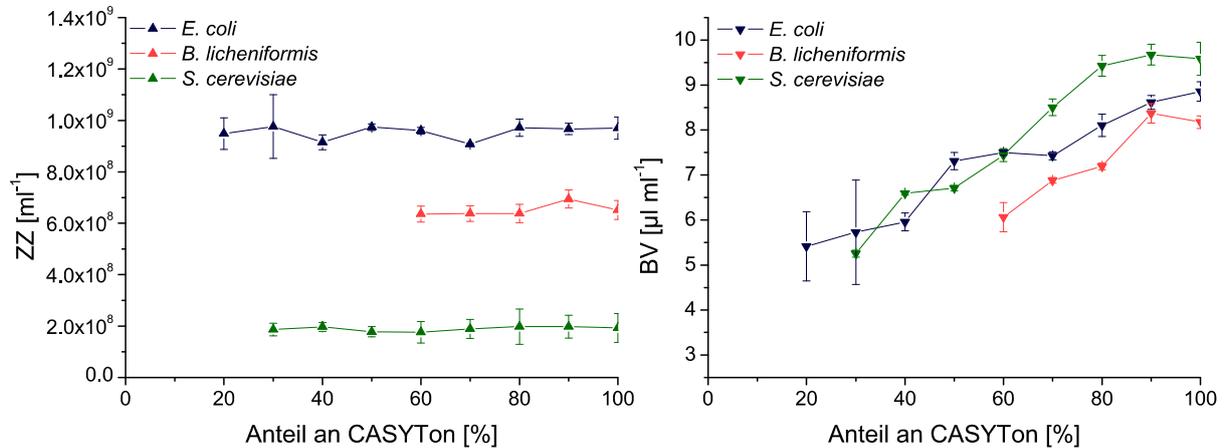


Abbildung 5.4: Einfluss der Leitfähigkeit auf die Detektion mittels Coulter-Counter. In Abhängigkeit von der Prozentualität der Messlösung wurden die absolute Zellzahl (ZZ, links) und das Biovolumen (BV, rechts) in Kultivierungsproben von *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* bestimmt.

Für alle drei Organismen ist zu erkennen, dass die detektierte Zellzahl unabhängig vom prozentualen Anteil an CASYTon in der Messlösung im Rahmen des Fehlers konstant ist.

Das detektierte Biovolumen zeigt mit sinkender CASYTon-Konzentration hingegen einen abnehmenden Wert. Bei einer Konzentrationsverringering um 20 % liegt die Abnahme zwischen 8 % (*E. coli*) und 12 % (*S. cerevisiae*) des Ausgangsvolumens. Das gemessene Biovolumen zeigt folglich eine Korrelation mit der Leitfähigkeit der Messlösung (vgl. Abbildung 5.5).

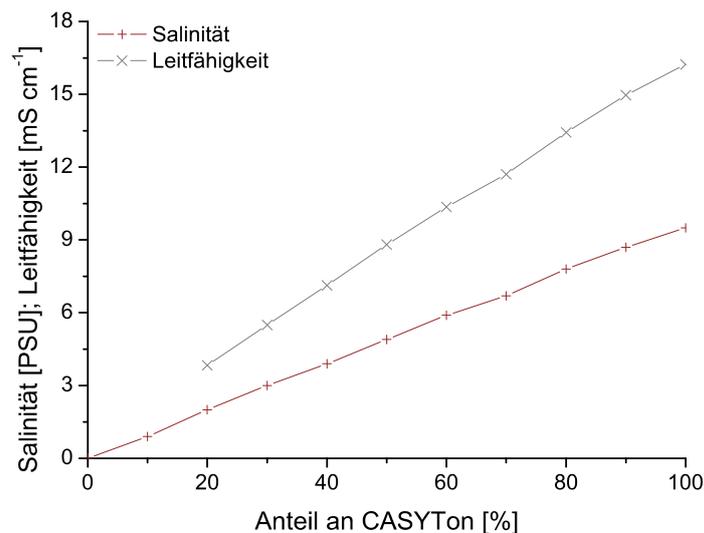


Abbildung 5.5: Salinität und Leitfähigkeit der verwendeten Messlösungen in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil an CASYTon.

Die Verringerung der Leitfähigkeit, die mit einer Verdünnung des Lösungsmittels einhergeht, hat zur Folge, dass ein geringerer Ausgangsstrom im zellfreien Lösungsmittel fließt. Obgleich ein Partikel von definierter Größe unabhängig vom Ausgangsstrom zur einer immer gleichen Erhöhung des Widerstandes und damit zu einem immer gleichen Volumensignal führen sollte, zeigen die generierten Daten eine nicht lineare Beeinflussung der Messung.

Eine physikalische Erklärung der Ergebnisse ist anhand der erhobenen Daten nicht möglich. Die Daten zeigen jedoch zweifelsfrei, dass die Messung des Biovolumens durch die Leitfähigkeit der Messlösung in der Form beeinflusst wird, dass Partikel von identischer Größe in einem Medium von höherer Leitfähigkeit ein stärkeres Signal erzeugen, als in einem Medium von geringerer Leitfähigkeit.

Einfluss der Osmolalität

Aufgrund der obigen Ergebnisse wurde zusätzlich der Einfluss der Osmolalität unabhängig von der Leitfähigkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden Proben mit 50 %-igem CASYTon verdünnt, dessen Osmolalität mittels Zugabe von unterschiedlichen Glucosemengen schrittweise um bis zu $0.5 \text{ Osmol kg}^{-1}$ erhöht wurde.

Die Untersuchung wurde analog zur Obigen mit *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* aus Schüttelkolben-Kultivierungen bei einem angenommenen Biovolumen von $10 \mu\text{l ml}^{-1}$ durchgeführt (vgl. Abbildung 5.6).

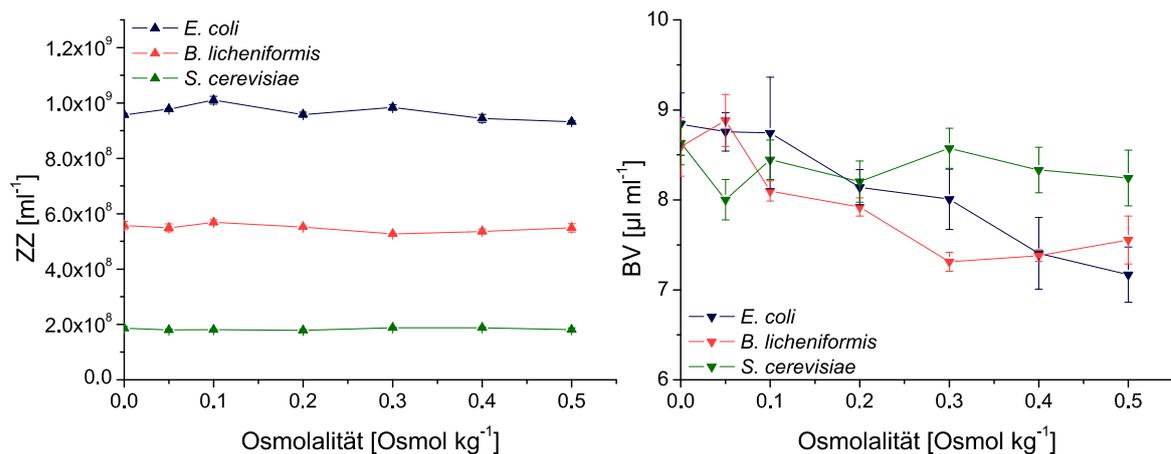


Abbildung 5.6: Einfluss der Osmolalität auf die Detektion mittels Coulter-Counter. In Abhängigkeit von der Osmolalität der Messlösung wurden die absolute Zellzahl (ZZ, links) und das Biovolumen (BV, rechts) in Kultivierungsproben von *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* bestimmt.

Wie beim obigen Versuch bleibt die detektierte Zellzahl im Rahmen des Fehlers unabhängig von der Osmolalität des Messmediums konstant. Für alle Organismen ist aber bei steigender Osmolalität ein sinkendes Biovolumen zu erkennen. Bei einer Erhöhung der Osmolalität um $0.1 \text{ Osmol kg}^{-1}$ beträgt die relative Verringerung zwischen 1 % (*E. coli*) und 5 % (*B. licheniformis*).

Durch eine parallel durchgeführte Messung der Leitfähigkeit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der verringerten Detektion um eine Folge von veränderter Leitfähigkeit handelt. Die Daten der Messung sind in Anhang D1 angegeben.

Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass die potentiometrische Messung des Biovolumens sowohl von der Osmolalität als auch von der Leitfähigkeit der zur Probenverdünnung eingesetzten Lösung beeinflusst werden kann.

Um das Biovolumen mit der beschriebenen Messmethode zu ermitteln, ist es daher notwendig, die Verdünnung in einer Lösung durchzuführen, die zwei Kriterien erfüllt:

1. Die Osmolalität der Lösung muss identisch mit der des Kulturmediums zum Zeitpunkt der Probenahme sein.
2. Die Leitfähigkeit des Messansatzes muss nach der Verdünnung der Leitfähigkeit von 100 % -igem CASYTon entsprechen, da das Gerät bei dieser Leitfähigkeit kalibriert wurde.

Da die Verdünnungsrate vor der Messung zwischen 1:1000 und 1:200000 beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass die Eigenschaften des Lösungsmittels gegenüber den Eigenschaften der verdünnten Kultur dominant sind. Bezüglich der Leitfähigkeit erzeugt die Verdünnung folglich optimale Messbedingungen. Bei der Betrachtung der Osmolalität hingegen, führt die Verdünnung zu einer Verringerung oder Vergrößerung des detektierten Biovolumens, je nachdem ob 100 % -iges CASYTon gegenüber dem Kulturmedium zum Zeitpunkt der Probenahme hyper- oder hypotonisch ist.

Bestimmung des nativen Biovolumens

Um die Relevanz der Volumenänderung für reale Proben einschätzen zu können, wurden das Einzelzellvolumen und der mittlere Zelldurchmesser von *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* Zellen parallel nach der Verdünnung in CASYTon und in sterilfiltriertem Medium bestimmt. Die Leitfähigkeit des Mediums, wurde den obigen Anforderungen entsprechend der Leitfähigkeit von CASY-Ton angepasst (vgl. Abbildung 5.7).

Die gute Übereinstimmung der Werte zeigt, dass für die untersuchten Kultivierungsbedingungen und Medien die Verdünnung nicht zu einer Beeinflussung der absoluten Ergebnisse führt.

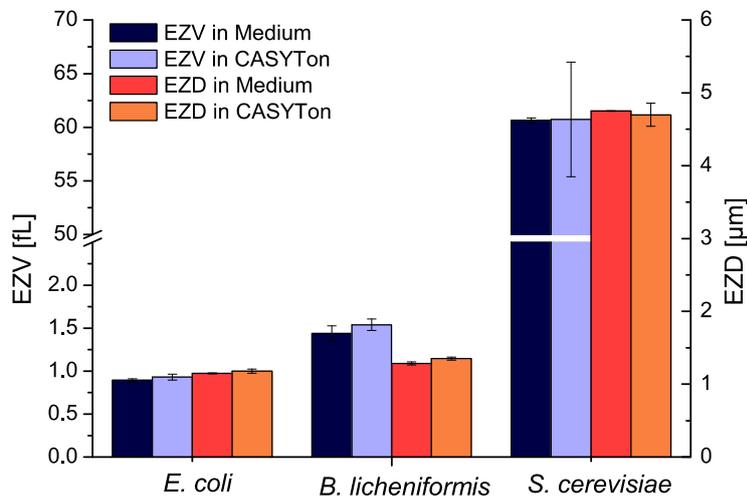


Abbildung 5.7: Bestimmung des Einzelzellvolumens (EZV) und des mittleren Zelldurchmessers (EZD) von *E. coli*, *B. licheniformis* und *S. cerevisiae* mittels Coulter-Counter. Die Proben wurden vor der Messung in Salzlösung (CASY-Ton) oder sterilfiltriertem Kulturmedium mit angepasster Leitfähigkeit verdünnt.

Leitfähigkeit und Osmolalität im Kultivierungsverlauf

Da es sich bei den bisher untersuchten Proben ausschließlich um Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase handelte, wurde weiterführend der Einfluss von Osmolalität und Leitfähigkeit im Kultivierungsverlauf exemplarisch für *E. coli* betrachtet. Speziell wurde untersucht, welchen Veränderungen diese Größen im Verlauf einer Batchkultivierung in Minimalmedium unterliegen (vgl. Abbildung 5.8).

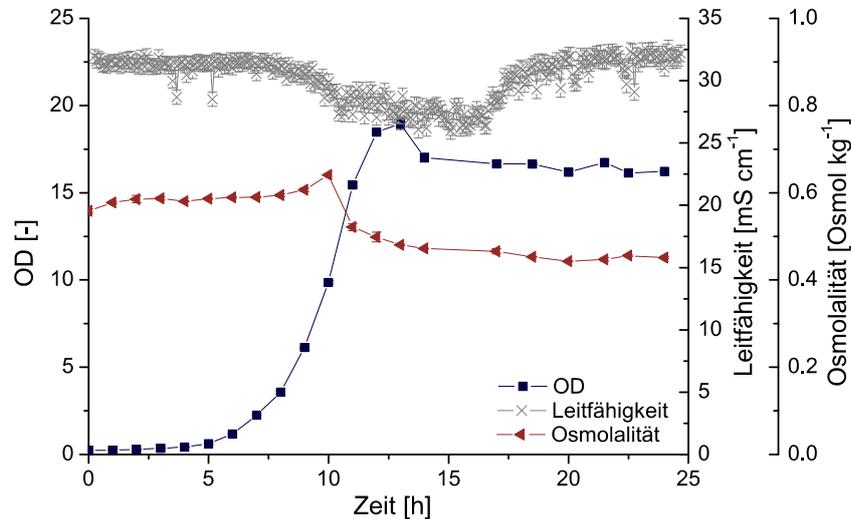


Abbildung 5.8: Veränderungen von Leitfähigkeit und Osmolalität im Verlauf einer Batchkultivierung von *E. coli* in Minimalmedium auf 16 g l^{-1} Glucose.

Es ist zu erkennen, dass sich im Verlauf der Kultivierungen beide Einflussgrößen unabhängig voneinander ändern. Damit besitzt die Verdünnung mit CASYTon keinen systematischen Einfluss auf die Detektion, sondern kann abhängig von der Wachstumsphase sowohl zu einer Unter- als auch zu einer Überschätzung führen.

Darüber hinaus ist zu sehen, dass die Veränderungen von Osmolalität und Leitfähigkeit für die untersuchte Kultivierung in einem Bereich von maximal $0,10 \text{ Osmol kg}^{-1}$ bzw. $6,45 \text{ mS cm}^{-1}$ liegen. Betrachtet man die in den Abbildungen 25 und 27 dargestellten linearen Zusammenhänge zwischen beiden Messgrößen und der Zellgröße kann eine Kombination beider Einflüsse rein rechnerisch maximal zu einer Veränderung des detektierten Messsignals um 3 % führen. Da diese Abweichung unter dem Standardfehler des Gerätes bei Messung von Replikaten liegt, ist sie somit vernachlässigbar gering.

Native Zellgröße im Kultivierungsverlauf

Die Messung der Zellzahl zeigte sich in allen vorangegangenen Untersuchungen gegenüber der Messung des Biovolumens als robusteres Verfahren und wäre aus diesem Grund als Standardmethode für die Biomassebestimmung zu bevorzugen. Weiterführend stellte sich somit die Frage, ob auch die Berechnung des Biovolumens aus der Zellzahl und dem Einzelzellvolumen (Literaturwert, Kubitschek und Friske 1986) sinnvolle Ergebnisse liefert.

Eine Schüttelkolben-Kultivierung von *E. coli* wurde über einen Zeitraum von 7 h beprobt und unter optimalen Bedingungen hinsichtlich Zellzahl, Einzelzellvolumen und Biovolumen analysiert (vgl. Abbildung 5.9)

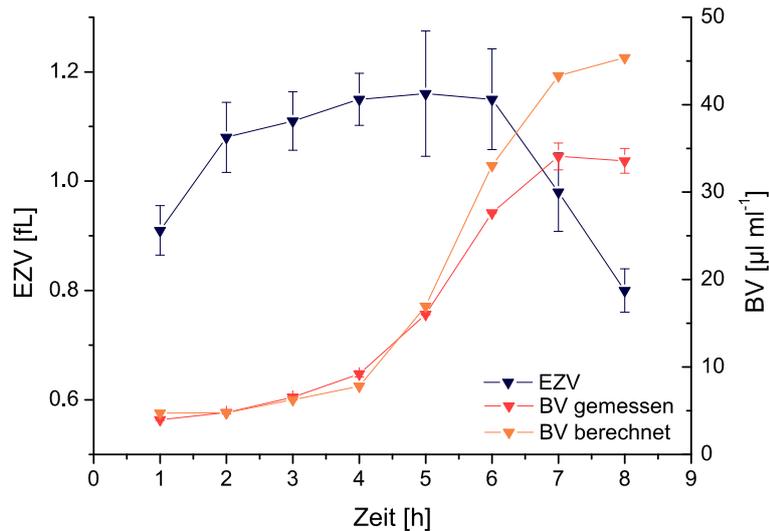


Abbildung 5.9: Veränderung von Einzelzellvolumen (EZV) und Biovolumen (BV) im Verlauf einer Batchkultivierung von *E. coli* in Minimalmedium auf 16 g l^{-1} Glucose. Die dargestellten Biomassevolumina wurden entweder mittels Coulter-Counter erfasst (BV gemessen) oder aus der gemessenen Zellzahl und einem Literaturwert für das Einzelzellvolumen berechnet (BV berechnet).

Es ist zu erkennen, dass sich das Einzelzellvolumen im Verlauf der Kultivierung ändert. Während es bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich steigt, sinkt es in der stationären Phase in den ersten 2 h nahezu linear.

Die Verläufe der berechneten und gemessenen Biovolumenkurven zeigen einen ähnlichen Trend. Dennoch unterscheiden sie sich insbesondere im hinteren Teil der Kultivierung um bis zu $1.6 \mu\text{l ml}^{-1}$ beziehungsweise 23 %.

Anhand der Daten wird deutlich, dass sich die Zellzahl in Kombination mit einem durchschnittlichen Einzelzellvolumen nicht als Bezugsgröße für die Metabolomanalyse eignet.

5.2 Online Bestimmung des Biovolumens

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass sich die Biovolumen-Messung mittels Coulter-Counter als Bezugsgröße für die Metabolomanalyse eignet. Darüber hinaus wurde mit der dielektrischen Kapazitätsmessung ein weiteres Verfahren untersucht, welches gegenüber allen etablierten Verfahren den wesentlichen Vorteil besitzt, Online und damit unbeeinflusst von jeglicher Probenvorbereitung messen zu können.

Die dielektrische Kapazitätsmessung wurde bisher vor allem für Kultivierungen im industriellen Maßstab und insbesondere bei der Untersuchung von Hefen und Pilzen angewendet (Nipkow, Andretta et al. 1990). Aus diesem Grund soll zunächst gezeigt werden, ob die Methode sich auch im Labormaßstab und zur Abbildung des Wachstums bakterieller Kulturen eignet.

5.2.1 Untersuchung der Funktionalität

Die Kapazitätsmessung wurde für den gram negativen Organismus *E. coli* getestet. Der Organismus wurde unter den in Abschnitt 4.1.4 angegebenen Bedingungen im Bioreaktor kultiviert. Parallel wurden die dielektrische Kapazität, die optische Dichte, die Biotrockenmasse, der Sauerstoffpartialdruck im Medium und der prozentuale Massenanteil an CO_2 in der Abluft aufgezeichnet, um die etablierten Biomasseindikatoren dem Sondersignal gegenüberzustellen (vgl. Abbildung 5.10).

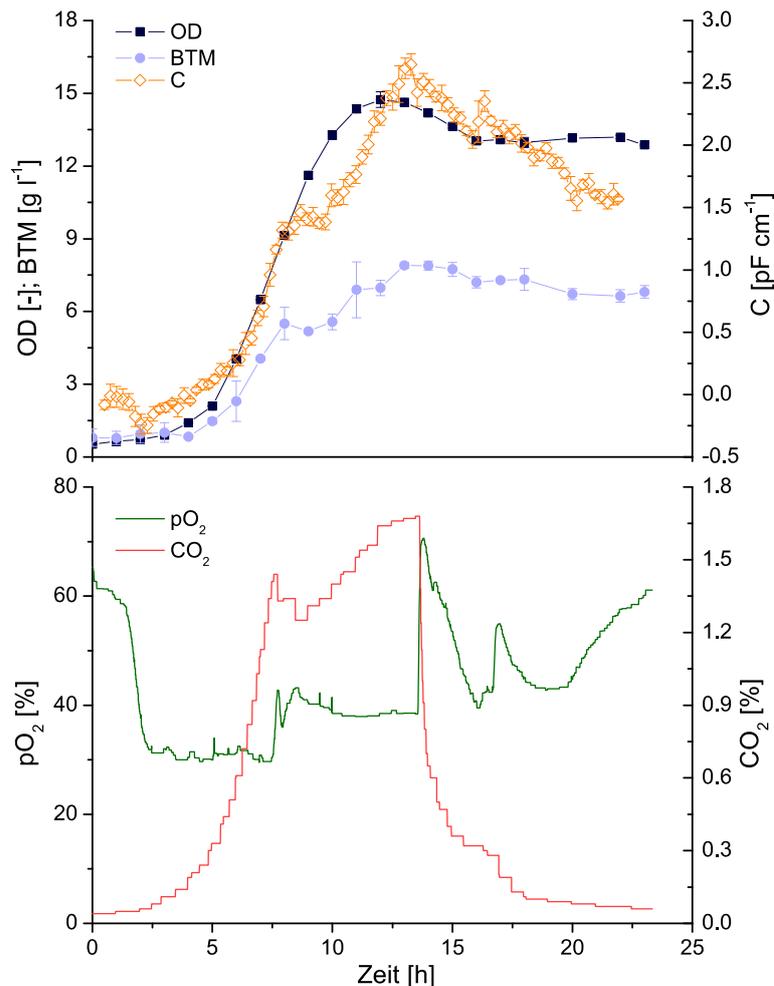


Abbildung 5.10: Vergleich der dielektrischen Kapazität mit etablierten Biomasseindikatoren in einer Reaktor-Kultivierung von *E. coli* in Minimalmedium auf 16 g l^{-1} Glucose. Mit der optischen Dichte (OD), der Biotrockenmasse (BTM), der dielektrischen Kapazität (C), dem prozentualen Massenanteil an CO_2 in der Abluft (CO_2) und dem Sauerstoffpartialdruck (pO_2).

Die Sondenmessung stimmt mit den übrigen Biomasseindikatoren weitgehend überein, wobei eine Differenz zwischen dem Kapazitätssignal und der optischen Dichte zwischen $t = 8 \text{ h}$ und $t = 13 \text{ h}$ zu erkennen ist. Betrachtet man die Auftragungen von CO_2 und pO_2 wird deutlich, dass in dieser Zeitspanne eine Veränderung des Stoffwechsels erfolgt. Die exponentielle Wachstumsphase endet und die Übergangsphase beginnt. Möglicherweise sinkt die Anzahl der lebenden Zellen zu Beginn dieser Phase vorübergehend oder bleibt konstant, bevor das Wachstum wieder einsetzt.

Aufgrund der geringeren Sensitivität der photometrischen Messung ist es möglich, dass sich dies nicht in der optischen Dichte widerspiegelt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass zu Beginn dieser Phase ein Teil der Population in das VBNC-Stadium übergeht und aufgrund von veränderten elektrischen Eigenschaften (geringere Ladungsdichte) ein verringertes SONDENSIGNAL hervorruft (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Dies wirft die Frage auf, ob die dielektrische Kapazität ausschließlich proportional zum Biovolumen einer Zelle ist oder ob Zellen von identischem Volumen aufgrund von weiteren Faktoren unterschiedliche Signale erzeugen können.

5.2.2 Detektion von Subpopulationen

Da das VBNC-Stadium reversibel ist, sollte es möglich sein, eine Kultur, die ausschließlich aus diesen Zellen besteht, durch einen Substratpuls zu revitalisieren. Die revitalisierten Zellen sollten unmittelbar nach dem Substratpuls vom VBNC-Stadium in das VC-Stadium wechseln, was mit einer Erhöhung des Membranpotentials und einer Zunahme der Einzelzellgröße einhergeht.

Unter der Annahme, dass das dielektrische Kapazitätssignal einer VC-Population höher ist, als das einer VBNC-Population, sollte die Kapazität einer substratlimitierten Kultur unmittelbar nach einem Substratpuls ansteigen. Wenn die Zunahme der dielektrischen Kapazität proportional zur Zunahme des Biovolumens erfolgt, sollte ein paralleler Anstieg der optischen Dichte beobachtet werden können. Da die optische Dichte ein Indikator der Gesamtzellzahl ist und eine Sensitivität gegenüber morphologischen Veränderungen besitzt, sollte sie sowohl Zellteilungen, als auch die Zunahme des Einzelzellvolumens detektieren können (vgl. Abschnitt 3.1.1).

Zur experimentellen Überprüfung wurde *E. coli* nach dem in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Standardprotokoll kultiviert, wobei die Glucosekonzentration auf 10 g l^{-1} verringert wurde. 22 h nach der vollständigen Verstoffwechslung der Glucose wurde die Kultur durch einen Glucosepuls von 7.5 g l^{-1} revitalisiert (vgl. Abbildung 5.11).

Um physikalische Einflussfaktoren auf die Sondenmessung auszuschließen, wurde die Messung bei konstanter Rührerdrehzahl von 600 rpm und unter gleichzeitiger Betrachtung der Leitfähigkeit des Mediums durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

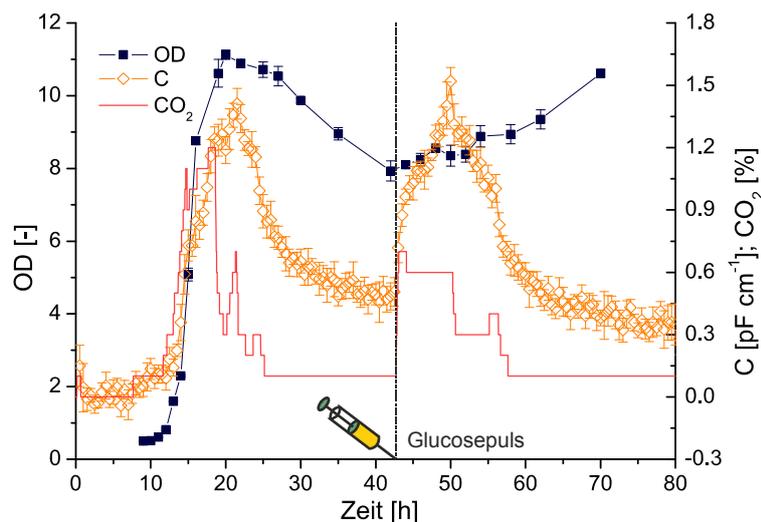


Abbildung 5.11: Verlauf der dielektrische Kapazität einer revitalisierten Kultivierung von *E. coli* in Minimalmedium auf 10 g l^{-1} Glucose. Mit der optischen Dichte (OD), dem prozentualen Massenanteil an CO_2 in der Abluft (CO_2) und der dielektrischen Kapazität (C).

Anhand des CO_2 -Signals sind wie in der obigen Kultivierung mehrere Phasen zu erkennen. Bis $t = 16 \text{ h}$ wächst die Kultur exponentiell, woraufhin sich eine kurze Übergangsphase mit verminderter Biomassebildung anschließt. Nach $t = 25 \text{ h}$ befindet sich die Kultur in einem glucoselimitierten Zustand in dem der prozentuale Massenanteil an CO_2 in der Abluft auf unter 0.1% sinkt und die Kultur praktisch keinen Sauerstoff verbraucht. Bei $t = 42 \text{ h}$ wurde die Kultur durch eine Glucosepuls revitalisiert, woraufhin das CO_2 -Signal eine sprunghaft ansteigt.

In der exponentiellen Wachstumsphase verläuft das dielektrische Kapazitätssignal parallel zur optischen Dichte und bestätigt damit die Beobachtung der vorangegangenen Kultivierung. Zwischen $t = 21$ h und $t = 42$ h sinkt das Sondensignal um ca. 60 %, während die optische Dichte um lediglich 30 % abnimmt. Unter der Annahme, dass Veränderungen der intrazellulären Ladungsdichte ebenso wie das Biovolumen die Messung beeinflussen, deutet dies darauf hin, dass der prozentuale Anteil an VBNC steigt, während die Gesamtzellzahl um einen geringeren Anteil sinkt oder konstant bleibt. Nach dem Glucosepuls nimmt die optische Dichte gegenüber dem Sondensignal erst mit zeitlicher Verzögerung zu.

Die in der Abbildung nicht dargestellte Leitfähigkeit des Mediums verändert sich nur zum Zeitpunkt der Glucosezugabe und auch dort um weniger als 5 % und kann als Einflussgröße der Sondenmessung ausgeschlossen werden.

Die Kultivierung wurde über 142 h weitergeführt, erreichte aber nicht den Ausgangspondenwert. Dies deutet darauf hin, dass auch zu diesem Zeitpunkt (nach 82 h Glucoselimitierung) noch intakte Zellen im VBNC-Stadium vorlagen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Sonde in der Lage ist, den Biomasseverlauf von *E. coli* qualitativ abzubilden, wobei der Übergang von Zellen in unterschiedliche Subpopulationen einen Einfluss auf die Messung zu haben scheint. Der Theorie entsprechend sollte die Sondenmessung unmittelbar mit dem Biovolumen korrelieren (vgl. Abschnitt 3.1.1). Dies würde bedeuten, dass das veränderte Messsignal beim Übergang von Zellen aus dem VC- in das VBNC-Stadium auf eine morphologische Veränderung (Verringerung der Einzelzellvolumens) zurückgeführt werden kann.

Aufgrund der bisherigen Daten kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Kapazität neben dem Biovolumen auch von der intrazellulären Ladungsdichte einer Zelle abhängt. Da die Polarisierung einer Membran bei der Messung direkt mit der Anzahl der Ionen korreliert, die von ihr getrennt werden, sollte eine Zelle bei gleichem Volumen und sinkendem Membranpotential ein gleichfalls sinkendes Kapazitätssignal erzeugen. In diesem Fall korreliert das Messsignal nicht mehr mit dem Biovolumen und wäre somit für die Metabolomanalyse ungeeignet.

5.3 Fazit Biomassebestimmung

Für die Bestimmung der Biomasse erfüllt die potentiometrische Messung des Biovolumens mittels Coulter-Counter die Anforderungen der Metabolomanalyse am besten und zeigt darüber hinaus einen geringeren Standardfehler als andere etablierte Verfahren, wie z.B. die Messung der Bio-trockenmasse oder der optischen Dichte.

Die Messmethode ist zudem in der Lage zwischen intakten und nicht-intakten Zellen zu differenzieren. Es wurde gezeigt, dass die Methode sensitiv gegenüber den Faktoren Osmolalität und Leitfähigkeit ist, allerdings besitzen die im Verlauf einer Batchkultivierung auftretenden Veränderungen dieser Größen, aufgrund ihrer geringen Höhe, nur einen sehr geringen Einfluss auf die Biomassebestimmung.

Die Online-Bestimmung der Biomasse mittels dielektrischer Kapazitätssonde wurde hinsichtlich ihrer Funktionalität erfolgreich getestet. Es bestehen allerdings noch offene Fragestellungen bezüglich des Einflusses der intrazellulären Ladungsdichte.

6. Probenahme

Die Kriterien, welche die Probenahme zur Generierung von Metabolomdaten erfüllen sollte, sind zum einen die exakte Entnahme eines definierten Volumens und zum anderen eine hohe Beprobungsgeschwindigkeit.

Es liegt außerhalb des Rahmens dieser Arbeit ein System zur schnellen und akkuraten Entnahme von Proben zu entwickeln. Stattdessen wurde versucht die Unvereinbarkeit zwischen Schnelligkeit und Genauigkeit aufzulösen, indem das exakte Volumen einer Probe nach der Entnahme eines undefinierten Volumens mit maximaler Geschwindigkeit unter Einsatz eines internen Standards quantifiziert wird.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die exakte manuelle Beprobung mittels Pipette möglich ist und zu welcher zeitlichen Verzögerung gegenüber der Standardbeprobung mittels Spritze sie führt.

6.1. Quantifizierung undefinierter Probenvolumina

Bei der Generierung von Metabolomdaten sind, abhängig vom verwendeten Protokoll, zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten Volumenkorrekturen notwendig (vgl. Abschnitt 3.1.2):

1. Bei der Entnahme der Probe aus dem Reaktor und dem Quenching des undefinierten Volumens
2. Beim Aliquotieren des Quenchingansatzes

Beide Korrekturen erfordern einen unterschiedlichen Einsatz von internen Standards.

6.1.1 Quantifizierung des Probenvolumens

Um das Probevolumen zu quantifizieren, wurde ein interner Standard einer definierten Konzentration c_0 in die Quenchinglösung gegeben. Durch die Zugabe der Probe erfolgt während des Quenchings eine Verringerung dieser Konzentration zur Endkonzentration c_1 , die linear mit der erfolgten Verdünnung in Form des Verdünnungsfaktors α korreliert. Dieser entspricht dem Verhältnis des Quenchingvolumens V_q zum Summenvolumen aus Quenchingflüssigkeit V_Q und Probe V_s und kann zu dessen Berechnung genutzt werden.

$$c_1 = c_0 \cdot \alpha \qquad \alpha = \frac{V_q}{V_q + V_s} \qquad (8),(9)$$

Anhand einer parallel durchgeführten Kalibrierung konnte ausschließlich aufgrund der Konzentrationsverringerung auf das Volumen der Probe geschlossen werden (vgl. Abbildung 6.1.a).

Als interner Standard wurde Maleinsäure verwendet. Die Dicarbonsäure ist ein Isomer der Fumarsäure und nach heutigem Kenntnisstand nicht physiologisch. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit konnte die Detektion des Standards analog zur Analyse physiologischer Carboxylsäuren mittels LC-ESI-MS/MS erfolgen.

Um zu ermitteln, in welchem Bereich das Messsingal (Peakfläche) der Maleinsäure linear mit der eingesetzten Konzentration korreliert und so die optimale Konzentration des internen Standards zu ermitteln, wurden Sättigungskurven aufgenommen, die im Anhang E1 wiedergegeben sind.

Für die Kalibrationsgerade wurde die mit internem Standard versetzte Quenchinglösung zum Zeitpunkt der Probenahme mit definierten Volumina an steriltfiltriertem Kulturüberstand verdünnt. Um den Bereich abzudecken, in dem eine akkurate Probenahme liegen würde, wurden für die Kalibrationsgerade Verdünnungen im Bereich von 1:6 bis 1:3 durchgeführt (vgl. Abbildung 6.1.b).

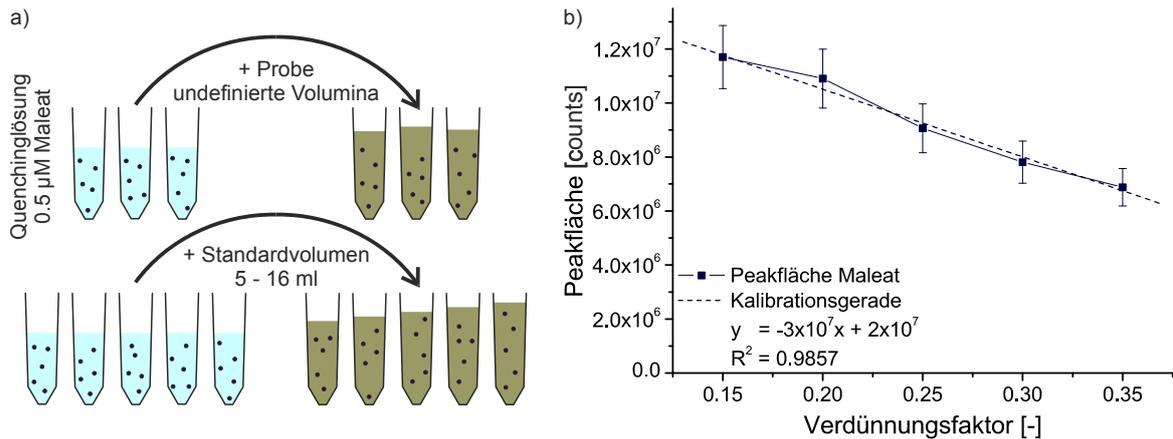


Abbildung 6.1: Quantifizierung des Probenvolumens mit Hilfe eines internen Standards. a) Schematische Darstellung des Verfahrens, bei dem ein interner Standard (Maleat) in die Quenchinglösung gegeben und bei der Probenahme entsprechend dem Volumen verdünnt wird. b) Kalibrationsgerade, die durch Verdünnungen einer markierten Quenchinglösung mit definierten Volumina an sterilfiltriertem Kulturüberstand erzeugt wurde. Anhand der Auftragung der absoluten Peakflächen gegen den Verdünnungsfaktor (Ausgangsvolumen/Endvolumen) kann das Volumen der Probe ermittelt werden.

Die Funktionalität des internen Standards wurde getestet, indem in fünf Replikaten ca. 10 ml einer *B. licheniformis* Batchkultivierung in 30 ml -50°C kaltem 60 % -igem Methanol gequenchet wurden.

Anhand des internen Standards wurde das tatsächliche Volumen der Replikate mit $11,62 \pm 0,52$ ml bestimmt. Die absoluten Peakflächen des internen Standards, sowie die daraus berechneten Verdünnungsfaktoren und Volumina der Einzelproben sind im Anhang E1 angegeben.

6.1.2 Quantifizierung des Aliquotvolumens

Um Volumenfehler bei Aliquotieren zu korrigieren, wurde eine definierte Menge eines internen Standards in den Probenahmegefäßen vorgelegt. Die Flüssigkeit wurde bei Raumtemperatur verdampft, sodass in allen Gefäßen eine identische Stoffmenge als Feststoff vorlag. Beim Aliquotieren wird diese Stoffmenge resolvasiert, wobei die Konzentration des gelösten internen Standards direkt proportional zum Volumen des Ansatzes sein sollte (vgl. Abbildung 6.2.a).

Als interner Standard wurde zyklisches AMP (cAMP) eingesetzt. Da die Möglichkeit besteht, auch in Extrakten auf dieses Molekül zu treffen, wäre eine unphysiologische Alternative von Vorteil. In den bisher durchgeführten Analysen konnte allerdings kein physiologisches cAMP nachgewiesen werden.

Für die Kalibrationsgerade wurden zum Zeitpunkt der Probenahme definierten Volumina an sterilfiltriertem Kulturüberstand in die mit internem Standard versehenen Reaktionsgefäße gegeben. Die Resuspension erfolgte mit 8, 9, 10, 11 und 12 ml (vgl. Abbildung 6.2.b).

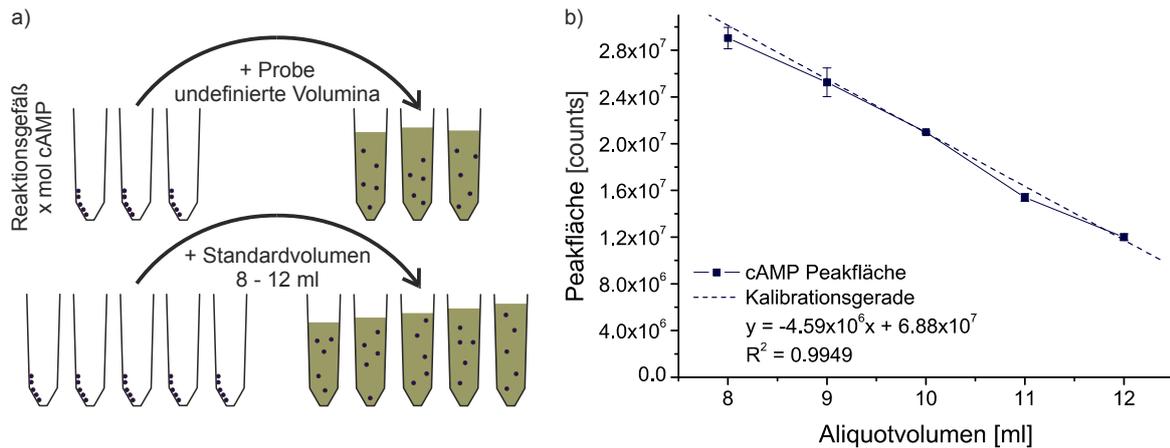


Abbildung 6.2: Quantifizierung des Aliquotvolumens mit Hilfe eines internen Standards. a) Schematische Darstellung des Verfahrens, bei dem eine definierte Menge eines internen Standards (cAMP) lösungsmittelfrei in den Probenahmegefäßen vorgelegt und bei der Probenahme resolvatisiert wird. b) Kalibrationsgerade die durch die Resolvatisierung mit definierten Volumina an gequenchter Biomasse erzeugt wurde. Anhand der Auftragung der absoluten Peakflächen gegen das zugegebene Volumen kann das Volumen der Aliquote ermittelt werden.

Auch der Einsatz des internen Standards für die Volumenkorrektur der Aliquotierung wurde anhand einer realen Beprobung überprüft. Dazu wurde gequenchte Biomasse von *B. licheniformis* in fünf Aliquote von je ca. 10 ml aufgeteilt, wobei die Aufteilung anhand der Skalierung auf den Reaktionsgefäßen erfolgte. Die tatsächlichen Aliquotvolumina wurden anhand der cAMP-Konzentration in den Quenchingansätzen bestimmt.

Auf diese Weise wurde das mittlere Aliquotvolumen mit 11.48 ± 0.23 ml bestimmt. Die absoluten Peakflächen der internen Standards, sowie die daraus berechneten Aliquotvolumina sind im Anhang E1 angegeben.

6.2 Beprobung mittels Pipette

Ein alternatives Verfahren zur manuellen Entnahme von exakten Volumina ist die Pipette. Soll dieses Verfahren für die Beprobung von Kultivierungssystemen eingesetzt werden, erfordert es zunächst die Entnahme eines undefinierten Volumens in ein Lagergefäß, aus dem definierte Volumina entnommen werden können.

Um die Beprobung mittels Pipette mit der manuellen Standardbeprobung mittels Spritze zu vergleichen, wurde einer Kultivierung von *C. glutamicum* DM 1800 mit beiden Verfahren als 5-fach Replikat ein Volumen von 10 ml entnommen. Die Entnahme wurde dreimal durchgeführt. Die Kontrolle des Probenvolumens erfolgte gravimetrisch unter Annahme einer Dichte von 1 g ml^{-1} . Die benötigte Zeit für die Entnahme aller Proben wurde mit Hilfe zweier Stoppuhren gemessen (vgl. Abbildung 6.3).

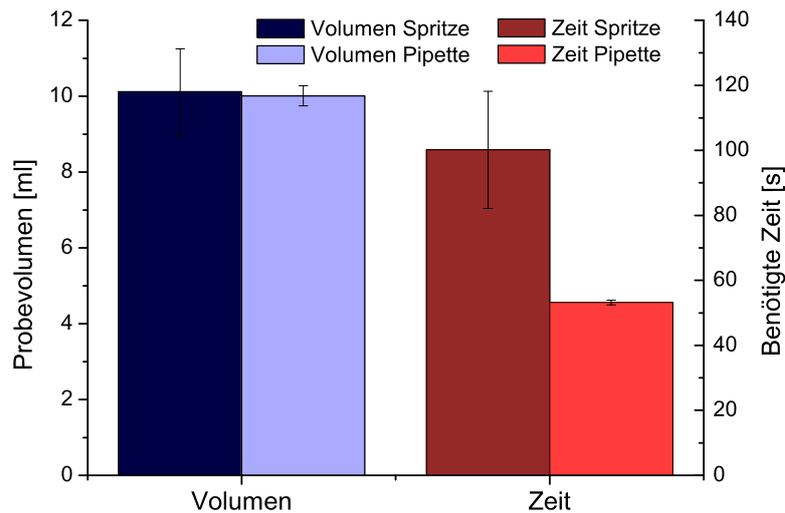


Abbildung 6.3: Genauigkeit und Beprobungszeit beim der dreimaligen Entnahme von 5 Replikaten mit einem Volumen von 10 ml mittels Pipette und Spritze.

Es ist zu erkennen, dass die Volumina, die mittels Pipette und Spritze entnommen wurden im Mittelwert eine vergleichbare Abweichung zum Sollvolumen aufweisen. Betrachtet man hingegen den Standardfehler beider Verfahren, liegt dieser mit 11 % bei Einsatz der Spritze deutlich über dem der Pipette (2 %). Zudem konnte die Beprobung mittels Pipette in einer kürzeren Zeit realisiert werden.

6.3 Fazit Probenahme

Es konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe von internen Standards möglich ist variierende Proben- und Aliquotvolumina zu korrigieren. Die Korrektur ist sowohl für den Einsatz bei der manuellen, als auch bei der semi-automatischen Probenahme geeignet. Sie ist allerdings mit einem hohen manuellen Aufwand verbunden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Entnahme eines exakt definierten Volumens aus einem Kultivierungssystem manuell erfolgen kann. Die Entnahme eines undefinierten Volumens und die Aliquotierung mittels Pipette ist dabei gegenüber dem Einsatz einer Spritze zu bevorzugen.

7. Quenching

Die für die Metabolomanalyse essentielle Inaktivierung des Stoffwechsels mittels Quenching stellt für die quantitative und relative Analytik eine große Herausforderung dar. Für die Etablierung eines Standardverfahrens, ist es notwendig, zunächst die grundlegende Frage zu beantworten, welcher der beiden in Abschnitt 3.1.3 genannten Ansätze (sequenziell oder simultan) eine allgemeine Gültigkeit besitzt. Für die Wahl des Quenchingansatzes sind dabei insbesondere die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Sind im extrazellulären Raum einer Kultur Metabolite vorhanden?
2. In welchen Konzentrationen liegen sie vor?
3. Was ist die Ursache für ihr Vorhandensein?

Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen war es zunächst, einen umfangreichen Satz an extrazellulären Metabolomdaten zu generieren. Auf Grundlage dieser Daten wurde anschließend versucht, die Ursachen für das Vorhandensein extrazellulärer Metabolite einzugrenzen. Anhand der Ergebnisse konnte entschieden werden, welcher der beiden Quenchingansätze (sequenziell oder simultan) sich als Standardverfahren zur Generierung von Metabolomdaten eignet.

Auf eine weitere Optimierung der Quenchinglösung wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da vorangegangene Arbeiten bereits zeigen konnten, dass eine allgemeingültige Quenchinglösung nicht existiert beziehungsweise auch „optimierte“ Quenchinglösungen nicht allen Kriterien gerecht werden (Kruse 2011).

7.1 Analyse des Exometaboloms

Zunächst wurden Kultivierungen von *E. coli*, *B. licheniformis*, *C. glutamicum* DM 1800 und *S. cerevisiae* unter definierten Bedingungen durchgeführt.

Für alle Organismen wurde der extrazelluläre Raum im Verlauf der Kultivierungen auf das Vorhandensein von Metaboliten des Zentralstoffwechsels, freien Aminosäuren und klassischen Nebenprodukten wie Acetat und Ethanol untersucht. Für jeden Organismus ist eine Auswahl an Analyten, sowie ausgewählten Prozessparameter in den Abbildungen 7.1 bis 7.4 dargestellt. Alle weiteren Exometabolomdaten sind im Anhang F1 aufgeführt.

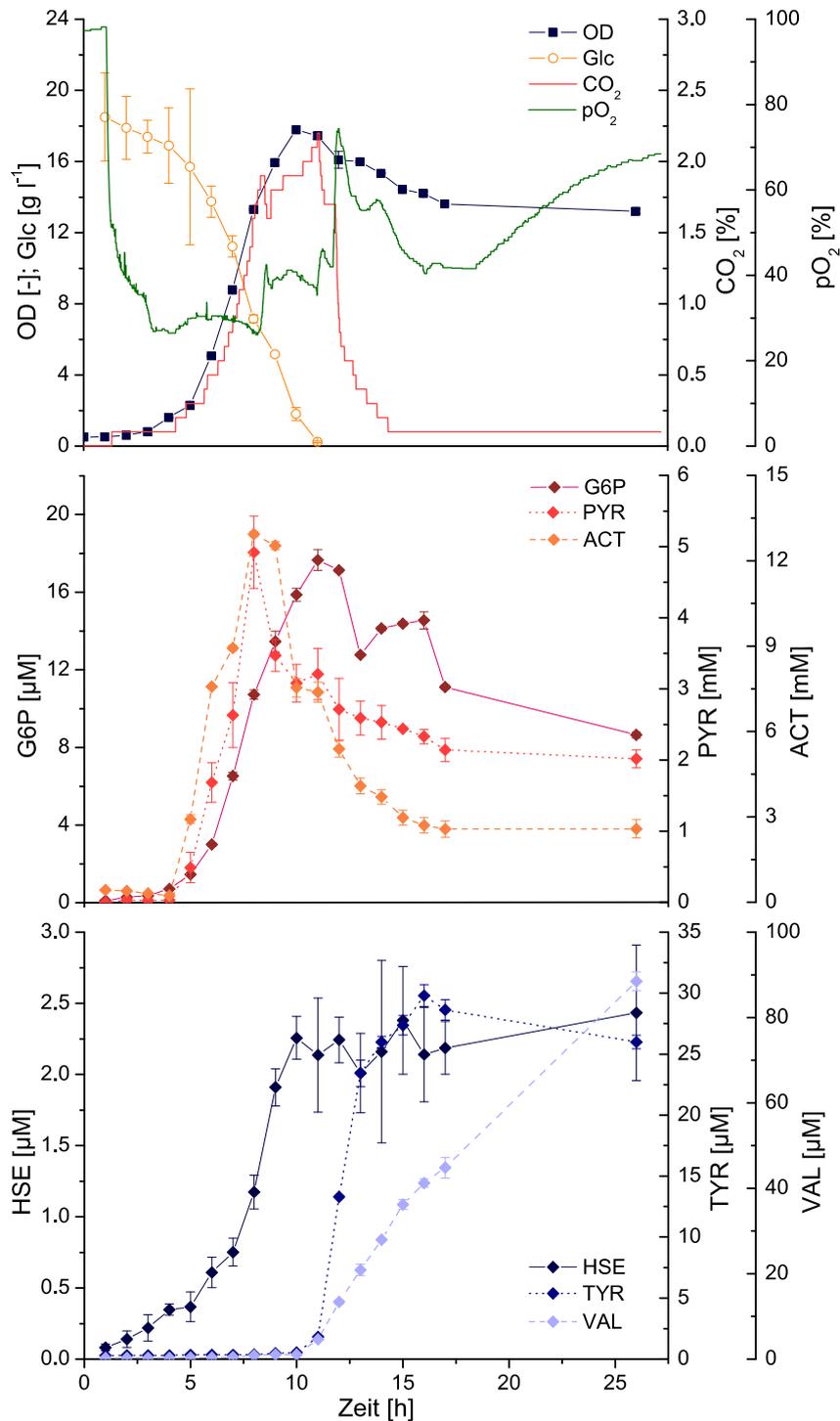


Abbildung 7.1: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *E. coli* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit der optischen Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), dem Sauerstoffpartialdruck (pO₂), dem prozentualen Massenanteil an CO₂ in der Abluft (CO₂) und den extrazellulären Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat (G6P), Pyruvat (PYR), Acetat (ACT), Tyrosin (TYR), Valin (VAL) und Homoserin (HOM).

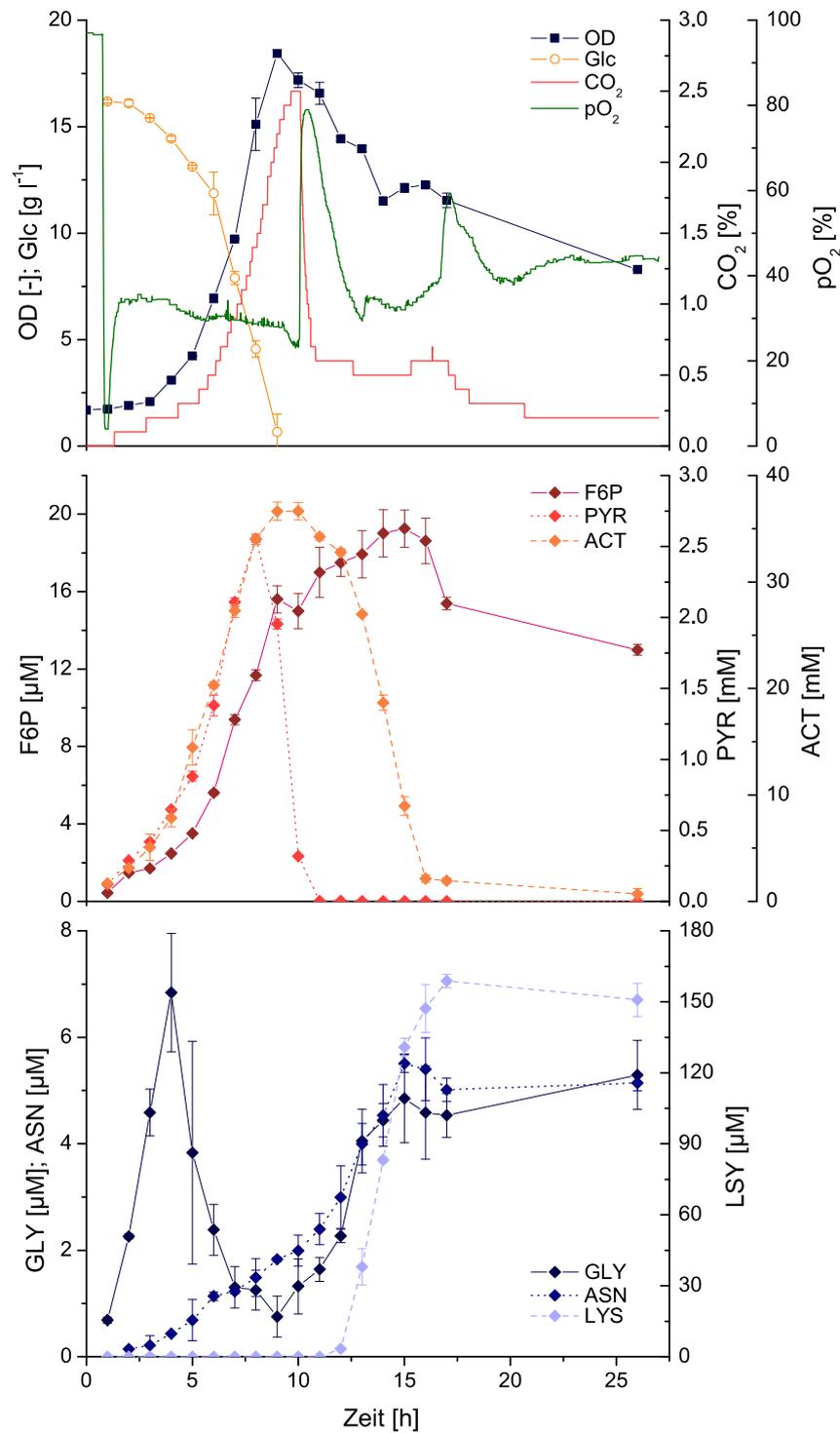


Abbildung 7.2: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *B. licheniformis* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit der optischen Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), dem Sauerstoffpartialdruck (pO₂), dem prozentualen Massenanteil an CO₂ in der Abluft (CO₂) und den extrazellulären Konzentrationen von Fructose-6-Phosphat (F6P), Pyruvat (PYR), Acetat (ACT), Glycin (GLY), Asparagin (ASN) und Lysin (LYS).

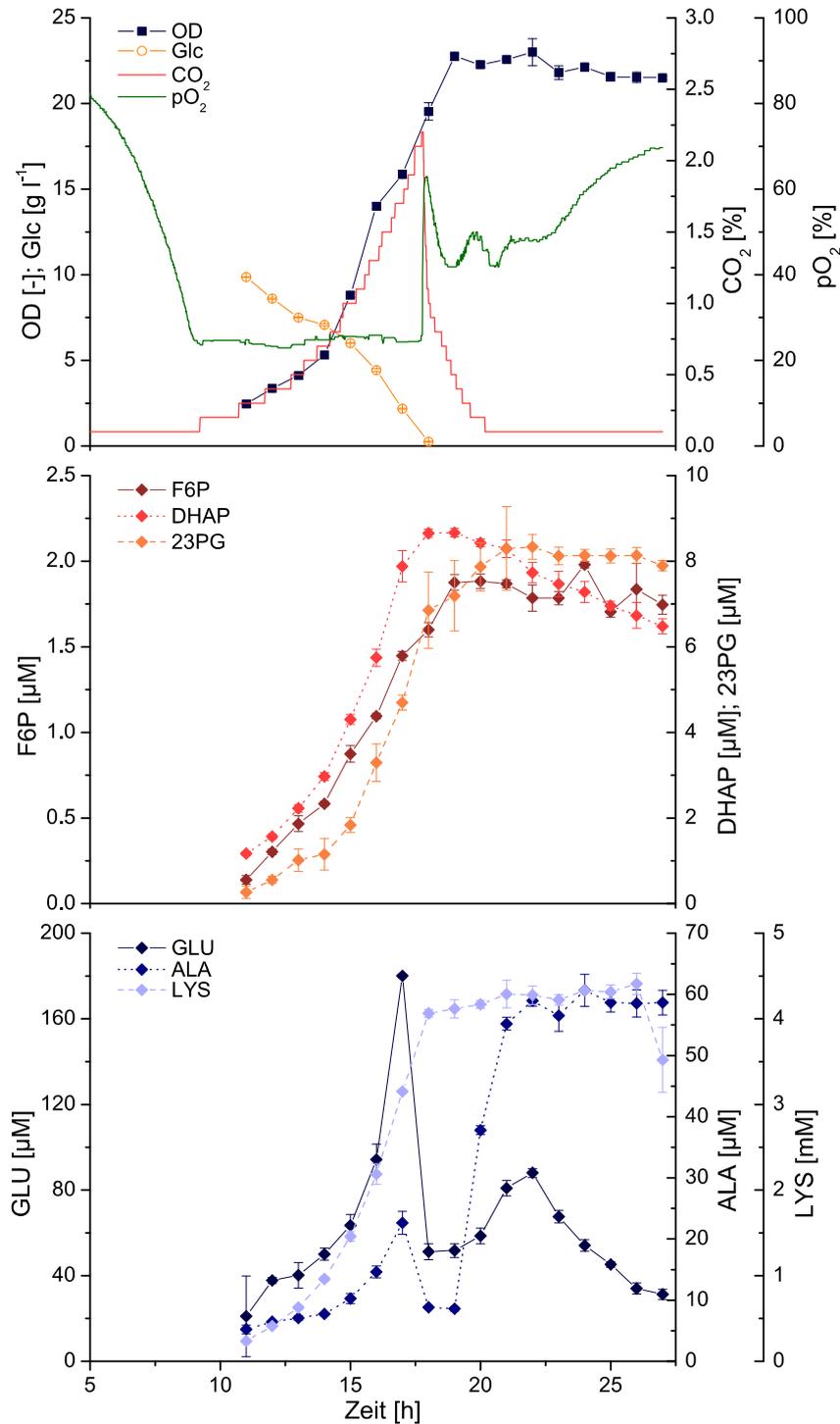


Abbildung 7.3: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *C. glutamicum* DM 1800 Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 10 g l⁻¹ Glucose. Mit der optischen Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), dem Sauerstoffpartialdruck (pO₂), dem prozentualen Massenanteil an CO₂ in der Abluft (CO₂) und den extrazellulären Konzentrationen von Fructose-6-Phosphat (F6P), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), 2/3-Phosphoglycerat (23PG), Glutamat (GLU), Alanin (ALA) und Lysin (LYS).

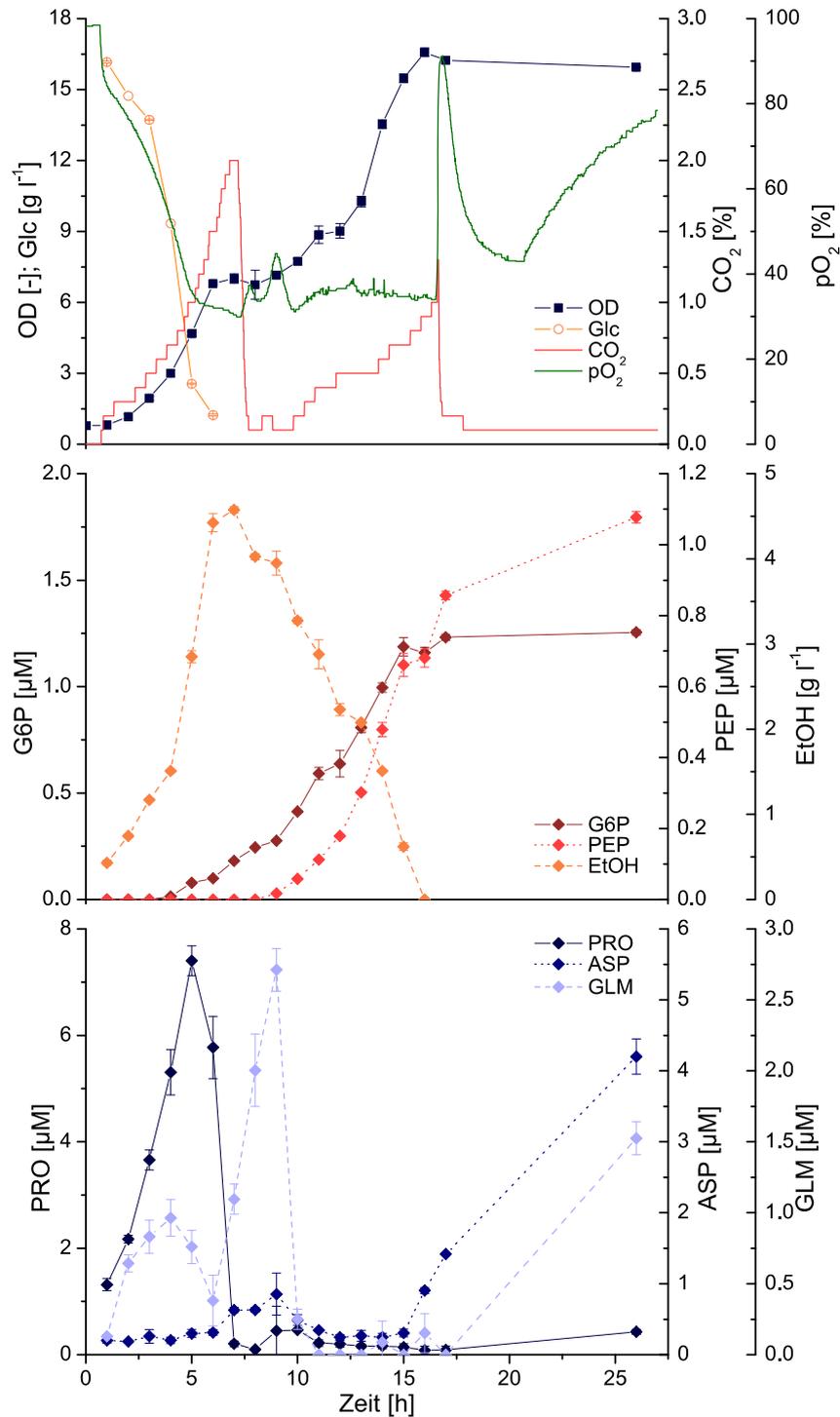


Abbildung 7.4: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *S. cerevisiae* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit der optischen Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), dem Sauerstoffpartialdruck (pO₂), dem prozentualen Massenanteil an CO₂ in der Abluft (CO₂) und den extrazellulären Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat (G6P), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Ethanol (EtOH), Prolin (PRO), Aspartat (ASP) und Glutamin (GLN).

E. coli

Anhand der Prozessdaten ist ein dreiphasiges Wachstum zu erkennen (vgl. Abbildung 7.1). Während der exponentiellen Wachstumsphase wird das Substrat Glucose in Biomasse und in die dominanten Nebenprodukte Pyruvat, Acetat und CO₂ umgesetzt. Das exponentielle Wachstum stoppt noch vor Eintritt einer Glucoselimitierung bei $t = 8.5$ h und die Zellen treten in eine Übergangsphase ein. In dieser Phase werden neben der Glucose auch die zuvor gebildeten Nebenprodukte Pyruvat und Acetat wieder aufgenommen. Bei vollständigem Verbrauch der Glucose beginnt eine sehr kurze stationäre Phase, nach der die optische Dichte langsam zu sinken beginnt und das CO₂-Signal rapide abfällt.

Überraschend ist, dass während der gesamten Kultivierung signifikante Mengen an intrazellulären Metaboliten im Kulturüberstand detektiert werden können. Einige der Metabolite, wie z.B. Glucose-6-Phosphat, scheinen stark mit der Biomasse zu korrelieren, während andere, wie z.B. Tyrosin, einen zeitlich verzögerten Verlauf mit ähnlichem Profil zeigen. Im Gegensatz dazu weisen einige Metabolite, wie z.B. Valin, erst mit Beginn der stationären Phase dynamische Verläufe auf.

B. licheniformis

Auch für *B. licheniformis* kann eine exponentielle Wachstumsphase beobachtet werden, in der Glucose verbraucht wird und neben Biomasse insbesondere die Nebenprodukte Acetat, Pyruvat (vgl. Anhang F1) und CO₂ entstehen. An die exponentielle Wachstumsphase schließt sich eine Übergangsphase an, in der die verbliebene Glucose parallel zum zuvor gebildeten Pyruvat aufgenommen wird. Im Gegensatz zu *E. coli* erfolgt die Aufnahme des Acetats nicht zeitgleich mit der Aufnahme des Pyruvats. Die Acetatkonzentration steigt auch in der Übergangsphase weiter an und erreicht zu Beginn der stationären Phase eine maximale Konzentration von 3.5 mM. Der vollständige Verbrauch der Glucose kennzeichnet auch hier den Eintritt in die stationäre Phase. Das CO₂-Signal sinkt wie bei *E. coli* schlagartig, während der Sauerstoffpartialdruck nur kurz steigt und dann wieder auf einen Wert von 36 % sinkt. In der anschließenden Phase sinkt die Acetatkonzentration stetig. Erst zu dem Zeitpunkt, an dem Acetat im Kulturüberstand nicht mehr zu detektieren ist, beginnt auch das pO₂-Signal kontinuierlich zu steigen.

Wie bei *E. coli* können über den gesamten Kultivierungsverlauf unerwartet hohe Konzentrationen an intrazellulären Metaboliten und Aminosäuren im Überstand der Kultur gefunden werden.

C. glutamicum DM 1800

Auch *C. glutamicum* DM 1800 zeigt in den ersten 30 h der Kultivierung drei unterschiedliche Wachstumsphasen (vgl. Abbildung 7.3). Bis zu $t = 16$ h wächst die Kultur exponentiell und tritt danach in eine Übergangsphase ein. Bei vollständiger Verstoffwechslung der Glucose geht die Kultur in eine stationäre Phase über, die durch eine sinkende optische Dichte gekennzeichnet ist.

Wie bei den oben beschriebenen Kultivierungen können Metabolite, wie z.B. Dihydroxyacetonphosphat, identifiziert werden, deren Verlauf in hohem Maße mit der Biomassekonzentration korreliert. Auch Metabolite, die mit einer zeitlichen Verzögerung zur Biomassebildung ansteigen, wie z.B. 2/3-Phosphoglycerat, sowie Metabolite, die erst zu Beginn der stationären Phase im extrazellulären Raum detektierbar sind, wie z.B. Valin, sind zu beobachten.

S. cerevisiae

Wie zu erwarten, zeigt der Kultivierungsverlauf des Eukaryoten *S. cerevisiae* ein von *E. coli*, *B. licheniformis* und *C. glutamicum* DM 1800 abweichendes Bild.

Während der exponentiellen Wachstumsphase wird Glucose aufgenommen und zu Biomasse und den Nebenprodukten Pyruvat, Acetat und CO₂ umgesetzt (vgl. Anhang F1). Im Gegensatz zu den obigen Kultivierungen ist das Hauptnebenprodukt von *S. cerevisiae* erwartungsgemäß Ethanol, das bei $t = 7$ h eine maximale Konzentration von ca. 4.5 g l^{-1} erreicht. In der auf die exponentielle Wachstumsphase folgenden Übergangsphase wird vergleichbar zu *B. licheniformis* zunächst Pyruvat und im Anschluss Acetat aufgenommen. Nach vollständiger Verstoffwechslung von Acetat beginnt eine zweite Wachstumsphase in der das zuvor gebildete Ethanol als Substrat dient.

Wie bei den untersuchten Prokaryoten konnten bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* nahezu alle der Analytik zugänglichen intrazellulären Metabolite und freien Aminosäuren im extrazellulären Medium detektiert werden.

7.2 Ursachenforschung

Die Beobachtung, dass ein nahezu vollständiges Spektrum an Metaboliten aus Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Zitronensäurezyklus und freien Aminosäuren im Kulturüberstand aller vier untersuchten Organismen gefunden werden konnte, führt konsequenter Weise zu der Frage, was den Austritt dieser energetisch wertvollen Moleküle hervorruft.

Da die vollständige Beantwortung der Frage außerhalb der Möglichkeiten dieser Arbeit liegt, wurde lediglich eine Strategie zur groben Charakterisierung der Beobachtung verfolgt. Dazu wurden drei Ausgangshypothesen formuliert (vgl. Abbildung 7.5). Die Überprüfung dieser Hypothesen erfolgte exemplarisch auf der Basis experimenteller Daten von *E. coli* und *C. glutamicum* DM 1800.

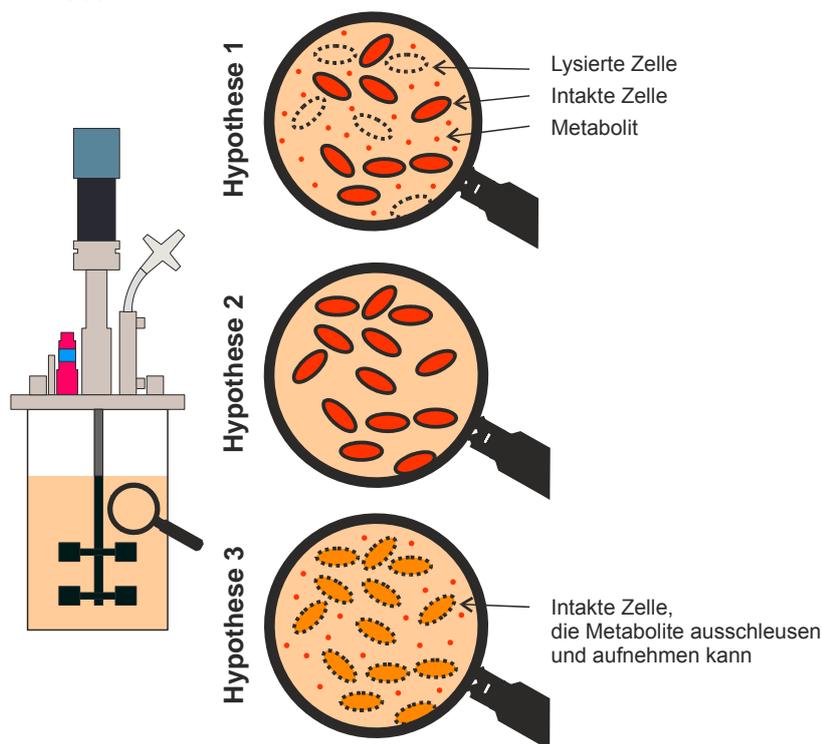


Abbildung 7.5: Hypothesen zur Ursache für das Vorhandensein von Metaboliten im extrazellulären Raum.

Hypothese 1: Im Reaktor liegen sowohl intakte, als auch lysierte Zellen vor, aus welchen die Metabolite im extrazellulären Raum stammen. Hypothese 2: Der extrazelluläre Raum ist frei von Metaboliten und erst die Probenahme selbst bewirkt den Austritt der Metabolite, die in Kulturüberständen detektiert werden können. Hypothese 3: Alle Zellen sind unter bestimmten Bedingungen in der Lage Metabolite auszuschleusen und auch wieder aufzunehmen.

7.2.1 Hypothese 1 – Zellyse

Die wohl am weitesten verbreitete Hypothese geht davon aus, dass die Zellpopulation in einem Kultivierungssystem aus intakten und nicht-intakten Zellen besteht. Die Metabolite im extrazellulären Raum stammen in diesem Fall allein aus lysierten oder stark beschädigten Zellen und sind nicht Teil des aktiven Metaboloms. Bei der Suche nach Hinweisen für oder gegen die Hypothese 1 wurden zwei Ansätze verfolgt.

Rechnerische Überprüfung

Zunächst wurde die Hypothese für den Organismus *E. coli* anhand von Literaturdaten und selbst generierten Daten rechnerisch überprüft. Zwischen der Stoffmenge im Kulturüberstand n_{cs} und der Stoffmenge aus den lysierten Zellen n_{lys} gilt die Masseerhaltung. Die Stoffmenge im Kulturüberstand kann aus dem extrazellulären Volumen V_{extra} und der Konzentration des Kulturmediums berechnet werden. Unter der Annahme, dass alle im Kulturüberstand detektierten Metabolite aus lysierten Zellen stammen, kann so auf das Volumen der lysierten Biomasse geschlossen werden:

$$n_{lys} = n_{cs} = V_{extra} * c_{cs} \quad (10)$$

Die Abschätzung der lysierten Biomasse m_{lys} erfolgte aufgrund von Literaturwerten für die spezifischen intrazellulären Metabolitkonzentrationen pro Gramm Biotrockenmasse c_{intra_spec} (Heijnen 2010).

$$m_{lys} = \frac{V_{extra} * c_{cs}}{c_{intra_spec}} \quad (11)$$

Die Abschätzung erfolgte für ein extrazelluläres Volumen von einem Liter und zum Zeitpunkt der höchsten extrazellulären Metabolitkonzentration (vgl. Tabelle 7.1).

Tabelle 7.1: Extrazelluläre Metabolitkonzentrationen und Abschätzung der theoretisch lysierten Biomasse für eine Batchkultivierung von *E. coli* auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit maximaler Metabolitkonzentration im Kulturüberstand (c_{cs}), spezifischer intrazellulärer Konzentration (c_{intra_spez}) (Heijnen 2010), gemessener Biotrockenmasse zum Zeitpunkt der Probenahme (m_{exp}) und berechneter Menge an Biomasse, die lysieren müsste, um die detektierten Metabolitmengen freizusetzen (m_{lys}).

	c_{cs} [μM]	c_{intra_spez} [mol g ⁻¹]	m_{exp} [g]	m_{lys} [g]
Glucose-6-Phosphat	17.65 ± 0.53	1.42	7.8 ± 0.7	12.4
Fructose-6-Phosphat	29.29 ± 0.60	0.38	7.8 ± 0.5	77.1
Fructose-1,6-Bisphosphat	34.21 ± 0.72	0.82	7.8 ± 0.7	41.7
Glyceraldehyde-3-Phosphat	15.04 ± 0.17	0.17	7.5 ± 0.5	88.5
6-Phospho-glycerat	19.45 ± 1.55	1.65	7.3 ± 0.6	11.8
Phosphoenol-pyruvat	20.43 ± 0.28	1.61	7.3 ± 0.6	12.7
α-Ketoglutarat	2.27 ± 0.35	0.31	7.8 ± 0.7	7.3
Fumarat	12.45 ± 2.31	0.22	7.3 ± 0.6	56.6
Alanin	1.69 ± 0.19	1.34	7.0 ± 0.8	1.3
Aspartat	20.87 ± 0.55	2.57	7.3 ± 0.8	8.1
Glutamat	11.57 ± 0.55	74.69	3.8 ± 0.2	0.2
Glycin	1.23 ± 0.52	1.51	7.5 ± 0.2	0.8
Histidin	6.83 ± 0.20	0.15	5.9 ± 1.1	45.5
Threonin	2.59 ± 0.30	0.47	7.4 ± 0.2	5.5
Methionin	0.55 ± 0.01	0.05	7.3 ± 0.8	11
Isoleucin	20.17 ± 0.21	0.11	7.3 ± 0.8	183.4
Leucin	20.33 ± 0.31	0.36	7.3 ± 0.8	56.5
Phenylalanin	28.00 ± 0.57	0.13	7.3 ± 0.8	215.4
Prolin	0.54 ± 0.13	0.66	7.5 ± 0.2	0.8
Serin	0.87 ± 0.52	0.53	7.5 ± 0.2	1.6
Tryptophan	0.25 ± 0.01	0.02	7.5 ± 0.5	12.5
Tyrosin	29.80 ± 0.90	0.18	7.3 ± 0.6	165.6
Valin	88.50 ± 2.18	0.51	7.3 ± 0.8	173.5

Die Biomassewerte zeigen deutlich, dass die Metabolite im Kulturüberstand unmöglich nur aus lysierten Zellen stammen können. Die Menge an Zellen, die lysieren müsste, übersteigt die maximal detektierte Biomasse im Kultivierungsverlauf um ein Vielfaches. Zudem wäre eine exponentielle Zunahme der Anzahl toter Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase erforderlich, um die detektierten Konzentrationen zu erzeugen.

Die Berechnungen erfolgten allerdings lediglich auf der Grundlage eines Datensatzes für die intrazellulären Konzentrationen. Folglich wurde die Änderung der intrazellulären Konzentrationen im Kultivierungsverlauf nicht berücksichtigt. Es ist aufgrund des deutlichen Ergebnisses aber zu erwarten, dass sich die getroffene Aussage auch bei einer Berechnung aufgrund von zeitabhängigen Konzentrationsdaten nicht ändern würde.

Untersuchung der Vitalität

Eine direkte Messung der Zellvitalität erfolgte für den Organismus *C. glutamicum* DM 1800, da hier bereits ein umfangreiches Methodenspektrum zur Detektion verschiedener Subpopulationen einer Kultivierung, insbesondere zur Detektion von Zellen mit nicht-intakter Membran, zur Verfügung stand.

Dazu wurde die in Abbildung 7.3 gezeigte Batchkultivierung bis zu einem Kultivierungszeitpunkt von 250 h beobachtet. Neben den Standard-Online- beziehungsweise Offline-Messungen wurden auch die Messgrößen aufgenommen, die zu einer Beschreibung der Populationsverteilung erforderlich sind. Hierzu zählen insbesondere die Zellzahl, die Biotrockenmasse und das prozentuale Verhältnis zwischen Zellen mit einer intakten und nicht-intakter Membran (vgl. Abbildung 7.6).

Anhand der Daten ist zu erkennen, dass der prozentuale Anteil an Zellen mit nicht-intakter Membran in den ersten 140 h der Kultivierung unter 1 % liegt. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Zellyse nicht die Ursache der intrazellulären Metabolite im extrazellulären Raum sein kann. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die absolute Zellzahl trotz sinkender optischer Dichte bis zum Zeitpunkt $t = 140$ h weiter steigt. Die Differenz zwischen beiden Signalen ist damit zu erklären, dass die Zellzahl zwar absolut steigt, das Einzelzellvolumen nach $t = 18$ h aber kontinuierlich abnimmt. Nach $t = 140$ h sinkt die absolute Zellzahl rapide ab.

Betrachtet man die Konzentrationsverläufe extrazellulärer Metabolite und Aminosäuren fällt auf, dass zu diesem Zeitpunkt auch die Konzentrationen einiger Metabolite und Aminosäuren, wie z.B. Aspartat und Dihydroxyacetonphosphat, wieder gegen Null laufen. Dies deutet darauf hin, dass auch extrazelluläre Metabolite und Aminosäuren als Substrate genutzt werden können.

Für einige Metabolite, wie z.B. Valin kann entgegen aller bisherigen Ergebnisse eine Korrelation zwischen dem Anteil an nicht-intakten Zellen und der extrazellulären Konzentration beobachtet werden. Dies spricht möglicherweise dafür, dass die Zellyse die Ursache für das Vorhandensein dieser Aminosäure im extrazellulären Raum ist.

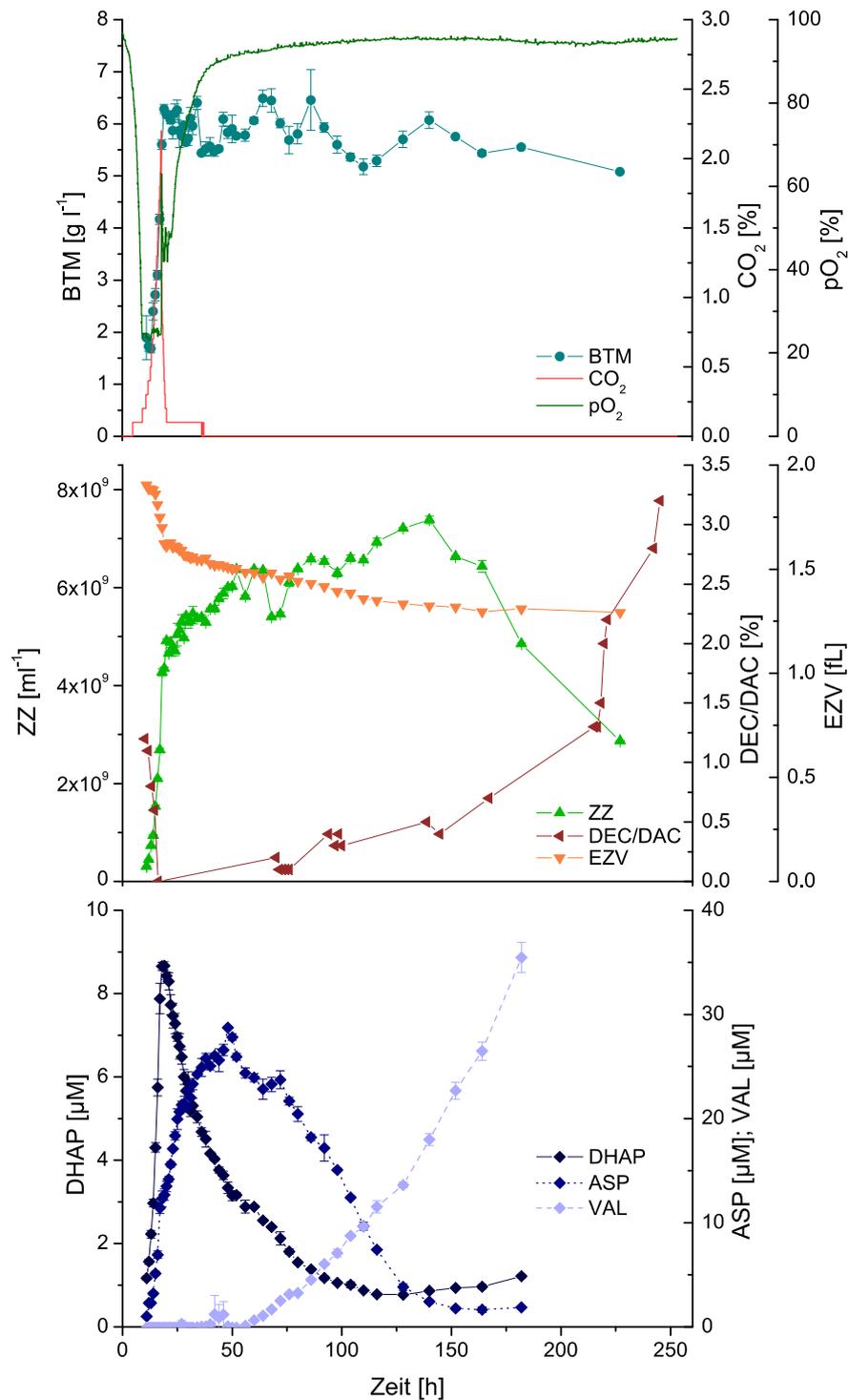


Abbildung 7.6: Vitalitätsanalyse im Verlauf einer *C. glutamicum* DM 1800 Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 10 g l⁻¹ Glucose. Mit der Biotrockenmasse (BTM), dem Sauerstoffpartialdruck (pO₂), dem prozentualen Massenanteil an CO₂ in der Abluft (CO₂), der Zellzahl (ZZ), dem prozentualen Anteil an Zellen mit nicht-intakter Membran (DEC/DAC), dem Einzelzellvolumen (EZV) und den extrazellulären Konzentrationen von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), Aspartat (ASP) und Valin (VAL).

7.2.2 Hypothese 2 – Metabolitverlust bei der Probenahme

Hypothese 2 geht von der Annahme aus, dass der Kulturüberstand während der Kultivierung frei von Metaboliten ist. Die Metabolite treten erst während der Probenahme aufgrund von einer Kombination aus Milieu-Wechsel (pH, Temperatur, pO_2 , Osmolalität, usw.) und physikalischem Energieeintrag (Zentrifugation, Filtration) aus den Zellen aus und sind tatsächlich Teil der intrazellulären Pools von lebenden Zellen.

Durch mehrmaliges Waschen einer biologischen Probe wurde gewährleistet, dass der extrazelluläre Raum frei von Metaboliten ist. Nach unterschiedlichen Probenahmeverfahren (Zentrifugation, Filtration) wurde der zellfreie Überstand erneut auf Metabolite untersucht (vgl. Abbildung 7.8).

Um auszuschließen, dass bereits beim Waschen alle intrazellulären Metabolite aus den Zellen entfernt wurden und sich in den folgenden Ansätzen aus diesem Grund keine Metabolite mehr nachweisen ließen, wurde der experimentelle Ansatz unter gleichzeitiger Betrachtung der intrazellulären Metabolitkonzentration durchgeführt. Die Analyse der Extrakte erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS. Alle Überstände wurden mit Hilfe von LC-ESI-MS/MS und GC-TOF-MS quantifiziert.

Anhand der LC-ESI-MS/MS-Daten (vgl. Abbildung 7.7) ist zu erkennen, dass die Waschschriffe zu einer Verringerung der extrazellulären Metabolitkonzentrationen führen. Es zeigt sich zudem, dass weder die Filtration noch die Zentrifugation zu einer erneuten Anreicherung von Metaboliten im extrazellulären Raum führt. Bei der Betrachtung der intrazellulären Konzentrationen ist zu beobachten, dass diese für keinen Metaboliten deutlich sinkt.

Die Analysen mittels GC-TOF-MS bestätigen sowohl die Effektivität der Waschschriffe, als auch die Beobachtung, dass Zentrifugation und Filtration nicht zu einem Metabolitaustritt führen. Während das Chromatogramm der Analyse des Kulturmediums eine Vielzahl von Peaks zeigt, erscheinen auf den nachfolgenden vier Chromatogrammen vergleichsweise wenige Signale (vgl. Abbildung 7.8). Die zwei in den Chromatogrammen von Wash 1, Wash 2, Filtrat und Zentrifugat dominanten Peakgruppen resultieren aus der Detektion einfach und mehrfach derivatisierter Hexosen. Die Beobachtung ist damit zu erklären, dass die Wasch- und Resuspensionslösung zum Ausgleich osmotischer Effekte eine Glucosekonzentration von 10 g l^{-1} besaß. Die in Abbildung 7.8 nur qualitativ gezeigten Chromatogramme sind zur quantitativen Betrachtung im Anhang F2 hinterlegt.

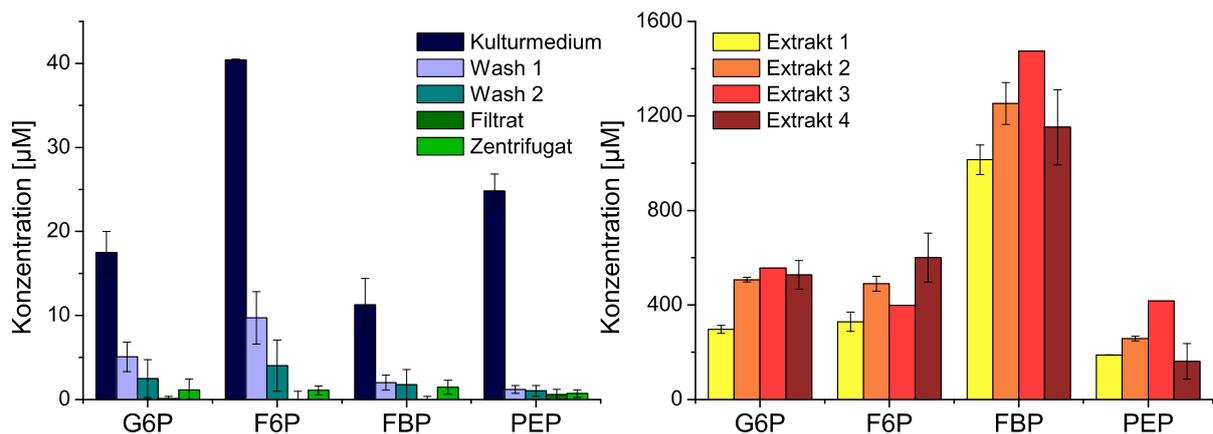


Abbildung 7.7: LC-ESI-MS/MS-Ergebnisse zur Untersuchung des Metabolitverlustes bei der Probenahme. Absolute Konzentrationen der analysierten Überstände und Filtrate (links) und Extraktkonzentrationen von Biomasse, die entsprechend dem Versuchsaufbau vor der Extraktion dreimal (Extrakt 4), zweimal (Extrakt 3) oder einmal (Extrakt 2) gewaschen oder ungewaschen extrahiert wurde (Extrakt 1). Mit den Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat (G6P), Fructose-6-Phosphat (F6P), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) und Phosphoenolpyruvat (PEP).

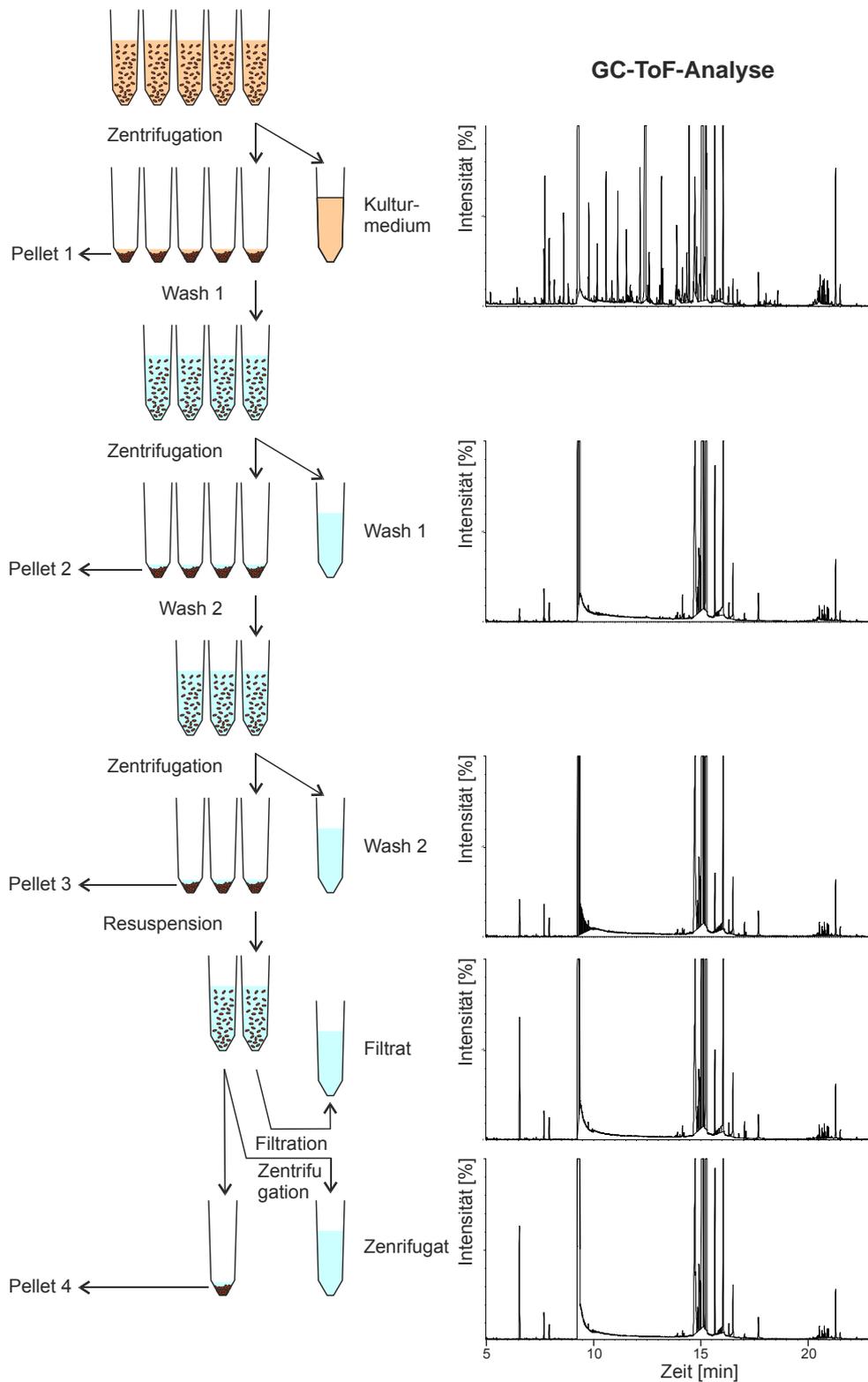


Abbildung 7.8: Schematische Darstellung und GC-ToF-MS-Ergebnisse zur Untersuchung des Metabolitverlustes bei der Probenahme. Versuchsaufbau mit Wasch- und Separationsschritten (links) und GC-ToF-MS-Chromatogramme der analysierten Überstände und Filtrate (rechts). Die in der Abbildung mit Pellet 1 – 4 bezeichnete Biomasse wurde mittels LC-ESI-MS hinsichtlich intrazellulärer Metabolitkonzentrationen untersucht (vgl. Abbildung 7.7).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass der physikalische Energieeintrag bei der Probenahme nicht die Ursache für das Vorhandensein von Metaboliten im extrazellulären Raum ist.

7.2.3 Hypothese 3 – Aktiver oder passiver Transport

Als Letztes wurde die spekulative Hypothese formuliert, dass die Zellmembran keine absolute Barriere für Metabolite und freie Aminosäuren darstellt. Unter bestimmten Umständen kann die Membran durch aktive oder passive Transportmechanismen überwunden werden. Besonders in Bezug auf passive Transportmechanismen ist zu berücksichtigen, dass Reaktorkultivierungen *per se* zu hohen Konzentrationsunterschieden zwischen dem intra- und extrazellulären Raum führen und vereinfachte Diffusion, z.B. durch mechanosensitive Kanäle, damit begünstigt ist.

Da die bisher beobachteten extrazellulären Konzentrationsverläufe nicht willkürlich erscheinen, liegt es nahe, dass der vermutete passive oder aktive Transport nur unter bestimmten Bedingungen erfolgt. Im Folgenden wurde daher versucht, die Ausschleusung von Metaboliten durch gezielte Prozessführung zu provozieren.

Einfluss des osmotischen Drucks

Unter der Annahme, dass die Osmolalität eines Mediums im Verlauf einer Kultivierung sinkt, könnte das Austreten intrazelluläre Metabolite dazu dienen, die extrazelluläre Wasseraktivität zu senken, und so das Einströmen von Wasser zu verhindern.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Änderung der Osmolalität im Verlauf einer Batchkultivierung untersucht. Um eine möglichst große Veränderung der Osmolalität beobachten zu können, wurden die Kultivierungen nicht wie im Standardprotokoll mit 16 g l^{-1} sondern mit 40 g l^{-1} Glucose durchgeführt.

In einem Folgeexperiment wurde die detektierte osmotische Änderung durch einen Feed des Osmoprotektivums Betain ausgeglichen und die extrazellulären Konzentrationsverläufe von Zentralstoffwechselmetaboliten mit einer Referenzkultur verglichen, die mit einem analogen betainfreien Feed durchgeführt wurde. In zwei weiteren Kultivierungen wurde die Osmolalität des Mediums durch einen höher-konzentrierten Feed nicht nur ausgeglichen, sondern über das Ausgangsniveau hinaus angehoben (vgl. Abbildung 7.9).

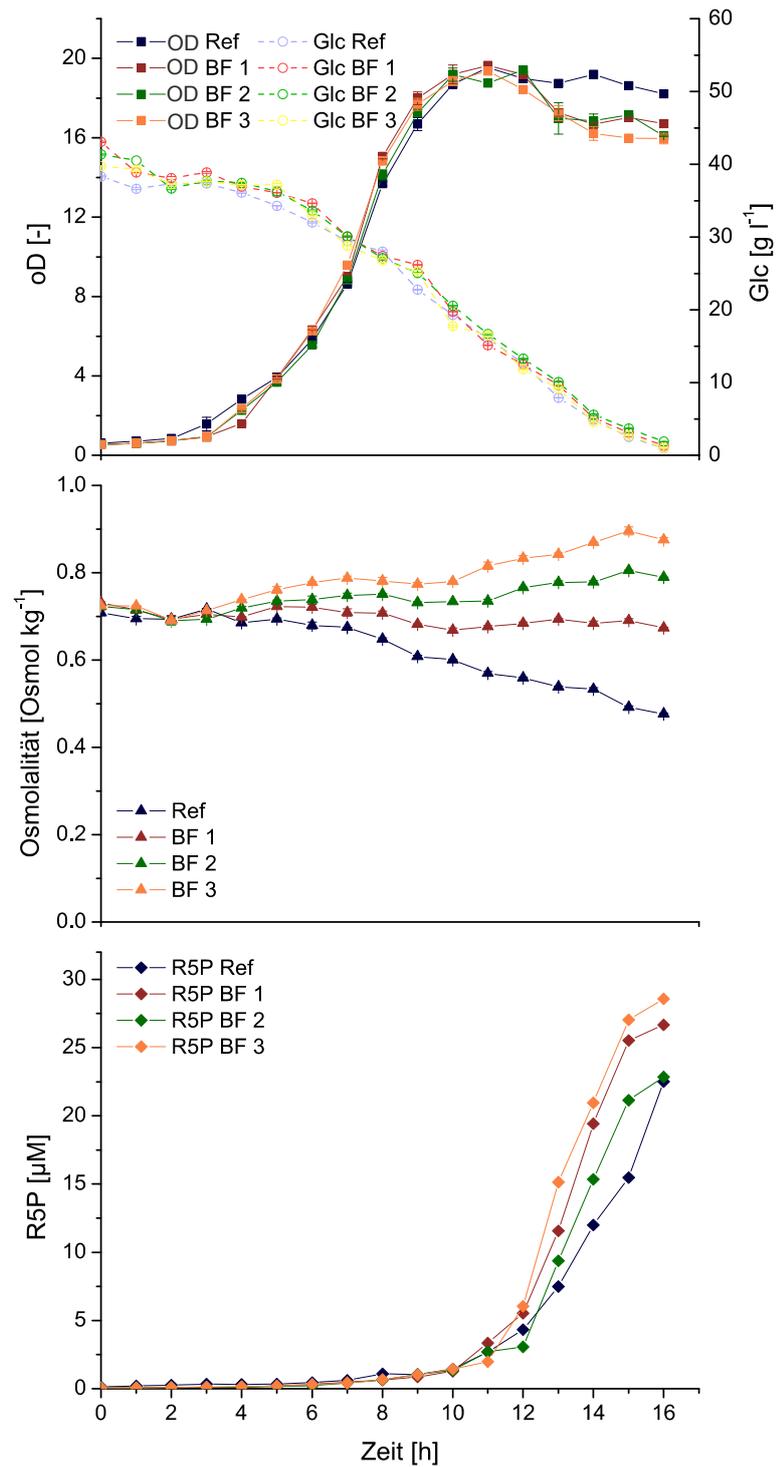


Abbildung 7.9: Exometabolomanalyse im Verlauf von vier parallelen Batchkultivierungen von *E. coli* auf Minimal-medium mit 40 g l⁻¹ Glucose. In drei Kultivierungen wurde Betain mit einer Feed-Konzentration von 1.2 g l⁻¹ (BF 1), 2.4 g l⁻¹ (BF 2) oder 3.6 g l⁻¹ sowie einer Feed-Rate von 3 ml h⁻¹ supplementiert. Der Referenzkultivierung (Ref) wurde mit der gleichen Rate Wasser zugegeben. Mit der optischer Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), der Osmolalität und der extrazellulären Konzentration von Ribose-5-Phosphat (R5P).

Anhand der Abbildungen ist zu erkennen, dass der Betain-Feed dazu führt, dass die Osmolalität wie angestrebt konstant gehalten wird bzw. steigt. Eine Beeinflussung des Wachstums kann hingegen nicht beobachtet werden.

Betrachtet man die extrazellulären Konzentrationsverläufe der Zentralstoffwechselmetabolite, sind nur wenige Veränderungen der Reaktoren mit konstanter oder gesteigerter Osmolalität gegenüber dem Referenzreaktor zu beobachten. Unter Einbeziehung des Messfehlers sind die detektierten Konzentrationen für alle Kultivierungen annähernd gleich. Eine vollständige Abbildung der extrazellulären Daten findet sich in Anhang F3.

Eine Ausnahme stellt hier Acetat dar. Es konnte im Überstand der Kultivierung mit der höchsten Osmolalität in einer um den Faktor 3 erhöhten Konzentration gegenüber der Referenzkultivierung nachgewiesen werden. Da aber die übrigen Reaktoren im Rahmen des Fehlers konstante Konzentrationen zeigten, muss angenommen werden, dass es sich bei den Werten um Ausreißer aufgrund von manuellen oder analytischen Fehlern handelt.

Vergleicht man die extrazellulären Konzentrationen mit den Werten, die bei Batchkultivierungen mit einer Glucosekonzentration von 16 g l^{-1} detektiert wurden (vgl. Abbildung 7.1), ist zu erkennen, dass der Großteil der extrazellulären Metabolite erst in der stationären Phase auftreten.

Anhand der Daten kann ausgeschlossen werden, dass eine gesteigerte Osmolalität des Mediums zu einer geringeren extrazellulären Metabolitkonzentration führt. Wäre das Ausschleusen von Metaboliten und freien Aminosäuren direkt auf die Änderung der Osmolalität zurückzuführen, hätte die Erhöhung der Osmolalität dazu geführt, dass die Zellen, alle osmotisch aktiven Stoffe im Zytoplasma zurückhalten. In diesem Fall hätten mit zunehmender Osmolalität sinkende extrazelluläre Konzentrationen detektiert werden müssen. Zudem scheint das Ausschleusen nicht zeitgleich mit dem Sinken der Osmolalität zu erfolgen, sondern an eine Wachstumsphase gekoppelt zu sein.

Darüber hinaus ist zu beobachten, dass insbesondere dann hohe extrazelluläre Konzentrationen detektiert werden, wenn die Kultur trotz hoher Substratkonzentration keine Biomasse mehr bildet.

Einfluss des Zellalters

Als weitere mögliche Ursache die zum aktiven oder passiven Transport von Metaboliten aus der Zelle führen könnte, wurde die Kultivierungsdauer untersucht. Dies würde darauf hindeuten, dass die Zellintegrität im Laufe einer Kultivierung sinkt, ohne dass die Viabilität der Zellen davon beeinflusst wird oder dass die Zellmembranen auch unter vitalen Bedingungen keine absolute Barriere für Metabolite darstellen und die Zellen daher kontinuierlich Metabolite verlieren.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in Parallelansätzen drei Kulturen dahingehend beeinflusst, dass das Wachstum bei gleichzeitiger Inokulation verzögert einsetzte (vgl. Abbildung 7.10). Der verzögerte Wachstumsbeginn wurde durch die Einstellung der Ausgangs-osmolalität des Mediums mittels Betain erreicht, nachdem gezeigt wurde, dass das Vorhandensein von Betain die Ausschleusung von Metaboliten selbst nicht beeinflusst (vgl. Abbildung 7.9).

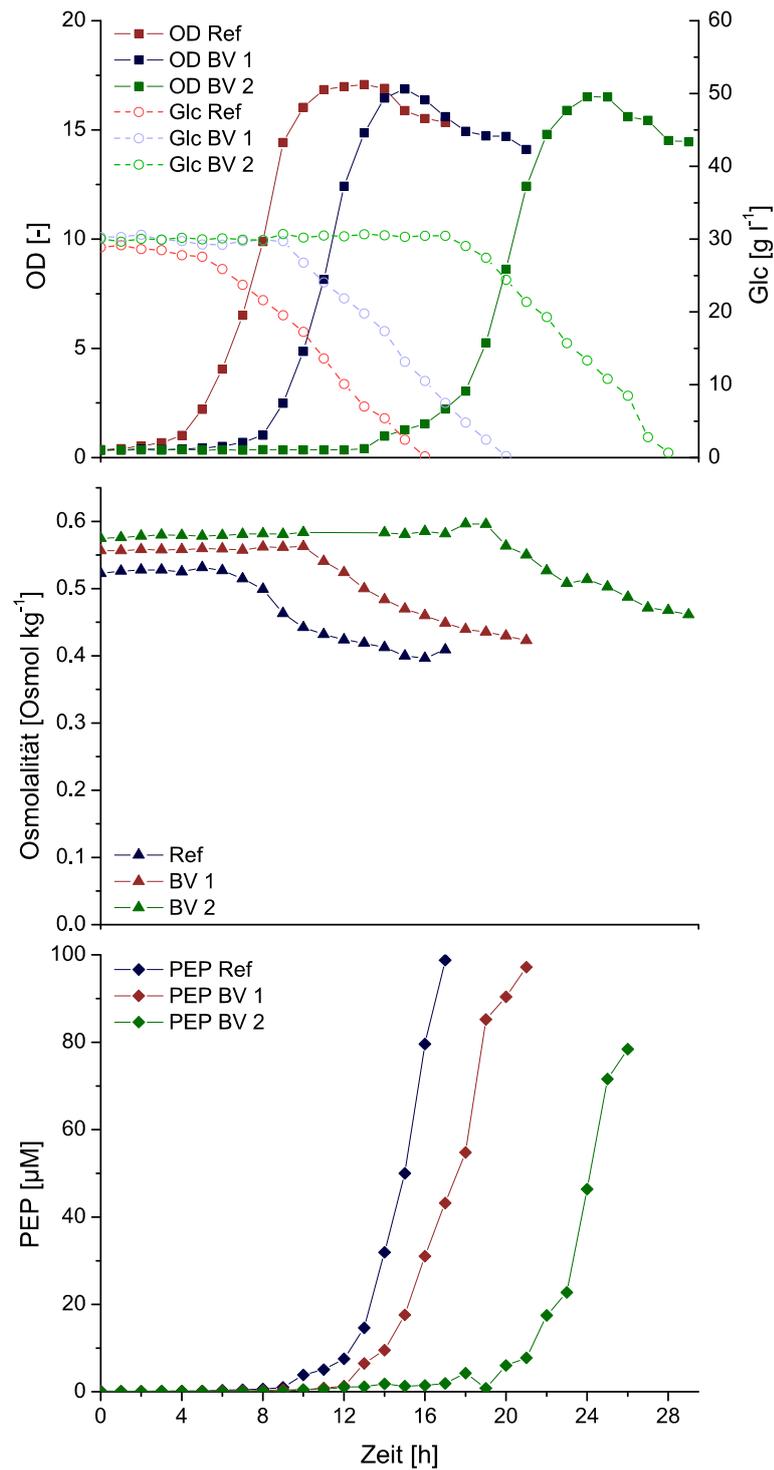


Abbildung 7.10: Exometabolomanalyse im Verlauf von drei parallelen Batchkultivierungen von *E. coli* auf Minimalmedium mit 40 g l⁻¹ Glucose. Durch Betainzugabe wurde die Osmolalität der Medien zweier Kulturen gegenüber der Referenzkultur (Ref) um 0.25 Osmol kg⁻¹ (BV 1) bzw. 0.5 Osmol kg⁻¹ erhöht. Mit der optischen Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), der Osmolalität und der extrazellulären Konzentration von Phosphoenolpyruvat (PEP).

Es ist zu erkennen, dass die Erhöhung der Osmolalität zu einem verzögerten Wachstumsbeginn bei ansonsten identischem Wachstumsverhalten führt. Betrachtet man die extrazellulären Konzentrationen an Phosphoenolpyruvat im Verlauf der drei Parallelkultivierungen ist zu beobachten, dass die Metabolitkonzentrationen analog zum Wachstumsbeginn ebenfalls verzögerte aber parallele Verläufe zeigen. Die Konzentrationsverläufe aller gemessenen Metabolite im Verlauf der drei Kultivierungen sind im Anhang F3 angegeben.

Es kann für keinen Metaboliten beobachtet werden, dass er zu einem für alle Kultivierungen gleichen Zeitpunkt ausgeschleust wird. Die Ergebnisse belegen damit eindeutig, dass der Austritt der Metabolite aus den Zellen nicht vom Alter der Zellen beziehungsweise der Kultivierungsdauer abhängt, sondern an bestimmte Wachstumsphasen gekoppelt ist.

Einfluss der Biomassebildung

Ein weiterer möglicher Auslöser für das aktive oder passive Ausschleusen von Metaboliten könnte die Kultivierung unter Bedingungen sein, in denen den Zellen mehr Energiequellen zur Verfügung stehen, als sie benötigen (Substratüberschuss).

Um diese Vermutung zu unterstützen wurden Parallelkultivierungen bei unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen und identischer Glucosekonzentration durchgeführt. Durch die Stickstofflimitierung sollten die Zellen in einen Zustand versetzt werden, indem die aufgenommene Glucose nicht zur Biomassebildung genutzt werden kann (vgl. Abbildung 7.11). Eine vollständige Darstellung aller im Verlauf der Kultivierungen detektierten extrazellulären Metabolite befindet sich in Anhang F3.

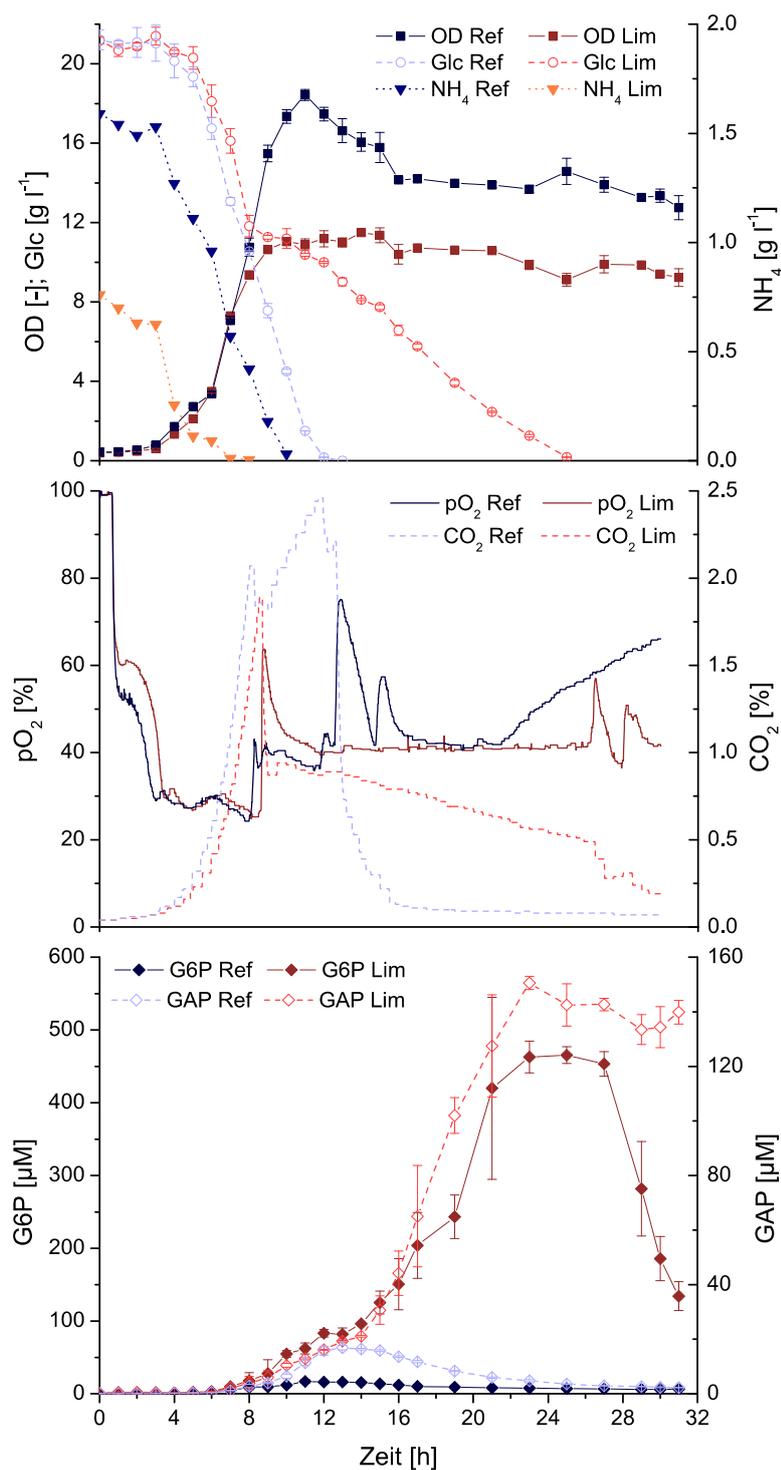


Abbildung 7.11: Exometabolomanalyse im Verlauf von zwei parallelen Batchkultivierungen von *E. coli* auf Minimalmedium mit 40 g l⁻¹ Glucose. In einer der Kultivierungen wurde die Biomassebildung gegenüber der Referenzkultur (Ref) durch Reduktion der Ammoniumsulfatkonzentration auf 2.5 g l⁻¹ limitiert (Lim). Mit der optischen Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), der Ammoniumkonzentration (NH₄), dem Sauerstoffpartialdruck (pO₂), dem prozentualen Massenanteil an CO₂ in der Abluft (CO₂) und der extrazellulären Konzentration an Glucose-6-Phosphat (G6P) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP).

Zunächst ist zu beobachten, dass beide Kulturen bis zum Eintritt der Stickstofflimitierung nach 7 h nahezu parallel wachsen und eine nahezu identische Biomasse bilden. Für die nicht-limitierte Referenzkultur schließt sich an die exponentielle Wachstumsphase eine zweite Wachstumsphase an, in der die optische Dichte der Kultur von 10.7 auf 18.4 steigt. Bei der limitierten Kultivierung kann hingegen eine stationäre Phase beobachtet werden, in welcher der Glucoseverbrauch und der Sauerstoffpartialdruck konstant bleiben, aber keine Biomasse mehr gebildet wird. In beiden Kultivierungen endet die zweite Wachstumsphase beim Eintreten einer Glucoselimitierung (nach 12 h bzw. 25 h).

Betrachtet man die extrazellulären Metabolitverläufe fallen insbesondere zwei Tatsachen auf:

1. Einige Metabolite, wie z.B. Citrat und α -Ketoglutarat (vgl. Anhang F3), treten extrazellulär nur in der Stickstoff-limitierten Kultivierung auf.
2. Andere Metabolite, wie z.B. Glucose-6-Phosphat, zeigen wie in vorangegangenen Untersuchungen zunächst eine Wachstumskopplung und in der Stickstofflimitierten Kultur im späteren Kultivierungsverlauf eine wachstumsentkoppelte Ausschleusung.

Beides könnten Hinweise darauf sein, dass der untersuchte *E. coli*-Stamm unter den gegebenen Bedingungen nicht die vollständige Menge an Glucose verstoffwechseln kann, die aufgenommen wird. Stattdessen scheint es in einigen intrazellulären Pools zu Akkumulationen zu kommen, welche die Funktionalität des Stoffwechsels negativ beeinflussen. Es ist daher denkbar, dass zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Reaktionsgleichgewichte Metabolite aus der Zelle austreten oder aktiv ausgeschleust werden (vgl. Abbildung 7.12).

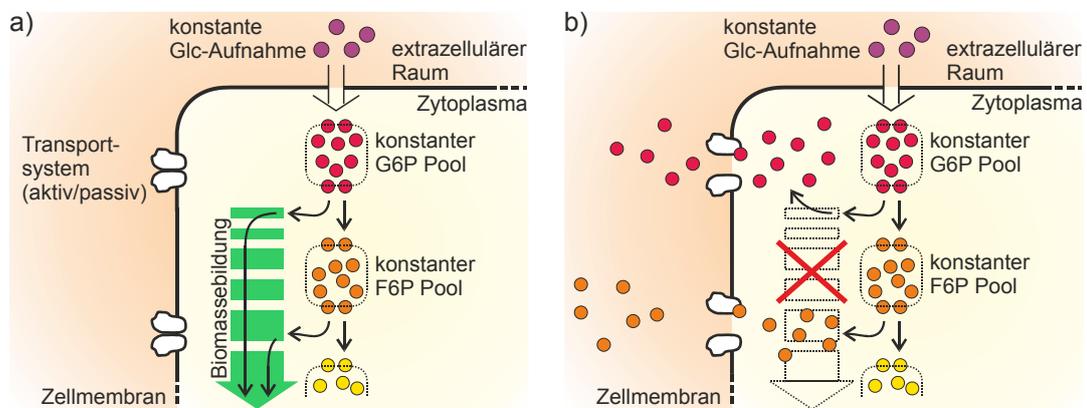


Abbildung 7.12: Schematische Darstellung der Ausschleusung intrazellulärer Metabolite bei Limitation der Biomassebildung. a) Angenommene Situation der Zelle unter optimalen Wachstumsbedingungen. Eine konstante Menge an Glucose (Glc) wird aufgenommen und fließt sowohl in die Biomassebildung als auch in den Erhaltungsstoffwechsel. b) Angenommene Situation unter wachstumslimitierten Bedingungen. Die Stoffmenge, die nicht zur Biomassebildung genutzt werden kann akkumuliert intrazellulär und induziert dadurch aktive oder passive Transportsysteme.

7.2.4 Import extrazellulärer Metabolite

Für einige Metabolite wurde nicht nur ein Anstieg der extrazellulären Konzentration im Kultivierungsverlauf beobachtet, sondern auch ein erneutes Absinken. Dies könnte einerseits durch einen Zerfall dieser Metabolite im Medium bedingt sein oder andererseits auf eine biologisch bedingte Wiederaufnahme hindeuten. Letzteres würde die Hypothese stützen, dass ein aktiver Austausch zwischen extra- und intrazellulären Metabolitpools stattfindet. Für den Metaboliten Glucose-6-Phosphat wurde daher beispielhaft die Ursache der sinkenden extrazellulären Konzentrationen genauer untersucht.

Metabolitstabilität

Zunächst wurde die Stabilität von Glucose-6-Phosphat bei 37°C in Kulturüberstand überprüft. Dazu wurde ein Standard mit einer Konzentration von 5 µM im Verhältnis von 1:4 in zellfreiem Überstand einer abgeschlossenen Batchkultivierung verdünnt, bei 37°C inkubiert und über 24 h stündlich beprobt (vgl. Abbildung 7.13).

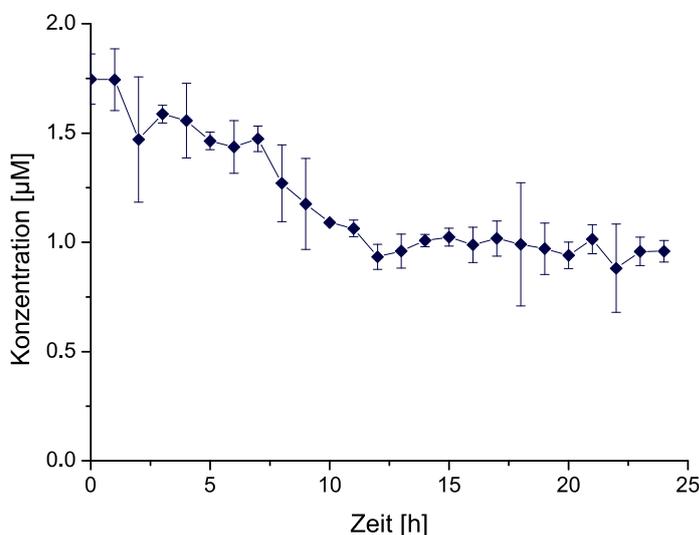


Abbildung 7.13: Stabilität von Glucose-6-Phosphat. Konzentrationsverlauf in sterilfiltriertem Kulturüberstand, der bei $t = 0$ h mit einer Konzentration von 1.25 µM gespikt und danach für 24 h bei 37°C inkubiert wurde.

Es ist zu erkennen, dass die detektierten Konzentrationen bis $t = 12$ h linear sinken und in den anschließenden 12 h nahezu konstant bleibt. Die Abnahme könnte zum einen mit thermischem Zerfall begründet werden, wobei unklar ist, warum die Abnahme nicht bis zum völligen Zerfall fortschreitet.

Eine alternative Erklärung stellt das mögliche Vorhandensein von aktiven Enzymen in dem sterilfiltrierten Überstand dar. Unter der Annahme, dass im Überstand Enzyme vorliegen, die Glucose-6-Phosphat umsetzen, könnte der anschließende stationäre Verlauf auf eine Inaktivierung dieser Enzyme hindeuten.

Betrachtet man die Konzentrationsabnahme als Kinetik nullter Ordnung, ergibt sich aus den ersten 12 h der Untersuchung eine Abnahme von $0.064 \mu\text{M h}^{-1}$. Im direkten Vergleich mit den Abnahmekinetiken, die bei einer Batchkultivierung zu beobachten sind, kann diese unmöglich durch den Zerfall begründet werden, da hier Raten von bis zu $60 \mu\text{M h}^{-1}$ (vgl. Abbildung 7.11) erreicht werden. Die Zerfallskurven von weiteren Metaboliten der Glykolyse wurden ebenfalls aufgenommen und sind im Anhang F4 angegeben.

Metabolitaufnahme

Um nicht nur den Zerfall als Ursache auszuschließen, sondern die Aufnahme unmittelbar nachzuweisen, wurde ein reverses Markierungsexperiment durchgeführt. Zwei Batch-Kultivierungen von *E. coli* wurden dazu parallel mit einer Kohlenstoffmenge von 44 mM durchgeführt, wobei als Substrat entweder Glucose oder eine identische Stoffmenge an Glucose und Glucose-6-Phosphat eingesetzt wurde (vgl. Abbildung 7.14). Um die Verwendung beider Substrate anhand der CO_2 -Bildung nachverfolgen zu können, wurde isotonen-markierte Glucose eingesetzt. Als Negativkontrolle erfolgte zudem eine Kultivierung mit 22 mM Glucose.

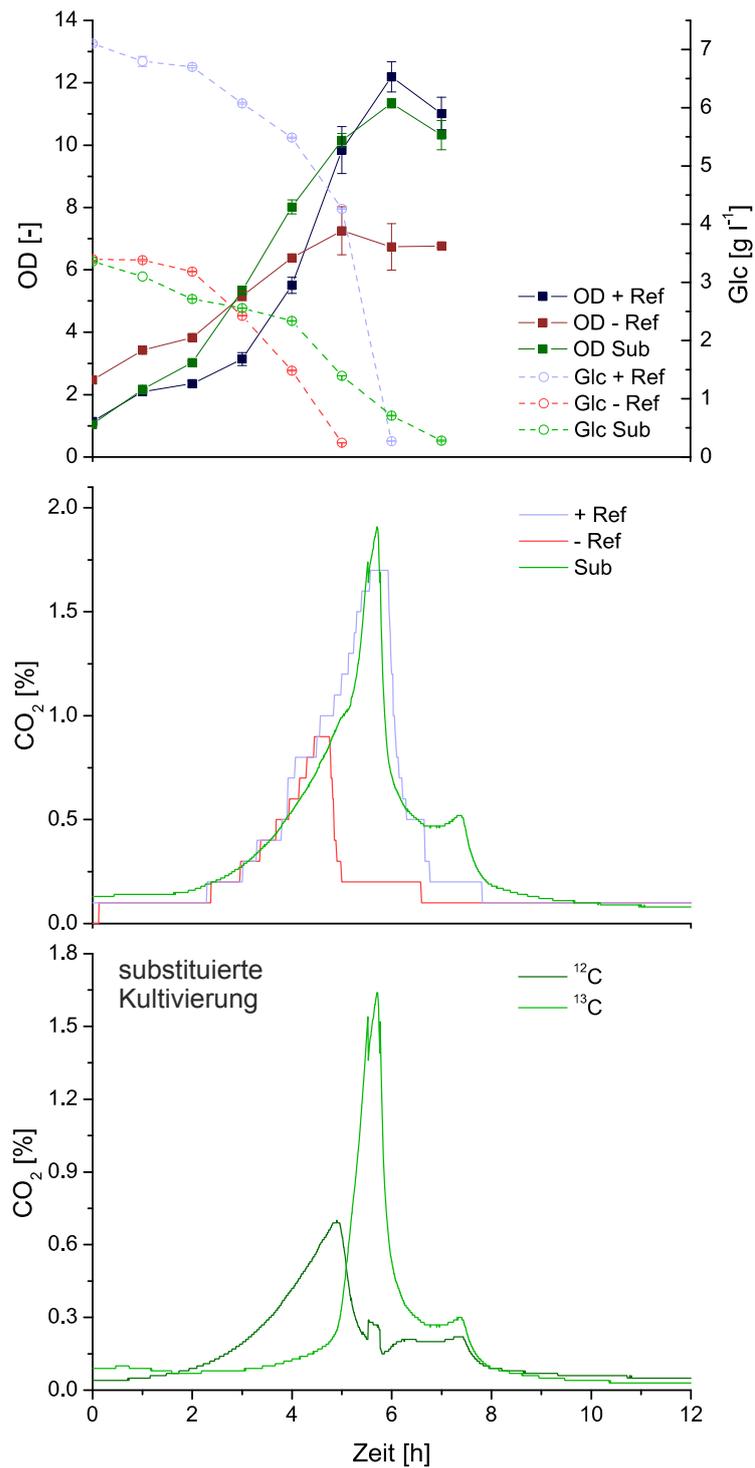


Abbildung 7.14: Aufnahme von extrazellulärem Glucose-6-Phosphat als alternatives Substrat für die Kultivierung von *E. coli* in drei parallele Batchkultivierung auf Minimalmedium. Als Kohlenstoffquelle wurden in den Referenzkulturen 44 mM (+Ref) bzw. 22 mM (-Ref) Glucose eingesetzt. Das Medium der substituierten Kultur (Sub) enthielt 22 mM Glucose und 22 mM Glucose-6-P. Mit der optischen Dichte (OD), der Glucosekonzentration (Glc), dem prozentualen Massenanteil an CO₂ in der Abluft (CO₂) und der differenzierte Auftragung des CO₂-Signals der substituierten Kultur in ¹²C-CO₂ und ¹³C-CO₂.

Die Abbildung zeigt, dass die substituierte Kultur eine Biomassekonzentration erreicht, die mit der Kultivierung auf 44 mM Glucose vergleichbar ist und deutlich über der der Kultivierung mit 22 mM Glucose liegt. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen auch in der Lage sind Glucose-6-Phosphat als Substrat zu verwenden. Aufgrund der Biomasse allein ließe sich allerdings nicht feststellen, ob der Metabolit extrazellulär dephosphoryliert und als Glucose aufgenommen wird.

Das differenzierte CO₂-Signal im unteren Abbildungsteil zeigt aber, dass ¹²C- und ¹³C-Substrat in einer zeitlichen Abfolge und nicht parallel verstoffwechselt wurden. Dies deutet darauf hin, dass eine separate Aufnahme stattgefunden hat.

7.3 Fazit Quenching

Im vorangegangenen Kapitel wurde untersucht, ob sich ein sequenzielles oder simultanes Quenchingverfahren für die Etablierung eines allgemeinen Standardprotokolls zur Generierung von Metabolomdaten eignet. Dazu wurde ein umfangreicher Satz an extrazellulären Metabolomdaten erzeugt. Für die vier untersuchten Organismen *E. coli*, *B. licheniformis*, *C. glutamicum* DM 1800 und *S. cerevisiae* wurde dabei ein nahezu vollständiges Spektrum an extrazellulären Metaboliten und freien Amino-säuren im Kultivierungsverlauf gefunden. Für die Organismen *E. coli* und *C. glutamicum* DM 1800 wurde exemplarisch versucht, die Ursache des beobachteten Exometaboloms einzugrenzen.

Anhand der erzeugten Daten ist es nicht möglich, die Ursache für das Vorhandensein intrazellulärer Metabolite und freier Aminosäuren im extrazellulären Raum zweifelsfrei zu ermitteln. Es ist aber möglich, einige Hypothesen auszuschließen und für andere Indikatoren anzugeben, die eine Eingrenzung z.B. hinsichtlich des Kultivierungszeitpunktes ermöglichen.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann nahezu ausgeschlossen werden, dass es sich bei den detektierten Metaboliten und Aminosäuren um intrazelluläre Pools handelt, die erst aufgrund der Probenahme aus den Zellen austreten. Es kann zudem ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Austritt um eine Reaktion auf osmotische Veränderungen oder auf ein Phänomen des Kulturalters handelt.

Die Zellyse kann als Ursache zwar nicht ausgeschlossen werden, liefert aber nur für einen Bruchteil der detektierten Konzentrationen eine potentielle Erklärung. Insbesondere für die stark wachstumskorrelierten Konzentrationen und die hohen Konzentrationen unter wachstumslimitierten Bedingungen ist die Zellyse als Ursache ausgeschlossen.

Die Beobachtungen deuten stattdessen darauf hin, dass der Austritt vermehrt in Phasen hoher metabolischer Aktivität stattfindet. Insbesondere konnten hohe extrazelluläre Konzentrationen in Phasen von starkem Wachstum oder unter wachstumslimitierten Bedingungen bei einem Überschussangebot einer Kohlenstoffquelle beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass der untersuchte *E. coli*-Stamm unter den gegebenen Bedingungen mehr Glucose aufnimmt, als für den Erhaltungsstoffwechsel benötigt wird. Das aufgenommene Substrat scheint in einigen intrazellulären Pools Akkumulationen zu verursachen, welche die Funktionalität des Stoffwechsels negativ beeinflussen. Es ist denkbar, dass zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Reaktionsgleichgewichte kontinuierlich Metabolite aus der Zelle austreten. Da in diesem Fall hohe Konzentrationsgradienten bestehen, ist die Annahme begründet, dass vereinfachte Diffusion durch selektive Membrankanäle die Triebkraft des Transportes ist. Auch ein aktiver Transport kann aufgrund der erzeugten Daten nicht ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass für alle untersuchten Organismen extrazellulär ein nahezu vollständiges metabolisches Spektrum detektiert werden konnte, zeigt gleichzeitig, dass eine Analyse intrazellulärer Metabolite ohne gewissenhafte Berücksichtigung des Exometaboloms nicht sinnvoll ist. Durch die Einschränkung der Ursachen für das Vorhandensein von extrazellulären Metaboliten ist es jetzt möglich, eine korrekte Vorschrift für die Bilanzierung intrazellulärer Metabolite zu erstellen.

Aufgrund der Daten kann geschlussfolgert werden, dass es unter Einhaltung bestimmter Kriterien sowohl mittels sequenziellem, als auch mittels simultanem Quenching möglich ist, korrekte intrazelluläre Metabolomdaten zu erzeugen. Der limitierende Faktor bei der Wahl der Methode stellt dabei die extrazelluläre Konzentration des Metaboliten im Fokus einer Untersuchung dar.

Soll ein kombiniertes Quenching- und Extraktionsverfahren angewendet werden, muss zuvor sichergestellt werden, dass intrazelluläre Metabolite zweifelsfrei von extrazellulären unterschieden werden können. Dies ist nur möglich, wenn die durch die Extraktion freigesetzte Stoffmenge signifikant größer ist, als die Stoffmenge, die bereits im Medium vorlag. Kann gewährleistet werden, dass die intrazelluläre Konzentration die extrazelluläre übersteigt und auch nach hoher Verdünnung noch im Messbereich der Analytik liegt, besitzt die Differentialmethode aufgrund ihres technisch geringeren Aufwandes einen Vorteil.

Sind die extrazellulären Konzentrationen unbekannt, ist die Differentialmethode nicht geeignet. In diesen Fällen und ebenso dann, wenn vergleichende Analysen angestrebt sind, ist es mit Hilfe dieser Methode nicht möglich, explizit zwischen intra- und extrazellulären Metaboliten zu unterscheiden. Da die allgemeine Anwendbarkeit für eine Standardmethode unverzichtbar ist, kann ein kombiniertes Quenching- und Extraktionsverfahren als solche nicht eingesetzt werden.

Für alle weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde das Quenching mit 60 % - igem -60°C kaltem Methanol durchgeführt. Aufgrund aktueller Forschungsergebnisse ist es nicht möglich, die Ursachen des Leakage zu nennen oder den Effekt zu umgehen. Daher scheint es für ein allgemeines Protokoll zur Generierung von Metabolomdaten sinnvoll, eine einfache und technisch robuste Quenchingmethode zu verwenden, um das auftretende Leakage sicher zu quantifizieren. Das kalte methanolische Quenching ist die zu diesem Zeitpunkt einzige Methode, welche diese Kriterien erfüllt.

8. Zellseparation

Wie in Abschnitt 3.1.4 ausführlich beschrieben, sind die Kriterien, die eine Separations-Methode zur Generierung von Metabolomdaten erfüllen muss, die Vollständigkeit der Trennung von Biomasse und extrazellulärer Flüssigkeit und die benötigte Separationszeit.

Das extrazelluläre Restvolumen stellt eine potentielle Fehlerquelle bei der Metabolomanalyse dar. Um die Relevanz des Fehlers einzuordnen und den Fehler mathematisch korrigieren zu können, ist es notwendig das Volumen absolut zu quantifizieren. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels wurde die Quantifizierung für die Zentrifugation als etabliertes Standardverfahren durchgeführt.

In Abschnitt 8.2 wurden mit der Silikonölzentrifugation und der Vakuumfiltration alternative Verfahren zur Zellabtrennung untersucht, die es ermöglichen das extrazelluläre Restvolumen zu reduzieren.

8.1 Extrazelluläre Restvolumina

Die Gesamtmasse eines Ansatzes nach der Zellseparation m_{tot} entspricht der Summe der Ausgangsmasse des Reaktionsgefäßes m_{tara} , der Masse der enthaltenen Zellen m_{cells} und der Masse der extrazellulären Restflüssigkeit m_{exf} (vgl. Abbildung 8.1). Bei bekannter Ausgangsmasse des Reaktionsgefäßes ist es folglich möglich, das Volumen der extrazellulären Restflüssigkeit zu bestimmen, wenn es gelingt, die Masse der enthaltenen Zellen zu ermitteln. Diese ergibt sich wiederum aus der Summe der festen Zellbestandteile m_{sc} und der Masse des Zytoplasmas m_{zyt} .

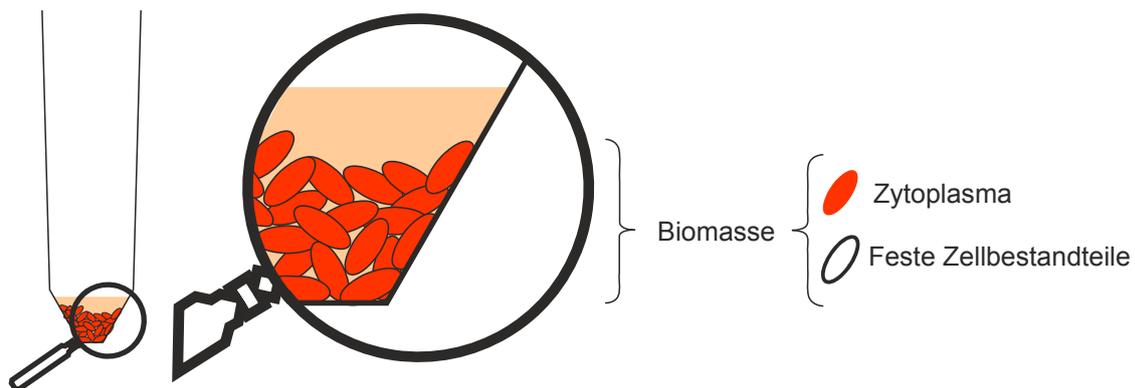


Abbildung 8.1: Schematische Darstellung der Bestimmung des extrazellulären Volumens.

$$m_{exf} = m_{tot} - m_{tara} - m_{cells} \quad m_{cells} = m_{sc} + m_{zyt} \quad (12), (13)$$

Unter der Annahme einer Dichte der extrazellulären Flüssigkeit ρ_{exf} von 1 g ml^{-1} , kann die Masse der extrazellulären Flüssigkeit in das entsprechende Volumen umgerechnet werden.

$$V_{exf} = m_{exf} * \rho_{exf} \quad (14)$$

Drei parallele Ansätze wurden zur Bestimmung der Masse der Zellen verfolgt, auf die im Nachfolgenden näher eingegangen wird.

Bestimmung aufgrund von Literaturwerten

Das spezifische intrazelluläre Volumen einer Zelle v_{intra_spec} [$\mu\text{L mg}^{-1}$] entspricht per Definition dem zytoplasmatischen Volumen pro Gramm Biotrockenmasse. Das zytoplasmatische Volumen in der Probe V_{zyt_LIT} [mL] ist folglich das Produkt aus dem Probenvolumen V_{sample} [mL], der Biotrockenmassekonzentration c_{cdw} [mg ml^{-1}] und dem spezifischen intrazellulären Volumen v_{intra_spec} [$\mu\text{L mg}^{-1}$]:

$$V_{zyt_LIT} = V_{sample} * c_{cdw} * v_{intra_spec} \quad (15)$$

Unter der Annahme einer Dichte ρ_{zyt} von mindestens 1 g ml^{-1} für das Zytoplasma, kann aus dessen Volumen und dem Produkt aus Biotrockenmasse und Probenvolumen die Masse der Zellen m_{cells_LIT} berechnet werden:

$$m_{cells_LIT} = V_{zyt_LIT} * \rho_{zyt} + c_{cdw} * V_{sample} \quad (16)$$

Bestimmung aufgrund des Biovolumens

Das spezifische Biovolumen v_{bv_spec} [$\mu\text{L ml}^{-1}$], das mittels Coulter-Counter bestimmt werden kann, entspricht dem von einer intakten Zellmembran umschlossenen Volumen pro Milliliter und kann daher unter Berücksichtigung des Probenvolumens mit dem zytoplasmatischen Volumen gleichgesetzt werden.

$$V_{zyt_CC} = V_{sample} * v_{bv_spec} \quad (17)$$

Die Masse der Zellen m_{cells_CC} kann folglich analog Gleichung (15) aus dem zytoplasmatischen Volumen, der Biotrockenmasse und dem Probenvolumen berechnet werden:

$$m_{cells_CC} = V_{zyt_CC} * \rho_{zyt} + c_{cdw} * V_{sample} \quad (18)$$

Bestimmung mittels Silikonöl-Zentrifugation

Die Zentrifugation in der Anwesenheit von Silikonöl bewirkt, dass nur die Zellen bis zum Boden des Reaktionsgefäßes gelangen, während jegliche Flüssigkeit oberhalb des Öls verbleibt. Es entsteht ein Zwei-Phasen-System, dessen Oberphase ohne Rückstände mit einer Pipette abgenommen werden kann. Beim Einsatz der Silikonöl-Zentrifugation wird die Differenz zwischen der Ausgangsmasse m_{tara_SZ} und der Endmasse m_{tot_SZ} des Reaktionsgefäßes ausschließlich durch das Zellpellet hervorgerufen und entspricht unmittelbar der Zellmasse m_{cells_SZ} .

$$m_{cells_SZ} = m_{tot_SZ} - m_{tara_SZ} \quad (18)$$

Anwendung der Verfahren auf reale Proben

Alle drei Bestimmungsmöglichkeiten wurden auf zwei Reihen von biologischen Proben angewendet. Dazu wurden die Leergewichte von 15 ml-Reaktionsgefäßes bestimmt, Biomasse von *E. coli* nach der in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Standardanweisung im Schüttelkolben generiert und gequenchet. Die Proben- und Quenchingvolumina betragen 2.5 ml bzw. 7.5 ml. Die Ansätze wurden zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und das Gewicht der Reaktionsgefäße erneut bestimmt. Unmittelbar vor dem Quenching wurde das Biovolumen potentiometrisch ermittelt, außerdem erfolgte eine Bestimmung der Biotrockenmasse. Die Versuche wurden bei einer optischen Dichte von 10 und 20 durchgeführt, wobei jede Analyse als Triplikat erfolgte.

Aufgrund der drei unterschiedlichen Bestimmungsmöglichkeiten ergaben sich für die Untersuchungen jeweils drei unterschiedliche Werte für die Masse der Zellen und folglich unterschiedliche extrazelluläre Restvolumina (vgl. Tabelle 8.1)

Tabelle 8.1: Extrazelluläres Restvolumen bei der Zentrifugation von Kultivierungsproben mit einer optischen Dichte (OD) von 10 und 20. Angegeben ist die Masse der Zellen, die aufgrund von Literaturwerten (m_{cells_LIT}), Coulter-Counter-Messungen (m_{cells_CC}) oder Silikonöl-Zentrifugation (m_{cells_SZ}) ermittelt wurde. Die aus diesen Werten berechneten extrazellulären Restvolumina sind mit V_{exf_LIT} , V_{exf_CC} und V_{exf_SZ} bezeichnet.

	m_{cells_LIT} [mg]	m_{cells_CC} [mg]	m_{cells_SZ} [mg]	V_{exf_LIT} [μ l]	V_{exf_CC} [μ l]	V_{exf_SZ} [μ l]
OD 10	76.79	69.69	92.12	76.75	83.84	62.42
OD 20	161.85	138.83	178.07	85.73	108.75	69.51

Die detektierten Werte für V_{exf} liegen abhängig von der eingesetzten Methode in einem Bereich von 62 μ l bis 83 μ l für eine optische Dichte von 10 und 69 μ l bis 110 μ l für eine optische Dichte von 20. Die Abhängigkeit des Wertes von der Pelletgröße stellt sich geringer dar, als erwartet. Bei einer nahezu Verdopplung der Biomasse erhöht sich das extrazelluläre Restvolumen im Mittel nur um 18 %. Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil des Restvolumens nicht interzellulär vorliegt, sondern unabhängig von der Biomasse an den Wänden des eingesetzten Reaktionsgefäßes haftet.

Beim Betrachten der absoluten Werte fällt auf, dass das extrazelluläre Restvolumen bei den untersuchten Proben zwischen 28 % und 55 % des Gesamtvolumens der Ansätze von 154 μ l bzw. 248 μ l bildet. Für Metabolite, die im extrazellulären Raum in hohen Konzentrationen vorliegen und für Metabolite, die ein starkes Leakage zeigen, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Verfälschung von Metabolomdaten durch das extrazelluläre Restvolumen durchaus relevant ist.

8.2 Alternative Verfahren zur Zellseparation

8.2.1 Silikonöl-Zentrifugation

Da die Silikonöl-Zentrifugation eine akkurate Trennung von Biomasse und extrazellulärer Flüssigkeit ermöglicht, wurde versucht, das Verfahren für die Metabolomanalyse zu adaptieren. Dazu wurde in den für das Quenching eingesetzten Probengefäßen 5 ml eines auf -20°C gekühlten Silikonöls mit einer Dichte von 1.01 g ml^{-1} vorgelegt. Bei der Zentrifugation passieren die gequenchten Zellen das Öl trotz der verringerten Dichte. Die Bildung eines Pellets erfolgte, entgegen der im Standardverfahren eingesetzten Zentrifugationsmethode, bereits nach 1 min bei 4500 g (vgl. Abbildung 8.2).

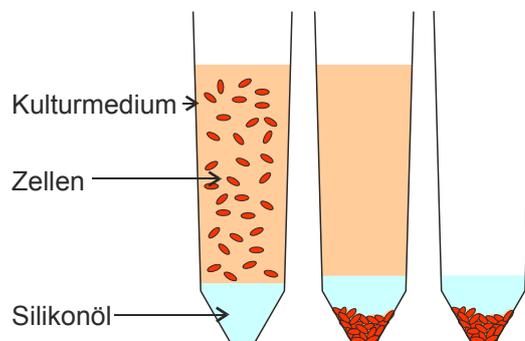


Abbildung 8.2: Schematische Darstellung der Silikonöl-Zentrifugation. Nach der Probennahme (links) sammeln sich die Zellen durch Zentrifugation unter dem vorgelegten Silikonöl, während jegliche Flüssigkeit eine zweite Oberphase bildet (Mitte). Diese Oberphase kann anschließend vollständig abgenommen werden (rechts).

Für die weitere Bearbeitung der gequenchten Biomasse stellte das Silikonöl allerdings ein nicht zu lösendes Problem dar. Zwar gelang die Extraktion nach dem in Abschnitt 4.5.1 beschriebenen Standardverfahren. Die Extrakte wiesen aber gegenüber Vergleichsextrakten ohne Silikonöl deutlich verringerte Konzentrationen auf (vgl. Tabelle 8.2).

Tabelle 8.2: Extraktkonzentration beim Einsatz der Silikonöl-Zentrifugation zur Zellseparation. Analyse von Proben einer *E. coli*-Kultivierung, die nach dem in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Standardverfahren generiert wurden und von Proben, bei denen die Separation mittels Silikonöl-Zentrifugation erfolgte. Mit den Extraktkonzentrationen (c_{ext}) von Glucose-6-Phosphat (G6P), Succinat (SUC), Phosphoenolpyruvat (PEP), Cis-Aconitat (CAN) und Aspartat (ASP).

	Standardverfahren	Silikonöl-Zentrifugation
	c_{ext} [μM]	c_{ext} [μM]
Glucose-6-Phosphat	1.31 ± 0.22	0.56 ± 0.07
Succinat	3.17 ± 0.32	2.73 ± 0.07
Phosphoenolpyruvat	1.04 ± 0.66	0.43 ± 0.04
Cis-Aconitat	0.50 ± 0.09	0.38 ± 0.08
Citrat	5.77 ± 0.14	-
Aspartat	13.55 ± 2.13	9.37 ± 0.63

Eine mögliche Ursache ist, dass das Silikonöl das extrazelluläre Restvolumen verringert und aus diesem Grund nicht die Extraktkonzentrationen des Silikonöl-Ansatzes zu niedrig, sondern die des Vergleichsansatzes zu hoch sind. aufgrund des deutlichen Konzentrationsunterschiede und der Tatsache, dass Citrat in den Extrakten des Silikonöl-Ansatzes nicht nachgewiesen werden konnten muss aber angenommen werden, dass das eingesetzte Öl die Extraktionseffizienz, möglicherweise durch die Bildung einer hydrophoben Hülle, negativ beeinflusst.

8.2.2 Vakuumfiltration

Als zweites Alternativverfahren zur Zentrifugation wurde die Vakuumfiltration untersucht. Obgleich die Filtration aufgrund der hohen Zelldichten ungeeignet für mikrobielle Kultivierungen scheint, wurde nach einer geeigneten Kombination von Membranen gesucht, die eine schnelle Zellabtrennung und anschließende Analyse ermöglicht. Dazu wurden 14 Filter, die sich in Membranart, Porendurchmesser und Filterfläche unterschieden, mit identischer, gequenchter Biomasse bei konstantem Vakuum beladen.

Die Bewertung der Filter erfolgte anhand der Kriterien:

- Filtrationszeit
- Biomassekonzentration im Filtrat
- Lösungsmittelstabilität
- Allgemeine Handhabung

Drei der Filter schieden aufgrund der Hydrophobizität des Materials aus. Obwohl eine Vorkonditionierung mit Ethanol das Membranmaterial Polytetrafluorethylen (PTFE) für wässrige Lösungen durchlässig hätte machen sollen, war eine Filtration nicht möglich. Das sehr dünne Filtermaterial der

chemisch modifizierten, hydrophilen PTFE-Membranen machte die Handhabung unvorteilhaft und führte zum Ausschluss der Filter.

Ein wichtiges Kriterium zwischen den verbliebenen Filtern aus Nylon, Polyamid und Polyester, die alle Filtrationszeiten < 5 s aufwiesen, war die Biomassekonzentration im Filtrat und damit der Verlust an Biomasse bei der Filtration. Hier erschien ein Polyamidfilter mit einer Porenweite von 1.2 µm und einem Biomasseverlust von unter 5 % als am besten geeignet.

Zur Bestimmung der Kompatibilität der Membranen mit der auf die Zellabtrennung folgenden Extraktion und Analytik wurde die abfiltrierte Biomasse von *E. coli* nach dem in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Standardverfahren weiterbehandelt. Die Extrakte wurden mittels LC-ESI-MS/MS quantitativ analysiert und relativ zueinander ausgewertet (vgl. Abbildung 8.3).

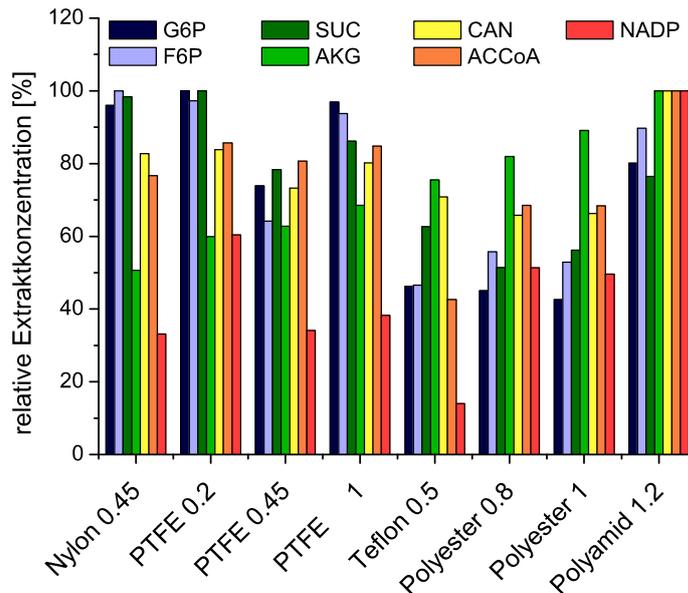


Abbildung 8.3: Relative Extraktkonzentrationen beim Einsatz verschiedener Filtermembranen für die Zellabtrennung. Die Extraktkonzentration von Glucose-6-Phosphat (G6P), Fructose-6-Phosphat (F6P), Succinat (SUC), α -Ketoglutarat (AKG), Cis-Aconitat (CAN), Acetyl-CoA (ACCoA) und NADP wurde relativ zur höchsten detektierten Konzentration des jeweiligen Metaboliten ausgedrückt.

Für vier der sieben untersuchten Metabolite konnte in den Extrakten der Polyamid-gefilterten Biomasse die höchste Konzentration detektiert werden. Die vergleichsweise niedrigen Metabolitkonzentrationen in den Teflon- und Polyester-gefilterten Extrakten decken sich mit dem Nachweis einer hohen Biomassekonzentration in den Filtraten dieser Ansätze (Daten nicht gezeigt).

Da keiner der untersuchten Filter vollständig stabil gegenüber den verwendeten Lösungsmitteln ist, wurde in einem abiotischen Ansatz untersucht, ob die teilweise Zersetzung eines Filters durch die eingesetzten Lösungsmittel die Analytik beeinflusst. Dies konnte nicht beobachtet werden.

Aufgrund der Ergebnisse wurden Polyamidfilter einer Porengröße von 1.2 µm als geeignet für die Zellabtrennung zur Metabolomanalyse eingestuft. Alle weiterführenden Untersuchungen wurden daher mit diesem Filtermaterial durchgeführt.

In einer Konzeptprüfung sollte gezeigt werden, ob sich die Ergebnisse der mittels Filtration generierten Metabolomdaten mit denen der Standardmethode decken. Dazu wurde Biomasse von *E. coli* gequenchet, aliquotiert und die Zellseparation von je fünf Aliquoten mittels Zentrifugation und Filtration durchgeführt. Extraktion und Analyse aller Ansätze erfolgten parallel nach dem in Abschnitt 4.5.1 beschriebenen Standardprotokoll.

Die Konzentrationen von freien Aminosäuren in den Quenchingüberständen bzw. Extrakten von Pellets und Filterkuchen wurden miteinander verglichen. Auf die Vermessung der Kulturüberstände wurde verzichtet, da es sich bei allen Aliquoten um Biomasse aus einer Kultivierung handelte (vgl. Abbildung 8.4).

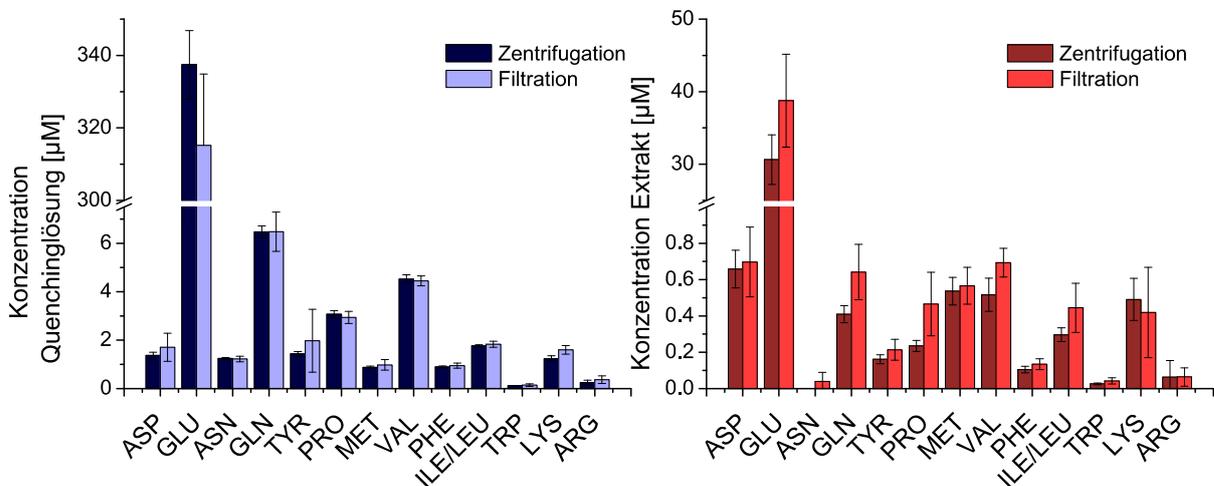


Abbildung 8.4: Aminosäurekonzentrationen in zellfreien Quenchingansätzen (links) und Extrakten (rechts) in Abhängigkeit vom Zellseparationsverfahren. Mit den Konzentration von Aspartat (ASP), Glutamat (GLU), Asparagin (ASN), Glutamin (GLN), Tyrosin (TYR), Prolin (PRO), Methionin (MET), Valin (VAL), Phenylalanin (PHE), Leucin/Isoleucin (ILE/LEU) Tryptophan (TRP), Lysin (LYS) und Arginin (ARG)

Es ist zu erkennen, dass die Verfahren zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Die höheren Standardfehler der Extrakte, die mittels Filtration erzeugt wurden, sind damit zu begründen, dass der manuelle Transfer der beladenen Filter ein hohes Fehlerpotential besitzt.

Obwohl die Zellseparation mittels Vakuumfiltration innerhalb von < 30 s erfolgt, während die Zentrifugation 10 min benötigt, ist nahezu kein Unterschied zwischen dem Leakage bei gefilterter und zentrifugierter Biomasse zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass das Leakage nicht durch eine kürzere Inkubationszeit von Biomasse und Quenchingflüssigkeit verringert werden kann.

8.3 Fazit Zellseparation

Es konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung der Zentrifugation zur Zellseparation undefinierte Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit im Reaktionsgefäß zurückbleiben. Dieses extrazelluläre Restvolumen ist weitgehend unabhängig vom Probenvolumen und kann nur äußerst unpräzise und aufwendig quantifiziert werden. Dies macht es unmöglich, das extrazelluläre Restvolumen parallel zu einer Standard-Metabolomanalyse zu bestimmen und den eingetragenen Fehler mathematisch zu korrigieren. Die Entwicklung eines alternativen Verfahrens zur Zellseparation ist daher langfristig unerlässlich.

Die alternativen Verfahren Silikonöl-Zentrifugation und Vakuumfiltration wurde eingesetzt und hinsichtlich ihrer Funktionalität bewertet. Während die Silikonöl-Zentrifugation mit der weiteren Prozessierung der Biomasse nicht kompatibel ist, eignet sich die Vakuumfiltration aufgrund des hohen manuellen Aufwands nicht als Standardmethode. Insbesondere die Handhabung von Filtern, die mit Biomasse beladen sind, stellt eine enorme Fehlerquelle dar.

9. Analytik

Die absolute Quantifizierung von Metaboliten im nanomolaren Konzentrationsbereich stellt höchste technische Anforderungen. Auch bei ansonsten einwandfreier experimenteller Arbeit birgt die Analytik ein hohes Fehlerpotential, da Fehldetektionen in den meisten Fällen nicht als solche erkennbar sind und folglich biologisch interpretiert werden.

Im folgenden Kapitel wurde zunächst die Funktionalität der seit 2005 zur Korrektur der Ionensuppression eingesetzten IDMS (vgl. Abschnitt 3.1.6) untersucht. Zudem wurden Qualitätskriterien aufgestellt, die eine belastbare Analytik mittels IDMS ermöglichen.

Der letzte Teil des Kapitels beschreibt die Etablierung einer neuen LC-ESI-MS/MS-Methode zur Quantifizierung organischer Säuren.

9.1 Optimierung der IDMS

Die IDMS beruht auf der Annahme, dass die gemessene ^{12}C -Peakfläche oder -höhe eines Analyten allein nicht ausreicht, um eine absolute Quantifizierung durchzuführen, weil unspezifische Größen die Signalintensität beeinflussen. Die Verhältnisbildung mit einem internen Standard, der ein isotopen-markiertes Analogon des Analyten ist, ermöglicht die Quantifizierung, da ^{12}C - und ^{13}C -Analyt sich bei der Messung identisch verhalten.

9.1.1 Funktionalität der IDMS

Zunächst sollte gezeigt werden, ob der Einsatz eines isotopen-markierten Standards die Quantifizierung in komplexen Matrices ermöglicht, die allein aufgrund der ^{12}C -Peakflächen nicht erfolgen kann.

Die Schwierigkeit der experimentellen Überprüfung besteht darin, eine komplexe Matrix zu generieren, in der die Konzentrationen einzelner Metabolite bekannt sind. Dazu wurden Überstände einer *E. coli* Kultivierung sterilfiltriert und im Verhältnis 1:2 mit 0.9 % -iger Natriumchlorid-Lösung verdünnt. In der zur Verdünnung eingesetzten Lösung wurden definierte Konzentrationen zwischen 30 μM und 3 μM an Metaboliten vorgelegt.

Die Analyse der Proben erfolgte zunächst nur anhand der ^{12}C -Peakflächen. Im Folgenden wurden die Verhältnisse zwischen den ^{12}C -Peakflächen und den ^{13}C -Peakflächen des zugehörigen internen Standards für die Analyse genutzt (vgl. Abbildung 9.1).

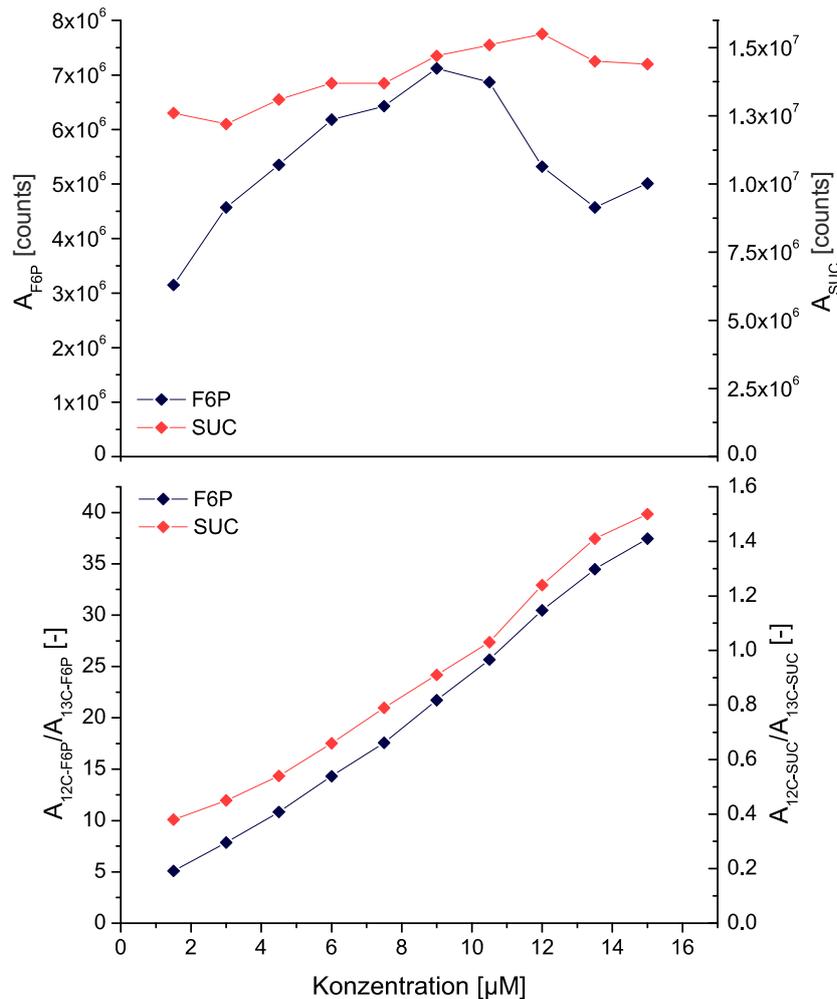


Abbildung 9.1: Absolute Quantifizierung von Metaboliten in komplexen Matrices. Analyse von Überstandsprouben einer Kultivierung von *E. coli*, die im Verhältnis von 1:2 mit Standardlösungen zwischen 3 µM und 30 µM gemischt wurden. Mit der absoluten Peakflächen von ¹²C-Fructose-6-Phosphat (F6P) und ¹²C-Succinat (SUC) (oben) und dem Verhältnis der Analytpeaks zum Peak des zugehörigen ¹³C-Standard (unten).

Es ist zu erkennen, dass die im oberen Abbildungsteil gezeigte Fläche der ¹²C-Peaks nicht mit den Konzentrationen korreliert, die dem Kulturüberstand zugegeben wurden. Die Peakflächen und Peakflächenverhältnisse von weiteren untersuchten Metaboliten sind im Anhang G1 dargestellt. Die hier gezeigten Daten sind repräsentativ für alle durchgeführten Messungen. Einzig bei der Analyse von Glucose-6-Phosphat bestand auch aufgrund der reinen Analyse der ¹²C-Peakflächen eine unmittelbare Korrelation zwischen dem Messsignal und der vorgelegten Konzentration.

Betrachtet man die Auftragung der Peakflächenverhältnisse im unteren Abbildungsteil, fällt auf, dass die Verhältnissbildung für beide Metabolite eine lineare Korrelation mit der zugegebenen Konzentration zeigt.

Aufgrund der Ergebnisse ist zu sagen, dass eine quantitative Analyse in komplexen Matrices auf alleiniger Basis der ¹²C-Peakflächen nicht möglich ist und dass der Einsatz der IDMS zu einer Korrektur von unspezifischen Einflüssen wie der Messmatrix genutzt werden kann.

9.1.2 Ionisierungseffizienz und Response Factor

Theoretisch sollte die oben gezeigte Korrelation zwischen dem $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Verhältnis und der Konzentration im gesamten Messbereich Gültigkeit besitzen. Dies gilt unter der Annahme, dass sich ^{12}C - und ^{13}C -Analyt im gesamten messbaren Bereich identisch verhalten und folglich gleiche Mengen an ^{12}C - und ^{13}C -Analyten identische Peakflächen erzeugen.

Zur Überprüfung der Annahme wurde eine Verdünnungsreihe von ^{12}C - und ^{13}C -Standards von Succinat im Bereich von 0.25 mM bis 5 mM separat vermessen (vgl. Abbildung 9.2).

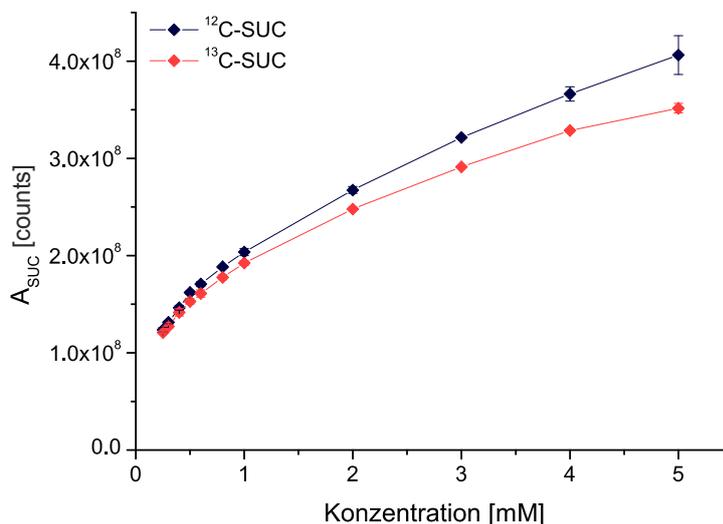


Abbildung 9.2: Auftragung der absoluten Peakflächen bei der LC-ESI-MS/MS-Messung von Standardreihen von ^{12}C und ^{13}C -Succinat (SUC) gegen die Analytkonzentration.

Es ist zu erkennen, dass ^{12}C - und ^{13}C -Succinat im Konzentrationsbereich unter 0.5 mM annähernd identische Peakflächen erzeugen. Im höher konzentrierten Bereich ist hingegen zu beobachten, dass die von ^{13}C -Succinat erzeugten Peakflächen systematisch kleiner sind, als die Peakflächen, die bei der Messung identischer Konzentrationen an ^{12}C -Succinat detektiert werden konnten.

Die Ergebnisse deuten auf einen konzentrationsabhängigen Effekt hin. Da die Peakintensitäten von ^{12}C - und ^{13}C -Analyten im niedrigen Konzentrationsbereich bis 0.5 mM identisch sind, kann ausgeschlossen werden, dass die Signale, die von einzelnen ^{12}C - und ^{13}C -Molekülen erzeugt werden, unterschiedlich sind, womit der Detektor als Ursache ausscheidet. Wäre eine Überladung der Chromatographiesäule die Ursache der Beobachtung, müssten chemische Unterschiede zwischen ^{12}C - und ^{13}C -Analyten bestehen. Aufgrund der vollkommen identischen Retention beider Isotope, ist dies äußerst unwahrscheinlich. Eine unterschiedliche Fragmentierung von ^{12}C - und ^{13}C -Analyten ist theoretisch möglich, kann aber nur dann die Ursache der Abweichungen sein, wenn beide Analyten im niedrigen Konzentrationsbereich identisch fragmentieren. Die Möglichkeit kann zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, ist aber ebenfalls äußerst unwahrscheinlich.

Folglich liefert lediglich die Ionisierung einen möglichen Erklärungsansatz. Wie in Abschnitt 3.1.6 ausführlich beschrieben, stellt die Ionisierung mittels Elektrospray-Ionisation eine Konkurrenzreaktion dar. Erreichen mehr Moleküle die Ionenquelle, als diese pro Zeiteinheit ionisieren kann, besitzt jede Molekülart abhängig von ihren elektrochemischen Eigenschaften eine unterschiedliche Ionisierungseffizienz (Response Factor $\neq 1$). Es ist anzunehmen, dass im obigen Experiment bei den Proben im Konzentrationsbereich über 0.5 mM mehr Moleküle die Ionenquelle erreichen, als diese ionisieren kann. Aus diesem Grund ist der Einsatz eines isotope-markierten internen Standards nur dann zur Korrektur von Suppressionseffekten geeignet, wenn unterhalb des Sättigungsbereichs der Ionenquelle gearbeitet wird.

9.1.3 Definition des linearen Messbereichs

Anhand der obigen Experimente konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen, die im Sättigungsbereich der Ionenquelle detektiert werden, nicht belastbar sind. Die Linearität des $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Verhältnisses im Bezug auf die Konzentration einer Standardreihe ist allerdings häufig auch in diesem Bereich noch gegeben, was eine Definition des linearen Messbereiches schwierig macht.

Um zu zeigen, welche Kriterien der lineare Messbereich für eine belastbare Quantifizierung erfüllen muss, wurden die absoluten Peakflächen und Peakflächenverhältnisse bei der Messung einer Standardreihe von 0.025 bis 100 μM Glucose-6-Phosphat exemplarisch untersucht (vgl. Abbildung 9.3).

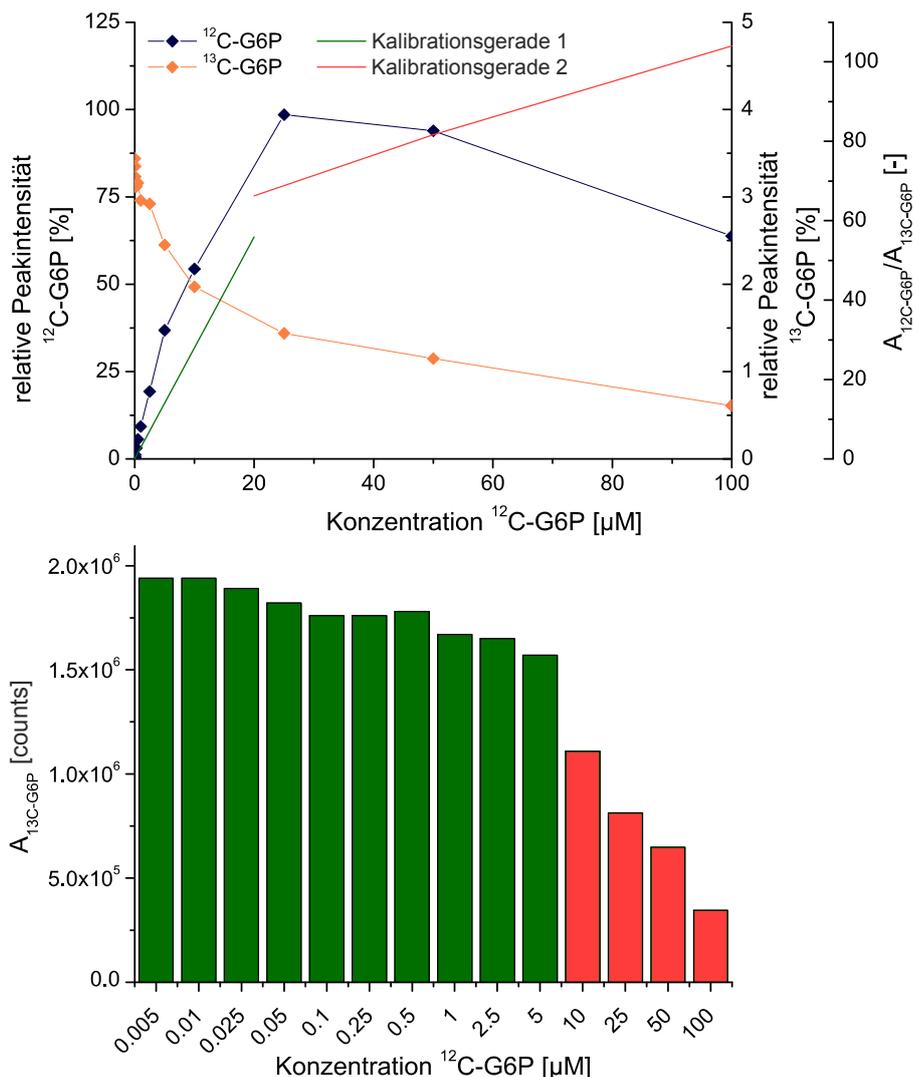


Abbildung 9.3: Peakflächen bei der Analyse einer Standardreihe von Glucose-6-Phosphat ($^{12}\text{C-G6P}$) und des entsprechenden internen Standards ($^{13}\text{C-G6P}$), sowie zwei aus der Verhältnissbildung beider Peakflächen resultierende Kalibrationsgerade für den Konzentrationsbereich von 0.0025 – 5 (Kalibrationsgerade 1) und 25 – 100 μM (Kalibrationsgerade 2). Im unteren Abbildungsteil sind die absoluten Flächen des internen Standards in Abhängigkeit von der Konzentration an $^{12}\text{C-G6P}$ gezeigt.

Bei gleicher Ionisierung der ^{12}C - und ^{13}C -Analyten sollte sich für den ^{12}C -Analyten eine Sättigungskurve zeigen, während die Intensität der ^{13}C -Peaks im niedrigen Konzentrationsbereich konstant bleiben und danach reziprok zur Sättigung der ^{12}C -Kurve absinken sollte. Die Verhältnisbildung beider Peakflächen sollte über den gesamten Messbereich linear mit der ^{12}C -Konzentration korrelieren.

Die absoluten Peakflächen der experimentell erzeugten Werte zeigen, dass die Intensität des ^{12}C -Peaks im niedrigen Konzentrationsbereich, in dem die Ionenquelle noch nicht abgesättigt ist, linear ansteigen. Ab einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ nimmt die konzentrationsabhängige Steigerung des Signals ab und zeigt ein klassisches Sättigungsverhalten. Die Intensität des ^{13}C -Peaks zeigt bis zu einer ^{12}C -Konzentration von $2.5\ \mu\text{M}$ annähernd konstante und im höher konzentrierten Bereich abnehmende Werte.

Betrachtet man die Peakflächenverhältnisse, ergeben sich abhängig vom gewählten Konzentrationsbereich zwei unterschiedliche Kalibrationsgeraden. Die Korrelationskoeffizienten beider Geraden besitzen Werte ≥ 0.99 , es ist allerdings zu beobachten, dass die Geradensteigungen sich in Abhängigkeit vom gewählten Bereich deutlich verändern.

Die Ergebnisse zeigen klar, dass nicht für den gesamten Messbereich ein linearer Zusammenhang zwischen dem $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Peakflächenverhältnis und der ^{12}C -Konzentration besteht. Daher ist anzunehmen, dass sich die lineare Korrelation auf den Bereich beschränkt, in dem die volle Kapazität der Ionenquelle noch nicht erreicht ist.

Zumindest bei der Vermessung von Standards kann dieser Bereich somit durch zwei Faktoren bestimmt werden:

- Die ^{12}C -Peakfläche sollte direkt mit der eingesetzten Konzentration korrelieren.
- Die Fläche des ^{13}C -Peaks sollte in allen Messungen im Rahmen des Fehlers konstant sein.

9.1.4 Matrixeffekte

Für die Generierung von Metabolomdaten ist neben der Definition des linearen Messbereiches von besonderem Interesse zu zeigen, ob und in welcher Weise sich Ionensuppressions-Effekte auf tatsächliche Messungen auswirken.

In den vorangegangenen Messungen wurde die Absättigung der Ionenquelle durch den Einsatz von hohen Analytkonzentrationen erzeugt. Es ist anzunehmen, dass diese Konzentrationen in realen Zellextrakten nicht vorliegen. Im Gegensatz dazu liegt in realen Proben eine um ein Vielfaches höhere Komplexität vor. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob auch unspezifische Komponenten der Probenmatrix zur Absättigung der Ionenquelle und damit zu Fehldetektionen beitragen können.

Variierende Matrices wurden dazu mit einer identischen Menge (Endkonzentration von $10\ \mu\text{M}$) an ^{12}C - und ^{13}C -Analyten versetzt und als Triplikate mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Als variierende Matrixkomponenten wurden die Konzentration an Glucose, Ammoniumsulfat, BSA als Modellprotein und der prozentuale Anteil an Methanol gewählt.

Bei den ersten drei Matrices handelt es sich um Komponenten, die im Verlauf einer Kultivierung starken Änderungen unterliegen und folglich auch in realen Proben deutlich schwanken. Es wurden Konzentrationen gewählt, die auch während einer Kultivierung auftreten könnten.

Die Variation des Anteils an Methanol resultiert aus der Tatsache, dass die Quantifizierung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen es erfordert, Analysen von Probenarten durchzuführen, bei denen der prozentuale Anteil an Methanol unterschiedlich ist (z.B. Extrakte 45 %, Kulturüberstände 25 %, usw.).

Neben der Variation der Matrices wurde die Art des eingesetzten ^{13}C -Standards in der Form geändert, dass er entweder dem in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Standardprotokoll entsprechend aus Zellextrakten (aus *B. licheniformis*, Konzentration unbekannt) oder aus technische erzeugten Reinstoffen (p.A. 99.9%, 4 μM) stammte.

Darüber hinaus wurden die Matrices in der Hälfte der Verdünnungsreihen nicht in Wasser, sondern in sterilfiltriertem Kulturüberstand angesetzt, so dass neben der linearen Variation der Matrices auch der Einfluss von komplexen biologischen Coeluenten untersucht werden konnte.

Eine detaillierte Auflistung der durchgeführten Versuche ist in den Tabellen 9.1 und 9.2 wiedergegeben.

Tabelle 9.1.: Eingesetzte Standards in den Versuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses der Messmatrix auf die LC-ESI-MS/MS-Analyse.

	Analyten
technischer Standard ^{12}C	Je 20 μM Glucose-6-Phosphat, Fructose-6- Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat, Acetyl-CoA, Citrat, Cis-Aconitita, α -Ketoglutarat. Fumarat
technischer Standard ^{13}C	Je 4 μM Phosphoenolpyruvat, α -Ketoglutarat
biologischer Standard ^{13}C	Zellextrakt aus <i>B. licheniformis</i> auf ^{13}C -Glucose kultiviert

Tabelle 9.2: Zusammensetzung der Messreihen zur Untersuchung des Einflusses der Messmatrix auf die LC-ESI-MS/MS-Analyse.

Messreihen mit biologischem internen Standard		
Matrix 1	Methanol in vollentsalztem Wasser	10 – 100 [%]
Matrix 2	Glucose in vollentsalztem Wasser	1 – 10 [g l^{-1}]
Matrix 3	Ammoniumsulfat in vollentsalztem Wasser	1 – 10 [g l^{-1}]
Matrix 4	BSA in vollentsalztem Wasser	0.5 – 5 [g l^{-1}]
Matrix 5	10 % Kulturüberstand mit Methanol in vollentsalztem Wasser	10 – 90 [%]
Matrix 6	Glucose in Kulturüberstand	1 – [g l^{-1}]
Matrix 7	Ammoniumsulfat in Kulturüberstand	1 – [g l^{-1}]
Matrix 8	BSA in Kulturüberstand	0.5 – 5 [g l^{-1}]
Messreihen mit technisch erzeugtem internen Standard		
Matrix 9	Methanol in vollentsalztem Wasser	10 – 100 [%]
Matrix 10	Glucose in vollentsalztem Wasser	1 – 10 [g l^{-1}]
Matrix 11	Ammoniumsulfat in vollentsalztem Wasser	1 – 10 [g l^{-1}]
Matrix 12	BSA in vollentsalztem Wasser	0.5 – 5 [g l^{-1}]
Matrix 13	10 % Kulturüberstand mit Methanol in vollentsalztem Wasser	10 – 90 [%]
Matrix 14	Glucose in Kulturüberstand	1 – 10 [g l^{-1}]
Matrix 15	Ammoniumsulfat in Kulturüberstand	1 – 10 [g l^{-1}]
Matrix 16	BSA in Kulturüberstand	0.5 – 5 [g l^{-1}]

Die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Daten macht es notwendig, zunächst eine Beurteilung der Effekte durchzuführen. Dazu wurden die insgesamt 16 Messreihen mit je 10 Analyten nach dem Kriterium sortiert, ob bei der Betrachtung des $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Peakflächenverhältnisses im Verlauf einer linearen Matrixvariation ein linearer Effekt zu beobachten ist oder nicht.

Die einzelnen Peakflächenverhältnisse wurden dazu relativ zum Mittelwert der Peakflächenverhältnisse der jeweiligen gesamten Verdünnungsreihe ausgedrückt und gegen die Stärke der Matrix (10 – 100 %) aufgetragen (vgl. Abbildung 9.4).

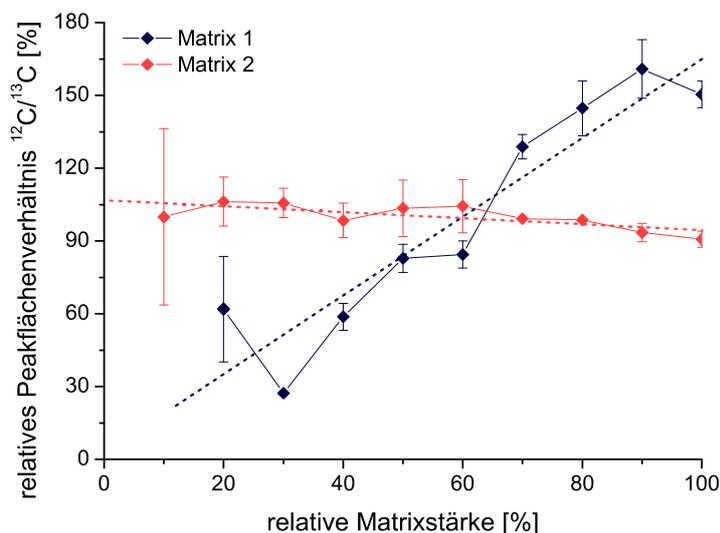


Abbildung 9.4: Relative $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Peakflächenverhältnisse von Fructose-6-Phosphat bei der Variation des prozentualen Anteils an Methanol (Matrix 1) und der Glucosekonzentration (Matrix 2) in der Messmatrix.

Es ist zu erkennen, dass das ermittelte Peakflächenverhältnis für die Messreihe Matrix 2 unabhängig von der Matrixstärke konstant bleibt, während für die Messreihe Matrix 1 ein linearer Trend zu beobachten ist. Abbildung 9.5 zeigt für beide Messreihen die absoluten Peakflächen von ^{12}C -Fructose-6-Phosphat und ^{13}C -Fructose-6-Phosphat.

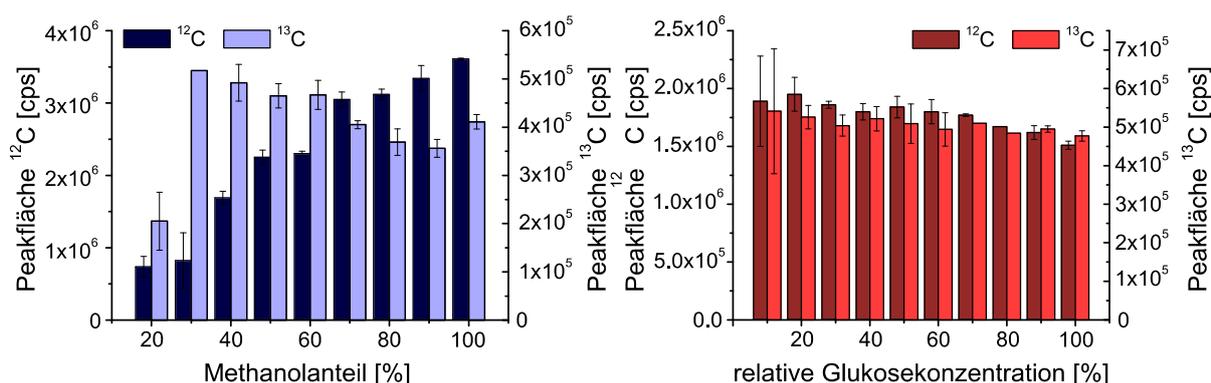


Abbildung 9.5: Absolute ^{12}C - und ^{13}C -Peakfläche von Fructose-6-Phosphat bei der Variation des prozentualen Anteils an Methanol (Matrix 1, links) und der Glucosekonzentration (Matrix 2, rechts).

Es wird deutlich, dass die ^{12}C - und ^{13}C -Peakflächen bei einer Veränderung der Glucosekonzentration ein identisches Verhalten zeigen, während eine Variation des prozentualen Anteils an Methanol zu einer linear steigenden ^{12}C -Peakfläche bei sinkendem ^{13}C -Peak führt.

Nachdem alle erzeugten Messreihen entsprechend der Abbildung 9.4 ausgewertet wurden, erfolgte die Beurteilung ggf. auftretender Suppressionseffekte anhand von zwei Kriterien:

- Die resultierende Korrelationsgerade besitzt eine Steigung bzw. ein Gefälle von ≥ 0.1 .
- Mindestens ein Datenpunkt zeigt eine Abweichung vom errechneten Mittelwert um $\geq 10\%$.

Die vereinfachte Beurteilung aller Verdünnungsreihen erfolgte anschließend auf Basis eines Rasters. Dabei wurden die Verdünnungsreihen rot gekennzeichnet, bei denen ein nach beiden Kriterien variierendes $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Peakflächenverhältnis beobachtet werden konnte. Grün gekennzeichnete Verdünnungsreihen besitzen hingegen ein konstantes $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Peakflächenverhältnis (vgl. Abbildung 9.6).

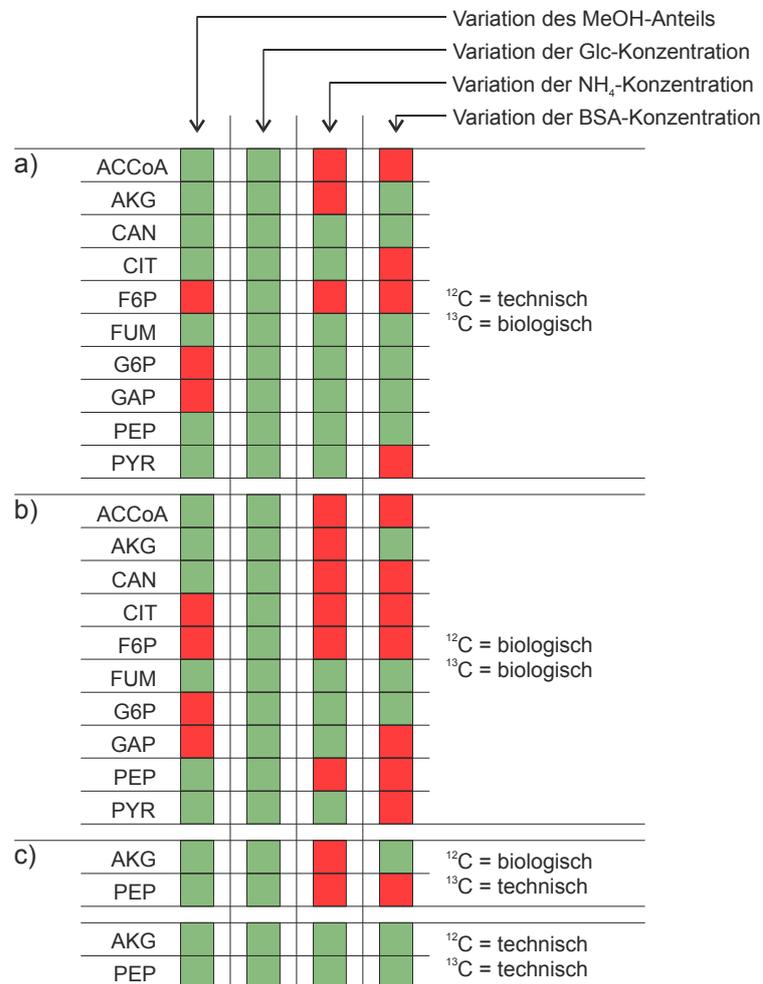


Abbildung 9.6: Ionensuppression bei der Analyse von Metabolitstandards in linear variierenden Matrices. Mit Acetyl CoA (ACCoA), α -Ketoglutarat (AKG), Cis-Aconitat (CAN), Citrat (CIT), Fructose-6-Phosphat (F6P), Fumarat (FUM), Glucose-6-Phosphat (G6P), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), Phosphosenolpyruvat (PEP) und Pyruvat (PYR) und der Variation der Matrixkomponenten Methanol (MeOH), Glucose (Glc), Ammonium (NH_4) und Serumalbumin (BSA). Grün bzw. rot gekennzeichnete Messreihen zeigen ein konstantes bzw. linear variierendes $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Peak-flächenverhältnis.

Einfluss der Probenmatrix

Betrachtet man den Abbildungsteil a), ist zunächst zu beobachten, dass in 10 der durchgeführten 40 Messreihen eine Beeinflussung durch die Matrix erfolgte, die durch den Einsatz des internen Standards nicht korrigiert werden konnte. Unter der Annahme, dass eine Absättigung der Ionenquelle zu einer unterschiedlichen Ionisierung von Analyt und internem Standard führt, könnten die Variationen der Matrix zu einer Sättigung der Ionenquelle führen und so die beobachteten Effekte erklären. Diese Sättigung kann durch unterschiedliche Einflüsse hervorgerufen werden:

- Da die Variation der Probenmatrix die Chromatographie beeinflusst, beeinflusst sie auch die absolute Anzahl an Ionen, die zeitgleich die Ionenquelle erreichen. Bei der Trennung handelt es sich um eine Umkehrphasen-Chromatographie, die maßgeblich auf hydrophoben und polaren Wechselwirkungen beruht. Es ist nicht auszuschließen, dass die Variation des Methanolanteils der Probe die Polarität des Eluenten beeinflusst und darin die Ursache für die auftretenden Effekte bei Fructose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat liegt.
- Die Probenmatrix beeinflusst die Ionisierbarkeit der Analyten in der Probe. Insbesondere die Variation der Ammoniumkonzentration, die mit einer Variation des Salzgehaltes der Probe einhergeht, beeinflusst parallel die Leitfähigkeit des Mediums und den Ladungszustand der Analyten.
- Bei der Variation der Protein-Konzentration kann nicht ausgeschlossen werden, dass das eingesetzte Protein (bovines Serumalbumin) mit Metaboliten verunreinigt war und deshalb unmittelbar zur Absättigung der Quelle führt.

Erwartungsgemäß zeigt die Variation der Glucosekonzentration, die keine physikalische Eigenschaft der Probenmatrix, außer der Viskosität, beeinflusst, bei keinem der Metabolite einen Effekt.

Einfluss biologischer Komponenten

Anhand der Ergebnisse in Abbildungsteil b) ist zu erkennen, dass die Erhöhung der biologischen Komplexität der Probe dazu führt, dass Metabolite, die von der linearen Variation einer definierten Probenmatrix zuvor nicht beeinflusst waren, jetzt eine Beeinflussung zeigen. Die Vermutung, die Konzentration der Zielmetabolite in dem zur Verdünnung eingesetzten Kulturüberstand könnte zu einer Absättigung der Ionenquelle führen, wurde durch eine separate Messung des zur Verdünnung eingesetzten Kulturüberstandes ausgeschlossen. Auch die Beobachtungen in Abbildungsteil b) lassen zwei Schlüsse zu:

- Unspezifische Komponenten aus der biologischen Matrix können zusammen mit den Zielanalyten eluieren und so die Ionisierung der Zielanalyten verringern.
- Insbesondere solche Komponenten, die aufgrund ihres m/z-Verhältnisses kein Signal am Detektor erzeugen und daher nicht als Störpeaks im Chromatogramm in Erscheinung treten, verringern die Belastbarkeit der Analysemehtode.

Unter der Annahme, dass diese Coeluenten in gleicher Weise zur Absättigung der Ionenquelle beitragen, wie die Analyten und ihre ^{13}C -Analoge, müsste die Verringerung der Konzentration an internem Standard in einem identischen Ansatz zu einer verringerten Anzahl an Matrixeffekten führen.

Einfluss des internen Standards

Betrachtet man die Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit technisch erzeugten ^{12}C -Komponenten in Abbildungsteil c) ist zu erkennen, dass in allen Messreihen mit technisch erzeugtem internen Standard ein konstantes Peakflächenverhältnis beobachtet werden konnte. Im Vergleich zu Ansätzen mit biologischen Komponenten konnte die Variation der Ammoniumkonzentration bei der Analyse von α -Ketoglutarat durch den Einsatz des technisch erzeugten Standards korrigiert werden, während dies mit dem biologisch erzeugten Standard nicht möglich war.

Absättigungseffekte in realen Proben

Die Ergebnisse zeigen, dass die Probenmatrix trotz Einsatz des internen Standards einen starken Einfluss auf die detektierten Konzentrationen besitzt. In 30 der insgesamt 96 Messreihen führen nicht korrigierbare Einflüsse der Probenmatrix zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen. Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ursache der Effekte in der Absättigung der Ionenquelle liegt. Aus diesem Grund muss bei der Analyse von Metabolomdaten gewährleistet werden, dass in Konzentrationsbereichen gearbeitet wird, in denen keine Absättigung auftritt.

Aufgrund des starken Einflusses, den die Probenmatrix trotz Einsatz eines internen Standards besitzt, ist es sinnvoll, die Eigenschaften einer Probe so weit wie möglich den Eigenschaften der Proben oder Standards anzupassen, mit denen ein Vergleich erfolgen soll. Für die Metabolomanalyse betrifft dies insbesondere die Anpassung des prozentualen Methanol-Anteils in externer Standardreihe, Extrakt, Quenching- und Kulturüberstand.

Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass der Einsatz eines technische erzeugten ^{13}C -Standards, der in einer definierten Stoffmenge eingesetzt wird, die Anzahl der auftretenden Effekte verringern kann. Da ein technisch erzeugter ^{13}C -Standard in einer definierten Konzentration vorliegt und keine zusätzlichen biologischen Komponenten in die Probe einträgt, deckt sich auch dieses Ergebnis mit der Theorie der Absättigung der Ionenquelle.

Des Weiteren ist zu erkennen, dass eine Verringerung der durch Coelution hervorgerufenen Effekte nur durch eine grundsätzliche Optimierung der Flüssigkeitschromatographie erreicht werden kann. Durch eine Steigerung der Selektivität der Trennung könnte erreicht werden, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein Analyt und der identisch retardierte interne Standard die Säule verlassen. Dies würde die Absättigung der Ionenquelle durch Coeluenten verhindern.

Eine weitere wichtige Optimierungsmöglichkeit stellt die Umstellung der Flüssigkeitschromatographie von einer Gradientenelution auf ein isokratisches Verfahren dar. Dadurch, dass der Anteil an Eluent und damit die Elektrolytkonzentration, welche die Ionenquelle erreicht, sich im Verlauf der Chromatographie ändert, ist der Einfluss des Elutionsmittels auf die Ionisierung nicht konstant. Eine Einbeziehung des Elutionsmittels in die Definition des linearen Messbereichs ist aus diesem Grund nicht möglich.

9.2 Verbesserung der Chromatographie mittels POP-LC

Zielsetzung der im Folgenden beschriebenen Methodenentwicklung ist die Analyse aller in Tabelle 9.3 aufgeführten 31 Metabolite. Die farblich gekennzeichneten Metabolite besitzen einen identischen Massenübergang und können aus diesem Grund nur chromatographisch getrennt werden. Die resultierende Methode soll gegenüber der Etablierten verringerte Störsignale bei der Messung von Wasser aufweisen, da diese die absolute Quantifizierung zwar nicht unmöglich machen, aber den linearen Messbereich verringern. Darüber hinaus soll die Methode auf einem gegenüber der etablierten Methode verringerten Anteil am Ionenpaarbildner Tributylamin basieren und ein isokratisches Elutionsprofil besitzen.

Die Grundlage der Methodenentwicklung stellte das System POP-LC der Firma Bischoff Chromatographie dar, das in Abschnitt 4.4.5 ausführlich beschrieben ist.

Tabelle 9.3: Angestrebtes Analytspektrum der Methodenentwicklung. Einteilung in die Stoffgruppen (Zucker-) Phosphate, Nukleotidverbindungen, organische Säuren und Coenzym-gekoppelte Metabolite.

Metabolit	Stoffgruppe	Aktuelle Messsituation
Glucose-6-Phosphat	(Zucker-)	– Quantifizierung möglich
Fructose-6-Phosphat	Phosphate	– gute chromatographische Trennung
Fructose-1-Phosphat		– schwache Störsignale in Wasser
Ribose-5-Phosphat		
Xylulose-5-Phosphat		
Ribulose-5-Phosphat		
Dihydroxyacetonphosphat		
Glycerinaldehyd-3-Phosphat		
Sedoheptulose-7-Phosphat		
Erythrose-4-Phosphat		
Fructose-1,6-Bisphosphat		
AMP	Nukleotid-	– Quantifizierung bedingt möglich
ADP	verbindungen	– zeitgleiche Elution mit organischen Säuren
ATP		– schwache Störsignale in Wasser
NAD		
NADH		
NADP		
NADPH		
6-Phosphoglykonat	Organische	– Quantifizierung nur bedingt möglich
2/3-Phosphoglycerat	Säuren	– schlechte chromatographische Trennung
Phosphoenolpyruvat		– starke Störsignale in Wasser
Pyruvat		
Cis-Aconitat		
Citrat		
Isocitrat		
α -Ketoglutarat		
Succiant		
Fumarat		
Malat		
Glyoxylat		
Acetyl-CoA	Coenzym- gekoppelte Metabolite	– Quantifizierung nur bedingt möglich – zeitgleiche Elution mit organischen Säuren – schwache Störsignale in Wasser

9.2.1 Erster Etablierungszyklus

Elutionsmittel

Für die Methodenetablierung war zunächst die Suche nach einem geeigneten Eluenten erforderlich. Dazu wurde nach dem Mischungsverhältnis zwischen Eluent A und Eluent B der Ausgangsmethode gesucht, das bei mindestens 60 % der Analyten zu einem Retentionsfaktor zwischen 4 und 15 (Herstellerangabe) führt.

Mit dem Mischungsverhältnis ändern sich dabei gleichzeitig der prozentuale Anteil an Methanol, die Konzentration an Tributylamin und die Konzentration an Essigsäure (vgl. Tabelle 9.4). Die Temperatur und die Flussrate der Chromatographie wurden im ersten Screening konstant bei 60°C und 0.5 ml min⁻¹ gehalten.

Tabelle 9.4: Eluenten des ersten Parameterscreenings. Untersucht wurden fünf Elutionsmittel, die sich im prozentualen Methanolanteil, der Essigsäure-Konzentration und der Tributylamin-Konzentration unterscheiden.

Eluent A	Eluent B	Essigsäure	Tributylamin
15 mM TBA	Methanol	Endkonzentration [mM]	Endkonzentration [mM]
10mM Essigsäure	Anteil [%]		
Anteil [%]			
30	70	3	4.5
40	60	4	6
50	50	5	7.5
60	40	6	9
70	30	7	10.5

Als Testsäule für die Elutionsmittelsuche wurde eine 20 mm lange, klassische C18-Säule mit Endcapping gewählt, bei der die Retention ausschließlich aus hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Analyt und Säulenmaterial resultiert. Nach dem Einbau der Säule wurde diese mit 100 % -igem Methanol equilibriert (20 Säulenvolumina) und über die Injektion von 10 µl einer 5 µM Urazillösung die Durchflusszeit der Säule bestimmt. Für das Screening wurde die Säule bei der jeweiligen Eluentzusammensetzung analog equilibriert und ein 5 µM Standardgemisch der in Tabelle 9.4 angegebenen Metabolite aufgetragen und detektiert.

Für alle Metabolite wurde bei jeder Auftragung der Retentionsfaktor bestimmt, wobei die Retentionszeit des Urazilpeaks der Durchflusszeit des Systems entsprach (vgl. Abbildung 9.7). Diese wurde mit 0.24 min bestimmt.

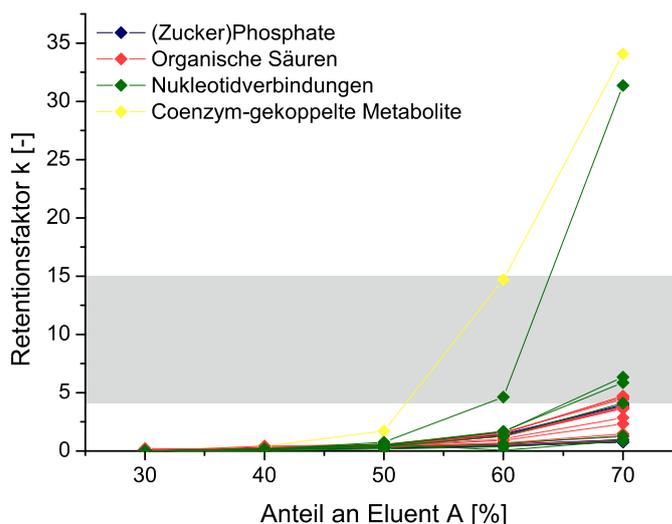


Abbildung 9.7: Retentionsfaktoren auf einer C18-Säule in Abhängigkeit von der Eluentzusammensetzung. Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet die angestrebten Retentionsfaktoren.

Es ist zu erkennen, dass der Retentionsfaktor bei einem prozentualen Anteil an Eluent A von 70 % nur für 7 Metabolite im Zielbereich zwischen 4 und 15 liegt.

Um eine Elution aller Metabolite zu garantieren, wurde die Eluentzusammensetzung von 65 % A und 35 % B unter den gegebenen Parametern als optimal eingestuft und die weiteren Messungen mit diesem Eluenten durchgeführt. Die Retentionsfaktoren und –zeiten aller Metabolite sind im Anhang G2 angegeben.

Durchflusszeiten

Für die Berechnung der Retentionsfaktoren der unterschiedlichen Säulenmaterialien (vgl. Abschnitt 4.4.5) wurden für alle Säulen die Retentionszeiten mit Hilfe einer nicht retardierten Substanz bestimmt. Theoretisch wird die Durchflusszeit ausschließlich vom Säulenvolumen definiert und sollte für Säulen von identischem Volumen in einem System gleich sein. Praktisch bestimmen auch undefinierte Faktoren wie die Säulenpackung oder minimal abweichende Totvolumina in den Anschlüssen die Durchflusszeit. Für die durchgeführte Methodenentwicklung wurde aus diesem Grund die Durchflusszeit für jede Säule separat experimentell ermittelt (vgl. Tabelle 9.5). Die Chromatogramme der Messung von Urazil, die zur Bestimmung der Durchflusszeit verwendet wurden, sind im Anhang G3 angegeben.

Tabelle 9.5: Durchflusszeiten der eingesetzten Säulen.

Säule	Durchflusszeit [min]
C18A (polar selectivity & hydrophobic interaction), C18 Phase mit eingebundener Amidgruppe	1.20
C18 (hydrophobic interaction), C18 Phase mit Endcapping	1.05
C30 (shape selectivity), C30 Phase ohne Endcapping	1.01
PH (π - π interaction), Phenylphase	2.24
CN (polar selectivity w/o hydrophobic interaction), Cyanopropylphase	2.26

Basismessungen

Die für die Simulation der optimalen stationären Phase notwendigen Basismessungen wurden mit vier verschiedenen Standardgemischen (Basic, Mix A, Mix B, Mix C) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5 μM , 50 μM) durchgeführt. Die Analytzusammensetzung der einzelnen Standardgemische ist in Tabelle 9.6 wiedergegeben.

Tabelle 9.6: Metabolitzusammensetzung der eingesetzten Standardgemische.

Standardgemisch	Metabolitzusammensetzung			
Basic	Siehe Tabelle 9.3			
Mix A	G6P	R5P	GAP	CIT
Mix B	F6P	X5P	DHAP	ISO
Mix C	F1P	Ru5P		

Die Messungen erfolgten als Triplikate. Für die Berechnung der Bodenzahlen wurden die Messungen der 5 μM Standardgemische genutzt. Die Messungen der 50 μM Standardgemische dienen lediglich zur Verifizierung der Retentionszeiten bei Metaboliten mit niedrigem Peak/Rauschen-Verhältnis.

Die Bestimmung der optimalen Säulenzusammensetzung kann nur erfolgen, wenn für alle Metabolite auf jedem Säulenmaterial Bodenzahl, Peakfläche und Retentionszeit bestimmt werden können. Für einen Teil der Metabolite konnten allerdings nicht für alle Säulen eindeutigen Peaks identifiziert werden. Mögliche Ursachen sind eine absolute Retention (bzw. eine Retentionszeit > 60 Minuten), eine Elution innerhalb des Totvolumens der Säule oder eine kontinuierliche Elution bei der ein Analyt keinen Peak, sondern nur eine kontinuierliches Signal erzeugt (vgl. Tabelle 9.7).

Tabelle 9.7: Detektierte Peaks bei der Basismessung auf unterschiedlichen Säulen. Die orangefarben markierten Metabolite konnten in mindestens einer Messung nicht eindeutig identifiziert werden und wurden aus diesem Grund in der weiteren Methodenentwicklung nicht berücksichtigt. + Peak mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von ≥ 10 und $N > 100$. \pm Peak mit einem Signal/Rasch-Verhältnis von ≥ 10 und $N \leq 100$. - kein Peak bzw. Peak mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von ≤ 10

Metabolit	C18A-Säule	C18-Säule	C30-Säule	Phenyl-Säule	Cyano-Säule
Glucose-6-Phosphat	+	+	+	+	+
Fructose-6-Phosphat	+	+	+	+	+
Fructose-1-Phosphat	+	+	+	+	+
Ribose-5-Phosphat	+	+	+	+	+
Xylulose-5-Phosphat	+	+	+	+	+
Ribulose-5-Phosphat	+	+	+	+	+
Dihydroxyacetonphosphat	+	+	+	+	+
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	+	+	+	+	+
Sedoheptulose-7-Phosphat	+	+	+	+	+
Erythrose-4-Phosphat	+	+	+	+	+
Fructose-1,6-Bisphosphat	+	+	+	+	+
AMP	+	+	+	+	+
ADP	+	+	-	-	+
ATP	+	+	-	-	-
NAD	+	+	+	+	+
NADH	+	+	+	+	+
NADP	+	+	\pm	+	+
NADPH	+	+	+	+	+
6-Phosphoglyconat	+	+	-	-	+
2/3-Phosphoglycerat	+	+	+	+	+
Phosphoenolpyruvat	+	+	+	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	+
Cis-Aconitat	+	+	+	+	+
Citrat	+	+	-	-	-
Isocitrat	+	+	+	-	-
α -Ketoglutarat	+	+	+	+	+
Succinat	+	+	+	+	+
Fumarat	+	+	+	+	+
Malat	\pm	+	\pm	\pm	+
Glyoxylat	+	\pm	+	\pm	+
Acetyl-CoA	+	+	-	-	+

Berechnung der optimalen Säulenkombination

Die ermittelten Bodenzahlen, Retentionszeiten, Peakflächen und Durchflusszeiten wurden mit Hilfe der Software POP-LC-Optimizer ausgewertet. Die Software erzeugt aus den Rohdaten ein Chromatogramm für jede Säule, dass bei korrekter Durchführung und Auswertung mit dem tatsächlich gemessenen Gesamt-Ionenstrom übereinstimmen sollte (vgl. Abbildung 9.8).

Geringfügige Abweichungen können selbst bei korrekter Durchführung und Auswertung auftreten, da die Software die Peakgeometrie nur in Form der Bodenzahl in die Simulation der Chromatogramme einbezieht. Alle Peaks erhalten in der Simulation eine Gauß'sche Form. Fronting oder Tailing werden folglich nicht berücksichtigt. Die graphische Darstellung dient lediglich als Kontrolle für den Anwender. Sie beeinflusst die Simulationsergebnisse selbst nicht, ist aber ein Qualitätsmerkmal.

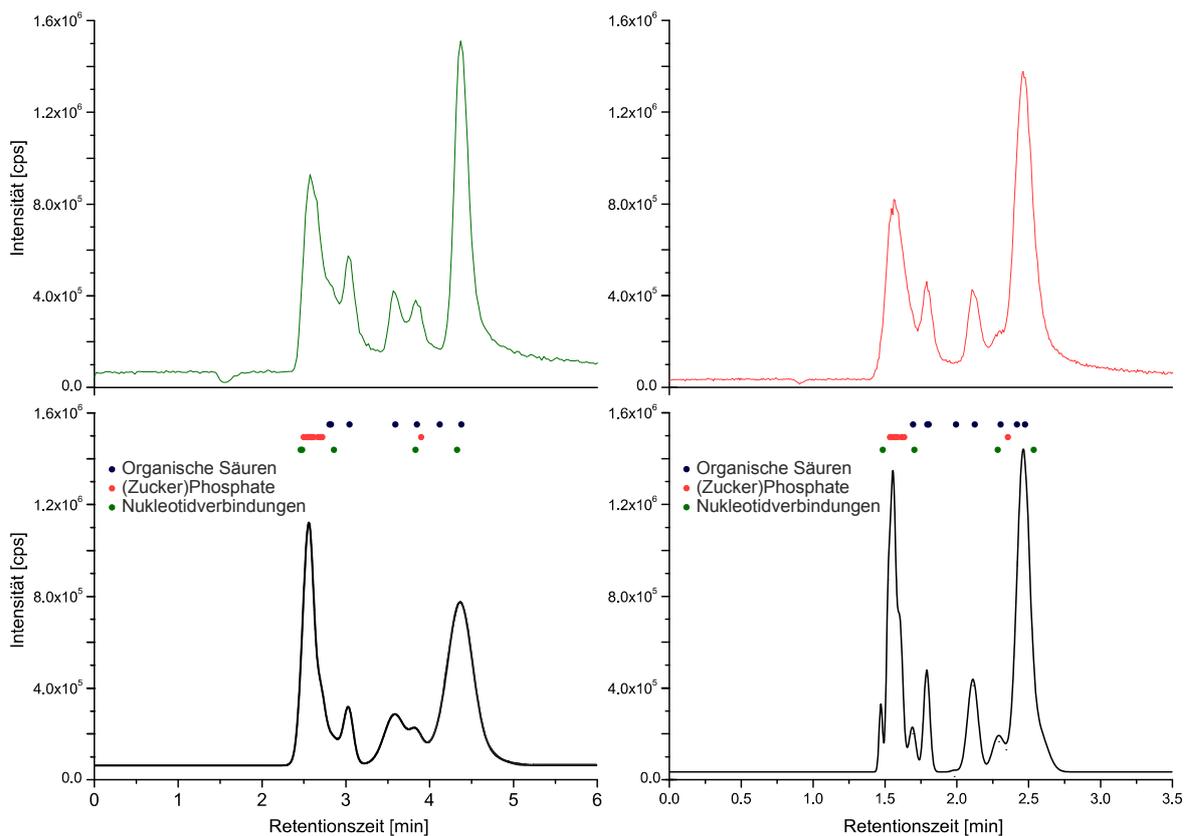


Abbildung 9.8: Simulierte und experimentell erzeugte Chromatogramme des Gesamt-Ionenstroms. Chromatogramme der LC-ESI-MS/MS-Messung eines Standardgemisches (Basic, vgl. Tabelle 9.6) auf einer C18A (oben, links) und einer C18-Säule (oben, rechts), und Chromatogramme, die aufgrund der Retentionsfaktoren, Retentionszeiten, Durchflusszeiten und Bodenzahlen von der Software POP-LC-Optimizer berechnet wurden (unten). Die farbigen Punkte über den simulierten Chromatogrammen kennzeichnen die Retentionszeiten der Metabolite nach Stoffgruppen.

Der Vergleich der Simulationen mit den Messdaten zeigt, dass die Auswertung korrekt durchgeführt wurde. Anhand der Basismessungen wurde mittels Software nach der Kombination von Säulen gesucht, die das bestmögliche Trennergebnis erzielen würde. Laut Software besteht die optimale Säule bei einer Länge von 230 mm aus der in Tabelle 9.8 angegebenen Kombination aus Säulenelementen.

Tabelle 9.8: Kombination von Säulenelementen zur Trennung aller Zielmetabolite aufgrund der Basismessungen des ersten Etablierungszyklus.

Säule	C18A-Säule	C18-Säule	Cyano-Säule	Phenyl-Säule
Länge [mm]	10	40	90	90

Unter den gewählten Analysebedingungen erfolgt die Trennung vor allem aufgrund von π - π -Wechselwirkungen und polarer Selektivität. Die Retention aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen oder strukturellen Unterschieden zwischen den Metaboliten scheint unerheblich zu sein.

Betrachtet man das Chromatogramm der Simulation, ist zu erkennen, dass unter den gegebenen Parametern für keinen der 25 Metabolite eine vollständige Trennung erreicht werden kann (vgl. Abbildung 9.9). Die berechneten Retentionszeiten aller Metabolite sind in Anhang G4 hinterlegt.

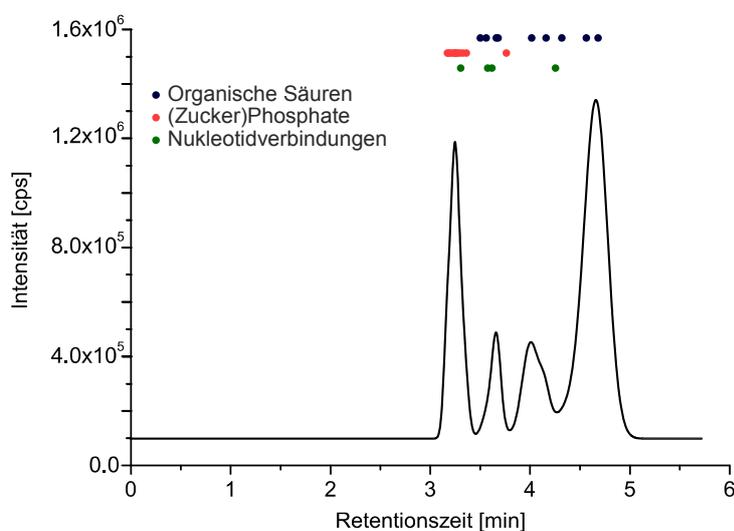


Abbildung 9.9: Simuliertes Chromatogramm für die Trennung aller Zielmetabolite mit der Säulenkombination aus Simulation 1 (vgl. Tabelle 9.8). Die farbigen Punkte über dem Chromatogramm kennzeichnen die Retentionszeit der Metabolite nach Stoffgruppen.

Eine zweite Simulation wurde mit der Zielsetzung durchgeführt eine optimale Säulenkombination für die Trennung von organischen Säuren zu finden. Laut Software besteht die optimale Säule für die Trennung von organischen Säuren bei einer Länge von 250 mm aus den in Tabelle 9.9 angegebenen Säulenelementen.

Tabelle 9.9: Kombination von Säulenelementen zur Trennung von organischen Säuren aufgrund der Basismessungen des ersten Etablierungszyklus.

Säule	C18A-Säule	Cyano-Säule	Phenyl-Säule
Länge [mm]	30	200	20

Wie bei der vorangegangenen Simulation bilden Elemente mit Cyanophase den größten Teil der Säule. Entgegen der obigen Ergebnisse enthält die simulierte Säule zur Trennung organischer Säuren keine Elemente mit klassischer C18 Oberfläche. Es kann daher geschlossen werden, dass hydrophile Wechselwirkungen unter den gewählten Analysebedingungen nicht zur Trennung organischer Säuren genutzt werden können.

Das simulierte Chromatogramm der Trennung zeigt, dass auch für die Trennung von organischen Säuren unter den gegebenen Parametern kein zufriedenstellendes Trennergebnis erzielt werden kann (vgl. Abbildung 9.10). Die berechneten Retentionszeiten aller organischen Säuren sind in Anhang G4 angegeben.

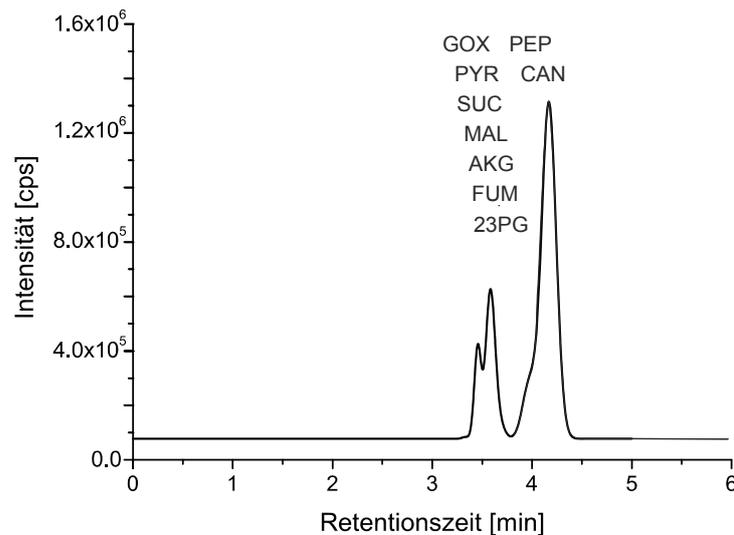


Abbildung 9.10: Simuliertes Chromatogramm für die Trennung von organischen Säuren mit der Säulenkombination aus Simulation 2 (vgl. Tabelle 9.9). Durch Abkürzungen gekennzeichnet sind die berechneten Retentionszeiten von Glyoxylat (GOX), Pyruvat (PYR), Succinat (SUC), Malat (MAL), α -Ketoglutarat (AKG), Fumarat (FUM), 2/3-Phosphoglycerat (23PG), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Cis-Aconitat (CAN).

Aufgrund der schlechten Trennung wurde darauf verzichtet, die Ergebnisse der ersten beiden Simulationen durch reale Messungen zu validieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zur chromatographischen Trennung der Zielmetabolite eine andere Kombination von Rahmenparametern erforderlich ist.

9.2.2 Zweiter Etablierungszyklus

Auf einer 200 mm Phenylsäule wurde für die Parameter, die während der Basismessungen konstant gehalten wurden (prozentualer Anteil an Methanol, Temperatur und Flussrate), nach einer optimalen Kombination gesucht. Das Parameterscreening wurde auf der 200 mm Phenylsäule durchgeführt, weil diese im ersten Etablierungszyklus die besten Trennergebnisse zeigte.

Für das Screening wurden nicht alle verfügbaren Metabolite herangezogen, sondern lediglich Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1-Phosphat, Ribulose-5-Phosphat, Xylulose-5-Phosphat, Ribose-5-Phosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Seduheptulose-7-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat als Vertreter der Zuckerphosphate, AMP und NAD als Vertreter der Nukleotidverbindungen und Cis-Aconitat, Succinat und Fumarat als Vertreter der organischen Säuren. 5 μ m Gemischstandards wurden als Triplikate vermessen.

Die Chromatogramme und graphischen Auftragungen des Parameterscreenings sind auf den Seiten 104 bis 106 gesammelt dargestellt.

Optimierung der Temperatur

Der Einfluss der Temperatur wurde bei einer Eluentzusammensetzung von 70 % Tributylamin 8 mM und 30 % Methanol und einem Fluss von 0.5 ml min^{-1} für 5°C , 20°C , 40°C und 60°C untersucht (vgl. Abbildung 9.11). Eine weitere Erhöhung der Temperatur würde zu einem Verdampfen des Laufmittels führen, eine weitere Erniedrigung kann technisch nicht umgesetzt werden.

Abbildung 9.11 zeigt, dass das gesamte Chromatogramm durch eine Erhöhung der Temperatur zusammengerückt wird. Bei der Auftragung der Retentionszeiten gegen die Temperatur (vgl. Abbildung 9.12) fällt darüber hinaus auf, dass die Retentionszeit für einige Metabolite nahezu linear sinkt.

Betrachtet man die Metabolitgruppen mit einem identischen Massenübergang, so fällt auf, dass unter den gegebenen Parametern auch eine Verringerung der Temperatur auf 5°C nicht zu einer Trennung führt. Die Temperatur scheint als Optimierungsparameter daher wenig geeignet.

Optimierung der Flussrate

Die Flussrate wurde bei einer Eluentzusammensetzung von 70 % Tributylamin 8 mM, 30 % Methanol und einer Temperatur von 20°C für 0.25 , 0.4 , 0.5 und 0.7 ml min^{-1} untersucht. Eine weitere Erhöhung des Flusses führt zu einem Gegendruck, der die physikalische Stabilität der Säule übersteigt. Bei einer weiteren Verringerung des Flusses sind Peaks zu erwarten, die so breit sind, dass sie nicht mehr ausgewertet werden können.

Im Vergleich zur Temperatur ist der Einfluss der Flussrate auf die Peakverteilung nicht linear (vgl. Abbildung 9.13 und 9.14). Eine niedrige Flussrate führt zu einer Verstärkung der Retention, die proportional zur Stärke der Wechselwirkung zwischen Analyt und Säulenmaterial ist. Folglich verbessert sich die Trennung bei niedrigeren Flussraten trotz breiterer Peaks.

Betrachtet man die Metabolitgruppen mit einem identischen Massenübergang so führt unter den gegebenen Parametern auch eine Verringerung des Flusses auf 0.25 ml min^{-1} nicht zu einer Trennung. Während sich die Erniedrigung des Flusses als Optimierungsparameter für die Trennung aller übrigen Metabolite zu eignen scheint, bewirkt sie für Zuckerphosphate keine Verbesserung.

Optimierung des Methanolanteils

Für die Gruppe der Zuckerphosphate wurde aufgrund der schlechten Trennung zusätzlich der Einfluss des Methanolanteils bei einer Eluentzusammensetzung von 8 mM Tributylamin (Endkonzentration), einer Temperatur von 20°C und einem Fluss von 0.25 ml min^{-1} für die Anteile 70 %, 80 % und 90 % H_2O untersucht (vgl. Abbildung 9.15). Eine weitere Verringerung des Methanolanteils wurde bereits im ersten Parameterscreening durchgeführt und daher nicht wiederholt.

Die Chromatogramme zeigen, neben einer deutlichen Veränderung der Retentionszeiten, dass ein Methanolanteil von $< 30\%$ zu einer Antrennung der Metabolite G6P/F6P/F1P, R5P/X5P/Ru5P und GAP/DHAP führt.

Da diese Antrennung das bisher beste Trennergebnis der Metabolite mit identischem Massenübergang darstellte, wurden die Basismessungen des zweiten Etablierungszyklus bei einer Temperatur von 20°C und einem Fluss von 0.25 ml min^{-1} durchgeführt. Für den Eluenten wurde ein Methanolanteil von 20 % bei einer Tributylamin-Konzentration von 8 mM gewählt.

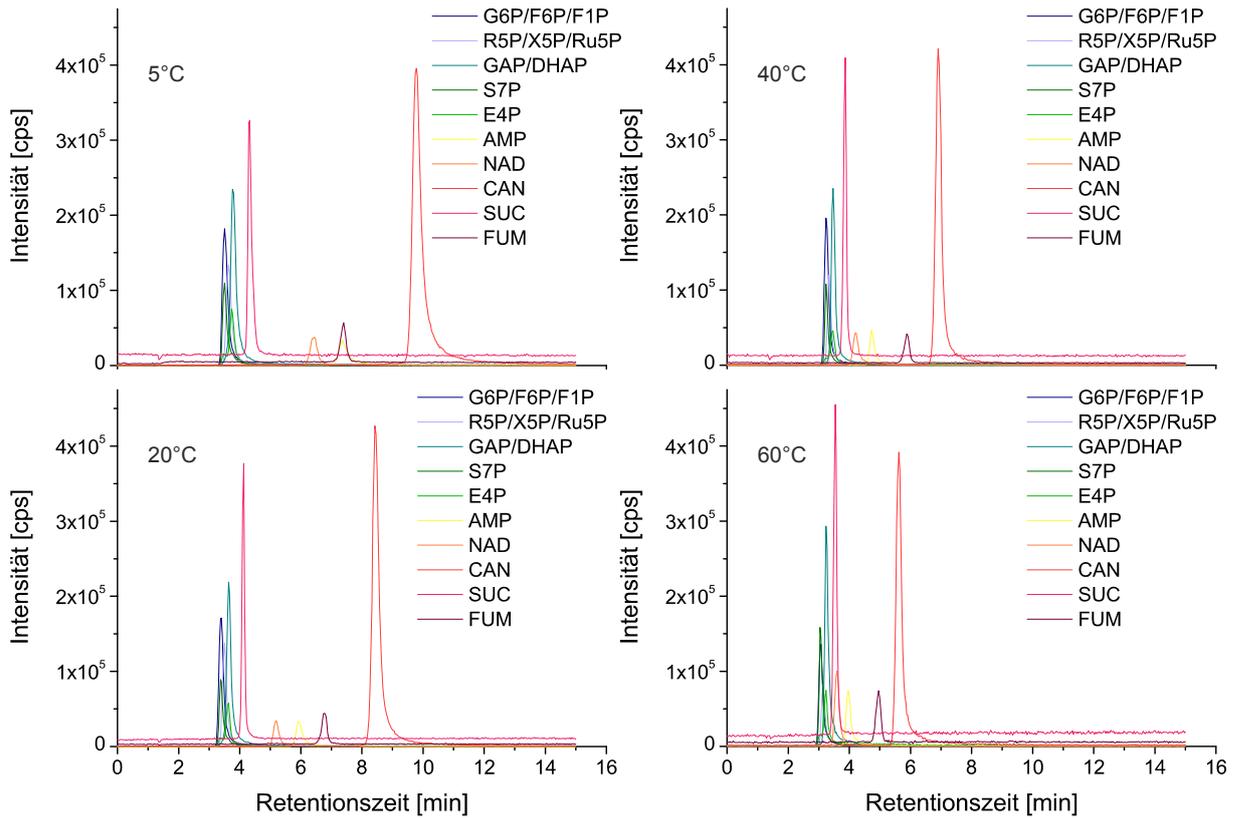


Abbildung 9.11: Chromatogramme der Vermessung eines Gemischtstandards nach der Trennung auf einer 200 mm Phenyl-Säule bei unterschiedlicher Säulentemperatur. MRM-Massenübergänge von Glucose-6-Phosphat/Fruktose-6-Phosphat/Fruktose-1-Phosphat (G6P/F6P/F1P), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat/ Ribose-5-Phosphat (R5P/X5P/Ru5P), Glycerinaldehyd-3-Phosphat/Dihydroxyacetonphosphat (GAP/DHAP), Seduheptulose-7-Phosphat (S7P), Erythrose-4-Phosphat (E4P), AMP, NAD, Cis-Aconitat (CAN), Succinat (SUC) und Fumarat (FUM).

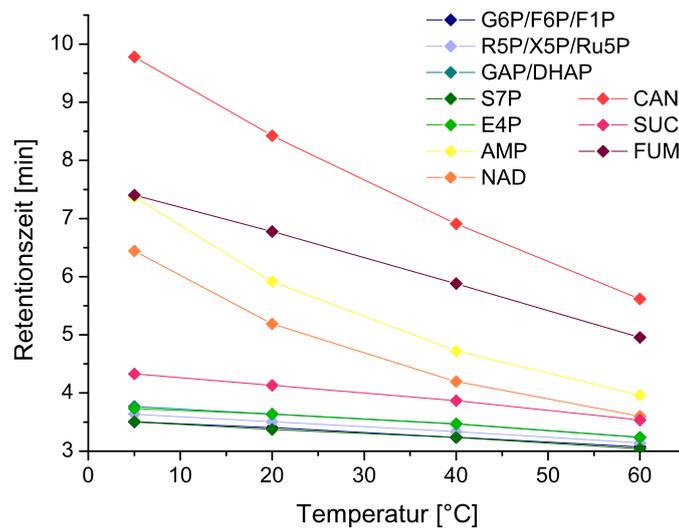


Abbildung 9.12: Verschiebung der Retentionszeit in Abhängigkeit von der Säulentemperatur nach der Trennung auf einer 200 mm Phenyl-Säule. Da die Gruppen G6P/F6P/F1P, R5P/X5P/Ru5P und GAP/DHAP unabhängig von der Temperatur ein identisches Retentionsverhalten zeigten, wurde jeweils nur eine Retentionszeit aufgetragen. Abkürzungen wurden analog zu Abbildung 9.11 verwendet.

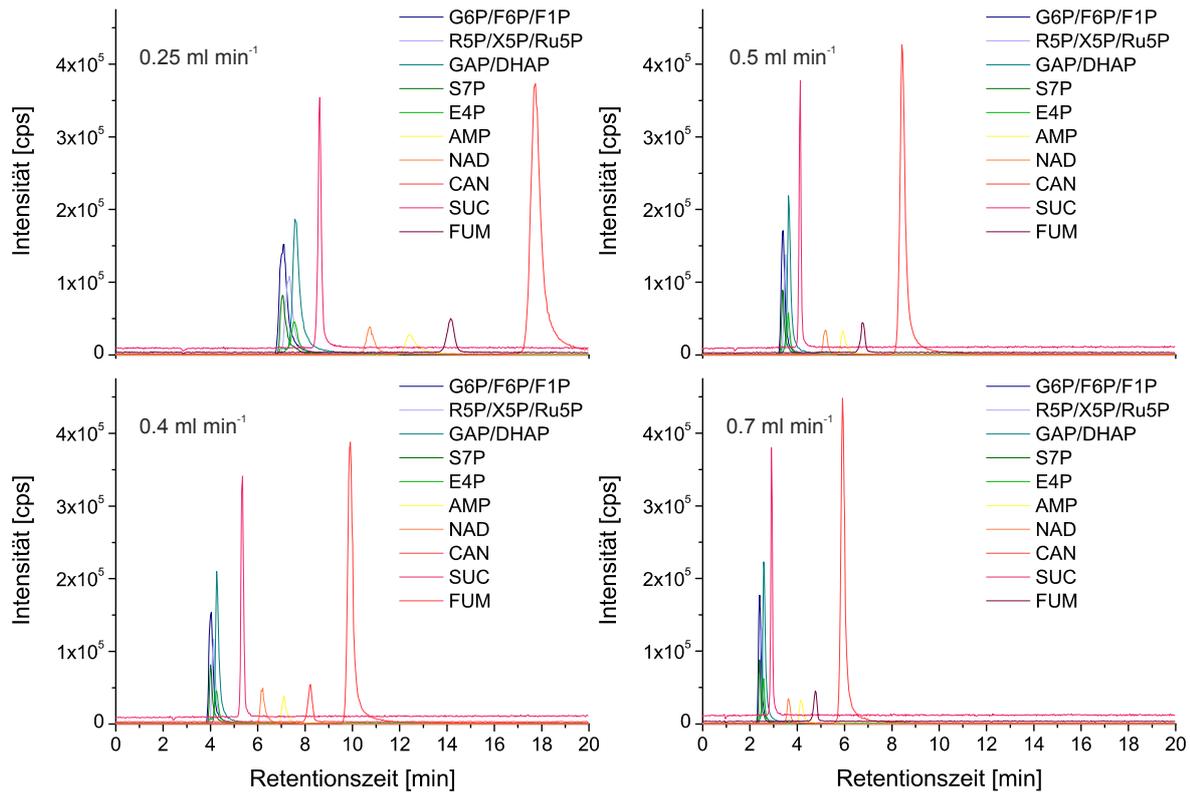


Abbildung 9.13: Chromatogramme der Vermessung eines Gemischtstandards nach der Trennung auf einer 200 mm Phenyl-Säule bei unterschiedlichen Flussraten. MRM-Massenübergänge von Glucose-6-Phosphat/Fructose-6-Phosphat/Fluctose-1-Phosphat (G6P/F6P/F1P), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat/ Ribose-5-Phosphat (R5P/X5P/Ru5P), Glycerinaldehyd-3-Phosphat/Dihydroxyacetonphosphat (GAP/DHAP), Seduheptulose-7-Phosphat (S7P), Erythrose-4-Phosphat (E4P), AMP, NAD, Cis-Aconitat (CAN), Succinat (SUC) und Fumarat (FUM).

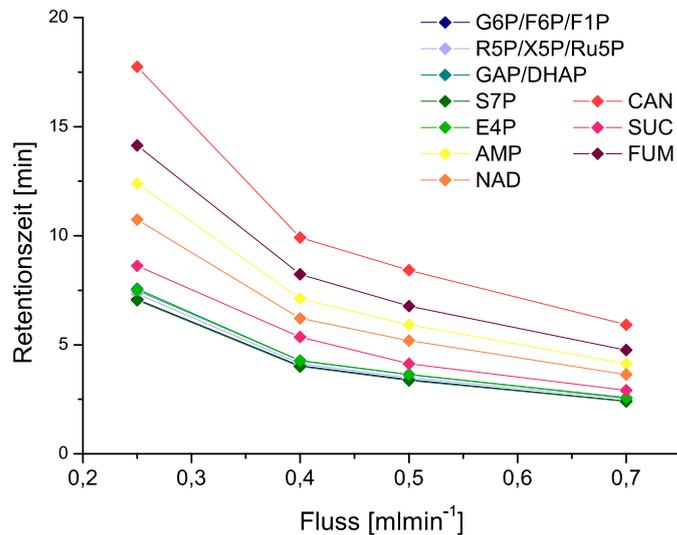


Abbildung 9.14: Verschiebung der Retentionszeit in Abhängigkeit von der Flussrate nach der Trennung auf einer 200 mm Phenyl-Säule. Da die Gruppen G6P/F6P/F1P, R5P/X5P/Ru5P und GAP/DHAP unabhängig von der Temperatur ein identisches Retentionsverhalten zeigten, wurde jeweils nur eine Retentionszeit aufgetragen. Abkürzungen wurden analog zu Abbildung 9.13 verwendet.

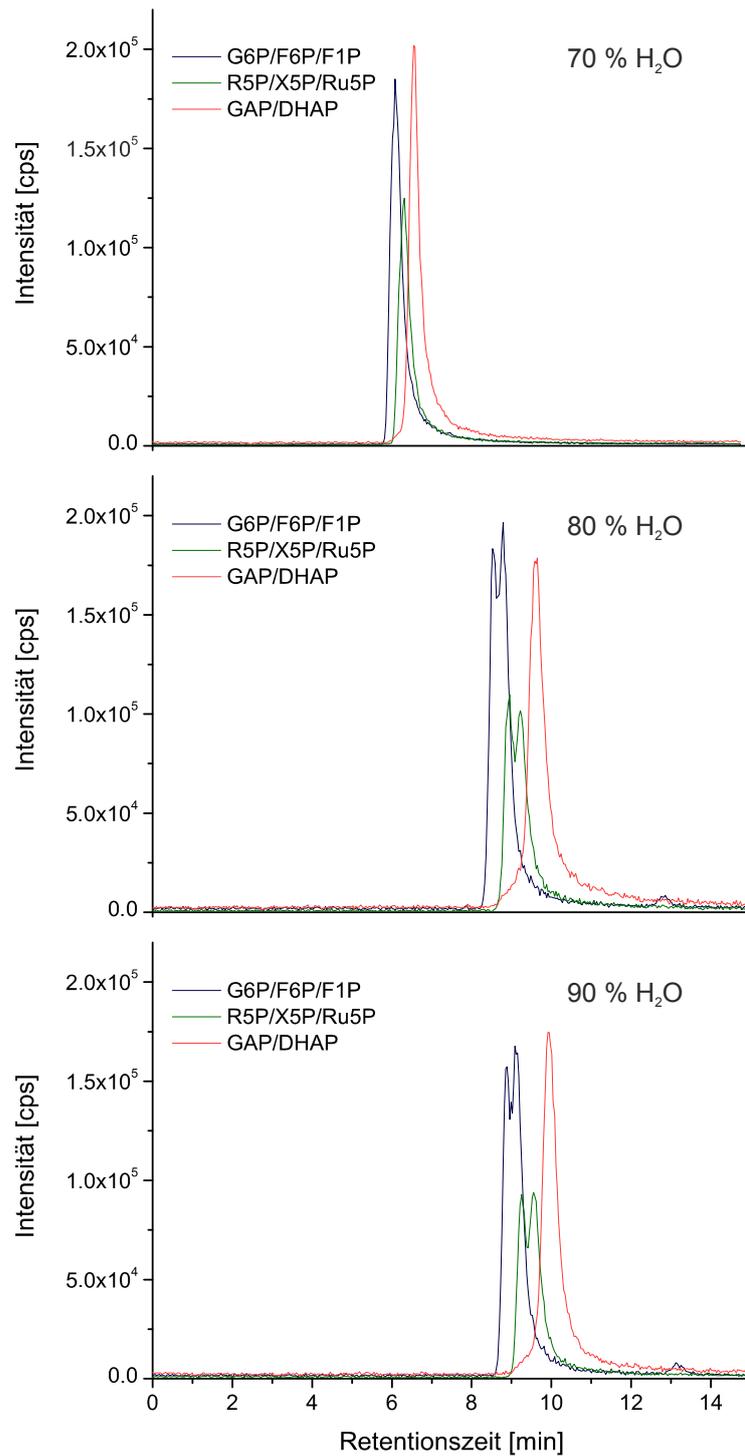


Abbildung 9.15: Chromatogramme der Vermessung eines Gemischtstandards nach der Trennung auf einer 200 mm Phenyl-Säule bei unterschiedlichen Methanolanteilen im Eluenten. MRM-Massenübergänge von Glucose-6-Phosphat/Fructose-6-Phosphat/Fructose-1-Phosphat (G6P/F6P/F1P), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat/ Ribose-5-Phosphat (R5P/X5P/Ru5P) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat/Dihydroxyacetonphosphat (GAP/DHAP)

Berechnung der optimalen Säulenkombination

Die Durchführung der Basismessungen erfolgte nach dem oben erläuterten Protokoll. Da die Metabolite NADP, NADH, NADPH, Fructose-1,6-Bisphosphat und 2/3-Phosphoglycerat nicht in allen Messungen detektiert werden konnten, wurden sie bei der abschließenden Simulation nicht berücksichtigt.

Die Kombination von Säulensegmenten, die aufgrund der wiederholten Basismessungen berechnet wurde, unterscheidet sich von der ersten als optimal angesehenen Säulenkombination (vgl. Tabelle 9.10).

Tabelle 9.10: Kombination von Säulenelementen zur Trennung aller Zielmetabolite aufgrund der Basismessungen des zweiten Etablierungszyklus.

Säule	C18A-Säule	C30-Säule	Cyano-Säule	Phenyl-Säule
Länge [mm]	10	30	190	20

Im Vergleich zur ersten Säulenkombination weist die Zweite auch einen Anteil an C30-Elementen auf, deren Trennleistung auf einer molekularen Formerkennung beruht. Während die π - π -Wechselwirkungen gegenüber den Bedingungen der ersten Etablierungsrunde eine niedrigere Relevanz besitzen, steigt der Anteil an Cyano-Elementen, die über eine polare Selektivität trennen, auf über 2/3 der Säule.

Betrachtet man das simulierte Chromatogramm der optimalen Säulenkombination ist zu erkennen, dass die Trennung gegenüber dem Chromatogramm des ersten Etablierungszyklus in Abbildung 9.9 deutlich verbessert wurde (vgl. Abbildung 9.17).

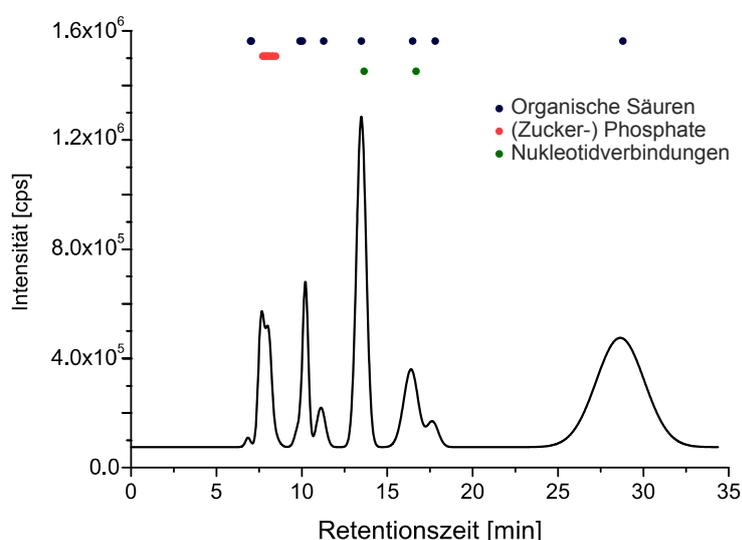


Abbildung 9.17: Simuliertes Chromatogramm für die Trennung aller Zielmetabolite mit der Säulenkombination aus Simulation 3 (vgl. Tabelle 9.10). Die farbigen Punkte über dem Chromatogramm kennzeichnen die Retentionszeit der Metabolite eingeteilt in Stoffgruppen.

Für einige Metabolite, wie Cis-Aconitat, kann eine vollständige Basislinientrennung von allen benachbarten Peaks erreicht werden. Allerdings ist insbesondere die Trennung der Zuckerphosphate im ersten Drittel des Chromatogramms nicht erfolgreich. Die untersuchten Zuckerphosphate eluieren vollständig in einem Zeitfenster von wenigen Sekunden.

Aufgrund ihrer vielfältigen chemischen Eigenschaften scheint eine gleichzeitige Trennung aller Metabolite bei den gewählten Analyseparametern nicht möglich zu sein. Von einer Validierung des

Simulationsergebnisse wurde daher erneut abgesehen. Stattdessen wurde in einer zweiten Simulation die chemische Diversität verringert, indem das Metabolitspektrum auf organische Säuren begrenzt wurde (vgl. Tabelle 9.11).

Tabelle 9.11: Kombination von Säulenelementen zur Trennung von organischen Säuren aufgrund der Basismessungen des zweiten Etablierungszyklus.

Säule	C18-Säule	Cyano-Säule	Phenyl-Säule
Länge [mm]	70	60	70

Die Tatsache, dass der Einsatz von C30-Elementen für die Trennung von organischen Säuren nicht erforderlich ist, deutet darauf hin, dass insbesondere die Phosphatgruppen und Nukleotidderivate zur Selektion aufgrund von molekularer Formerkennung beitragen. Das simulierte Chromatogramm der Trennung zeigt, dass für alle Metabolite, außer Malat und Glyoxylat eine Trennung erreicht werden kann (vgl. Abbildung 9.18).

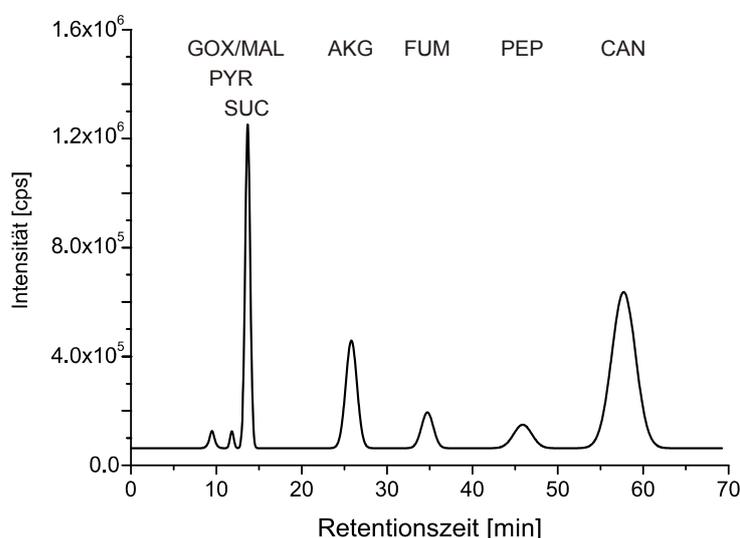


Abbildung 9.18: Simuliertes Chromatogramm für die Trennung von organischen Säuren mit der Säulenkombination aus Simulation 4 (vgl. Tabelle 9.11). Durch Abkürzungen gekennzeichnet sind die berechneten Retentionszeiten von Glyoxylat/Malat (GOX/MAL), Pyruvat (PYR), Succinat (SUC), α -Ketoglutarat (AKG), Fumarat (FUM), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Cis-Aconitat (CAN).

9.3 Validierung

Durch die Messung eines Standardgemisches wurden die Simulationsergebnisse für die Trennung von organischen Säuren überprüft (vgl. Abbildung 9.19). Da Temperatur und Fluss für diese Metabolite die Trennung nicht maßgeblich beeinflussen, sondern lediglich die Retentionszeit verändern, wurden die Überprüfung der Simulation bei einem Fluss von 0.5 ml min^{-1} und einer Temperatur von 60°C durchgeführt. Neben dem Gemischtstandard wurde eine Wasserprobe vermessen, um zu untersuchen, ob die neu etablierte Methode gegenüber der Standardmethode verringerte Störsignale aufweist.

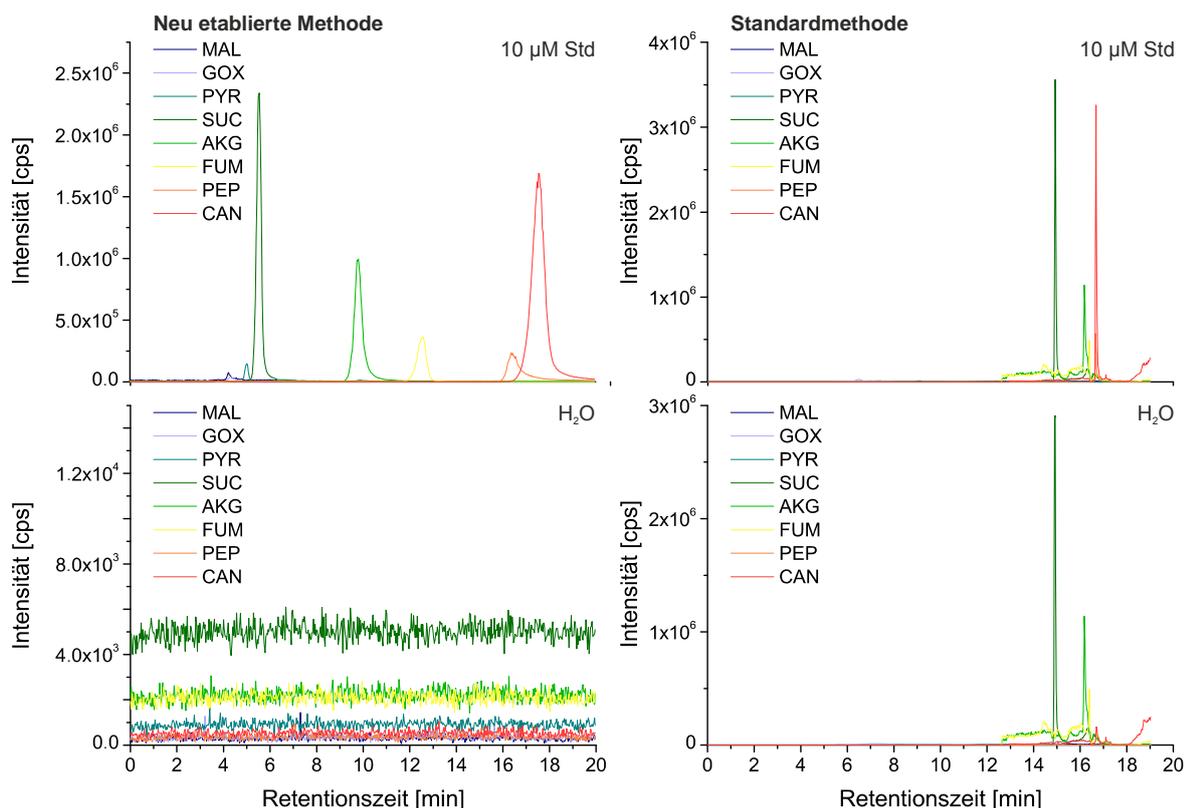


Abbildung 9.19: Chromatogramme der Trennung eines 10 µM Standardgemischs (oben) und einer Wasserprobe (unten) bei Verwendung der neu etablierten Methode (links) und der Standardmethode (rechts). MRM-Massen-übergänge von Malat (MAL), Glyoxylat (GOX), Pyruvat (PYR), Succinat (SUC), α -Ketoglutarat (AKG), Fumarat (FUM), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Cis-Aconitat (CAN).

Obwohl die Retentionszeiten durch die Veränderung von Temperatur und Fluss um einen Faktor von ca. 2.5 verringert wurden, ist zu erkennen, dass die Trennung für alle Metabolite außer Malat und Glyoxylat gelingt. Die Analyten eluieren zudem in der aufgrund der Simulation erwarteten Reihenfolge. Die Trennschärfe ist aufgrund der insgesamt kürzeren Retentionszeiten geringer als die berechnete. Hingegen sind die Bodenzahlen der realen Messung gegenüber der Simulation erhöht, was zu einer insgesamt besseren Auflösung führt.

Die Vermessung von Wasserproben zeigt, dass es beim Einsatz der neu entwickelten Methode nicht zur Detektion von Störpeaks in Wasser kommt.

Reproduzierbarkeit

Um den Einsatz der entwickelten Methode, die nach den Spezifitäten der eingesetzten Säulenkomponenten als CypecATN-Methode bezeichnet wird, für die Analyse realer Proben zu ermöglichen, wurde diese hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Genauigkeit untersucht.

Zunächst wurden 12 Standardreihen (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 µM) über einen Zeitraum von 80 h sukzessive gemessen. Untersucht wurde die Wiederfindung der Metabolite in Bezug auf ihre Retentionszeiten (vgl. Abbildung 9.20) und Peakflächen (vgl. Abbildung 9.21).

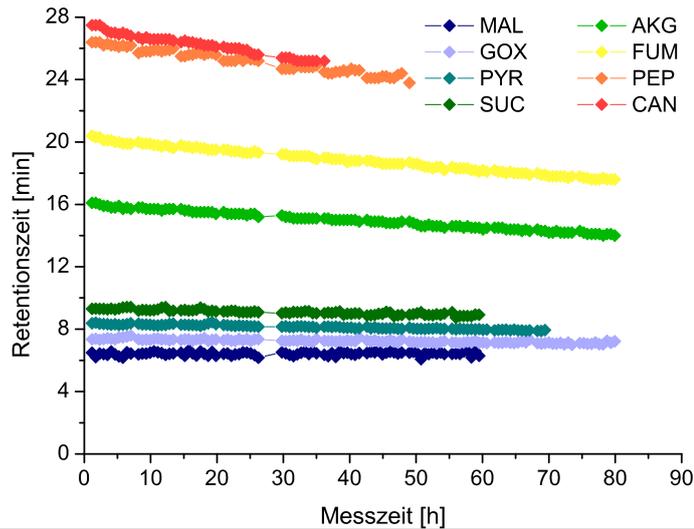


Abbildung 9.20: Retentionszeiten bei wiederholter Messung eines 10 μM Gemischtstandards über einen Zeitraum von 80 h. Mit Malat (MAL), Glyoxylat (GOX), Pyruvat (PYR), Succinat (SUC), α -Ketoglutarat (AKG), Fumarat (FUM), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Cis-Aconitat (CAN). Für die Metabolite CAN, PEP, SUC, PYR und MAL konnte aufgrund der Verschiebung der Retentionszeiten keine vollständige Aufnahme aller Datenreihen erfolgen.

Es ist zu erkennen, dass die Retentionszeit mit steigender Probenzahl sinkt. Die Verringerung der Retentionszeit ist erwartungsgemäß für die Analyten mit der höchsten Retentionszeit am größten und liegt für Cis-Aconitat bei 0.23 % pro Stunde, bezogen auf die Ausgangsretentionszeit. Für die wenig retardierten Analyten, die im ersten Drittel des Chromatogramms eluieren, ist die Verringerung der Retentionszeit sehr gering und liegt z.B. für Glyoxylat bei 0.05 % pro Stunde bezogen auf die Ausgangsretentionszeit.

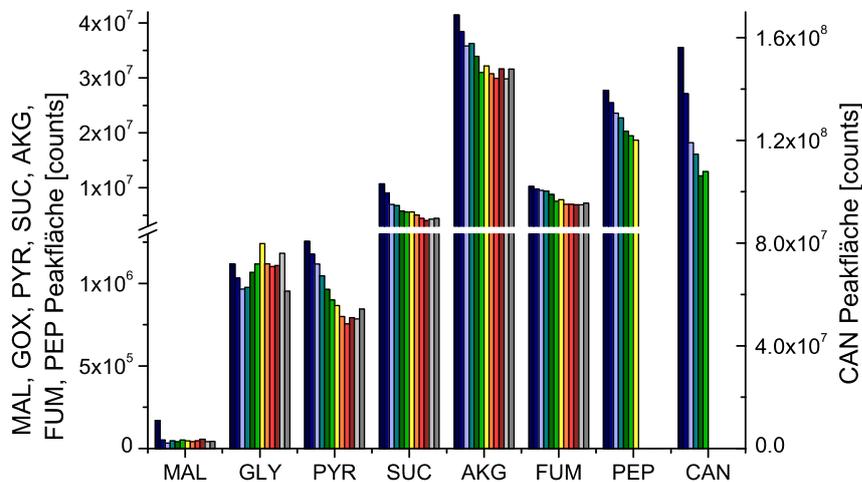


Abbildung 9.21: Signalintensität bei wiederholter Messung eines 10 μM Gemischtstandards über einen Zeitraum von 80 h. Mit Malat (MAL), Glyoxylat (GOX), Pyruvat (PYR), Succinat (SUC), α -Ketoglutarat (AKG), Fumarat (FUM), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Cis-Aconitat (CAN). Für die Metabolite CAN, PEP, SUC, PYR und MAL konnte aufgrund der Verschiebung der Retentionszeiten keine vollständige Aufnahme aller Datenreihen erfolgen.

Die Auftragung der absoluten Peakflächen zeigt, dass die Intensitäten der Signale mit der Zeit sinken. Anhand der Daten kann nicht entschieden werden, ob es sich bei der Verringerung des Signals um eine verringerte Detektion oder um einen tatsächlichen Zerfall der Metabolite handelt.

Sollte dies der Fall sein, ist davon auszugehen, dass die Verringerung der Peakintensität durch den Einsatz eines internen Standards korrigiert werden kann.

Nutzt man die erzeugten Daten zur Erstellung von Standardreihen, zeigt sich die sinkende Peakintensität in der Steigung der resultierenden Geraden. Betrachtet man hingegen die Korrelationsfaktoren der Standardgeraden, liegen diese für alle Messreihen über 0.99. Unter der Annahme, dass die Verringerung der Peakflächen zu den obigen Effekten führen und diese durch den Einsatz eines internen Standards korrigiert werden können, zeigt die entwickelte Methode eine hinreichenden Reproduzierbarkeit. Im Anhang G5 sind beispielhaft die Steigungen und Korrelationskoeffizienten der 12 Standardreihen für die Metabolite Pyruvat und Fumarat gezeigt, wobei für alle Standardreihen Konzentrationswerte zwischen 0.5 und 25 μM genutzt wurden.

Apparative Optimierung

Da sich das für die Etablierung eingesetzte Stecksystem von Säulenteilen nicht für den Standardmessbetrieb eignet, wurde die Firma CS Chromatographie damit beauftragt, eine Säule herzustellen, die sich zu den oben ermittelten Anteilen aus den drei ermittelten Säulenspezifitäten zusammensetzt. Zur weiteren Erhöhung der Trennschärfe wurde die Größe der Säulenpartikel von 5 μm auf 3 μm verringert.

Mit der erhaltenen Säule wurden Standardreihen unter Einsatz eines internen Standards gemessen (vgl. Abbildung 9.22).

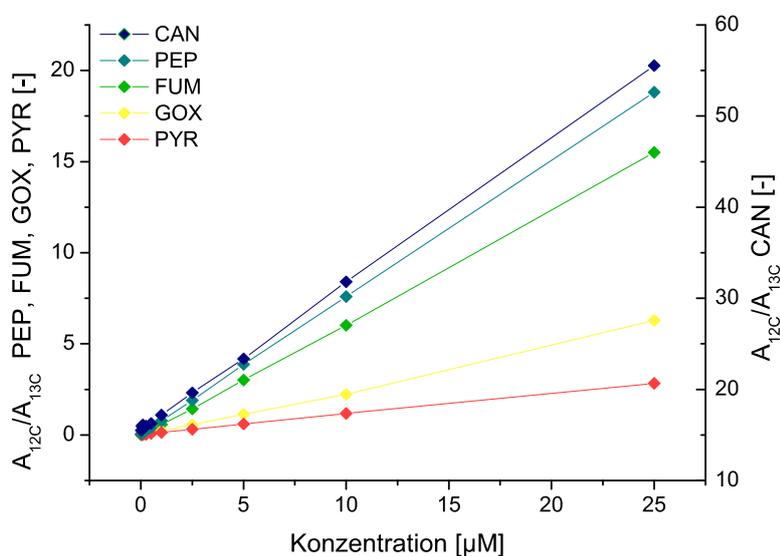


Abbildung 9.22: Messung von Standardgeraden unter Verwendung der neu entwickelten CyphecATN-Methode und eines internen Standards. Peakflächenverhältnisse (A_{12c}/A_{13c}) von Cis-Aconitat (CAN), Phosphoenolpyruvat (PEP), Fumarat (FUM), Glyoxylat (GOX) und Pyruvat (PYR).

Die erzeugten Korrelationsgeraden aller untersuchten organischen Säuren zeigen eine konstante Steigung und besitzen Korrelationskoeffizienten > 0.99 .

9.4 Fazit Analytik

Im vorangegangenen Kapitel konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz der IDMS es ermöglicht, quantitative Analysen in komplexen Matrices durchzuführen. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die IDMS einen eingeschränkten linearen Messbereich besitzt und Kriterien ermittelt, welche die Definition dieses Bereiches ermöglichen.

Der lineare Messbereich ist dabei gleichzusetzen mit dem Konzentrationsbereich, indem die Ionenquelle des Massenspektrometers nicht abgesättigt ist. Im Sättigungsbereich der Ionenquelle kann der IDMS nicht zur Korrektur genutzt werden, da gezeigt wurde, dass ^{12}C - und ^{13}C -Metabolite in diesem Bereich nicht in gleicher Weise ionisiert werden.

Neben der Einschränkung der Messbereichs konnten der Einsatz eines technisch erzeugten internen Standards, die Anpassung des Methanolanteils und die Verbesserung der chromatographischen Trennung als Optimierungsparameter identifiziert werden.

Da eine Verbesserung der bestehenden Chromatographie für organische Säuren nicht möglich war, wurde mit Hilfe des Systems POP-LC eine neuartige chromatographische Methode entwickelt und validiert.

10. Fehlerfortpflanzung und Anwendung

Wie unter 3.1.7 beschrieben, beeinflussen alle während einer Probengenerierung potentiell auftretenden Fehler die Qualität einer Analyse und die Belastbarkeit der resultierenden Daten erheblich. Bei der Generierung von Metabolomdaten ist die Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung von besonderem Interesse, weil in die Berechnung der intrazellulären Daten bis zu 10 fehlerbehaftete Größen einfließen können. Dies macht deutlich, warum die mehrfache Durchführung eines Teilschritts, die Berechnung des Mittelwerts und der Streuung dieser Mehrfachanalyse den Gesamtfehler des finalen Konzentrationswertes nicht abdecken kann. Zudem wird klar, dass die Komplexität der experimentellen Arbeitsabläufe, methodischen Ansätze und mathematischen Bilanzierungen die Betrachtung der Fehlerfortpflanzung ohne eine geeignete Softwareunterstützung unmöglich macht.

Im folgenden Kapitel wurde untersucht, wie die konsequente Einbeziehung aller Messfehler die Aussagen und Interpretationen von Metabolomdaten beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die systematischen (soweit möglich) und zufälligen Fehler aller Arbeitsschritte bestimmt und in ein mathematisches Modell des optimierten Probenahmeprotokolls integriert. Das mathematische Modell wurde von J. Tillack (Forschungszentrum Jülich, IBG-1: Biotechnologie 2) im Rahmen ihre Promotion erstellt und in Kooperation an die Anforderungen der experimentellen Arbeit angepasst.

Da die Verbesserung der Datenprozessierung den letzten Schritt der Optimierung des Protokolls zur Generierung von Metabolomdaten darstellt, wurde im zweiten Teil des Kapitels eine vergleichende Metabolomanalyse von vier *C. glutamicum* Stämmen durchgeführt. Diese diente gleichermaßen der Validierung des Fehlerfortpflanzungsmodells sowie des gesamten Optimierungsprozesses.

10.1 Fehlerbehaftete Messgrößen und Fehlermodell

Für die Berechnung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen, die nach dem optimierten Protokoll (vgl. Abschnitt 4.5.2) generiert wurden, werden 10 experimentelle Messwerte benötigt. Dabei handelt es sich um fünf Volumina, drei Konzentrationswerte sowie um Steigung und Ordinatenabschnitt der externen Kalibrationsgerade, die zur Bestimmung der Konzentrationen verwendet wird (vgl. Abbildung 10.1).

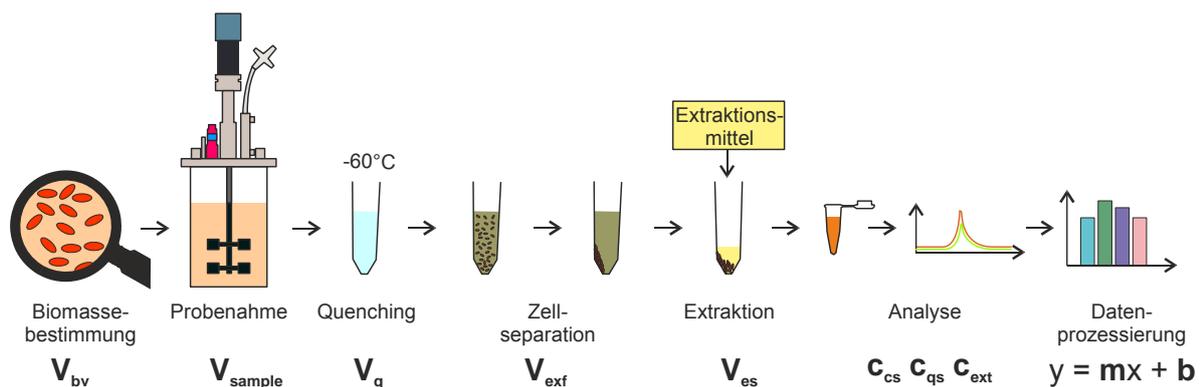


Abbildung 10.1: Schematische Darstellung der Fehlerfortpflanzung bei der Metabolomanalyse. Mit Biovolumen (V_{bv}), Probevolumens (V_{sample}), Volumen an Quenchinglösung (V_q), extrazelluläre Restflüssigkeit (V_{extf}), Volumen an Extraktionsmittel (V_{es}), Konzentration des Kulturüberstandes (c_{cs}), Konzentration des Quenchingüberstandes (c_{qs}), Konzentration des Extraktes (c_{ext}) und Steigung und Ordinatenabschnitt der externer Kalibrationsgerade (m und b).

Bezüglich der Volumen- und Pipettierfehler, der analytischen Fehler bei der Messung von Standards und den daraus resultierenden Fehlern der Regressionsgerade, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Fehler handelt, die für ein gegebenes experimentelles Setup (Labor, Experimentator, Analyseprotokoll) konstant sind.

Der Fehler, der durch diese Größen eingetragen wird, wurde einmalig mit einer hohen Zahl an Replikaten bestimmt und im Folgenden als bekannt angenommen (vgl. Tabelle 10.1). Die Fehler aller übrigen Werte müssen in jeder Analyse separat über die Untersuchung von Replikaten ermittelt werden. Details der Fehlerbestimmung sind in Anhang H1 angegeben.

Tabelle 10.1: Fehlerbehaftete Messgrößen bei der Generierung von Metabolomdaten. Zufällige und z.T. systematische Fehler, die nach den in Anhang H1 beschriebenen Methoden für eine Metabolomanalyse von *C. glutamicum* DM 1800 ermittelt wurden. n.b. = nicht bestimmbar.

Prozessgröße	Sollwert	Messwert	systematische Abweichung [%]	zufällige Abweichung [%]
V_{sample}	2000 [μl]	1912.73 ± 15.28 [μl]	- 4.36	± 0.80
V_{qs}	7500 [μl]	7736.21 ± 60.19 [μl]	+ 3.15	± 0.78
V_{es}	2500 [μl]	2541.13 ± 32.53 [μl]	+ 1.65	± 1.27
A_{std5_12C}	—	1.64*10 ⁶ ± 7.25*10 ⁵ [cps]	n.b.	± 4.42
A_{std5_13C}	—	6.18*10 ⁶ ± 9.94*10 ⁴ [cps]	n.b.	± 1.61
A_{std1_12C}	—	6.94*10 ⁶ ± 4.30*10 ⁵ [cps]	n.b.	± 6.19
A_{std1_13C}	—	6.24*10 ⁶ ± 1.29*10 ⁵ [cps]	n.b.	± 2.06
$A_{std0.25_12C}$	—	4.29*10 ⁶ ± 1.67*10 ⁵ [cps]	n.b.	± 3.91
$A_{std0.25_13C}$	—	6.63*10 ⁶ ± 6.48*10 ⁴ [cps]	n.b.	± 1.02

Die Betrachtung der einzelnen Prozessgrößen zeigt, dass keine von ihnen mit einer zufälligen Abweichung behaftet ist, die über 10 % liegt. Gleichzeitig lässt sich daraus ableiten, dass der Gesamtfehler bei der Generierung von Metabolomdaten zu vergleichbaren Teilen aus den Einzel Fehlern aller Arbeitsschritte resultiert. Dies zeigt, dass nur die Optimierung aller Arbeitsschritte in Summe zu einer signifikanten Verbesserung von Messdaten genutzt werden kann.

Zur automatischen Berechnung der Fehlerfortpflanzung wurde der vollständige Prozess der Probengenerierung, Analytik und Bilanzierung mit Hilfe der Software Matlab (MathWorks Inc.) abgebildet. Das resultierende Script ist in der Lage, unter Anwendung verschiedener Algorithmen (z.B. lineare Regression, Monte-Carlo-Simulation), fehlerbehaftete Größen nach zuvor generierten Berechnungsvorschriften und unter vollständiger Berücksichtigung systematischer und zufälliger Fehler zu verarbeiten.

Mit Hilfe des Fehlermodells ist es zum einen möglich, den Gesamtfehler bei der Messung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen zu bestimmen. Andererseits kann es auch dazu genutzt werden, den Einfluss von Leakage und dessen Korrektur zu untersuchen und intrazelluläre Konzentrationswerte unter Einbeziehung oder Vernachlässigung des Effektes miteinander zu vergleichen. Da die Modellierung und Simulation nicht Teil dieser Arbeit waren, wird an dieser Stelle auf die Promotion von J. Tillack verwiesen.

10.2 Vergleichende Metabolomanalyse

Zur Validierung des optimierten Protokolls zur Generierung von Metabolomdaten sollte dieses auf eine biologische Fragestellung angewendet werden. Dabei war es erforderlich, dass bereits vor der Metabolomanalyse eine konkrete Erwartungshaltung gegenüber dem Ergebnis der Analyse bestand, um den Erfolg der Optimierung beurteilen zu können.

Aus diesem Grund wurde zur Validierung eine vergleichende Metabolomanalyse der vier *C. glutamicum*-Stämme DM 1800, DM 1800'A16, DM 1800'L1 und DM 1800'C7 durchgeführt. Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, handelt es sich bei den Stämmen um einen Lysinproduzenten und drei von diesem Stamm ausgehende Mutanten. Die Mutanten wurden im Rahmen der Dissertation von J.v.Ooyen (Forschungszentrum Jülich, IBG-1: Biotechnologie 1) erzeugt (van Ooyen 2010). Ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ein Vergleich der Stämme auf Metabolomebene, wobei die Aussagekraft durch den hohen Fehler der resultierenden Daten stark reduziert wurde.

Die Wiederholung der Analyse unter Anwendung des optimierten Protokolls sollte dazu genutzt werden, belastbare und absolute Konzentrationsdaten für den Metabolomvergleich zu generieren. Zudem sollten aus dem Vergleich der bereits veröffentlichten Daten mit den neu zu erhebenden Rückschlüsse auf die Funktionalität des optimierten Protokolls gezogen werden.

10.3.1 Prozesscharakterisierung

Um vergleichbare Ausgangssituationen für alle Analysen zu schaffen, wurde zunächst ein Setup von Prozessparametern etabliert, das für alle vier Stämme zu einer vergleichbaren Steuerung von pH und pO_2 genutzt werden kann (vgl. Abbildung 10.2). Einzelheiten des Setups sind in Abschnitt 4.1.4 ausführlich beschrieben.

Anhand der im Kultivierungsverlauf aufgezeichneten absoluten Zellzahlen wurden die Wachstumsraten der einzelnen Stämme bestimmt. Die in Tabelle 10.2 angegebenen Wachstumsraten decken sich im Trend mit den Literaturdaten (Van Ooyen 2010). Diese Übereinstimmung stellt die Grundvoraussetzung dafür dar, dass die mit dem gegebenen Setup generierten Daten mit den bereits veröffentlichten verglichen werden können. Die Abweichungen der Daten, insbesondere bei der Untersuchung von *C. glutamicum* DM 1800'L1, sind damit zu begründen, dass die Kultivierungen im Rahmen dieser Arbeit unter kontrollierten Prozessbedingungen in einem Bioreaktor durchgeführt wurden, während die Vergleichsdaten aus Schüttelkolbenkulturen stammen.

Tabelle 10.2: Wachstumsraten von *C. glutamicum* DM 1800 und Mutanten. Vergleich von Literaturdaten mit Bestimmungen der vorliegenden Arbeit

<i>C. glutamicum</i>	DM 1800	DM 1800'A16	DM 1800'L1	DM 1800'C7
Wachstumsrate, van Ooyen [h^{-1}]	0.39	0.37	0.27	0.24
Wachstumsrate, diese Arbeit [h^{-1}]	0.37	0.35	0.34	0.28

Aufgrund der Prozessdaten wurde der Probenahmezeitpunkt für die vergleichende Analyse der vier Stämme in das hintere Drittel der exponentiellen Wachstumsphase gelegt. Die Größenverteilung innerhalb der Kulturen deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt morphologisch weitgehend homogene Populationen vorliegen, was die Vergleichbarkeit der einzelnen Analysen weiter erhöhen sollte.

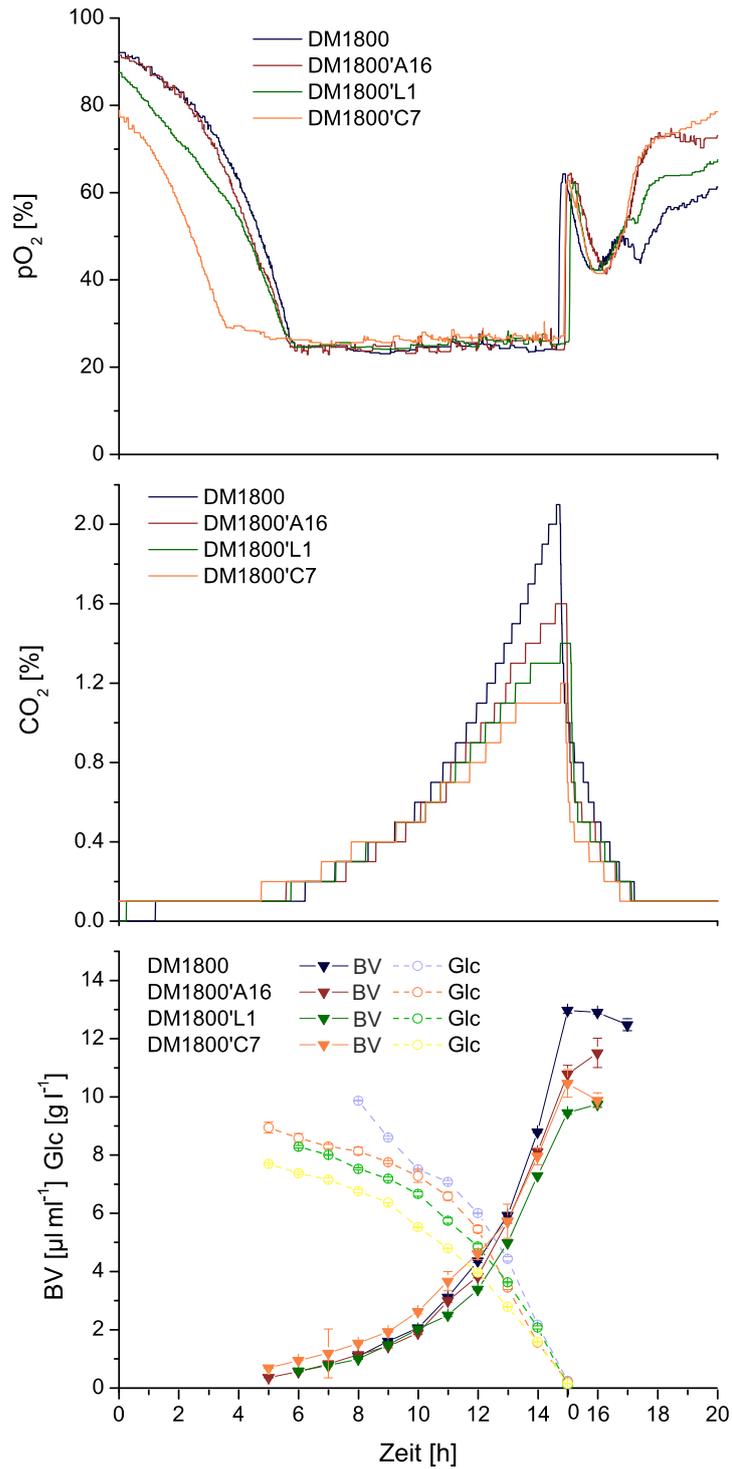


Abbildung 10.2: Prozessdaten von vier parallelen Batchkultivierungen der Stämme *C. glutamicum* DM 1800, DM 1800'A16, DM 1800'L1 und DM 1800'C auf Minimalmedium mit einer Ausgangskonzentration von $10 g l^{-1}$ Glucose. Mit dem Sauerstoff-partialdruck (pO_2), dem prozentualen Massenanteil an CO_2 in der Abluft (CO_2), der optischen Dichte (OD), dem Biovolumen (BV) und der Glucosekonzentration (Glc).

10.3.2 Intrazelluläre Konzentrationen

Die Probengenerierung, Analyse und Bilanzierung erfolgte unter Einhaltung aller im Verlauf der Arbeit umgesetzten Optimierungen nach dem in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Protokoll. Das Probenahmevolumen betrug, aufgrund der aus den Voruntersuchungen bekannten Biomassekonzentration, zum Probenahmezeitpunkt 5 ml woraus sich ein Biovolumen von mindestens 10 μl in jedem Zellpellet ergeben sollte. Aufgrund der unterschiedlichen Biomassekonzentrationen zum Zeitpunkt der Probenahme variierte das Biovolumen im Pellet geringfügig. Um das Verhältnis von Extraktionsmittel zu Biovolumen in allen Ansätzen identisch zu halten, wurde das Extraktionsmittelvolumen unmittelbar an das Biovolumen jedes Pellets angepasst. Das mittlere Biovolumen in den Pellets der vier Stämme und die Volumen an Extraktionsmittel sind in Anhang H2 hinterlegt.

Das Spektrum der Analyse umfasste die Metabolite der Glykolyse, des Pentosephosphat-Wegs und des Zitronensäurezyklus, sowie freie Aminosäuren, Energiemetabolite und Redoxäquivalente. Eine Auswahl der generierten Daten ist in Abbildung 10.3 dargestellt. Eine vollständige Darstellung aller Daten ist in Anhang H2 zu finden.

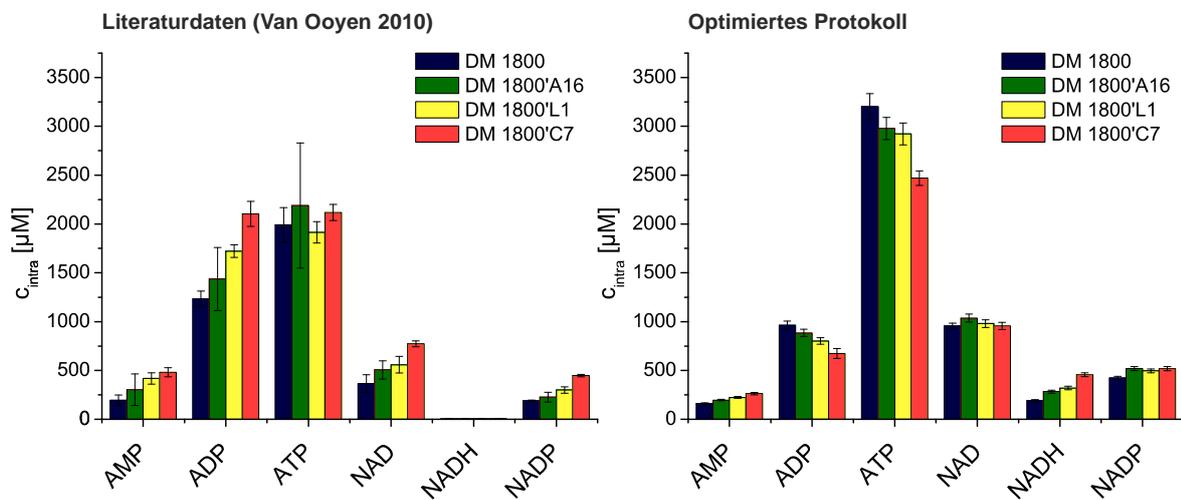


Abbildung 10.3: Vergleich intrazellulärer Metabolomdaten auf Basis von Literaturdaten (Van Ooyen 2010) (links) und mittels des optimierten Protokolls generierte Daten (rechts).

Anhand der Daten ist zu erkennen, dass die neu generierten Werte sich nicht nur in ihrer Höhe, sondern zum Teil auch in ihrem Trend von den Literaturdaten unterscheiden. Da es nicht Ziel dieser Arbeit ist eine biologische Interpretation der metabolischen Unterschiede zwischen den vier Stämmen durchzuführen, soll an dieser Stelle aber nicht weiter auf die Daten eingegangen werden.

10.3 Fazit Fehlerfortpflanzung und Anwendung

Im vorhergegangenen Kapitel konnte das optimierte Standardprotokoll zur Generierung von Metabolomdaten vollständig in einem mathematischen Modell abgebildet werden. Systematische (soweit möglich) und zufällige Fehler aller Arbeitsschritte wurden bestimmt und in das Modell integriert. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Gesamtfehler der Metabolomanalyse nicht aus wenigen, stark fehlerbehafteten Arbeitsschritten entsteht, sondern aus der Akkumulation vieler kleiner Fehler, die von allen Arbeitsschritten in nahezu gleichem Maße beigetragen werden.

Mit dem skriptbasierten Fehlermodell wurde eine semi-automatische Methode zur Bilanzierung von Konzentrationswerten geschaffen, welche zur Auswertung unmittelbar auf die Rohdaten der LC-ESI-MS/MS-Analytik zurückgreift und damit eine erhebliche Arbeitserleichterung darstellt.

Anhand einer vergleichenden Metabolomanalyse wurde gezeigt, dass die Optimierung des Protokolls zur Generierung von intrazellulären Metabolomdaten erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Die erzeugten Daten besitzen gegenüber den Referenzwerten (Literaturquelle) deutlich verringerte Standardabweichungen, was die Funktionalität der ausgewählten Methoden für jeden Arbeitsschritt und die durchgeführten Einzeloptimierungen bestätigt. Zudem ermöglicht die konsequente Einbeziehung aller Messfehler eine Aussage über den Konfidenzbereich jedes Konzentrationswertes, was die Belastbarkeit dieser Daten für biologische Interpretationen weiter steigert.

11. Automatisierungskonzept

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass die Metabolomanalyse notwendig mit einem hohen manuellen Aufwand verbunden ist. Dieser Aufwand begrenzt die Beprobungsfrequenz und birgt darüber hinaus die Gefahr des Eintrags manueller Fehler.

Wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben ist, wurde in den vergangenen Jahren mit hohem Aufwand an der Umsetzung schneller Probenahmesysteme geforscht. Viele der Systeme bieten hervorragende technische Lösungen für ein spezifisches Problem, berücksichtigen aber nicht den komplexen Zusammenhang der einzelnen Arbeitsschritte der Generierung von Metabolomdaten.

Im Folgenden Kapitel sind zunächst am Beispiel eines etablierten Systems zur schnellen Probenahme die Anforderungen beschrieben, die ein Automatisierungskonzept zur Metabolomanalyse erfüllen muss.

Im zweiten Teil des Kapitels wird, ausgehend von diesen Anforderungen, ein Konzept zur Automatisierung erstellt. Da nicht alle Einzelkomponenten des Systems käuflich zu erwerben sind, wurden für das integrierte Quenching und die Zellseparation eigene Lösungen entwickelt.

Der dritte Teil des Kapitels zeigt die konzeptionelle Umsetzung der etablierten und neu entwickelten Komponenten zu einem funktionellen System zur automatischen Probenahme.

11.1 Ist- und Soll-Analyse

Im Folgenden ist das 1999 im Journal of Analytical Biochemistry veröffentlichte System von U.Schäfer aus dem Forschungszentrum Jülich beschrieben (vgl. Abbildung 11.1).

Hauptkomponente des Systems bildet ein Magazin aus beweglichen, mit Probenahmegefäßen bestückten Schlitten. Diese werden unter dem geöffneten Probenahmeventil am Boden eines Reaktors bewegt und dabei sukzessive befüllt. Triebkraft der Probenahme stellt der im Reaktor vorhandene Überdruck dar. Das Volumen, das in die einzelnen Probenahmegefäße gelangt, ist folglich abhängig von deren Verweilzeit unter dem geöffneten Ventil. Zur Inaktivierung des Stoffwechsels werden die Probenahmegefäße vor der Probenahme mit einem definierten Volumen an -60°C kalter Quenchinglösung gefüllt. Nach der Probenahme werden die Probenahmegefäße manuell verschlossen. Die Zellabtrennung erfolgt in Gruppen von sechs Proben mittels Zentrifugation.

Abhängig vom Probenvolumen kann das System eine Probenfrequenz von bis zu zwei Proben pro Sekunde erreichen. Das Probenvolumen ist aufgrund der standardisierten Probengefäße auf Volumen zwischen 5 und 10 ml beschränkt und kann in einem Satz von Proben nicht variiert werden.

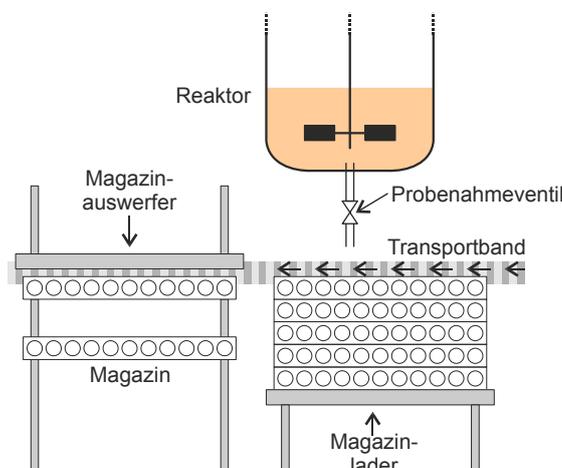


Abbildung 11.1: System zur schnellen Probenahme nach Schäfer. Modifiziert nach Oldiges (Oldiges 2005).

Aufgrund der technischen und analytischen Weiterentwicklung genügt das oben beschriebene System aus mehreren Gründen nicht mehr den Anforderungen:

- Das Quenching erfolgt, wie bei der manuellen Probenahme, in einem Probenahmegefäß ohne aktive Mischung von Quenchinglösung und Probe. Da das Misch- und Abkühlverhalten beider Lösungen nie detailliert betrachtet wurde, können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob es bei der Mischung zu Inhomogenitäten oder Temperaturverteilungen innerhalb der Probe kommt. Sollten diese Phänomene auftreten, wäre eine inhomogene Inaktivierung der Zellen in der Probe die Folge. Die metabolischen Daten wären damit erheblich verfälscht.
- Das Probenvolumen ist abhängig von einem konstanten und definierten Überdruck im Kultivierungssystem. Da der Überdruck eine schlecht zu reproduzierende und schlecht zu regelnde Prozessgröße darstellt, ist anzunehmen, dass das Probenvolumen von einem experimentellen Ansatz zum nächsten variiert. Darüber hinaus besteht nicht die Möglichkeit den Überdruck nach einmaligem Öffnen des Systems im Verlauf der Beprobung konstant zu halten. Es ist daher davon auszugehen, dass das Probenvolumen im Verlauf einer Reihe von Proben aufgrund des sinkenden Überdrucks ebenfalls abnimmt.
- Aufgrund der nicht untersuchten Mischkinetik ist nicht bekannt, ob das Verhältnis von Quenchinglösung zu Probe optimal bzw. minimal gewählt wurde. Bei optimaler Mischkinetik wäre es denkbar, dass der Anteil an Quenchinglösung gegenüber der Probe verringert und von der Temperatur der Kultivierung abhängig gemacht werden könnte.
- Das System hat weitere technisch bedingte Mängel. So besteht nicht die Möglichkeit das System an andere Kultivierungssysteme zu adaptieren. Es besteht darüber hinaus keine Möglichkeit die Probenahmegefäße vor, während und nach der Probenahme zu kühlen. Dies bedingt zum einen, dass die Abkühlgeschwindigkeit mit steigender Probennummer sinkt und zum anderen, dass die Reaktivierung von Enzymen nach der Probenahme nicht ausgeschlossen werden kann. Der Probenverlust durch die kontinuierliche Beprobung auch bei Wechsel der Probengefäße ist vorhanden, aber vernachlässigbar.

Aus den Beobachtungen ergeben sich für ein funktionelles System folgende Anforderungen.

- Das System muss räumlich flexibel und unabhängig vom Kultivierungssystem einsetzbar sein.
- Das Probenvolumen muss frei wählbar, definiert und unmittelbar von der aktuellen Biomassekonzentration im Reaktor abhängig sein. Die Entnahme muss mittels eines Systems erfolgen, das konstante Volumina und kontinuierliche Flüsse garantiert.
- Die parallele Entnahme von zellfreien Überstandsproben muss gewährleistet sein.
- Die Geometrie des Probenahmeventils muss eine totvolumenfreie Entnahme von biologischem Material und zudem die Inaktivierung unmittelbar am Kultivierungssystem ermöglichen. Das Quenching sollte vollständig, homogen und mit minimalem Einsatz an Quenchinglösung erfolgen, wozu eine aktive Mischung und eine vollständig bekannte Misch- und Abkühlkinetik erforderlich sind.
- Die Zellabtrennung sollte kontinuierlich erfolgen und zu einem minimalen extrazellulären Restvolumen führen.

11.2 Entwicklung fehlender Komponenten

Die technische Lösung der obigen Anforderungen ist für drei der fünf Punkte bereits erfüllt. Verschiedene Hersteller (HEL Group, Groton Biosystems, bbi biotech) bieten Pumpensysteme an, die mit entsprechender Modifikation in der Lage sind, Volumina bis zu 1.8 l min^{-1} zu fördern. Die zeitgleiche exakte Kontrolle von Ventilen macht es mit diesen Systemen zudem möglich, das Probenvolumen frei zu wählen und ggf. zu verändern. Meist handelt es sich bei den Pumpenblöcken um räumlich flexible Systeme, die sowohl an großvolumige Stahltanks, als auch an Glasreaktoren mit 200 ml Arbeitsvolumen gekoppelt werden können.

Die zellfreie Probenahme mit Hilfe von Probenahmerohren mit integrierten Filtern ist ebenfalls eine Anwendung, die von mehreren Herstellern angeboten wird (Flownamics).

Für die Komponenten, die zur Inaktivierung des Stoffwechsels und zur Zellseparation benötigt werden, konnte kein geeignetes Standardsystem gefunden werden. Es wurden daher eigenen technische Lösungsansätze entwickelt, die im Folgenden beschrieben sind.

11.2.1 Probenahme mit integriertem Quenching - MIST (MIXing SEctiOn)

Grundlage für die Entwicklung des Systems zum automatischen und kontinuierlichen Quenching stellt ein Rohr dar, das mit biologischer Proben und Quenchingflüssigkeit in den entsprechenden Volumenanteilen durchströmt wird. Da das Quenching die Abkühlung einer biologischen Probe in kürzester Zeit erfordert und die Abkühlung mittels einer gekühlten Flüssigkeit erfolgt, ist die Geschwindigkeit der Abkühlung vor allem abhängig von der Durchmischung beider Flüssigkeiten.

Die Entwicklung eines Systems erfolgte aufgrund von Simulationen und deren experimenteller Validierung. Alle Simulationen wurden mit der Software COMSOL von S. Mottyl (Forschungszentrum Jülich, IBG-1: Biotechnologie 2) im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

Anhand der Simulation einer Ausgangsgeometrie, sollten zunächst ermittelt werden, welche physikalischen und chemischen Größen die Durchmischung beeinflussen. Die Ausgangsgeometrie wurde dabei gezielt rotationssymmetrisch gewählt, um eine vollständige Abbildung aller auftretenden Phänomene durch Simulation in einem zweidimensionalen Modell abbilden zu können.

Bei der Umsetzung der Ausgangsgeometrie wurde ein Rohr mit einem Innendurchmesser von 7 mm, 30 mm tief in ein Rohr mit einem Innendurchmesser von 14 mm geschoben. Das äußere Rohr ist an dem Ende abgeschlossen, an dem es über das innere Rohr ragt und verfügt über zwei Einlässe auf gegenüberliegenden Seiten. Bei Durchströmung des inneren Rohres mit einem Fluss von 750 ml min^{-1} und Durchströmung des äußeren Rohres mit einem Fluss von 2250 ml min^{-1} (verteilt auf beide Einlässe), kann beim Zusammentreffen der Ströme von einem gleichmäßigen Strömungsprofil ausgegangen werden. Die Volumenströme wurden so gewählt, dass bei einem Probenvolumen von 2.5 ml eine Beprobungsfrequenz von 5 Proben pro Sekunden möglich wäre (vgl. Abbildung 11.2 a).

Die physikalischen Eigenschaften von Wasser und Methanol, die der Simulation zugrunde liegen, wurden aus Datenbanken entnommen und die verbleibenden Rahmenparameter (z.B. Druck, Ausgangstemperaturen, usw.) den tatsächlichen Einstellungen beim Quenching entsprechend gewählt. Zur Simulation der Biomasse wurden die Eigenschaften von Wasser bei 37°C angenommen.

Die Simulation der Strömungen zeigt, dass für das gegebene System sowohl beim Stoff- als auch beim Wärmetransport der konvektive Transportanteil wesentlich höher ist, als der Diffusive (Mottyl 2010). Ein Wärmetransport in Querrichtung findet folglich nur in den unmittelbaren Grenzbe-reichen beider Ströme statt (vgl. Abbildung 11.2 b).

Um die Ergebnisse zu verifizieren und Hinweise auf eventuell bisher nicht berücksichtigte Einflussgrößen zu erhalten, wurde die Simulation experimentell überprüft. Dazu wurde das oben beschriebene Modell mit Kühlflüssigkeit und gefärbtem Wasser durchströmt und das Strömungsverhalten mit bildgebenden Verfahren analysiert (vgl. Abbildung 11.2 c und d). Aufgrund der großen Volumina wurde statt des toxischen Methanols 60 %-iges Ethanol als Kühlflüssigkeit verwendet. Die Analyse erfolgte aufgrund von Wärmebild- und Digitalkameraaufnahmen.

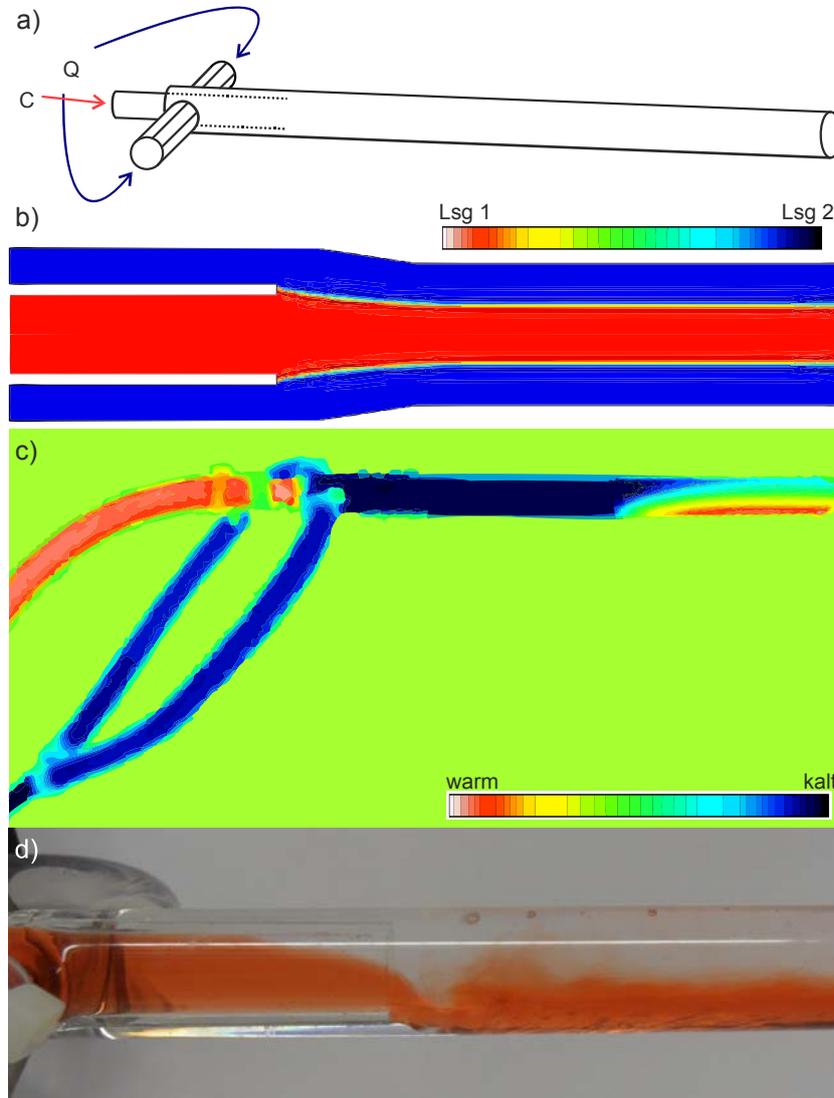


Abbildung 11.2: Untersuchung einer rotationssymmetrischen Mischstrecke zum integrierten Quenching. a) Schematische Darstellung mit Einflüssen von Probe (C) und Kühlflüssigkeit (Q). b) Simulation des Stofftransports (Querschnitt) mit Probe (rot) und Kühlflüssigkeit (blau). c) Aufnahme der Wärmebildkamera mit gradueller Darstellung der Außentemperatur. d) Aufnahme der Digitalkamera bei Durchströmung mit gefärbtem Wasser und 60 %-igem Ethanol. Abbildungsteil b) modifiziert nach Mottyl (Mottyl 2010).

Die Simulation der Mischstrecke zeigte, dass es innerhalb der Strecke zur Bildung von zwei parallelen Flüssigkeitsströmen kommt, die erst im hinteren Bereich ineinander übergeben. Beim unmittelbaren Aufeinandertreffen der Ströme bildet sich ein Konus, der sich im weiteren Verlauf sehr langsam auflöst.

Des Weiteren ist zu sehen, dass die von der Kamera aufgezeichnete Temperatur der Strecke bis zur Mitte bei der minimal detektierbaren Temperatur liegt. Dies deutet darauf hin, dass innerhalb der ersten Zentimeter weder eine Abkühlung der Biomasse noch einer Mischung von Biomasse und Kühlflüssigkeit stattfindet. Im hinteren Teil der Strecke ist zu beobachten, dass die Außentemperatur des Rohrs im unteren Bereich höher ist, als im oberen. Dies deutet darauf hin, dass es aufgrund des Dichteunterschieds zwischen der Kühlflüssigkeit und dem warmen Wasser zu einem Absinken des Wassers kommt und nicht, zu einer homogenen Mischung beider Flüssigkeiten.

Die Annahme bestätigt sich bei der Betrachtung der Digitalkameraaufnahme. Es ist zu erkennen, dass die farbige Flüssigkeit, die zur Simulation der Biomasse verwendet wurde unmittelbar nach dem Zusammentreffen beider Ströme an den Boden des Rohrs sinkt und es optisch nicht zu einer Vermischung beider Ströme kommt.

Die Beobachtungen decken sich im Wesentlichen mit den aufgrund der Simulation erwarteten Ergebnissen. Zudem zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Gravitation. Die abgesehen davon gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse mit den experimentellen Beobachtungen zeigt, dass die Medieneigenschaften und physikalischen Zusammenhänge, welche die Grundlage der Simulation bilden, korrekt abgebildet wurden. Dies macht eine Optimierung des Misch- und Abkühlverhaltens möglich.

Bei der Optimierung wurde zunächst das Aufeinandertreffen der beiden Flüssigkeitsströme verändert. Um die parallelen Flüsse in einen Gegenstrom umzuwandeln, werden vor der Mischstrecke sowohl der Kühlmittel-, als auch der Biomassefluss in zwei Ströme geteilt und in einem Kreuzstrom wiedervereinigt. Durch das senkrechte Aufeinandertreffen der Volumina kommt es zu turbulenter Strömungen, welche die Vermischung beider Medien verbessern sollte. Wie für das rotationssymmetrische Modell wurde eine Simulation durchgeführt und diese anhand von bildgebenden Verfahren überprüft (vgl. Abbildung 11.3).

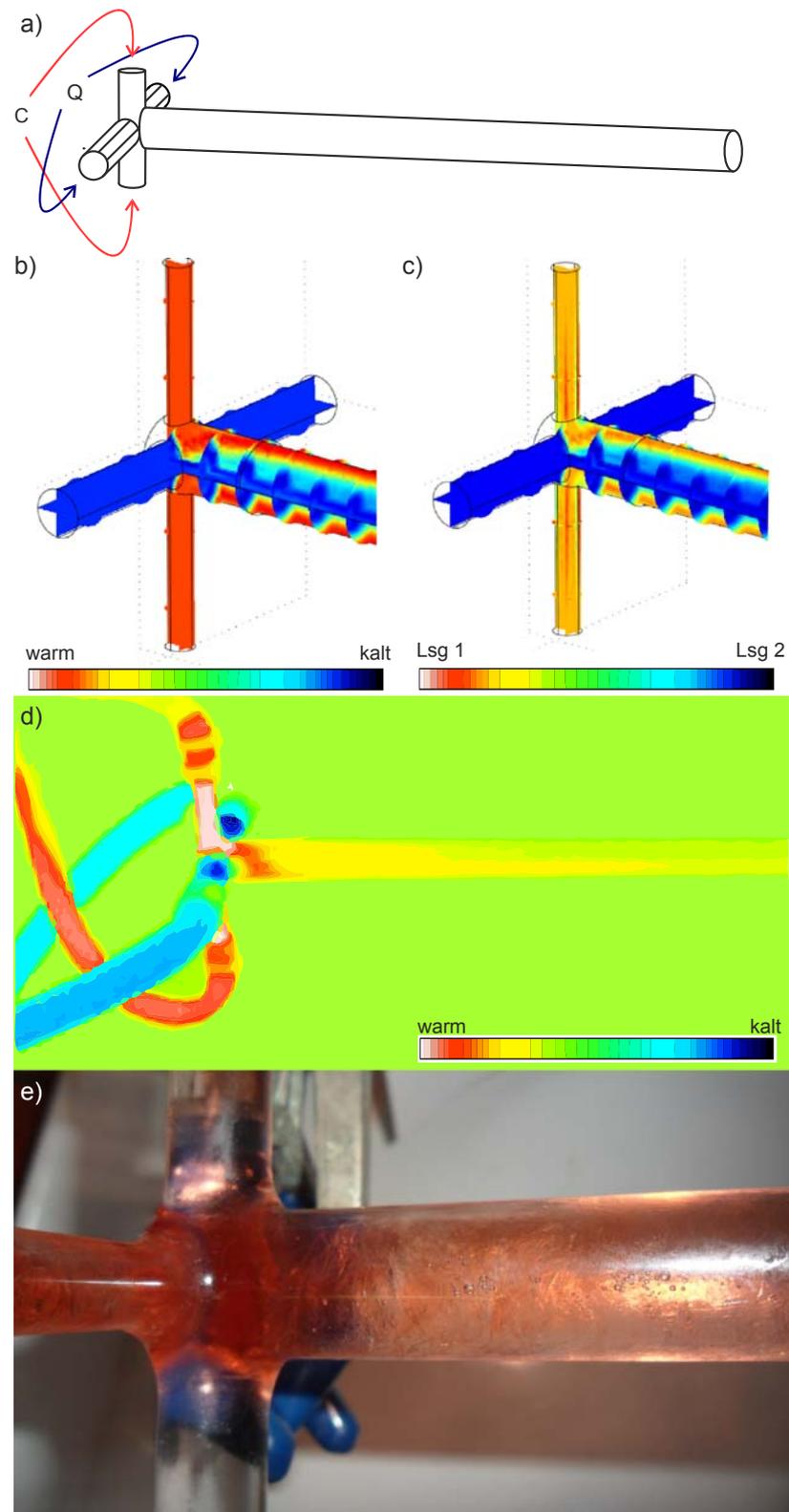


Abbildung 11.3: Untersuchung eines Gegenstrommodells zum integrierten Quenching. a) Schematische Darstellung mit Einflüssen von Probe (C) und Kühlflüssigkeit (Q). b) Simulation des Temperaturverlaufs mit kalter (blau) und warmer (rot) Flüssigkeit. c) Simulation des Stofftransports mit Probe (rot) und Kühlflüssigkeit (blau). d) Aufnahme der Wärmebildkamera mit gradueller Darstellung der Außentemperatur. e) Aufnahme der Digitalkamera bei Durchströmung mit gefärbtem Wasser und 60 %-igem Ethanol. Abbildungsteil b) und c) modifiziert nach Mottyl (Mottyl 2010).

Betrachtet man zunächst die Digitalbild-Aufnahme so ist anzunehmen, dass die Durchmischung beider Flüssigkeiten unmittelbar beim Aufeinandertreffen erfolgt. Die Aufnahme der Wärmebildkamera unterstützt diese Annahme, da bereits unmittelbar im Bereich des Kreuzstroms die Temperatur beobachtet wird, die auch am Auslauf detektiert wurde. Eine Phasenbildung kann weder im Digital- noch im Wärmebild beobachtet werden.

Die Simulationsergebnisse zeigen allerdings, dass auch beim Kreuzstrommodell keine vollständig homogene Verteilung der Temperatur und Konzentration erreicht wird. Nachdem alle einlaufenden Ströme zunächst bis in die Mitte des Mischungskreuzes vordringen, trennen sich die Ströme im anschließenden Rohr wieder auf. Die wärmere Flüssigkeit wird in die Randbereiche gedrückt, während in der Nähe der Achse das Kühlmittel mit höherer Geschwindigkeit fließt.

Aufgrund der Simulation kann angenommen werden, dass die gleichmäßige Strömung im Rohr einen ungünstigen Einfluss auf die Mischung besitzt. In weiteren Optimierungsschritten wurde versucht, die Strömung im Rohr durch den Einbau von statischen Mixern so zu gestalten, dass eine optimale Mischung erreicht wird. Drei unterschiedliche Mischervarianten wurden in das Model übertragen und anhand von Simulationen verglichen (vgl. Abbildung 11.4).

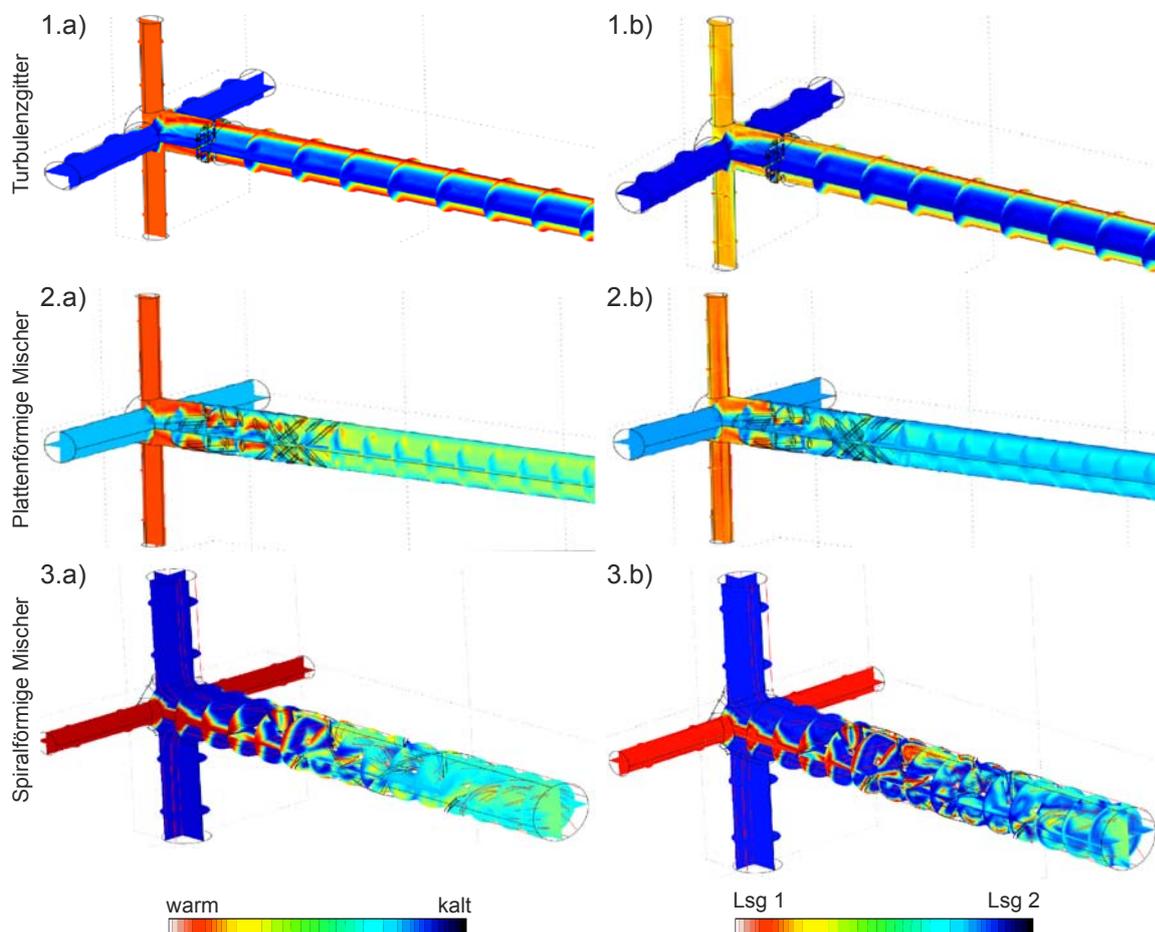


Abbildung 11.4: Untersuchung verschiedener Mischervarianten zum integrierten Quenching. Temperaturverteilung (1.a, 2.a, 3.a) mit warmer (rot) und kalter (blau) einströmender Flüssigkeit und Verteilung der Stoffflüsse (1.b, 2.b, 3.b) mit einströmender Biomasse (rot) und Kühlmittel (blau). Modifiziert nach Mottyl (Mottyl 2010).

Es ist zu erkennen, dass der Einbau eines Turbulenzgitters nahezu keine Verbesserung bewirkt, während die Ergebnisse der beiden Elemente zur Strömungsumleitung (platten- und spiralförmige Mischer) optisch einen ähnlichen Eindruck erwecken.

Betrachtet man beide Varianten im unmittelbaren Vergleich, ist die spiralförmige Bauform zu bevorzugen. Obgleich die mittlere Temperatur nach einer identischen Mischstrecke in beiden Formen verglichen werden kann, ist die Temperaturverteilung beim Einsatz spiralförmiger Elemente weniger groß. Dies ist ein Hinweis auf eine homogenere Durchmischung. Zudem steigt der Druck bei Verwendung der plattenförmigen Einbauten aufgrund der vollständigen Strömungsumkehr am Einlass stark an. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Druckerhöhung bereits zu einem ungewollten Zellaufschluss führt.

Zuletzt wurde versucht, die als optimal angesehene Mischstreckengeometrie in einem Ventil umzusetzen, dass das Quenching unmittelbar am Reaktor ermöglicht (vgl. Abbildung 11.5).

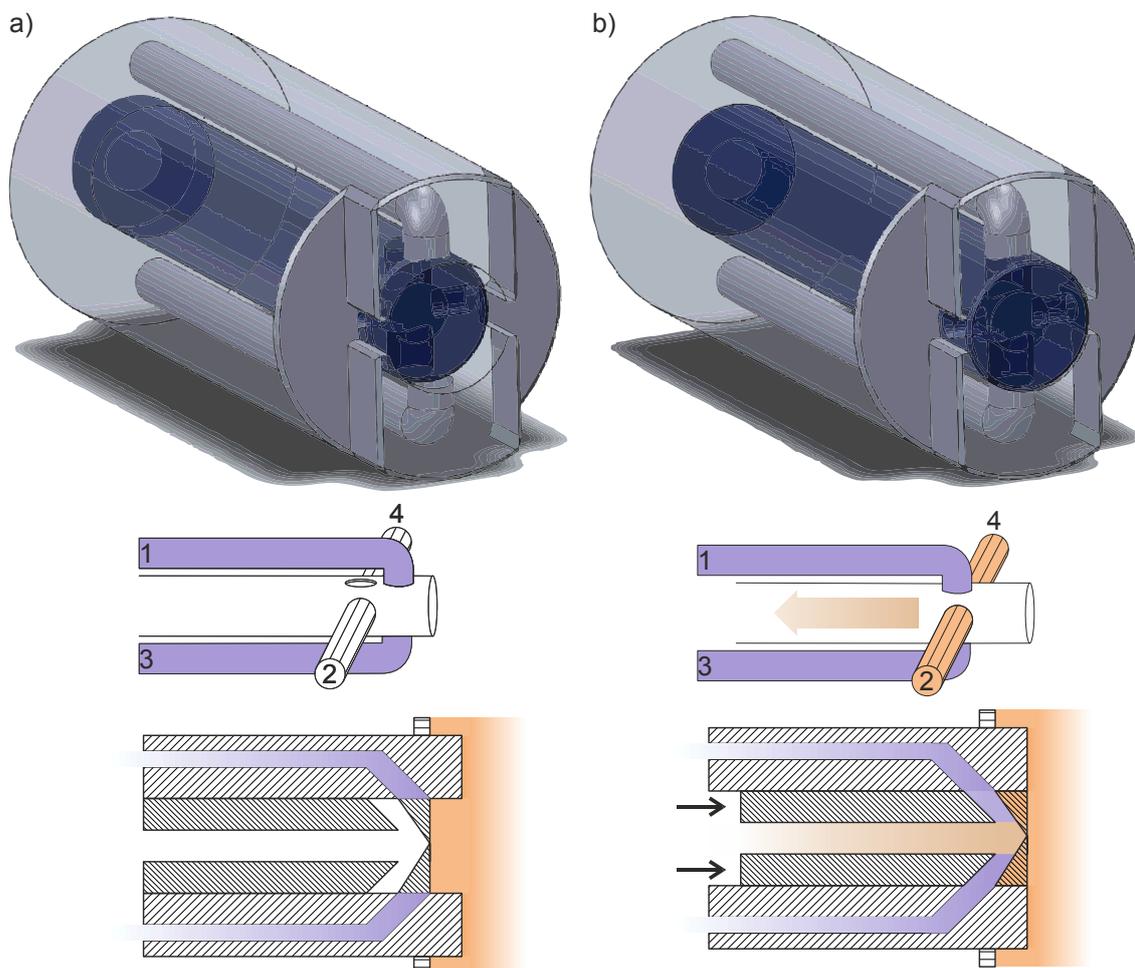


Abbildung 11.5: Ventil zum integrierten Quenching am Reaktor anhand eines dreidimensionalen Modells und einer Schemazeichnung. a) Geschlossener Zustand. b) Offener Zustand. Mit den Kühlmittelstrecken 1 und 3 und den Strecken 2 und 4 für den Zulauf der Biomasse. Modifiziert nach Mottyl (Mottyl 2010).

Im unteren Totpunkt des Kolbens sind die vier Zulaufe der Mischstrecke geschlossen. Die Zulaufstrecken 1 und 3 sind mit Quenchingflüssigkeit gefüllt, während die Zulaufstrecken 2 und 4 leer sind. Eine Bewegung des Kolbens in die Position b) öffnet gleichzeitig alle vier Zulaufe und führt zu einer Durchmischung von Quenchingflüssigkeit und biologischer Probe unmittelbar am Kultivierungssystem.

11.2.2 Verfahren zur Zellabtrennung - SWUC (Sampling With the help of Underpressure Cell separation)

Die Zellseparation mittels Vakuumfiltration mit den zur Verfügung stehenden Standardmethoden erfordert einen hohen manuellen Aufwand. Eine Automatisierung ist unter Einsatz der etablierten Standardsysteme aus runden Filtermembranen, die einzeln auf Filterfritten aufgebracht werden, nicht möglich. Zudem erfolgt die Fixierung der Filtermembran über den Andruck eines Glaszylinders und ist aufgrund von Falten im Filter oder verkantetem Einsatz des Glaszylinders häufig nicht vollständig dicht. Das Filtrat wird meist in eine 1 l-Flasche oder ein Gefäß von ähnlichem Volumen geleitet, wobei die Totvolumina der Adapter zwischen 1 und 5 ml umfassen (vgl. Abschnitt 3.1.4).

Der Einsatz der Vakuumfiltration zur Generierung von Metabolomdaten erfordert hingegen minimierte Totvolumina, kühlbare und minimierte Filtratvolumina und eine einfache Platzierung bzw. einen einfachen Wechsel von Membranen. Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurde ein experimentelles Setup entwickelt, mit dem eine Zellabtrennung in Millisekunden und eine Weiterbearbeitung der Zellen ohne Zeit- und Biomasseverlust möglich ist. Das System beinhaltet einen Absaugvorrichtung und ein Filtermodul, das gleichzeitig das Probenahmegefäß und die Filtermembran umfasst.

Die Optimierung der benötigten Absaugvorrichtung orientierte sich weitgehend an etablierten Standardsystemen. Die Geometrie einer Standardabsaugvorrichtung wurde so modifiziert, dass das Filtrat in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen werden kann. Darüber hinaus wurde das Totvolumen der Absaugvorrichtung durch eine konische Bohrung des Filtratablaufs verringert.

Ausgangspunkt für die Entwicklung des Filteradapters war die Feststellung, dass der zeitlimitierende Arbeitsschritt bei der Vakuumfiltration das manuelle Kombinieren von Fritte und Membran ist. Um diesen Arbeitsschritt zu vereinfachen, sollten Membran und Probenahmegefäß in dem zu entwickelnde System fest verbunden sein. Diese Anforderung machte es notwendig, den mit dem Projektnamen SWUC (Sampling With the help of Underpressure Cell separation) bezeichneten, kombinierten Filteradapter für den einmaligen Gebrauch zu entwerfen.

Im frühen Entwicklungsstadium wurde vorgesehen, das Modul kompatibel mit der Standardnutsche zu gestalten. Die Maße des Probenahmegefäßes wurden daher den Maßen der Glaszylinder angepasst, die für die Kombination mit den Standardnutschen vorgesehen sind. Für die Weiterbearbeitung der Filterkuchen sollte die beladene Membran nach der Filtration vom Probenahmegefäß getrennt und direkt in die Extraktionslösung gegeben werden (vgl. Abbildung 11.6).

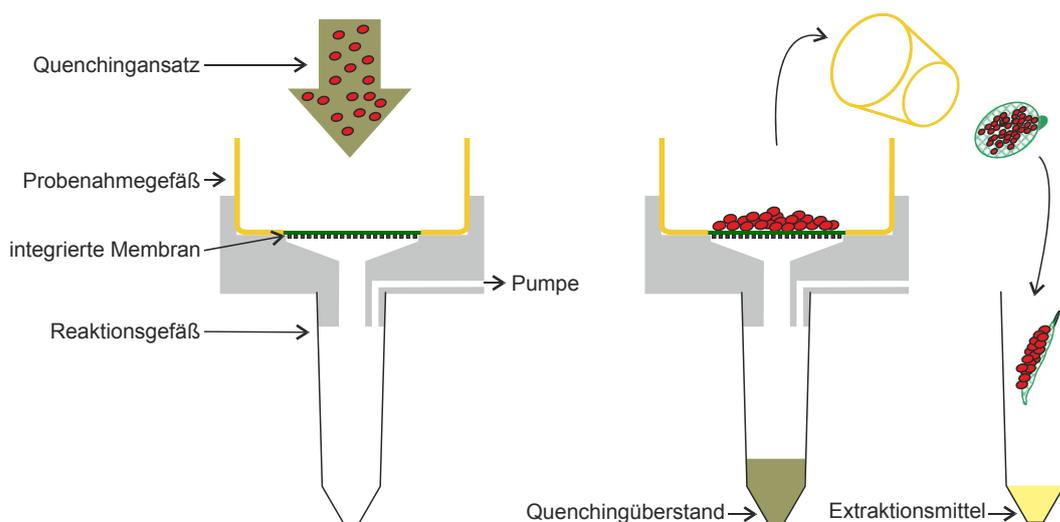


Abbildung 11.6: Ausgangsentwurf des Zellseparationsmoduls SWUC. Mit der Beladung des Moduls mit gequenchter Biomasse (links), der Zellabtrennung (mitte), der Entnahme des Probenahmegefäßes und der Trennung der beladenen Membran von diesem (rechts).

Da es nicht möglich ist, das für die Filtration ausgewählte Membranmaterial (Polyamid) durch eine Schweißnaht mit dem Material des Probenahmegefäßes (Polypropylen) zu verbinden, muss die Verbindung über eine Klemmung erfolgen. Dies macht es unmöglich, Membran und Probenahmegefäß nach der Filtration zu trennen, weshalb der in Abbildung gezeigte Entwurf nicht umgesetzt werden konnte.

Stattdessen wurde versucht eine Geometrie zu finden, in der die Weiterbearbeitung der Zellen ohne die Trennung von Probenahmegefäß und Membran erfolgen kann. Die Änderung der Funktionsweise machte es notwendig, auch die Geometrie der verwendeten Nutsche zu optimieren (vgl. Abbildung 11.7).

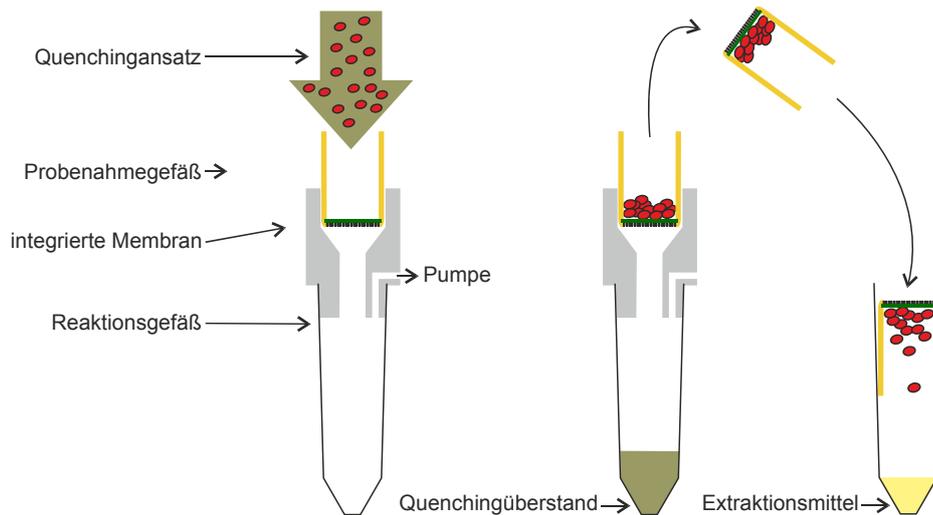


Abbildung 11.7: Zweiter Entwurf des Zellseparationsmoduls SWUC. Mit der Beladung des Moduls mit gequenchter Biomasse (links), der Zellabtrennung (mitte), der Entnahme des Probenahmegefäßes und der unmittelbaren Weiterbearbeitung der Biomasse (rechts).

Für die Umsetzung wurde zunächst die benötigte Filterfläche ermittelt, um in einer Filtrationszeit unter 30 s 25 mg Biomasse aus einer entsprechenden Lösung zu filtern. Biomasse aus einer Schüttelkolben-Kultivierung von *E. coli* in einer Konzentration von 11.3 g l^{-1} wurde in Aliquote zu je 3 ml geteilt. Diese wurden über Polyamid-Filter von unterschiedlicher Größe gegeben. Es zeigte sich, dass eine kreisförmige Fläche von 25 mm Durchmesser erforderlich ist, um die obigen Kriterien zu erfüllen.

Zur Verifizierung wurde die oben eingesetzte Biomasse durch Zentrifugation und Resuspension in einem verringerten Volumen auf 50 g l^{-1} aufkonzentriert. Aus der aufkonzentrierten Biomasse wurde eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 20, 10, 5, 2.5 und 1.25 g l^{-1} erstellt. Jeweils 8 ml der verdünnten Ansätze wurden als Triplikat über eine Filterfläche der ermittelten Maße gegeben (vgl. Abbildung 11.8).

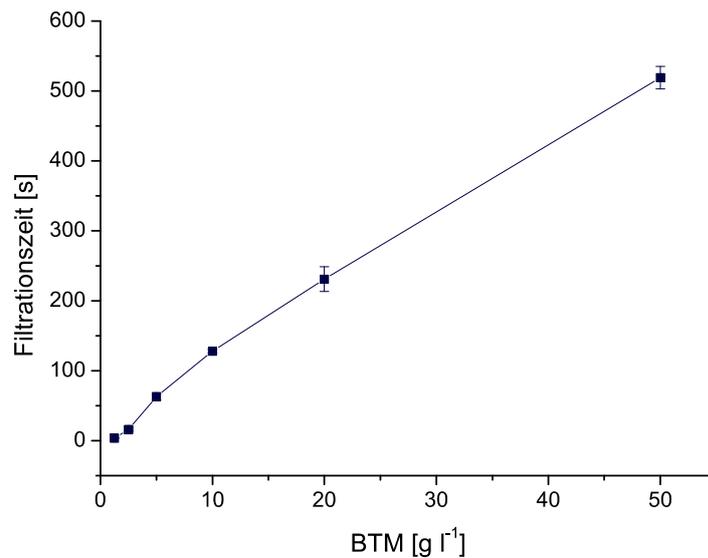


Abbildung 11.8: Benötigte Filtrationszeit von 8 ml Probe über eine 1.2 μm Polyamid-Membran mit einer effektiven Filterfläche von 7 cm^2 bei der Separation unterschiedlicher Biomassekonzentrationen.

Es ist zu erkennen, dass Filtrationszeit und aufgetragene Biomasse in dem betrachteten Konzentrationsbereich nahezu linear korrelieren. Für die Separation einer Biomassemenge von 25 mg werden zudem weniger als 30 s benötigt.

Da die Außenabmessungen des Moduls durch die Maße der zur Weiterbearbeitung eingesetzten Standardreaktionsgefäße vorgegeben sind, stellten die Membranfläche und das Fassungsvermögen die einzigen Variablen dar. Das Fassungsvermögen wurde auf 6 ml begrenzt, da größere Volumina problemlos sukzessive filtriert werden können. Die benötigte Filterfläche in einer kreisförmigen, planaren Anordnung würde allerdings den Innendurchmesser eines Standardreaktionsgefäßes (z.B. Falcon 50 ml) übersteigen. Aus diesem Grund wurde eine elliptische, geneigte Anordnung gewählt (vgl. Abbildung 11.9).

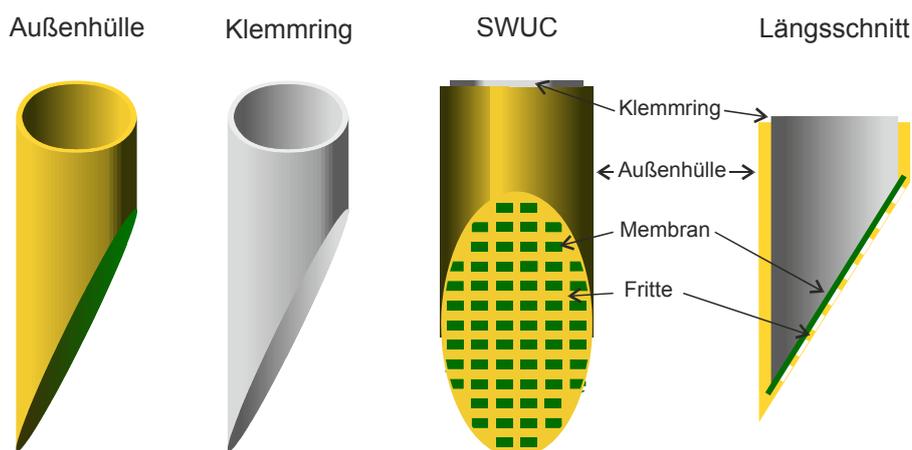


Abbildung 11.9: Finaler Entwurf des Zellseparationsmoduls SWUC.

Da die Membranhalterung bei der Extraktion nicht von der Membran und den Zellen getrennt wird, musste ausgeschlossen werden, dass die Geometrie des Adapters die Extraktion negativ beeinflusst. Dazu wurden von der Firma DIA-Nielsen Prototypen des Adapters hergestellt, mit denen die Funktionalität des Entwurfs überprüft werden soll.

Die Untersuchung der Prototypen erforderte ein vollständiges Durchlaufen des Probenahme-Prozesses, weshalb zunächst ein geeignetes Material für die Herstellung der Prototypen gefunden werden musste. Die im Spritzgussverfahren zur Herstellung von Prototypen etablierten Kunstharze eigneten sich aufgrund ihrer Instabilität gegenüber Lösungsmitteln nicht, jedoch konnte der oberflächenbehandelte Kunstharz „Vero white“ alle Anforderungen erfüllen und wurde zur Herstellung der Prototypen eingesetzt.

Aufgrund der manuellen Herstellung der Prototypen und des starren Materials war es nicht möglich, die Filtermembran in den Prototypen fest zwischen der Außenhülle und dem Klemmring zu fixieren. Aus diesem Grund konnte kein Biomassefluss über die eingebaute Membran erzielt werden. Der Biomasseverlust bei entsprechenden Versuchen betrug über 70 %.

Trotz dieser Mängel konnte hinreichend untersucht werden, ob die Geometrie des Moduls einen Einfluss auf die Extraktion von filtrierter Biomasse besitzt. Dazu wurden Membranmuster unter Zuhilfenahme einer Standard-Nutsche separat mit Biomasse beladen und im Anschluss in die Kunstharz-Prototypen eingelegt. Parallel zu den beladenen Prototypen wurden einzelnen Membranfilter mit identischer Biomasse beladen. Beide Membrantypen wurden anschließend einer Extraktion unterzogen. Die Extrakte wurden mittels LC-ESI-MS/MS hinsichtlich ihrer Metabolitkonzentration untersucht und verglichen (vgl. Abbildung 11.10). Die Untersuchung wurde für *B. licheniformis* und *C. glutamicum* DM 1800 aus Schüttelkolben-Kultivierungen bei einer optischen Dichte von ca. 10 durchgeführt. Probenahme, Quenching und Extraktion erfolgten nach dem in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Standardverfahren.

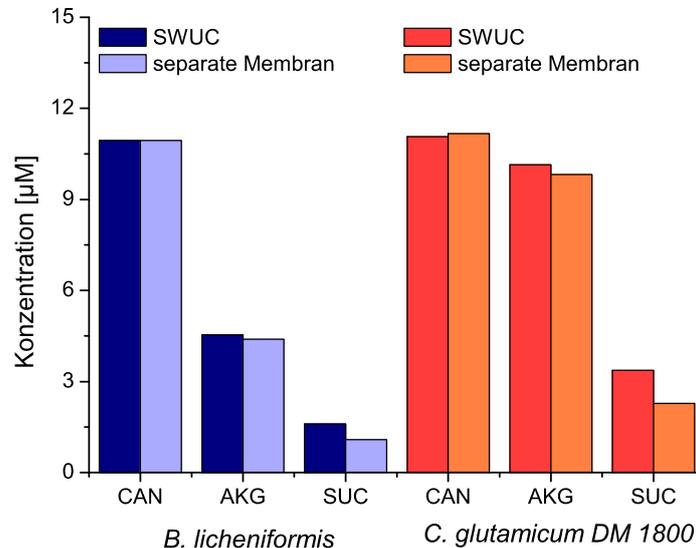


Abbildung 11.10: Extraktkonzentrationen von Filterkuchen (*B. licheniformis* und *C. glutamicum* DM 1800) die mittels SWUC und Standardnutsche erzeugt wurden. Mit Cis-Aconitat (CAN), Succinat (SUC) und α -Ketoglutarat (AKG).

Es ist zu erkennen, dass die Extrakte beider Filtrationsverfahren für die untersuchten Metabolite eine annähernd identische Konzentration aufweisen. Es ist damit ausgeschlossen, dass die Geometrie des Filtermoduls die Extraktion beeinflusst.

Im Anschluss an diese positiven Vortests wurde die Firma DIA-Nielsen mit der Umsetzung des Adapters im Spritzgussverfahren beauftragt. Trotz der einfachen Geometrie stellte sich dies als technisch sehr anspruchsvoll dar. Aufgrund der geringen Größe des Filterguts war die geplante Klemmung der Membran zwischen Außenhülle und Klemmring nicht ausreichend, um einer vollständige Abdichtung zu erreichen. In der Ausgangsgeometrie passierte ein Großteil der zu filternden Biomasse nicht die Filtermembran, sondern drang durch den Spalt zwischen Membran und Klemmring.

Durch sukzessive Optimierung konnte eine Konstruktion entwickelt werden, die eine vollständige Funktionalität besitzt (vgl. Abbildung 11.11).

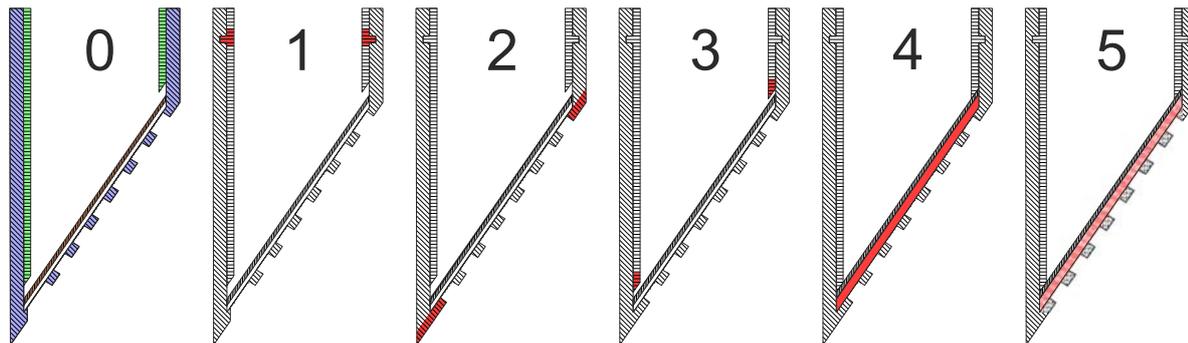


Abbildung 11.11: Schematische Darstellung der Konstruktionsschritte bei der Entwicklung des Filtermoduls SWUC. Ausgangsgeometrie 0 mit Außenhülle (blau), Klemmring (grün) und Membran (orange) und die baulichen Veränderungen (rot) der Optimierungsschritte 1 bis 5.

Die Optimierungsschritte sind im Folgenden beschrieben:

1. Ein zusätzliches Nut- und Feder-System wurde eingefügt, um den Druck des Klemmrings auf die Membran zu erhöhen.
2. Die Perforation der Fritte im Bereich der Auflagefläche des Klemmrings wurde entfernt, um die Stabilität der Auflagefläche und damit den Gegendruck auf den Klemmring zu erhöhen.
3. Der Klemmring wurde um 0.1 mm verlängert, wodurch der Spalt zwischen Membran und Klemmring verringert werden konnte.
4. Einer Stützschicht aus Glasfaser wurde unterhalb der Membran eingefügt, die aufgrund ihres größeren Querschnitts eine effektive Klemmung ermöglicht.
5. Glasfaserfilter mit unterschiedlichen Faserabständen wurden untersucht, um eine Stützmembran zu finden, die bei vollständiger Dichtheit des Moduls nur zu einer minimalen Erhöhung der Filtrationszeit führt.

Da die Entwicklung des Ein-Weg-Moduls aufgrund langer Produktionszeiten erheblich mehr Zeit in Anspruch genommen hat, als zuvor angenommen, war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, das System über prinzipielle Funktionstests hinaus zu charakterisieren.

11.3 Konzeptionelle Umsetzung

Mit Hilfe der neu entwickelten Komponenten war es möglich, ein Konzept zur technischen Umsetzung der automatisierten Probenahme für die Metabolomanalyse aufzustellen (vgl. Abbildung 11.12 und Tabelle 11.1).

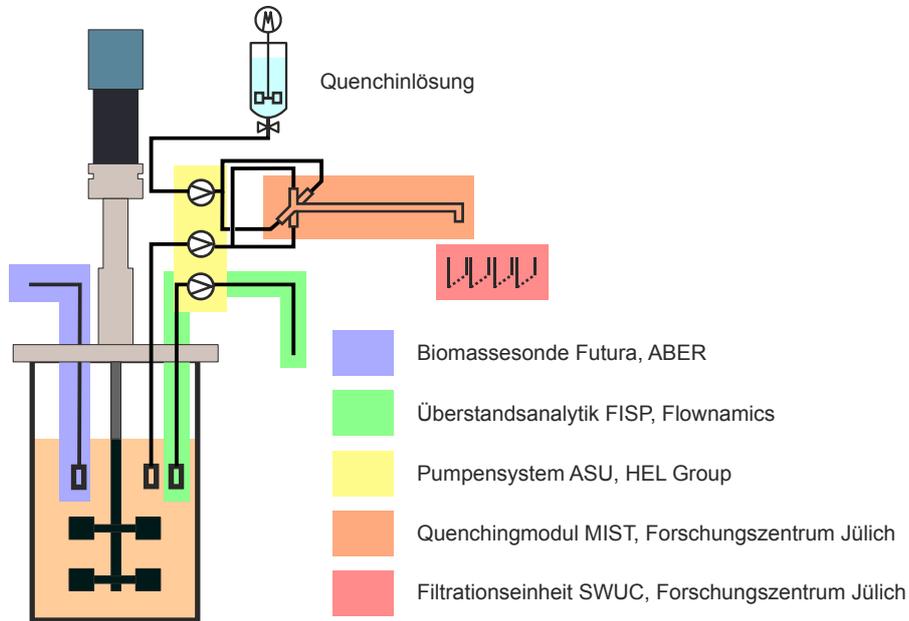


Abbildung 11.12 Konzept zur automatisierten Probenahme für die Metabolomanalyse. Mit Online-Biomassebestimmung (blau), automatische Entnahme von zellfreiem Überstand (grün), definierter Probenahme (gelb), integriertem Quenching (orange) und kontinuierlicher Zellseparation (rot).

Tabelle 11.1: Komponenten eines Systems zur automatisierten Probenahme für die Metabolomanalyse. Einzelkomponenten mit den an sie gestellten Anforderungen sowie geeigneten Methoden und ausgewählten Herstellern entsprechender Systeme. * = Hinsichtlich der Verwendung der dielektrischen Kapazitätsmessung sind weitere Tests erforderlich, um die Allgemeingültigkeit der Methode zu bestätigen.

Komponente	Methode	System (Hersteller)	Anforderung
Biomassebestimmung	Dielektrische Kapazitätsmessung	Futura Biomassesonde, ABER*	Bestimmung des Biovolumens
Probenahme	Pumpensystem	ASU, HEL Group	<ul style="list-style-type: none"> – kontinuierlicher Volumenstrom – automatische Reinigung der Probenstrecken – Pumpleistungen zwischen 600 und 1800 ml min⁻¹
Quenching	methanolisches Quenching	MIST, FZ Jülich	Aktive, homogene Mischung
Zellabtrennung	Vakuumfiltration	SWUC, FZ Jülich	<ul style="list-style-type: none"> – minimales extrazelluläres Restvolumen – kontinuierliche Zellabtrennung
Überstandsanalytik	Probenahmerohr mit integriertem Filter	FISP, Flownamics	Entnahme von zellfreiem Überstand

11.4 Fazit Automatisierung

Es konnte ein Konzept aus technisch bereits umgesetzten und neu entwickelten Einzelkomponenten erstellt werden, das eine automatisierte Metabolomanalyse nach heutigem Stand der Technik ermöglichen sollte.

Für die technische Umsetzung des integrierten Quenchings wurde mittels computergestützter Simulation und experimenteller Daten ein Ventil konzipiert, das die totvolumenfreie Probenahme mit integriertem Quenching ermöglicht und zudem eine homogene und vollständige Inaktivierung der Probe garantiert.

Für die automatisierte Separation gequenchter Zellen wurde die Vakuumfiltration in einem Ein-Weg-Filtermodul umgesetzt, das die Zellabtrennung bei minimalem extrazellulären Restvolumen ermöglicht.

12. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll für die Analyse von intrazellulären Metaboliten entwickelt. Dafür wurden insbesondere folgende Teilaspekte untersucht und umgesetzt:

- Für alle Arbeitsschritte der Probengenerierung, Analyse und Interpretation wurden unterschiedliche methodische Ansätze untersucht und hinsichtlich ihrer Funktionalität bewertet.
- Aufgrund der Untersuchungen wurde ein optimiertes Protokoll erstellt, dessen Einzelkomponenten sich durch eine hohe Funktionalität und eine maximal Kompatibilität auszeichnen und das vor allem das Kriterium der Allgemeingültigkeit nach bestem Wissen erfüllt.
- Das optimierte Protokoll wurde für die vergleichende Metabolomanalyse von vier *C. glutamicum*-Stämmen angewendet, die zuvor bereits mit einem alternativen Protokoll durchgeführt wurde. Die Ergebnisse bestätigen den Erfolg der durchgeführten Optimierung des Protokolls.
- Abschließend wurde ein Konzept zur automatisierten Anwendung des optimierten Protokolls erstellt. Für die Arbeitsschritte Quenching und Zellseparation wurden dazu eigene technische Lösungen entwickelt und umgesetzt.

Die vorliegende Arbeit zeigt eindeutig, dass die Ergebnisse einer Metabolomanalyse erheblich von den zur Probengenerierung angewendeten Methoden beeinflusst werden. Diese Feststellung trifft auch für das aus der Arbeit resultierende, optimierte Protokoll zur Metabolomanalyse zu

So kann z.B. das Problem heterogener Populationen nicht durch eine separate Probenahme gelöst werden. Mit dem beschriebenen Protokoll ist es aber möglich, Aussagen über Populationsverteilungen zum Probenahmezeitpunkt zu machen und diese bei der Interpretation der resultierenden Daten mit einzubeziehen.

Auch die negative Beeinflussung von chromatographischen Analysen durch die Messmatrix wird durch das optimierte Protokoll nicht vollständig verhindert. Die Einhaltung der beschriebenen Kriterien ermöglicht aber das Erkennen dieser Effekte, die anderenfalls auf biologische Ursachen zurückgeführt und falsch interpretiert würden.

An mehreren Stellen konnte nicht abschließend die Ursache dafür geklärt werden, warum eine Verfahren oder ein methodischer Ansatz gegenüber einem anderen zu bevorzugen ist. Dies betrifft die Verfahren zur Biomassebestimmung, sowie das Quenching.

Bezüglich der Biomassebestimmung ist unklar, ob die dielektrische Kapazitätsmessung tatsächlich mit dem Biovolumen korreliert oder stärker von den elektrochemischen Eigenschaften einer Zelle beeinflusst wird.

Bei der Untersuchung des Quenching konnte gezeigt werden, dass die Differentialmethode aufgrund hoher extrazellulärer Metabolitkonzentrationen nur in wenigen Fällen anwendbar ist. Die Ursache für das Vorhandensein dieser Metabolite im extrazellulären Raum konnte deutlich eingegrenzt aber nicht abschließend untersucht werden.

In Bezug auf die Analyse von Metaboliten mittels LC-ESI-MS/MS ist es nicht möglich, eine abschließende Optimierung durchzuführen. Neue chromatographische Techniken, basierend auf Weiterentwicklungen wie Säulenmaterialien, Elutionsmittel oder Messverfahren machen eine ständige Verbesserung möglich. Die vorliegende Arbeit hat dazu geführt, dass die eingesetzte Analytik für den Moment dem Stand der Technik entspricht, der sicherlich bald schon wieder überholt sein wird.

Die vorliegende Arbeit konnte mit der Entwicklung des Systems zum integrierten Quenching MIST und der Entwicklung des Adapters zur Zellseparation mittels Vakuumfiltration SWUC einen Beitrag zur Weiterentwicklung der automatisierte Probenahme leisten. In nachfolgenden Arbeiten müssen diese Systeme als Standardverfahren etabliert und vor allem genutzt werden, um ggf. weitere Optimierungsparameter zu finden und die Metabolomanalyse weiter zu verbessern.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1:	Übersicht der verwendeten biologischen Systeme	29
Tabelle 4.2:	Kultivierungsbedingungen für Schüttelkolben-Kultivierungen	30
Tabelle 7.1:	Extrazelluläre Metabolitkonzentrationen und theoretisch lysierte Biomasse	62
Tabelle 8.1:	Bestimmung des extrazelluläres Restvolumens	81
Tabelle 8.2:	Extraktkonzentration beim Einsatz der Silikonöl-Zentrifugation zur Zellseparation	82
Tabelle 9.1:	Eingesetzte Standards in den Versuchsreihen zur Untersuchung des Einflusses der Messmatrix auf die Analyse mittels LC-ESI-MS/MS	90
Tabelle 9.2:	Zusammensetzung der Messreihen zur Untersuchung des Einflusses der Messmatrix auf die Analyse mittels LC-ESI-MS/MS	90
Tabelle 9.3:	Angestrebtes Analytspektrum der Methodenentwicklung	95
Tabelle 9.4:	Eluenten des ersten Parameterscreenings	96
Tabelle 9.5:	Durchflusszeiten der eingesetzten Säulen	97
Tabelle 9.6:	Metabolitzusammensetzung der Standardgemische	98
Tabelle 9.7:	Detektierte Peaks bei der Basismessung auf unterschiedlichen Säulen	100
Tabelle 9.8:	Kombination von Säulenelementen zur Trennung aller Zielmetabolite aufgrund der ersten Basismessungen	101
Tabelle 9.9:	Kombination von Säulenelementen zur Trennung von organischen Säuren aufgrund der ersten Basismessungen	101
Tabelle 9.10:	Kombination von Säulenelementen zur Trennung aller Zielmetabolite aufgrund der zweiten Basismessungen	107
Tabelle 9.11:	Kombination von Säulenelementen zur Trennung von organischen Säuren aufgrund der zweiten Basismessungen	108
Tabelle 10.1:	Fehlerbehaftete Messgrößen bei der Generierung von Metabolomdaten	114
Tabelle 10.2:	Wachstumsraten von <i>C. glutamicum</i> DM 1800 und Mutanten	115
Tabelle 11.1:	Komponenten eines Systems zur automatisierten Probenahme für die Metabolomanalyse	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Umsätze dedizierter Biotechnologieunternehmen in Deutschland in den Jahren 2005 bis 2010	1
Abbildung 1.2:	Publikationen im ISI Web of Knowledge unter dem Suchbegriff „metabolome“	2
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung der Probengenerierung für die Metabolomanalyse	3
Abbildung 3.1:	Schematischer Verlauf der Vitalität einer Zelle	6
Abbildung 3.2:	Schematische Unterteilung einer Kultur in Subpopulationen	7
Abbildung 3.3:	Koloniebildung unterschiedlicher Subpopulationen	8
Abbildung 3.4:	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	10
Abbildung 3.5:	Schematischer Aufbau eines Coulter-Counters	12
Abbildung 3.6:	Schematischer Aufbau einer Kapazitätssonde	13
Abbildung 3.7:	Semi-automatisches Probenahmesystem nach Lange	14
Abbildung 3.8:	Probenahmesystem SegFlow (Flownamics)	15
Abbildung 3.9:	Erzeugung technischer Replikate zur Metabolomanalyse	15
Abbildung 3.10:	Schematische Darstellung der Berechnung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen beim sequenziellen und simultanen Quenching	17
Abbildung 3.11:	Schematische Darstellung unterschiedlicher Theorien zum Leakage	18
Abbildung 3.12:	Schematische Darstellung des extrazellulären Restvolumens	20
Abbildung 3.13:	Schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation	23
Abbildung 3.14:	Schematische Darstellung eines Triple Quad	24
Abbildung 3.15:	Schematische Darstellung der IDMS	25
Abbildung 3.16:	Schematischer Aufbau bakterieller Zellwände	27
Abbildung 3.17:	Schematischer Aufbau der Zellwand von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
Abbildung 4.1:	Schematische Darstellung einer Standardnutsche	31
Abbildung 4.2:	Personal Optimized Phase-LC Schema	35
Abbildung 4.3:	Schematische Darstellung der Standardphasen der PO PLC	36
Abbildung 5.1:	Optische Dichte und Biotrockenmasse bei der Analyse von Mischpopulationen	40
Abbildung 5.2:	Streulicht und Fluoreszenz bei der Analyse von Mischpopulationen	41
Abbildung 5.3:	Zellzahl und Biovolumen bei der Analyse von Mischpopulationen	42
Abbildung 5.4:	Einfluss der Leitfähigkeit auf die Detektion mittels Coulter-Counter	43
Abbildung 5.5:	Salinität und Leitfähigkeit der verwendeten Messlösungen	43
Abbildung 5.6:	Einfluss der Osmolalität auf die Detektion mittels Coulter-Counter	44
Abbildung 5.7:	Bestimmung des Einzelzellvolumens und des mittleren Zelldurchmessers	45
Abbildung 5.8:	Veränderungen von Leitfähigkeit und Osmolalität im Verlauf einer Batchkultivierung	46
Abbildung 5.9:	Veränderung von Einzelzellvolumen und Biovolumen im Verlauf einer Batchkultivierung	47
Abbildung 5.10:	Vergleich der dielektrischen Kapazität mit etablierten Biomasseindikatoren	48
Abbildung 5.11:	Verlauf der dielektrischen Kapazität einer revitalisierten Kultivierung	49

Abbildung 6.1:	Quantifizierung des Probenvolumens mit Hilfe eines internen Standards.....	52
Abbildung 6.2:	Quantifizierung des Aliquotvolumens mit Hilfe eines internen Standards.....	53
Abbildung 6.3:	Genauigkeit und Beprobungszeit beim Vergleich von Pipette und Spritze	54
Abbildung 7.1:	Exometabolomanalyse einer <i>E. coli</i> Batchkultivierung	56
Abbildung 7.2:	Exometabolomanalyse einer <i>B. licheniformis</i> Batchkultivierung	57
Abbildung 7.3:	Exometabolomanalyse einer <i>C. glutamicum</i> DM 1800 Batchkultivierung	58
Abbildung 7.4:	Exometabolomanalyse einer <i>S. cerevisiae</i> Batchkultivierung	59
Abbildung 7.5:	Hypothesen zur Ursache für das Vorhandensein von Metaboliten im extrazellulären Raum	61
Abbildung 7.6:	Vitalitätsanalyse einer <i>C. glutamicum</i> DM 1800 Batchkultivierung.....	65
Abbildung 7.7:	LC-ESI-MS/MS-Ergebnisse der Untersuchung des Metabolitverlustes bei der Probenahme.....	66
Abbildung 7.8:	Schema und GC-TOF-MS-Ergebnisse der Untersuchung des Metabolitverlustes bei der Probenahme	67
Abbildung 7.9:	Exometabolomanalyse in Abhängigkeit von der Osmolalität.....	69
Abbildung 7.10:	Exometabolomanalyse in Abhängigkeit vom Zellalter	71
Abbildung 7.11:	Exometabolomanalyse in Abhängigkeit von der Biomassebildung	73
Abbildung 7.12:	Schematische Darstellung der Ausschleusung intrazellulärer Metabolite bei Limitation der Biomassebildung.....	74
Abbildung 7.13:	Stabilität von Glucose-6-Phosphat	75
Abbildung 7.14:	Aufnahme von extrazellulärem Glucose-6-Phosphat als alternatives Substrat	76
Abbildung 8.1:	Schematische Darstellung der Bestimmung des extrazellulären Volumens	79
Abbildung 8.2:	Schematische Darstellung der Silikonöl-Zentrifugation	81
Abbildung 8.3:	Relative Extraktkonzentrationen beim Einsatz verschiedener Filtermembranen für die Zellabtrennung	83
Abbildung 8.4:	Aminosäurekonzentrationen in Abhängigkeit vom Zellseparationsverfahren	84
Abbildung 9.1:	Absolute Quantifizierung von Metaboliten in komplexen Matrices	86
Abbildung 9.2:	LC-ESI-MS/MS-Messung von Standardreihen von ¹² C- und ¹³ C-Succinat	87
Abbildung 9.3:	LC-ESI-MS/MS-Messung einer Standardreihe von Glucose-6-Phosphat mit entsprechendem internen Standard	88
Abbildung 9.4:	¹² C/ ¹³ C-Peakflächenverhältnis von Fructose-6-Phosphat bei linearer Variation der Messmatrix	91
Abbildung 9.5:	Absolute ¹² C- und ¹³ C-Peakfläche von Fructose-6-Phosphat bei linearer Variation der Messmatrix	91
Abbildung 9.6:	Ionensuppression bei der Analyse von Metabolitstandards in linear variierenden Matrices	92
Abbildung 9.7:	Retentionsfaktoren in Abhängigkeit von der Eluentzusammensetzung	97

Abbildung 9.8:	Simulierte und experimentell erzeugte Chromatogramme des Gesamt-Ionenstroms	100
Abbildung 9.9:	Simuliertes Chromatogramm für die Trennung aller Zielmetabolite mit der Säulenkombination aus Simulation 1	101
Abbildung 9.10:	Simuliertes Chromatogramm für die Trennung von organischen Säuren mit der Säulenkombination aus Simulation 2	102
Abbildung 9.11:	Chromatogramme der Vermessung eines Gemischtstandards bei unterschiedlicher Säulentemperatur	104
Abbildung 9.12:	Verschiebung der Retentionszeit in Abhängigkeit von der Säulentemperatur	104
Abbildung 9.13:	Chromatogramme der Vermessung eines Gemischtstandards bei unterschiedlichen Flussraten	105
Abbildung 9.14:	Verschiebung der Retentionszeit in Abhängigkeit von der Flussrate	105
Abbildung 9.15:	Chromatogramme der Vermessung eines Gemischtstandards bei unterschiedlichen Methanolanteilen im Eluenten	106
Abbildung 9.17:	Simuliertes Chromatogramm für die Trennung aller Zielmetabolite mit der Säulenkombination aus Simulation 3	107
Abbildung 9.18:	Simuliertes Chromatogramm für die Trennung von organischen Säuren mit der Säulenkombination aus Simulation 4	108
Abbildung 9.19:	Chromatogramme der Trennung eines 10 µM Gemischtstandards und einer Wasserprobe bei Verwendung der neu etablierten Methode und der Standardmethode	109
Abbildung 9.20:	Retentionszeiten bei wiederholter Messung eines Gemischtstandards	110
Abbildung 9.21:	Signalintensität bei wiederholter Messung eines Gemischtstandards	110
Abbildung 9.22:	Messung von Standardgeraden unter Verwendung der neu entwickelten CyphecATN-Methode	111
Abbildung 10.1:	Schematische Darstellung der Fehlerfortpflanzung bei der Metabolomanalyse	113
Abbildung 10.2:	Prozessdaten von vier parallelen Batchkultivierungen der Stämme <i>C. glutamicum</i> DM 1800, DM 1800'A16, DM 1800'L1 und DM	116
Abbildung 10.3:	Vergleich intrazellulärer Metabolomdaten auf Basis von Literaturdaten und mittels des optimierten Protokolls generierte Daten	117
Abbildung 11.1:	System zur schnellen Probenahme nach Schäfer	119
Abbildung 11.2:	Untersuchung einer rotationssymmetrischen Mischstrecke zum integrierten Quenching	122
Abbildung 11.3:	Untersuchung eines Gegenstrommodells zum integrierten Quenching	124
Abbildung 11.4:	Untersuchung verschiedener Mischervarianten zum integrierten Quenching	125
Abbildung 11.5:	Ventil zum integrierten Quenching am Reaktor	126
Abbildung 11.6:	Ausgangsentwurf des Zellseparationsmoduls SWUC	127

Abbildung 11.7:	Zweiter Entwurf des Zellseparationsmoduls SWUC	128
Abbildung 11.8:	Benötigte Zeit bei der Filtration unterschiedlicher Biomassekonzentrationen.....	129
Abbildung 11.9:	Finaler Entwurf des Zellseparationsmoduls SWUC	129
Abbildung 11.10:	Extraktionsvergleich von Filterkuchen die mittels SWUC und Standardnutsche erzeugt wurden	130
Abbildung 11.11:	Schematischer Darstellung der Konstruktionsschritte des Filtermoduls SWUC	131
Abbildung 11.12:	Konzept zur automatisierten Probenahme für die Metabolomanalyse.....	132

Literaturverzeichnis

Bast, E. (2001).

Mikrobiologische Methoden

Spektrum Akademischer Verlag, Berlin

Bennett, B. D., Yuan, J., Kimball, E. H., Rabinowitz, J. D. (2008)

Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach

Nature Protocols 3(8): 1299-1311

Bhattacharya, M., Fuhrman, L., Ingram, A., Nickerson, K. W., et al. (1995)

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*

Analytical Biochemistry 232(1): 98-106

Biotechnologie.de (2011)

Biotechnologie-Firmenumfrage 2011

<http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Service/suche,did=123260.html?listBIId=74568&searchText=firenumfrage>, Datum des Downloads 10.01.2012

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., et al. (1997)

The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12

Science 277(5331): 1453-1462

Bolten, C. J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J.C., et al. (2007)

Sampling for metabolome analysis of microorganisms

Analytical Chemistry 79(10): 3843-3849

Buchholz, A., Takors, R., Wandrey, C. (2001)

Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques

Analytical Biochemistry 295(2): 129-137

Buhrman, D. L., Price, P. I., Rudewicz, P. J. (1996)

Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography tandem mass spectrometry: A study of ion suppression

Journal of the American Society for Mass Spectrometry 7(11): 1099-1105

Buziol, S., Bashir, I., Baumeister, A., Claasen, W., et al. (2002)

New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale

Biotechnology and Bioengineering 80(6): 632-636

Canelas, A. B., Ras, C., ten Pierick, A., van Dam, J. C., et al. (2008)

Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics

Metabolomics 4(3): 226-239

Davey, H. M. (2011)

Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology

Applied and Environmental Microbiology 77(16): 5571-5576

Davey, H. M. und Hexley, P. (2011)

Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide

Environmental Microbiology 13(1): 163-171

Deboer, A. S., Priest, F., Diderichsen, B. (1994)

On the industrial use of *Bacillus licheniformis* - a review

Applied Microbiology and Biotechnology 40(5): 595-598

de Koning, W. und van Dam, K. (1992)

A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH

Analytical Biochemistry 204(1): 118-123

Diaz, M., Herrero, M., Garcia, L. A., Quiros, C. (2010)

Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses

Biochemical Engineering Journal 48(3): 385-407

Dietmair, S., Timmins, N. E., Gray, P. P., Kromer, J. O. et al. (2010)

Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol

Analytical Biochemistry 404(2): 155-164

Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., et al. (1968)

Molecular beams of macroions

Journal of Chemical Physics 49(5): 2240-2250

Douma, R. D., de Jonge, L. P., Jonker, C. T. H., Seifar, R. M. et al. (2010)

Intracellular metabolite determination in the presence of extracellular abundance: Application to the penicillin biosynthesis pathway in *Penicillium chrysogenum*

Biotechnology and Bioengineering 107(1): 105-115

Drake, J. F. und Tsuchiya, H. M. (1973)

Differential counting in mixed cultures with coulter counters

Applied Microbiology 26(1): 9-13

Duden (2011)

Deutsches Universalwörterbuch

Dudenverlag, Mannheim

Enke, C. G. (1997)

A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes

Analytical Chemistry 69(23): 4885-4893

Escherich, T. (1988)

The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant

Reviews of Infectious Diseases 10(6): 1220-1225

Ewald, K. (2005)

Einastz von Pippetiersystemen im Labor

<http://www.eppendorf.com/script/cms-newspic.php?id=1142&inline=1&col=DOWNLOADFILE>, Datum des Downloads: 28.01.2012

Fajjes, M., Mars, A. E., Smid, E. J. (2007)

Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*

Microbial Cell Factories 6(7)

Fehrenbach, R., Comberbach, M., Petre, J. O. (1992)

Online biomass Mmonitoring by capacitance measurement

Journal of Biotechnology 23(3): 303-314

Flownamics

SegFlow 201D

http://www.flownamics.com/docs/110414_SegFlow_201.pdf, Datum des Downloads: 28.01.2012

Freudl, R. (1992)

Protein secretion in gram-positive bacteria

Journal of Biotechnology 23(3): 231-240

Glajch, J. L., Gluckman, J. C., Charikofsky, J. G., Minos, J. M., et al. (1985)

Simultaneous selectivity optimization of mobile and stationary phases in reversed-phase liquid-chromatography for isocratic separations of phenylthiohydantoin amino-acid derivatives

Journal of Chromatography 318(1): 23-39

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., et al. (1996)

Life with 6000 genes

Science 274(5287): 546-&

Gonzalez, B., J. Francois, Renaud, M. (1997)

A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol

Yeast 13(14): 1347-1355

Grob, M. K., O'Brien, K., Chu, J. J., et al. (2003)

Optimization of cellular nucleotide extraction and sample preparation for nucleotide pool analyses using capillary electrophoresis

Journal of Chromatography B 788(1): 103-111

Hage, K. (2010)

Bioprozessoptimierung und Metabolomanalyse zur Proteinproduktion in *Bacillus licheniformis*.

Dissertation

Fakultät für Maschinenbau, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig

Hajjaj, H., Blanc, P. J., Goma, G., Francois, J. (1998)

Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi

Fems Microbiology Letters 164(1): 195-200

Harris, C. M., Todd, R. W., Bungard, S. J., Lovitt, R. W., et al. (1987)

Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies - a novel method for the real-time estimation of microbial biomass

Enzyme and Microbial Technology 9(3): 181-186

Heijnen, J. J. (2010)

Impact of thermodynamic principles in systems biology

Biosystems Engineering II: Linking Cellular Networks and Bioprocesses 121: 139-162

Henze, N. (2008)

Stochastik für Einsteiger

Springer Vieweg Fachmedien GmbH, Wiesbaden

Herbert, R. A. (1990)

Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments

Methods in Microbiology 22: 1-39

Hiller, J., Franco-Lara, E., Papaioannou, V., Weuster-Botz, D. (2007)

Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling

Biotechnology Letters 29(8): 1161-1167

Hiller, J., Franco-Lara, E., Weuster-Botz, D. (2007)

Metabolic profiling of *Escherichia coli* cultivations: evaluation of extraction and metabolite analysis procedures

Biotechnology Letters 29(8): 1169-1178

Iribarne, J. V. und Thomson, B. A. (1976)

Evaporation of small ions from charged droplets

Journal of Chemical Physics 64(6): 2287-2294

Ishizaki, A., Yamamoto, K., Furuta, Y. (1995)

A new method for the accurate and rapid determination of the concentrations of intracellular metabolites in cells during fermentation

Biotechnology Techniques 9(6): 409-412

Iversen, J. J. L. (1981)

A rapid sampling valve with minimal dead space for laboratory scale fermenters

Biotechnology and Bioengineering 23(2): 437-440

Jessome, L. L. und Volmer, D. A. (2006)

Ion suppression: A major concern in mass spectrometry

LCGC North America 24(5): 83-89

Kebarle, P. und Verkerk, U. H. (2009)

Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now

Mass Spectrometry Reviews 28(6): 898-917

Keilhauer, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1993)

Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* - molecular analysis of the *ilvb-ilvn-ilvc* operon

Journal of Bacteriology 175(17): 5595-5603

Kiefer, P., Delmotte, N., Vorholt, J. A. (2011)

Nanoscale ion-pair reversed-phase HPLC-MS for sensitive metabolome analysis

Analytical Chemistry 83(3): 850-855

Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (2004)

Studies on the amino acid fermentation - Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms

Journal of General and Applied Microbiology 50(6): 331-343

Kruse (2010)

Untersuchung und Verringerung des Leakage während des eiskalten Methanolquenchings

Bachelorarbeit

Fachbereich: Chemie und Biotechnologie, Fachhochschule Aachen, Jülich

Kubitschek, H. E. und Friske, J. A. (1986)

Determination of bacterial-cell volume with the coulter-counter

Journal of Bacteriology 168(3): 1466-1467

Kütting, H. (2011)

Elementare Stochastik

Spektrum Akademischer Verlag, Berlin

Lamotte, S. (2006)

Optimising HPLC disconnections over the stationary phase

Nachrichten Aus Der Chemie 54(4): 439-440

Lange, H. C., Eman, M., van Zuijlen, G., van Dam, J. C., et al. (2001)

Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*

Biotechnology and Bioengineering 75(4): 406-415

Leung, M. Y. K., Liu, C., Koon, J. C. M., Fung, K. P. (2006)

Polysaccharide biological response modifiers

Immunology Letters 105(2): 101-114

Liang, H. R., Foltz, R. L., Meng, M., Bennett, P. (2003)

Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Rapid Communications in Mass Spectrometry 17(24): 2815-2821

Link, H., Anselment, B., Weuster-Botz, D. (2008)

Leakage of adenylates during cold methanol/glycerol quenching of *Escherichia coli*

Metabolomics 4(3): 240-247

Logan, D. (2010)

The introduction of the Futura Biomass Monitor for monitoring conventional and disposable bioreactors

<http://www.aberinstruments.com/static/assets/downloads/Introduction-Futura-Biomass-Monitor-web.pdf>, Datum des Downloads: 28.01.2012

Lottspeich, F. (1998)

Bioanalytik

Spektrum Akademischer Verlag, Berlin

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2011)

Brock Mikrobiologie

Spektrum Akademischer Verlag, Berlin

Maharjan, R. P. und Ferenci, T. (2003)

Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*

Analytical Biochemistry 313(1): 145-154

Mashego, M. R., Gulik, W. M., Heijnen, J. J. (2007)

Metabolome dynamic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to simultaneous rapid perturbations in external electron acceptor and electron donor"

FEMS Yeast Research 7(1): 48-66

Mashego, M. R., van Gulik, W. M., Vinke, J. L., Heijnen, J. J. (2003)

Critical evaluation of sampling techniques for residual glucose determination in carbon-limited chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*

Biotechnology and Bioengineering 83(4): 395-399

Mashego, M. R., van Gulik, W. M., Vinke, J. L., Visser, D. , et al. (2006)

In vivo kinetics with rapid perturbation experiments in *Saccharomyces cerevisiae* using a second-generation BioScope

Metabolic Engineering 8(4): 370-383

Mashego, M. R., Wu, L., van Dam, J. C., Ras, C. et al. (2004)

MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-C-13-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites

Biotechnology and Bioengineering 85(6): 620-628

Molecular Probes

LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit product information sheet

<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07007.pdf>, Datum des Downloads: 28.01.2012

Monod, J. (1949)

The growth of bacterial cultures

Annual Review of Microbiology 3: 371-394

Moritz, B., Striegel, K., de Graaf, A. A., Sahm, H. (2000)

Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo

European Journal of Biochemistry 267(12): 3442-3452

Mottyl, S. (2010)

Modellbasierte Auslegung eines Probenahmeventils mit integrierter Kühlung für Bioreaktoren

Masterarbeit

Fakultät für Maschinenbau, Ruhr-Universität-Bochum, Bochum

Nasution, U., van Gulik, W. M., Kleijn, R. J., van Winden, W. A., et al. (2006)

Measurement of intracellular metabolites of primary metabolism and adenine nucleotides in chemostat cultivated *Penicillium chrysogenum*

Biotechnology and Bioengineering 94(1): 159-166

Nebe-von-Caron, G., Stephens, P. J., Hewitt, C. J., Powell, J. R., et al. (2000)

Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting

Journal of Microbiological Methods 42(1): 97-114

Nipkow, A., Andretta, C., Kappeli, O. (1990)

Biomass estimation in yeast cultivation by means of turbidity measuring probes

Chemie Ingenieur Technik 62(12): 1052-1053

Nyiredy, S., Szucs, Z., Szepesy, L. (2007)

Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: Basic possibilities of serially connected columns using the 'PRISMA' principle

Journal of Chromatography A 1157(1-2): 122-130

Oldiges M. (2005)

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

Dissertation

Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Papula, L. (2006)

Mathematische Formelsammlung für Ingenieure und Naturwissenschaftler

Springer Vieweg Fachmedien GmbH, Wiesbaden

Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A., E., Gimenez, M. N., et al. (1995)

Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16s Ribosomal-RNA gene-sequences

International Journal of Systematic Bacteriology 45(4): 724-728

Persicke, M., Plassmeier, J., Neuweiger, H., Ruckert, C., Pühler, A., et al. (2011)

Size exclusion chromatography - An improved method to harvest *Corynebacterium glutamicum* cells for the analysis of cytosolic metabolites

Journal of Biotechnology 154(2-3): 171-178

Ritter, J. B., Genzel, Y., Reichl, U. (2008)

Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design

Analytical Biochemistry 373(2): 349-369

Robertson, B. R., Button, D. K., Koch, A. L. (1998)

Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry

Applied and Environmental Microbiology 64(10): 3900-3909

Roche Diagnostics GmbH

CASY Model TTC-Cell Counter and Analyse

<http://ebookbrowse.com/gdoc.php?id=254751609&url=0adb1f0faac26869dc690ea0adc29794>,

Datum des Downloads: 28.01.2012

Ruijter, G. J. G. und Visser, J. (1996)

Determination of intermediary metabolites in *Aspergillus niger*

Journal of Microbiological Methods 25(3): 295-302

Ryll, T. und Wagner, R. (1991)

Improved ion-pair high-performance liquid-chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar nucleotides in animal-cells

Journal of Chromatography-Biomedical Applications 570(1): 77-88

Saez, M. J. und Lagunas, R. (1976)

Determination of intermediary metabolites in yeast - critical-examination of effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels"

Molecular and Cellular Biochemistry 13(2): 73-78

Schädel, F. und Franco-Lara, E. (2009)

Rapid sampling devices for metabolic engineering applications

Applied Microbiology and Biotechnology 83(2): 199-208

Schädel, F., David, F., Franco-Lara, E. (2011)"

Evaluation of cell damage caused by cold sampling and quenching for metabolome analysis

Applied Microbiology and Biotechnology 92(6):1261-74

Schaub, J., Schiesling, C., Reuss, M., Dauner, M. (2006)

Integrated sampling procedure for metabolome analysis

Biotechnology Progress 22(5): 1434-1442

Schlegel, H., Drews, G., Lengeler, J. (1999)

Biology of the prokaryotes

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Shin, M. H., Lee, D. Y., Liu, K. H., Fiehn, O., et al. (2010)

Evaluation of sampling and extraction methodologies for the global metabolic profiling of *Saccharophagus degradans*

Analytical Chemistry 82(15): 6660-6666

Shryock, J. C., Rubio, R., Berne, R. M. (1986)

Extraction of adenine-nucleotides from cultured endothelial-cells

Analytical Biochemistry 159(1): 73-81

Sojo, L. E., Lum, G., Chee, P. (2003)

Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS

Analyst 128(1): 51-54

Sonenshein, A., Hoch, J., Losick, R. (2002)

Bacillus subtilis and its closest relatives - from genes to cells

ASM Press, Washington

Sonnleitner, B., Locher, G., Fiechter, A. (1992)

Biomass determination

Journal of Biotechnology 25(1-2): 5-22

Takashima, M., Soda, K., Takada, T. (1988)

Measurement of electric charges at the interface between 2 dielectric layers using an electro-acoustic transducer technique

Transactions on Electrical Insulation 23(2): 287-295

Theobald, U., Mailinger, W., Reuss, M., Rizzi, M. (1993)

In-vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine-nucleotide pool applying a rapid sampling technique

Analytical Biochemistry 214(1): 31-37

Tillack, J., Paczia, N., Leweke, S., Oldiges, M., et al. (2010)

Modellierung und detaillierte Fehleranalyse der Metabolom-Datenprozessierung"

Chemie Ingenieur Technik 82(9): 1556-1557

Tredwell, G. D., Edwards-Jones, B., Leak, D. J., Bundy, J. G. (2011)

The development of metabolomic sampling procedures for *Pichia pastoris*, and baseline metabolome data

Plos One 6(1)

van Ooyen, J. (2010)

Systemische Analyse des Citratzyklus in *Corynebacterium glutamicum*

Dissertation

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf

Villas-Boas, S. G. und Bruheim, P. (2007)

Cold glycerol-saline: The promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells

Analytical Biochemistry 370(1): 87-97

Villas-Boas, S. G., Hojer-Pedersen, J., Akesson, M., Smedsgaard, J. et al. (2005)

Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods

Yeast 22(14): 1155-1169

Visser, D., van Zuylen, G. A., van Dam, J. C., Oudshoorn, A., et al. (2002)

Rapid sampling for analysis of in vivo kinetics using the BioScope: A system for continuous-pulse experiments

Biotechnology and Bioengineering 79(6): 674-681

Volmer, M., Northoff, S., Scholz, S., Thüte, T., et al. (2011)

Fast filtration for metabolome sampling of suspended animal cells

Biotechnology Letters 33(3): 495-502

Walker, G. M. (1998)

Magnesium as a stress-protectant for industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*

Journal of the American Society of Brewing Chemists 56(3): 109-113

Wellerdiek, M., Winterhoff, D., Reule, W., Brandner, J., et al. (2009)

Metabolic quenching of *Corynebacterium glutamicum*: efficiency of methods and impact of cold shock

Bioprocess and Biosystems Engineering 32(5): 581-592

Weuster-Botz, D. (1997)

Sampling tube device for monitoring intracellular metabolite dynamics

Analytical Biochemistry 246(2): 225-233

Wichter, J. (2011)

Untersuchung de L-Cystein-Biosynthese in *Escherichia coli* mit Techniken der Metabolom- und ¹³C-Stoffflussanalyse

Dissertation

Fakultät für Maschinenbau, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig

Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S., Broadhurst, D., et al. (2008)

Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: An evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites

Analytical Chemistry 80(8): 2939-2948

Wittmann, C., Kromer, J. O., Kiefer, P., Binz, T., et al. (2004)

Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria

Analytical Biochemistry 327(1): 135-139

Wu, L., Mashego, M. R., Proell, A. M., Vinke, J. L., et al. (2006)

In vivo kinetics of primary metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* studied through prolonged chemostat cultivation

Metabolic Engineering 8(2): 160-171

Wu, L., Mashego, M. R., van Dam, J. C., Proell, A. M., et al. (2005)

Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly C-13-labeled cell extracts as internal standards

Analytical Biochemistry 336(2): 164-171

Yardley, J. E., Todd, R., Nicholson, D. J., Barrett, J., et al. (2000)

Correction of the influence of baseline artefacts and electrode polarisation on dielectric spectra

Bioelectrochemistry 51(1): 53-65

Yardley, Y. E., Kell, D. B., Barrett, J., Davey, C. L. (2000)

On-line, real-time measurements of cellular biomass using dielectric spectroscopy

Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, Vol 17 17: 3-35

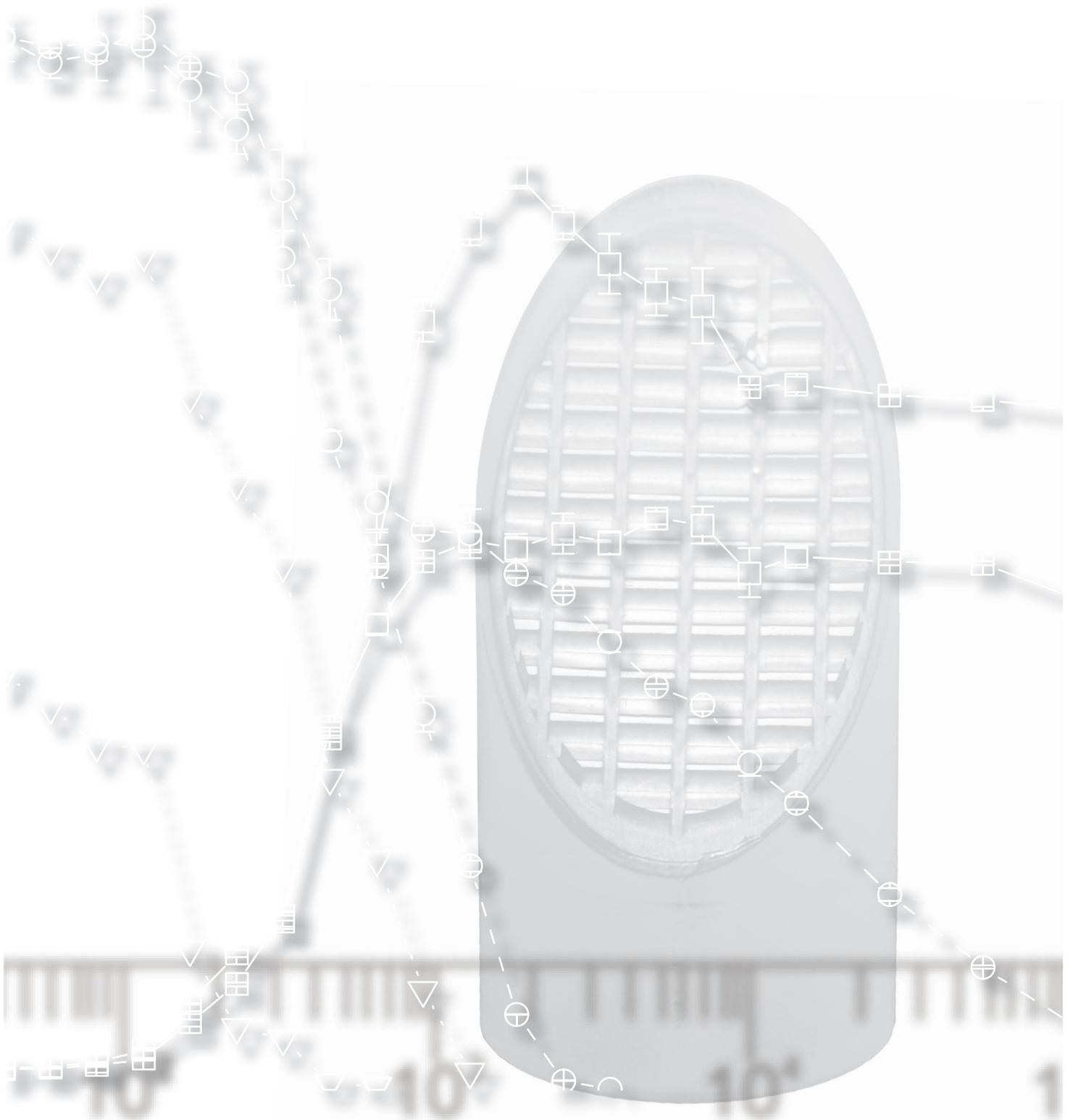
Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oochi, R., et al. (2011)

A novel mechanism regulates H₂S and SO₂ production in *Saccharomyces cerevisiae*

Yeast 28(2): 109-121

Anhang

Seiten I – XXXV



Anhang A – Einleitung

A1. Aktuelle Protokolle zur Metabolomanalyse

**Publikationen ISI web of Knolwedge, Topic = (intracellular metabolome analysis)
Year = (2011), Experimentelle Arbeiten mit Suspensionszellen**

Dunn (Dunn and Winder 2011)

Biologisches System: *Saccharomyces cerevisiae*

10 ml Probe werden in 40 ml 60 % -iges Methanol bei -58°C gegeben und gemischt. Danach erfolgt die Zellseparation mittels Zentrifugation (5 min, -20°C, 4000 g). Der Überstand wird dekantiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Restvolumina werden mit einer Pipette entfernt. Das Pellet wird in 10 ml 0.85 % -iger Natriumchlorid-Lösung resuspendiert, die Zellseparation erfolgt analog zum ersten Zentrifugationsschritt. Danach wird die Biomasse in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Extraktion werden 400 µL 80 % -iges Methanol auf das Pellet gegeben. Die Biomasse wird darin resuspendiert und der Ansatz in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Ausgangsgefäß verbliebene Biomasse wird mit 250 µl Chloroform gelöst und dem Ansatz hinzugefügt. Zusätzlich werden 600 µl Chloroform zugesetzt. Der Ansatz wird gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach für 1 min auf Eis aufgetaut. Der Frier-Tau-Zyklus wird drei Mal wiederholt. Im Anschluss werden Zelltrümmer und Überstand mittels Zentrifugation (15 min, 13000 g) getrennt. Der wässrige Überstand wird abgenommen und mittels GC- oder LC-MS analysiert.

Tredwell (Tredwell, Edwards-Jones et al. 2011)

Biologisches System: *Pichia pastoris*

2 ml Probe werden in 13 ml Quenchinglösung gegeben. Als Quenchinglösung werden 60 % -iges Methanol, 86 % -iges Methanol, 60 % -iges Methanol mit 10 mM Tricine oder 60 % -iges Methanol mit 0.11 M Ammoniumbicarbonat eingesetzt. Nach dem Mischen erfolgt die Zellseparation mittels Zentrifugation (5 min, 5000 g, -19°C). Der Überstand wird dekantiert und die Zellen in 5 ml Quenchinglösung resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wird das Waschen wiederholt. Zur Extraktion wird 60 % -iges Methanol bei -50°C auf die Zellen gegeben, der Ansatz wird gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der gefrorene Ansatz wird für 15 min im Ultraschallbad aufgetaut und im Anschluss erneut zentrifugiert (5 min, 5000 g, -19°C). Der Überstand wird abgenommen und mittels GC-MS analysiert.

Ahmed (Ahmed, Wardel et al. 2011)

Biologisches System: *Escherichia coli* K12 MG1655

5 ml Probe werden in eine Plastikspritze gezogen, die 15 ml 60 % -iges Methanol mit 70 mM HEPES bei -50°C enthält. Der Ansatz wird in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und Zentrifugiert (5 min, 9300 g, 4°C). Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in 500 µl 50 % -igem Methanol mit 0.5 mol cGMP resuspendiert. 2 ml 35 % -ige Perchlorsäure werden zugegeben und der Ansatz bei -80°C eingefroren. Die Probe wird wieder aufgetaut und erneut zentrifugiert (30 min, 9300 g, 4°C). Der Überstand wird in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 1 ml 5 M Kaliumcarbonat-Lösung neutralisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 9300 g, 4°C) wird der Überstand gefriergetrocknet, in einem Acetonitril/Ammoniumacetat-Puffer (9:1) resuspendiert, zentrifugiert (5 min, 9300 g, 4°C) und mittels LC-MS analysiert.

Schädel (Schadel, David et al. 2011)

Biologisches System: *Escherichia coli* K12 MG1655

4 ml Probe werden in 16 ml Quenchinglösung gegeben. Als Quenchinglösung wird 60 % -iges Methanol mit den Additiven HEPES, Glycerin, Natriumchlorid, Glutaraldehyd, Trehalose und Mannitol bei -40°C eingesetzt.

Der Fokus der Untersuchung liegt auf den Folgen des Quenchings, weshalb das Protokoll mit diesem Arbeitsschritt endet.

Persicke (Persicke, Plassmeier et al. 2011)

Biologisches System: *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 und DM 1730

Nach der Probenahme erfolgt die Zellseparation mittels dreier unterschiedlicher Verfahren:

1. 5 ml Probe werden in 45 ml 60 % -iges Methanol bei -58°C gegeben, gemischt und mittels Zentrifugation (15 s, 16100 g, -20°C) getrennt. Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren.
2. 1 ml Probe wird auf eine Cellulosenitrat-Membran mit einer Porenweite von 0.2 µm gegeben und mittels Vakuumfiltration separiert. Der Filterkuchen wird mit 4 ml 0.9 % -iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, die beladene Membran in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.
3. 10 ml Probe werden durch eine Plastikspritze geleitet in mit einer Filterschicht aus Glaskugeln gepackt ist. Die ersten 7 ml des Durchflusses werden verworfen, das übrige Volumen wird direkt in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben, das flüssigen Stickstoff enthält. Diese wird nach dem Einfrieren der Zellen dekantiert.

Die Extraktion der Zellen erfolgt unabhängig von der Separationsmethode mit 80 % -igem Methanol. Zusätzlich werden die im Extraktionsmittel gelösten Zellen in einer Kugelmühle physikalisch aufgeschlossen. Das Extrakt wird evaporisiert und in 800 µl eines Derivatisierungsreagenz resolvatisiert. Die Analyse erfolgt mittels GC-MS.

Kim (Kim, Kaiser et al. 2011)

Biologisches System: *Neurospora crassa* ORS-SL6a

Nach der Probenahme erfolgt die Zellseparation mittels Filtration (Wathman #3 Filterpapier). Der Filterkuchen wird mit Hilfe eines Spatels vom Filter gelöst und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Dieses wird in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Extraktion wird die gefrorene Biomasse mit einem Stößel pulverisiert, 850 µl 50 % -iges Acetonitril werden zugegeben und der Ansatz gemischt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern erfolgt eine Zentrifugation (5 min, 2300 g). Der Überstand wird überführt und evaporisiert. Im Anschluss erfolgt die Resolvatisierung in 700 µl D₂O und die Analyse mittels NMR.

Aranibar (Aranibar, Borys et al. 2011)

Biologisches System: CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen

Nach der Probenahme werden die Zellen mittels Zentrifugation separiert. Das Pellet wird in PBS resolvatisiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wird zwei Mal wiederholt. Für die Extraktion werden die Zellen im sechsfachen des Pelletvolumens an kaltem Methanol resolvatisiert. Zum Zellaufschluss werden Glaskugeln zu dem Ansatz gegeben und dieser für 2 min in einem Homogenisator inkubiert. Zelltrümmer werden mittels Zentrifugation entfernt (10 min, 6000 g, 4°C). Der Überstand wird in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und ein identisches Volumen an Chloroform zugegeben. Der Ansatz wird zentrifugiert (1 h, 1000 g), der wässrige Überstand entnommen und im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur verdampft. Die Proben werden in D₂O resolvatisiert und mittels NMR vermessen

Yoshida (Yoshida, Imoto et al. 2011)**Biologisches System: *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli***

Nach der Probenahme erfolgt die Zellseparation mittels Filtration (Cellulosenitrat-Membran, 0.45 µm Porenweite). Der Filterkuchen wird mit Wasser gewaschen und die beladene Membran danach für 5 min in 1 ml Methanol getaucht. 1 ml Chloroform und 380 µl Wasser werden dem Ansatz hinzugefügt. Der Ansatz wird zentrifugiert, der Überstand filtriert, lyophilisiert und in 50 µl Wasser resuspendiert. Die Analyse erfolgt mittels CE-MS.

Suzuki (Suzuki, Yokoyama et al. 2011)**Biologisches System: *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida utilis***

Siehe Yoshida (Yoshida, Imoto et al. 2011)

Hebert (Hebert, Forquin-Gomez et al. 2011)**Biologisches System: *Kluveromyces lactis***

Nach der Probenahme erfolgt die Zellseparation mittels Zentrifugation. Das Zellpelet wird in 20 ml kaltem Wasser gewaschen. Danach werden die Zellen erneut mittels Zentrifugation separiert. Das Pellet wird in 1 ml 1 % -iger Ameisensäure resuspendiert und für 10 min bei 95°C inkubiert. Die Zelltrümmer werden mittels Zentrifugation entfernt. Das Volumen des Extraktes wird durch Lyophilisation reduziert und mittels LC-MS analysiert.

Kiefer (Kiefer, Delmotte et al. 2011)**Biologisches System: *Methylobacterium extorquens* AM1**

1 ml Probe wird in 4.5 ml Acetonitril mit 0.1 M Ameisensäure gegeben und für 15 min inkubiert. Der Ansatz wird lyophilisiert und in Wasser ($10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) resuspendiert. Die Resuspension wird zentrifugiert (10 min, 20000 g, 4°C) und der Überstand mittels LC-MS analysiert.

Anhang B – Theoretische Grundlagen

B1 Theoretische Grundlagen der Fehleranalyse

Der Gesamtfehler einer Analyse setzt sich aus zufälligen und systematischen Fehler zusammen.

Die Quantifizierung von zufälligen Fehlern erfolgt in der Regel aufgrund von Parallelbestimmungen. Unter der Annahme, dass ein fehlerbehafteter Arbeitsschritt zu einer zufälligen Streuung der Einzelwerte führt und diese Streuung einer Gauß'schen Normalverteilung entspricht, liegt das arithmetische Mittel \bar{x} der Parallelbestimmungen x_i mit einem Stichprobenumfang von n in der Nähe des wahren aber unbekanntes Erwartungswert μ :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{A1})$$

Das arithmetische Mittel geht für einen unendlich großen Stichprobenumfang in den unbekanntes Erwartungswert über:

$$\bar{x} \xrightarrow{n \rightarrow \infty} \mu \quad (\text{A2})$$

Für die Interpretation von Stichproben ist es vor Allem von Interesse, wie weit die jeweiligen Einzelwerte vom Erwartungswert entfernt sind. Ein Maß dafür stellt die Standardabweichung σ dar. Diese bezeichnet die Breite der Verteilung der einzelnen Messwerte um den Erwartungswert. Beide Werte können aus einer endlichen Zahl von Messwerten nicht absolut bestimmt werden, aber es ist möglich aus einer Anzahl von Stichproben einen Schätzwert s (Streuung) für die Standardabweichung anzugeben:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{A3})$$

Für eine unendliche Anzahl an Messwerten konvergiert s gegen σ .

$$s \xrightarrow{n \rightarrow \infty} \sigma \quad (\text{A4})$$

Bei Stichproben, die einer Gauß'schen Normalverteilung entsprechend streuen, gibt die Standardabweichung bzw. Streuung (bei einer endlichen Zahl von Messwerten) an, dass alle Messwerte mit einer Wahrscheinlichkeit von 68.3 % innerhalb der Wertegrenzen $\mu - \sigma$ und $\mu + \sigma$ liegen.

Anhang C – Material und Methoden

C1 Elutionsmittel und -profile

Tabelle C1.1: Analyse von freien Aminosäuren mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	5 % -ige Essigsäure [%]	5 mM Ammoniumacetat , pH 6.0 [%]
10	85	15
17	0	100
25	0	100
29	85	15

Tabelle C1.2: Analyse von Zentralstoffwechselmetaboliten mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	10 mM Tributylamin 15 mM Essigsäure, pH 4,95 [%]	Methanol [%]
4	100	0
6	80	20
12	80	20
13	65	35
14	65	35
15	40	60
16	0	100
18	0	100
18.53	100	0

Tabelle C1.3: Analyse von Zuckerphosphaten, Energiemetaboliten und Redoxäquivalenten mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	10 mM Tributylamin, 15 mM Essigsäure, pH 4,95 [%]	Methanol [%]
2	100	0
5	80	20
8	80	20
10	65	35
14	0	100
15	0	100
15.5	100	0
17	100	0

C2 Analytspektrum

Tabelle C2.1: Freie Aminosäuren

Alanin	Cystein	Glycin	Leucin	Phenylalanin	Tryptophan
Arginin	Cystin	Histidin	Lysin	Prolin	Tyrosin
Asparagin	Glutamat	Homoserin	Methionin	Serin	Valin
Aspartat	Glutamin	Isoleucin	O-Acetyl-Serin	Threonin	

Tabelle C2.2: Zentralstoffwechselmetabolite

2/3-Phosphoglycerat	Fumarat	Pyruvat
6-Phosphogluconat	Glucose-6-Phosphat	Ribose-5-Phosphat
Acetyl CoA	Glycerinaldehyd-3-Phosphat	Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat
ADP		
AMP	Glyoxylat	Sedoheptulose-7-Phosphat
ATP	Isocitrat	Succinat
Cis-Aconitat	Malat	α -Ketoglutarat
Citrat	NAD	
Dihydroxyacetonphosphat	NADH	
Erythrose-4-Phosphat	NADP	
Fructose-1,6-Bisphosphat	NADPH	
Fructose-6-Phosphat	Phosphoenolpyruvat	

Tabelle C2.3: Zuckerphosphate, Energiemetabolite und Redoxäquivalente

2/3-Phosphoglycerat	Fructose-6-Phosphat	NADP
ADP	Fumarat	NADPH
AMP	Glucose-6-Phosphat	Ribose-5-Phosphat
ATP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat	Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat
Dihydroxyacetonphosphat		
Erythrose-4-Phosphat	NAD	Sedoheptulose-7-Phosphat
Fructose-1,6-Bisphosphat	NADH	α -Ketoglutarat

Tabelle C2.4: Organische Säuren

Cis-Aconitat	Glyoxylat	Phosphoenolpyruvat	Succinat
Fumarat	Malat	Pyruvat	α -Ketoglutarat

C3 Berechnung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen

Berechnung nach dem Ausgangsprotokoll

Die Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentration c_{intra} erfordert als Messgrößen die Konzentrationen des Kulturüberstandes c_{cs} , die Konzentration des Quenchingüberstandes c_{qs} , die Konzentration des Extraktes c_{ext} , die Konzentration der Biotrockenmasse c_{cdw} , sowie das Probenvolumen V_{sample} , das Volumen an Quenchinglösung V_{qs} , das Volumen an Extraktionsmittel V_{es} und das spezifische intrazelluläre Volumen V_{intra_spec} .

$$c_{intra} = \frac{(c_{qs} - 0.25 * c_{cs}) * (V_{sample} + V_{qs}) + c_{ext} * (c_{cdw} * V_{intra_spec} * V_{sample} + V_{es})}{c_{cdw} * V_{intra_spec} * V_{sample}} \quad (A5)$$

Berechnung nach dem optimierten Protokoll

Die Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentration c_{intra} nach dem optimierten Protokoll erfordert als Messgrößen die Konzentrationen des Kulturüberstandes c_{cs} , die Konzentration des Quenchingüberstandes c_{qs} , die Konzentration des Extraktes c_{ext} , sowie das Biovolumen V_{bio} , das Probenvolumen V_{sample} , das Volumen an Quenchinglösung V_{qs} , das Volumen an Extraktionsmittel V_{es} und das spezifische intrazelluläre Volumen V_{intra_spec} .

$$c_{intra} = \frac{(c_{qs} - c_{cs}) * (V_{sample} + V_{qs}) + c_{ext} * (V_{bv} + V_{es})}{V_{bv}} \quad (A6)$$

Bei Kenntnis des extrazellulären Restvolumens V_{exf} ist es möglich, dieses in die Berechnung einzubeziehen, indem die Extraktkonzentration um die Stoffmenge korrigiert wird, die im extrazellulären Restvolumen vorlag.

$$c_{ext_kor} = \frac{(c_{ext} * V_{es}) + (c_{ext} * V_{bv}) + (c_{ext} * V_{exf}) - (c_{qs} * V_{exf})}{V_{es}} \quad (A7)$$

C4 Protokolle zur Metabolomanalyse

Tabelle C4.1: Gegenüberstellung des Ausgangs- und Endprotokolls zur Metabolomanalyse Teil 1/2

Arbeitsschritt	Ausgangsmethode	Optimiertes Protokoll
<ul style="list-style-type: none"> • Probevolumen 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • In Vorversuchen wird das Biovolumen [$\mu\text{l ml}^{-1}$] zum Probenahmezeitpunkt bestimmt • Aufgrund des Biovolumens zum wird das Probevolumen so definiert, dass pro Probe (Einfachbestimmung) 20 μl vorliegen.
<ul style="list-style-type: none"> • Quenchingvolumen 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 X Probevolumen • Für eine 6-fach Bestimmung 150 ml in einer Schottflasche 	<ul style="list-style-type: none"> • 3 X Probenvolumen • Pro Einfachbestimmung jeweils ein Falcon (15 oder 50 ml) mit dem entsprechenden Volumen
<ul style="list-style-type: none"> • Quenchinglösung 	<ul style="list-style-type: none"> • 60 %-iges Methanol 	<ul style="list-style-type: none"> • 60 %-iges Methanol
<ul style="list-style-type: none"> • Probenahme 	<ul style="list-style-type: none"> • 50 ml mit einer Spritze 	<ul style="list-style-type: none"> • Pro Einfachbestimmung das bestimmte Probenvolumen mit einer Spritze • Zwischenlagerung in einem Becherglas
<ul style="list-style-type: none"> • Quenching 	<ul style="list-style-type: none"> • 50 ml werden aus der Spritze in die Schottflasche mit Quenchinglösung gegeben • Mischen durch Rühren 	<ul style="list-style-type: none"> • Das bestimmte Probenvolumen einer Einzelbestimmung wird mit einer Pipette in ein Falcon mit Quenchinglösung gegeben • Mischen durch Schütteln
<ul style="list-style-type: none"> • Aliquotieren 	<ul style="list-style-type: none"> • Aliquote von 20 ml Volumen werden aus dem Ansatz durch dekantieren erzeugt • Volumenkontrolle anhand der Skalierung auf den Reaktionsgefäßen 	<ul style="list-style-type: none"> • entfällt
<ul style="list-style-type: none"> • Zellseparation 	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifugation (10 min, 10 000 g, - 20°C) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifugation (5 min, 10 000 g, - 20°C)

Tabelle C4.2: Gegenüberstellung des Ausgangs- und Endprotokolls zur Metabolomanalyse Teil 2/2

Arbeitsschritt	Ausgangsmethode	Optimiertes Protokoll
<ul style="list-style-type: none"> Quenching-überstand 	<ul style="list-style-type: none"> 1 ml abnehmen und filtrieren (0.22 µm) Rest dekantieren 	<ul style="list-style-type: none"> 1 ml abnehmen und filtrieren (0.22 µm) Rest dekantieren
<ul style="list-style-type: none"> Extraktionsmittel 	<ul style="list-style-type: none"> Methanol/TE-Puffer 	<ul style="list-style-type: none"> Methanol/TE-Puffer
<ul style="list-style-type: none"> Extraktionsmittelvolumen 	<ul style="list-style-type: none"> 2 ml 	<ul style="list-style-type: none"> Das 50-fache des Biovolumens im Pellet (z.B. 20 µl Biovolumen entsprechen 1000 µl Extraktionsmittel)
<ul style="list-style-type: none"> Zellyse 	<ul style="list-style-type: none"> 2 ml Chloroform 	<ul style="list-style-type: none"> Extraktionsmittelvolumen an Chloroform
<ul style="list-style-type: none"> Extraktion 	<ul style="list-style-type: none"> Zugabe von Extraktionsmittel und Chloroform Resuspension Inkubation (2 h, -20°C Überkopfschüttler) 	<ul style="list-style-type: none"> Zugabe von Extraktionsmittel und Chloroform Resuspension Inkubation (2 h, -20°C, Überkopfschüttler)
<ul style="list-style-type: none"> Extraktseparation 	<ul style="list-style-type: none"> Zentrifugation (10 min, 10 000 g, -20°C) Oberphase abnehmen und filtrieren 	<ul style="list-style-type: none"> Überführen des Ansatzes in ein 2 ml Reaktionsgefäß Zentrifugation (5 min, 13 000 g, -20°C) Oberphase abnehmen und filtrieren
<ul style="list-style-type: none"> Analyse 	<ul style="list-style-type: none"> Anwendung von mehreren Analyseverfahren auf eine Probe linearer Messbereich = 0.025 – 100 µM 	<ul style="list-style-type: none"> Aliquotierung der Probe für die Anwendung mehrerer Analyseverfahren linearere Messbereich entsprechend auftretenden Suppressions-effekten

Anhang D – Biomassebestimmung

D1 Einfluss der Leitfähigkeit auf die Messung der Zellgröße

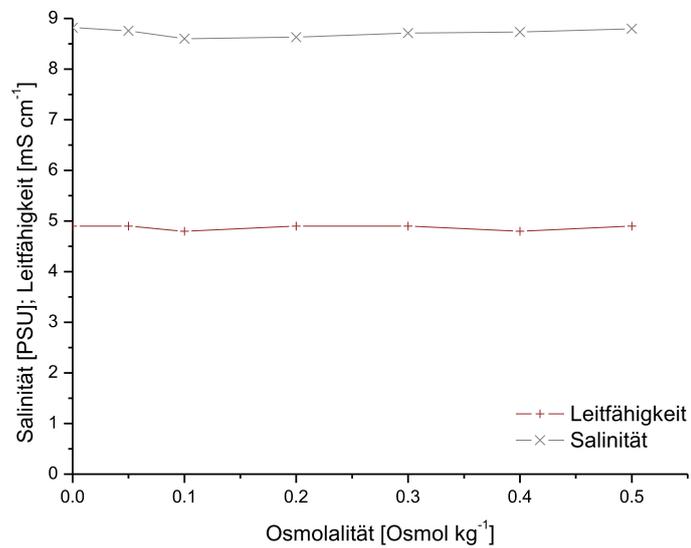


Abbildung D1: Salinität und Leitfähigkeit gegen die Erhöhung der Osmolalität bei den verwendeten Messlösungen.

Anhang E – Probenahme

E1 Volumenbestimmung mittels interner Standards

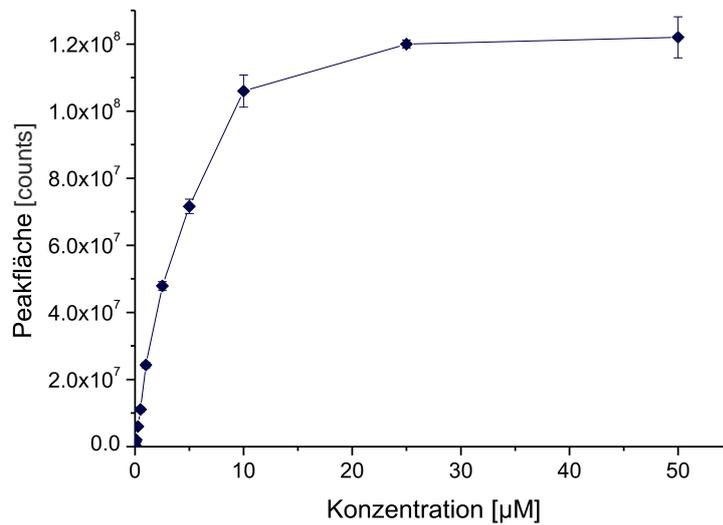


Abbildung E1: Peakintensität gegen die eingesetzte Konzentration von Maleat bei der Messung mittels LC-ESI-MS/MS.s

Tabelle E1.1: Volumenbestimmung durch Messung der Konzentration an internem Standard in Quenching-überständen. Gezeigt sind die absolute Peakfläche des internen Standards Maleat in den Proben und die aus den Peakflächen berechneten Verdünnungsfaktoren und Probenvolumina.

	Peakfläche Maleat in der Probe [counts]	Verdünnungsfaktor [-]	Probenvolumen [ml]
Probe 1	$8.68 \cdot 10^6$	0.27	11.28
Probe 2	$8.52 \cdot 10^6$	0.28	11.64
Probe 3	$8.41 \cdot 10^6$	0.28	11.89
Probe 4	$8.96 \cdot 10^6$	0.26	10.67
Probe 5	$8.89 \cdot 10^6$	0.27	10.82

Tabelle 1: Volumenbestimmung durch Messung der Konzentration an internem Standard in Proben, die in Probenahmegefäßen mit internem Standard abgefüllt wurden. Gezeigt sind die absolute Peakfläche des internen Standards cAMP in den Proben, die aus den Peakflächen berechneten Aliquotvolumina und die relative Abweichung von Sollvolumen.

	Peakfläche cAMP in der Probe [counts]	Aliquotvolumen [ml]	Abweichung [%]
Aliquot 1	1.55×10^7	11.61	16.01
Aliquot 2	1.53×10^7	11.65	16.48
Aliquot 3	1.65×10^7	11.39	13.9
Aliquot 4	1.54×10^7	11.64	16.35
Aliquot 5	1.78×10^7	11.1	11.07

Anhang F – Quenching

F1 Exometabolomanalyse in Batchkulturen

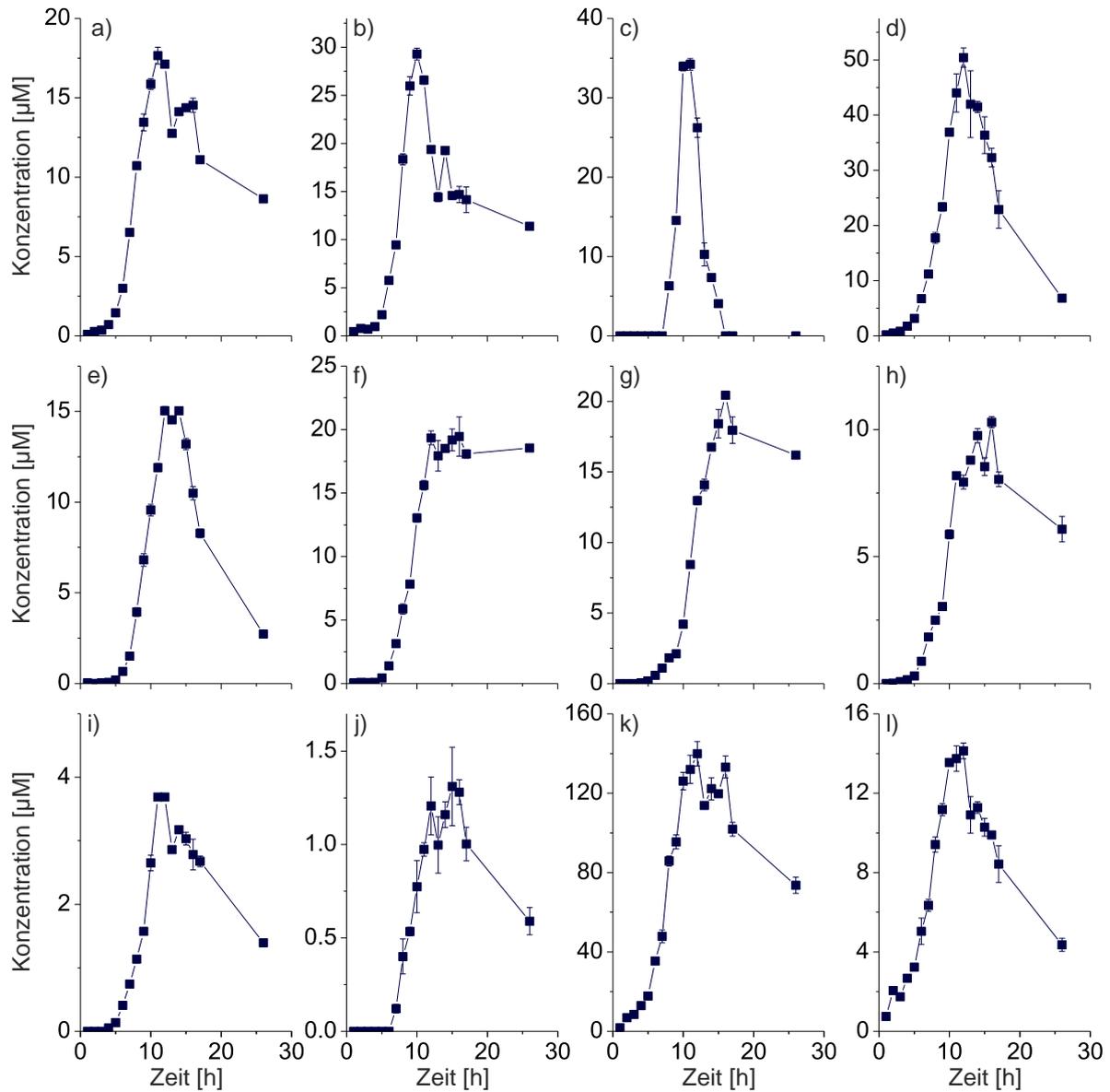


Abbildung F1.1 Teil 1/3: Vollständige Exometabolomanalyse im Verlauf einer *E. coli* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Fructose-1,6-Bisphosphat (c), Dihydroxyacetonphosphat (d), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (e), 2/3-Phosphoglycerat (f), Phosphoenolpyruvat (g), Ribose-5-Phosphat (h), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat (i), Erythrose-4-Phosphat (j), Citrat (k), Cis-Aconitat (l)

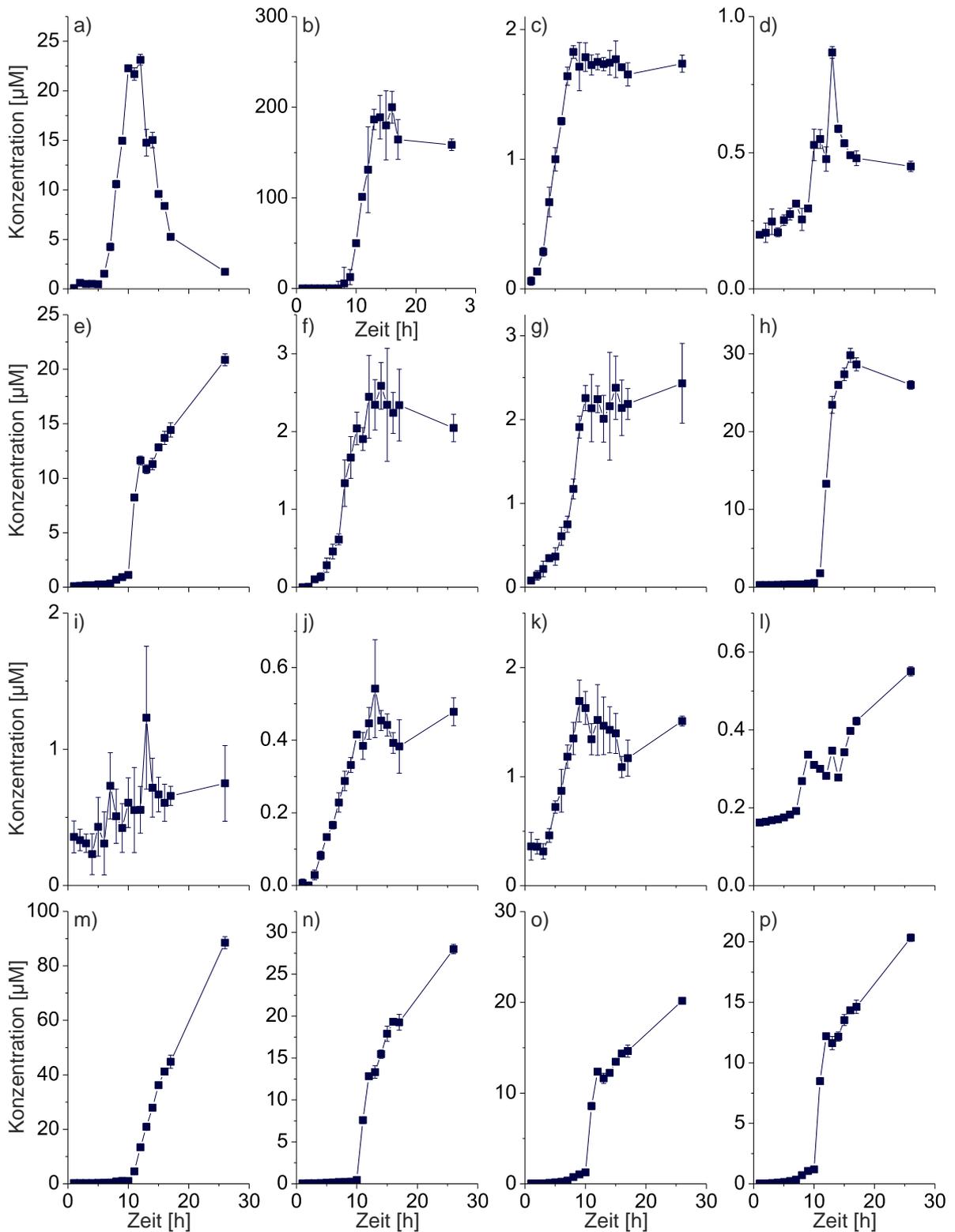


Abbildung F1.1 Teil 2/3: Vollständige Exometabolomanalyse im Verlauf eine *E. coli* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l^{-1} Glucose. Mit Isocitrat (a), α -Ketoglutarat (b), Fumarat (c), O-Acetyl-Serin (d), Aspartat (e), Threonin (f), Homoserin (g), Tyrosin (h), Glycin (i), Prolin (j), Alanin (k), Methionin (l), Valin (m), Phenylalanin (n), Isoleucin (o), Leucin (p).

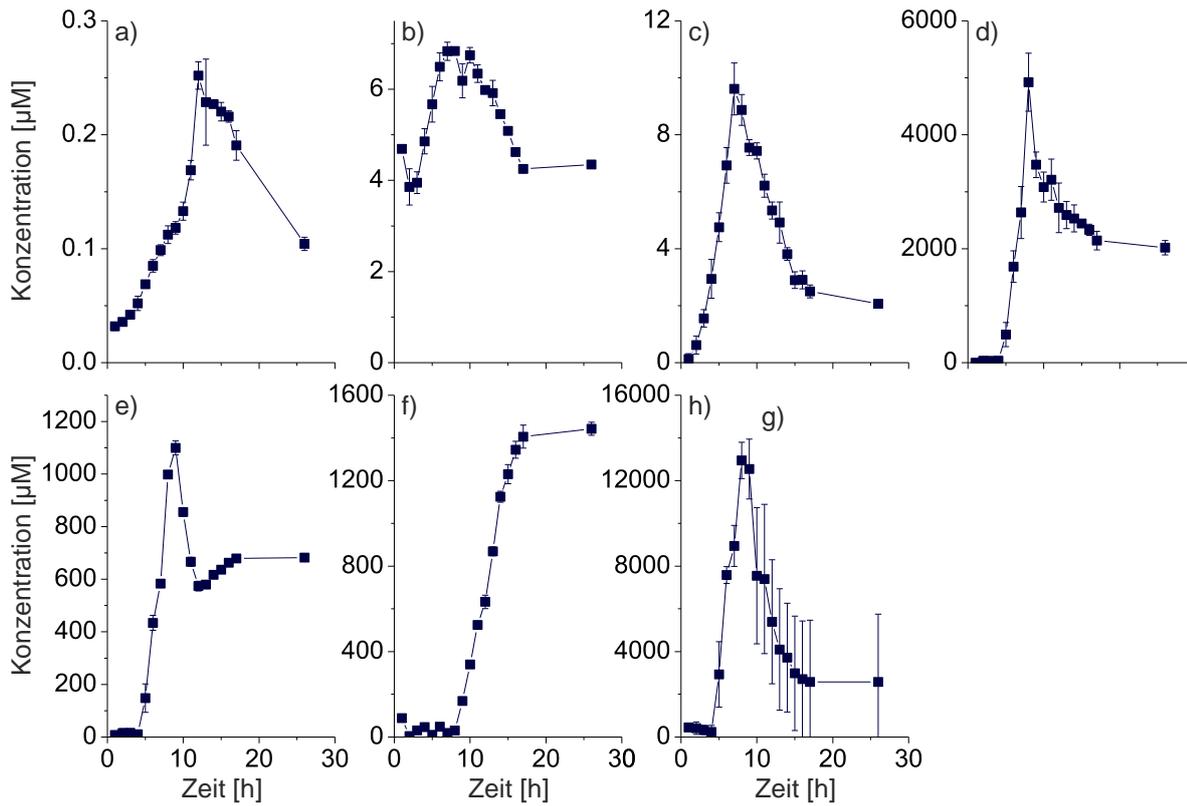


Abbildung F1.1 Teil 3/3: Vollständige Exometabolomanalyse im Verlauf einer *E. coli* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit Tyrosin (a), Histidin (b), Arginin (c), Pyruvat (d), Orotat (e), Urazil (f) und Acetat (g)

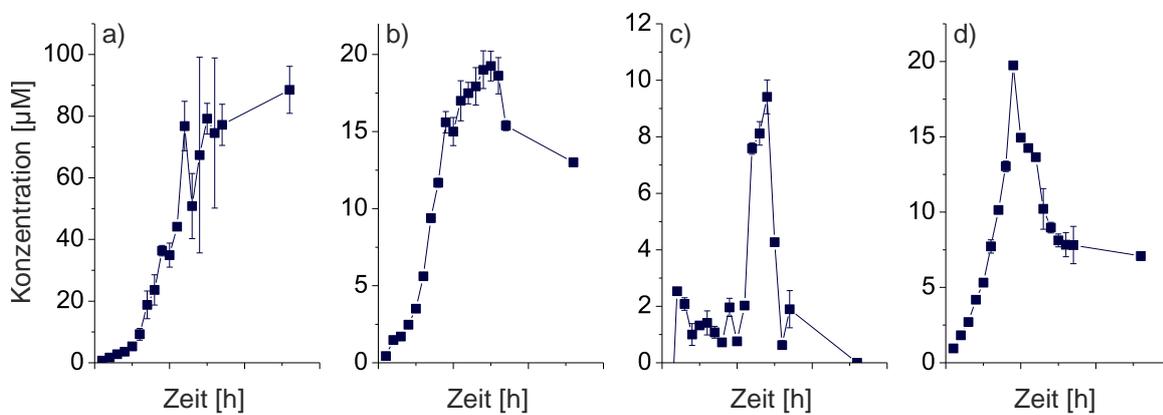


Abbildung F1.2 Teil 1/3: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *B. licheniformis* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Fructose-1,6-Bisphosphat (c) und Dihydroxyacetonphosphat (d).

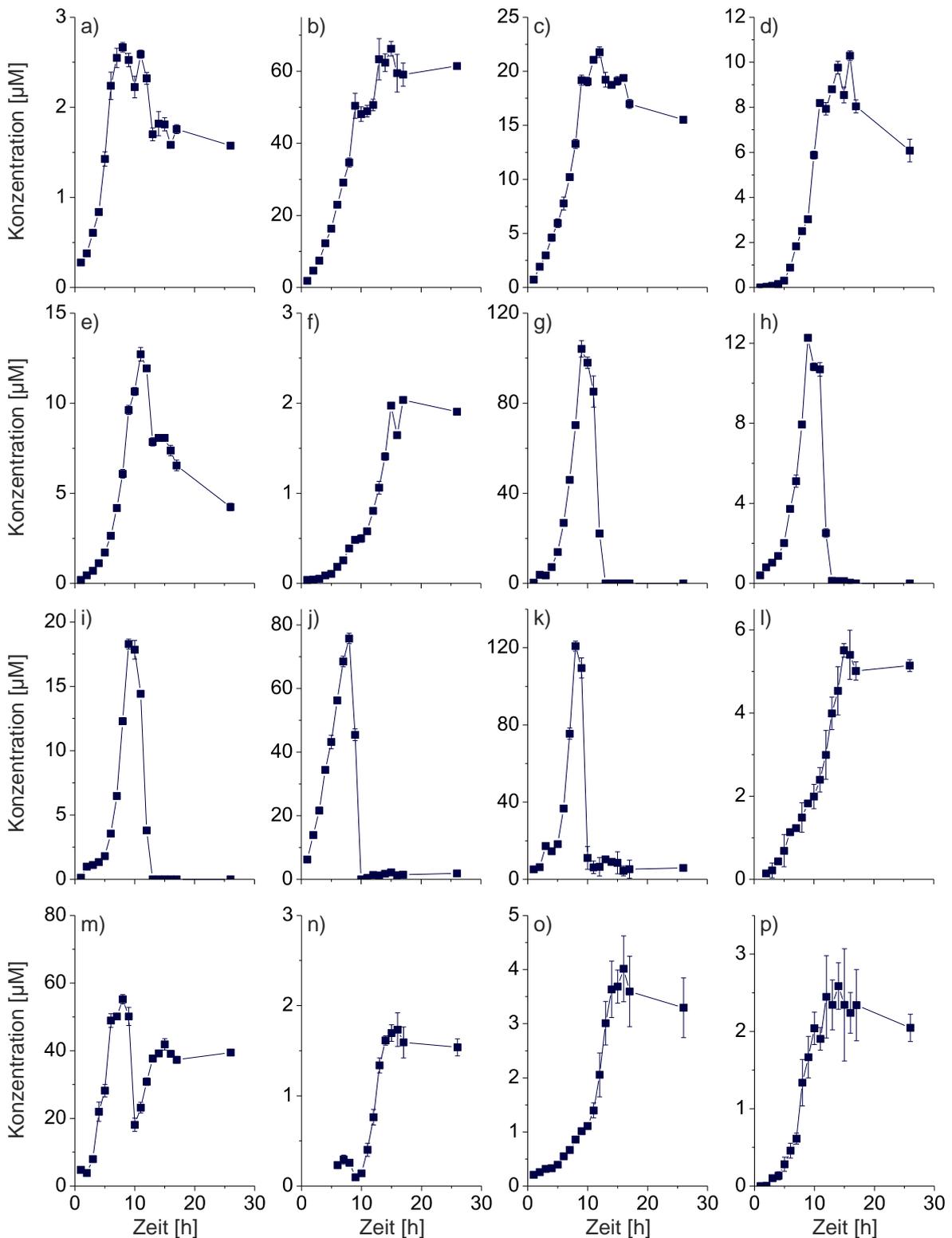


Abbildung F1.2 Teil 2/3: Exometabolomanalyse im Verlauf eine *B. licheniformis* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l^{-1} Glucose. Mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat (a), 2/3-Phosphoglycerat (b), Phosphoenolpyruvat (c), Ribose-5-Phosphat (d), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat (e), Erythrose-4-Phosphat (f), Citrat (g), Cis-Aconitat (h), Isocitrat (i), α -Ketoglutarat (j), Fumarat (k), Asparagin (l), Glutamat (m), Serin (n), Aspartat (o) und Threonin (p).

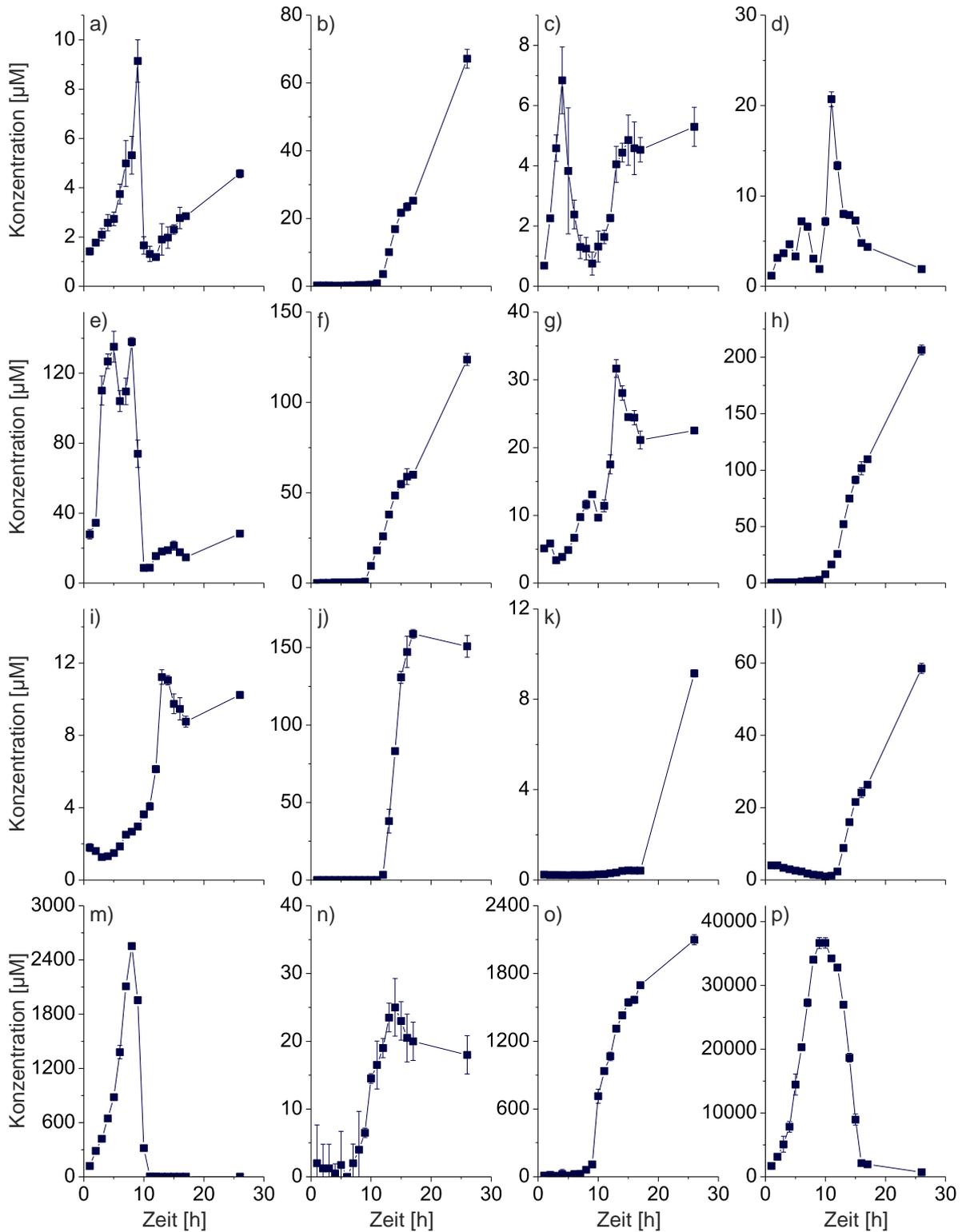


Abbildung F1.2 Teil 3/3: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *B. licheniformis* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l⁻¹ Glucose. Mit Homoserin (a), Tyrosin (b), Glycin (c), Prolin (d), Alanin (e), Methionin (f), Valin (g), Phenylalanin (h), Leucin/Isoleucin (i), Lysin (j), Tryptophan (k), Histidin (l), Pyruvat (m), Orotat (n), Urazil (o) und Acetat (p)

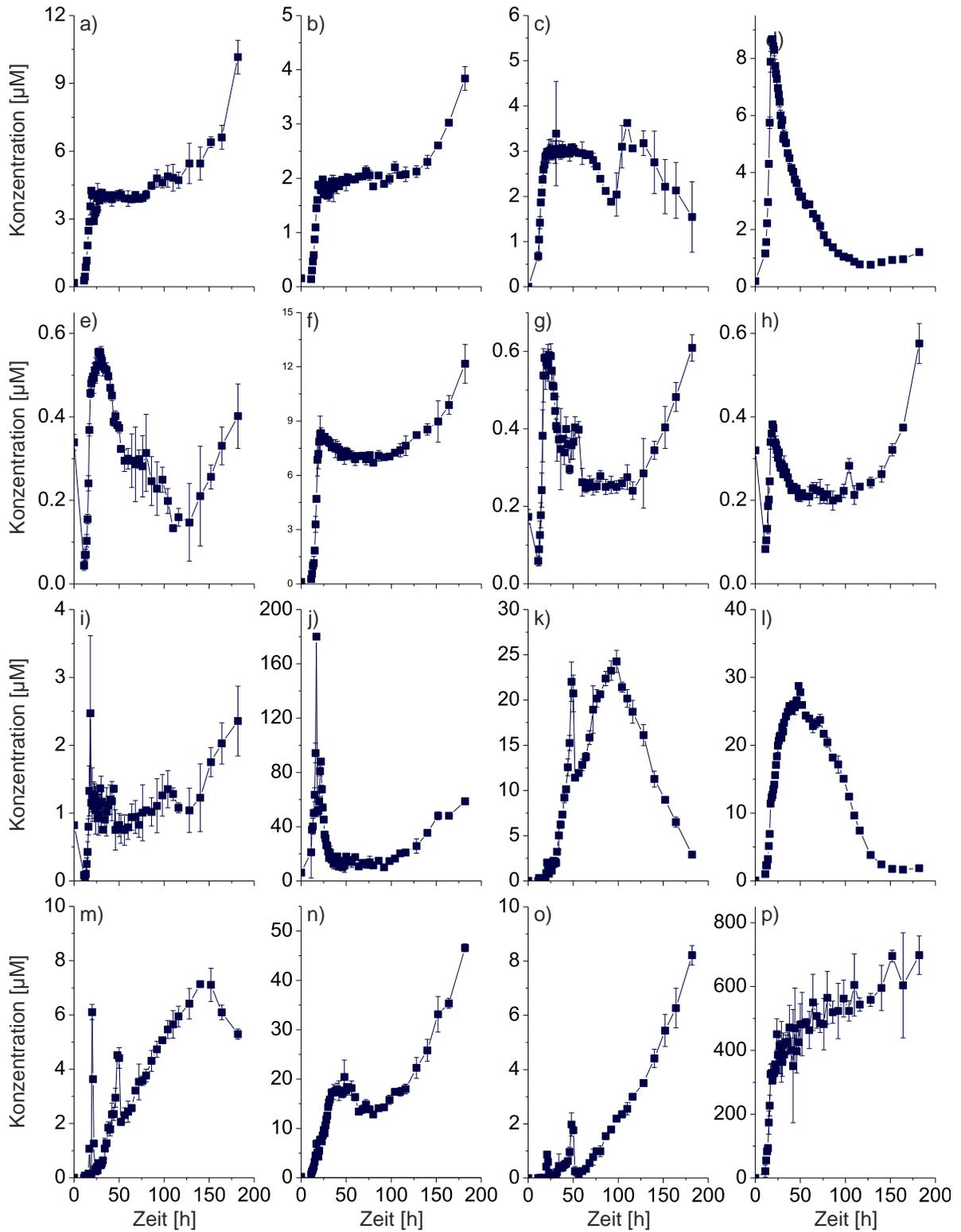


Abbildung F1.3 Teil 1/2: Exometabolomanalyse im Verlauf eine *C. glutamicum* DM 1800 Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 10 g l^{-1} Glucose. Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Fructose-1,6-Bisphosphat (c), Dihydroxyacetonphosphat (d), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (e), 2/3-Phosphoglycerat (f), Ribose-5-Phosphat (g), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat (h), Erythrose-4-Phosphat (i), Glutamat (j), Serin (k) Aspartat (l), Threonin (m), Homoserin (n), Tyrosin (o), und Glycin (p).

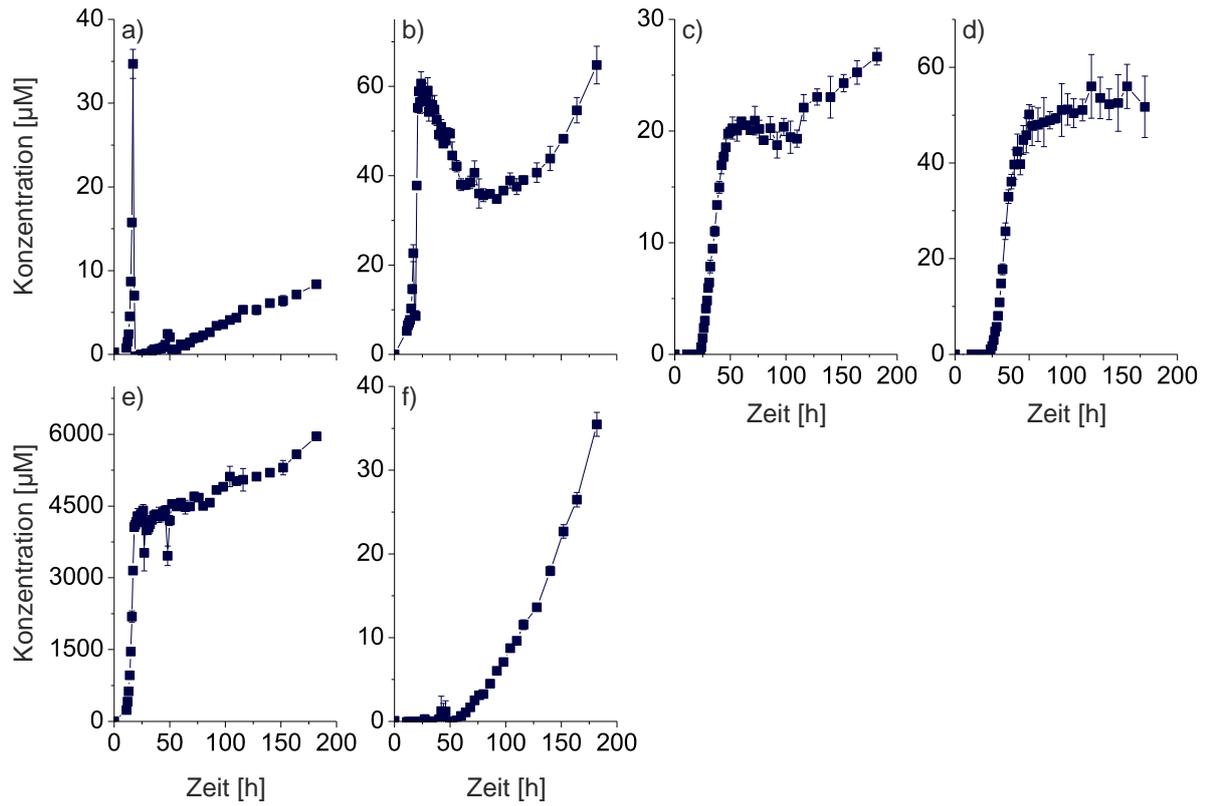


Abbildung F1.3 Teil 2/2: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *C. glutamicum* DM 1800 Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 10 g l^{-1} Glucose. Mit Prolin (a), Alanin (b), Methionin (c), Arginin (d), Lysin (e) und Valin (f).

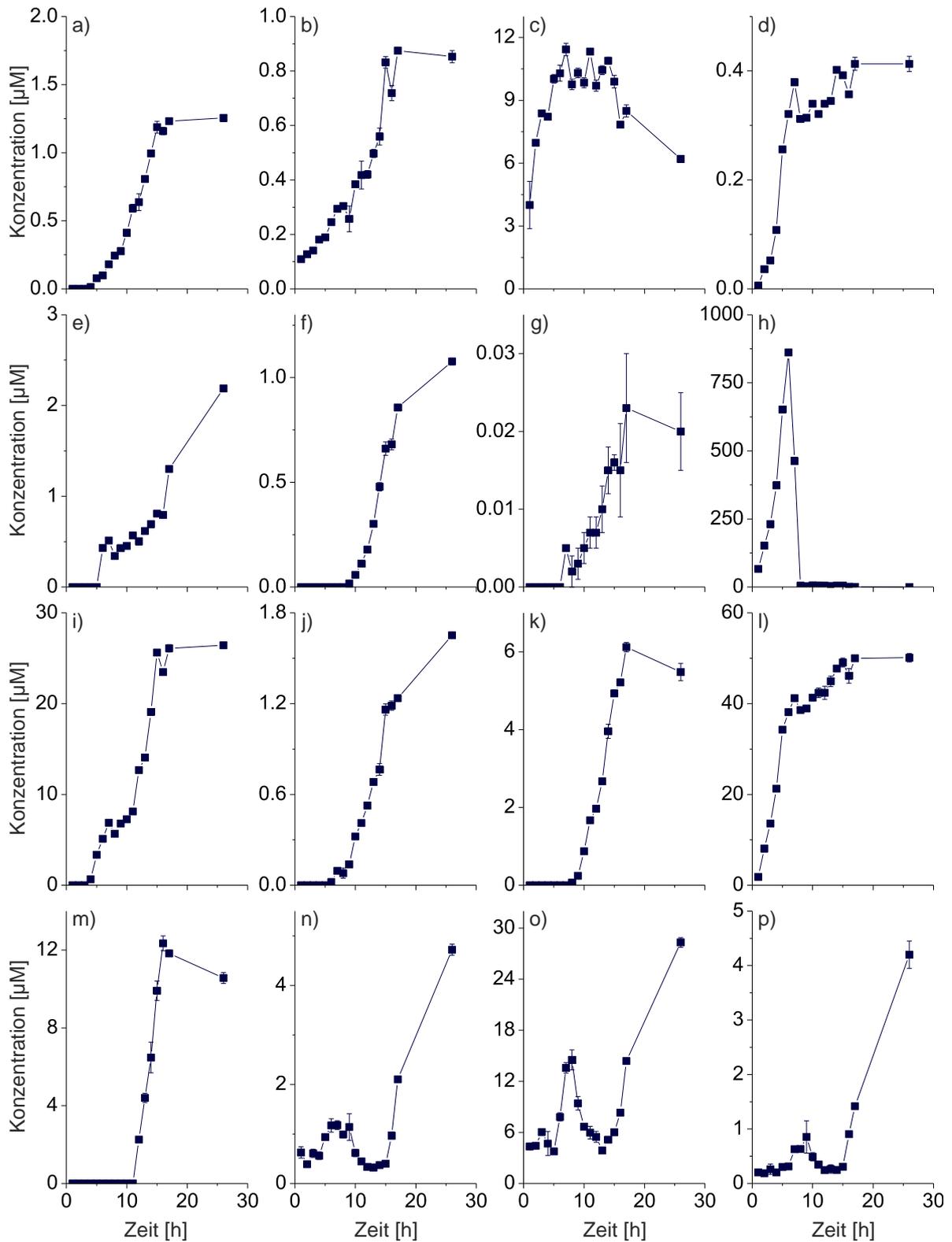


Abbildung F1.4 Teil 1/2: Exometabolomanalyse im Verlauf eine *S. cerevisiae* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l^{-1} Glucose. Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Fructose-1,6-Bisphosphat (c), Dihydroxyacetonphosphat (d), 2/3-Phosphoglycerat (e), Phosphoenolpyruvat (f), Ribulose-5-Phosphat/ Xylulose-5-Phosphat (g), Pyruvat (h), Citrat (i), Cis-Aconitat (j), Isocitrat (k), α -Ketoglutarat (l), Fumarat (m), Asparagin (n), Glutamat (o) und Aspartat (p).

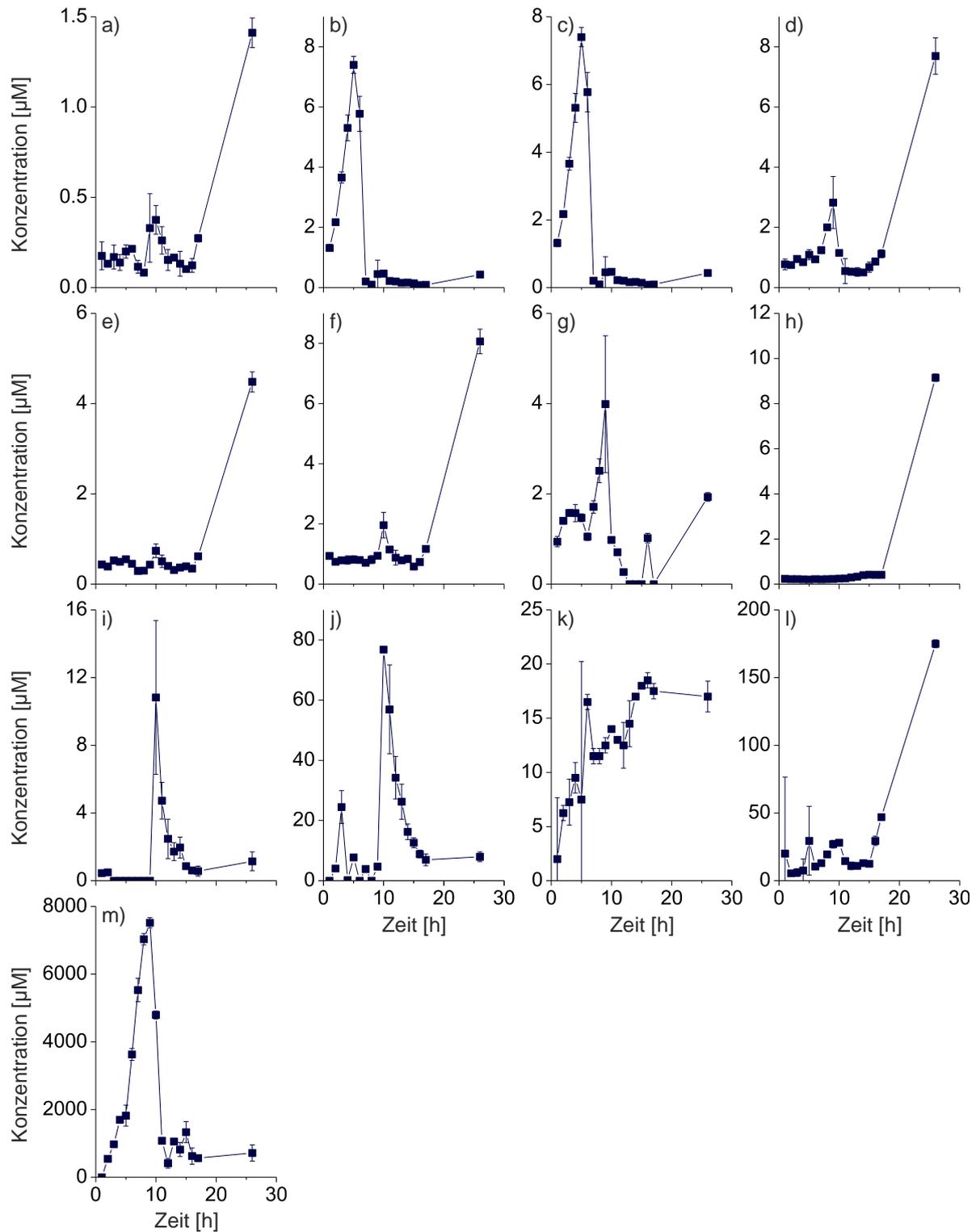


Abbildung F1.4: Exometabolomanalyse im Verlauf einer *S. cerevisiae* Batchkultivierung auf Minimalmedium mit 16 g l^{-1} Glucose. Mit Tyrosin (a), Prolin (b), Alanin (c), Valin (d), Phenylalanin (e), Leucin/Isoleucin (f), Lysin (g), Threonin (h), Histidin (i), Arginin (j), Orotat (k), Urazil (l) und Acetat (m).

F2 Untersuchung des Austritts intrazellulärer Metabolite während der Probenahme

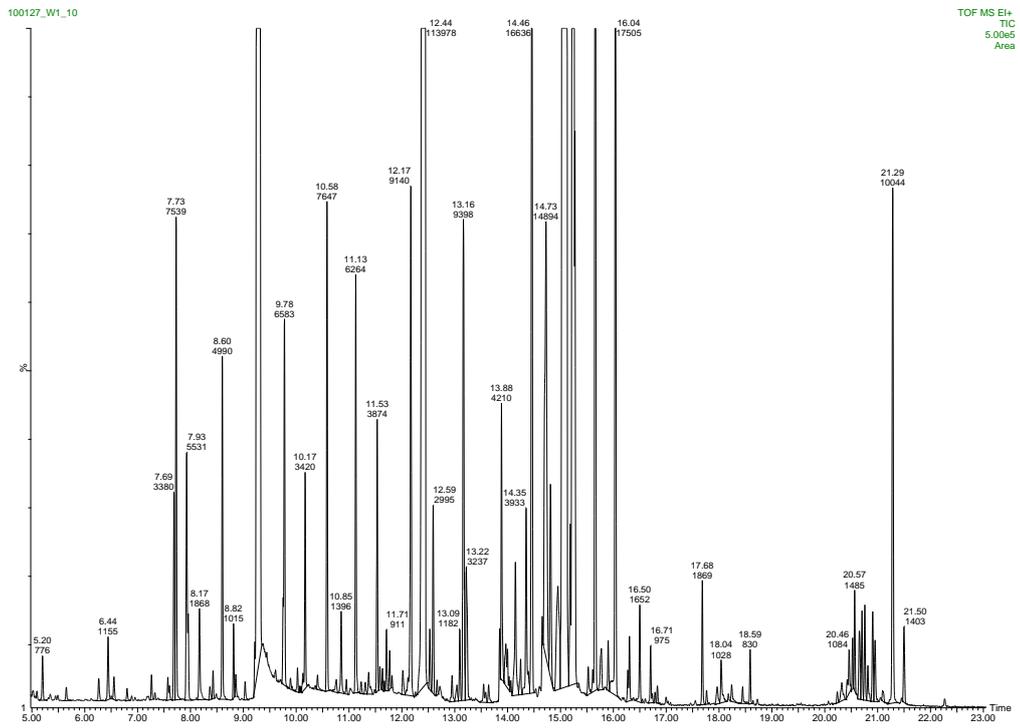


Abbildung F2.1: GC-TOF-MS-Chromatogramm des Kulturüberstandes

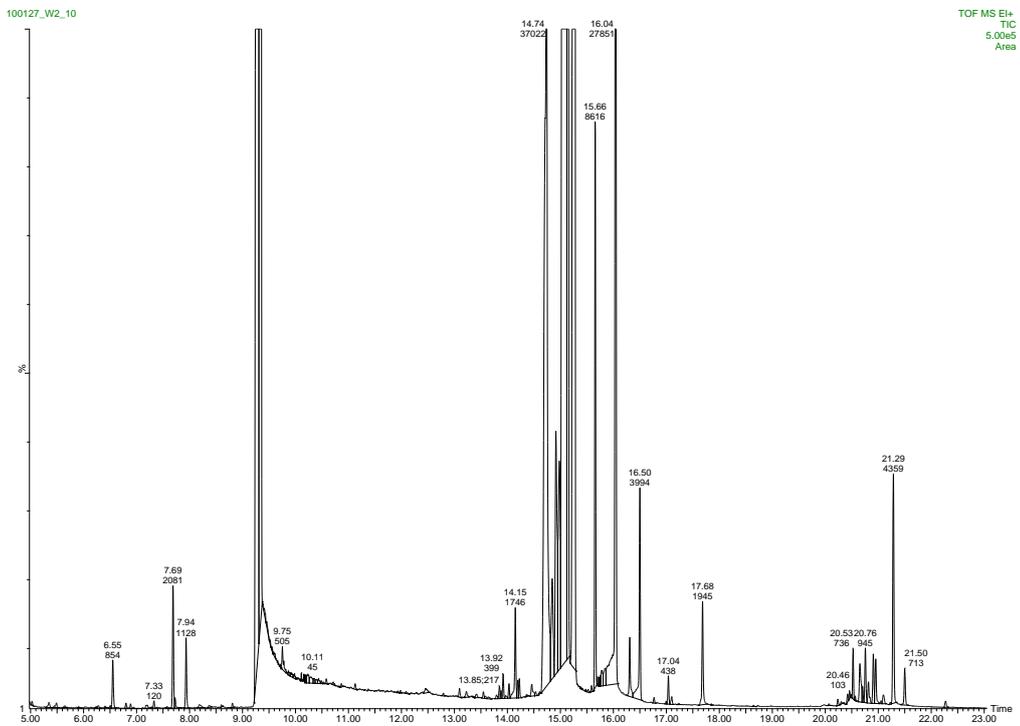


Abbildung F2.2: GC-TOF-MS-Chromatogramm der ersten Waschlösung

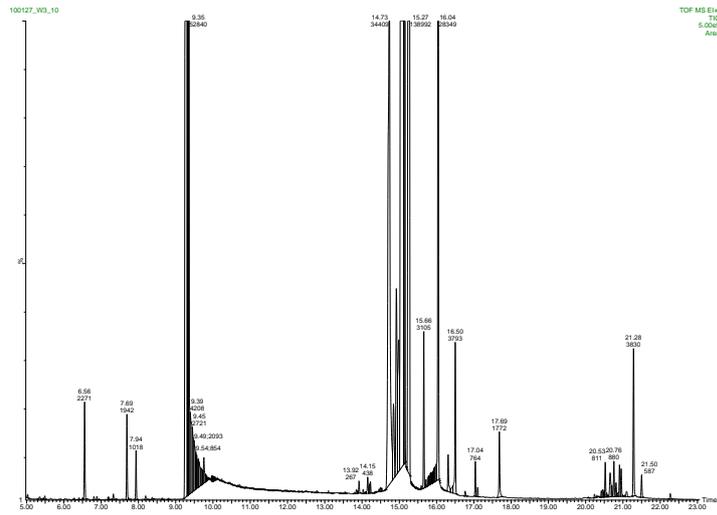


Abbildung F2.3: GC-TOF-MS-Chromatogramm der zweiten Waschlösung.

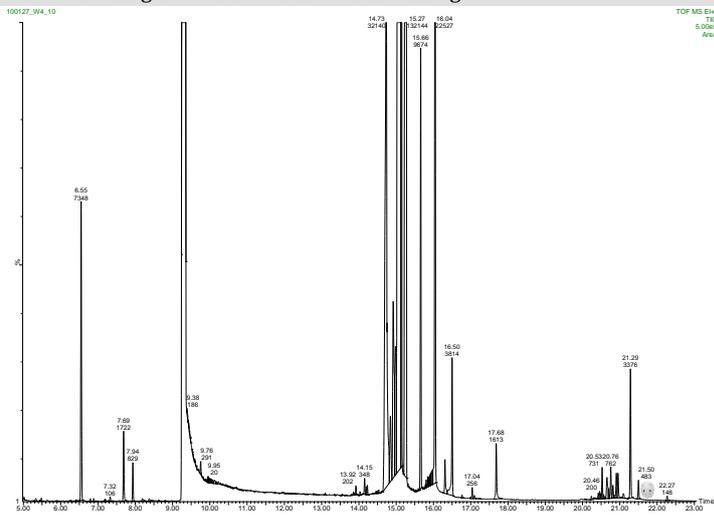


Abbildung F2.4: GC-TOF-MS-Chromatogramm des Zentrifugats

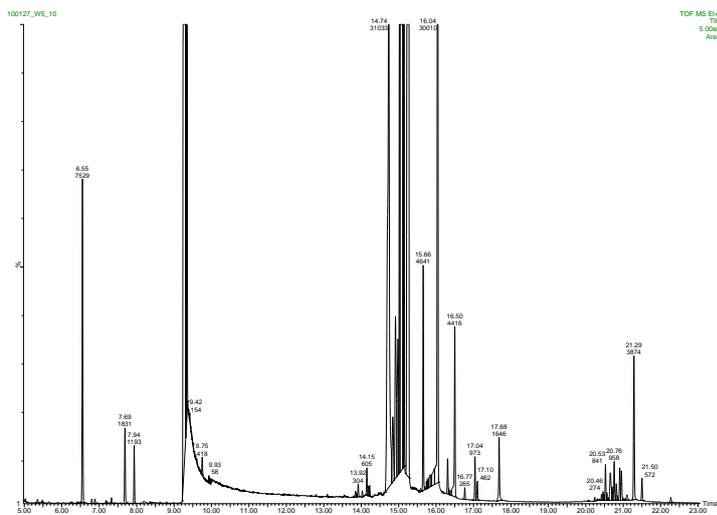


Abbildung F2.4: GC-TOF-MS-Chromatogramm des Filtrats

F3 Das Exometabolom bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen

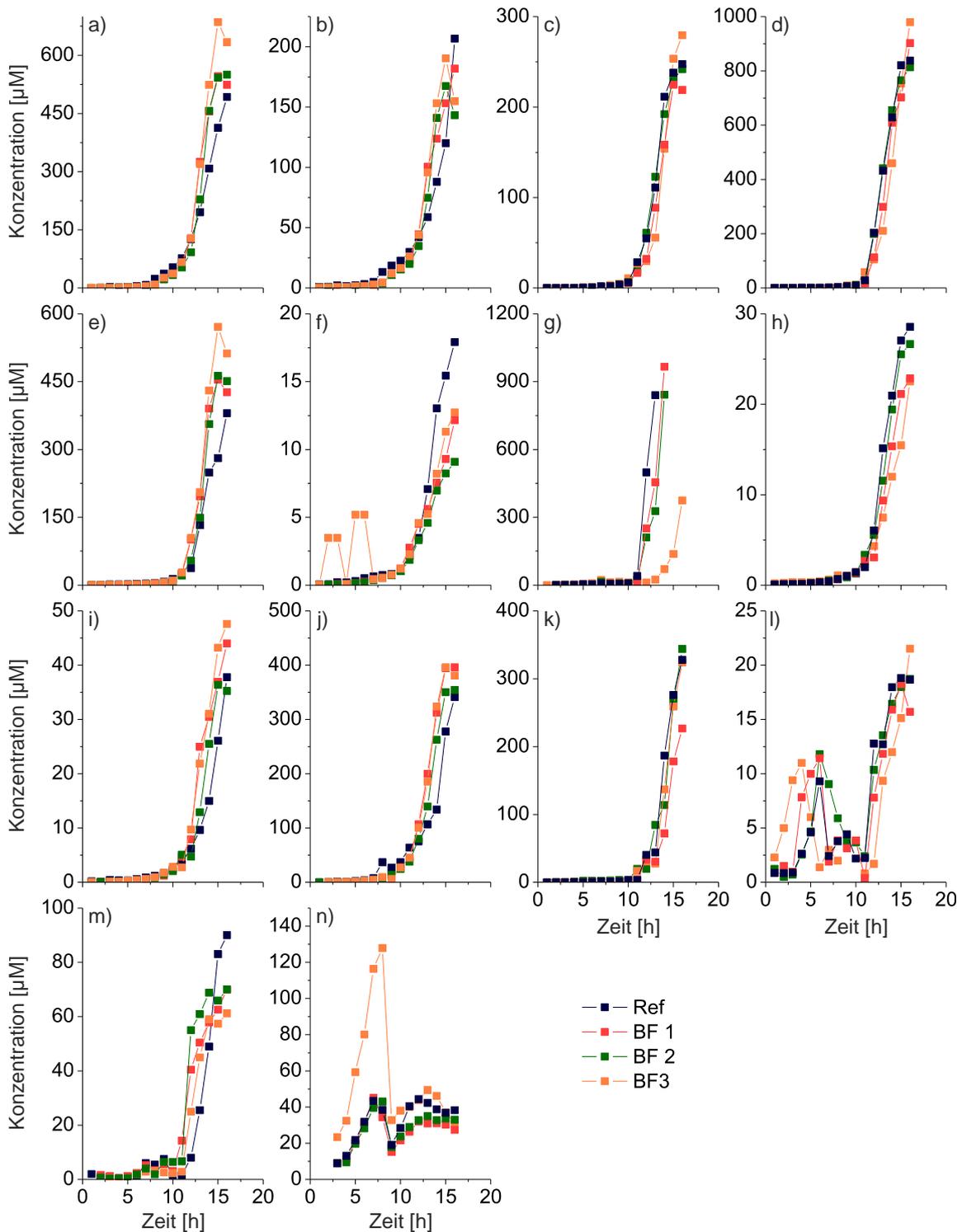


Abbildung F3.1: Exometabolomanalyse im Verlauf von vier parallelen Batchkultivierungen von *E. coli* auf Minimalmedium mit 40 g l^{-1} Glucose. In drei Kultivierungen wurde Betain mit einer Feed-Konzentration von 1.2 g l^{-1} (BF 1), 2.4 g l^{-1} (BF 2) oder 3.6 g l^{-1} (BF 3) sowie einer Feed-Rate von 3 ml h^{-1} supplementiert. Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (c), Dihydroxyacetonphosphat (d), 2/3-Phosphoglycerat (e), Phosphoenolpyruvat (f), Pyruvat (g), Ribose-5-Phosphat (h), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat (i), Erythrose-4-Phosphat (j), α -Ketoglutarat (k), Succinat (l), Fumarat (m) und Acetat (n).

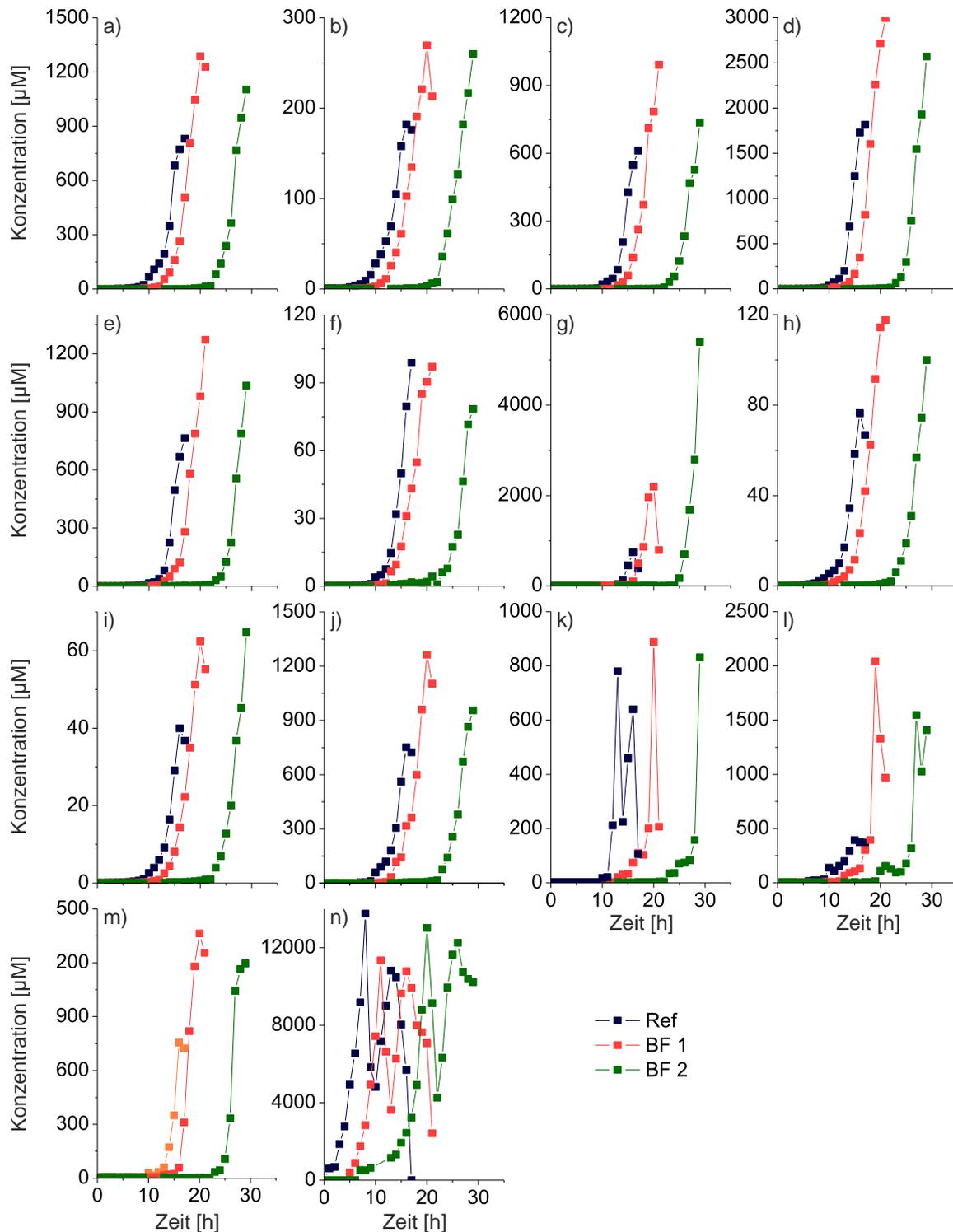


Abbildung F3.2: Durch Betainzugabe wurde die Osmolalität der Medien zweier Kulturen gegenüber der Referenzkultur (Ref) um $0.25 \text{ Osmol kg}^{-1}$ (BV 1) bzw. $0.5 \text{ Osmol kg}^{-1}$ erhöht. Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (c), Dihydroxyacetonphosphat (d), 2/3-Phosphoglycerat (e), Phosphoenolpyruvat (f), Pyruvat (g), Ribose-5-Phosphat (h), Ribulose-5-Phosphat/Xylulose-5-Phosphat (i), Erythrose-4-Phosphat (j), α -Ketoglutarat (k), Succinat (l), Fumarat (m) und Acetat (n).

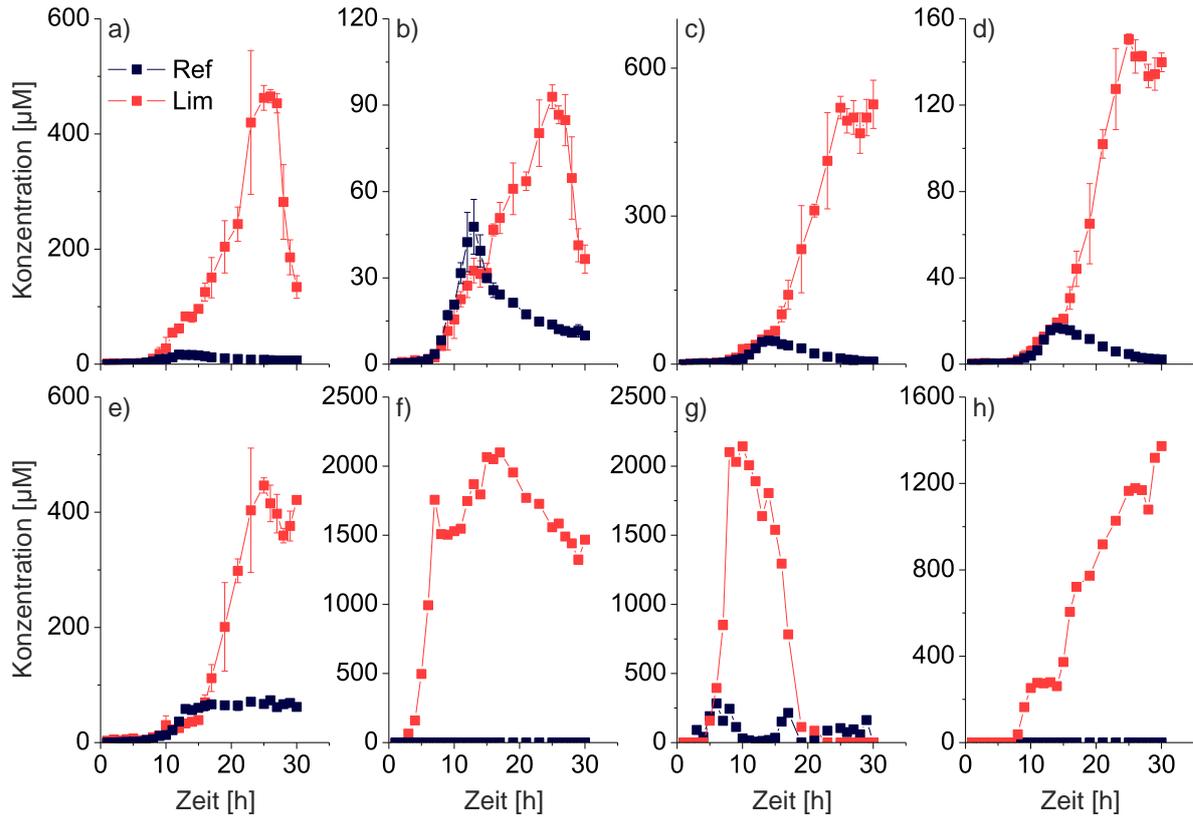


Abbildung F3.3: Exometabolomanalyse im Verlauf von zwei parallelen Batchkultivierungen von *E. coli* auf Minimalmedium mit 40 g l^{-1} Glucose. In einer der Kultivierungen wurde die Biomassebildung gegenüber der Referenzkultur (Ref) durch Reduktion der Ammoniumsulfatkonzentration auf 2.5 g l^{-1} limitiert (Lim). Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Dihydroxyacetonphosphat (c), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (d), 2/3-Phosphoglycerat (e), Citrat (f), Pyruvat (g) und Urazil (h).

F4 Zerfallskurven von Metaboliten der Glykolyse

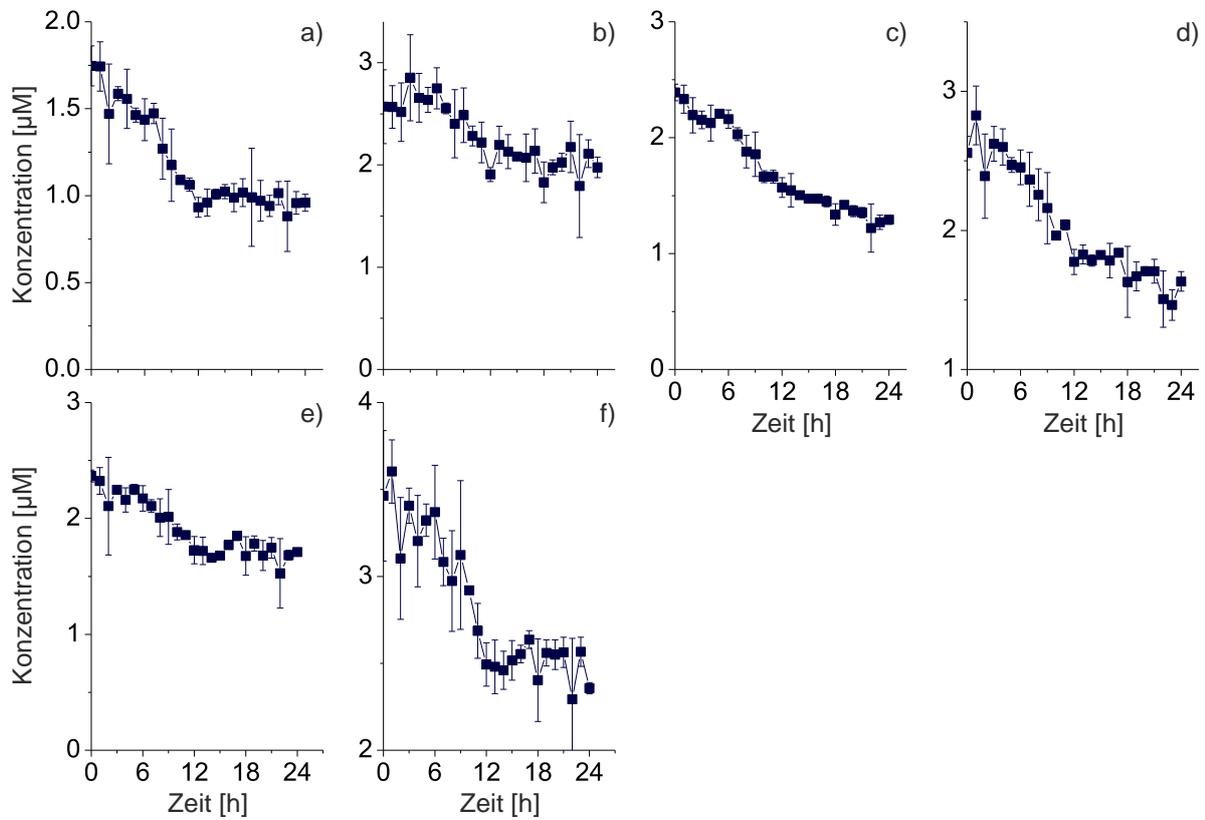


Abbildung F4.1: Stabilität von Metaboliten der Glykolyse in serifiltriertem Kulturüberstand von *E. coli*, der bei $t = 0$ h mit einer Konzentration von $1.25 \mu\text{M}$ gespikt und danach für 24 h bei 37°C inkubiert wurde. Mit Glucose-6-Phosphat (a), Fructose-6-Phosphat (b), Dihydroxy-acetonphosphat (c), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (d), 2/3-Phosphoglycerat (e) und Phosphoenolpyruvat (f).

Anhang G – Analytik

G1 LC-ESI-MS/MS-Analyse in komplexen Matrices

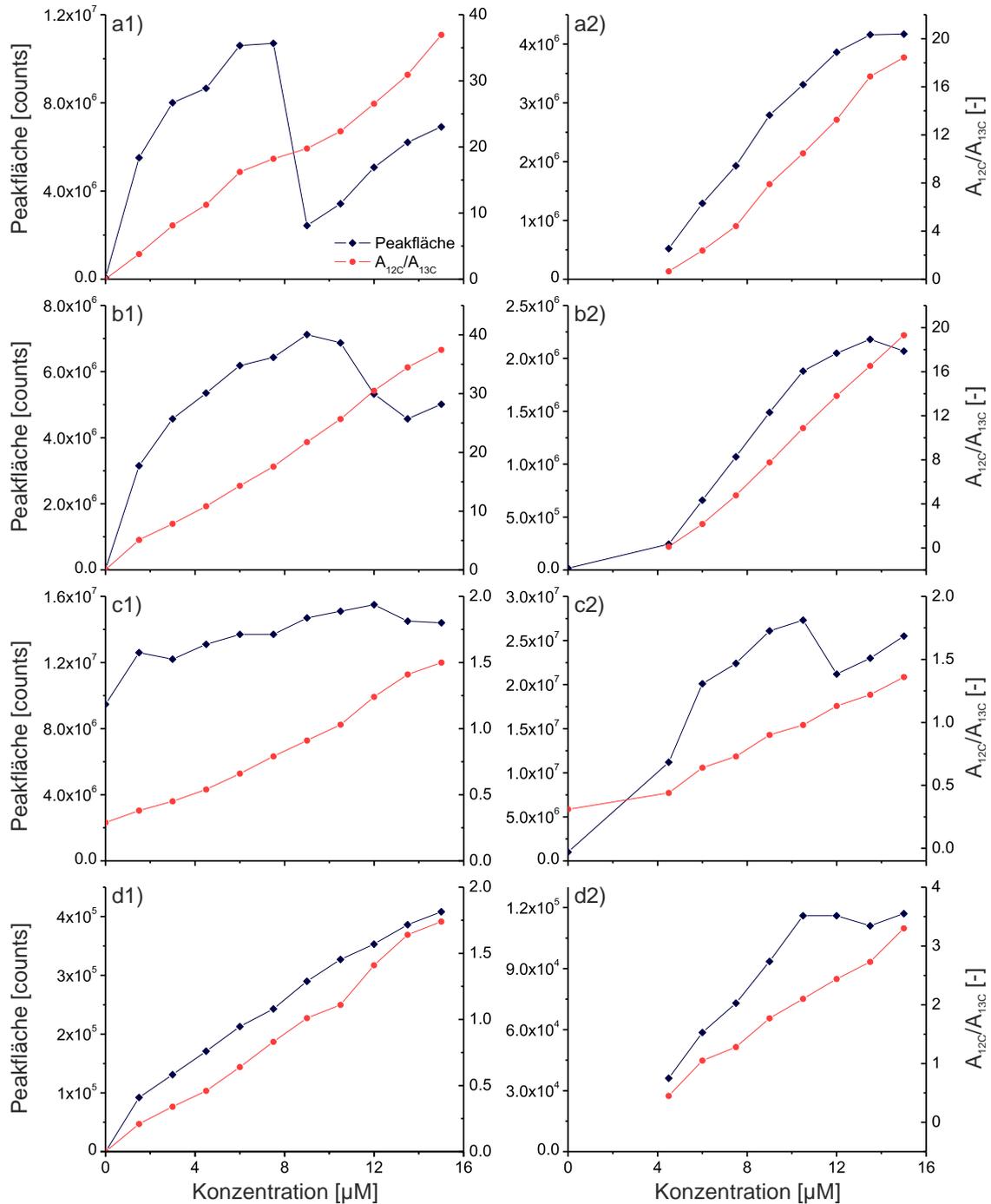


Abbildung G1: Analyse von Überstandsproben einer Kultivierung von *E. coli* auf Komplex- (links) und Minimal-medium (rechts), die im Verhältnis von 1:2 mit Standardlösungen zwischen 3 µM und 30 µM gemischt wurden. Absolute ^{12}C -Peakflächen und $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Peakflächenverhältnis ($A_{12\text{C}}/A_{13\text{C}}$) von Glucose-6-Phosphat (a1 und a2), Fructose-6-Phosphat (b1 und b2), Succinat (c1 und c2) und Pyruvat (d1 und d2).

G2 Elutionsmittelscreening

Tabelle G2.1: Retentionszeiten aller untersuchten Metabolite in Abhängigkeit des prozentualen Anteils an Eluent A.

Anteil an Eluent A [%]	Anteil an Eluent A [%] Retentionszeiten				
	30	40	50	60	70
Seduheptulose-7-Phosphat	0,24	0.27	0.30	0.34	0.42
Fructose-6-Phosphat	0.26	0.28	0.31	0.34	0.43
Fructose-1-Phosphat	0.26	0.28	0.31	0.34	0.43
Glucose-6-Phosphat	0.26	0.28	0.30	0.34	0.43
Ribose-5-Phosphat	0.26	0.30	0.30	0.35	0.44
Xylulose-5-Phosphat	0.26	0.28	0.31	0.35	0.44
Ribulose-5-Phosphat	0.26	0.28	0.31	0.35	0.44
NAD	0.24	0.25	0.28	0.33	0.45
ATP	0.24	0.28	0.39	0.25	0.45
Glyoxylat	0.29	0.28	0.31	0.37	0.45
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	0.24	0.30	0.31	0.36	0.47
Dihydroxyacetonphosphat	0.26	0.28	0.32	0.37	0.47
Pyruvat	0.27	0.30	0.33	0.40	0.53
AMP	0.24	0.27	0.30	0.38	0.55
Succinat	0.25	0.29	0.32	0.40	0.59
Malat	0.24	0.29	0.33	0.46	0.80
α -Ketoglutarat	0.24	0.29	0.34	0.49	0.93
6-Phosphogluconat	0.25	0.29	0.36	0.55	1.11
Fumarat	0.24	0.29	0.35	0.54	1.11
Erythrose-4-Phosphat	0.22	0.28	0.31	0.55	1.15
Isocitrat	0.24	0.29	0.35	0.55	1.15
Fructose-1,6-Bisphosphat	0.26	0.28	0.36	0.56	1.18
2/3-Phosphoglycerat	0.24	0.30	0.37	0.58	1.19
NADP	0.24	0.27	0.33	0.55	1.23
Citrat	0.24	0.34	0.37	0.63	1.31
Phosphoenolpyruvat	0.24	0.31	0.37	0.62	1.35
Cis-Aconitat	0.24	0.29	0.36	0.60	1.37
ADP	0.24	0.28	0.37	0.65	1.65
NADH	0.24	0.28	0.34	0.64	1.76
NADPH	0.24	0.28	0.42	1.35	7.77
Acetyl-CoA	0.24	0.34	0.65	3.77	8.42

Tabelle G2.2: Retentionskoeffizienten aller untersuchten Metabolite in Abhängigkeit des prozentualen Anteils an Eluent A.

Anteil an Eluent A [%]	Retentionskoeffizient				
	30	40	50	60	70
Seduheptulose-7-Phosphat	0.00	0.12	0.27	0.42	0.76
Fructose-6-Phosphat	0.10	0.17	0.27	0.43	0.78
Fructose-1-Phosphat	0.10	0.17	0.27	0.43	0.78
Glucose-6-Phosphat	0.09	0.16	0.27	0.43	0.79
Ribose-5-Phosphat	0.08	0.24	0.27	0.44	0.83
Xylulose-5-Phosphat	0.09	0.16	0.27	0.45	0.85
Ribulose-5-Phosphat	0.09	0.16	0.27	0.45	0.85
NAD	0.00	0.03	0.15	0.38	0.86
ATP	0.00	0.16	0.60	0.06	0.87
Glyoxylat	0.19	0.16	0.30	0.53	0.89
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	0.01	0.24	0.30	0.52	0.95
Dihydroxyacetonphosphat	0.09	0.18	0.31	0.54	0.97
Pyruvat	0.10	0.24	0.39	0.67	1.22
AMP	0.00	0.12	0.27	0.60	1.30
Succinat	0.05	0.20	0.33	0.68	1.47
Malat	0.00	0.21	0.39	0.90	2.33
α -Ketoglutarat	0.00	0.22	0.41	1.03	2.85
6-Phosphogluconat	0.02	0.19	0.49	1.29	3.63
Fumarat	0.00	0.21	0.45	1.26	3.63
Erythrose-4-Phosphat	0.00	0.17	0.30	1.30	3.77
Isocitrat	0.00	0.23	0.45	1.28	3.81
Fructose-1,6-Bisphosphat	0.08	0.17	0.49	1.35	3.91
2/3-Phosphoglycerat	0.00	0.23	0.53	1.43	3.96
NADP	0.00	0.12	0.37	1.27	4.10
Citrat	0.00	0.42	0.54	1.60	4.45
Phosphoenolpyruvat	0.00	0.28	0.54	1.56	4.61
Cis-Aconitat	0.00	0.19	0.48	1.49	4.72
ADP	0.00	0.18	0.52	1.69	5.85
NADH	0.00	0.17	0.43	1.65	6.33
NADPH	0.00	0.16	0.75	4.62	31.36
Acetyl-CoA	0.00	0.41	1.70	14.72	34.07

G3 Basismessungen der Optimierung mittels POP-LC

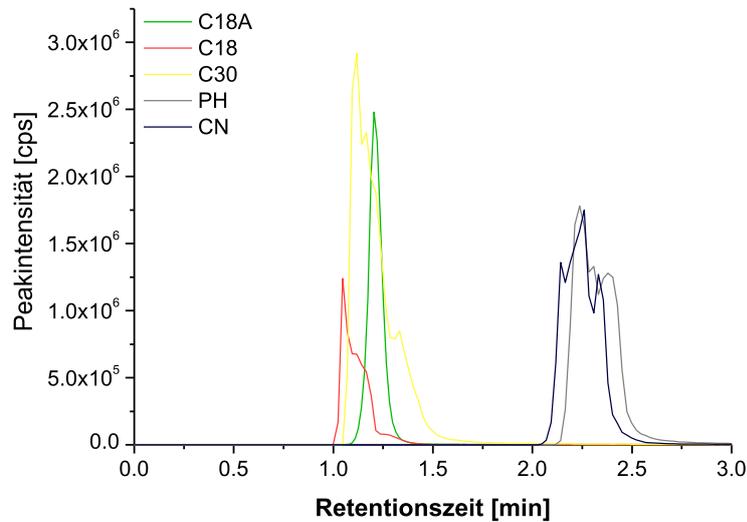


Abbildung 1: Chromatogramm eines Urazilstandards bei der Trennung auf unterschiedlichen Säulen. Die Säulen C18A, C18 und C30 wurden in einer Länge von 100 mm eingesetzt, die Säulen PH und CN in einer Länge von 200 mm.

G4 Simulierte Retentionszeiten von Gemischtstandards bei der Trennung auf heterogenen Säulen

Tabelle G4.1: Retentionszeiten aller Metabolite (vgl. Tabelle 9.6) entsprechend Simulation 1

Metabolit	Retentionszeit [min]	Metabolit	Retentionszeit [min]
Glucose-6-Phosphat	3.15	NAD	3.28
Fructose-6-Phosphat	3.18	NADH	4.75
Fructose-1-Phosphat	3.22	NADP	4.23
Ribose-5-Phosphat	3.21	NADPH	3.55
Xylulose-5-Phosphat	3.23	2/3-Phosphoglycerat	4.29
Ribulose-5-Phosphat	3.24	Phosphoenolpyruvat	4.53
Dihydroxyacetonphosphat	3.30	Pyruvat	3.64
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	3.34	Cis-Aconitat	4.65
Sedoheptulose-7-Phosphat	3.16	α -Ketoglutarat	3.99
Erythrose-4-Phosphat	3.27	Succinat	3.65
Fructose-1,6-Bisphosphat	3.74	Fumarat	4.13
AMP	3.59	Malat	3.54
Glyoxylat	3.48		

Tabelle G4.2: Retentionszeiten organischer Säuren entsprechend Simulation 2

Metabolit	Retentionszeit [min]	Metabolit	Retentionszeit [min]
Glyoxylat	3.33	Fumarat	3.61
Pyruvat	3.43	2/3-Phosphoglycerat	3.67
Succinat	3.45	Phosphoenolpyruvat	3.97
Malat	3.52	Cis-Aconitat	4.16
α -Ketoglutarat	3.57		

Tabelle G4.3: Retentionszeiten aller Metabolite entsprechend Simulation 3

Metabolit	Retentionszeit [min]	Metabolit	Retentionszeit [min]
Glucose-6-Phosphat	7.54	NAD	13.45
Fructose-6-Phosphat	7.7	2/3-Phosphoglycerat	9.85
Fructose-1-Phosphat	7.85	Phosphoenolpyruvat	11.09
Ribose-5-Phosphat	7.74	Pyruvat	9.71
Xylulose-5-Phosphat	7.93	Cis-Aconitat	28.57
Ribulose-5-Phosphat	7.89	α -Ketoglutarat	16.29
Dihydroxyacetonphosphat	8.28	Succinat	10.19
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	8.11	Fumarat	17.6
Sedoheptulose-7-Phosphat	7.58	Malat	6.86
Erythrose-4-Phosphat	8.07	AMP	16.5
Glyoxylat	6.82		

Tabelle G4.4: Retentionszeiten organischer Säuren entsprechend Simulation 2

Metabolit	Retentionszeit [min]	Metabolit	Retentionszeit [min]
Malat	9.49	α -Ketoglutarat	25.8
Glyoxylat	9.49	Fumarat	34.7
Pyruvat	11.82	Phosphoenolpyruvat	45.85
Succinat	13.66	Cis-Aconitat	57.66

G5 Validierung der CyphecATN-Methode

Tabelle G5.1: Steigungen und Korrelationskoeffizienten einer Standardreihe bei 12-maliger Messung für die Metabolite Pyruvat und Fumarat.

	Steigung Pyruvat [counts μM^{-1}]	Korrelations- koeffizient Pyruvat [-]	Steigung Fumarat [counts μM^{-1}]	Korrelations- koeffizient Fumarat [-]
Standardreihe 1	10.96×10^4	0.9967	93.66×10^4	0.9983
Standardreihe 2	10.75×10^4	0.9988	93.61×10^4	0.9995
Standardreihe 3	10.17×10^4	0.9985	89.52×10^4	0.9993
Standardreihe 4	9.46×10^4	0.9981	87.36×10^4	0.9986
Standardreihe 5	9.03×10^4	0.9994	82.64×10^4	0.9990
Standardreihe 6	8.29×10^4	0.9990	73.16×10^4	0.9998
Standardreihe 7	7.62×10^4	0.9969	69.37×10^4	0.9972
Standardreihe 8	7.06×10^4	0.9975	68.52×10^4	0.9999
Standardreihe 9	7.05×10^4	0.9995	67.97×10^4	0.9998
Standardreihe 10	7.26×10^4	0.9987	65.79×10^4	0.9995
Standardreihe 11	7.13×10^4	0.9988	65.46×10^4	0.9995
Standardreihe 12	7.38×10^4	0.9973	70.78×10^4	0.9999

Anhang H – Fehlerfortpflanzung und Anwendung

H1 Bestimmung der Standardfehler für die Einzelschritte der Metabolomanalyse

Volumenfehler

Alle in die Berechnung eingehenden Volumina (Probenvolumen, Quenchinglösungsvolumen, Extraktionsmittelvolumen) wurden mit den Hilfsmitteln, mit denen sie auch während der Probenahme abgemessen werden, 20-fach in Reaktionsgefäße von bekanntem Leergewicht aliquotiert. Die Aliquote wurden gewogen und aus der Gewichts Differenz das tatsächlich aliquotierte Volumen bestimmt. Aus dem Mittelwert der tatsächlichen Volumina und dem Sollvolumen wurde die systematische Abweichung berechnet. Aus der Standardabweichung der pipettierten Volumina wurde die zufällige Abweichung berechnet.

Analysefehler

Alle für die Berechnung notwendigen Probenarten (Standards, Extrakte, Kulturüberstände, Quenchingüberstände) wurden 5-fach nach dem Standardverfahren gemessen. Die Standardabweichung von ^{12}C - und ^{13}C -Peaks der technischen Replikate wurde separat bestimmt.

Zur Untersuchung von Extrakten, Quenchinglösungen und Kulturüberständen dienten Proben einer Kultivierung von *C. glutamicum* DM 1800. Zur Untersuchung der Standards wurde ein Gemisch aus Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Phosphoenolpyruvat, Pyruvat, Acetyl-CoA, Citrat, Cis-Aconitat, α -Ketoglutarat, Succinat und N-Acetyl-Serin in den Konzentrationen 5 μM , 1 μM und 0.25 μM verwendet.

H2 Vergleichende Metabolomanalyse

Tabelle H2.1: Pelletgröße und Extraktionsmittelvolumen

Volumina	<i>C. glutamicum</i>			
	DM 1800	DM 1800'A16	DM 1800'L1	DM 1800'C7
Biovolumen pro ml Kultur [$\mu\text{l ml}^{-1}$]	5.40	3.34	3.02	2.52
Biovolumen im Pellet [μl]	27.02	16.68	15.08	12.59
Extraktionsmittelvolumen [μl]	1350	830	750	630

Tabelle H2.3 Teil 1/2: Absolute intrazelluläre Konzentrationen von Metaboliten des Zentralstoffwechsels bei der vergleichenden Metabolomanalyse von vier *C. glutamicum*-Stämmen.

Metabolite des Zentralstoffwechsels	<i>C. glutamicum</i> DM 1800	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'A16	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'L1	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'C7
Glucose-6-Phosphat	2072.79 ± 95.99	2230.09 ± 96.54	1962.88 ± 91.19	1888.79 ± 89.96
Fructose-6-Phosphat	975.06 ± 43.66	1101.67 ± 46.03	867.51 ± 38.54	814.67 ± 37.41
Fructose-1.6-Bisphosphat	2928.92 ± 141.06	2372.06 ± 114.88	2110.06 ± 107.94	1988.90 ± 127.66
Dihydroxyacetonphosphat	879.35 ± 41.35	791.02 ± 36.22	888.57 ± 46.12	914.90 ± 44.88
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	178.74 ± 8.14	221.75 ± 10.11	181.53 ± 10.04	242.61 ± 12.27
2/3-Phosphoglycerat	1469.60 ± 72.79	1825.09 ± 80.67	1666.16 ± 81.32	1818.30 ± 86.56
6-Phosphoglyconat	369.13 ± 16.15	504.76 ± 20.02	408.93 ± 17.79	300.85 ± 14.51
Ribose-5-Phosphat	387.52 ± 16.24	406.90 ± 15.21	423.94 ± 17.41	397.42 ± 16.92
Ribulose-5-Phosphat/ Xylulose-5-Phosphat	801.18 ± 36.06	902.23 ± 36.85	868.74 ± 38.20	721.95 ± 32.95
Seduheptulose-7-Phosphat	1277.41 ± 52.72	217.12 ± 106.67	1910.73 ± 77.76	1163.54 ± 49.22
Erythrose-4-Phosphat	2423.34 ± 119.46	2630.58 ± 123.12	2271.80 ± 113.91	2035.62 ± 104.61
Acetyl CoA	5.77 ± 1.45	9.99 ± 2.17	19.31 ± 2.41	59.15 ± 3.65
AMP	161.14 ± 6.70	196.70 ± 8.31	223.27 ± 9.63	263.18 ± 12.12
ADP	963.40 ± 41.74	884.47 ± 36.81	801.58 ± 34.13	674.02 ± 50.20
ATP	3203.67 ± 132.47	2978.20 ± 114.05	2922.55 ± 112.92	2470.04 ± 75.10

Tabelle H2.2 Teil 2/2: Absolute intrazelluläre Konzentrationen von Metaboliten des Zentralstoffwechsels bei der vergleichenden Metabolomanalyse von vier *C. glutamicum*-Stämmen.

Metabolite des Zentralstoffwechsels	<i>C. glutamicum</i> DM 1800	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'A16	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'L1	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'C7
NAD	958.09 ± 26.10	1035.96 ± 41.51	980.09 ± 38.83	956.85 ± 37.07
NADH	191.04 ± 10.45	283.30 ± 15.34	320.83 ± 17.18	456.65 ± 19.46
NADP	422.29 ± 17.16	519.70 ± 20.73	495.72 ± 19.82	517.92 ± 20.33
NADPH	8.28 ± 1.60	0.86 ± 2.38	25.92 ± 2.78	1.65 ± 3.13
A-Ketoglutarat	4292.55 ± 447.48	3878.64 ± 471.45	4439.86 ± 541.97	5582.06 ± 670.42
Succinat	350.33 ± 55.82	320.87 ± 82.69	373.62 ± 89.87	729.29 ± 115.78
Fumarat	110.19 ± 5.21	120.31 ± 6.33	151.09 ± 7.45	189.71 ± 9.36
Glyoxylat	82.44 ± 12.11	101.54 ± 17.71	135.70 ± 20.53	134.45 ± 23.37
Cis-Aconitat	97.55 ± 322.18	-162.06 ± 496.99	-284.36 ± 547.69	-755.04 ± 750.85
Cis-Aconitat ohne Berücksichtigung des Leakage	18.90 ± 2.48	16.03 ± 2.42	15.17 ± 2.44	14.28 ± 2.87
Pyruvat	374.94 ± 31.67	416.53 ± 43.05	424.77 ± 47.69	549.17 ± 106.33
Phosphoenolpyruvat	163.27 ± 7.84	225.55 ± 10.37	264.56 ± 13.08	274.05 ± 13.40

Tabelle H2.3: Absolute intrazelluläre Konzentrationen von freien Aminosäuren bei der vergleichenden Meta-bolomanalyse von vier *C. glutamicum*-Stämmen.

Freie Aminosäuren	<i>C. glutamicum</i> DM 1800	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'A16	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'L1	<i>C. glutamicum</i> DM 1800'C7
Q-Acetyl-Serin	162.72 ± 6.49	248.89 ± 9.36	327.60 ± 12.26	155.87 ± 11.68
Aspartat	4.46 ± 0.23	8.34 ± 0.38	11.50 ± 0.57	11.18 ± 0.56
Glutamat	278.08 ± 72.61	229.27 ± 59.44	216.02 ± 56.43	226.41 ± 58.74
Serin	600.21 ± 28.46	3304.11 ± 156.26	706.52 ± 33.95	779.55 ± 37.65
Threonin	867.64 ± 40.15	1369.03 ± 56.75	1968.09 ± 89.40	1720.46 ± 78.72
Glutamin	16.47 ± 0.73	9.24 ± 0.37	9.11 ± 0.39	11.36 ± 0.49
Homoserin	3274.62 ± 166.21	3078.29 ± 139.72	4315.22 ± 206.53	4852.24 ± 236.07
Tyrosin	80.90 ± 3.66	57.42 ± 3.03	69.15 ± 3.81	100.78 ± 5.11
Glycin	14.92 ± 0.98	16.25 ± 1.01	17.01 ± 1.10	11.56 ± 0.73
Prolin	9.66 ± 0.46	3.45 ± 0.15	2118.47 ± 98.75	3.91 ± 0.18
Alanin	7.15 ± 0.38	4.22 ± 0.20	5.74 ± 296.62	7.08 ± 0.37
Methionin	41.89 ± 2.05	36.32 ± 2.38	37.33 ± 2.63	43.82 ± 3.13
Valin	1641.87 ± 77.84	1400.80 ± 58.16	1817.58 ± 81.95	2287.24 ± 103.58
Phenylalanin	100.98 ± 4.57	97.09 ± 4.33	106.17 ± 5.12	115.20 ± 5.91
Leucin	180.64 ± 8.60	245.45 ± 10.80	281.45 ± 13.66	269.63 ± 13.27
Histidin	156.52 ± 35.34	343.35 ± 55.40	27.89 ± 53.35	-154.77 ± 164.70
Lysin	244.28 ± 18.27	553.25 ± 36.09	643.12 ± 44.63	665.87 ± 44.43

