

**REGULATION DER STOFFWECHSELFLÜSSE  
IN *BACILLUS SUBTILIS* DURCH  
DAS NÄHRSTOFFANGEBOT**

-

**BETEILIGUNG  
REGULATORISCHER PROTEINE**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

**Oliver Frick**

Saarbrücken

2007

Tag des Kolloquiums: 28.11.2007

Dekan: Prof. Dr. Uli Müller

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Heinzle (Gutachter)  
Prof. Dr. Manfred J. Schmitt (Gutachter)  
Prof. Dr. Friedrich Giffhorn (Vorsitzender)  
Dr. Gert-Wieland Kohring (Akademischer Beisitzer)

Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.

*Thorstein Bunde Veblen (1857-1929), Soziologe u. Ökonom*

**Für meine Eltern**



## Danksagung

Herrn Prof. Elmar Heinzle danke ich für die Bereitstellung des Themas und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Christoph Wittmann und Herrn Dr. Tae Hoon Yang danke ich für viele wertvolle Anregungen, Vorschläge und Diskussionsbeiträge, sowie insbesondere für ihre Unterstützung bei der metabolischen Flussanalyse.

Herrn Prof. Manfred Schmitt danke ich für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Jörg Stülke danke ich für seine wertvollen Ideen und Diskussionsbeiträge, sowie für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten von *Bacillus subtilis*. Für die Konstruktion des Stammes *B. subtilis* GP391, die Durchführung der Transkriptomanalyse, viele fruchtbare Diskussionen und nicht zuletzt für seine Unterstützung bei der Handhabung des *Bacillus subtilis* danke ich Herrn Oliver Schilling.

Den Herren Dr. Jens Krömer und Dr. Andreas Tholey danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Fermentationen und der Analytik, sowie für viele weitere hilfreiche Anregungen und Diskussionsbeiträge. Für seine wertvolle Unterstützung in instrumentellen Fragestellungen und bei der Analytik danke ich Herrn Michel Fritz. Herrn Christoph Bolten danke ich für seine experimentellen Arbeiten im Rahmen seiner Forschungsarbeit.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für ein gutes Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft. Für ihre regelmäßige Teilnahme an der Gruppentherapie zur Stressbewältigung danke ich dem God of Holy Crossfire, dem Bullet von Toelz und K.O. McPain.

Mein ganz besonderer, tiefer Dank gilt meinen Eltern Karin und Otto für ihre Liebe, den großen persönlichen Rückhalt und die Unterstützung meines Studiums in jeglicher Hinsicht.

Schließlich danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung, ohne die dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.



# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>V</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>3</b>
3.1    Allgemeine Einleitung.....	3
3.2    Zielsetzung der Arbeit.....	4
<b>4 THEORETISCHER HINTERGRUND</b> .....	<b>6</b>
4.1    Die Bedeutung von <i>Bacillus subtilis</i> für Industrie und Forschung.....	6
4.2    Der Zentralstoffwechsel von <i>Bacillus subtilis</i> .....	7
4.2.1    Kohlehydrataufnahme.....	9
4.2.2    Glykolyse .....	9
4.2.3    Pentosephosphatweg (PPP).....	10
4.2.4    Pyruvatmetabolismus und fermentative Stoffwechselwege.....	10
4.2.5    Tricarbonsäurezyklus (TCA) und oxidative Phosphorylierung.....	12
4.2.6    Anaplerotische Reaktionen.....	13
4.2.7    Gluconeogenese.....	14
4.2.8    Aminosäuremetabolismus .....	14
4.3    Die Regulation des Zentralstoffwechsels von <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
4.3.1    Der Mechanismus der Katabolitenrepression durch Glucose bei <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
4.3.2    Durch Katabolitenrepression regulierte Gene von <i>Bacillus subtilis</i> .....	17
4.4    Metabolische Flussanalyse in <i>Bacillus subtilis</i> .....	19
4.4.1    Stöchiometrische Bilanzierung .....	19
4.4.2    Modellierung von Isotopomer-Netzwerken .....	21
4.4.3    Parameter-Schätzung.....	26
4.4.4    Statistische Auswertung .....	27
4.4.5    Design von Experimenten zur metabolischen Flussanalyse.....	28
4.5    Transkriptomanalyse von <i>Bacillus subtilis</i> .....	29

<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
5.1	Verwendete Bakterienstämme.....	31
5.2	Chemikalien und Nährmedien .....	32
5.2.1	Verwendete Chemikalien.....	32
5.2.2	Nährmedien .....	33
5.3	Kultivierungsmethoden.....	36
5.3.1	Stammkonservierung.....	36
5.3.2	Vorkultur .....	36
5.3.3	Kultivierung in Schüttelkolben.....	36
5.3.4	Kultivierung im Bioreaktor.....	37
5.3.5	Probenahmen während der Kultivierungen .....	38
5.4	Analytische Methoden .....	40
5.4.1	Bestimmung der Biomassekonzentration .....	40
5.4.2	Quantifizierung von Aminosäuren.....	41
5.4.3	Quantifizierung von organischen Säuren und Alkoholen.....	43
5.4.4	Quantifizierung von Glucose in Kulturüberständen .....	45
5.4.5	Bestimmung von Massenisotopomerverteilungen mittels GC/MS.....	45
5.4.6	Spezifische Raten und Ausbeutekoeffizienten .....	50
5.4.7	Massenbilanz für Kohlenstoff.....	51
5.5	Metabolische Flussanalyse.....	52
5.6	Transkriptomanalyse .....	53
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
6.1	Auswahl des geeigneten <i>Bacillus subtilis</i> Stammes und Validierung des metabolischen Netzwerks .....	55
6.1.1	Auswirkungen der Tryptophan-Auxotrophie auf Wachstum und Physiologie von <i>Bacillus subtilis</i> .....	56
6.1.2	Markierung proteinogener Aminosäuren bei Wachstum auf Glucose.....	59
6.1.3	Auswirkungen der Tryptophan-Auxotrophie auf die Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg .....	61
6.1.4	Der Serin-Biosyntheseweg von <i>B. subtilis</i> 168 .....	63
6.2	Physiologie von <i>B. subtilis</i> 168 bei Wachstum auf Glucose .....	66
6.2.1	Wachstum und Produktbildung von <i>B. subtilis</i> 168 bei Nutzung von Glucose als Kohlenstoffquelle .....	66
6.2.2	Metabolische Flussanalyse von <i>B. subtilis</i> 168 bei Wachstum auf Glucose...68	
6.3	Physiologie von <i>B. subtilis</i> 168 bei Wachstum auf Glucose, Glutamat und Succinat.....	74

6.3.1	Wachstum und Produktbildung von <i>B. subtilis</i> 168 bei Nutzung von Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquelle .....	74
6.3.2	Metabolische Flussanalyse von <i>B. subtilis</i> 168 bei Wachstum auf Glucose, Glutamat und Succinat .....	77
6.4	Vergleichende Transkriptomstudien von <i>B. subtilis</i> 168 bei Wachstum auf Glucose und Glucose/Succinat/Glutamat .....	83
6.5	Physiologie von <i>B. subtilis</i> 168 bei Wachstum auf Glutamat und Succinat .....	90
6.5.1	Wachstum und Produktbildung von <i>B. subtilis</i> 168 auf Succinat und Glutamat als Kohlenstoffquelle .....	90
6.5.2	Experimentelles Design von Tracerexperimenten für die metabolische Flussanalyse auf Succinat und Glutamat .....	92
6.5.3	Metabolische Flussanalyse von <i>B. subtilis</i> 168 bei Wachstum auf Succinat und Glutamat .....	96
6.6	Die Rolle des Nährstoffangebots bei der Regulation des Zentralstoffwechsels von <i>Bacillus subtilis</i> .....	104
6.7	Die Rolle der Katabolitenrepression bei der Regulation des Zentralstoffwechsels von <i>Bacillus subtilis</i> .....	111
6.7.1	Phänotypische Charakteristika von <i>ccpA</i> -Deletionsmutanten .....	111
6.7.2	Wachstum und Produktbildung bei <i>ccpA</i> -Deletionsmutanten auf Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquellen .....	112
6.7.3	Metabolische Flussanalyse von <i>ccpA</i> -Deletionsmutanten auf Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquellen .....	116
6.7.4	Die Rolle des Regulatorproteins CcpA von <i>Bacillus subtilis</i> .....	127
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK .....</b>	<b>133</b>
7.1	Schlussfolgerungen .....	133
7.2	Ausblick .....	136
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>138</b>
	Datenbanken .....	138
	Publikationen .....	138
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>151</b>
9.1	Metabolische Netzwerke .....	151
9.1.1	Stöchiometrisches Netzwerk zur metabolischen Flussanalyse von <i>B. subtilis</i> 168 auf Glucose, sowie auf Glucose, Succinat und Glutamat .....	151

---

9.1.2	Stöchiometrisches Netzwerk zur metabolischen Flussanalyse von <i>B. subtilis</i> 168 auf Succinat und Glutamat, sowie von <i>B. subtilis</i> QB5407 und GP335 auf Glucose, Succinat und Glutamat .....	153
9.2	Metabolische Flüsse .....	155
9.3	Massenisotopomerverteilungen .....	157
9.4	Stöchiometrie von Biomassebestandteilen .....	164

# SYMBOLS UND ABKÜRZUNGEN

---

## Symbole

$\Delta G^0$	Freie Reaktionsenthalpie [kJ mol <sup>-1</sup> ] unter Standardbedingungen (pH 7, 25°C)
$\Delta$ +/-	Standardabweichung
$\Phi$	Verzweigungsverhältnis
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate [h <sup>-1</sup> ]
$Q_{CO_2}$	Volumetrische Kohlendioxidbildungsrate [mol h <sup>-1</sup> ]
$q_{CO_2}$	Spezifische Kohlendioxidbildungsrate [mol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$q_S$	Spezifische Substrataufnahmerate [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$q_P$	Spezifische Produktbildungsrate [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$m/z$	Verhältnis Masse Ladungszahl <sup>-1</sup>
$v$	metabolischer Fluss [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$S_i$	Sensitivität
$S_r$	relativer Fehler [%]
$Y_{X/S}$	Biomasseausbeutekoeffizient [g mmol <sup>-1</sup> ]
$Y_{P/S}$	Produktausbeutekoeffizient [mol mol <sup>-1</sup> ]
$\zeta$	Reversibilität

## Abkürzungen

3-PG	3-Phosphoglycerat
Abb.	Abbildung
ABU	$\alpha$ -Amino-n-Buttersäure
ACA/AcCoA	Acetyl-CoenzymA
ADP	Adenosindiphosphat
AKG	$\alpha$ -Ketoglutarat
AMM	Atom Mapping Matrix
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
C	Kohlenstoff
<sup>13</sup> C	Kohlenstoffisotop der Massenzahl 13

---

CcpA	Catabolite Control Protein A
CcpC	Catabolite Control Protein C
CCR	Carbon Catabolite Repression = Kohlenstoff-Katabolitenrepression
cDNA	komplementäre DNA
CIT	Citrat
CoA	Coenzym A
cre	Catabolite Response Element
Cy3	Cyanin-3
Cy5	Cyanin-5
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	2-Desoxyuridin-5-Triphosphat
E	Glutamat
E-4P	Erythrose-4-Phosphat
EI	Enzym 1 des Phosphotransferasesystems
EII <sup>Glc</sup>	Glucosespezifisches Enzym 2 des Phosphotransferasesystems
Exp.	Expression
F-6P	Fructose-6-Phosphat
FUM	Fumarat
G-6P	Glucose-6-Phosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Glc	Glucose
Glu	Glutamat
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPr	Hitzestabiles Protein
ICI	Isocitrat
IDV	Isotopomer Distribution Vector
IMM	Isotopomer Mapping Matrix
kbp	10 <sup>3</sup> Basenpaare
MAL	Malat
MBDSTFA	N-Methyl(tertbutyl-dimethylsilyl)-trifluoracetamid
MDV	Mass Distribution Vector
MFA	Metabolische Flussanalyse
mRNA	Messenger-RNA

M-THF	Methyl-Tetrahydrofolat
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenindinucleotid
NADH	Nicotinamid-Adenindinucleotid (reduziert)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat (reduziert)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OAA	Oxalacetat
OD	Optische Dichte
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
ORF	Open Reading Frame = offener Leserahmen
-P	Phosphatgruppe eines Moleküls
PC	Pyruvat-Carboxylase
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGA	3-Phosphoglycerat
P <sub>i</sub>	freies Phosphat
PPP	Pentosephosphatweg
PTS	Phosphotransferasesystem
Pyr	Pyruvat
R-5P	Ribose-5-Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	Respiratorischer Quotient
S-7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
Ser	Serin
SIM	Selected Ion Monitoring
SLS	Sum of least Squares = Summe der kleinsten Fehlerquadrate
Suc	Succinat
SucCoA	Succinyl-CoA
T3P	Triosephosphat
Tab.	Tabelle
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl-Gruppe
TCA	Tricarbonsäurezyklus
WT	Wildtyp



# 1 ZUSAMMENFASSUNG

---

Zur Gewinnung neuer Erkenntnisse über die Regulation des Stoffwechsels von *Bacillus subtilis* wurde die Rolle des globalen Regulatorproteins CcpA untersucht. Dies erfolgte einerseits anhand metabolischer Charakterisierung und vergleichender Analyse der Expressionsmuster kataboler Gene von *B. subtilis* 168 bei Nutzung unterschiedlicher Substrate, sowie andererseits anhand der metabolischen Charakterisierung verschiedener *ccpA*-Mutanten. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität der beiden Stoffwechselwege Glykolyse und Pentosephosphatweg nicht auf Transkriptebene gesteuert wird, sondern offenbar auf metabolischer Ebene durch die Verfügbarkeit intrazellulärer Metabolite beeinflusst wird. Der Überflussmetabolismus von *Bacillus subtilis* wird offenbar sowohl auf Transkript- als auch auf Metabolom-Ebene reguliert, wobei die Ausschaltung der Katabolitenrepression die Bildung von Überflussmetaboliten nicht vollständig unterdrückt. Die metabolische Aktivität des Tricarbonsäurezyklus ist dagegen hauptsächlich auf Transkriptebene über die synergistische Repression der Citrat-Synthase und Aconitase durch CcpA und den Repressor CcpC reguliert. Die Rolle von CcpA als globalem Regulator des Zentralmetabolismus in Abhängigkeit des Nährstoffangebots wurde in dieser Arbeit zwar bestätigt, jedoch besitzt dieser Effektor offenbar eine eher unterstützende Funktion bei der Regulation des Stoffwechsels und übt keine vollständige Kontrolle über einzelne Stoffwechselwege aus.

## 2 ABSTRACT

---

The role of the global regulator protein CcpA was investigated to obtain deeper insight into the regulation of *Bacillus subtilis* metabolism. This was achieved on the one hand by metabolic characterization and parallel analysis of gene expression patterns in *B. subtilis* 168 growing on different carbon sources and on the other hand by metabolic characterization of *ccpA* mutants. The activity of glycolysis and pentose phosphate pathway was shown to be regulated independently from the transcriptional level and glucose induced catabolite repression but was affected by the availability of metabolic intermediates and therefore is presumed to be mainly controlled on the metabolic level. The overflow metabolism pathways of *Bacillus subtilis* are obviously regulated on both, transcriptional and metabolic level, while elimination of carbon catabolite repression did not completely suppress the formation of overflow metabolites. The metabolic activity of the Krebs-cycle was shown to be mainly regulated on the transcriptional level by synergistic repression of citrate synthase and aconitase by CcpA and the repressor Protein CcpC. On the one hand the role of CcpA as a global regulator was confirmed by these studies but on the other hand the observations showed a more supporting role of CcpA in the regulation of the *Bacillus subtilis* central metabolism, precisely because this regulator did not exhibit total control on the metabolic activity of any pathway.

## 3 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

---

### 3.1 Allgemeine Einleitung

Innerhalb der Biowissenschaften hat in den letzten Jahren das noch relativ junge Teilgebiet der Systembiologie zunehmend an Bedeutung gewonnen und wird mittlerweile als eines der wichtigsten Forschungsgebiete des 21. Jahrhunderts angesehen (Kitano, 2002). Im Focus der Systembiologie steht das ganzheitliche Verständnis der Zusammenhänge zellulärer Vorgänge auf unterschiedlichen organisatorischen Ebenen. Die verschiedenen physiologischen Ebenen einer Zelle werden dabei durch die Summe der in einer Zelle transkribierten Gene (Transkriptom), die Gesamtheit der vorhandenen Proteine (Proteom), die Konzentrationen der in der Zelle enthaltenen Metabolite (Metabolom), sowie die Durchflussraten verschiedener Stoffwechselwege (Fluxom) repräsentiert. Systembiologische Forschungsansätze können zur Untersuchung verschiedenster Fragestellungen dienen, wie z.B. der Erforschung von Krankheiten (Hood et al., 2004), oder auch der Optimierung biotechnologisch eingesetzter Organismen (Lee et al., 2005).

Ein nicht nur biotechnologisch relevanter, sondern auch als Modellobjekt für Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt und zur Erforschung pathogener Arten bedeutsamer Mikroorganismus ist *Bacillus subtilis*. Die Aufklärung seiner Genomsequenz (Kunst et al., 1997) ermöglichte die Durchführung von Transkriptomanalysen (Blencke et al., 2003; Moreno et al., 2001; Ye et al., 2000), sowie die Kombination von Transkriptomstudien und Proteomanalysen (Tobisch et al., 1999; Yoshida et al., 2001). Gegenstand dieser Arbeiten war in erster Linie die Aufklärung der Koordination regulatorischer Vorgänge des Zellmetabolismus, insbesondere der regulatorischen Mechanismen des Kohlenstoff- und Energiestoffwechsels, welche von zentraler Bedeutung für die Physiologie der Zelle sind. Dabei wurden vor allem das Phänomen der C-Katabolitenrepression kataboler Gene und Operons durch Glucose und andere glykolytisch abbaubare Hexosen, sowie die Mechanismen der substratspezifischen Induktion untersucht (Stülke and Hillen, 1999; Stülke and Hillen, 2000). Viele der Arbeiten an *Bacillus subtilis* haben gezeigt, dass das Regulatorprotein CcpA ein wichtiger Faktor bei der Regulation des Stoffwechsels ist. Dieses Protein löst als Repressor die C-Katabolitenrepression aus, ist jedoch als positiver Regulator auch an der Kontrolle von Glykolyse, Überflusstoffwechsel und Aminosäure-Biosynthesen beteiligt (Henkin, 1996; Ludwig et al., 2001; Ludwig and Stülke, 2001). Die Charakteristik der Regulation wichtiger Gene des Zellmetabolismus durch CcpA wurde bislang anhand von *ccpA*-Deletionsmutanten und aufgrund von Variationen des Substratangebots mittels

Transkriptom- und Proteomanalysen untersucht (Moreno et al., 2001; Tobisch et al., 1999; Yoshida et al., 2001).

Ein viel versprechender Ansatz zur weiterführenden, detaillierten Erforschung der Regulation des Stoffwechsels besteht in der Verknüpfung von Transkriptom- und Metabolomanalysen (Urbanczyk-Wochniak et al., 2003), was bereits für *Corynebacterium glutamicum* (Krömer et al., 2004) und *Saccharomyces cerevisiae* (Daran-Lapujade et al., 2004; Frick, 2003) realisiert werden konnte. Die metabolische Flussanalyse ermöglicht aufgrund des Einsatzes  $^{13}\text{C}$ -markierter Substrate in Kombination mit computergestützten Modellen eine genaue Analyse metabolischer Flussverteilungen innerhalb des Zellstoffwechsels (Wiechert et al., 2001; Wittmann, 2002). Flussanalysen wurden bislang für nahezu sämtliche biotechnologisch bedeutsame Mikroorganismen durchgeführt, so z.B. für *C. glutamicum* (Becker et al., 2005; Krömer et al., 2004; Wittmann and Heinzle, 2001b; Wittmann and Heinzle, 2002; Wittmann et al., 2004a), verschiedene Hefen wie *K. marxianus* (Wittmann et al., 2002a) oder *S. cerevisiae* (Christensen et al., 2002; Frick and Wittmann, 2005; Gombert et al., 2001) und nicht zuletzt auch für *B. subtilis* (Dauner et al., 2001a; Dauner et al., 2002; Sauer et al., 1996; Sauer et al., 1997). Jedoch existieren für *Bacillus subtilis* bislang keine Untersuchungen des metabolischen Zustandes von Mutanten bei ausgewählten Substratangeboten, welche sich mit korrespondierenden Expressionsanalysen verknüpfen lassen, um Aufschluss über die Auswirkungen der C-Katabolitenrepression auf die Kinetik des Zentralstoffwechsels zu erhalten.

### 3.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf Grundlage systembiologischer Methoden ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen der transkriptionellen und der metabolischen Ebene bei der Regulation der Aktivität des Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis* zu gewinnen. Diese Aufgabe wurde innerhalb eines gemeinsamen Forschungsprojektes des Lehrstuhls für Technische Biochemie (Universität des Saarlandes) mit dem Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie (Universität Göttingen) bearbeitet. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die regulatorischen Effekte der Glucose-induzierten Katabolitenrepression auf den Zellstoffwechsel, welche durch Nutzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen und anhand verschiedener Mutanten untersucht wurden. Die Hauptaufgabe bestand dabei neben Studien zur Durchführbarkeit der metabolischen Flussanalyse in der Quantifizierung intrazellulärer Stoffflüsse mittels  $^{13}\text{C}$ -Tracerstudien (Technische Biochemie, Saarbrücken) bei Wachstum von *Bacillus subtilis* auf verschiedenen Kombinationen von Substraten, sowie bei Deletion des für die Glucose-induzierte Katabolitenrepression erforderlichen Regulatorproteins CcpA.

Zur Charakterisierung der Auswirkungen der Zugabe zusätzlicher Substrate auf die Glucose-induzierte Katabolitenrepression erfolgte eine detaillierte, physiologische Charakterisierung des Wildtyp-Stammes *Bacillus subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose, sowie auf Glucose, Succinat und Glutamat. Diese Untersuchungen umfassten neben der Kinetik von Wachstum und Produktbildung die Quantifizierung metabolischer Flüsse innerhalb des Zentralmetabolismus (Technische Biochemie, Saarbrücken), sowie die parallele Analyse der Expression der beteiligten Enzyme mittels DNA-Microarrays (Allgemeine Mikrobiologie, Göttingen). Zur weiteren Aufklärung der Auswirkungen des Substratangebots auf den Metabolismus erfolgte eine physiologische Charakterisierung des Wildtyps *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Succinat und Glutamat (Technische Biochemie, Saarbrücken). Dazu wurde erstmals eine Kombination aus mehreren <sup>13</sup>C-Tracerexperimenten mit unterschiedlichen Kombinationen an Substratmarkierung eingesetzt, um die intrazellulären Stoffflüsse unter diesen Bedingungen quantifizieren zu können. Der Vergleich der dadurch gewonnenen Daten mit den intrazellulären Flüssen bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat sowie der Abgleich mit bereits vorhandenen Expressionsdaten (Blencke et al., 2003; Ludwig et al., 2001) diente der Gewinnung weiterer Erkenntnisse über die Beteiligung der Katabolitenrepression an der Regulation des Stoffwechsels.

Zur Aufklärung der Rolle des globalen Regulatorproteins CcpA bei der Regulation des Zellstoffwechsels wurden zwei, am Lehrstuhl für allgemeine Mikrobiologie (Göttingen) durch Transformation des Stammes *B. subtilis* 168 hergestellte *ccpA*-Deletionsmutanten eingesetzt. Diese umfassten den Stamm *B. subtilis* QB5407, der lediglich eine Deletion des für CcpA kodierenden Gens besitzt, sowie die Mutante *B. subtilis* GP335, welche zusätzlich zur Deletion von CcpA eine durch Mutation der PTS-Komponente HPr herbeigeführte Dereglulation der Glucoseaufnahme aufweist. Am Lehrstuhl für allgemeine Mikrobiologie (Göttingen) wurden für diese beiden Stämme sowie den Wildtyp *B. subtilis* 168 bereits in der Vergangenheit vergleichende Studien über die Expression der Enzyme des Zentralstoffwechsels durchgeführt (Blencke et al., 2003). Innerhalb dieser Arbeit erfolgte die physiologische Charakterisierung von *B. subtilis* QB5407 und *B. subtilis* GP335 durch Quantifizierung der intrazellulären Stoffflüsse mittels <sup>13</sup>C-Tracerstudien.

## 4 THEORETISCHER HINTERGRUND

---

### 4.1 Die Bedeutung von *Bacillus subtilis* für Industrie und Forschung

Bei *Bacillus subtilis* handelt es sich um ein ubiquitär verbreitetes, chemoorganoheterotrophes Bodenbakterium, welches taxonomisch zu den gram-positiven Eubakterien (Firmicutes) gehört. Innerhalb dieser Gruppe wird *B. subtilis* der Klasse der Bacilli zugeordnet, deren charakteristisches Merkmal ein niedriger GC-Gehalt ist. Innerhalb dieser Klasse gehört *Bacillus subtilis* zur Ordnung der Bacillales mit der Familie der Bacillaceae und der Gattung *Bacillus*, welche ca. 150 Arten umfasst (Claus and Berkeley, 1986). Die stäbchenförmigen Zellen von *Bacillus subtilis* besitzen eine Länge von 2 bis 3  $\mu\text{m}$  bei einem Durchmesser von ca. 0,6  $\mu\text{m}$ , sind peritrich begeißelt und können sich daher schnell fortbewegen.

Bei ausreichendem Nährstoff- und Sauerstoff-Angebot erreicht *B. subtilis* Generationszeiten von ca. 45 min., wobei als Kohlenstoff- und Energiequelle bevorzugt Glucose genutzt und als terminaler Elektronenakzeptor Sauerstoff bevorzugt wird. Unter anaeroben Bedingungen kann *Bacillus subtilis* einerseits bei Verfügbarkeit von Glucose und Nitrat Energie durch Nitrat-Atmung gewinnen, andererseits aber auch ohne Vorhandensein von Elektronenakzeptoren rein fermentativen Stoffwechsel unter Bildung von Acetat, Lactat, Acetoin und 2,3-Butandiol betreiben (Cruz Ramos et al., 2000; Nakano et al., 1997).

Seit geraumer Zeit ist *Bacillus subtilis* Gegenstand molekularbiologischer Untersuchungen. So wurde bereits 1958 bei *B. subtilis* 168 das Vorhandensein der natürlichen Kompetenz entdeckt, wodurch die Zelle in der Lage ist, freie DNA aufzunehmen und in das eigene Genom zu übertragen (Spizizen, 1958). Diese Entdeckung ermöglichte die Erstellung von Genkarten mittels Transformation (Dubnau et al., 1967) bereits lange Zeit vor der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Bacillus subtilis* im Jahr 1997 (Kunst et al., 1997), so dass *Bacillus subtilis* heute zu einem der am besten erforschten Mikroorganismen gehört. Die Genomsequenz von *B. subtilis* zeigt einen Gesamtumfang von 4215 kbp mit insgesamt ca. 4100 offenen Leserahmen (open reading frames = ORFs), wobei der GC-Anteil im Genom bei 43,52 % und der AT-Anteil bei 56,48 % liegt. Von der Gesamtsequenz haben insgesamt 86,87 % der Nukleotide kodierende Funktion, die übrigen Nukleotide befinden sich in teilweise regulatorisch bedeutsamen Regionen zwischen den einzelnen Genen von *Bacillus subtilis* (Kunst et al., 1997).

*Bacillus subtilis* ist im Gegensatz zu anderen Bacillaceae nicht pathogen, seine nahe Verwandtschaft zu Pathogenen und die Fähigkeit, Endosporen zu bilden machen ihn jedoch

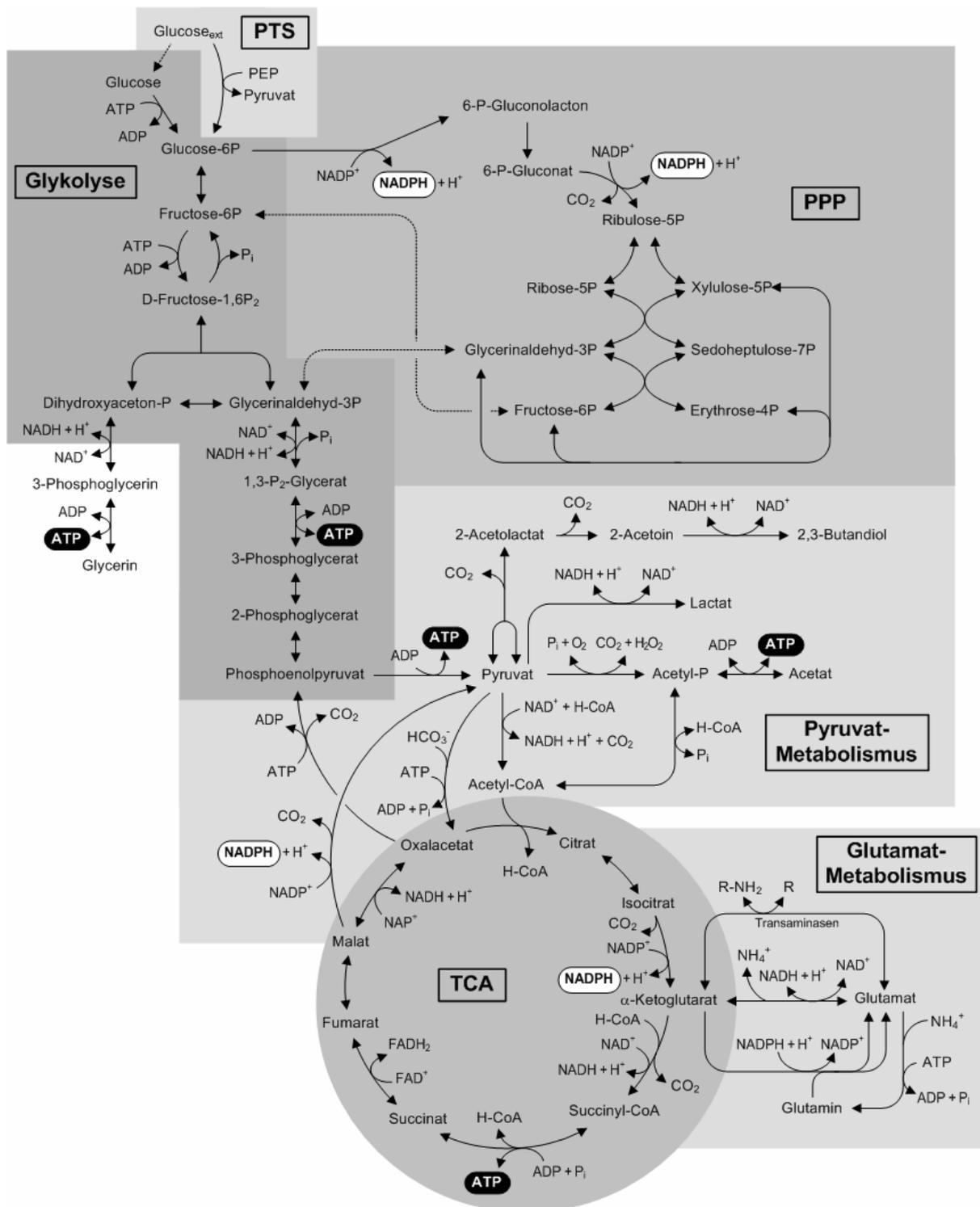
zu einem idealen Modellorganismus zur medizinischen Erforschung pathogener Sporenbildner wie *Bacillus cereus* und *Bacillus anthracis* (Sagripanti et al., 2007). Aufgrund der Hitzeresistenz der Sporen von *B. subtilis* werden diese zudem als Indikator bei Sterilisationsprozessen in Pharmazie, Medizin und Lebensmittelindustrie eingesetzt (Wheeler and Robert, 1983).

Für die Verarbeitung von Lebensmitteln spielt *Bacillus subtilis* eine zunehmend wichtigere Rolle. So wird *Bacillus subtilis* im asiatischen Raum bereits seit Jahrzehnten und neuerdings auch in Afrika großtechnisch zur Lebensmittelherstellung durch Fermentation von Sojabohnen eingesetzt (Amoa-Awua et al., 2006; Terlabie et al., 2006).

Industriell wird *Bacillus subtilis* großtechnisch zur Produktion von Enzymen aber auch zur Produktion des Peptidantibiotikums Bacitracin eingesetzt (Azevedo et al., 1993; Katz and Demain, 1977). Mit *Bacillus subtilis* produzierte Amylasen, Lipasen und vor allem die Protease Subtilisin werden industriell vorwiegend als Waschmittelzusätze verwendet (Powell et al., 2001). Die wohl bekannteste und wichtigste moderne Anwendung von *Bacillus subtilis* besteht in der industriellen Produktion von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) (Bacher et al., 2000). Riboflavin ist als Zusatzstoff in Fruchtsäften, Vitamintabletten und anderen Lebensmitteln enthalten und wird mittlerweile zu einem Großteil durch Fermentationen mit *Bacillus subtilis* hergestellt (Pasamontes et al., 2002).

## 4.2 Der Zentralstoffwechsel von *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* ist in der Lage, eine Vielzahl von organischen Verbindungen als Kohlenstoff- und Energie-Quelle zu nutzen. Zu den verwertbaren Substraten gehören außer verschiedenen Kohlehydraten auch eine Vielzahl an Polysacchariden, organischen Säuren und Alkoholen (Sonenshein et al., 2002). Durch Umwandlung dieser Substrate innerhalb des Zentralstoffwechsels wird der Bedarf der Zelle an Energieäquivalenten in Form von ATP, sowie an Reduktionskraft in Form von NADH und NADPH gedeckt. Des Weiteren werden im Zentralstoffwechsel sämtliche für die Synthese aller Zellbestandteile notwendigen Vorläufermoleküle synthetisiert. Zu den Stoffwechselwegen des Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis*, dessen Komponenten im Folgenden eingehend beschrieben werden, gehören unter anderem die Glykolyse, der Pentosephosphatweg (PPP), die Reaktionen des Pyruvatmetabolismus als zentraler Knotenpunkt des Zellmetabolismus, sowie der Tricarbonsäurezyklus (TCA) (Abb. 4.1). Das Netzwerk des Zentralstoffwechsels wurde, sofern nicht explizit angegeben, aufgrund von Datenbankrecherchen (KEGG, MetaCyc, TIGR) und Informationen aus Lehrbüchern über Biochemie (Stryer, 1996) und *Bacillus subtilis* (Sonenshein et al., 2002), aufgestellt.



**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *Bacillus subtilis* mit den Komponenten PTS, Glykolyse, Pentosephosphatweg, Pyruvatknotenpunkt, sowie den an Synthese und Abbau von Glutamat beteiligten Wegen. Reaktionen zur Generierung von ATP (schwarz unterlegt) und NADPH (weiß unterlegt) sind zusätzlich gekennzeichnet. R bezeichnet einen Metabolit, der an Transaminasereaktionen als Aminogruppen-Donator oder Akzeptor beteiligt ist.

### 4.2.1 Kohlehydrataufnahme

Das von *Bacillus subtilis* bevorzugte Substrat stellt Glucose dar, deren Aufnahme bei *Bacillus subtilis* auf verschiedene Arten erfolgen kann. Der hauptsächlich genutzte Weg zur Aufnahme von Hexosen wie Glucose und Fructose besteht in dem Phosphoenolpyruvat:Zucker-Phosphotransferasesystem (PTS) (Postma et al., 1993; Reizer et al., 1999; Saier et al., 2002). Im PTS wird Glucose bei der Aufnahme gleichzeitig mittels Phosphoenolpyruvat (PEP) als Phosphatdonor phosphoryliert und als Glucose-6-Phosphat in die Zelle eingeschleust. Eine schematische Darstellung des PTS befindet sich in Kapitel 4.3.1 (Abb. 4.3) bei der Beschreibung der Katabolitenrepression von *Bacillus subtilis*.

Das PTS besteht aus zwei löslichen Komponenten, dem Enzym I (EI), sowie dem HPr („heat-stable protein“). Das EI überträgt den Phosphatrest des PEP zunächst autokatalytisch auf sich selbst und anschließend auf einen Histidinrest des HPr. Von diesem wird der Phosphatrest dann auf das glucosespezifische Enzym II (EII<sup>Glc</sup>) des PTS übertragen. Das EII<sup>Glc</sup> besteht aus insgesamt drei Domänen (A, B und C), von denen EIIC<sup>Glc</sup> hydrophob und membranassoziiert ist. Von dem phosphorylierten HPr wird der Phosphatrest zunächst auf EIIGlc übertragen, von dort auf EIIB<sup>Glc</sup> und von diesem auf die Glucose selbst, welche durch das EIIBC<sup>Glc</sup>-Membrantransportprotein über die Cytoplasmamembran transportiert wird.

Zusätzlich zur Aufnahme über das PTS kann *Bacillus subtilis* Glucose auch über einen Glucose/Mannose:H<sup>+</sup>-Symporter aufnehmen (Saier et al., 2002), die Phosphorylierung erfolgt dann im Cytoplasma über eine glucosespezifische Hexokinase mittels ATP als Phosphatdonor (Saier et al., 2002; Skarlatos and Dahl, 1998; Wagner et al., 2000).

### 4.2.2 Glykolyse

Die Glykolyse besteht aus einer Reihe von neun aufeinander folgender, biochemischer Reaktionen, die sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen ablaufen und primär der Umwandlung von Kohlehydraten in Precursor für Biomasse und andere Stoffwechselwege dienen. Insgesamt werden dabei ohne Berücksichtigung des Verbrauchs an Vorläufermolekülen für die Biomassebildung aus einem mol Glucose-6-Phosphat zwei mol Pyruvat gebildet (Abb. 4.1). In der Summe werden dabei pro aufgenommenem mol Glucose zwei mol Reduktionsäquivalente in Form von NADH sowie zwei mol ATP gewonnen. Einige Metabolite der Glykolyse stellen zudem wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von Biomassebestandteilen dar. Dihydroxyacetonphosphat fließt bei *Bacillus subtilis* in die Synthese von Glycerin und Teichonsäure, Glycerinaldehyd-3-Phosphat dient zur Synthese von Lipiden und Zellwandbestandteilen, 3-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat sind Ausgangsstoffe für die Biosynthese von Aminosäuren. Da 3-Phosphoglycerat und

Phosphoenolpyruvat kontinuierlich zur Bildung von Biomasse abgezogen werden, entstehen bei Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose mehr Reduktionsäquivalente als Pyruvat.

### 4.2.3 Pentosephosphatweg (PPP)

Der Pentosephosphatweg stellt für *Bacillus subtilis* einen wichtigen Weg dar, um NADPH sowie Vorstufen für die Biosynthese von Aminosäuren und Nukleotiden zu gewinnen. Man kann innerhalb des PPP zwei Abschnitte unterscheiden, einen oxidativen, irreversiblen und einen nicht-oxidativen, reversiblen Teil. Im oxidativen Teil wird Glucose-6-P zunächst durch die Glucose-6-P-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert, und anschließend durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu Ribulose-5-P oxidativ decarboxyliert, wobei insgesamt zwei mol NADPH gebildet werden (Abb. 4.1).

Im reversiblen Teil wird Ribulose-5-P unter Beteiligung von Isomerasen, Epimerase-, Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen in verschiedene Zuckerphosphate überführt. Diese Zuckerphosphate fließen entweder in die Synthese von Nukleotiden und Aminosäuren (Histidin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan), oder über Fructose-6-P und Glycerinaldehyd-3-P zurück in die Glykolyse. In der Summe werden im PPP für die Annahme, dass keine Intermediate für die Biomassesynthese abgezogen werden aus einem mol Glucose-6-P zwei mol NADPH, 0,66 mol Fructose-6-P, 0,33 mol Glycerinaldehyd-3-P und ein mol CO<sub>2</sub> gebildet.

### 4.2.4 Pyruvatmetabolismus und fermentative Stoffwechselwege

Das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat ist bei *Bacillus subtilis* an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt und stellt einen zentralen Verzweigungspunkt innerhalb des Zentralmetabolismus dar (Abb. 4.1). Pyruvat kann nach oxidativer Decarboxylierung als Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust, oder zur Bildung von Aminosäuren genutzt werden.

Des Weiteren ist Pyruvat an einer Reihe von Reaktionen beteiligt, welche der Bildung von Fermentationsprodukten dienen. Unter anaeroben Bedingungen kann *Bacillus subtilis* die im Metabolismus anfallenden Reduktionsäquivalente auf Intermediate des Pyruvatmetabolismus übertragen und dadurch auch unter Sauerstoffausschluss ATP generieren (Cruz Ramos et al., 2000; Nakano et al., 1997). Sind verwertbare Kohlehydrate im Überschuss vorhanden, kommt die Bildung von Fermentationsprodukten bei *Bacillus subtilis* allerdings auch unter aeroben Bedingungen vor, was gemeinhin als Überflusstoffwechsel bezeichnet wird (Dauner et al., 2001b). Ebenso kann *Bacillus subtilis* bei Mangel an energiereichen Substraten wiederum sämtliche gebildeten Sekundärprodukte

wie Glycerin, Acetat und Acetoin unter aeroben Bedingungen als alternative Energie- und Kohlenstoff-Quelle nutzen (Grundy et al., 1993b).

Pyruvat kann über die Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert und ausgeschieden werden, wobei pro umgesetztem mol Pyruvat ein mol  $\text{NADH} + \text{H}^+$  oxidiert wird. Zwei mol Pyruvat können über die Acetolactat-Synthase unter Decarboxylierung zu einem mol Acetolactat umgewandelt werden, welches wiederum durch die Acetolactat-Decarboxylase unter erneuter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung zu 2-Acetoin umgesetzt wird. Dieses kann nun entweder direkt ausgeschieden oder unter Oxidation von einem mol  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu 2,3-Butandiol reduziert werden.

Das quantitativ hauptsächlich im Überflussmetabolismus von *Bacillus subtilis* gebildete Produkt stellt Acetat dar (Dauner et al., 2001b), dessen Bildung in *Bacillus subtilis* eine Besonderheit im Vergleich zu anderen Mikroorganismen darstellt. Der Vorläufer für die Acetatbildung ist Acetylphosphat, für dessen Synthese es bei *Bacillus subtilis* zwei verschiedene Möglichkeiten gibt. Einerseits kann ein mol Acetyl-CoA über die Phosphotransacetylase unter Transfer eines freien Phosphatrestes zu einem mol Acetylphosphat umgesetzt werden (Cruz Ramos et al., 2000; Nakano et al., 1997). Andererseits besitzt *Bacillus subtilis* zusätzlich eine Pyruvat-Oxidase (Dandekar et al., 1999), welche ein mol Pyruvat mit einem mol  $\text{O}_2$  und einem Mol freiem Phosphat zu einem Mol Acetylphosphat, einem mol  $\text{CO}_2$  und einem mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  umsetzen kann (Wolfe, 2005). Das über diese Reaktionen gebildete Acetylphosphat wird nun über die Acetat-Kinase zu Acetat umgesetzt, wobei pro umgesetztem mol Acetylphosphat ein mol ATP gewonnen wird. Trotz der Möglichkeit, Acetylphosphat über zwei verschiedene Wege zu synthetisieren wird in der Literatur allgemein angenommen, dass dessen Bildung über die Phosphotransacetylase verläuft, während der Pyruvat-Oxidase keine Bedeutung in der Acetat-Bildung zugeschrieben wird (Cruz Ramos et al., 2000; Dauner and Sauer, 2001; Dauner et al., 2001b; Nakano et al., 1997).

Zusätzlich besitzt *Bacillus subtilis* aufgrund der Analyse seiner Genomsequenz eine Aldehyd-Dehydrogenase, sowie eine Alkohol-Dehydrogenase zur anaeroben Bildung von Ethanol aus Acetyl-CoA (Nakano et al., 1997). Eine Aktivität dieser Enzyme konnte jedoch unter aeroben Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Dauner et al., 2001b).

Eine unter aeroben Bedingungen sehr wichtige Reaktion innerhalb des Pyruvatmetabolismus wird durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex) bewerkstelligt. Dieser besteht bei Prokaryonten aus den Untereinheiten  $\text{E}_1$  (mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit),  $\text{E}_2$  und  $\text{E}_3$ .  $\text{E}_1$  katalysiert sowohl die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat als auch die nachfolgende reduktive Acetylierung einer Lipoyl-Gruppe, die kovalent an  $\text{E}_2$  gebunden ist.  $\text{E}_2$  überträgt diese Acetyl-Gruppe daraufhin auf das Coenzym A (CoA), während  $\text{E}_3$  die Rückoxidation der

Dihydrolipoyl-Gruppe von  $E_2$  unter Verwendung von  $NAD^+$  als terminalen Elektronen-Akzeptor katalysiert. In der Summe entstehen somit aus einem mol Pyruvat, einem mol  $NAD^+$  und einem mol CoA-SH insgesamt ein mol Acetyl-CoA ein mol  $NADH+H^+$  und ein mol  $CO_2$ . Das entstandene Acetyl-CoA wird nun im Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt oder für die Synthese von Acetat verwendet. Des Weiteren dient Acetyl-CoA der Synthese von Aminosäuren, Fettsäuren und Zellwandkomponenten.

#### 4.2.5 Tricarbonsäurezyklus (TCA) und oxidative Phosphorylierung

Der TCA umfasst eine Reihe von acht enzymatischen Reaktionen und dient sowohl der Gewinnung von Reduktionsäquivalenten durch vollständige Oxidation des Acetyl-CoA, als auch der Bereitstellung von Vorstufen für Biosynthesen. Zu Beginn des TCA kondensiert Acetyl-CoA mit Oxalacetat zu Citrat, woraus im weiteren Verlauf nach insgesamt 8 Reaktionen, die unter anderem zwei Decarboxylierungen umfassen, wieder Oxalacetat für einen erneuten Zyklus bereitgestellt wird (Abb. 4.1). Zusätzlich entstehen pro mol Acetyl-CoA insgesamt 2 mol  $NADH+H^+$ , 1 mol  $NADPH+H^+$ , 1 mol ATP, sowie 1 mol  $FADH_2$ . Wichtige Intermediate des TCA, welche für die Synthese von Aminosäuren, Nukleotiden, Lipiden und anderen Biomassekomponenten benötigt werden sind  $\alpha$ -Ketoglutarat, Oxalacetat sowie Succinyl-CoA. Eine Besonderheit im Vergleich zu anderen Prokaryonten stellt die Succinyl-CoA-Synthetase innerhalb des TCA von *Bacillus subtilis* dar, für welche Datenbankrecherchen zufolge in der Genomsequenz anstatt der GDP-abhängigen lediglich die ADP-abhängige Isoform vorliegt (KEGG, MetaCyc). Laut Literaturangaben gilt die Succinyl-CoA-Synthetase von *Bacillus subtilis* grundsätzlich als ATP-bildend (Dauner and Sauer, 2001; Sauer et al., 1998; Sonenshein et al., 2002).

Die Bildung von  $NADPH$  im Tricarbonsäurezyklus wird über die Isocitrat-Dehydrogenase bewerkstelligt, welche die  $NADP^+$ -abhängige, oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat katalysiert (Jin et al., 1997; Matsuno et al., 1999; Ramaley and Hudock, 1973). *Bacillus subtilis* verfügt zusätzlich noch über die Fähigkeit der gegenseitigen Umwandlung von  $NADH$  und  $NADPH$  (Sauer et al., 1997). Dies wird auf das Vorhandensein von Transhydrogenasen zurückgeführt, die Literaturangaben zufolge bei *Bacillus subtilis* als reversibel und Energie-unabhängig gelten (Sauer et al., 1998).

Unter der Annahme einer Äquivalenz von  $NADPH$  und  $NADH$  kann *Bacillus subtilis* bei vollständiger Metabolisierung von Glucose über PTS, Glykolyse, oxidative Decarboxylierung und Tricarbonsäurezyklus in der Summe aus einem mol Glucose insgesamt 4 mol ATP, 2 mol  $FADH_2$  und 10 mol  $NADH+H^+$  generieren. Die anfallenden Reduktionsäquivalente können in der Atmungskette durch Übertragung der Elektronen auf den Elektronenakzeptor Sauerstoff regeneriert werden. Dabei wird über die Cytoplasmamembran hinweg ein

Protonen-Gradient aufgebaut, welcher dazu genutzt wird, durch oxidative Phosphorylierung über eine membrangebundene ATP-Synthase ATP zu generieren. Die Stöchiometrie dieser Reaktion ist variabel und beträgt bei Prokaryonten maximal 3 mol ATP pro mol  $\text{NADH}+\text{H}^+$  und maximal 2 mol ATP pro mol  $\text{FADH}_2$ . In der Summe kann *Bacillus subtilis* also, unter der Voraussetzung, dass keine unvollständigen Oxidationen (Gärungsprozesse) stattfinden und keine Intermediate für die Biomassebildung abfließen, aus einem mol Glucose maximal 38 mol ATP generieren.

#### 4.2.6 Anaplerotische Reaktionen

Da im TCA in der Nettosumme keine Intermediate gebildet werden,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Succinyl-CoA und Oxalacetat jedoch kontinuierlich zur Synthese von Biomassekomponenten verbraucht werden, verfügt *Bacillus subtilis* über einige ergänzende Reaktionen mit auffälliger (anaplerotischer) Funktion. Die beiden Reaktionen der Pyruvat-Carboxylase und des Malatenzyms bilden gemeinsam eine wichtige Verknüpfung zwischen Pyruvat-Knoten und Tricarbonsäurezyklus. Dies ermöglicht einerseits einen schnellen Austausch an Intermediaten zwischen beiden Stoffwechselwegen und andererseits die Energiegewinnung bei Wachstum auf Substraten, welche über den TCA in den Zentralmetabolismus eingeschleust werden. (Diesterhaft and Freese, 1973).

*Bacillus subtilis* verfügt über insgesamt 4 Isoformen des Malatenzyms, von denen Literaturangaben zufolge eine Isoform (*ytsJ*) überwiegend  $\text{NADP}^+$ -abhängig ist, zwei (*malS* und *mleA*) sowohl  $\text{NAD}^+$  als auch  $\text{NADP}^+$  gleichermaßen als Cofaktor nutzen können und eine Isoform (*maeA*), die  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor bevorzugt (Lerondel et al., 2006). Dem  $\text{NADP}^+$ -abhängigen Isoenzym *ytsJ* wird dabei die tragende Rolle zugesprochen, da in Expressionsstudien von *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Malat lediglich für dieses Enzym eine signifikante Expression beobachtet werden konnte. Des Weiteren treten bei Deletion dieses Gens bei Wachstum auf Malat Wachstumsdefekte auf, während dies bei den übrigen drei Genen nicht der Fall ist (Lerondel et al., 2006). Bei der Reaktion des Malatenzyms handelt es sich um eine oxidative Decarboxylierung, wobei aus einem mol Malat und einem mol  $\text{NADP}^+$  ein mol Pyruvat, ein mol  $\text{CO}_2$ , sowie ein mol  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  entstehen.

Den Gegenpart zu dem Malatenzym übernimmt die Pyruvat-Carboxylase, welche die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat durch Fixierung freien, intrazellulären Carbonats katalysiert. Diese Reaktion benötigt jedoch Energie, welche aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat stammt, so dass pro synthetisiertem mol Oxalacetat ein mol ATP verbraucht wird. Über die anaplerotische Reaktion der Pyruvat-Carboxylase kann *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf energiereichen Kohlehydraten den gesamten Bedarf an

Oxalacetat und Succinyl-CoA für die Synthese von Biomassekomponenten decken. (Fisher and Magasanik, 1984b).

#### 4.2.7 Gluconeogenese

Bei Wachstum auf Acetat und anderen organischen Säuren und Aminosäuren kann *Bacillus subtilis* ausgehend von C<sub>4</sub>-Metaboliten des TCA sämtliche Intermediate des Zentralstoffwechsels einschließlich C<sub>6</sub>-Verbindungen synthetisieren (Dauner and Sauer, 2001).

Dabei verläuft die Glykolyse im Vergleich zum Wachstum auf Glucose in umgekehrter Richtung, jedoch müssen dazu die beiden irreversiblen Reaktionen der 6-Phosphofruktokinase und der Pyruvat-Kinase durch alternative, gluconeogenetische Reaktionen überbrückt werden.

Die Decarboxylierung von Oxalacetat zur Synthese von Phosphoenolpyruvat geschieht über die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, wobei pro umgesetztem mol Oxalacetat ein mol ATP zur Phosphorylierung aufgewendet wird (Abb. 4.1). Untersuchungen an Pyruvat-Kinase-Knockout-Mutanten zeigten eine Aktivität der PEP-Carboxykinase bei Inaktivierung der Pyruvat-Carboxylase auch in Richtung des Oxalacetat. Allerdings kann aufgrund dieser Beobachtungen nicht auf eine Beteiligung der PEP-Carboxykinase an den anaplerotischen Reaktionen geschlossen werden (Zamboni et al., 2004).

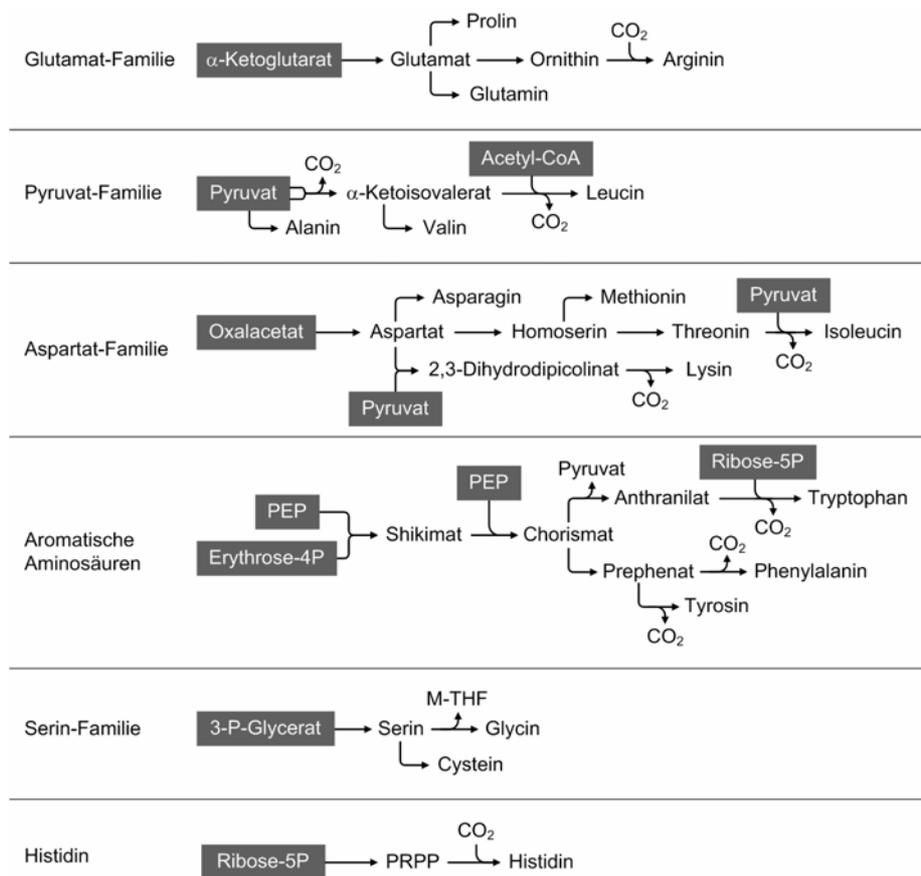
Die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-Bisphosphat wird durch die Fructose-1,6-Bisphosphatase katalysiert, wobei die Phosphatgruppe nicht auf ATP übertragen wird, sondern als freies Phosphat abgespalten wird (Fujita and Freese, 1979).

#### 4.2.8 Aminosäuremetabolismus

Da die metabolische Flussanalyse die Bestimmung der <sup>13</sup>C-Markierungsverteilungen in proteinogenen Aminosäuren erfordert und einen besonderen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt, müssen zusätzlich zu den Reaktionen des Zentralmetabolismus die Biosynthesewege der Aminosäuren betrachtet werden. Von besonderer Wichtigkeit sind dabei die Synthese- und Abbauwege für Glutamat (Abb. 4.1), da es sich bei dieser Aminosäure um ein in dieser Arbeit eingesetztes Substrat handelt.

Die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert die Desaminierung von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat, wobei pro mol umgesetztem Glutamat außer einem mol freiem Ammonium auch ein mol NADH + H<sup>+</sup> generiert wird. Obwohl diese Reaktion reversibel ist, wird der Glutamat-Dehydrogenase in *Bacillus subtilis* überwiegend die Rolle des Abbaus von Glutamat zugeschrieben (Belitsky and Sonenshein, 1998). Die Synthese von Glutamat verläuft in *Bacillus subtilis* überwiegend über die Glutamat-Synthase. Dabei werden aus je einem mol

$\alpha$ -Ketoglutarat und Glutamin unter Übertragung der Aminogruppe insgesamt 2 mol Glutamat synthetisiert, wobei zusätzlich ein mol NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird. Ebenfalls in betracht gezogen werden muss die Glutamin-Synthetase. Diese katalysiert die Synthese von Glutamin aus Glutamat und freiem Ammonium unter Verbrauch von ATP. Zusammen bilden die drei Enzyme Glutamat-Dehydrogenase, Glutamat-Synthase und Glutamin-Synthetase ein zyklisches System von Reaktionen, dessen primäre Funktion in der Aufrechterhaltung der intrazellulären Poolgrößen von Glutamat und Glutamin besteht, da diese beiden Aminosäuren wichtige Aminogruppendonatoren für sämtliche an den Biosynthesewegen der übrigen Aminosäuren beteiligten Transaminasereaktionen sind (Sonenshein et al., 2002). Die Biosynthesewege aller 20 im Proteom von *Bacillus subtilis* enthaltenen L- Aminosäuren sind in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt. Die Aminosäuren lassen sich aufgrund ihrer Synthesewege in 6 Gruppen unterteilen, an deren Synthese insgesamt 8 verschiedene Intermediate des Zentralmetabolismus beteiligt sind (Abb. 4.2).

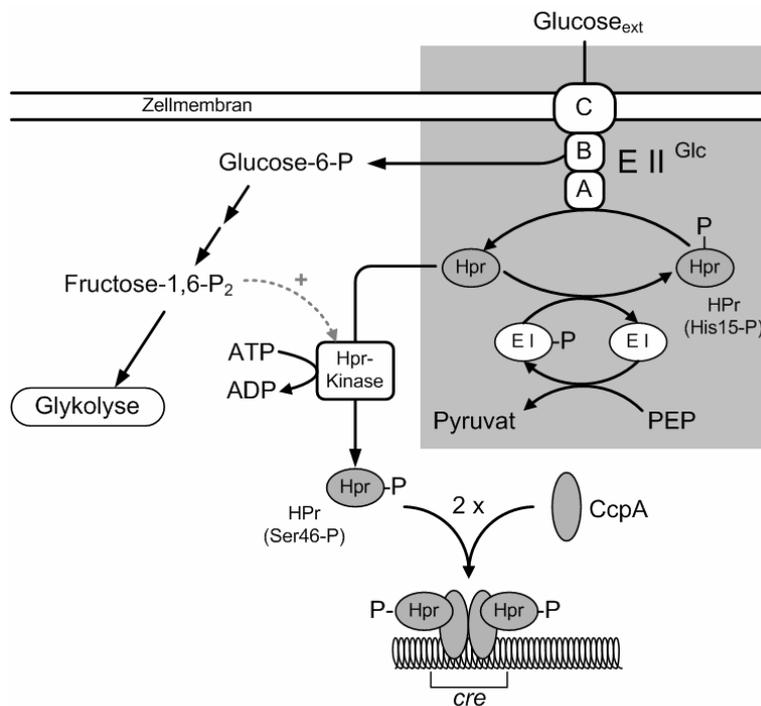


**Abb. 4.2:** Schematische Darstellung der Biosynthesewege der Aminosäuren in *Bacillus subtilis*. Diese lassen sich aufgrund ihrer Synthesewege in 6 unterschiedliche Gruppen einordnen und werden aus insgesamt 8 Intermediaten des Zentralstoffwechsels (grau unterlegt) synthetisiert. Verwendete Abkürzungen: PEP = Phosphoenolpyruvat, M-THF = Methyl-Tetrahydrofolat.

## 4.3 Die Regulation des Zentralstoffwechsels von *Bacillus subtilis*

### 4.3.1 Der Mechanismus der Katabolitenrepression durch Glucose bei *Bacillus subtilis*

Die Fähigkeit von *Bacillus subtilis*, eine Vielzahl von Verbindungen mit unterschiedlichem Energiegehalt als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen erfordert eine substratabhängige Regelung von Aufnahme und Metabolisierung. Bei Vorhandensein des von *Bacillus subtilis* bevorzugten Substrats Glucose werden die Transkription der Gene für Aufnahme und Metabolisierung alternativer Substrate reprimiert, was als Kohlenstoff-Katabolitenrepression (carbon catabolite repression = CCR) bezeichnet wird (Stülke and Hillen, 2000). Der Mechanismus der glucoseabhängigen CCR bei *Bacillus subtilis* ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung des PTS (grau unterlegt) und der CcpA-vermittelten Katabolitenrepression (Erläuterung im Text). EII<sup>Glc</sup> = Glucosespezifisches Enzym II des PTS mit den drei Domänen A, B und C (membranassoziiert); EI = Enzym I des PTS; HPr = Heat Stable Protein; CcpA = Catabolite Control Protein A; cre = Catabolite Response Element

Zentraler Bestandteil ist das globale Regulatorprotein CcpA (catabolite control protein A), welches in der Lage ist, an eine spezifische Sequenz, die so genannte cre-Sequenz (cre = catabolite response element) des zu regulierenden Gens zu binden (Kim et al., 1995). Um an

die *cre*-Sequenz binden zu können, benötigt CcpA das an Serin 46 phosphorylierte HPr (HprSer46P) aus dem PTS als Corepressor (Henkin, 1996; Lorca et al., 2005). Die Phosphorylierung des HPr wird durch die HPr-Kinase bewerkstelligt, welche durch das Intermediat der Glykolyse Fructose-1,6-Bisphosphat stimuliert wird (Galinier et al., 1997; Galinier et al., 1998). Die Metabolisierung von Glucose und anderer, glykolytisch abbaubarer Zucker stimuliert somit die CcpA-vermittelte Katabolitenrepression über den intrazellulären Level an Fructose-1,6-Bisphosphat (Seidel et al., 2005). Die Koppelung zwischen Glucoseaufnahme und CcpA-vermittelter Katabolitenrepression besteht somit in der PTS-Komponente HPr, da diese nicht nur als Corepressor für CcpA fungiert, sondern auch den Transport des Phosphatrestes für die Phosphorylierung der Glucose im PTS übernimmt (Abb. 4.3).

Das Regulationssystem der CCR wurde erstmals bei *Bacillus subtilis* entdeckt, kommt allerdings in analoger Form bei sehr vielen gram-positiven Bakterien vor und stellt daher ein wichtiges Modellsystem dar (Warner and Lolkema, 2003).

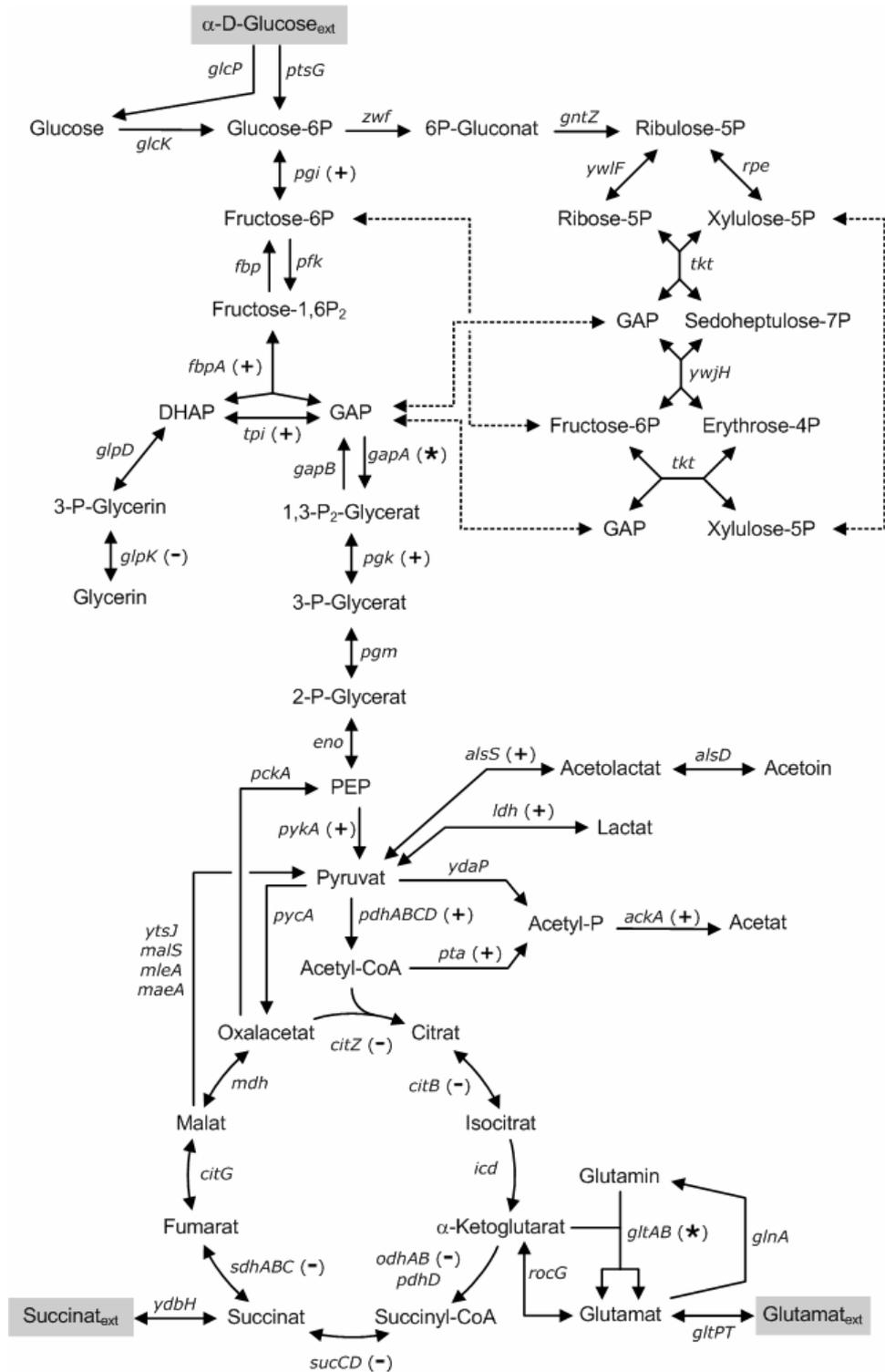
#### **4.3.2 Durch Katabolitenrepression regulierte Gene von *Bacillus subtilis***

Bei der *cre*-Sequenz handelt es sich um einen 14 Basenpaare langen Abschnitt, der einzeln oder mehrfach in der Promotorregion oder im offenen Leserahmen CcpA-regulierter Gene vorkommt (Weickert and Chambliss, 1990). Ob ein Gen durch CcpA aktiviert oder reprimiert wird, ist vor allem von der Lage der *cre*-Sequenz innerhalb des zu regulierenden Gens abhängig. (Grundy et al., 1993a; Miwa et al., 2000). Die Bindung von CcpA an *cre*-Sequenzen upstream der Promotorregion aktiviert die Transkription, während die Interaktion von CcpA mit *cre*-Sequenzen innerhalb oder downstream der Promotorregion die Transkription des regulierten Gens reprimiert (Miwa et al., 2000; Presecan-Siedel et al., 1999; Turinsky et al., 1998). Insgesamt wurden bislang in *Bacillus subtilis* über 200 Gene nachgewiesen, die CcpA-vermittelt aktiviert oder reprimiert werden können (Moreno et al., 2001; Yoshida et al., 2001).

Zusätzlich zu diesen Genen existieren in *Bacillus subtilis* Operons, die zwar keine *cre*-Sequenz für CcpA besitzen, für die aber dennoch eine indirekte, CcpA-vermittelte Induktion durch Glucose beobachtet werden konnte. Dies konnte für das Operon *gapA* der Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase, sowie für das Operon *gltAB* der Glutamat-Synthase nachgewiesen werden (Ludwig et al., 2002; Wacker et al., 2003).

Abbildung 4.4 zeigt eine schematische Darstellung der Gene, welche die Enzyme des Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis* kodieren mit jeweiliger Angabe der Regulation

durch CcpA (Blencke et al., 2003; Lorca et al., 2005; Ludwig et al., 2001; Sonenshein et al., 2002).



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung des Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis* mit den beteiligten Genen. Die Angaben in den Klammern hinter den jeweiligen Genbezeichnungen zeigen die Art der CcpA-vermittelten Regulation durch Glucose: (+) = durch CcpA aktiviert; (-) = durch CcpA reprimiert; (\*) = indirekt durch CcpA aktiviert.

## 4.4 Metabolische Flussanalyse in *Bacillus subtilis*

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit besteht in der Untersuchung metabolischer Reaktionsnetzwerke mittels Quantifizierung intrazellulärer Stoffflüsse innerhalb des Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis*, was als metabolische Flussanalyse (MFA) bezeichnet wird. In der metabolischen Flussanalyse wird die Aktivität definierter, biochemischer Reaktionen innerhalb eines metabolischen Netzwerks in Relation zu der Substrataufnahmerate als Bezugsgröße ermittelt. Für die exponentielle Wachstumsphase eines Mikroorganismus kann davon ausgegangen werden, dass innerhalb des Zellstoffwechsels ein Pseudo-Fließgleichgewicht herrscht. In einem solchen quasi-stationären Zustand des metabolischen Netzwerkes sind die intrazellulären Konzentrationen der beteiligten Intermediate konstant und die bestimmten Stoffflüsse entsprechen somit den jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten (Niranjan and San, 1989; Wiechert, 2001).

Die Durchführung der metabolischen Flussanalyse erfordert geeignete mathematische Modelle, welche eine Kombination aus einem Netzwerk zur stöchiometrischen Bilanzierung beteiligter Metabolite („Metabolite Balancing“) und einem Isotopomer-Netzwerk zur Bilanzierung von <sup>13</sup>C-Markierungsanteilen („Isotope Balancing“) darstellen (Wittmann and Heinzle, 2001a; Wittmann and Heinzle, 2001b; Wittmann and Heinzle, 2002; Wittmann et al., 2004a; Yang et al., 2004; Yang et al., 2007).

### 4.4.1 Stöchiometrische Bilanzierung

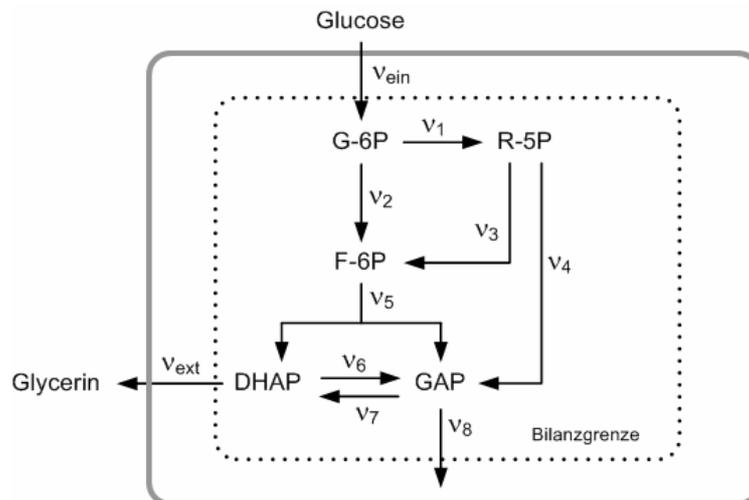
Die Grundlage für die MFA besteht in einem stöchiometrischen Modell des Zentralstoffwechsels, in welchem für alle beteiligten Metabolite Massenbilanzen aufgestellt werden. Zur Bilanzierung der jeweiligen Metabolite werden für die beteiligten, biochemischen Reaktionen lineare Gleichungen aufgestellt, so dass ein Gleichungssystem entsteht, welches das gesamte Netzwerk beschreibt. Anhand der direkten Messung extrazellulärer Flussraten wie Substrataufnahmerate, Bildungsraten von Biomasse, CO<sub>2</sub> und Stoffwechselprodukten lassen sich mittels des Gleichungssystems die intrazellulären Stoffflüsse aus den extrazellulären Raten berechnen, was als „Metabolite Balancing“ bezeichnet wird. Für die Konzentration pro g Biotrockenmasse eines Metaboliten X, in dessen Pool  $n$  metabolische Flüsse hinein und  $m$  Flüsse hinaus fließen ergibt sich die zeitliche Änderung der Konzentration [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] aus der Differenz der zu- und abfließenden Flüsse nach:

$$\frac{dX}{dt} = \sum_{i=1}^n v_{zu,i} - \sum_{j=1}^m v_{ab,j} \quad [\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}] \quad \text{Gl. 4.1}$$

Im quasi-stationären Zustand des stöchiometrischen Netzwerks sind sämtliche intrazellulären Metabolitkonzentrationen konstant und Gleichung 4.1 reduziert sich zu:

$$\sum_{i=1}^n v_{zu,i} = \sum_{j=1}^m v_{ab,j} \quad [\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad \text{Gl. 4.2}$$

Als Beispiel zur stöchiometrischen Bilanzierung ist in Abbildung 4.5 ein stark vereinfachtes, metabolisches Netzwerk dargestellt, welches aus insgesamt fünf intrazellulären Metaboliten, zwei extrazellulären, messbaren Stoffflüssen und acht intrazellulären, nicht messbaren Stoffflüssen besteht. Die Metabolitbilanzen für das in Abbildung 4.5 dargestellte Netzwerk sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.



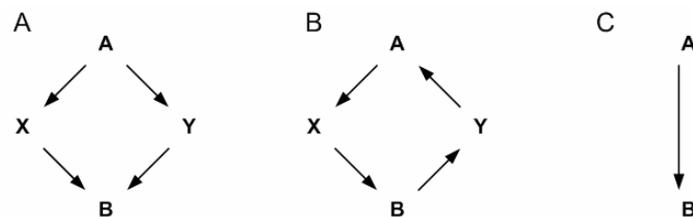
**Abb. 4.5:** Schematische Darstellung eines stöchiometrischen Netzwerks mit insgesamt fünf zu bilanzierenden Metaboliten, zwei messbaren ( $v_{\text{ein}}$  und  $v_{\text{ext}}$ ) und acht nicht messbaren Flüssen ( $v_1$ – $v_8$ ).

**Tab. 4.1:** Bilanzgleichungen für die Metabolitpools des in Abb. 4.5 dargestellten, metabolischen Netzwerks, wobei die Flüsse  $v$  jeweils die Dimension  $[\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}]$  besitzen.

Pool	eintretende Flüsse	=	austretende Flüsse
G-6P	$v_{\text{ein}}$	=	$v_1 + v_2$
F-6P	$v_2 + v_3$	=	$v_5$
R-5P	$v_1$	=	$v_3 + v_4$
DAHP	$v_5 + v_7$	=	$v_{\text{ext}} + v_6$
GAP	$v_4 + v_5 + v_6$	=	$v_7 + v_8$

Tabelle 4.1 zeigt, dass zur Berechnung der insgesamt 10 an dem Netzwerk beteiligten Flüsse lediglich 5 Gleichungen zur Verfügung stehen. Damit bleiben 5 Freiheitsgrade, d. h. aus 5 bekannten Flüssen könnten die übrigen Flüsse des Netzwerks bestimmt werden. Da das Netzwerk jedoch nur zwei extrazelluläre, messbare Flüsse enthält, können die restlichen 8 unbekanntes Flüsse mit den stöchiometrischen Gleichungen alleine nicht berechnet werden.

Um die Bilanzierung von Metaboliten anhand eines linearen Gleichungssystems durchzuführen, ist aufgrund der hohen Zahl von unbekannt Variablen eine ausreichend hohe Anzahl von extrazellulären Messgrößen erforderlich, was in der Praxis nicht gegeben ist (Nielsen, 2001; Niranjana and San, 1989). Daher werden auf Basis des Bedarfs für die Biomassebildung zusätzliche Bilanzen für NADP/NADPH oder ADP/ATP verwendet, deren Bilanzierung jedoch mit großen Unsicherheiten behaftet ist, so dass sich diese Vorgehensweise nur eingeschränkt zur Bestimmung der Flussparameter eignet (Wittmann and Heinzle, 2002). Des Weiteren wurde anhand von Aktivitätsmessungen in Zellextrakten von *Bacillus subtilis* eine aktive Transhydrogenase nachgewiesen (Dauner and Sauer, 2001; Sauer et al., 1998), was eine Bilanzierung der einzelnen Reduktionsäquivalente unmöglich macht. Biologische Stoffwechselsysteme sind außerdem sehr kompliziert aufgebaut und enthalten eine Reihe von Stoffwechselwegen, deren Flüsse sich durch Bilanzierung der Metabolite nicht quantifizieren lassen (Schmidt et al., 1998; Wiechert, 2001), wie z. B. alternative Stoffwechselwege, zyklische Systeme oder reversible Reaktionen (Abb. 4.6). Aus diesen Gründen werden in der metabolischen Flussanalyse zusätzlich zur stöchiometrischen Bilanzierung Markierungsstudien unter Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten durchgeführt (Kap. 4.4.2).



**Abb. 4.6:** Die stöchiometrische Bilanzierung ermöglicht nicht die Auflösung von Flussraten bei Vorhandensein von (A) alternativen Stoffwechselwegen, (B) zyklischen metabolischen Systemen und (C) reversiblen Reaktionen.

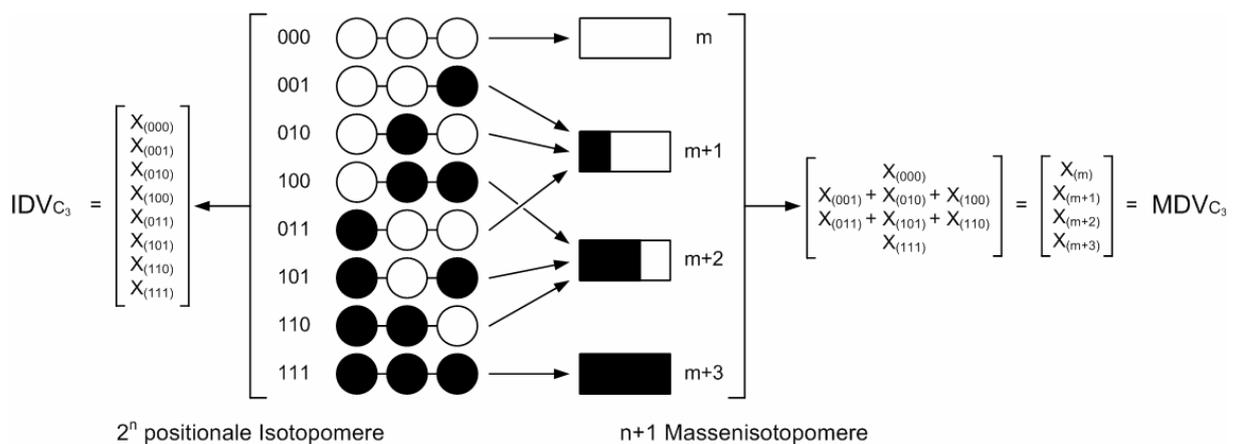
#### 4.4.2 Modellierung von Isotopomer-Netzwerken

Die Untersuchung von bestimmten Isotopen-Mustern (insbesondere  $^{13}\text{C}$  Isotopen-Mustern) in organischen Molekülen wird als Isotopomeren-Analyse bezeichnet. In Tracerstudien zur MFA werden Substrate eingesetzt, welche an einer definierten Stelle durch das Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  markiert sind. Die Metabolisierung des Substrats erzeugt aufgrund der Spezifität der beteiligten enzymatischen Reaktionen eine charakteristische Verteilung von Isotopomeren in den Intermediaten des Zentralmetabolismus (Wittmann and Heinzle, 2002). Mittels eines Netzwerks aus Isotopomerenbilanzen („Isotope Balancing“) können anhand der Isotopomerenverteilung in den Metaboliten die relativen Aktivitäten der beteiligten biochemischen Reaktionen zueinander bestimmt werden (Wittmann and Heinzle, 1999;

Wittmann and Heinzle, 2001a). Dazu muss die Topologie des Isotopomeren-Netzwerks, d.h. die durch die biochemischen Reaktionen bedingten Positionsänderungen der in den beteiligten Metaboliten enthaltenen Kohlenstoffatome genau bekannt sein. Zur Analyse der Markierungsverteilungen innerhalb der beteiligten Metabolite werden in der Regel zelluläre Bestandteile verwendet, die während des exponentiellen Wachstums aus diesen Intermediaten gebildet werden. Diese umfassen vor allem Aminosäuren des Zellproteins (Christensen and Nielsen, 1999; Dauner and Sauer, 2000; Wittmann and Heinzle, 1999), aber auch Glucose-Monomere aus Kohlehydraten (Shulman and Rothman, 2001).

#### 4.4.2.1 Mathematische Transformation der Markierung von Metaboliten

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei den Isotopomeren einer organischen Verbindung um Moleküle mit unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung. Für ein Molekül, das  $n$  Kohlenstoffatome besitzt, die entweder als  $^{12}\text{C}$ - (unmarkiert) oder  $^{13}\text{C}$ -Isotop (markiert) auftreten können, existieren somit  $2^n$  Möglichkeiten der Markierung und somit  $2^n$  Isotopomere (Abb. 4.6). Die Isotopomere eines Moleküls lassen sich mathematisch als ein Vektor mit  $2^n$  Elementen ausdrücken, dem so genannten IDV (Isotopomer Distribution Vector), dessen Elemente die relativen, molaren Anteile aller  $2^n$  möglichen Isotopomere eines aus  $n$  C-Atomen bestehenden Moleküls enthalten (Abb. 4.7) (Schmidt et al., 1997; Wittmann and Heinzle, 1999).



**Abb. 4.7:** Für ein Molekül mit  $n$  C-Atomen existieren  $2^n$  Möglichkeiten einer  $^{13}\text{C}$ -Markierung =  $2^n$  Isotopomere, welche sich als Isotopomer Distribution Vector (IDV) darstellen lassen. Da jedes C-Atom entweder markiert oder unmarkiert sein kann, ist den verschiedenen Isotopomeren im Binärcode (0 = unmarkiert, 1 = markiert) jeweils eine  $n$ -stellige Zahl zugeordnet. Somit enthält beispielsweise das fünfte Element des IDV eines Moleküls mit 3 C-Atomen den molaren Anteil ( $X$ ) des an den Positionen  $C_2$  und  $C_3$  markierten Isotopomers (011). Die insgesamt  $n+1$  Massenisotopomere lassen sich als Mass Distribution Vector (MDV) darstellen, in dessen  $n+1$  Elementen jeweils die relativen Anteile der Isotopomere mit gleicher Anzahl an markierten C-Atomen ( $m, m+1, \dots, m+n$ ) aufsummiert sind.

Die Analyse der  $^{13}\text{C}$ -Markierungsverteilung in Metaboliten wird in der Regel mit  $^{13}\text{C}$ -NMR oder massenspektrometrischen Verfahren durchgeführt (Sauer et al., 1997; Shulman and Rothman, 2001; Szyperski, 1998). Aufgrund der hohen Sensitivität und der schnellen Gewinnung von Daten wurde in dieser Arbeit die Massenspektrometrie mit GC/MS gewählt (Dauner and Sauer, 2000). Das in der GC/MS-Analytik bestimmte Massenspektrum von Molekülen erlaubt jedoch lediglich die Analyse mit der Markierungsverteilung auf der Ebene des gesamten Moleküls und nicht die direkte Bestimmung der Positionsisotopomerenverteilung. (Christensen and Nielsen, 1999). Daher ist es notwendig, den IDV in eine dem GC/MS-Massenspektrum entsprechende, mathematische Form zu transformieren, den so genannten MDV (Mass Distribution Vector) (Wittmann and Heinzle, 1999). Für ein Molekül mit  $n$  C-Atomen und  $2^n$  möglichen Positionsisotopomeren enthält der MDV  $n+1$  Elemente, in denen jeweils die relativen Anteile der Isotopomere mit gleicher Anzahl an markierten C-Atomen (Massenisotopomere) aufsummiert sind (Abb. 4.7).

#### 4.4.2.2 Mathematische Transformation des Kohlenstofftransfers

Um die durch die  $^{13}\text{C}$ -Markierung des metabolisierten Substrates auftretende Isotopomerenverteilung der verschiedenen Intermediate bilanzieren zu können, ist eine mathematische Darstellung der biochemischen Reaktionen des Zentralstoffwechsels erforderlich. Dies geschieht mittels einer charakteristischen Matrix, der so genannten Atom Mapping Matrix (AMM) (Zupke and Stephanopoulos, 1994), welche den Transfer von Kohlenstoff zwischen Edukten und Produkten der jeweiligen Reaktion in vereinfachter Form darstellt. Für die Reaktion eines Eduktes mit  $n$  C-Atomen zu einem Produkt mit  $m$  C-Atomen ergibt sich eine  $(m \times n)$ -Matrix, deren Zeilen die Positionen der C-Atome im Edukt, die Spalten die Positionen der C-Atome im Produkt darstellen. Die einzelnen Elemente der Matrix besitzen dabei jeweils den Wert 1, wenn in der Reaktion ein Kohlenstoffatom übertragen wird, andernfalls den Wert 0. Als Beispiel seien hier die beiden AMMs zur Darstellung des Kohlenstofftransfers bei der Reaktion der Pyruvat-Carboxylase unter Carboxylierung eines Moleküls Pyruvat zu Oxalacetat gezeigt, bei der die C-Atome 1, 2 und 3 des Pyruvat auf die Positionen 1, 2 und 3 des Oxalacetat übertragen werden (Gl. 4.3), während das C-Atom des  $\text{CO}_2$  die Position 4 im Oxalacetat einnimmt (Gl. 4.4):

$$AMM_{\text{Pyr} \rightarrow \text{OAA}} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad AMM_{\text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA}} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \quad \text{Gl. 4.3, Gl. 4.4}$$

Dabei muss für die an der Reaktion beteiligten Edukte und Produkte jeweils eine eigene AMM aufgestellt werden, welche den Kohlenstofftransfer in Richtung der Produktbildung beschreibt. Bei reversiblen Reaktionen ist die Aufstellung eines zusätzlichen Satzes an AMMs für die Rückreaktion erforderlich.

Die AMM dient primär dazu, eine zu den IDVs komplementäre Zuordnungsmatrix zu generieren, die so genannte Isotopomer Mapping Matrix (IMM) (Schmidt et al., 1997), welche die Berechnung der IDVs der in einer Reaktion entstehenden Produkte durch Multiplikation der IDVs der Edukte mit den entsprechenden IMMs ermöglicht. In der IMM, welche mittels einer in MATLAB implementierten Software aus der AMM direkt berechnet werden kann, werden für jedes einzelne Element des Produkt-IDVs einer Reaktion alle Paare von Edukt-Isotopomeren aufsummiert, die für die Bildung des betreffenden Produktisotopomers in Frage kommen. Daher existiert - analog zu der AMM - für jedes Edukt-Produkt-Paar einer biochemischen Reaktion eine spezifische IMM. Für eine Reaktion zwischen einem Edukt mit  $n$  C-Atomen zu einem Produkt mit  $m$  C-Atomen ergibt sich eine  $(2^m \times 2^n)$ -Matrix, in der die Anzahl der Zeilen der Anzahl der Isotopomere des Eduktes, die der Spalten der Anzahl der Isotopomere des Produktes entspricht.

Beispielhaft sei hier die aus der in Gleichung 4.3 dargestellten AMM für den Kohlenstofftransfer zwischen Pyruvat und Oxalacetat generierte IMM gezeigt (Gl. 4.5). Die Anzahl der Spalten entspricht der Anzahl der Elemente des Edukt-IDV von Pyruvat ( $2^3 = 8$ ), die der Zeilen der Anzahl der Elemente des Produkt-IDV von Oxalacetat ( $2^4 = 16$ ):

$$\text{IMM}_{\text{Pyr} \rightarrow \text{OAA}} = \begin{bmatrix}
 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1
 \end{bmatrix} \quad \text{Gl. 4.5}$$

Durch die Verwendung der IMMs existiert nun ein System, um den IDV und damit die Isotopomerenverteilung eines in einer Reaktion entstehenden Produktes aus dem IDV des Eduktes berechnen zu können. Dies geschieht durch elementweise Multiplikation der Spaltenvektoren, welche durch Multiplikation der Edukt-IDVs mit den zugehörigen IMMs erhalten werden, hier beispielhaft für die Berechnung des IDV von Oxalacetat in der Pyruvat-Carboxylase-Reaktion aufgeführt (Gl. 4.6):

$$IDV_{OAA} = (IMM_{Pyr \rightarrow OAA} \times IDV_{Pyr}) \otimes (IMM_{CO_2 \rightarrow OAA} \times IDV_{CO_2}), \quad \text{Gl. 4.6}$$

wobei  $\otimes$  die elementweise Multiplikation zweier Spaltenvektoren bezeichnet. Durch die Berechnung der IDVs eines Produktes aus den IDVs der Edukte lassen sich für alle Isotopomere eines Metaboliten Massenbilanzen als Funktion der Flussraten in Form einer einzigen Matrixgleichung aufstellen (Schmidt et al., 1997). Die Produktionsrate der Isotopomere eines Metaboliten kann aus dem IDV der an der Reaktion beteiligten Edukte, den IMMs und der molaren Flussrate in den Oxalacetat-Pool berechnet werden. Bezogen auf das obige Beispiel (Gl. 4.6) ergibt sich für die Produktionsrate der Isotopomere von Oxalacetat ( $r_{OAA,Prod}$ ):

$$r_{OAA,Prod} = v_{ein} \cdot ((IMM_{Pyr \rightarrow OAA} \times IDV_{Pyr}) \otimes (IMM_{CO_2 \rightarrow OAA} \times IDV_{CO_2})), \quad \text{Gl. 4.7}$$

wobei  $v_{ein}$  die molare Produktionsrate bezeichnet. Die Verbrauchsrate der Isotopomere eines Metaboliten ergibt sich dementsprechend aus dem IDV des Metaboliten und dem molaren Fluss aus dem Metabolitpool hinaus. Für die Isotopomere des Oxalacetat ergibt sich die Verbrauchsrate ( $r_{OAA,Verb}$ ) nach:

$$r_{OAA,Verb} = v_{aus} \cdot IDV_{OAA}, \quad \text{Gl. 4.8}$$

wobei  $v_{aus}$  den gesamten, molaren Fluss aller beteiligten Reaktionen aus dem Oxalacetat-Pool bezeichnet. Unter der Annahme eines quasi-stationären Zustandes ergibt sich aus den obigen Gleichungen für die Bilanz der Isotopomerenverteilung von Oxalacetat somit:

$$\frac{dIDV_{OAA}}{dt} = v_{ein} \cdot ((IMM_{Pyr \rightarrow OAA} \times IDV_{Pyr}) \otimes (IMM_{CO_2 \rightarrow OAA} \times IDV_{CO_2})) - v_{aus} \cdot IDV_{OAA} = 0 \quad \text{Gl. 4.9}$$

Das Vorhandensein von bidirektionalen Flüssen zwischen den Metaboliten des Zentralmetabolismus führt jedoch dazu, dass das Gleichungssystem aus Isotopomerbilanzen unterbestimmt ist, da die Menge an extrazellulären Messdaten nicht ausreicht, um sämtliche in den Isotopomerbilanzen auftretenden Variablen zu berechnen. Ein solches, bilineares Gleichungssystem erfordert entweder eine Linearisierung aufgrund bestimmter Voraussetzungen, so z.B. der Definition von Hauptflussrichtungen (Wittmann and Heinzle, 1999), oder eine weitere Transformation in ein linearisiertes Gleichungssystem. Zur Lösung eines bilinearen Gleichungssystems wurde eine Methode entwickelt (Wiechert et al., 1999),

welche es erlaubt, die Isotopomer-Fractionen durch Multiplikation mit einer Transformationsmatrix in einen Vektor zu transformieren, dessen Elemente die Summe der Isotopomere mit definierter Position der Markierung enthalten und die als Cumomere (**cumulative isotopomer**) bezeichnet werden. Dabei wird das bilineare Netzwerk aus Isotopomerbilanzen in Subnetzwerke aus Cumomer-bilanzen transformiert (Yang, 2006; Yang et al., 2007). Die Gleichungen in Form von Cumomer-Fractionen können explizit als Kaskade linearer Gleichungssysteme gelöst werden und die berechneten Cumomer-Fractionen zurück in Isotopomer-Fractionen transformiert werden.

Üblicherweise werden die Flussraten in der Bilanzierung der Isotopomerenverteilungen nicht als molare Flüsse [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] eingesetzt. Durch Skalieren der Substrataufnahmerate auf den Wert 1 (= 100%) erhält man für alle übrigen Flüsse Werte, die die Relation zur Substrataufnahmerate als dimensionslose Dezimalzahl angeben.

#### 4.4.3 Parameter-Schätzung

In der Computersimulation werden anhand der Flussraten als veränderliche Startwerte theoretische MDVs der beteiligten Metabolite berechnet, die sich aus dem Isotopomerenmuster des eingesetzten Substrats aufgrund der Topologie des Isotopomeren-Netzwerks ergeben. Diese werden unter Variation der Flussraten den experimentell bestimmten MDVs angepasst, die aus der GC/MS-Messung eines Tracerexperiments mit dem  $^{13}\text{C}$ -markierten Substrat stammen (Abb. 4.8).

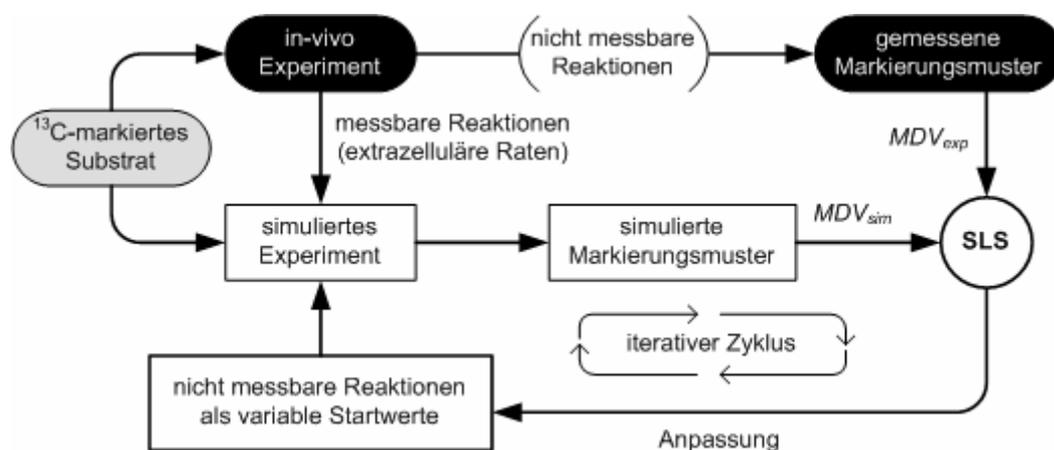
Bei der massenspektrometrischen Bestimmung von Markierungsmustern ist jedoch zu berücksichtigen, dass die in den Analytmolekülen vorhandenen Elemente verschiedene, natürlich vorkommende, stabile Isotope besitzen. Berücksichtigt wird das Auftreten dieser Isotope mittels spezifischer Korrekturmatrizen, die für die zu analysierenden Analyte auf der Grundlage ihrer Summenformeln aufgestellt werden (Wittmann and Heinzle, 1999). Durch Multiplikation des MDV mit seiner spezifischen Korrekturmatrix entsteht ein Vektor, welcher die Massenisotopenverteilung enthält, wie sie aus der Umsetzung eines markierten Substrates ohne Vorhandensein natürlich vorkommender Isotope resultieren würde. Diese korrigierten MDVs der analysierten Metabolite werden letztendlich zur Bestimmung der Flussparameter als experimentell bestimmte MDVs eingesetzt.

Die Anpassung der theoretischen MDVs an die experimentell bestimmten MDVs in der Computersimulation geschieht durch Minimierung der Quadratsumme (SLS = sum of least squares) der relativen Differenzen aus den gemessenen ( $r_{\text{exp}}$ ) und in der Simulation bestimmten ( $r_{\text{sim}}$ ), relativen Anteile der verschiedenen Massenisotopomere (Wittmann and Heinzle, 2002). Eine zusätzliche Gewichtung erhält die Anpassung dabei durch die aus der

GC/MS-Messung resultierenden, relativen Fehler ( $S_r$ ) der experimentell bestimmten Massenisotopomeranteile:

$$SLS = \sum_i \left( \frac{r_{\text{exp},i} - r_{\text{sim},i}}{r_{\text{exp},i}} \right)^2 \frac{1}{S_{r,i}^2} \quad \text{Gl. 4.10}$$

Zur Anpassung wird ein iterativer Optimierungsalgorithmus verwendet, welcher es ermöglicht, in mehreren, aufeinander folgenden Simulationen unter Variation der intrazellulären Flussraten für die nach Gleichung 4.10 bestimmte Quadratsumme der Differenzen zwischen experimentell bestimmten und simulierten Markierungsmustern ein globales Minimum zu bestimmen (Wiechert et al., 1997) (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8:** Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Experiment und Simulation bei der Durchführung der metabolischen Flussanalyse (Erläuterung im Text).

#### 4.4.4 Statistische Auswertung

Um die Qualität der aus der Flussanpassung erhaltenen Werte statistisch zu überprüfen und die Empfindlichkeit der bestimmten Parameter im Hinblick auf Messungenauigkeiten zu untersuchen, bedient man sich der Methode der Monte-Carlo-Simulation (Möllney et al., 1999; Schmidt et al., 1999; Wiechert et al., 1997; Wittmann and Heinzle, 2002; Yang, 2006). Dieser Begriff bezeichnet ein stochastisches Verfahren, bei dem sehr häufig durchgeführte Zufallsexperimente die Basis darstellen.

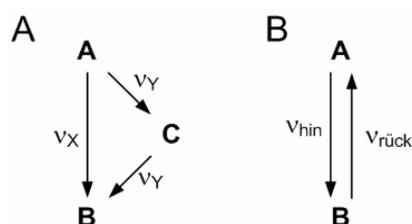
Dazu werden mehrere Parameter-Schätzungen hintereinander durchgeführt, in denen die zur Anpassung dienenden Markierungsdaten aus künstlich erzeugten Zufallswerten der Markierungsmuster bestehen. Für die aus den GC/MS-Mehrfachmessungen resultierenden Markierungsdaten wird dabei eine Normalverteilung angenommen, deren Standardabweichung zur Bestimmung der Intervalle der in die Monte-Carlo-Simulation eingesetzten Zufallswerte dient. Da sich die Häufigkeit eines mit der Monte-Carlo-Methode berechneten

Ergebnisses immer weiter an die theoretische Wahrscheinlichkeit für dieses Ergebnis annähert, je häufiger die Simulation durchgeführt wird, ist eine sehr große Anzahl von aufeinander folgenden Simulationen notwendig (Metropolis et al., 1953). Als Ergebnis wird für jeden in der Parameter-Schätzung bestimmten Flussparameter eine dementsprechend große Zahl an Einzelwerten erhalten, aus denen die Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Flussraten einfach berechnet werden können.

#### 4.4.5 Design von Experimenten zur metabolischen Flussanalyse

Bevor ein Tracerexperiment und die anschließende Parameter-Schätzung durchgeführt werden können, muss zuerst überprüft werden, ob die  $^{13}\text{C}$ -Markierung des verwendeten Substrats eine ausreichende Menge an Information zur Flussbestimmung liefert, da das eingesetzte Substrat und die darin enthaltene  $^{13}\text{C}$ -Markierung signifikante Auswirkungen auf den Informationsgehalt eines Tracerexperiments besitzen (Wiechert and de Graaf, 1997; Yang, 2006).

Insbesondere Verzweigungen innerhalb des metabolischen Netzwerks und reversible Reaktionen stellen kritische Parameter für die experimentelle Vorgehensweise in einem Tracerexperiment dar (Abb. 4.9). Im Zentralstoffwechsel von Mikroorganismen existieren einige charakteristische Verzweigungsverhältnisse, z.B. das Verzweigungsverhältnis von Glucose-6-Phosphat zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg ( $\Phi_{\text{PPP}}$ ) oder das des Pyruvat zwischen Pyruvat-Carboxylase und Pyruvat-Dehydrogenase ( $\Phi_{\text{PC}}$ ), sowie Reversibilitäten enzymatischer Reaktionen ( $\zeta$ ), für deren Auflösung nicht jedes  $^{13}\text{C}$ -markierte Substrat geeignet ist (Wittmann and Heinzle, 2001a).



**Abb. 4.9:** Aufgrund der unterschiedlichen Aktivität ( $v$ ) beteiligter Reaktionen stellen alternative Stoffwechselwege (A) und reversible Reaktionen (B) besondere Anforderungen an die experimentelle Vorgehensweise zur Flussbestimmung dar.

Das Verzweigungsverhältnis ( $\Phi$ ) zwischen zwei alternativen Stoffwechselwegen X und Y (Abb. 4.9) lässt sich aus den Aktivitäten ( $v$ ) der beiden Alternativwege berechnen nach:

$$\Phi_X = \frac{v_X}{v_X + v_Y} \quad \text{Gl. 4.11}$$

Die Reversibilität ( $\zeta$ ) einer biochemischen Reaktion (Abb. 4.9) ergibt sich aus dem Quotient der Aktivitäten ( $v$ ) von Rückreaktion und Nettoreaktion nach:

$$\zeta = \frac{V_{rück}}{V_{hin} - V_{rück}} \quad \text{Gl. 4.12}$$

Eine geeignete Methode zur Validierung des experimentellen Designs eines Tracereperiments stellt die Sensitivitätsanalyse dar (Wittmann and Heinzle, 2001a). Dabei werden analog zur Parameter-Schätzung in Simulationen definierte Flussparameter variiert und die Markierungsverteilung innerhalb der zu analysierenden Metabolite berechnet. Die Sensitivität  $S(I_{m+1/m}, \varphi)$  zur Quantifizierung eines Flussparameters  $\varphi$  ergibt sich aus der partiellen Ableitung der Funktion aus dem relativen Anteil einzelner Massenisotopomere ( $I_{m+1/m}$ ) in Abhängigkeit von dem variierten Parameter ( $\varphi$ ) nach:

$$S(I_{m+1/m}, \varphi) = \left| \frac{\delta I_{m+1/m}}{\delta \varphi} \right|, \quad \text{Gl. 4.13}$$

wobei  $\varphi$  verschiedene Flussparameter ( $v$ ,  $\Phi$  oder  $\zeta$ ) bezeichnet. Die Berechnung der Sensitivitäten erlaubt es, den relativen Informationsgehalt unterschiedlicher  $^{13}\text{C}$ -Markierungen eines oder mehrerer in Frage kommender Substrate mit einander zu vergleichen und die optimale Substratmarkierung zur Bestimmung charakteristischer Flussparameter zu ermitteln.

## 4.5 Transkriptomanalyse von *Bacillus subtilis*

Zur Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene existieren verschiedene Methoden, unter denen DNA-Microarrays in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben (Churchill, 2002; Dopazo et al., 2001; Oliver et al., 2002; van Hal et al., 2000).

Die Analyse der relativen Genexpression mit DNA-Microarrays geschieht mittels eines Träger-Chips aus Glas mit kleinen Vertiefungen der Oberfläche (Spots), welche immobilisierte DNA-Sequenzen enthalten, die jeweils einem spezifischen Gen entsprechen. Zur Analytik werden die DNA-Stränge auf den Spots (Proben-DNA) mit zu untersuchender cDNA (Target-DNA) hybridisiert. Dazu wird zunächst aus einer Zellprobe die mRNA isoliert, durch reverse Transkription in cDNA überführt und mittels PCR amplifiziert. In der PCR werden spezielle Nukleotide verwendet, welche mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Eine gängige Standardmethode ist dabei die Verwendung von Cyanin3-markiertem (Cy3) und Cyanin5-markiertem (Cy5) dUTP. Der Einsatz von grün fluoreszierendem Cy3 und rot fluoreszierendem Cy5 ermöglicht die kompetitive Hybridisierung der Chip-DNA in den Spots mit 2 verschiedenen cDNA-Fraktionen aus verschiedenen Experimenten. Die Anzahl der auf dem Spot hybridisierten cDNA-Stränge für die beiden Fraktionen ist direkt abhängig von der Konzentration der sequenzspezifischen cDNA für den jeweiligen ORF in der Probe. Die

Konzentration der cDNA lässt sich nach der Hybridisierung durch Scannen in einem Fluoreszenz-Reader mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen ermitteln. Dadurch wird für die beiden Proben jeweils ein optisches Verteilungsmuster erhalten, bei dem die Intensität der Fluoreszenzmarkierung mit der Anzahl der Hybridisierungen auf dem Spot korreliert. Üblicherweise sind für jedes Gen mehrere Spots auf dem Chip vorhanden, so dass Mehrfachbestimmungen durchgeführt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet werden können.

Aus der Fluoreszenzmarkierung lässt sich die relative Expression  $rE_{A/B}$  eines Gens unter zwei verschiedenen Bedingungen A und B direkt aus den Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten ( $I_A$  und  $I_B$ ) berechnen:

$$rE_{A/B} = \frac{\bar{I}_A}{\bar{I}_B} \quad \text{Gl. 4.14}$$

Die Intensitäten der gemessenen Gene müssen jedoch vor der Bestimmung der relativen Expression normalisiert werden, da unterschiedliche Intensitäten der verwendeten Farbstoffe zu Fehlern führen könnten (Engelen et al., 2006). Dies geschieht mittels einer auf dem Chip enthaltenen Reihe von Spots, die die gleiche DNA-Sequenz in unterschiedlicher Konzentration enthalten. Diese werden jeweils nur mit einer der beiden cDNA-Fraktionen hybridisiert, was die Bestimmung der Abhängigkeit der Fluoreszenzstärke von der Menge an Target-DNA ermöglicht.

Eine zusätzliche Fehlerquelle liegt in der Verwendung der markierten Nukleotide in der PCR, da Cy5 langsamer eingebaut wird als Cy3 (Nazarenko et al., 2002), was zusätzliche Fehler in der Bestimmung der relativen Expression anhand der Fluoreszenzintensitäten verursacht. Diese Fehler können mittels Durchführung von Flip-Experimenten eliminiert werden. Dabei wird die isolierte RNA geteilt und in zwei unabhängigen PCR-Läufen jeweils zur Hälfte mit Cy3 und Cy5 markiert. Dies wird mit der isolierten RNA aus beiden zu vergleichenden Proben durchgeführt (Schilling et al., 2007), so dass jeweils zwei cDNA-Sonden derselben Probe mit gegensätzlicher Markierung erhalten werden. Diese vier Sonden werden dann auf zwei getrennten Chips kreuzhybridisiert und diese unabhängig voneinander ausgewertet, wobei für jedes Gen der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten beider DNA-Chips berechnet wird.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Verwendete Bakterienstämme

Sämtliche, in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Bacillus subtilis* wurden vom Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie (Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland) bezogen (Tab.5.1). Der Stamm *B. subtilis* 168 stellt den allgemein am häufigsten verwendeten Laborstamm von *Bacillus subtilis* dar.

*B. subtilis* QB 5407 und *B. subtilis* GP335 sind aus dem Wildtyp 168 abgeleitete Mutanten, bei denen durch Transformation mit dem Transposon Tn917 das Regulatorprotein CcpA deletiert wurde (Faires et al., 1999). *B. subtilis* GP 335 besitzt zusätzlich zu dieser Transformation eine Mutation an der Phosphorylierungsstelle Ser-46 des HPr (Ludwig et al., 2002).

Die Konstruktion des Tryptophan-prototrophen Stammes *B. subtilis* GP391 aus dem Stamm *B. subtilis* 168 erfolgte extern (O. Schilling, Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland) mittels genomischer DNA der Tryptophan-prototrophen Mutante *B. subtilis* GM1010 und eines anschließenden Screenings anhand von in der Literatur aufgeführten Standardtechniken (Blencke et al., 2006; Hoch, 1991; Sambrook et al., 1989).

**Tab. 5.1:** Verwendete Stämme von *Bacillus subtilis*

Stamm	Genotyp	Quelle bzw. Referenz
168	<i>trpC2</i>	Stammsammlung
GM1010	<i>sacXYΔ3 sacBΔ23 sacTΔ4</i>	LeCoq et al, 1995
GP391	„Wildtyp“	Transformation (O. Schilling)
QB5407	<i>trpC2 ccpA::Tn917spc</i>	Faires et al, 1999
GP335	<i>trpC2 ccpA::Tn917 erm ptsH1</i>	Ludwig et al, 2002

## 5.2 Chemikalien und Nährmedien

### 5.2.1 Verwendete Chemikalien

Das komplexe Substrat Nutrient Broth, sowie der verwendete Agar (Difco Agar Noble) wurden von Difco (Detroit, USA) bezogen. Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen: Acros Organics (Geel, Belgien), Aldrich (Steinheim, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland). Für sämtliche verwendeten Lösungen wurde doppelt deionisiertes Wasser (18,2 MO, Elga, High Wycombe, Großbritannien) eingesetzt. Die für die Labeling-Experimente verwendeten  $^{13}\text{C}$ -markierten Substanzen wurden über den Europa-Vertrieb Eurisotop (Gif sur Ivette, Frankreich) des Herstellers Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) bezogen (Tab. 5.2).

**Tab. 5.2:** Isotopenmarkierte Substanzen mit Angabe des relativen Gehalts an  $^{13}\text{C}$

Substanz	$^{13}\text{C}$ -Anreicherung
[1- $^{13}\text{C}$ ]-Glucose	99 %
[U- $^{13}\text{C}_6$ ]-Glucose	99 %
[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]-Glutamat	99 %
[U- $^{13}\text{C}_5$ ]-Glutamat	98 %
[1,4- $^{13}\text{C}_2$ ]-Succinat	99 %
[2,3- $^{13}\text{C}_2$ ]-Succinat	97 %
[U- $^{13}\text{C}_4$ ]-Succinat	99 %

## 5.2.2 Nährmedien

### 5.2.2.1 Stammlösungen

Folgende Stammlösungen (Tab. 5.3) wurden unabhängig voneinander angesetzt, autoklaviert (121°C, 25 min) bzw. sterilfiltriert (Millipore, Express™Plus 0,22 µm, Eschborn, Deutschland) und dienten als Grundlage für Sp-Komplexmedium und C-Minimalmedium.

**Tab. 5.3:** Konzentrationen und Zubereitung der Stammlösungen

CaCl <sub>2</sub> (0,5 M)		0,5 mol l <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> (10 mM)		10 mmol l <sup>-1</sup>
Ammonium-Fe(III)-Citrat		2,2 g l <sup>-1</sup>
Tryptophan		5 g l <sup>-1</sup>
Glucose (25%)		250 g l <sup>-1</sup>
jeweils autoklavieren (121°C, 25 min), Tryptophan sterilfiltrieren		
Salzlösung A	MnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,232 g
	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	12,3 g
	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren (121°C, 25 min)	
Salzlösung B (5 × konzentriert)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	80 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16,5 g
	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren (121°C, 25 min)	
Kaliumglutamat (40%)	L-Glutamat	40 g
	KOH	15,25 g
	Ad 100 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren (121°C, 25 min)	
Natriumsuccinat (30%)	Succinat	15 g
	NaOH	5,08 g
	Ad 50 ml H <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren	

### 5.2.2.2 SP-Komplexmedium

Zur Anzucht der Zellen in Reinkultur wurden Agarplatten mit SP-Medium verwendet (Tab. 5.4).

**Tab. 5.4:** Zusammensetzung des SP-Mediums

Lösung 1:	Agar	18 g
	Ad 500 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren (121°C, 25 min)	
Lösung 2:	Nutrient Broth	8 g
	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
	KCl	1 g
	Ad 500 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren (121°C, 25 min)	

beide Lösungen nach dem Autoklavieren vereinigen, anschließende, sterile Zugabe von:

CaCl <sub>2</sub> (0,5 M)	1 ml
MnCl <sub>2</sub> (10 mM)	1 ml
Ammonium-Fe(III)-Citrat (2,2 g l <sup>-1</sup> )	2 ml

### 5.2.2.3 C-Minimalmedium

Alle Kultivierungen in Flüssigkultur wurden auf vollsynthetischem Minimalmedium (pH 7,3) durchgeführt (Tab. 5.5). Bei Verwendung dieses Mediums können durch Zugabe verschiedener, hochkonzentrierter Substratlösungen unterschiedliche Kombinationen von Kohlenstoffquellen eingesetzt werden, wohingegen alle übrigen Parameter wie Ionenstärke oder pH konstant bleiben. Die Zubereitung von einem Liter dieses Mediums erfolgte durch das Mischen der Stammlösungen, wie in Tab. 5.5 angegeben in einer autoklavierten (121°C, 25 min) Vorratsflasche (Schott DURAN®, Schott Duran GmbH, Wertheim, Deutschland) zunächst ohne Zugabe der Kohlenstoffquelle. Anschließend wurden je nach Versuchsanordnung unterschiedliche Stammlösungen mit den jeweiligen C-Quellen zugegeben. Unterschiedliche Kombinationen von Kohlenstoffquellen waren dabei C-Glucose (Glucose 0,5%), CSE (Glutamat 0,8%, Succinat 0,6%) und CSE-Glucose (Glutamat 0,8%, Succinat 0,6%, Glucose 0,5%). Nach der Zugabe aller erforderlichen Stammlösungen wurde das Volumen mit sterilem Wasser (121°C, 25 min) auf 1 Liter aufgefüllt.

**Tab. 5.5:** Zusammensetzung des Minimalmediums, wahlweise mit Glutamat, Succinat und/oder Glucose als C-Quelle

Salzlösung A	1 ml
Salzlösung B	20 ml
Ammonium-Fe(III)-Citrat (2,2 g l <sup>-1</sup> )	1 ml
Tryptophan (5 g l <sup>-1</sup> )	1 ml
Wahlweise sterile Zugabe verschiedener C-Quellen:	
Kaliumglutamat (40%)	2 ml
Natriumsuccinat (30%)	2 ml
Glucose (25%)	2 ml
Ad 100 ml mit sterilem H <sub>2</sub> O	

Abweichend zu der oben beschriebenen Zubereitung des C-Minimalmediums wurden die unterschiedlichen, markierten Kohlenstoffquellen bei der Zubereitung des Mediums für Labelingexperimente nicht durch Zugabe der in Tab. 5.3 aufgeführten Stammlösungen dem Medium beigefügt. Stattdessen wurde für jede markierte C-Quelle jeweils eine gesonderte Lösung mit den benötigten, <sup>13</sup>C-markierten Substrat (Tab. 5.2) angesetzt, autoklaviert (121°C, 25 min) und dem Medium steril zugegeben.

#### 5.2.2.4 Sonstige Lösungen

Zum raschen Abtöten der Zellen für die Transkriptomanalyse mittels DNA-Microarrays wurde ein natriumazidhaltiger Killingbuffer verwendet (Tab. 5.6).

**Tab. 5.6:** Zusammensetzung des Killingbuffers zur Gewinnung der RNA

Tris, pH 7,5	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaN <sub>3</sub>	20 mM
Lagerung bei -20°C	

## 5.3 Kultivierungsmethoden

### 5.3.1 Stammkonservierung

Da *Bacillus subtilis* ein Sporenbildner ist, kann eine Konservierung und Aufbewahrung über die Bildung von Endosporen auf trockenen Substraten erfolgen (Setlow, 2006; Sonenshein et al., 2002). Dazu wurden die mit *B. subtilis* bewachsenen Agarplatten über mehrere Wochen im Trockenschrank (37°C) belassen, bis das im Agar enthaltene Wasser vollständig entzogen war. Die getrockneten Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei Zimmertemperatur gelagert. Zum Überimpfen und Auskeimen wurden die Sporen von der trockenen Platte mittels einer Kolbenhubpipette in 0,5 ml sterilem (121°C, 25 min) H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf einer frischen Platte ausplattiert (Foerster and Foster, 1966; Wax and Freese, 1968; Wuytack et al., 2000).

### 5.3.2 Vorkultur

Zur Vorbereitung der Vorkultur wurden Kolonien einer maximal 2 Tage alten Agarplatte (37°C) auf einer frischen Platte ausplattiert und diese 9 Stunden bei 45°C inkubiert. Mit den Zellen dieser Platte wurden daraufhin die Vorkulturen in mit Kapsenberg-Kappen verschlossenen Kulturröhrchen (16x160 mm, Schott DURAN®, Schott Duran GmbH, Wertheim, Deutschland) angeimpft. Dazu wurden die Zellen mittels einer Impföse durch vorsichtiges Reiben an der Reagenzglaswand in 3 ml C-Minimalmedium suspendiert. Die Inkubation der Vorkulturen erfolgte über Nacht (30°C, 230 Upm) bis zu einer optischen Dichte von ca. 2, so dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Das Starten der Hauptkulturen erfolgte in Markierungsexperimenten durch Überführen eines am Volumen der Hauptkultur gemessenen Volumens von 1%, so dass die optische Dichte der Hauptkultur zwischen 0,01 und 0,03 lag. Bei Kultivierungen ohne Beteiligung markierter Substanzen wurde so überimpft, dass die optische Dichte der Hauptkultur zu Beginn bei 0,1 lag.

### 5.3.3 Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierungen im Schüttelkolben wurden stets in Schikanekolben bei 230 Upm und einer Auslenkung von 5 cm im Schüttelschrank (Multitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Zur Ermittlung des Sauerstoffbedarfs im Schüttelkolben wurden zusätzlich unshikanierte Kolben verwendet. Die Kultivierungstemperatur bei den vergleichenden Kultivierungen zwischen *B. subtilis* 268 und *B. subtilis* GP391 betrug 30°C, die aller anderen Kultivierungen von *B. subtilis* 168 und daraus abgeleiteten Mutanten 37°C. Zur Vermeidung einer Sauerstofflimitierung wurden die Kolben zu höchstens 10 % des maximalen

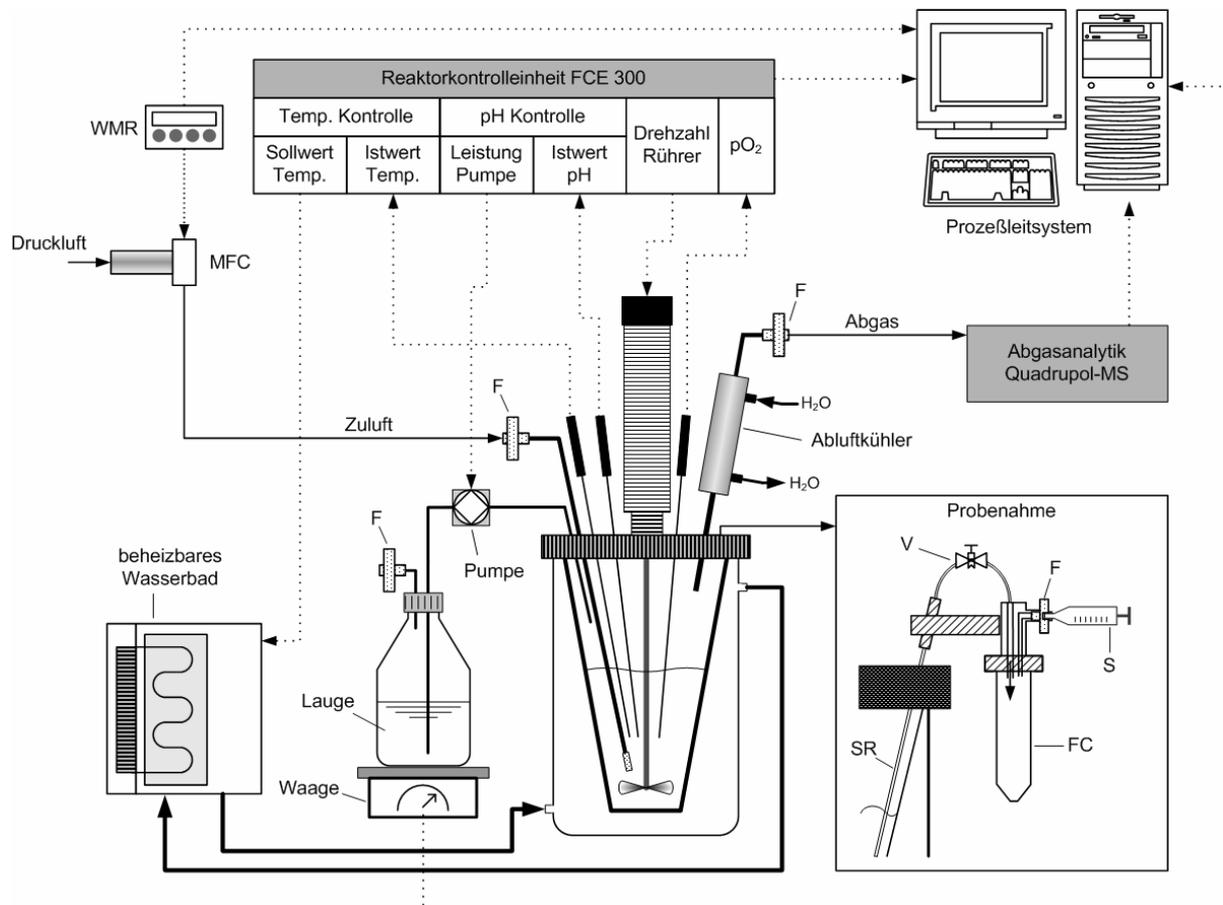
Füllvolumens mit Medium befüllt. Sämtliche Kulturen auf markierten Kohlenstoffquellen wurden bei einer maximalen optischen Dichte von 1,5 abgeerntet, um sicher zu stellen, dass sich die Zellen noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

### 5.3.4 Kultivierung im Bioreaktor

Sämtliche Kultivierungen im Bioreaktor wurden in einem Vario 1000 Minireaktor (Merco, Bovenden, Deutschland) mit einem Kulturvolumen von 100 ml durchgeführt (Abb. 5.1). Über eine zentrale Steuereinheit (FCE-03, FairMenTec GmbH, Göttingen, Deutschland) wurden im Verlauf der Kultivierungen Rührerdrehzahl, Temperatur und pH-Wert geregelt, sowie der gelöste Sauerstoff im Medium gemessen. Die Rührerdrehzahl betrug 1000 Upm, die Kultivierungstemperatur 37°C. Die Kultivierungstemperatur wurde mittels eines Temperatursensors (FairMenTec GmbH, Göttingen, Deutschland) in der Kulturflüssigkeit gemessen und über ein an das Reaktoraußengefäß angeschlossenes Heizwasserbad (Julabo MV-4, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) konstant gehalten. Der pH-Wert wurde mittels einer pH-Elektrode (Broadly-James Corporation, Irvine, CA, USA) gemessen und mit 2 M NaOH über eine an den pH-Regler angeschlossene Peristaltikpumpe auf einen konstanten Wert von pH 7,0 geregelt. Die Menge an zugeführter Lauge wurde dabei gravimetrisch mit einer Laborwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Die Begasungsrate von 1 vvm (bezogen auf das Kulturvolumen zu Beginn) wurde mittels einer Steuereinheit (WMR Compact 4, Brooks Instruments, Veenendaal, Niederlande) über einen angeschlossenen Massendurchflußbegrenzer (5850 TR, Brooks Instruments, Veenendaal, Niederlande) geregelt. Die Menge an gelöstem Sauerstoff in der Kulturflüssigkeit wurde mittels einer pO<sub>2</sub>-Elektrode (Broadly-James Corporation, Irvine, CA, USA) in Prozent der Sättigungskonzentration gemessen.

Sowohl für die Zuluft, als auch für die Abluft des Bioreaktors wurden während der Kultivierungen im Bioreaktor die relativen Volumenanteile an N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, CO<sup>18</sup>O und Argon online unter Verwendung eines Quadrupol-Massenspektrometers (Omnistar QMS 422, Inficon, Vaduz, Liechtenstein) analysiert. Die Ionisierungsspannung betrug dabei 70 eV. Zur Kalibrierung wurde synthetische Luft mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 1,5 % eingesetzt. Die verschiedenen Gasströme wurden über einen vorgeschalteten, auf 30 °C vorgeheizten Gas Stream Selector (GSS 300, Inficon, Vaduz, Liechtenstein) abwechselnd in Intervallen von zwei Minuten zum Massenspektrometer geleitet. Die Temperatur der Kapillare zwischen dem Gas Stream Selector und dem Massenspektrometer betrug dabei 100 °C. Bei einer Begasungsrate von 100 ml min<sup>-1</sup> und einem Gasraum von 300 ml betrug die Verweilzeit der Abluft in der Kapillare zwischen Reaktor und Gas Stream Selector ca. 3 min.

Sämtliche gemessenen Prozessdaten wie Temperatur, pH-Wert, Gelöstsauerstoff, Begasungsrate, Rührerdrehzahl, und die Volumenanteile der genannten Gase wurden durch das übergeordnete Prozessleitsystem Lucillus (Lucillus PIMS V 2.01, Biospectra AG, Schlieren, Schweiz) aufgezeichnet.



**Abb. 5.1:** Versuchsaufbau der Fermentationen im Bioreaktor. F = steriler Filter (0,22 µm Porengröße); FC = Falcon; MFC = Mass Flow Controller; S = Einwegspritze; SR = Saugrohr; V = Ventil; WMR = Steuermodul des Mass Flow Controller

### 5.3.5 Probenahmen während der Kultivierungen

#### 5.3.5.1 Allgemeine Probenahmetechniken

Die Probenahmen während der Schüttelkolbenversuche wurden mit sterilen Einwegpipettenspitzen unter der Sterilbank durchgeführt. Dabei wurde für jeden Messpunkt 1 ml Kulturflüssigkeit entnommen. Während der Kultivierung im Bioreaktor erfolgte die Probenahme mittels der an den Reaktor angeschlossenen Probenahmeverrichtung (Abb. 5.1). Die Kulturflüssigkeit wurde in einer Tischzentrifuge (5 min, 4°C, 16000 x g, Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert, und der gewonnene Überstand abgezogen und für spätere Analysen eingefroren (-20°C). Das erhaltene Zellpellet ergab

dabei ca. 1 mg Biomasse. Bei Kultivierungen auf markierten Substraten wurde dieses zweimal mit doppelt deionisiertem Wasser gewaschen (5 min, 4°C, 16000 x g, Biofuge Pico, Heraeus, Hanau, Deutschland). Anschließend wurde das gewaschene Zellpellet zur späteren Analyse der proteinogenen Aminosäuren und des intrazellulären Glycogens eingefroren (-20°C).

### 5.3.5.2 Probenahmen zur Transkriptionsanalyse

Zur Gewinnung der RNA für die Transkriptomanalyse wurde vor Versuchsbeginn je 15 ml Killingbuffer (Tab. 5.6) in 50 ml Falcongefäßen vorgelegt und bei -20°C eingefroren. Im Schüttelkolben wurden Parallelkulturen bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,5 aufgezogen. Zum Abernten der Zellen wurden 12 ml Kulturflüssigkeit mittels einer sterilen Pipette in Falcons überführt, mit 23 ml steriler 0,9 % NaCl-Lösung versetzt und durch kurzzeitiges Schütteln gemischt. Der Falconinhalt wurde in die kalten Falcons mit dem Killingbuffer gegeben und dieser durch Schütteln gelöst. Nach anschließender Zentrifugation (3 min, 0°C, 8000 x g, Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und Abdekantieren des Überstands wurden die Falcons mit den erhaltenen Zellpellets 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und später bei -70°C gelagert. Die so behandelten Proben wurden auf Trockeneis zur Durchführung der Transkriptionsanalyse zum Lehrstuhl für Allgemeine Mikrobiologie (Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland) geschickt.

### 5.3.5.3 Zellextraktion

Zur Analyse intrazellulären  $\alpha$ -Ketoglutarats wurde eine in der Literatur beschriebene Schnellfiltrationsmethode (Wittmann et al., 2004c) modifiziert. Aus dem Schüttelkolben wurden 3 ml Kulturflüssigkeit in eine sterile Einwegspritze aufgezogen, abgewogen und auf einen Filter (Sartorius, 0,2  $\mu$ m Porengröße, Göttingen, Deutschland) gegeben. Mittels einer Saugflasche wurden die Zellen dabei direkt vom Kulturüberstand getrennt und mit MilliQ gewaschen. Zur Bestimmung des Kulturvolumens wurde die leere Einwegspritze anschließend ebenfalls abgewogen. Der Filterkuchen wurde mit 1,5 ml Extraktionslösung versetzt und im Wasserbad inkubiert (15 min, 100°C), um die Zellen aufzuschließen. Die Extraktionslösung bestand dabei aus einer wässrigen Lösung des Derivatisierungsreagenz O-Benzylhydroxylamin \* HCl im Überschuss sowie 3-Methyl-2-Oxopentansäure (1,5 mM) als internem Standard. Nach der Inkubation wurde die Suspension abzentrifugiert (5 min, 4°C, 16000 x g, Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) und der erhaltene Überstand zur Analytik mittels HPLC eingesetzt.

## 5.4 Analytische Methoden

### 5.4.1 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Berechnung der Biomassekonzentration sämtlicher Kultivierungen in Schüttelkolben und Bioreaktor erfolgte aufgrund der Korrelation zwischen der optischen Dichte (OD) der Kulturflüssigkeit und der Biotrockenmassekonzentration [ $\text{g l}^{-1}$ ].

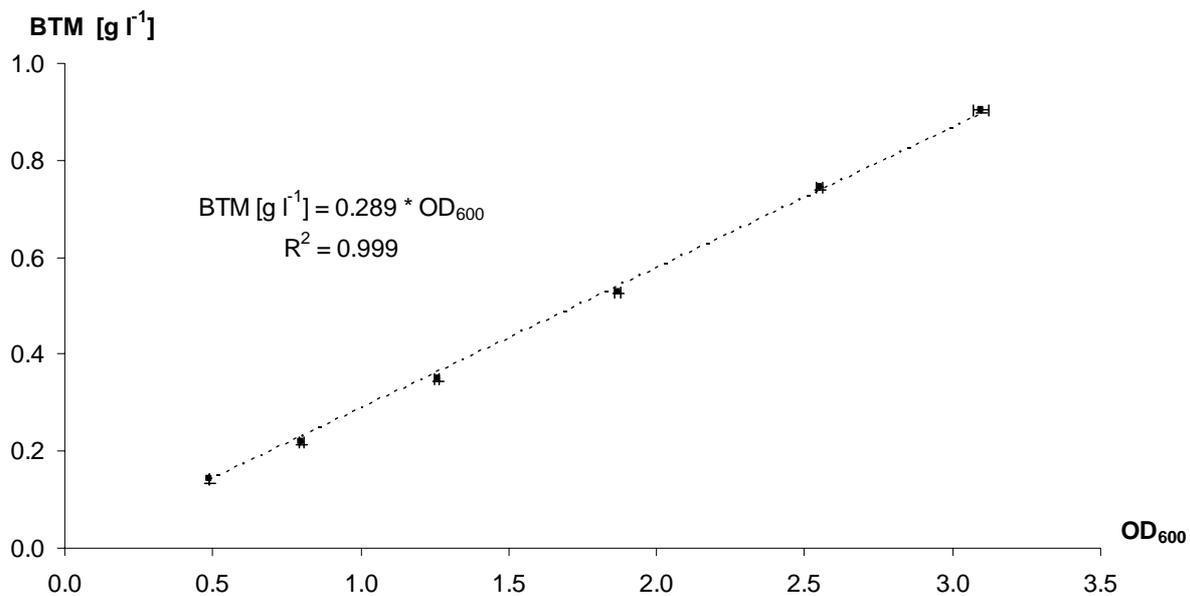
#### 5.4.1.1 Optische Dichte

Die optische Dichte der Kulturflüssigkeit wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Spektralphotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden stets in Doppelbestimmung gegen Wasser als Leerwert in 1,5 ml Polystyrol-Einwegküvetten (Halbmikro-Plastibrand, Brand, Wertheim, Deutschland) gemessen. Die Proben wurden bei höheren OD-Werten auf der Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) verdünnt, so dass die gemessene OD stets im linearen Bereich zwischen 0,05 und 0,3 lag.

#### 5.4.1.2 Biotrockenmasse

Während der exponentiellen Wachstumsphase von *Bacillus subtilis* 168 im 1L-Schüttelkolben auf C-Glucose-Medium wurden für definierte Zeitpunkte simultan die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ), sowie die Konzentration an Biotrockenmasse (BTM) bestimmt. Die BTM wurde dabei in Dreifachbestimmung gemessen. Dazu wurden 50 ml Falcons (Greiner PP-Zentrifugenröhrchen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) getrocknet (48 h, 80 °C), im Vakuumexsikkator abgekühlt und gewogen (Sartorius, Göttingen, Deutschland). Es wurde pro Messpunkt dreimal 50 ml Kulturflüssigkeit entnommen, gewogen und abzentrifugiert (5 min, 4°C, 8000 x g, Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Es folgten zwei Waschschrte (5 min, 4°C, 8000 x g), wobei der erste unter Verwendung von NaCl-Lösung (4°C, 0,9%), der zweite mit doppelt deionisiertem Wasser durchgeführt wurde. Anschließend wurde das Zellpellet bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (80°C, 8 Tage), und die Biotrockenmasse auf der Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) gravimetrisch bestimmt. Aus diesen beiden Parametern lässt sich nun mittels Geradenregression eine Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmassekonzentration [ $\text{g l}^{-1}$ ] aufstellen (Abb. 5.2, Gl. 5.1):

$$BTM [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}] = 0,29 \cdot OD_{600} \quad \text{Gl. 5.1}$$



**Abb. 5.2:** Korrelation zwischen optischer Dichte (OD<sub>600</sub>) und Konzentration [g l<sup>-1</sup>] der Biotrockenmasse (BTM) für *B. subtilis* 168 auf C-Minimalmedium mit Glucose. Jeder Messpunkt resultiert aus der Doppelbestimmung der OD und der Dreifachbestimmung der Biotrockenmasse.

#### 5.4.2 Quantifizierung von Aminosäuren

Die Quantifizierung der Aminosäuren in Kulturüberständen wurde auf einer HPLC-Anlage (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) unter Einsatz einer Gemini<sup>®</sup>-Analysensäule (Gemini C<sub>18</sub>, 150 x 4,6 mm, 5µm Partikeldurchmesser, 110 Å Porengröße, Phenomenex Ltd., Aschaffenburg, Deutschland) durchgeführt. Bei der Quantifizierung sämtlicher Proben diente α-Aminobuttersäure (ABU) als interner Standard. Dazu wurden die Proben vor der Analyse mit einer wässrigen ABU-Lösung (225 µM) auf der Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) 1:10 verdünnt, zur Quantifizierung von Glutamat bei Einsatz als Kultursubstrat wurde eine 1:50 Verdünnung eingesetzt. Die Trennung der zu analysierenden Aminosäuren (Tab. 5.7) erfolgte bei einer Säulentemperatur von 40°C und einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup>. Dazu wurde ein Gradient aus dem polaren Eluenten A und dem apolaren Eluenten B gefahren (Tab. 5.8). Eluent A bestand aus 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,8), Eluent B aus einem Gemisch von Methanol (45%), Acetonitril (45%) und Wasser (10%). Die Kalibrierung erfolgte mittels externer Standards.

**Tab. 5.7:** Peaktabelle der trennbaren Aminosäuren mit Angabe der Retentionszeit (Ret.-Zeit  $\pm$  0,2 min).

Ret.-Zeit [min]	Analyt	Ret.-Zeit [min]	Analyt
4,7	Aspartat	26,1	Tyrosin
7,1	Glutamat	27,5	$\alpha$ -Aminobuttersäure
12,4	Asparagin	31,1	Cystein
13,4	Serin	32,2	Valin
15,3	Glutamin	32,9	Methionin
16,1	Histidin	35,8	Tryptophan
17,3	Glycin	37,0	Phenylalanin
17,9	Threonin	37,7	Isoleucin
19,5	Arginin	39,8	Leucin
20,2	$\beta$ -Alanin	41,9	Lysin
21,9	Alanin	47,9	Prolin

**Tab. 5.8:** Gradient zur Trennung von Aminosäuren mittels HPLC

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100,0	0,0
41,0	59,0	41,0
46,0	19,0	81,0
46,5	0,0	100,0
49,0	0,0	100,0
49,5	100,0	0,0
52,0	100,0	0,0

Die Derivatisierung der Aminosäuren wurde über Vorsäulenderivatisierung (Zorbax Eclipse-AAA, 12,5 × 4,6 mm, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mittels *o*-Phthaldialdehyd (OPA) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels eines Fluoreszenzdetektors bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Da Cystein spontan schlecht mit OPA zu derivatisierende Disulfide ausbilden kann, wurde die Disulfidbrücke vor der OPA-Derivatisierung mittels 3-Mercaptopropionsäure (0,5 % in 0,5 M Bicin) reduziert. Da OPA nur mit primären Aminen reagiert, wurde Prolin mit 9-Fluorenylmethylcarbonyl-Chlorid (Fmoc) derivatisiert und der Fluoreszenzdetektor bei einer Laufzeit von 43,5 min auf eine Anregungswellenlänge von 266 nm und eine Emissionswellenlänge von 305 nm umgeschaltet.

### 5.4.3 Quantifizierung von organischen Säuren und Alkoholen

Die Quantifizierung von organischen Säuren und Alkoholen in Kulturüberständen und Zellextrakten erfolgte mittels einer HPLC-Anlage (Kontron Bio-Tek Instruments GmbH, Neufahrn, Deutschland). Diese bestand aus einem Autosampler (HPLC 465, Kontron), einem Pumpensystem (HPLC-System 522, Kontron) mit vorgeschaltetem Eluent-Entgaser (Degasser 3493, ERC Inc., Alteglofsheim, Deutschland), sowie dem Säulenofen (Jetstream 2 plus, Thermotechnic Products, Langertsdorf, Deutschland) mit der Säule. Die Trennung erfolgte über eine Kationenaustauschersäule (Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Als Eluent wurde 0,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> isokratisch eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 ml min<sup>-1</sup>, die Säulentemperatur 45°C. Zur Detektion organischer Säuren war ein UV-Detektor (HPLC 535, Kontron) angeschlossen, die Detektionswellenlänge betrug 210 nm. Die Messung von Alkoholen erfolgte über die Änderung des Brechungsindex mittels eines RI-(Brechungsindex-)-Detektors (ERC-7515A, ERC Inc., Alteglofsheim, Deutschland).

#### 5.4.3.1 Quantifizierung von organischen Säuren und Alkoholen in Kulturüberständen

In Kulturüberständen wurden die organischen Säuren Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Pyruvat, Succinat, Lactat, Fumarat und Acetat, sowie Glycerin, Dihydroxyaceton, Acetoin, 2,3-Butandiol und Ethanol bestimmt (Tab. 5.9). Glycerin und Dihydroxyaceton sowie Acetoin und 2,3-Butandiol wurden dabei nicht getrennt, sondern in der Summe der Konzentrationen der jeweiligen Analyte quantifiziert. Die Analyse erfolgte mittels einer 1:10-Verdünnung aus den Kulturüberständen unter Verwendung externer Standards zur Kalibrierung. Zur

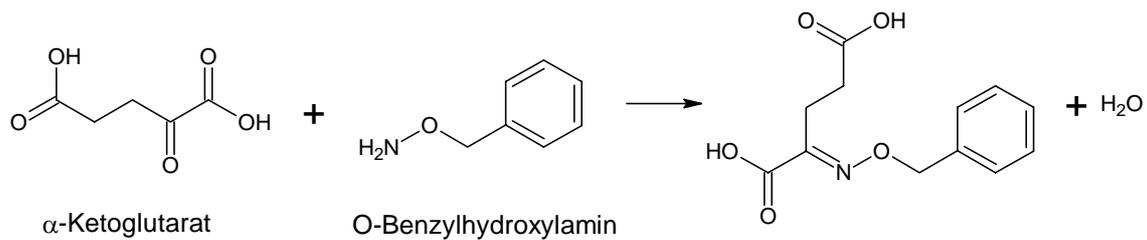
Quantifizierung von Succinat bei Einsatz als Kultursubstrat wurde eine 1:50 Verdünnung eingesetzt.

**Tab. 5.9:** Peaktable der analysierten organischen Säuren und Alkohole mit Angabe der Retentionszeit (Ret.-Zeit,  $\pm 0,2$  min).

Ret.-Zeit [min]	Analyt
4,5	Citrat
5,0	$\alpha$ -Ketoglutarat
5,8	Pyruvat
7,0	Succinat
7,6	Lactat
7,9	Glycerin + DHA
8,3	Fumarat
9,1	Acetat
10,4	Acetoin + 2,3-Butandiol
12,1	Ethanol

#### 5.4.3.2 Quantifizierung von $\alpha$ -Ketosäuren in Zellextrakten

Die Analytik von Zellextrakten mittels HPLC gestaltet sich aufgrund der großen Zahl unterschiedlicher, intrazellulärer Substanzen grundsätzlich schwierig. Da sich  $\alpha$ -Ketoglutarat im Chromatogramm bei einer Retentionszeit von 5 min (Tab. 5.9) mit anderen intrazellulären, organischen Säuren überlagert, wurde eine Verlängerung der Retentionszeit der zu analysierenden Substanz angestrebt. Um eine Verbesserung von Trennung und Detektion des  $\alpha$ -Ketoglutarats zu erreichen, wurde bereits während der Probenahme (Kap. 5.3.5.3) eine Oximierungsreaktion mit O-Benzylhydroxylamin durchgeführt (Abb. 5.3), die spezifisch für  $\alpha$ -Ketone abläuft. Dadurch wird zum einen eine Verringerung der Polarität und damit eine Erhöhung der Retentionszeit auf 23 Minuten, zum anderen eine Verbesserung der Detektion aufgrund der vergleichsweise hohen Absorption des Benzylrestes im UV-Bereich erreicht. Zur Bestimmung des intrazellulären  $\alpha$ -Ketoglutarats wurden Parallelkulturen mit jeweils zwei Schüttelkolben und einer Extraktion pro Kolben durchgeführt. Die Messung der Extrakte erfolgte jeweils in Doppelbestimmung, wobei die Kalibrierung analog zur Bestimmung organischer Säuren mittels externer Standards erfolgte.



**Abb. 5.3:** Schematische Darstellung der Oximierungsreaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat mit O-Benzylhydroxylamin.

#### 5.4.4 Quantifizierung von Glucose in Kulturüberständen

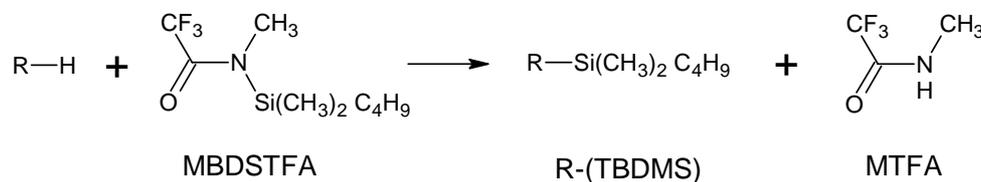
Extrazelluläre Konzentrationen des Substrats Glucose in den Kulturüberständen der kontinuierlichen Kultivierungen wurden mittels eines enzymatischen Testkits (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) im Spektralphotometer (Novaspec II, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 340 nm unter Verwendung von 1,5 ml Polystyrol-Einwegküvetten (Halbmikro-Plastibrand, Brand, Wertheim, Deutschland) quantitativ bestimmt. Die Bestimmung der Probemenge der jeweiligen Messansätze erfolgte dabei gravimetrisch auf der Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland). Es wurden standardmäßig Fünffachbestimmungen durchgeführt.

#### 5.4.5 Bestimmung von Massenisotopomerverteilungen mittels GC/MS

Die Massenisotopomerverteilungen der proteinogenen Aminosäuren und des intrazellulären Glycogens wurden mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie bestimmt (Wittmann et al., 2002b). Die dazu verwendete GC/MS-Anlage bestand aus dem Gaschromatographen HP 6890 GC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) mit einer HP-5MS Säule (5 % Phenyl-Methyl-Siloxan-Diphenylpolysiloxan; 30 m x 0,251 mm x 0,25  $\mu$ m, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und einem Quadrupol-Massenspektrometer MS 5973 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,5 [ $ml\ min^{-1}$ ] eingesetzt. Die Injektion des Probenmaterials erfolgte über einen Split/Splitless-Einzelinjektor im Splitless-Modus.

### 5.4.5.1 Bestimmung der Massenisotopomerenverteilungen proteinogener Aminosäuren

Zur Analyse der proteinogenen Aminosäuren wurde die aus der Kultivierung erhaltene Biomasse nach der in Kapitel 6.3.5.1 beschriebenen Zellernte hydrolysiert (100 µl 6 N HCl, 24 h, 105°C). Die Hydrolysate wurden neutralisiert (6 N NaOH) und anschließend mittels Filtration (10000 x g, Ultrafree-MC, 0,22 µm Durapore, Millipore, Bedford, USA) von partikulären Verunreinigungen getrennt. 50 µl des gefilterten Hydrolysates wurden lyophilisiert, anschließend in 50 µl Dimethylformamid + 0,1% Pyridin aufgenommen und mit 50 µl N-Methyl(tertbutyl-dimethylsilyl)-trifluoracetamid (MBDSTFA, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) derivatisiert (60 min, 80°C). Dabei erfolgt eine Umwandlung (Silylierung) der Aminosäuren in deren *tert.*-Butyldimethylsilyl-Derivate (TBDMS-Aminosäuren, Abb. 5.4).



**Abb. 5.4:** Schematische Darstellung der Silylierung von Aminosäuren mittels MBDSTFA, wobei R-H = -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, =NH, -SH.

Die derivatisierten Proben wurden nochmals zentrifugiert (5 min, 4°C, 16000 x g) um das durch Hydrolyse und Neutralisation in der Probe entstandene Salz zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mittels GC/MS analysiert, wobei ein Probevolumen von 1 µl eingesetzt wurde. Zur Trennung wurde im GC folgender Temperaturgradient gefahren: 120°C (0-5 min), Temperaturerhöhung bis auf 270°C mit 4°C min<sup>-1</sup>, weitere Temperaturerhöhung auf 320°C mit 20°C min<sup>-1</sup>. Die Temperatur am Inlet betrug dabei 300°C, an Interface und Quadrupol jeweils 320°C.

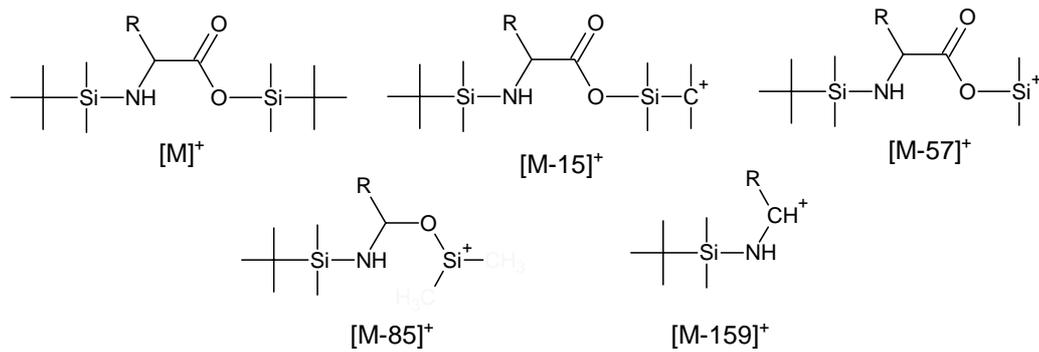
Bei der Ionisierung im Massenspektrometer zerfallen die primären Ionen in Fragment-Ionen, welche ein für das jeweilige Fragment charakteristisches Verhältnis von Masse zu Ladungszahl (*m/z*) aufweisen (Tab. 5.10, Abb. 5.5). Zur Identifizierung der detektierten Metabolite anhand ihres Massenspektrums wurden MS-Messungen im Scan-Modus mit einem Massenbereich von 150 bis 650 *m/z* durchgeführt. Die Bestimmung der Anteile verschiedener Massenisotopomere erfolgte im SIM-Modus („selected ion monitoring“), in welchem die Intensität einzelner, definierter Massen gemessen wird, was zu einer Erhöhung der Messgenauigkeit führt. Die Massenisotopomerenverteilungen wurden dabei stets in Doppelbestimmung gemessen.

**Tab. 5.10:** Verhältnisse zwischen Masse und Ladungszahl ( $m/z$ ) der einzelnen, durch Ionisation aus dem primären Ion (M) der derivatisierten Aminosäuren entstehenden Fragment-Ionen.

Analyt	M [ $m/z$ ]	M-15 [ $m/z$ ]	M-57 [ $m/z$ ]	M-85 [ $m/z$ ]	M-159 [ $m/z$ ]
Alanin	317	302	260	232	158
Glycin	303	288	246	218	144
Valin	345	330	288	260	186
Leucin	359	344	302	274	200
Isoleucin	359	344	302	274	200
Serin	447	432	390	362	288
Threonin	461	446	404	376	302
Phenylalanin	393	378	336	308	234
Aspartat	475	460	418	390	316
Glutamat	489	474	432	404	330
Lysin	488	473	431	403	329
Arginin*	499*	484	442	414	340
Histidin	497	482	440	412	338
Tyrosin	523	508	466	438	364

\* Die Silylierung der Guanidinogruppe des Arginins verläuft unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$ , was zu einem Massenverlust von  $m/z = 17$  führt.

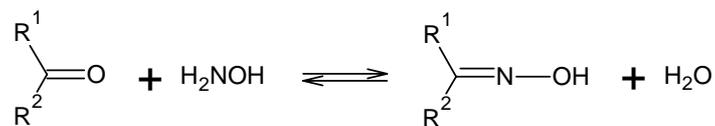
Für die Berechnung der relativen Verteilung der Massenisotopomere einer Aminosäure wurden jeweils die [M-57]-Fragmente gemessen, da diese aufgrund sehr hoher Intensitäten eine sehr gute Bestimmbarkeit zeigten und das gesamte Kohlenstoffgerüst des jeweiligen Metaboliten enthalten (Abb. 5.5). Somit konnte ein eventueller, durch die Fragmentierung entstehender Informationsverlust vermieden werden.



**Abb. 5.5:** Strukturformeln der bei der Ionisation aus dem primären Ion  $[M]^+$  der derivatisierten Aminosäuren entstehenden Fragment-Ionen.

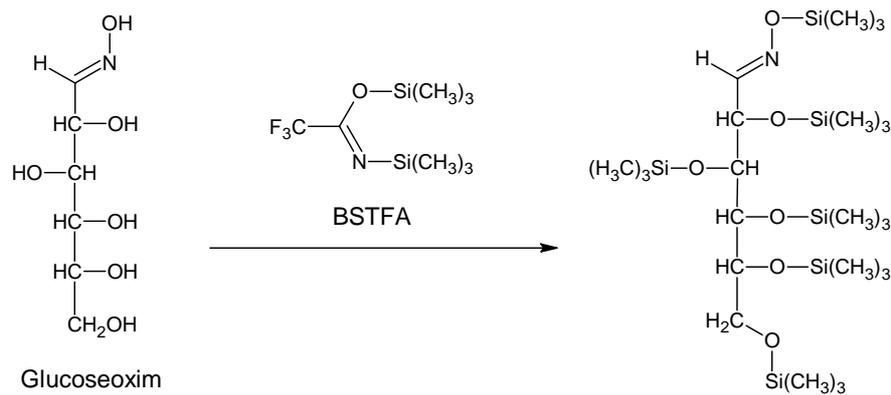
#### 5.4.5.2 Bestimmung der Massenisotopomerenverteilung in Glucose-Monomeren aus der hydrolytischen Spaltung von Polysacchariden

Die Bestimmung der Massenisotopomerenverteilung des Glucose-6-Phosphats erfolgte aufgrund der hydrolytischen Spaltung intrazellulärer Kohlehydrate und GC/MS-Analyse der dabei entstehenden Glucose-Monomere. Dazu wurde die Biomasse hydrolysiert (100  $\mu$ l 2 N HCl, 2 h, 105°C). Die Hydrolysate wurden neutralisiert (2 N NaOH) und anschließend mittels Filtration (10000 x g, Ultrafree-MC, 0,22  $\mu$ m Durapore, Millipore, Bedford, USA) von partikulären Verunreinigungen getrennt. Derivatisierung und GC/MS-Analyse erfolgten analog zu einem in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Analyse von Trehalose in Kulturüberständen (Kiefer et al., 2004). 50  $\mu$ l des gefilterten Hydrolysates wurden lyophilisiert und in zwei Schritten derivatisiert. Der erste Derivatisierungsschritt mit 50  $\mu$ l Hydroxylaminlösung (25 mg ml<sup>-1</sup> Hydroxylamin-HCl in Pyridin, 25 min, 80°C) diente der Oximierung von Aldehyd- bzw. Ketogruppen (Abb. 5.6).



**Abb. 5.6:** Schematische Darstellung der Umsetzung reduktiver Zucker mit Hydroxylamin zum Zuckeroxim.

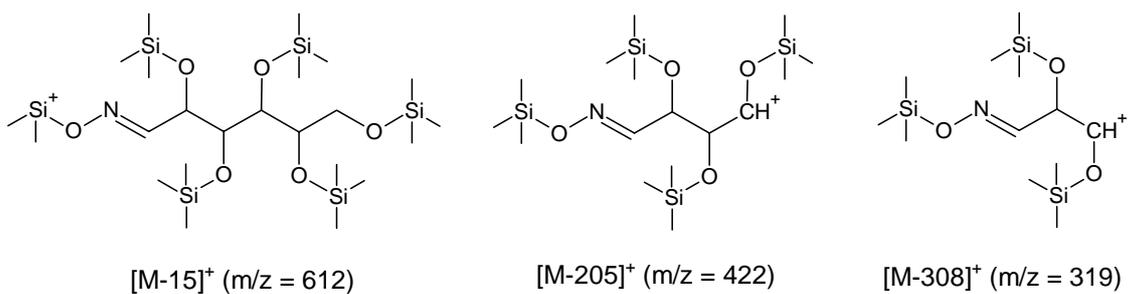
Anschließend wurde die Probe mit 50  $\mu$ l N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) in einem zweiten Schritt derivatisiert (30 min, 80°C). Dabei erfolgt eine Silylierung der Hydroxyl- und Hydroximgruppen des Glucoseoxims zu deren Trimethylsilylether (Abb. 5.7).



**Abb. 5.7:** Schematische Darstellung der Silylierung des Glucoseoxims mittels BSTFA.

Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4°C, 16000 x g) wurden die Proben mittels GC/MS analysiert, wobei ein Probevolumen von 1 µl eingesetzt wurde. Zur Trennung wurde im GC folgender Temperaturgradient gefahren: 150°C (0-5 min), Temperaturerhöhung bis auf 310°C mit 8°C min<sup>-1</sup>, 10 min bei 310°C. Am Inlet betrug die Temperatur 310°C, an Interface und Quadrupol jeweils 320°C.

Aus den für das Massenspektrum des Hexakis-(trimethylsilyl)-Glucoseoxims charakteristischen Fragmenten (Abb. 5.8) wurde zur Bestimmung der relativen Massenisotopomerenverteilung mittels GC/MS-Messungen im SIM-Modus das Fragment [M-15] mit der Masse  $m/z = 612$  ausgewählt, da es das einzige, reproduzierbar messbare Fragment war, welches das gesamte Kohlenstoffgerüst des Glucose-6-Phosphats enthält.



**Abb. 5.8:** Strukturformeln der bei der Ionisation aus dem primären Ion des Hexakis-(trimethylsilyl)-Glucoseoxims entstehenden Fragment-Ionen, von denen einzig das [M-15]<sup>+</sup>-Fragment das gesamte Kohlenstoffgerüst der Glucose enthält.

### 5.4.6 Spezifische Raten und Ausbeutekoeffizienten

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] von *Bacillus subtilis* wurde durch Ableitung der Funktion des Logarithmus der optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) über der Zeit [ $\text{h}^{-1}$ ] berechnet nach:

$$\mu[\text{h}^{-1}] = \frac{d \ln \text{OD}_{600}}{dt} \quad \text{GI. 5.2}$$

Die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] wurde berechnet durch Division der zeitlichen Änderung der Substratkonzentration  $S$  [ $\text{mmol l}^{-1}$ ] durch die mittlere Biomassekonzentration  $X$  [ $\text{g l}^{-1}$ ] nach:

$$q_S[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{GI. 5.3}$$

Die spezifische Produktbildungsrate  $q_P$  [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] wurde berechnet durch Division der zeitlichen Änderung der Produktkonzentration  $P$  [ $\text{mmol l}^{-1}$ ] durch die mittlere Biomassekonzentration  $X$  [ $\text{g l}^{-1}$ ] nach:

$$q_P[\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{GI. 5.4}$$

Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S}$  [ $\text{g mmol}^{-1}$ ] für die während der Kultivierung gebildete Biomasse wurde berechnet Division der zeitlichen Änderung der Biomassekonzentration  $X$  [ $\text{g l}^{-1}$ ] durch die zeitliche Änderung der Substratkonzentration  $S$  [ $\text{mmol l}^{-1}$ ] nach:

$$Y_{X/S}[\text{g} \cdot \text{mmol}^{-1}] = \frac{dX/dt}{dS/dt} \quad \text{GI. 5.5}$$

Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{P/S}$  [ $\text{mol mol}^{-1}$ ] für die während der Kultivierung gebildeten Produkte wurde berechnet Division der zeitlichen Änderung der Produktkonzentration  $P$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ] durch die zeitliche Änderung der Substratkonzentration  $S$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ] nach:

$$Y_{P/S}[\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}] = \frac{dP/dt}{dS/dt} \quad \text{GI. 5.6}$$

Die volumetrische Kohlendioxidbildungsrate  $Q_{\text{CO}_2}$  [ $\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] wurde mittels einer Inertgasbilanz (Dunn et al., 2003) aus den relativen Anteilen von Kohlendioxid [%] in Zuluft ( $\text{CO}_{2\text{ein}}$ ) und Reaktorabgas ( $\text{CO}_{2\text{aus}}$ ) berechnet nach:

$$Q_{\text{CO}_2}[\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{p}{R \cdot T} \cdot \left( \frac{\text{CO}_{2\text{ein}}}{100} - \frac{\text{CO}_{2\text{aus}}}{100} \cdot \frac{N_{2\text{ein}}}{N_{2\text{aus}}} \right) \cdot \frac{F_{\text{Gas}}}{V}, \quad \text{GI. 5.7}$$

wobei:  $p$  = Druck [ $\text{N m}^2$ ];  $R$  = allgemeine Gaskonstante [ $\text{N m mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ];  $T$  = absolute Temperatur [ $\text{K}$ ];  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  = relative Anteile [%] von  $\text{CO}_2$  und  $\text{N}_2$  in Zuluft ( $\text{CO}_{2\text{ein}}$ ,  $\text{N}_{2\text{ein}}$ ) und Abgas ( $\text{CO}_{2\text{aus}}$ ,  $\text{N}_{2\text{aus}}$ );  $F_{\text{Gas}}$  = Gasfluss durch den Reaktor [ $\text{l h}^{-1}$ ];  $V$  = Reaktorvolumen [ $\text{l}$ ].

Die spezifische Kohlendioxidbildungsrate  $q_{CO_2}$  [ $mol\ g^{-1}\ h^{-1}$ ] wurde berechnet durch Division der volumetrischen Kohlendioxidbildungsrate durch die mittlere Konzentration an Biomasse  $X$  [ $g\ l^{-1}$ ] nach:

$$q_{CO_2} [mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}] = \frac{Q_{CO_2}}{X} \quad \text{GI. 5.8}$$

### 5.4.7 Massenbilanz für Kohlenstoff

Zur Validierung der Analytik wurde für die Tracerkultivierungen von *Bacillus subtilis* eine Massenbilanz für Kohlenstoff aufgestellt. Als Grundlage für die Berechnung des Kohlenstoffanteils in der Biomasse diente die Funktion der relativen Masse von *B. subtilis* pro mol Kohlenstoff  $M_r$  [ $g\ mol^{-1}$ ] in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  [ $h^{-1}$ ] (Dauner and Sauer, 2001):

$$M_r [g \cdot mol^{-1}] = 0,1339 \cdot \mu + 25,18 \quad \text{GI. 5.9}$$

Die Kohlenstoffbilanz für die Kultivierungen von *Bacillus subtilis* im Bioreaktor erfolgte nach:

$$\frac{dC_{ges}}{dt} \cdot V = \frac{dC_S}{dt} \cdot V - \frac{dC_X}{dt} \cdot V - \frac{dC_P}{dt} \cdot V - Q_{CO_2} \cdot V = 0, \quad \text{GI. 5.10}$$

wobei  $C_{ges}$  = Konzentration an Kohlenstoff in der Kultur [ $C\text{-mol}\ l^{-1}$ ];  $C_S$  = Konzentration des in den aufgenommenen Substraten enthaltenen Kohlenstoffs [ $C\text{-mol}\ l^{-1}$ ];  $C_X$  = Konzentration des in der gebildeten Biomasse enthaltenen Kohlenstoffs [ $C\text{-mol}\ l^{-1}$ ];  $C_P$  = Konzentration des in den gebildeten Produkten enthaltenen Kohlenstoffs [ $C\text{-mol}\ l^{-1}$ ];  $Q_{CO_2}$  = volumetrische Kohlendioxidbildungsrate [ $mol\ l^{-1}\ h^{-1}$ ];  $V$  = Kulturvolumen [l].

Die Wiederfindung [%] für die Kohlenstoffmassenbilanz ist definiert als der Quotient aus dem einer Kultivierung abgeführten und zugeführtem Kohlenstoff nach:

$$\text{Wiederfindung}[\%] = \frac{\frac{dC_X}{dt} \cdot V + \frac{dC_P}{dt} \cdot V + Q_{CO_2} \cdot V}{\frac{dC_S}{dt} \cdot V} \cdot 100 \quad \text{GI. 5.11}$$

Für die Kohlenstoffmassenbilanz der Tracerkultivierungen im Schüttelkolben, für die keine Abgasanalytik durchgeführt werden konnte, wurde die  $CO_2$ -Bildung aus den in der metabolischen Flussanalyse bestimmten, relativen Stoffflüssen berechnet. Dazu wurde die volumetrische Kohlendioxidbildungsrate  $Q_{CO_2i}$  [ $mmol\ l^{-1}\ h^{-1}$ ] einer Decarboxylierungsreaktion innerhalb des Zentralmetabolismus aus dem auf die Glucoseaufnahmerate  $q_S$  [ $mmol\ g^{-1}\ h^{-1}$ ] skalierten Fluss  $v_i$  über dieses Enzym und der mittleren Biomassekonzentration  $X$  [ $g\ l^{-1}$ ] berechnet nach:

$$Q_{CO_2i} [mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}] = v_i \cdot q_S \cdot X \quad \text{GI. 5.12}$$

Die Berechnung der in einer Schüttelkolbenkultivierung von *Bacillus subtilis* insgesamt gebildeten Menge an CO<sub>2</sub> erfolgte durch Summation der anhand der metabolischen Flussanalyse ermittelten Kohlendioxidbildungsraten decarboxylierender Enzyme, sowie aufgrund von Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) über die Stöchiometrie der CO<sub>2</sub>-Bildung bei der Synthese von Zellbestandteilen (Anhang, Tab. 9.4.1) und die relativen Anteile in *Bacillus subtilis* enthaltener Zellbestandteile an der Gesamtbiomasse (Anhang, Tab. 9.4.2).

## 5.5 Metabolische Flussanalyse

Die Bestimmung der intrazellulären Stoffwechselflüsse wurde mittels <sup>13</sup>C-Flussanalyse durchgeführt. Dazu wurden zwei unterschiedliche numerische Verfahren eingesetzt, welche die mathematische Modellierung der am Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis* beteiligten enzymatischen Reaktionen beinhalten. Die mathematische Modellbildung umfasste dabei sämtliche zentralen Stoffwechselwege wie Glykolyse, Pentosephosphatweg, Tricarbonsäurezyklus und anaplerotische Carboxylierungen. Zusätzlich wurden Stoffwechselwege für die Bildung von Acetat, Lactat, Acetoin und Glycerin, sowie die Biomassebildung aus Intermediaten des Zentralmetabolismus implementiert.

Die Modellierung umfasste sämtliche extrazellulär bestimmbaren Substrataufnahme- und Produktbildungsraten, die Markierungsmuster der proteinogenen Aminosäuren Alanin, Glycin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Aspartat, Phenylalanin, Glutamat, Lysin, Arginin, Histidin und Tyrosin sowie das Markierungsmuster von Glucose-Monomeren aus der hydrolytischen Spaltung von Polysacchariden. Aus den Markierungsmustern dieser Analyte wurden die Massenisotopomerenverteilungen charakteristischer Intermediate des Zentralmetabolismus abgeleitet, welche Vorläufermoleküle zur Biosynthese dieser Zellbestandteile darstellen. Zusätzlich wurde der anabole Bedarf an Intermediaten des Zentralstoffwechsels für die Bildung von Biomasse benötigt. Die Berechnung des anabolen Bedarfs an Biomassevorstufen erfolgte aufgrund von Literaturdaten über die Biomassezusammensetzung von *Bacillus subtilis* als Funktion der spezifischen Wachstumsrate (Dauner et al., 2001a; Dauner and Sauer, 2001; Dauner et al., 2002). Aufgrund dieses Zusammenhangs wurde die Biomassezusammensetzung [ $g_{\text{Zellbestandteil}} g_{\text{BTM}}^{-1}$ ] bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen in Abhängigkeit von der experimentell bestimmten, spezifischen Wachstumsrate interpoliert (Anhang Tab. 9.4.2) Anhand von Literaturdaten über den Bedarf an Intermediaten zur Bildung der betreffenden Biomassekomponenten [ $\text{mmol}_{\text{Precursor}} g_{\text{Zellbestandteil}}^{-1}$ ] (Dauner and Sauer, 2001) (Anhang Tab. 9.4.1) wurde daraufhin der genaue Bedarf an Biomassevorstufen [ $\text{mmol}_{\text{Precursor}} g_{\text{BTM}}^{-1}$ ] errechnet. Durch Multiplikation mit dem Biomasseausbeutekoeffizienten  $Y_{X/S}$  [ $g_{\text{BTM}}$

$\text{mmol}_{\text{Substrat}}^{-1}$ ] wurde dieser Wert auf die Substrataufnahme normiert und in der Flussbestimmung eingesetzt.

Für die Flussberechnung wurden jeweils Daten aus zwei parallelen Kultivierungen kombiniert. Dazu wurden die Flussparameter in der Simulation variiert, bis die Abweichung zwischen experimentell bestimmten und simulierten Markierungsverteilungen minimal war. Als zu minimierender Parameter diente dabei die Summe der kleinsten Fehlerquadrate.

Die Berechnung der metabolischen Flüsse bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose und der Kombination aus Glucose, Glutamat und Succinat als C-Quelle wurden von C. Wittmann (Lehrstuhl für Technische Biochemie, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Das mathematische Modell für *Bacillus subtilis* (Schilling et al., 2007) wurde auf Grundlage eines bereits etablierten Modells für *Corynebacterium glutamicum* erstellt, welches bereits mehrfach eingesetzt und in der Literatur beschrieben wurde (Krömer et al., 2004; Wittmann and Heinzle, 2001a; Wittmann and Heinzle, 2002; Wittmann et al., 2004b). Die Simulationen wurden mittels MATLAB 7.0 sowie Simulink 3.0 (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) durchgeführt.

Die Simulationen für die metabolische Flussanalyse von *B. subtilis* 168 mit Glutamat und Succinat, sowie von *B. subtilis* GP335 und QB5407 mit Glucose, Glutamat und Succinat als C-Quelle wurden mittels eines von Tae Hoon Yang (Lehrstuhl für Technische Biochemie, Universität des Saarlandes) entwickelten, mathematischen Modells (Yang et al., 2007) unter Verwendung von Matlab 7.1 (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) durchgeführt. In diesem Modell wurde die Methode der Cumomeren-Bilanzierung (Wiechert and de Graaf, 1997) verwendet (Yang et al., 2007). Die Ermittlung des Informationsgehaltes unterschiedlicher Kombinationen von verschiedenen, kommerziell erhältlichen  $^{13}\text{C}$ -Substraten erfolgte mittels Sensitivitätsanalyse (Möllney et al., 1999; Yang et al., 2005). Bei den Flussbestimmungen für *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glutamat und Succinat als C-Quelle, sowie für *B. subtilis* QB5407 wurden die Markierungsdaten aus der Kombination einer Kultivierung auf unmarkiertem Glutamat und  $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat und einer Kultivierung auf  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Glutamat und  $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ -Succinat verwendet (Yang et al., 2007).

## 5.6 Transkriptomanalyse

Parallel zur metabolischen Flussanalyse von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose sowie auf Glucose, Glutamat und Succinat erfolgte eine vergleichende Analyse des Transkriptoms mittels DNA-Microarrays. Die erforderlichen Kultivierungen und Probenahmen waren Gegenstand dieser Arbeit, die Transkriptomanalyse selbst wurde von O. Schilling (Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland) durchgeführt und ist in der Literatur näher beschrieben (Schilling et al., 2007). Die Microarray-Chips enthielten insgesamt 70

Gene, welche für Enzyme des zentralen Kohlenstoff- and Stickstoffmetabolismus von *B. subtilis* kodieren. Für jedes Gen waren auf dem Chip insgesamt 8 Spots enthalten, die in zwei Reihen mit jeweils 4 Spots lokalisiert waren. Für jede Reihe wurde dabei eine unabhängige PCR-Reaktion durchgeführt, wobei die erhaltenen PCR-Produkte eine Länge zwischen 300 und 500 Basenpaaren (bp) aufwiesen und dem 3'-Ende jedes Gens entsprachen. Zusätzlich wurden als Qualitätskontrolle ausgewählte Gene mit einer Länge von 300 bis 500 bp als PCR-Produkte des 5'-Endes auf dem Chip aufgebracht. Alle PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel kontrolliert und sequenziert. Zur Kalibrierung des Readers war auf jedem Chip ein Set von 10 PCR-Produkten von Genen aus *Escherichia coli* und *Mycoplasma pneumoniae* mit jeweils 400 – 500 bp enthalten, welches als Scorecard bezeichnet und in einer definierten Menge von 30 pg Sonden-DNA pro Spot ohne Kreuzhybridisierung mit cDNA von *Bacillus subtilis* aufgetragen wird.

Aus den Biomasseproben wurde die RNA isoliert und nach dem in der Literatur beschriebenen Protokoll (Schilling et al., 2007) in cDNA transkribiert und diese in der PCR-Reaktion amplifiziert, wobei die fluoreszierenden Nukleotide Cy3-dUTP (grün) und Cy5-dUTP (rot) verwendet wurden. Die fluoreszenzmarkierte cDNA wurde aufgereinigt und der Gehalt an fluoreszierenden Nukleotiden durch Absorptionsmessung bei 550 nm für Cy3 und 650 nm für Cy5 bestimmt. Anschließend erfolgte die Kreuzhybridisierung des DNA-Chips mit jeweils gleichem Gehalt an Cy3- und Cy5-markierter cDNA.

Für jedes Gen wurden bei den zugehörigen 8 Spots die Signalintensitäten bei 550 nm und 650 nm mittels eines Fluoreszenz-Scanners (GenePix 4000B, Molecular Devices Corp., Union City, USA) gemessen und daraus der Expressionsquotient bestimmt. Hierzu wurden insgesamt 3 mathematisch unterschiedliche Quotienten berechnet: Der Quotient aus dem Median, der Quotient aus dem Durchschnittswert und der Quotient der Regression. Dabei wurde für die zur Berechnung der bestimmten Expressionsquotienten herangezogenen Einzelwerte eine maximale Abweichung von 30 % festgesetzt (Schilling et al., 2007). Ein weiteres Kriterium zur Evaluierung der Messdaten war die Durchführung untereinander unabhängiger Flip-Experimente. Dazu wurden die RNA-Isolate aus den Kultivierungen von *B. subtilis* 168 auf Glucose und der Kombination aus Glucose, Glutamat und Succinat nach der Isolierung gesplittet, so dass letztendlich von jeder Kultivierung zwei RNA-Pools vorhanden waren. Diese wurden jeweils wechselseitig mit Cy3 und Cy5 markiert, so dass jeweils 2 cDNA-Sonden derselben Probe mit gegensätzlicher Markierung vorlagen. Diese 4 Sonden wurden dann auf 2 getrennten Chips kreuzhybridisiert und diese getrennt voneinander ausgewertet.

## 6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

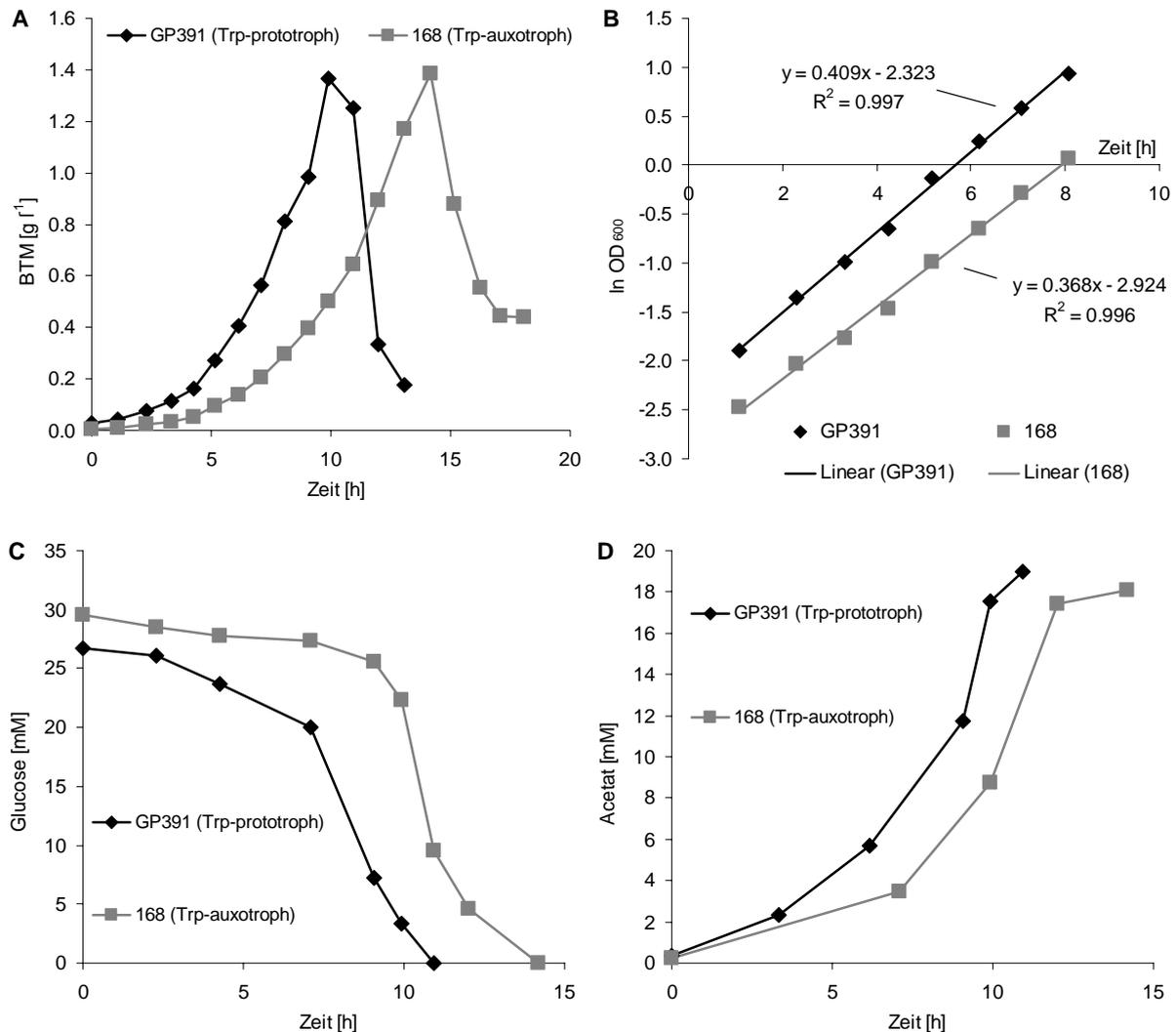
### 6.1 Auswahl des geeigneten *Bacillus subtilis* Stammes und Validierung des metabolischen Netzwerks

Seitdem John Spizizen 1958 anhand des Tryptophan-auxotrophen Stammes *B. subtilis* 168 den Nachweis der Transformation gelang (Spizizen, 1958), stellt dieser Stamm den in der Forschung am häufigsten eingesetzten Stamm von *Bacillus subtilis* dar. Forschungsarbeiten zur Untersuchung von Physiologie und Sporenbildung (Piggot and Coote, 1976) während der 70er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts und nicht zuletzt die vollständige Sequenzierung des Genoms (Kunst et al., 1997) führten zur Akzeptanz von *B. subtilis* 168 als Referenzstamm.

Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Analyse intrazellulärer Flussverteilungen. Für die metabolische Flussanalyse ist eine vollständige Bilanzierung aller aufgenommenen und verstoffwechselten Kohlenstoffquellen sowie die genaue Kenntnis intrazellulärer metabolischer Vorgänge essentiell. Das für den Metabolismus von *Bacillus subtilis* aufgestellte Netzwerk umfasst nicht den Abbau von Tryptophan, da in den dazu verwendeten Datenbanken (KEGG, MetaCyc) keine Abbaupfade für Tryptophan enthalten sind und auch keine anderweitigen Literaturangaben über Untersuchungen hinsichtlich eines Abbaus von Tryptophan durch *Bacillus subtilis* gefunden werden konnten. *Bacillus subtilis* 168 besitzt eine Mutation der Indol-3-Phosphoglycerin-Synthase, was sowohl die Biosynthese als auch den Abbau von Tryptophan über dieses Enzym verhindert. Da dies aber die einzige Mutation in diesem Stamm ist, muss dieser Organismus über eine funktionelle Indol-3-Phosphoglycerin-Aldolase verfügen. Dabei handelt es sich um das terminale Enzym der Tryptophan-Synthese, welches theoretisch eine Metabolisierung von Tryptophan zu Serin und Indol ermöglichen könnte (Sonenshein et al., 2002). Ob dies in vivo tatsächlich geschieht, musste zunächst anhand eines physiologischen Vergleichs von *B. subtilis* 168 mit dem Tryptophan-prototrophen Stamm *B. subtilis* GP391 sowie anhand von Markierungsstudien geklärt werden.

### 6.1.1 Auswirkungen der Tryptophan-Auxotrophie auf Wachstum und Physiologie von *Bacillus subtilis*

Die beiden Stämme *Bacillus subtilis* 168 und *Bacillus subtilis* GP391 zeigen einige Unterschiede, was die Kinetik von Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung betrifft. Der Stamm GP391 zeigt eine stärkere Zunahme der Biotrockenmasse und mit  $\mu = 0,41$  [ $\text{h}^{-1}$ ] eine um 12 % höhere Wachstumsrate als der Stamm 168 (Abb. 6.1.1 A, B; Tab. 6.1.1).



**Abb. 6.1.1:** Kultivierungsprofil von *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* GP391 bei Wachstum im Schüttelkolben bei 30°C auf Glucose als C-Quelle. Dargestellt sind der zeitliche Verlauf der Biomassekonzentration [ $\text{g l}^{-1}$ ] (A), die Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] aus der Steigung des Logarithmus der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit (B) sowie der zeitliche Verlauf der Konzentrationen [ $\text{mmol l}^{-1}$ ] an Glucose (C) und Acetat (D). Die während der Kultivierungsdauer von 0 - 10 h gewonnenen Messwerte wurden zur Berechnung der spezifischen Raten für Wachstum, Substrataufnahme und Produktbildung sowie der Ausbeutekoeffizienten von Biomasse und Acetat verwendet (Tab. 6.1.1).

Die über den gesamten Verlauf der Kultivierung gebildete Menge an Biomasse ist bei beiden Stämmen mit ca. 1,5 [g l<sup>-1</sup>] etwa gleich hoch. Beide Stämme weisen mit etwa 50 mg gebildeter Biotrockenmasse pro aufgenommenem mmol Glucose einen identischen Biomasseausbeutekoeffizienten auf (Tab. 6.1.1).

Bezüglich der Substrataufnahme kann bei *B. subtilis* GP391 eine deutlich schnellere Abnahme der absoluten Konzentration an Glucose im Medium beobachtet werden als bei *B. subtilis* 168 (Abb.6.1.1 C), dennoch liegt die spezifische Glucoseaufnahmerate [mmol gBTM<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] von *B. subtilis* GP391 etwa 8% unter der von *B. subtilis* 168 (Tab. 6.1.1). Zurückzuführen ist die schnellere Abnahme der Glucosekonzentration bei *B. subtilis* GP391 somit auf die höhere spezifische Wachstumsrate dieses Stammes und die damit einhergehende, erhöhte Biomassebildung.

Die Produktbildung der beiden Stämme betreffend lässt sich festhalten, dass unter den hier vorliegenden Kultivierungsbedingungen außer Acetat keine nennenswerten Mengen an organischen Säuren in das Medium ausgeschieden werden. Ebenso konnte keine messbare Zunahme der fermentativen Produkte Glycerin, Lactat, Ethanol, Acetoin und 2,3-Butandiol festgestellt werden.

**Tab. 6.1.1:** Spezifische Raten für Wachstum, Substrataufnahme und Produktbildung sowie Ausbeutekoeffizienten von Biomasse und Acetat für *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* GP391 bei Wachstum auf Glucose als C-Quelle.

<i>Bacillus subtilis</i> Stamm	168	GP391
Spezifische Wachstumsrate $\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	0,37	0,41
Spezifische Glucoseaufnahmerate $q_s$ [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	-7,3	-6,7
Spezifische Acetatbildungsrate $q_p$ [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	6,0	5,9
Ausbeutekoeffizienten		
Biotrockenmasse $Y_{x/s}$ [g mmol <sup>-1</sup> ]	0,050	0,051
Acetat $Y_{p/s}$ [mmol mmol <sup>-1</sup> ]	0,689	0,734

Der Konzentrationsverlauf von Acetat im Medium zeigt bei *B. subtilis* GP391 eine deutlich stärkere Zunahme als bei *B. subtilis* 168 (Abb. 6.1.1 D). Die insgesamt gebildete Menge an Acetat ist bei beiden Stämmen vergleichbar. Der Stamm GP391 bildet 0,711 mmol Acetat pro aufgenommenem mmol Glucose und liegt damit geringfügig über dem Ausbeutekoeffizienten für *B. subtilis* 168 von 0,651 mmol pro mmol Glucose (Tab. 6.1.1).

Sowohl die insgesamt gebildete Menge an Acetat (Abb. 6.1.1 D), als auch die Ausbeutekoeffizienten für Acetat unterscheiden sich bei beiden Stämmen nur geringfügig,

der Stamm *B. subtilis* GP391 besitzt einen gegenüber *B. subtilis* 168 um etwa 6% erhöhten Acetatausbeutekoeffizienten, wohingegen die spezifische Acetatbildungsrate bei beiden Stämmen identisch ist (Tab. 6.1.1).

Vom energetischen Standpunkt aus betrachtet wäre die Aufnahme von Tryptophan aus dem Medium für den Organismus günstiger als die Biosynthese, da zur Biosynthese eines Mols Tryptophan phosphorylierte Metabolite in einer zu 6 mol ATP äquivalenten Menge verbraucht werden. Für den Tryptophan-auxotrophen Stamm *Bacillus subtilis* 168 wurde unter diesen Bedingungen eine spezifische Tryptophanaufnahmerate von 21,6 [ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] bestimmt. In Anbetracht der Tatsache, dass der Tryptophan-prototrophe Stamm *B. subtilis* GP391 gegenüber *B. subtilis* 168 mit einer etwa 11% höheren spezifischen Wachstumsrate wächst, bedeutet dies, dass *B. subtilis* GP391 etwa 0,144 [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] an phosphorylierten Metaboliten zur Tryptophansynthese einsetzen muss.

Über die Aufnahme von Tryptophan ist bei *Bacillus subtilis* noch sehr wenig bekannt, bislang wurde lediglich ein mögliches Transport-Protein für Tryptophan identifiziert, das jedoch keine Homologie zu den Transport-Proteinen für aromatische Aminosäuren in *E. coli* aufweist (Sarsero et al., 2000). Untersuchungen der Tryptophan-Aufnahme bei *S. typhimurium* (Ames, 1964) und *B. megatherium* (Bouknight and Sadoff, 1975) ergaben Aufnahmeraten im Bereich von 0,5 - 0,6 [ $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{min}^{-1}$ ].

Eine mögliche Erklärung für die bei dem Tryptophan-auxotrophen Stamm *B. subtilis* 168 höhere, spezifische Glucose-Aufnahmerate bei gleichzeitig niedrigerer Acetatausbeute besteht in der Annahme eines  $\text{H}^+$ -Antiport-Mechanismus zur Einschleusung des relativ großen Moleküls Tryptophan. Die Zelle wäre dadurch gezwungen, die dazu notwendigen Reduktionsäquivalente über eine im Vergleich zu dem prototrophen Stamm GP391 erhöhte Aktivität des Tricarbonsäurezyklus zu generieren. Leider sind keine Messdaten über  $\text{CO}_2$ -Bildungsraten vorhanden, wodurch diese Hypothese überprüft werden könnte. Eine im Vergleich zu *B. subtilis* GP391 höhere spezifische  $\text{CO}_2$ -Bildungsrate bei dem Stamm *B. subtilis* 168 würde diese Annahme unterstützen. Eine genauere Betrachtung dieser Annahme erfolgt in Kapitel 6.1.3 im Rahmen der Betrachtung der relativen Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg beider Stämme.

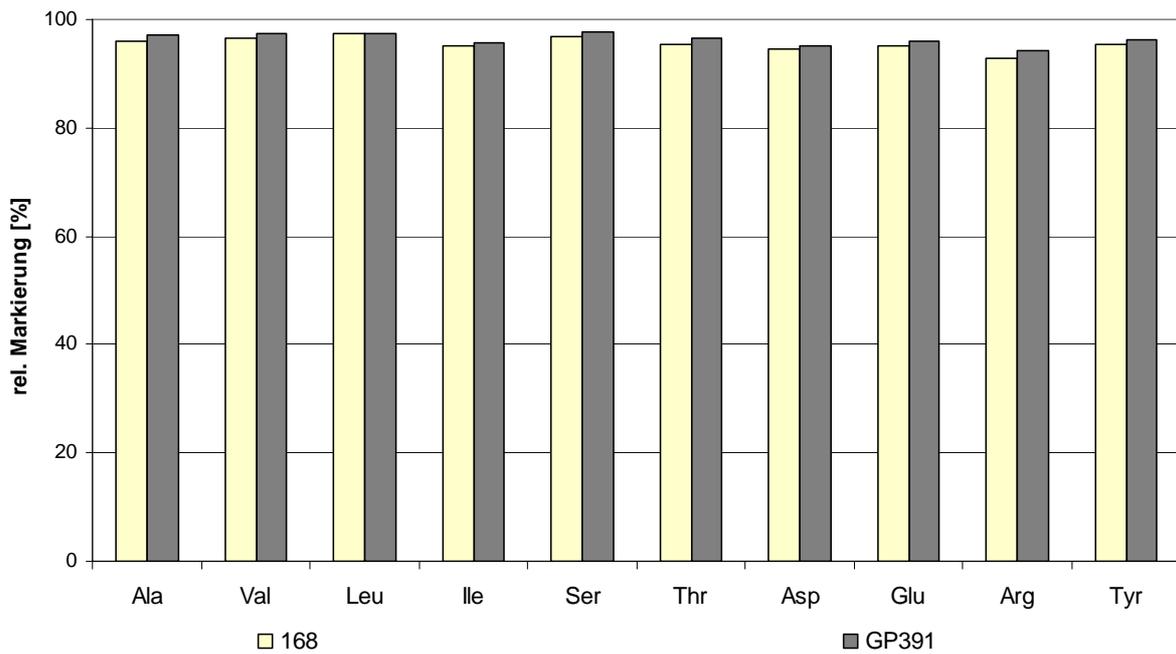
Die hier gemachten Beobachtungen deuten in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass das Wachstum von *B. subtilis* 168 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur durch die Aufnahme und Metabolisierung von Glucose, sondern auch durch die Geschwindigkeit der Tryptophan-Aufnahme begrenzt ist.

### 6.1.2 Markierung proteinogener Aminosäuren bei Wachstum auf Glucose

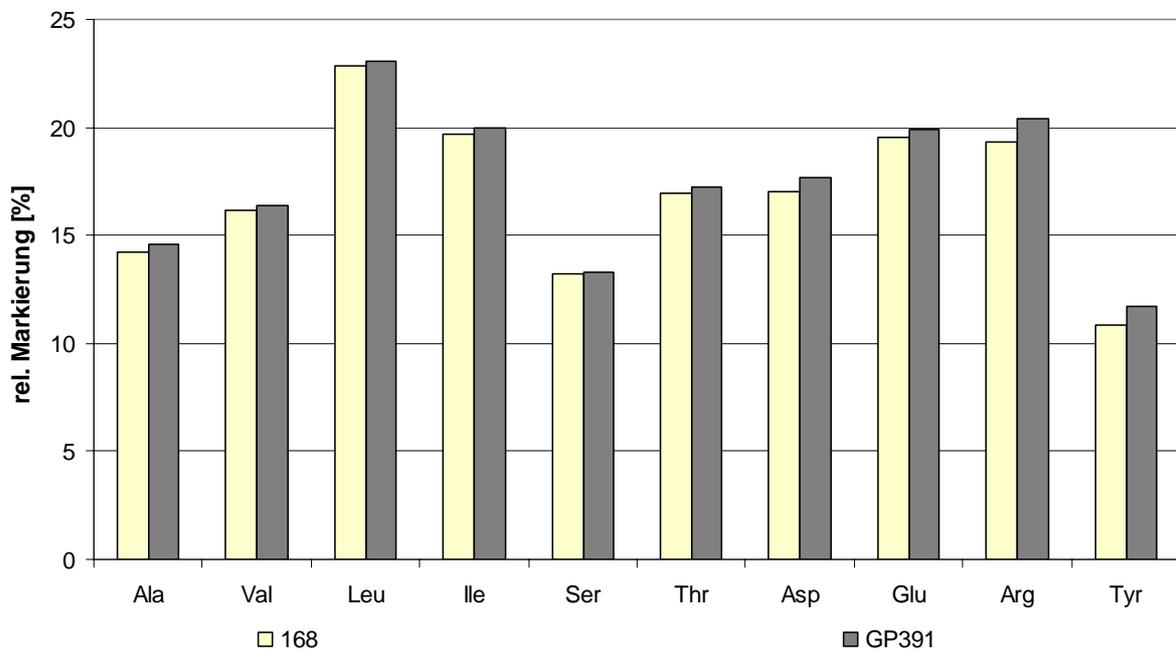
Die Markierungsmuster der proteinogenen Aminosäuren zeigen bei Wachstum auf [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Glucose keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* GP391 (Abb. 6.1.2). Beide Kultivierungen wurden mit einer Anfangs-OD von etwa 0,05 gestartet und bei einer optischen Dichte von 1,5 geerntet, wobei das Inokulum in beiden Fällen aus Vorkulturen auf unmarkierter Glucose stammte. Dies erklärt, warum für keine Aminosäure ein relativer Markierungsanteil von 100 % bestimmt werden konnte, da etwa 3% unmarkierte Zellen zum Zeitpunkt der Zellernte in jeder Kultur vorhanden waren (Abb. 6.1.2). Die prozentualen Anteile an Markierung in den proteinogenen Aminosäuren liegen bei *B. subtilis* GP391 insgesamt zwar etwas höher als bei *B. subtilis* 168, die Tatsache, dass diese Beobachtung aber auf alle Aminosäuren zutrifft, lässt eher das Auftreten eines systematischen Fehlers aus der Messung vermuten als einen Fluss von unmarkiertem Kohlenstoff aus dem Abbau von Tryptophan. Durch das sehr niedrige Volumen des Inokulums werden Unterschiede im Gehalt an unmarkiertem Zellmaterial in der Kultur zusätzlich begünstigt, da bereits kleine Ungenauigkeiten in einzelnen Pipetierschritten vergleichsweise große relative Fehler verursachen.

Somit lassen sich für beide Stämme keine signifikanten Unterschiede im relativen Markierungsgehalt der proteinogenen Aminosäuren beobachten, insbesondere im Falle eines Umsatzes von Tryptophan zu Serin und Indol müsste Serin bei *B. subtilis* 168 jedoch eine deutlich schwächere Markierung aufweisen als bei GP391. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden.

Noch deutlicher zeigt sich diese Tatsache bei Markierungsstudien auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose. Der Anteil an <sup>13</sup>C-Markierung von Serin ist bei beiden Stämmen identisch (Abb. 6.1.3). Die übrigen Aminosäuren zeigen zwar eine geringe Abweichung in den prozentualen Anteilen an Markierung, jedoch gibt es für den Abbau von Tryptophan keine andere Möglichkeit als die Bildung von Serin. Es lässt sich sowohl bei Wachstum auf [U-<sup>13</sup>C]-Glucose als auch auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose für keine Aminosäure ein eindeutiger Einfluss des Labelings durch einen eventuellen Abbau von Tryptophan beobachten.



**Abb. 6.1.2:** Graphische Darstellung der relativen Markierungsanteile proteinogener Aminosäuren der Stämme *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* GP391 bei Wachstum auf  $[U-^{13}C_6]$ -Glucose.



**Abb. 6.1.3:** Graphische Darstellung der relativen Markierungsanteile proteinogener Aminosäuren der Stämme *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* GP391 bei Wachstum auf  $[1-^{13}C]$ -Glucose.

### 6.1.3 Auswirkungen der Tryptophan-Auxotrophie auf die Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg

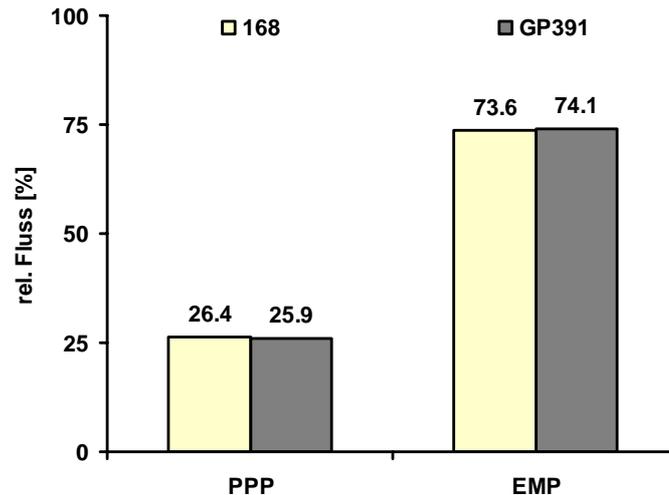
Die relative Aktivität des Pentosephosphatwegs ( $\Phi_{PPP}$ ) kann aus den Markierungsmustern von Pyruvat oder anderen Intermediaten der Glykolyse berechnet werden. Da bei der Synthese der Aminosäuren Alanin und Serin das Kohlenstoffgerüst der beiden Precursor Pyruvat und 3-Phosphoglycerat nicht verändert wird, ist die Markierungsverteilung in diesen beiden Aminosäuren repräsentativ für das Verhältnis der Markierung im Pyruvat. Aus der Massenisotopomerenverteilung des Pyruvats kann  $\Phi_{PPP}$  mittels Gleichung 6.1.1 abgeschätzt werden (Wittmann, 2002) nach:

$$\Phi_{PPP} = \frac{1 - I_{m+1/m}}{1 + 2/3 \cdot I_{m+1/m}} \quad \text{Gl. 6.1.1}$$

wobei:  $\Phi_{PPP}$  = Verzweigungsverhältnis des Flusses zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg ( $0 < \Phi_{PPP} < 1$ );  $I_{m+1/m}$  = Intensitätsverhältnis der Massenisotopomere  $m+1$  und  $m$  des Pyruvats.

Die Berechnung von  $\Phi_{PPP}$  aus der Markierungsverteilung des Alanins erfolgt jedoch unter der Annahme, dass kein Fluss von Metaboliten aus dem Tricarbonsäurezyklus in den Pyruvat-Pool stattfindet und stellt daher lediglich einen ersten Ansatz zur Detektion von eventuell vorhandenen Unterschieden in den Flussverteilungen zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg dar.

Die über das Verzweigungsverhältnis  $\Phi_{PPP}$  berechneten, relativen Flüsse in Glykolyse und Pentosephosphatweg sind für beide Stämme von *B. subtilis* in Abb. 6.1.4 graphisch dargestellt. Aus diesen geht hervor, dass sich  $\Phi_{PPP}$  in beiden Stämmen nicht signifikant unterscheidet, *B. subtilis* 168 zeigt gegenüber *B. subtilis* GP391 einen um lediglich 2 % erhöhten Fluss in den Pentosephosphatweg. Bezogen auf die Markierungsverteilung des Pyruvat-Pools lässt sich kein eindeutiger Einfluss der Tryptophan-Auxotrophie des Stammes 168 beobachten. Der Stamm GP391 muss Tryptophan selbst synthetisieren, während der Wildtyp es aus dem Medium aufnehmen kann. Für die Synthese von 1 mol Tryptophan sind unter anderem 1 mol NADPH, 1 mol Erythrose-4-P und 1 mol Phosphoribosyl-Pyrophosphat erforderlich. Allerdings sind auch PEP und ATP notwendig, was wiederum eine erhöhte Aktivität der Glykolyse erfordern würde. Zusätzlich muss der Stamm GP391 die Energie für die Tryptophan-Synthese aus Glucose gewinnen, da ihm keine andere Energiequelle zur Verfügung steht. *Bacillus subtilis* nimmt Glucose über das PTS-System auf, welches pro aufgenommenem mol Glucose ein mol PEP verbraucht (Sonenshein et al., 2002; Ye and Saier, 1996). Dies würde bei *B. subtilis* GP391 eine geringfügig erhöhte Aktivität der Glykolyse erklärbar machen.



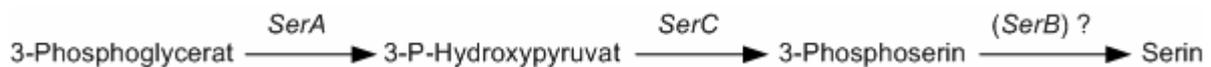
**Abb. 6.1.4:** Graphische Darstellung der relativen Flüsse [%] von Glucose-6-P in Glykolyse (EMP) und Pentosephosphatweg (PPP) für die Stämme *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* GP391.

Die Aufnahme von Tryptophan verläuft über das Transmembranprotein YhaG (Sarsero et al., 2000). Dabei handelt es sich vermutlich um einen sekundären Carrier, welcher Tryptophan nach dem Protonensymport-Mechanismus transportiert (Saier, 2000; Saier et al., 2002; Sonenshein et al., 2002). Untersuchungen des Transports in Membranvesikeln von *Bacillus subtilis* zeigten, dass für den aktiven Transport von Aminosäuren Elektronendonatoren wie NADH und NADPH notwendig sind (Konings and Freese, 1972). Daraus lässt sich schließen, dass die Aufnahme von Tryptophan durch *B. subtilis* 168 ATP-unabhängig verläuft und die dazu notwendige Energie vorwiegend aus den im Tricarbonsäurezyklus generierten Reduktionsäquivalenten stammt, was bereits in Kapitel 6.1.1 aufgrund des Vergleichs der spezifischen Raten für Substrataufnahme und Produktbildung, sowie der Acetatausbeutekoeffizienten angenommen werden konnte (s.o.).

Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass für alle weiteren, physiologischen Untersuchungen der Stamm *B. subtilis* 168 eingesetzt wurde. Eine Verstoffwechslung von Tryptophan konnte nicht festgestellt werden, womit ein negativer Einfluss der Tryptophan-Auxotrophie auf die Bilanzierung intrazellulärer Metabolite ausgeschlossen erscheint. Ein deutlicher Einfluss der Tryptophan-Auxotrophie konnte jedoch bei den spezifischen Raten von Wachstum, Produktbildung und Substrataufnahme beobachtet werden. Für verschiedene Operons von *Bacillus subtilis* wurde bereits eine Regulation in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate nachgewiesen (Deneer and Spiegelman, 1987; Marini et al., 2001; Weart and Levin, 2003), so dass hinsichtlich der Vergleichbarkeit zu Literaturdaten der Stamm *B. subtilis* 168 für alle weiteren physiologischen Untersuchungen vorzuziehen ist.

### 6.1.4 Der Serin-Biosyntheseweg von *B. subtilis* 168

Ein weiterer wichtiger Punkt betrifft die Biosynthese von Serin. Bei der Sequenzierung des *Bacillus subtilis* Genoms wurde kein homologes Gen zu dem terminalen Enzym (*SerB*) des von 3-Phosphoglycerat ausgehenden Biosynthesewegs für Serin (Abb. 6.1.5) gefunden (Kunst et al., 1997). Diese Fragestellung betrifft damit ebenfalls die Synthese von Glycin, da für *Corynebacterium glutamicum* Serin als Precursor zur Glycinsynthese nachgewiesen werden konnte (Simic et al., 2002).



**Abb. 6.1.5:** Darstellung des Synthesewegs von Serin aus 3-Phosphoglycerat in *Bacillus subtilis* mit Angabe der an der Synthese beteiligten ORFs.

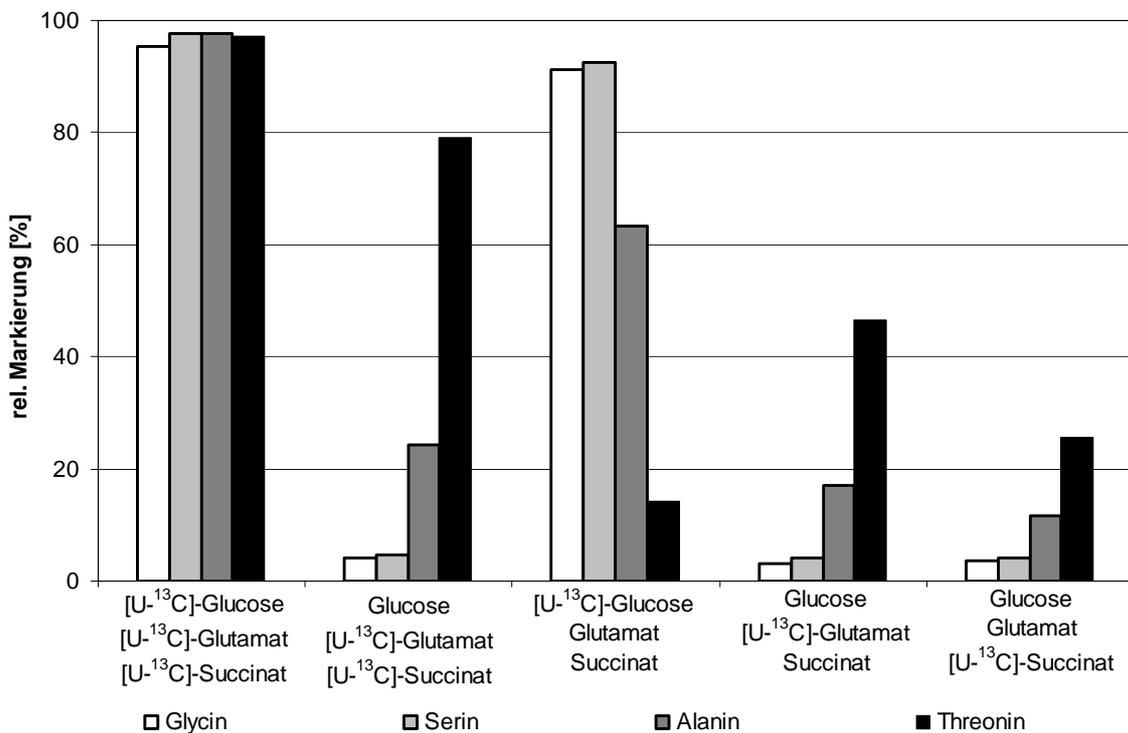
Es wäre einerseits möglich, dass die Synthese von Serin und Glycin in *B. subtilis* stattdessen ausgehend von Pyruvat oder Threonin über O-Acetylserin als Zwischenstufe verläuft (Bell and Turner, 1976). Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die 3-Phosphoserin-Phosphatase-Funktion von einer anderen, unspezifischen Phosphatase übernommen wird. Die Tatsache, dass für *Bacillus subtilis* bei Deletion des Gens *SerA* des Serinsynthesewegs eine Auxotrophie für Serin und Glycin nachgewiesen wurde (Sonenshein et al., 2002), legt aber die zweite der beiden vorgestellten Hypothesen nahe. Um eine genaue Bilanzierung der intrazellulären Vorgänge durchführen zu können, musste diese Fragestellung jedoch zunächst geklärt werden.

Dazu wurden Markierungsstudien bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat durchgeführt, bei denen unterschiedliche Kombinationen an [U-<sup>13</sup>C]-markierten Substraten eingesetzt wurden. Über die Bestimmung der relativen <sup>13</sup>C-Anreicherung der Aminosäuren Serin, Glycin, Alanin und Threonin kann festgestellt werden, welchen Anteil die verschiedenen Substrate an der Bildung der Vorläufermoleküle dieser Aminosäuren haben. Alanin und Threonin besitzen dabei die zu ihren Vorläufermolekülen Pyruvat und Oxalacetat identischen, relativen Markierungsanteile, da sich bei der Synthese dieser beiden Aminosäuren das Kohlenstoffgerüst der Precursor nicht verändert.

Abbildung 6.1.6 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Markierungsanteile von Glycin, Serin, Alanin und Threonin für unterschiedliche Kombinationen von markierten Substraten. Es zeigt sich, dass alle gemessenen Aminosäuren bei vollständiger Markierung aller Kohlenstoffquellen mit 95 - 98 % identische Anteile an relativer Markierung aufweisen (Abb. 6.1.6). Dieser Wert entspricht nicht dem theoretisch zu erwartenden Wert von 100%, was durch eine Verschleppung von nicht markiertem Kohlenstoff aus der Vorkultur in die

Hauptkultur zu begründen ist. In diesem Fall wurden die Vorkulturen nicht getrennt voneinander auf unterschiedlich markierten Medien aufgezogen, der Start sämtlicher Hauptkulturen erfolgte durch Animpfen aus derselben Vorkultur, welche mit unmarkiertem Medium durchgeführt wurde. Angeimpft wurde mit einer Start-OD zwischen 0,02 und 0,05, was 1 - 2,5 % der End-OD bei der Zellernte entspricht. Daher sind die hier dargestellten, prozentualen Angaben aufgrund der Einstreuung aus der Vorkultur mit einer Genauigkeit von +/- 2,5 % zu betrachten.

Lediglich 63 % der Markierung des Alanins, bzw. Pyruvats stammt aus der aufgenommenen Glucose, etwa 16 % entstammen dem Succinat und etwa 11 % dem Glutamat (Abb. 6.1.6). Die Markierung des Threonins und damit des Oxalacetats dagegen setzt sich zu insgesamt fast 80 % aus Succinat und Glutamat zusammen (Abb. 6.1.6), wobei der Anteil an Markierung aus Glutamat allein bereits über 45 % beträgt. Die beiden Aminosäuren Serin und Glycin zeigen identische Markierungsmuster, was gut mit der aufgrund von Literaturangaben über *Corynebacterium glutamicum* und *Bacillus subtilis* aufgestellten Hypothese zu vereinbaren ist, dass es sich bei dem Vorläufer der Glycin-Synthese um Serin handelt (Simic et al., 2002; Sonenshein et al., 2002).



**Abb. 6.1.6:** Graphische Darstellung der relativen Markierungsanteile von Glycin, Serin, Alanin und Threonin bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat unter Verwendung verschiedener, vollständig <sup>13</sup>C-markierter Substrate.

Des Weiteren weichen die Markierungsverteilungen des Serins und Glycins deutlich von denen des Pyruvats und Threonins ab. Eine mögliche Synthese von Serin aus Threonin kann nahezu ausgeschlossen werden, da markiertes Succinat und Glutamat gemeinsam lediglich 5 % der  $^{13}\text{C}$ -Markierung des Serins verursachen. Ebenso unwahrscheinlich ist eine Beteiligung von Pyruvat an der Serinsynthese, da an dessen Markierungsgehalt Glutamat und Succinat zusammen einen Anteil von 25 % besitzen.

Die Markierung des Serins und Glycins dagegen entstammt zu über 90 % der Glucose, der Rest verteilt sich etwa gleichermaßen auf Succinat und Glutamat (Abb. 6.1.6). Der hohe Anteil der Glucose an der Markierungsverteilung macht ein Vorläufermolekül weiter vorne in der Glykolyse wahrscheinlich. Es kann somit angenommen werden, dass die Synthese von Serin ausgehend von 3-Phosphoglycerat über den in Abbildung 6.1.5 dargestellten Syntheseweg verläuft. Auch wenn bislang keine funktionelle 3-Phosphoserin-Phosphatase in *Bacillus subtilis* nachgewiesen wurde, existiert doch eine ganze Reihe weiterer ORFs, die vermutlich für Enzyme mit Phosphatase-Funktion kodieren könnten (Sonenshein et al., 2002). Somit lassen sich bereits erste Schlussfolgerungen im Bezug auf intrazelluläre Flussverteilungen ziehen. Die Zugabe von Succinat und Glutamat als Substrate legt eine Speisung des Tricarbonsäurezyklus durch diese beiden Substrate nahe. Etwa 37% des Pyruvat entstammen nach den hier vorliegenden Daten aus den Reaktionen über Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Pyruvat-Kinase (Yoshida et al., 2001), sowie der Reaktion über das Malatenzym (Doan et al., 2003). Insgesamt stammen etwa 14 % des Kohlenstoffs im Oxalacetat aus der Glucose, was bedeutet, dass *Bacillus subtilis* auch in Anwesenheit von Glutamat und Succinat den Tricarbonsäurezyklus über Pyruvat und Acetyl-CoA auffüllen muss. Literaturangaben zufolge ist die durch Acetyl-CoA aktivierte Pyruvat-Carboxylase zum Wachstum auf Glucose notwendig (Diesterhaft and Freese, 1973), über ihre Aktivität unter den hier vorliegenden Bedingungen lassen sich aus diesen Daten jedoch keine Erkenntnisse gewinnen.

Der große Anteil der Glucose an der Markierung des Serins und Glycins legt die Vermutung nahe, dass die metabolischen Flüsse der unteren Glykolyse fast ausschließlich in Richtung des Phosphoenolpyruvats laufen und nur eine geringe Reversibilität zeigen.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse konnte nunmehr ein hinreichend genaues Modell des Zentralstoffwechsels von *Bacillus subtilis* aufgestellt werden.

## 6.2 Physiologie von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose

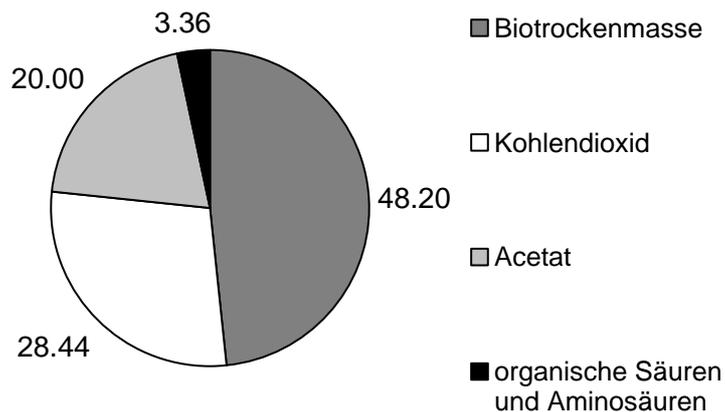
### 6.2.1 Wachstum und Produktbildung von *B. subtilis* 168 bei Nutzung von Glucose als Kohlenstoffquelle

*Bacillus subtilis* 168 zeigt aufgrund seines fakultativ anaeroben Stoffwechsels bei Wachstum auf Glucose einen charakteristischen Überflussmetabolismus unter aerober Bildung von Fermentationsprodukten wie organischen Säuren. Unter diesen Bedingungen wächst *B. subtilis* 168 mit einer relativ hohen, spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,64 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  (Tab. 6.2.1), was einer Verdopplungszeit von ca. einer Stunde entspricht. Dabei nimmt *B. subtilis* 168 etwa 9 mmol Glucose pro g Biotrockenmasse und Stunde auf und produziert 5,3 mmol Acetat pro g Biotrockenmasse und Stunde (Tab. 6.2.1). Der Ausbeutekoeffizient für Acetat liegt bei ca. 0,58 mol Acetat pro mol Glucose (Tab. 6.2.1).

**Tab. 6.2.1:** Spezifische Raten für Wachstum, Substrataufnahme und Produktbildung sowie Ausbeutekoeffizienten von Biomasse und organischen Säuren für *B. subtilis* 168 auf Glucose als Kohlenstoffquelle bei 37°C.

<b>Spezifische Wachstumsrate <math>\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}</math></b>	0,64
<b>Spezifische Raten <math>[\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}]</math></b>	
Glucose	-9,1
Acetat	5,3
Lactat	0,0
Pyruvat	0,1
<b>Ausbeutekoeffizienten</b>	
Acetat $[\text{mol mol}^{-1}]$	0,581
Lactat $[\text{mol mol}^{-1}]$	0,000
Pyruvat $[\text{mol mol}^{-1}]$	0,015
$\alpha$ -Ketoglutarat $[\text{mol mol}^{-1}]$	0,005
Biotrockenmasse $Y_{x/s} \text{ [g mmol}^{-1}\text{]}$	0,069

Unter den hier vorliegenden, aeroben Bedingungen konnte eine recht starke Bildung von Acetat, in geringerem Maße auch von Pyruvat beobachtet werden (Tab. 6.2.1). Die Bildung anderer Produkte, wie Lactat, Glycerin, Acetoin oder 2,3-Butandiol wurde nicht beobachtet. Die Betrachtung der prozentualen Verteilung des Kohlenstoffs in der Biomasse, sowie den gebildeten Produkten zeigt, dass unter den hier vorliegenden Bedingungen 20 % des mit der Glucose aufgenommenen Kohlenstoffs als Acetat ausgeschleust wird (Abb. 6.2.1).



**Abb. 6.2.1:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] des Kohlenstoffs in den gebildeten Produkten von *B. subtilis* 168 auf Glucose bei 37°C.

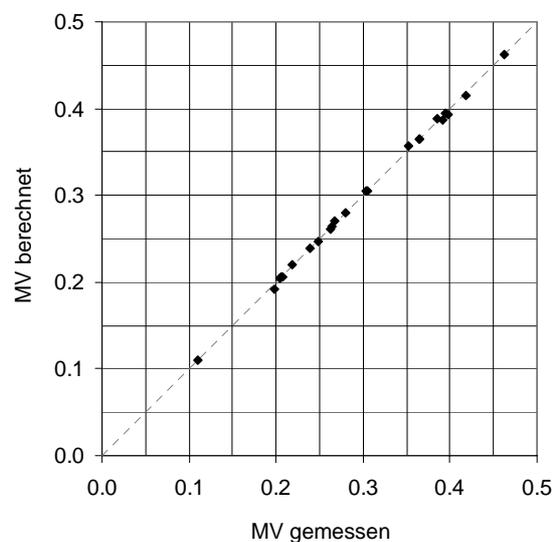
Fast die Hälfte des mit der Glucose aufgenommenen Kohlenstoffs wird zur Biomassebildung verbraucht, etwa 28 % des Kohlenstoffs fließt in die Produktion von CO<sub>2</sub>. Der sehr hohe Anteil der Acetatbildung an der Gesamtaktivität des Metabolismus von *Bacillus subtilis* lässt sich durch das Vorhandensein eines respiro-fermentativen Stoffwechsels erklären, wie er bei fakultativ anaeroben Mikroorganismen unter aeroben Bedingungen bei Vorhandensein ausreichend großer Mengen an Substrat bereits nachgewiesen werden konnte (Frick and Wittmann, 2005).

Etwa 3,4 % des aufgenommenen Kohlenstoffs werden über die Exkretion von Pyruvat, Aminosäuren und organischen Säuren des Tricarbonsäurezyklus wieder ausgeschieden. Der Anteil des Kohlenstoffs im Pyruvat beträgt allerdings weniger als 1 % des Gesamtkohlenstoffs in den gebildeten Produkten, so dass nicht von einer aktiven Pyruvatproduktion gesprochen werden kann.

Die Bilanzierung des Kohlenstoffs der gebildeten Produkte und der aufgenommenen Glucose ergab eine Wiederfindung von 96,1 %, womit sichergestellt ist, dass die Analytik alle relevanten Produkte erfasste.

## 6.2.2 Metabolische Flussanalyse von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose

Die Markierungsdaten der proteinogenen Aminosäuren, sowie die stöchiometrischen Daten für die metabolische Flussanalyse wurden aus Parallelkultivierungen im Schüttelkolben gewonnen, welche die gleiche stöchiometrische Charakteristik wie die Kultivierungen im Bioreaktor zeigten. Für die Berechnung der intrazellulären Flüsse wurde die minimale Abweichung zwischen experimentell bestimmten und simulierten Massenisotopomerfraktionen als Kriterium verwendet (Abb. 6.2.2; Anhang Tab. 9.3.1).



**Abb. 6.2.2:** Graphische Auftragung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS-Messung bestimmten Massenisotopomerverteilungen (MV) proteinogener Aminosäuren für die Kultivierung von *B. subtilis* 168 auf  $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose. Die exakten numerischen Werte der berechneten und experimentell bestimmten Massenisotopomerverteilungen sind in Tab. 9.3.1 im Anhang aufgeführt.

In den Simulationen wurde eine recht gute Anpassung der gemessen und vom Modell berechneten Markierungsverteilungen der proteinogenen Aminosäuren erreicht (Abb. 6.2.2; Anhang Tab. 9.3.1.), der experimentelle Fehler der Massenisotopomerfraktionen lag im Durchschnitt bei ca. 0,15 %.

Die intrazellulären Flussverteilungen bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose als Substrat sind in der metabolischen Flusskarte (Abb. 6.2.3) dargestellt. Tabelle 9.2.1 im Anhang enthält zusätzlich sämtliche berechneten intrazellulären Flüsse einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz.



*Bacillus subtilis* nimmt Glucose über das PTS-System auf, wobei die aufgenommene Glucose zu Glucose-6-P aktiviert wird. Bei Wachstum auf Glucose wird etwa ein Drittel des Glucose-6-P in den Pentosephosphatweg eingeschleust, während zwei Drittel über die Glucosephosphat-Isomerase in die Glykolyse fließen (Abb. 6.2.3). In Bakterien wird der Fluss in den Pentosephosphatweg bei Wachstum auf Glucose generell mit Werten zwischen 20 % und 30 % der Glucoseaufnahme beziffert (Sauer et al., 1996), so dass diese Werte gut mit Literaturangaben zu vereinbaren sind. Der über die Glucose-6-P-Dehydrogenase in den Pentosephosphatweg eingeschleuste Kohlenstoff fließt wiederum zu etwa 66 % über die Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen in die Pools von Fructose-6-P und Glycerinaldehyd-3-P zurück, lediglich ein Drittel wird zur Biomassebildung benötigt. Des Weiteren zeigen die Glucosephosphat-Isomerase sowie die Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen des Pentosephosphatwegs eine nur sehr geringe Reversibilität (Abb. 6.2.3), was darauf schließen lässt, dass der Bedarf an NADPH die treibende Kraft für den Fluss über die Glucose-6-P-Dehydrogenase ist und nicht der Bedarf an Ribosephosphat und Erythrose-4-P. Über die Regulation des Pentosephosphatwegs in *Bacillus subtilis* ist zwar wenig bekannt, jedoch zeigten Transkriptomuntersuchungen, dass die Gene dieses Stoffwechselweges offenbar nicht durch Glucose induziert werden, sondern konstitutiv exprimiert sind (Blencke et al., 2003). Da in allen Mikroorganismen die Glucose-6-P-Dehydrogenase eines der wichtigsten Enzyme zur NADPH-Synthese ist (Wood, 1986a; Wood, 1986b), legt dies den Schluss nahe, dass der metabolische Fluss über die Glucose-6-P-Dehydrogenase in *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit vom NADPH-Gehalt der Zelle reguliert ist.

Zur Energiegewinnung dient *Bacillus subtilis* Sauerstoff als bevorzugter, terminaler Elektronenakzeptor. Unter anaeroben Bedingungen ist *Bacillus subtilis* jedoch ebenso in der Lage, rein fermentativen Stoffwechsel unter Bildung typischer Fermentationsprodukte wie Acetat, Lactat und Acetoin zu betreiben (Nakano et al., 1997). Daher zeigt *Bacillus subtilis* bei Glucoseüberschuss einen typischen Überflussmetabolismus unter oxidativer Bildung von Acetat (Dauner et al., 2001b). Dies äußert sich unter den hier vorliegenden Bedingungen darin, dass fast 70 % des Acetyl-CoA in die Bildung von Acetat fließen. Die starke Acetatbildung beruht dabei einerseits auf der CcpA-vermittelten Induktion der für die Enzyme der Acetatbildung kodierenden Gene (Grundy et al., 1993a), andererseits könnte aber auch die Funktion des Tricarbonsäurezyklus als Bottleneck aufgrund begrenzter, respiratorischer Aktivität der Grund dafür sein. Die kaum vorhandene Ausschleusung von Pyruvat deutet weniger auf eine limitierende Funktion der Pyruvat-Dehydrogenase und einen Stau auf Stufe des Pyruvats hin, sondern eher auf einen Stau auf Stufe des Acetyl-CoA. Im Gegensatz zur Acetatbildung scheint die Bildung von Acetoin und Lactat nicht am Überflussmetabolismus

beteiligt zu sein, da diese Produkte unter den hier vorliegenden Bedingungen nicht gebildet werden (Abb. 6.2.3). Dies ist gut mit Literaturdaten zu vereinbaren, die zeigen, dass die an der Bildung von Lactat und Acetoin beteiligten Enzyme bei Wachstum auf Glucose erst bei Eintritt in die stationäre Phase und Substratverarmung exprimiert werden (Renna et al., 1993; Yashphe et al., 1978). Da die Reaktionen der Lactat- und Acetoinbildung sämtlich reversibel sind, dienen diese ebenso wie die Metabolisierung von Acetat über die Acetyl-CoA-Synthetase zur Verwertung alternativer Substrate, sobald energiereiche Kohlehydrate aufgebraucht sind.

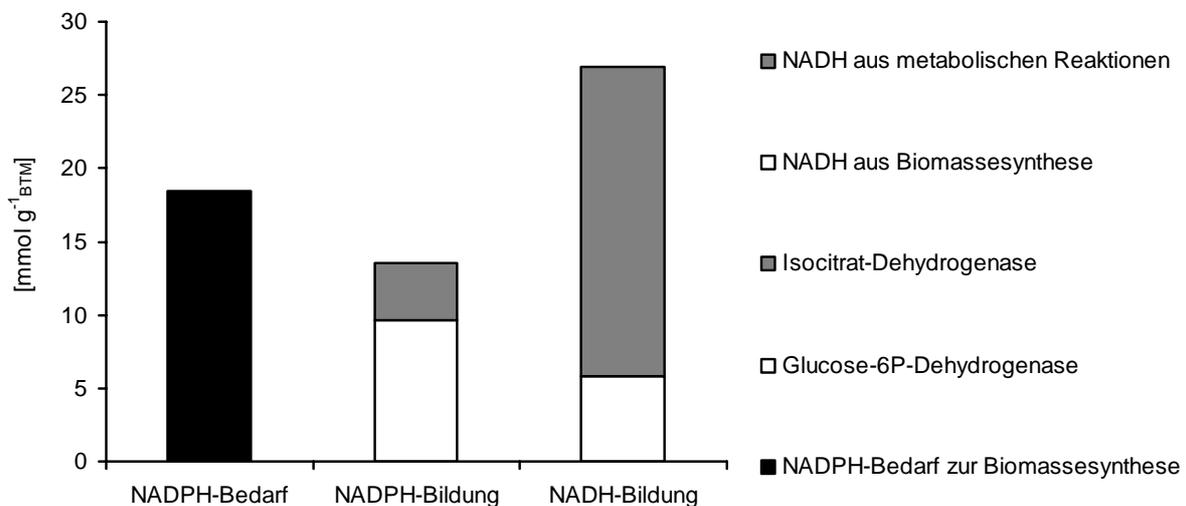
Auffällig ist weiterhin der relativ hohe Fluss über die Pyruvat-Carboxylase in den Oxalacetat/Malat-Pool (Abb. 6.2.3). Diese Reaktion bildet zusammen mit dem Fluss von Oxalacetat über die PEP-Carboxykinase in den Phosphoenolpyruvat-Pool und von dort über die Pyruvat-Kinase in den Pyruvat-Pool einen als „Futile Cycle“ bezeichneten Substratzyklus. Ein solcher Zyklus zwischen Pyruvat-Knoten und TCA wurde für den Zentralstoffwechsel von *Bacillus subtilis* bereits beschrieben (Dauner et al., 2001b), doch hinsichtlich der physiologischen Funktion solcher Substratzyklen existieren verschiedene, bislang nicht vollständig verifizierte Annahmen (Fell, 1997; Portais and Delort, 2002).

In Bezug auf die hier gemachten Beobachtungen erscheint eine Funktion dieses Substratzyklus zur Pufferung der intrazellulären Konzentrationen an PEP und Pyruvat durchaus wahrscheinlich. Phosphoenolpyruvat wird zur Aufnahme von Glucose über das PTS benötigt, was im Falle eines plötzlichen Anstiegs der Konzentration an extrazellulärer Glucose ein Absinken der PEP-Konzentration in der Zelle und somit eine Aktivitätserniedrigung aller nachfolgenden Reaktionen nach sich ziehen könnte. Die hier beobachtete Aktivität der PEP-Carboxykinase erklärt sich somit aus ihrer Funktion als Auffüllreaktion des PEP-Pools zur Vermeidung von Instabilitäten innerhalb des metabolischen Netzwerks. Der Umstand, dass der Fluss aus dem Succinat/Fumarat-Pool in den Oxalacetat/Malat-Pool lediglich etwa 6 % über dem Bedarf an Oxalacetat für die Biomassebildung liegt (Abb. 6.2.3), hat zur Folge, dass der Nettofluss aus dem PEP/Pyruvat-Pool in den Oxalacetat-Pool in etwa den Wert des Flusses über die Citrat-Synthase von 0,27 besitzt (Abb. 6.2.3). Hieraus lässt sich folgern dass die Pyruvat-Carboxylase eine wichtige Funktion zur Bereitstellung von Oxalacetat für die Synthese von Citrat und somit zur Aufrechterhaltung der Gesamtaktivität des Tricarbonsäurezyklus besitzt. In ihrer Gesamtheit fungieren die beiden Reaktionen der PEP-Carboxykinase und der Pyruvat-Carboxylase vermutlich als regulatorisches Element auf metabolischer Ebene, über welches die intrazellulären Poolgrößen von Phosphoenolpyruvat und Pyruvat relativ schnell an veränderte Wachstumsbedingungen angepasst werden können.

Grundsätzlich kann *Bacillus subtilis* mittels verschiedener Enzyme des Zentralmetabolismus NADPH generieren, so z.B. über die Reaktionen der Glucose-6-P-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs, sowie die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (KEGG etc.).

Des Weiteren verfügt *Bacillus subtilis* über ein NADP-abhängiges Malatenzym, welches zur NADPH-Generierung beitragen könnte (Doan et al., 2003). Das verwendete Modell lässt jedoch keine Rückschlüsse über die Aktivität des Malatenzyms zu, da Aufgrund der Notwendigkeit zur Definition von Nettoflussrichtungen für das Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose ein Nettofluss ausgehend vom Pyruvat-Pool zum Oxalacetat/Malat-Pool angenommen wurde. Es ist daher möglich, dass Teil des für die Reaktion der PEP-Carboxykinase bestimmten Flusses zwischen dem Oxalacetat-Pool und dem PEP/Pyruvat-Pool in der Zelle tatsächlich über das Malatenzym läuft anstatt über die PEP-Carboxykinase. Wie hoch dieser Anteil ist, lässt sich allerdings anhand der hier vorliegenden Daten nicht abschätzen.

Die Bilanzierung von NADPH ergibt, dass *Bacillus subtilis* unter diesen Bedingungen 50 % seines NADPH-Bedarfs über den oxidativen Zweig des PPP deckt, weitere 20 % werden über die Isocitrat-Dehydrogenase zur Verfügung gestellt (Abb. 6.2.4).

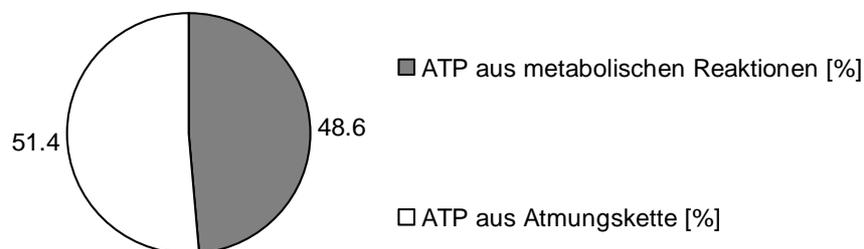


**Abb. 6.2.4:** Darstellung des für die Biomassesynthese benötigten, anhand von Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) berechneten Bedarfs an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ], der maximal gebildeten Menge an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.2.3) NADPH-generierender Reaktionen, sowie der maximal gebildeten Menge an NADH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.2.3) der NADH-generierenden Reaktionen und der Synthese von Biomassebestandteilen (Dauner and Sauer, 2001) bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose.

Zusätzlich kann *Bacillus subtilis* überschüssiges NADH über Transhydrogenasen in NADPH umwandeln (Sauer et al., 1998).

Aus Literaturdaten über Bildung und Verbrauch von NADH und NADPH für einzelne Zellbestandteile wie Proteine, DNA etc. [ $\text{mmol g}^{-1}$ ] und der Berechnung des Gehalts an Zellbestandteilen pro Gramm Biotrockenmasse in Abhängigkeit von der Wachstumsrate (Dauner et al., 2001a) wurde für die hier geltenden, physiologischen Bedingungen eine aus der Biomassesynthese resultierende NADH-Bildung von  $5,8 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  bestimmt. Zusätzlich werden in den Reaktionen des Zentralmetabolismus  $21,1 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  NADH gebildet, so dass *B. subtilis* unter diesen Umständen insgesamt  $26,9 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  NADH zur Generierung von ATP in der Atmungskette sowie zur Umwandlung von NADH in NADPH über Transhydrogenasen zur Verfügung stehen (Abb. 6.2.4).

Der aufgrund der Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) für *Bacillus subtilis* bei Wachstum unter den hier vorliegenden Bedingungen berechnete ATP-Bedarf pro Gramm Biotrockenmasse beträgt  $49,9 \text{ [mmol g}^{-1}]$ . Die anhand der metabolischen Flüsse (Abb. 6.2.3) berechnete ATP-Bildung der an der Substratkettenphosphorylierung beteiligten Reaktionen des Zentralmetabolismus liegt mit insgesamt  $24,2 \text{ [mmol g}^{-1}]$  deutlich unter dem Bedarf, so dass insgesamt etwa 51 % des ATP-Bedarfs über die Atmungskette gedeckt werden müssen (Abb. 6.2.5).



**Abb. 6.2.5:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] von Atmungskette und ATP-bildenden Reaktionen des Zentralmetabolismus an der Gesamtbildung von ATP bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose.

Unter der Annahme, dass in der Atmungskette zwei mol ATP pro mol NADH generiert werden, würden somit zur ATP-Synthese in der Atmungskette unter diesen Bedingungen insgesamt  $12,8 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  NADH verbraucht. Abzüglich dieses Bedarfs verblieben somit noch  $14,2 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  NADH zur Umwandlung in NADPH über Transhydrogenasen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Stöchiometrie der Atmungskette variabel ist, die Ausbeute zwischen einem und drei mol ATP pro mol NADH betragen kann und eine Bilanzierung von ATP somit lediglich näherungsweise erfolgen kann.

## 6.3 Physiologie von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose, Glutamat und Succinat

### 6.3.1 Wachstum und Produktbildung von *B. subtilis* 168 bei Nutzung von Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquelle

*B. subtilis* 168 wächst auf der Kombination aus Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquelle mit einer gegenüber dem Wachstum auf Glucose um ca. 26 % erhöhten spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,81 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  (Tab. 6.3.1). Dabei werden alle drei zur Verfügung stehenden Substrate aufgenommen, wobei die spezifische Glucoseaufnahme rate sogar noch ca. 10 % höher liegt als bei Wachstum auf Glucose als alleiniger C-Quelle (Tab. 6.3.1). Die Glutamataufnahmerate liegt mit  $4,2 \text{ [mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$  deutlich darunter, den geringsten Anteil hat die Succinataufnahmerate mit  $1,0 \text{ [mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$ .

**Tab. 6.3.1:** Spezifische Raten für Wachstum, Substrataufnahme und Produktbildung sowie Ausbeutekoeffizienten von Biomasse und organischen Säuren für *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquellen bei 37°C.

<b>Spezifische Wachstumsrate <math>\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}</math></b>	0,81
<b>Spezifische Raten <math>\text{[mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}</math></b>	
Glucose	-10,0
Glutamat	-4,2
Succinat	-1,0
Acetat	8,3
Lactat	2,5
Pyruvat	0,6
<b>Ausbeutekoeffizienten</b>	
Acetat $\text{[mol mol}^{-1}\text{]}$	0,829
Lactat $\text{[mol mol}^{-1}\text{]}$	0,248
Pyruvat $\text{[mol mol}^{-1}\text{]}$	0,061
$\alpha$ -Ketoglutarat $\text{[mol mol}^{-1}\text{]}$	0,063
Biotrockenmasse $Y_{x/s} \text{ [g mmol}^{-1}\text{]}$	0,075

In Anbetracht des unterschiedlichen Kohlenstoffanteils der metabolisierten Substrate deckt *Bacillus subtilis* somit bei Wachstum auf Glucose, Glutamat und Succinat seinen Gesamtbedarf an Kohlenstoff in der Summe zu 70,6 % über die Aufnahme von Glucose (Tab. 6.3.1). Von den anderen beiden beteiligten Substraten hat Glutamat an der molaren Menge an insgesamt aufgenommenem Kohlenstoff mit 24,7 % einen deutlich höheren Anteil als Succinat mit lediglich 4,7 %. Betrachtet man die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G^0$  [kJ mol<sup>-1</sup>] der beteiligten Substrate von 2872 [kJ mol<sup>-1</sup>] für Glucose, 1599 [kJ mol<sup>-1</sup>] für Succinat und 2315 [kJ mol<sup>-1</sup>] für Glutamat (Roels, 1983), so ergibt sich, dass *Bacillus subtilis* unter diesen Bedingungen durch Aufnahme von Glucose alleine bereits 71,7 % der in den Substraten insgesamt enthaltenen Energiemenge aufnimmt. Dagegen enthalten Glutamat 24,3 % und Succinat lediglich 4 % der insgesamt aufgenommenen Energiemenge.

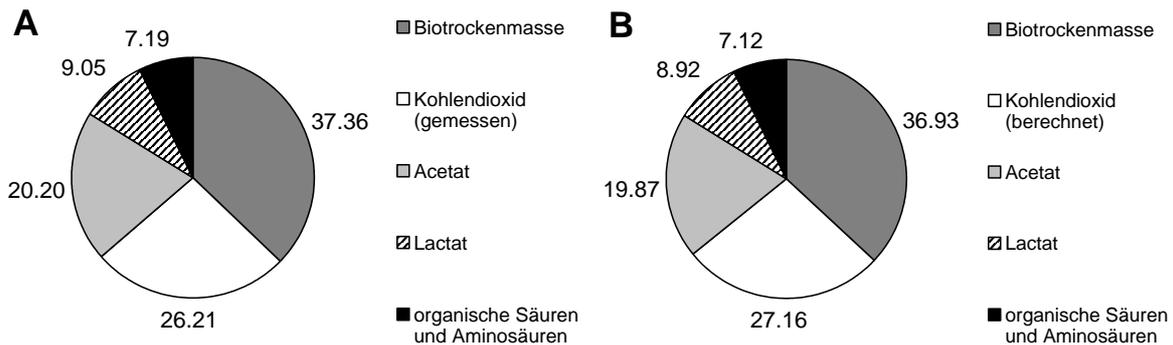
Die Biomasseausbeute pro mol aufgenommener Glucose ist bei Vorhandensein von Succinat und Glutamat geringfügig höher als bei Glucose als alleiniger C-Quelle, allerdings beträgt die Ausbeute pro aufgenommenem Mol Kohlenstoff auf die Gesamtheit der Substrate bezogen bei Wachstum auf Glucose 11,5 [g<sub>BTM</sub> C-mol<sup>-1</sup>], während sie auf Glucose, Glutamat und Succinat lediglich 8,8 [g<sub>BTM</sub> C-mol<sup>-1</sup>] beträgt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass unter den hier vorliegenden Bedingungen zusätzlich zu Acetat auch Lactat und Pyruvat ausgeschleust werden (Tab. 6.3.1), was bei Wachstum auf Glucose nicht der Fall war.

Die Bestimmung der Kohlendioxidproduktion zur Berechnung der relativen Anteile des Kohlenstoffs in den gebildeten Produkten für das Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat (Abb. 6.3.1) erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten. Zunächst wurde wie für das Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose (Kap. 6.2.1) das in der Kultivierung im Bioreaktor gebildete CO<sub>2</sub> über die Abgasanalyse gemessen. Zusätzlich erfolgte die Berechnung des Kohlendioxidanteils unter den gebildeten Produkten durch Summation der anhand der metabolischen Flussanalyse (Abb. 6.3.3) ermittelten Bildung von Kohlendioxid in den Decarboxylierungsreaktionen des Zentralmetabolismus, sowie über die Stöchiometrie der CO<sub>2</sub>-Bildung bei der Biomassesynthese (Kap. 5.4.7).

Die Massenbilanz für Kohlenstoff zeigte mit einer Wiederfindung von 93,7 % eine nicht ganz so gute Wiederfindung wie bei den Untersuchungen auf Glucose allein. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in der komplexeren Analytik begründet, da unter diesen Bedingungen mehr Substrate und Produkte quantifiziert werden müssen als dies bei der Kultivierung auf Glucose als alleinigem Substrat der Fall war.

Die Berechnung der Kohlendioxidproduktion anhand der metabolischen Flüsse (Abb. 6.3.1 B) ergab eine Verteilung des Kohlenstoffs in den gebildeten Produkten, welche nahezu identisch mit der anhand der Abgasanalytik ermittelten Produktverteilung ist (Abb. 6.3.1 A) ist. Der Wert für den relativen Anteil an Kohlendioxid an dem in den gebildeten Produkten

insgesamt enthaltenen Kohlenstoff liegt 3,6% über dem mittels Abgasanalyse ermittelten Anteil (Abb. 6.3.1 A, B), während die Abweichungen der relativen Anteile in den übrigen Produkten zwischen 1 und 2 % betragen. Dies zeigt, dass eine Berechnung der Kohlendioxidbildung anhand der molaren Stoffflüsse die Messung von CO<sub>2</sub> mittels Abgasanalytik zwar nicht unbedingt ersetzen kann, bei Tracerkultivierungen im Schüttelkolben jedoch eine geeignete Methode darstellt, um den relativen Anteil der Kohlendioxidbildung an den gebildeten Produkten näherungsweise abzuschätzen.

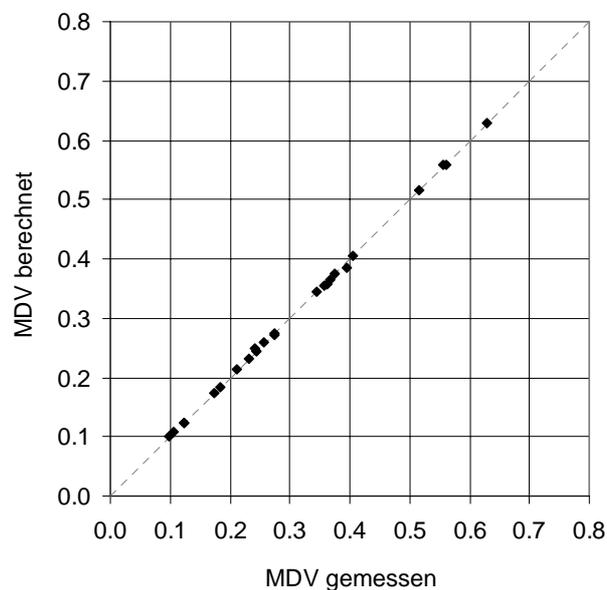


**Abb. 6.3.1:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] des Kohlenstoffs in den gebildeten Produkten von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat bei 37°C. Der relative Anteil von CO<sub>2</sub> wurde einerseits durch die Abgasanalyse der Kultivierung im Bioreaktor bestimmt (Abb. A), andererseits aufgrund der in der metabolischen Flussanalyse ermittelten Kohlendioxidbildungsraten decarboxylierender Enzyme (Abb. 6.3.3) und der Stöchiometrie der CO<sub>2</sub>-Bildung bei der Biomassessynthese berechnet (Abb. B).

Bezüglich der relativen Anteile des Kohlenstoffs in den gebildeten Produkten (Abb. 6.3.1), wurde bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat für Acetat ein Anteil von 20 % beobachtet, welcher dem Anteil bei Wachstum auf Glucose entspricht. Etwa 9 % des Kohlenstoffs der gebildeten Produkte sind in Lactat enthalten, zusätzlich werden ca. 2 % des aufgenommenen Kohlenstoffs als Pyruvat ausgeschleust. Der Anteil an Biomasse ist mit ca. 37 % des Gesamtkohlenstoffanteils der Produkte deutlich geringer als bei Wachstum auf Glucose als einziger C-Quelle. Diese Beobachtungen lassen bereits darauf schließen, dass nicht Glucose allein das Auftreten eines Überflussmetabolismus induziert. Weitere Substrate, wie organische Säuren und Aminosäuren unterstützen vermutlich die oxidative Bildung von Fermentationsprodukten auf metabolischer Ebene.

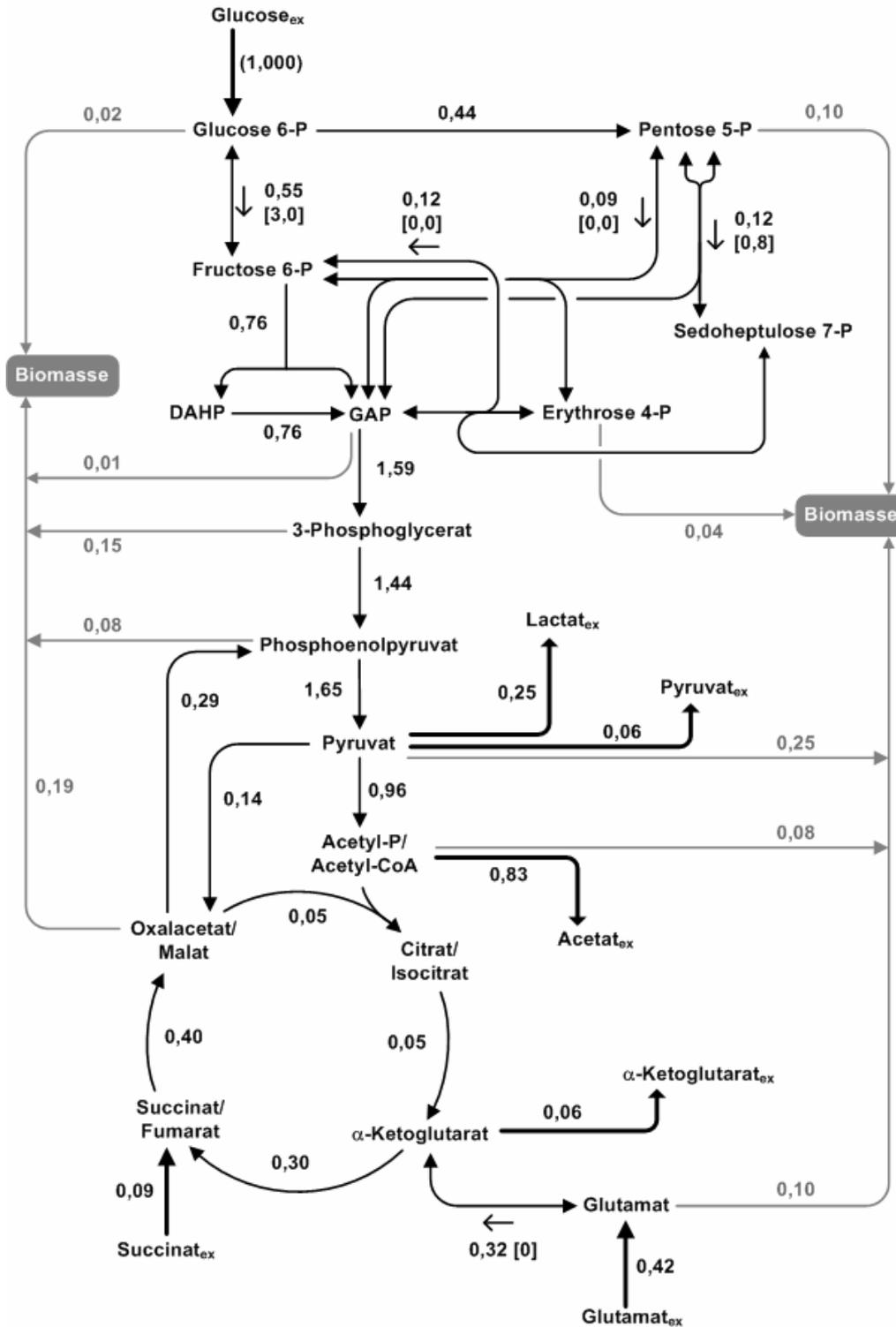
### 6.3.2 Metabolische Flussanalyse von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose, Glutamat und Succinat

Analog zu den vorherigen Simulationen für  $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose wurde in diesem Fall für die Berechnung der intrazellulären Flüsse über die minimale Abweichung zwischen experimentell bestimmten und simulierten Massenisotopomerfraktionen  $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose als markiertes Substrat verwendet, während Succinat und Glutamat unmarkiert eingesetzt wurden. Auch in diesem Fall betrug der experimentelle Fehler der Massenisotopomerfraktionen im Durchschnitt ca. 0,15 % und es wurde auch eine recht gute Anpassung der gemessen und vom Modell berechneten Markierungsverteilungen der proteinogenen Aminosäuren erreicht (Abb. 6.3.2; Anhang Tab. 9.3.2).



**Abb. 6.3.2:** Graphische Auftragung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS-Messung bestimmten Massenisotopomerverteilungen (MV) proteinogener Aminosäuren für die Kultivierung von *B. subtilis* 168 auf  $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose, Succinat und Glutamat. Die exakten numerischen Werte der berechneten und experimentell bestimmten Massenisotopomerverteilungen sind in Tab. 9.3.2 im Anhang aufgeführt.

Die intrazellulären Flussverteilungen bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose als Substrat sind in der metabolischen Flusskarte (Abb. 6.3.3) dargestellt. Tabelle 9.2.1 im Anhang enthält die exakten numerischen Werte der berechneten Flüsse einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz.



**Abb. 6.3.3:** Metabolische Flusskarte von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat bei 37°C. Sämtliche Flüsse sind als dimensionslose Relativwerte angegeben, normiert auf die Glucoseaufnahme (1,000). Bei als reversibel definierten Reaktionen sind jeweils die Nettoflüsse angegeben, sowie die Reversibilitäten in eckigen Klammern. Die exakten, numerischen Werte einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz sind Tab. 9.2.1 im Anhang zu entnehmen.

Graue Pfeile: Flüsse zur Bildung von Biomasse; dicke Pfeile: extrazelluläre Flüsse;

Index „ex“: extrazelluläre Metabolite

Fast die Hälfte des Glucose-6-P fließt bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat in den Pentosephosphatweg, lediglich etwa 55 % fließen in die Glykolyse (Abb. 6.3.3). Der beobachtete Fluss über die Glucose-6-P-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ist damit deutlich höher als bei Metabolisierung von Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle. Die Flüsse über die Transketolase und die Transaldolase zeigen ebenfalls eine erhöhte Aktivität, insgesamt fließen von dem in den Pentosephosphatweg eingeschleusten Kohlenstoff etwa 69 % wieder über Fructose-6-P und Glycerinaldehyd-3-P zurück in die Glykolyse. Dies hat zur Folge, dass die Flüsse der unteren Glykolyse nicht durch die veränderte Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg beeinträchtigt werden. Mit Ausnahme der Glucosephosphat-Isomerase ließ sich für die Reaktionen der Glykolyse kein Effekt durch die zusätzliche Metabolisierung von Glutamat und Succinat beobachten. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die zusätzliche Metabolisierung von Glutamat und Succinat eine Erhöhung der Gesamtaktivität des Pentosephosphatwegs bewirkt, während für die Glykolyse keine eindeutige Änderung der Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die beobachtete stöchiometrische Veränderung der Flussverteilungen zwischen Glucosephosphat-Isomerase und Glucose-6-P-Dehydrogenase könnte aus einer erhöhten Aktivität des Pentosephosphatwegs allein resultieren, ohne dass sich dazu die Aktivität der glykolytischen Enzyme ändern müsste.

Aus dem sehr hohen Fluss in den Pentosephosphatweg sowie aufgrund der in Relation zum Wachstum auf Glucose geringfügig erhöhten Reversibilität der Glucose-6-P-Isomerase lässt sich schließen, dass die Metabolisierung der Glucose mehr der Energiegewinnung in Form von Reduktionsäquivalenten dient als der Bereitstellung von Metaboliten für die Biomassesynthese. Diese Folgerung wird einerseits durch die Beobachtung gestützt, dass der Fluss aus Glucose-6-P in die Biomassesynthese unter diesen Bedingungen geringer ist als bei Wachstum auf Glucose allein. Zum anderen zeigt die Bilanzierung des NADPH, dass unter diesen Bedingungen etwa 62 % des NADPH-Bedarfs allein über den oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs gedeckt werden (Abb. 6.3.4). Dies lässt auf eine Regulation der Aktivität des Pentosephosphatwegs von *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit des NADPH-Gehalts schließen.

Ebenso wie für die Enzyme der unteren Glykolyse konnte auch für die Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion keine Zunahme der Aktivität bei Addition von Glutamat und Succinat beobachtet werden, während der Fluss von Pyruvat über die Pyruvat-Carboxylase in den Tricarbonsäurezyklus um den Faktor 2,7 verringert ist (Abb. 6.3.3). Bei Wachstum auf Glucose muss die Bereitstellung von Oxalacetat für die Biomassesynthese und die Versorgung des Tricarbonsäurezyklus mit Metaboliten über die anaplerotische Reaktion der

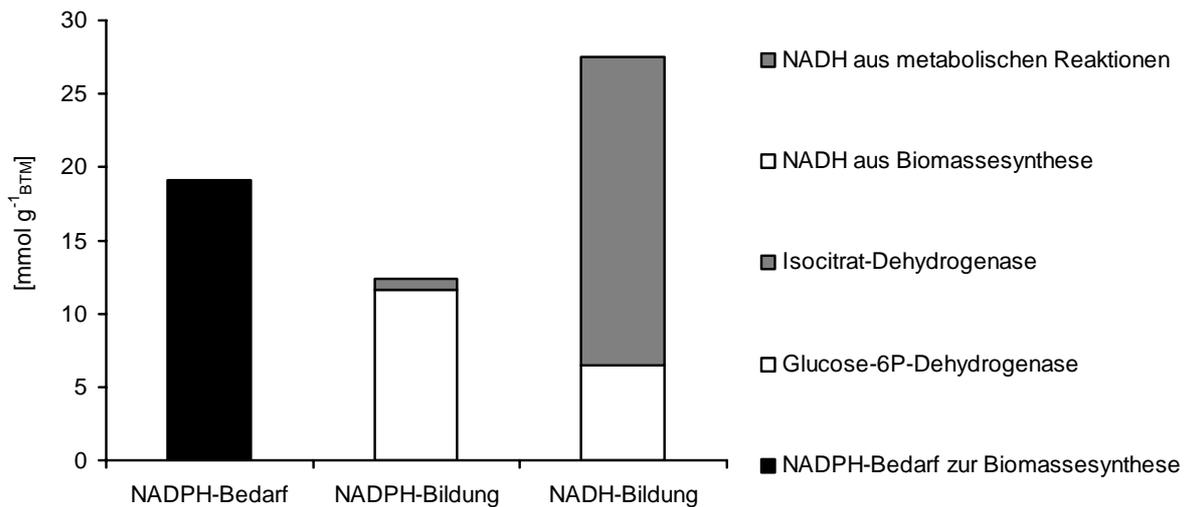
Pyruvat-Carboxylase gewährleistet werden. Bei zusätzlicher Metabolisierung von Glutamat und Succinat ist die zusätzliche Versorgung des Oxalacetat-Pools durch Carboxylierung von Pyruvat weniger wichtig, dennoch reicht die Zugabe von Succinat und Glutamat offenbar nicht aus, den Bedarf an Oxalacetat vollständig auszugleichen. Die beiden zusätzlichen Substrate bewirken jedoch eine Erhöhung der Aktivität der PEP-Carboxykinase um das Dreifache. Die Tatsache, dass es sich dabei um das einzige Enzym in *Bacillus subtilis* handelt, welches einen metabolischen Fluss ausgehend vom Tricarbonsäurezyklus in Richtung der Glykolyse katalysieren kann, lässt vermuten, dass die beobachtete Reversibilität der Glucosephosphat-Isomerase auf die Speisung des Zellstoffwechsels mit Glutamat und Succinat über Gluconeogenese zurückzuführen ist.

Die Exkretion von Pyruvat in das Kulturmedium steigt bei Zusatz von Glutamat und Succinat stark an, was auf einen metabolischen Stau auf der Stufe des Pyruvats schließen lässt. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass (i) unter diesen Bedingungen Lactatbildung auftritt, was bei *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Glucose allein nur unter anaeroben Bedingungen oder Eintritt in die stationäre Phase vorkommt (Yashphe et al., 1978) und (ii) der metabolische Fluss über die Pyruvat-Dehydrogenase keine Erhöhung zeigt. Das über die Pyruvat-Dehydrogenase gebildete Acetyl-CoA fließt bei zusätzlicher Aufnahme von Glutamat und Succinat fast ausschließlich in die Bildung von Acetat, während die Aktivität der Reaktionen des vorderen Tricarbonsäurezyklus extrem stark reduziert ist. Die starke Acetatbildung ist unter diesen Bedingungen vermutlich notwendig, um bei einer solch geringen Aktivität des vorderen Tricarbonsäurezyklus den Fluss durch die Glykolyse aufrecht zu erhalten und die dabei auftretende Substratkettenphosphorylierung zur Energiegewinnung zu nutzen.

Der mit Abstand stärkste Einfluss der zusätzlichen Verstoffwechslung von Glutamat und Succinat zeigt sich in den von der Citrat-Synthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase katalysierten Reaktionen, deren Aktivität gegenüber dem Wachstum auf Glucose allein um das 5-fache abgenommen hat. Dies hat weitreichende Auswirkungen auf den gesamten Zellstoffwechsel, so hat die Isocitrat-Dehydrogenase an der NADPH-Bildung nur noch einen Anteil von etwa 4 % (Abb. 6.3.4). Dieser Verlust an NADPH-Bildung muss daher durch den oxidativen Zweig des Pentosephosphatwegs, das Malatenzym, oder die Bildung von NADPH aus NADH über die Transhydrogenase ausgeglichen werden.

Diese Aktivitätsänderung des vorderen Tricarbonsäurezyklus resultiert vorwiegend aus der Aufnahme von Glutamat allein, da der Fluss ausgehend von Glutamat zu Succinat und weiter zu Malat/Oxalacetat gegenüber dem Wachstum auf Glucose allein um mehr als das Doppelte zugenommen hat. Ein negativer Effekt auf die Reaktionen des Citratzyklus durch Succinat erscheint daher unwahrscheinlich. Die Synthese von Glutamat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat

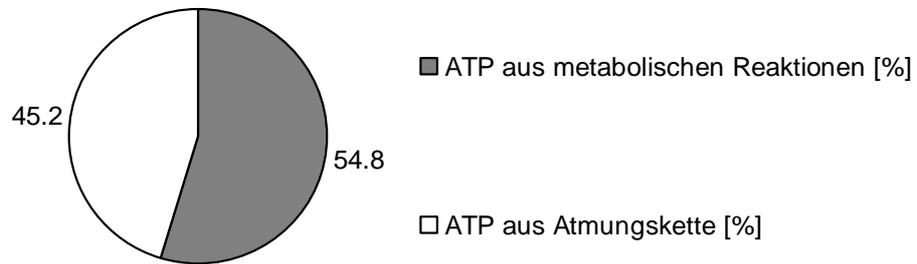
konnte nicht beobachtet werden. Die Aufnahme von Glutamat hat somit auf die Reaktionen des vorderen Citratzyklus einen reprimierenden Effekt, welcher nach den bislang vorliegenden Daten sowohl auf metabolischer als auch auf regulatorischer Ebene stattfinden könnte. Die vergleichende Untersuchung des Transkriptom von *Bacillus subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose sowie Glucose, Glutamat und Succinat wird darüber weiteren Aufschluss geben.



**Abb. 6.3.4:** Darstellung des für die Biomassesynthese benötigten, anhand von Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) berechneten Bedarfs an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ], der maximal gebildeten Menge an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.3.3) NADPH-generierender Reaktionen, sowie der maximal gebildeten Menge an NADH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.3.3) der NADH-generierenden Reaktionen und der Synthese von Biomassebestandteilen (Dauner and Sauer, 2001) bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat.

Der Bedarf an NADPH für die Synthese von Zellbestandteilen liegt etwa  $6,7 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  über der durch die NADPH-generierenden Reaktionen des Zentralmetabolismus gewonnenen Menge (Abb. 6.3.4). Insgesamt werden jedoch in den metabolischen Reaktionen und bei der Synthese von Zellbestandteilen bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat  $27,5 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  NADH gebildet (Abb. 6.3.4). Der anhand von Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) berechnete Bedarf an ATP für die Biomassesynthese beträgt unter diesen Bedingungen  $53,4 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$ , welcher über die Reaktionen des Zentralmetabolismus mit einer ATP-Bildung von  $29,3 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  zu  $54,8 \%$  gedeckt werden kann (Abb. 6.3.5). Der restliche Anteil von  $45,2 \%$  muss über die Atmungskettenphosphorylierung bereitgestellt werden, wozu bei Annahme einer ATP-Ausbeute von  $2 \text{ mol ATP pro mol NADH}$  etwa  $12 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  NADH benötigt werden. Somit verbleiben zum Ausgleich des NADPH-Bedarfs über Transhydrogenasen noch  $15,4 \text{ [mmol}$

$g_{\text{BTM}}^{-1}$ ], wobei dieser Wert jedoch aufgrund der Variabilität der Stöchiometrie der Atmungsketten-phosphorylierung lediglich näherungsweise zu betrachten ist.



**Abb. 6.3.5:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] von Atmungskette und ATP-bildenden Reaktionen des Zentralmetabolismus an der Gesamtbildung von ATP bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat.

## 6.4 Vergleichende Transkriptomstudien von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose und Glucose/Succinat/Glutamat

In Analogie zu der metabolischen Flussanalyse wurde für das Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose, sowie Glucose, Succinat und Glutamat eine Analyse der Genexpression mittels DNA-Microarrays durchgeführt. Diese erfolgte durch O. Schilling am Lehrstuhl für allgemeine Mikrobiologie der Universität in Göttingen und umfasste sämtliche Gene, die an der Kodierung der Enzyme des Zentralstoffwechsels beteiligt sind (Schilling et al., 2007). Die Charakterisierung der Genexpression erfolgte mittels Bestimmung der relativen Expression als Quotient aus den Signalintensitäten der auf dem Chip enthaltenen Gene für die zu vergleichenden Bedingungen. Die relativen, metabolischen Flüsse lassen sich jedoch nicht direkt mit der Genexpression beteiligter Enzyme vergleichen. Zur Korrelation mit der Genexpression wurden aus den relativen Flüssen (Abb. 6.2.3, Abb. 6.3.3) die molaren Flüsse [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] für die beteiligten Reaktionen bei Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose, sowie Glucose, Succinat und Glutamat berechnet. Diese sind in Tab. 6.4.1 und Tab. 6.4.2 der relativen Expression beteiligter Gene gegenübergestellt.

Die Expression der glykolytischen Gene, sowie des *ptsG*-Operons zeigt bei Zugabe von Succinat und Glutamat als Substrat keine signifikante Änderung, was sich ebenfalls in den beobachteten, metabolischen Flüssen der Glykolyse und der Glucoseaufnahme widerspiegelt (Tab. 6.4.1). Das Operon *ptsGHI*, welches das zur Aufnahme von Glucose und anderer Zucker benötigte Phosphotransferasesystem kodiert, unterliegt einer glucosespezifischen Induktion mittels transkriptioneller Antitermination (Stülke et al., 1997). Dies erklärt die unveränderte Funktionalität des PTS-Systems, da die Glucosekonzentration im Medium unter beiden Bedingungen identisch war.

Im Gegensatz zu den Enzymen des Pentosephosphatwegs (siehe unten) zeigen die Enzyme der Glykolyse sowohl gleich bleibende Aktivität, als auch unveränderte Expressionslevel bei Zugabe von Succinat und Glutamat. Dies resultiert aus der Tatsache, dass die glykolytischen Enzyme, welche reversible Reaktionen katalysieren in *Bacillus subtilis* konstitutiv exprimiert sind (Ludwig et al., 2001). Die Gene für die Phosphofruktokinase (*pfkA*), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gapA*) und Pyruvat-Kinase (*pyk*) werden durch Glucose induziert (Ludwig et al., 2001), was aufgrund der Verfügbarkeit von Glucose in beiden Medien der Fall ist. Eine zusätzliche Regulation der enzymatischen Aktivität der glykolytischen Enzyme in Abhängigkeit anderer Metabolite erscheint aufgrund der hier gemachten Beobachtungen sehr unwahrscheinlich und wurde auch bislang nicht in der Literatur beschrieben.

**Tab. 6.4.1:** Relative Expression und korrespondierende metabolische Flüsse für die Gene von Glucoseaufnahme, Glykolyse, Pentosephosphatweg, Pyruvat-Dehydrogenase und Überfluss-metabolismus. Die relative Expression bezeichnet den Quotienten aus den Werten der Genexpression (Exp.-Ratio) bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose/Succinat/Glutamat (GSE) und Glucose (Glc). Die metabolischen Flüsse sind als molare Flüsse [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] der beteiligten Reaktionen unter den beiden zu vergleichenden Bedingungen angegeben.

ORF	Exp.-Ratio		abs. Fluss [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]		Beschreibung
	GSE / Glc	Glc	Glc	GSE	
<i>ptsG</i>	0,9	9,1	10,0		Phosphotransferase-System
<i>pgi</i>	1,1	5,9	5,5		Glucose-6-Phosphat-Isomerase
<i>pfkA</i>	1,1	3,6	3,8		6-Phosphofruktokinase
<i>fbaA</i>	1,2	7,2	7,6		Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase
<i>tpiA</i>	1,2	7,2	7,6		Triosephosphate-Isomerase
<i>gapA</i>	1,1				Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase I
<i>pgk</i>	1,2	14,9	15,9		Phosphoglycerat-Kinase
<i>pgm</i>	1,1				Phosphoglycerat-Mutase
<i>eno</i>	1,4	13,7	14,4		Enolase
<i>pyk</i>	1,2	14,1	16,5		Pyruvat-Kinase
<i>zwf</i>	1,2				
<i>zwf-2</i>	1,1	3,0	4,4		Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
<i>gntZ</i>	1,2	3,0	4,4		6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
<i>rpe</i>	1,0	-	-		Epimerase
<i>ywIF</i>	1,4				
<i>tkt</i>	1,1	0,8	1,2		Transketolase (Reaktion I)
		0,5	0,9		Transketolase (Reaktion II)
<i>ywjH</i>	1,1	0,8	1,2		Transaldolase
<i>pdhA</i>	1,6				
<i>pdhB</i>	1,6				
<i>pdhC</i>	1,3	8,6	9,6		Pyruvat-Dehydrogenase
<i>pdhD</i>	1,3				
<i>alsS</i>	9,3				$\alpha$ -Acetolactat-Synthase
<i>alsD</i>	3,8	0,0	0,0		$\alpha$ -Acetolactat-Decarboxylase
<i>ldh</i>	1,1	0,0	2,5		Lactat-Dehydrogenase
<i>pta</i>	1,3				Phosphotransacetylase
<i>ackA</i>	3,0	5,3	8,3		Acetat-Kinase

**Tab. 6.4.2:** Relative Expression und korrespondierende metabolische Flüsse für die Gene von Citratzyklus, Gluconeogenese, Pyruvat-Carboxylase, sowie das Malatenzym. Die relative Expression bezeichnet den Quotienten aus den Werten der Genexpression (Exp.-Ratio) bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose/Succinat/Glutamat (GSE) und Glucose (Glc). Die metabolischen Flüsse sind als absolute Flüsse [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] der beteiligten Reaktionen unter den beiden zu vergleichenden Bedingungen angegeben.

ORF	Exp.-Ratio		abs. Fluss [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]		Beschreibung
	GSE / Glc		Glc	GSE	
<i>citZ</i>	0,2		2,5	0,5	Citrat-Synthase
<i>citB</i>	0,1		2,5	0,5	Aconitase
<i>icd</i>	0,5				Isocitrat-Dehydrogenase
<i>odhA</i>	0,6				$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (E1-UE)
<i>odhB</i>	0,7				$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (E2-UE)
<i>sucC</i>	0,5		1,6	3,0	Succinyl-CoA-Synthetase ( $\beta$ -UE)
<i>sucD</i>	0,6				Succinyl-CoA-Synthetase ( $\alpha$ -UE)
<i>sdhA</i>	0,8				Succinat-Dehydrogenase (Flavoprotein-UE)
<i>sdhB</i>	0,8		1,6	4,0	Succinat-Dehydrogenase (Fe-S-Protein)
<i>sdhC</i>	0,9				Succinat-Dehydrogenase (Cytochrom b558)
<i>citG</i>	1,0		1,6	4,0	Fumarat-Hydratase
<i>mdh</i>	0,6		n.b.	n.b.	Malat-Dehydrogenase*
<i>pckA</i>	0,9		0,9	2,9	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
<i>pckA-2</i>	0,9				
<i>pycA</i>	0,7		3,3	1,4	Pyruvat-Carboxylase
<i>pycA-2</i>	0,5				
<i>malS</i>	0,9		-	-	Malatenzym
<i>fbp</i>	0,7		-	-	Fructose-1,6-Bisphosphatase
<i>gapB</i>	0,9		-	-	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase II
<i>gapB-2</i>	0,9				
<i>dctP</i>	0,6		-	1,0	Succinat-Aufnahme
<i>gltP</i>	1,0		-	4,2	Glutamat-Aufnahme
<i>gltT</i>	1,3				

UE: Untereinheit

\*: n.b. = nicht bestimmbar

Für den Pentosephosphatweg lässt sich im Gegensatz zur Glykolyse bezüglich der molaren Flüsse eine eindeutige Aktivitätsänderung feststellen. Der metabolische Fluss über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase steigt bei Addition von Succinat und Glutamat um 47% (Tab. 6.4.1). Die in den beiden vorigen Kapiteln gemachte Beobachtung, dass die Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg  $\Phi_{PPP}$  sich von 0,34 bei Wachstum auf Glucose allein zu 0,44 bei Addition von Glutamat und Succinat verschiebt, resultiert somit nicht aus einer verringerten Aktivität der Glykolyse, sondern ausschließlich aus einer erhöhten Aktivität des oxidativen Zweigs des Pentosephosphatwegs. Eine signifikante Änderung in den Expressionsmustern der am Pentosephosphatweg beteiligten Gene konnte jedoch nicht beobachtet werden (Tab. 6.4.1). Dies deutet zum einen auf eine sehr hohe, katalytische Elastizität der Enzyme des Pentosephosphatwegs hin, zum anderen scheinen die Enzyme dieses Stoffwechselweges unter den hier vorliegenden Bedingungen nicht durch die Expression reguliert zu sein. Über die Regulation der Gene des Pentosephosphatwegs ist zwar bislang noch sehr wenig bekannt, doch wurde bereits nachgewiesen, dass die Expression der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf*) von der Glucosekonzentration im Medium nicht beeinflusst werden (Blencke et al., 2003). Die Ursache für die Erhöhung der metabolischen Aktivität liegt vermutlich im gestiegenen NADPH-Bedarf bei Addition von Glutamat und Succinat (Kapitel 6.3.2). Der dafür verantwortliche Regulationsmechanismus scheint nach den hier vorliegenden Daten jedoch nicht auf der Ebene der Transkription zu liegen, sondern auf metabolischer Ebene über eine eventuell erhöhte Bereitstellung glykolytischer Metabolite mittels Gluconeogenese.

Die bei zusätzlicher Metabolisierung von Succinat und Glutamat beobachtete Lactatbildung wird nicht durch eine signifikante Erhöhung der Expression unterstützt (Tab. 6.4.1). Offenbar scheint die Lactat-Dehydrogenase (*ldh*) unter beiden Bedingungen konstitutiv exprimiert zu sein und die Enzymaktivität auf metabolischer Ebene durch den Pyruvatlevel beeinflusst zu werden. Eine Induktion der Lactat-Dehydrogenase wird vorwiegend für anaerobe Bedingungen angenommen, während die Expression dieses Enzyms nachgewiesenermaßen unabhängig von seinem Substrat Pyruvat ist (Yashphe et al., 1978). Im Gegensatz zu der Lactatbildung zeigen die Gene für die Enzyme der Acetoinbildung eine deutlich gesteigerte Expression, allerdings konnte für keine der beiden untersuchten Bedingungen Acetoinbildung in signifikanter Menge nachgewiesen werden (Tab. 6.4.1). Die beiden Gene für die Acetolactat-Synthase (*alsS*) und die Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*) sind in einem gemeinsamen Operon (*alsSD*) organisiert, deren Expression durch das Regulatorprotein AlsR reguliert wird (Renna et al., 1993). Die Akkumulation von Acetat im Kulturmedium führt Literaturdaten zufolge zu einer Induktion des *alsSD*-Operons (Cruz Ramos et al., 2000;

Turinsky et al., 2000). Dies erklärt die erhöhte Expression bei Addition von Glutamat und Succinat, da unter diesen Bedingungen auch verstärkt Acetat gebildet wurde. Allerdings wurde Acetoinbildung auch in anderen Arbeiten bislang nur für die stationäre Phase von *Bacillus subtilis* nachgewiesen (Renna et al., 1993). Dies könnte bedeuten, dass die Acetoinbildung durch die Akkumulation von Acetat zum Zeitpunkt der Zellernte erst begonnen hatte. Die einsetzende Acetoinbildung als Folge der Induktion des *alsSD*-Operons wäre dann aufgrund der zu diesem Zeitpunkt noch sehr niedrigen extrazellulären Konzentration von Acetoin nicht detektierbar.

Die Transkriptdaten zeigen, dass die Expressionslevel der einzelnen Komponenten des Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes (*pdhABCD*) bei Addition von Glutamat und Succinat zwar schwach, aber signifikant erhöht sind (Tab. 6.4.1). Diese Beobachtung wird von einem ebenfalls schwach erhöhten metabolischen Fluss über die Pyruvat-Dehydrogenase begleitet. Das *pdhABCD*-Operon wird über einen bislang unbekanntem Mechanismus durch Glucose induziert, andere Signale zur Induktion des Pyruvat-Dehydrogenasekomplexes wurden bislang nicht identifiziert (Blencke et al., 2003). Eine Ursache für die leichte Erhöhung des metabolischen Flusses könnte ein Stau auf Stufe des Pyruvats sein, da bei Addition von Glutamat und Succinat zusätzlich zur Lactatbildung auch die Akkumulation von extrazellulärem Pyruvat beobachtet wurde (Kap. 6.3).

Der erhöhte, metabolische Fluss in die Acetatbildung bei Addition von Glutamat und Succinat wird durch die Transkriptanalyse bestätigt (Tab. 6.4.1). Dabei zeigt sich jedoch für die Acetat-Kinase (*ackA*) eine wesentlich stärkere Erhöhung des Expressionslevels als für die Phosphotransacetylase (*pta*). In den meisten Bakterien sind die Gene für die Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase in einem Operon organisiert, in *Bacillus subtilis* jedoch befinden sie sich auf völlig unterschiedlichen Positionen des Bakterienchromosoms. Dennoch wurde für beide Gene eine CcpA-vermittelte Induktion durch Glucose nachgewiesen (Presecan-Siedel et al., 1999). Untersuchungen an *E. coli* zeigten, dass Acetylphosphat eine globale Signalfunktion besitzt und die Expression verschiedener Gene reguliert (McCleary et al., 1993). Acetylphosphat speichert deutlich mehr Energie ( $\Delta G^0 = -43,3 \text{ [kJ mol}^{-1}\text{]}$ ) als ATP ( $\Delta G^0 = -30,5 \text{ [kJ mol}^{-1}\text{]}$ ) und ist damit ein wichtiger Metabolit, um die Gewinnung von ATP über die Acetat-Kinase zu ermöglichen (Wolfe, 2005). Dies könnte auf eine zusätzliche, positive Regulation der Acetat-Kinase über Acetylphosphat als Produkt der Phosphotransacetylase bei Addition von Glutamat und Succinat hindeuten.

Der Anteil an Pyruvat, der über die Pyruvat-Carboxylase in den Oxalacetat-Pool eingeschleust wird, ist bei zusätzlicher Aufnahme von Succinat und Glutamat deutlich geringer als bei Wachstum auf Glucose allein (Tab. 6.4.2). Dies wird durch die verringerte Expression der beiden Isoenzyme der Pyruvat-Carboxylase, *pycA* und *pycA-2* bei Addition

von Glutamat und Succinat gestützt. Wenn Glucose als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, muss *Bacillus subtilis* vermutlich einen nicht unerheblichen Teil des Pyruvat-Pools nutzen, um über die Pyruvat-Carboxylase den Oxalacetat-Pool des Tricarbonsäurezyklus aufzufüllen. Wenn Succinat und Glutamat vorhanden sind, scheint die anaplerotische Reaktion weniger wichtig zu sein. Auf welchem Mechanismus die Regulation der Pyruvat-Carboxylase beruht, ist bislang noch unbekannt. Aufgrund der hier gemachten Beobachtungen scheint die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase in erster Linie von der Verfügbarkeit von TCA-Metaboliten abzuhängen. Möglicherweise ist dieses Enzym konstitutiv exprimiert und verfügt dabei über eine sehr hohe Elastizität, so dass Veränderungen im Oxalacetat-Pool die Aktivität dieser Reaktion über das chemische Gleichgewicht beeinflussen.

Für die Enzyme des Tricarbonsäurezyklus, welche die Reaktionen von Oxalacetat über Citrat und Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat katalysieren, konnte eine fünffache Abnahme der Expression beobachtet werden (Tab. 6.4.2). Exakt diese Verringerung um den Faktor fünf wurde auch in den metabolischen Flüssen über diese Enzyme beobachtet. Damit lässt sich für die Gene der Citrat-Synthase (*citZ*) und Aconitase (*citB*) ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression und der Enzymaktivität festhalten. Da die Reaktion über die Citrat-Synthase nach der Michaelis-Menten-Kinetik verläuft (Shepherd and Garland, 1969), ist ihre Aktivität direkt von der Enzymkonzentration abhängig. Dies würde bedeuten, dass diese Reaktion hauptsächlich über die Transkriptebene gesteuert wird. Die Gene *citZ* und *citB* unterliegen einer CcpC-vermittelten, synergistischen Repression durch Glucose und Glutamat bzw. Ammonium (Blencke et al., 2006; Jourlin-Castelli et al., 2000). Diese Repression zeigt sich hier in der fünffach erniedrigten Expression dieser Gene, bedingt durch die Aufnahme von Glutamat. Dieses wird über Umwandlung zu  $\alpha$ -Ketoglutarat direkt in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust, was für die Zelle einen energetisch wesentlich günstigeren Weg der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Gewinnung bedeutet als die Synthese aus Glucose über Glykolyse, Pyruvat-Dehydrogenase und den Krebszyklus. Dies resultiert in einem deutlich erhöhten metabolischen Fluss von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Oxalacetat bei gleich bleibender Expression der beteiligten Enzyme. Diese Beobachtung konnte analog auch für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pckA*) gemacht werden, welche zur Gluconeogenese benötigt wird. Bei Wachstum auf Glucose unterliegt *pckA* der über das Regulatorprotein CcpN vermittelten Katabolitenrepression durch Glucose (Servant et al., 2005; Yoshida et al., 2001). Die Metabolisierung von Succinat und Glutamat zeigt sich jedoch in einem mehr als dreifach erhöhten metabolischen Fluss über dieses Enzym bei unveränderter Stärke der Expression (Tab. 6.4.2).

Die Expression der Transporter zur Aufnahme von Succinat (*dctP*) und Glutamat (*gltP*, *gltT*) wird nur schwach durch die Anwesenheit dieser beiden Substanzen beeinflusst, für den Succinat-Transporter lässt sich sogar eine leichte Abnahme der Expression bei Succinat und Glutamat beobachten (Tab. 6.4.2). Die Gene *dctP* und *gltP* unterliegen der CcpA-vermittelten Katabolitenrepression durch Glucose und sollten daher unter beiden hier untersuchten Bedingungen nur schwach exprimiert sein (Asai et al., 2000; Blencke et al., 2003). Dennoch lässt sich eine Aufnahme beider Substrate aus dem Medium beobachten, von welcher vor allem die Aufnahme von Glutamat gravierende Auswirkungen auf den gesamten Metabolismus besitzt. Der Effekt des Regulatorproteins CcpA auf die Aufnahme von Succinat und Glutamat wurde innerhalb dieser Arbeit durch Charakterisierung zweier unterschiedlicher *ccpA*-Deletionsmutanten weiter untersucht (Kap. 6.7).

## 6.5 Physiologie von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glutamat und Succinat

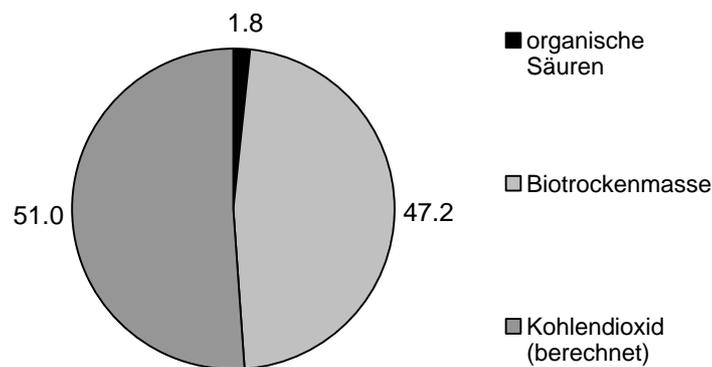
### 6.5.1 Wachstum und Produktbildung von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat als Kohlenstoffquelle

*B. subtilis* 168 wächst auf Succinat und Glutamat mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,47 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  deutlich langsamer als auf Glucose ( $\mu = 0,64 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ ) oder Glucose, Succinat und Glutamat ( $\mu = 0,81 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ ). Als Bezugsgröße für die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten (Tab. 6.5.1) wurde die Aufnahme von Glutamat gewählt. Die spezifische Aufnahmerate des Succinats liegt mit  $5,4 \text{ [mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$  zwar höher als die des Glutamats von  $4,8 \text{ [mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$  und beträgt somit 55 % der insgesamt aufgenommenen Menge an Substraten. Da Glutamat aber ein Kohlenstoffatom mehr besitzt, ergeben sich spezifische Kohlenstoffaufnahmeleistungen von  $19,5 \text{ [C-mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$  für Succinat und  $21,7 \text{ [C-mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$  für Glutamat.

**Tab. 6.5.1:** Spezifische Raten für Wachstum, Substrataufnahme und Produktbildung sowie Ausbeutekoeffizienten von Biomasse und organischen Säuren für *B. subtilis* 168 auf Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquellen bei 37°C. Für die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten wurde Glutamat als Bezugsgröße gewählt.

<b>Spezifische Wachstumsrate <math>\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}</math></b>	0,47
<b>Spezifische Raten <math>[\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}</math></b>	
Glutamat	-4,8
Succinat	-5,4
Acetat	0,0
Fumarat	0,0
$\alpha$ -Ketoglutarat	0,1
<b>Ausbeutekoeffizienten <math>[\text{mol mol}^{-1}_{\text{Glutamat}}]</math></b>	
Succinat $[\text{mol mol}^{-1}]$	-1,13
Fumarat $[\text{mol mol}^{-1}]$	0,01
Acetat $[\text{mol mol}^{-1}]$	0,01
$\alpha$ -Ketoglutarat $[\text{mol mol}^{-1}]$	0,02
Biotrockenmasse $[\text{g mmol}^{-1}_{\text{Glutamat}}]$	0,09

Außer einer geringen Menge  $\alpha$ -Ketoglutarat werden von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Succinat und Glutamat keine signifikanten Mengen an Überflusmetaboliten wie Acetat oder Pyruvat ausgeschieden, wie dies bei Vorhandensein von Glucose der Fall ist. Dies lässt sich gut mit der Kenntnis vereinbaren, dass die Gene für die fermentativen Stoffwechselwege durch Glucose induziert werden. Eine Induktion der Gene des Überflusstoffwechsels durch das Regulatorprotein CcpA findet unter den hier vorliegenden Bedingungen nicht statt (Stülke and Hillen, 1999; Stülke and Hillen, 2000; Tobisch et al., 1999). Die hier beobachtete, geringe Bildung von Acetat (Tab. 6.5.1) resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit eher aus einer geringen Grundaktivität der fermentativen Stoffwechselwege, anstatt aus einer Aktivierung der fermentativen Stoffwechselwege aufgrund regulatorischer Faktoren. Insgesamt fließt der mit den Substraten aufgenommene Kohlenstoff zu weniger als 2 % in die Produktion organischer Säuren (Abb. 6.5.1). Der restliche, in den Produkten enthaltene Kohlenstoff verteilt sich zu etwa gleichen Teilen auf Biomasse und Kohlendioxid (Abb. 6.5.1).



**Abb. 6.5.1:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] des Kohlenstoffs in den gebildeten Produkten bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glutamat und Succinat. Der relative Anteil von  $\text{CO}_2$  wurde aufgrund der in der metabolischen Flussanalyse ermittelten Kohlendioxidbildungsraten decarboxylierender Enzyme (Abb. 6.5.7), sowie über die Stöchiometrie der  $\text{CO}_2$ -Bildung bei der Biomassesynthese berechnet (Kap. 5.4.7).

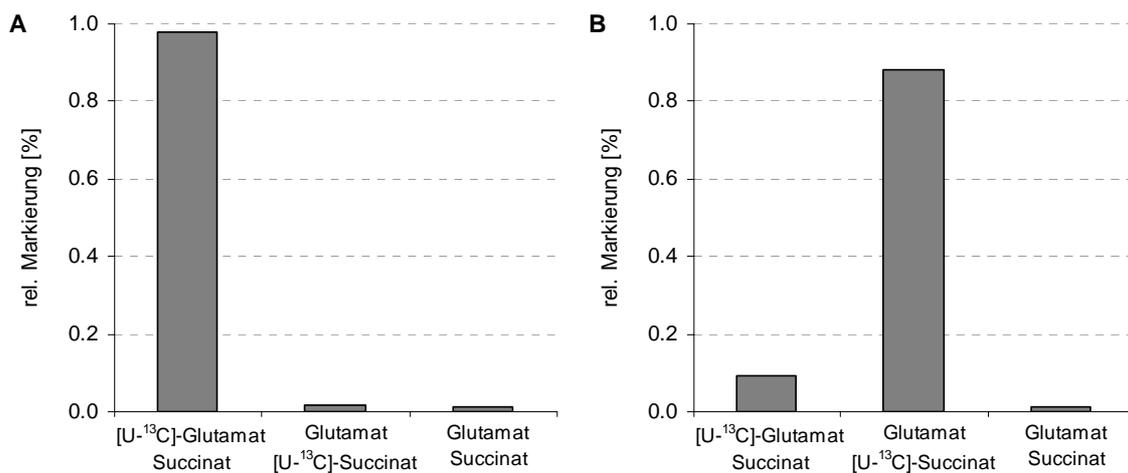
Bei den in Abb. 6.5.1 dargestellten Werten ist jedoch zu beachten, dass zur Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Bildung keine realen Messdaten aus der Abgasanalyse verwendet werden konnten. Die Berechnung der Kohlendioxidbildung erfolgte stattdessen aufgrund der metabolischen Flüsse (Abb. 6.5.7), sowie anhand von Literaturdaten über den stöchiometrischen Anteil der Kohlendioxidbildung bei der Synthese von Zellbestandteilen und den relativen Anteil verschiedener Zellbestandteile an der Gesamtbiomasse von *Bacillus subtilis*. Die verwendeten Literaturdaten stammen aus Kultivierungen von *Bacillus subtilis* auf Glucose als Substrat (Dauner and Sauer, 2001) und sind daher nur bedingt geeignet, eine Aussage über

den relativen Gehalt einzelner Zellbestandteile von *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Succinat und Glutamat zu treffen. Dies schlägt sich in einer vergleichsweise geringen Wiederfindung von 87,8 % für die Kohlenstoffmassenbilanz des Wachstums von *B. subtilis* auf Succinat und Glutamat nieder.

### **6.5.2 Experimentelles Design von Tracerexperimenten für die metabolische Flussanalyse auf Succinat und Glutamat**

Über die Transportsysteme für Dicarboxysäuren und deren Regulation in *Bacillus subtilis* ist zwar bislang noch wenig bekannt (Asai et al., 2000), jedoch wird angenommen, dass dieser Organismus über eine ganze Reihe sekundärer Carrier für die Aufnahme und Exkretion von Dicarboxysäuren erfolgt, welche einem H<sup>+</sup>- oder Na<sup>+</sup>-Symportmechanismus unterliegen (Ghei and Kay, 1973; Janausch et al., 2002). Daher musste zunächst sichergestellt werden, dass bei Verwendung markierter Substrate kein Austausch zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Succinat stattfindet. Ein Austausch zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Succinat würde eine Veränderung des Substratlabelings zur Folge haben und dadurch eine exakte Bilanzierung der Markierungsverteilung intrazellulärer Metabolite verhindern.

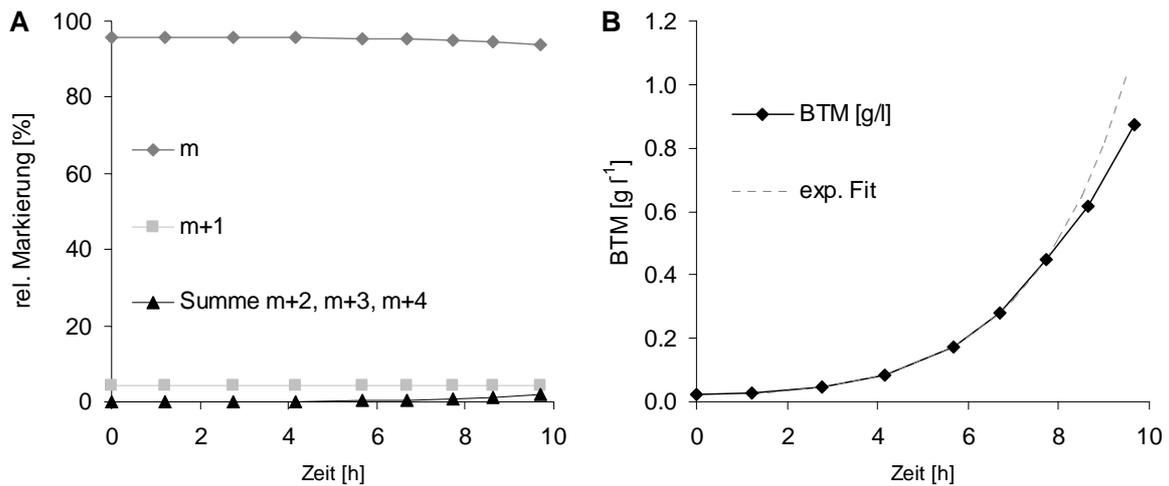
Nach 12-stündiger Kultivierung von *B. subtilis* 168 auf Glutamat und Succinat unter Verwendung von jeweils [U-<sup>13</sup>C]-Glutamat und unmarkiertem Succinat, unmarkiertem Glutamat und [U-<sup>13</sup>C]-Succinat, sowie unmarkiertem Glutamat und Succinat wurden die Markierungsverteilungen der extrazellulären Kohlenstoffquellen mittels GC/MS bestimmt (Abb. 6.5.2 A, B). Es zeigte sich, dass die relative Markierung des extrazellulären Glutamats bei Wachstum auf [U-<sup>13</sup>C]-Succinat und unmarkiertem Glutamat unverändert blieb (Abb. 6.5.2 A), woraus sich schließen lässt, dass unter den hier angelegten Bedingungen keine Exkretion von Glutamat in das Kulturmedium stattfindet. Für Succinat ließ sich jedoch bei Wachstum auf [U-<sup>13</sup>C]-Glutamat und unmarkiertem Succinat ein 10%-iger Anstieg der relativen Markierung über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg beobachten (Abb. 6.5.2 B).



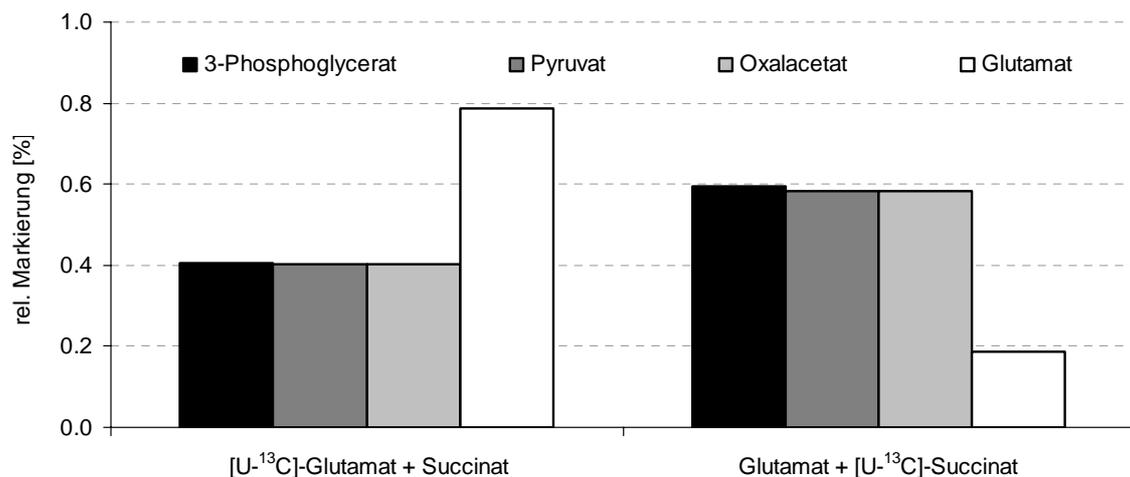
**Abb. 6.5.2:** Graphische Darstellung relativer Markierungsanteile [%] von extrazellulären Substraten bei Kultivierung von *B. subtilis* 168 auf Glutamat (A) und Succinat (B) auf Glutamat und Succinat. Beide Substrate wurden wechselseitig als vollständig <sup>13</sup>C-markierte, sowie unmarkierte Substanzen eingesetzt, die Kultivierungsdauer betrug 12 Stunden.

Um die Geschwindigkeit zu ermitteln, mit der der Austausch zwischen intrazellulärem, markiertem und extrazellulärem, unmarkiertem Succinat stattfindet, wurden in einer weiteren Kultivierung von *B. subtilis* 168 auf [U-<sup>13</sup>C]-Glutamat und unmarkiertem Succinat in Abständen von 30 min die relativen Anteile der verschiedenen Massenisotopomere extrazellulären Succinats gemessen und die Biomassekonzentration bestimmt (Abb. 6.5.3). Es zeigte sich während der exponentiellen Wachstumsphase eine sehr geringe Abnahme des Massenisotopomers m+0 um 0,6% (Abb. 6.5.3 A). Bei einer Kultivierungsdauer von 8 Stunden und einer Biotrockenmassekonzentration von 0,5 [g l<sup>-1</sup>] verlassen die Zellen die exponentielle Phase (Abb. 6.5.3 B). Erst ab diesem Punkt steigt der relative Anteil der Massenisotopomere m+1 bis m+4 auf eine Gesamtsumme von 1,5 % (Abb. 6.5.3 A). Für die exponentielle Wachstumsphase konnte somit ein zwar geringer, die Analytik der metabolischen Flussanalyse betreffend jedoch vernachlässigbar kleiner Rückfluss von intrazellulärem Succinat in das Kulturmedium festgestellt werden.

Da die Durchführung der metabolischen Flussanalyse von Pseudo-Steady-State Voraussetzungen ausgeht, in denen keine Veränderung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen stattfindet und die in mikrobiellen Kultivierungen ausschließlich für die exponentielle Wachstumsphase gelten, wurde für alle künftigen Kultivierungen eine maximale Biomassekonzentration von 0,5 [g l<sup>-1</sup>] festgelegt.



**Abb. 6.5.3:** Zeitlicher Verlauf der relativen Markierungsanteile [%] der Massenisotopomere des extrazellulären Succinats (A) sowie der Konzentration an Biotrockenmasse [g l<sup>-1</sup>] (B) bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Succinat und [U-<sup>13</sup>C]-Glutamat. Über den Zeitraum der ersten 6 Stunden der Kultivierung wurde die spezifische Wachstumsrate bestimmt und daraus ein theoretischer Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (exponentieller Fit) für das exponentielle Zellwachstum berechnet.



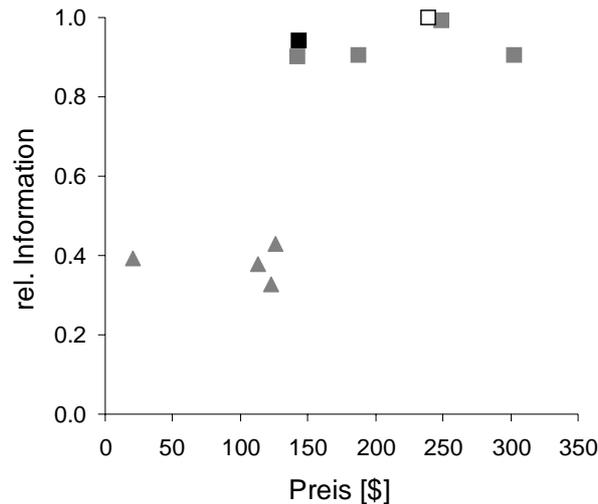
**Abb. 6.5.4:** Graphische Darstellung der relativen, anhand der GC/MS-Messung proteinogener Aminosäuren bestimmten Markierungsanteile intrazellulärer Metabolite bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glutamat und Succinat unter Verwendung verschiedener Kombinationen vollständig <sup>13</sup>C-markierter Substrate. Der Markierungsanteil des 3-Phosphoglycerats wurde aus Serin, der des Pyruvats aus Alanin und der des Oxalacetats aus Aspartat abgeleitet. Die Zellernte erfolgte bei einer Biotrockenmassekonzentration von 0,5 [g l<sup>-1</sup>].

Mittels Hydrolyse und GC/MS-Analytik der proteinogenen Aminosäuren, welche jeweils aus spezifischen Vorläufermetaboliten synthetisiert werden, lassen sich aus Kultivierungen auf wechselseitig [U-<sup>13</sup>C]-markiertem Succinat und Glutamat Rückschlüsse auf den Informationsgehalt dieser beiden Substrate ziehen (Abb. 6.5.4). Die Schlüsselmetabolite 3-

Phosphoglycerat, Pyruvat und Oxalacetat beziehen ihre Markierung zu 40 % aus Glutamat, 60 % entstammen dem Succinat (Abb. 6.5.4). Des Weiteren findet sich bei Wachstum auf voll markiertem Succinat auch ein Anstieg der relativen Markierung im Glutamat (Abb. 6.5.4). Das bedeutet, dass auch bei Nutzung von Glutamat als C-Quelle ein nicht unerheblicher Rückfluss von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat vorliegt. Die Messung der Labelings der extrazellulären Substrate im Kulturüberstand (Abb. 6.5.2) zeigt jedoch, dass das aus dem TCA stammende Glutamat nicht von der Zelle ausgeschieden wird, da sich keine Erhöhung des Glutamat-Labelings bei Verwendung von voll markiertem Succinat nachweisen ließ. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der aufgrund der Symmetrie von Succinat bevorzugte Einsatz von Glutamat als markiertem Substrat nur eine relativ schwache Änderung der Markierungsmuster intrazellulärer Aminosäuren verursachen sollte. Betrachtet man die spezifischen Aufnahmeraten von Succinat und Glutamat (Tab. 6.5.1), so zeigt sich, dass *B. subtilis* 168 in der Summe über beide Substrate etwa gleich viel Kohlenstoff aufnimmt.

Der Einsatz von markiertem Glutamat allein in Tracerexperimenten wäre daher vermutlich mit hohen Fehlerraten behaftet. Zur Bestimmung der geeigneten Substratmarkierung wurden Computersimulationen mittels eines von Tae Hoon Yang entwickelten mathematischen Modells durchgeführt, und die relative Änderung der Markierungsverhältnisse proteinogener Aminosäuren in Abhängigkeit der metabolischen Flüsse für unterschiedliche Kombinationen von markierten Substraten berechnet (Yang et al., 2007).

Aus den Simulationen ergab sich die größte Sensitivität für ein Parallelexperiment mit jeweils [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und [3,4-<sup>13</sup>C]-Glutamat, sowie [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [U-<sup>13</sup>C]-Glutamat. Da jedoch [3,4-<sup>13</sup>C]-Glutamat zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht kommerziell verfügbar war, musste der relative Informationsgehalt mehrerer Kombinationen aus Substraten mit der Verfügbarkeit der erforderlichen Chemikalien und dem Preis für ein solches Experiment verglichen werden. Zur Berechnung des Preises wurde dabei die unverbindliche Preisempfehlung des Anbieters auf dessen Internetseite zugrunde gelegt. Für insgesamt 32 Kombinationen aus markierten Substraten wurde die Sensitivität der Markierungsmuster der Aminosäuren berechnet (Abb. 6.5.5). Daraus ergab sich, dass in Bezug auf Verfügbarkeit und Preis der markierten Substanzen die günstigste Wahl eine Kombination aus einer Parallelkultivierung mit [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und unmarkiertem Glutamat, sowie [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat ist. Diese Kombination aus Substraten war kommerziell erhältlich und liefert mit 94 % des maximal erhältlichen Informationsgehaltes eine ausreichende Sensitivität für die metabolische Flussanalyse (Abb. 6.5.5).

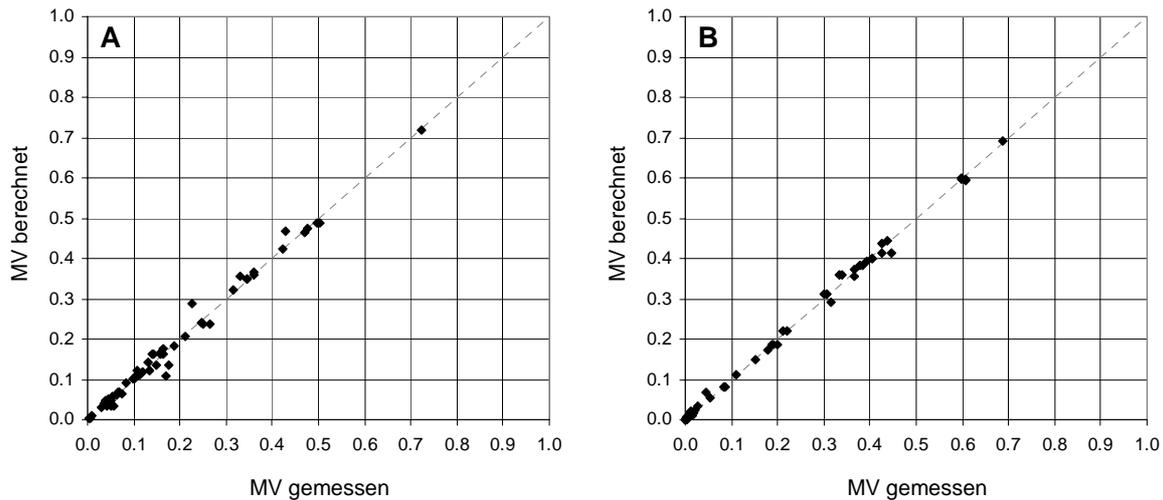


**Abb. 6.5.5:** Relativer Informationsgehalt unterschiedlicher Kombinationen von Tracersubstraten über dem Preis in \$ pro Schüttelkolbenversuch. Einfachkultivierungen sind als graue Dreiecke (▲), Parallelkultivierungen als graue Quadrate (■) dargestellt. Als Referenz mit einem relativen Informationsgehalt von 1,0 dient das Parallelexperiment [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat + [3,4-<sup>13</sup>C]-Glutamat und [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat + [U-<sup>13</sup>C]-Glutamat (□). Die mit ■ dargestellte Kombination aus [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat + unmarkiertem Glutamat und [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat + [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat wurde für die Durchführung des Tracerexperiments ausgewählt.

### 6.5.3 Metabolische Flussanalyse von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Succinat und Glutamat

Für die metabolische Flussanalyse von *Bacillus subtilis* auf Glutamat und Succinat wurden Parallelkultivierungen mit [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und unmarkiertem Glutamat, sowie [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat eingesetzt. Die Berechnung der metabolischen Flüsse erfolgte dabei auf Grundlage der stöchiometrischen Daten unter Anpassung der vom Modell berechneten Markierungsverteilungen. In den Simulationen wurde eine recht gute Anpassung der gemessenen und vom Modell berechneten Markierungsverteilungen der proteinogenen Aminosäuren, sowie des Glucose-6-Phosphats erreicht (Abb. 6.5.6; Anhang Tab. 9.3.3, Tab. 9.3.4).

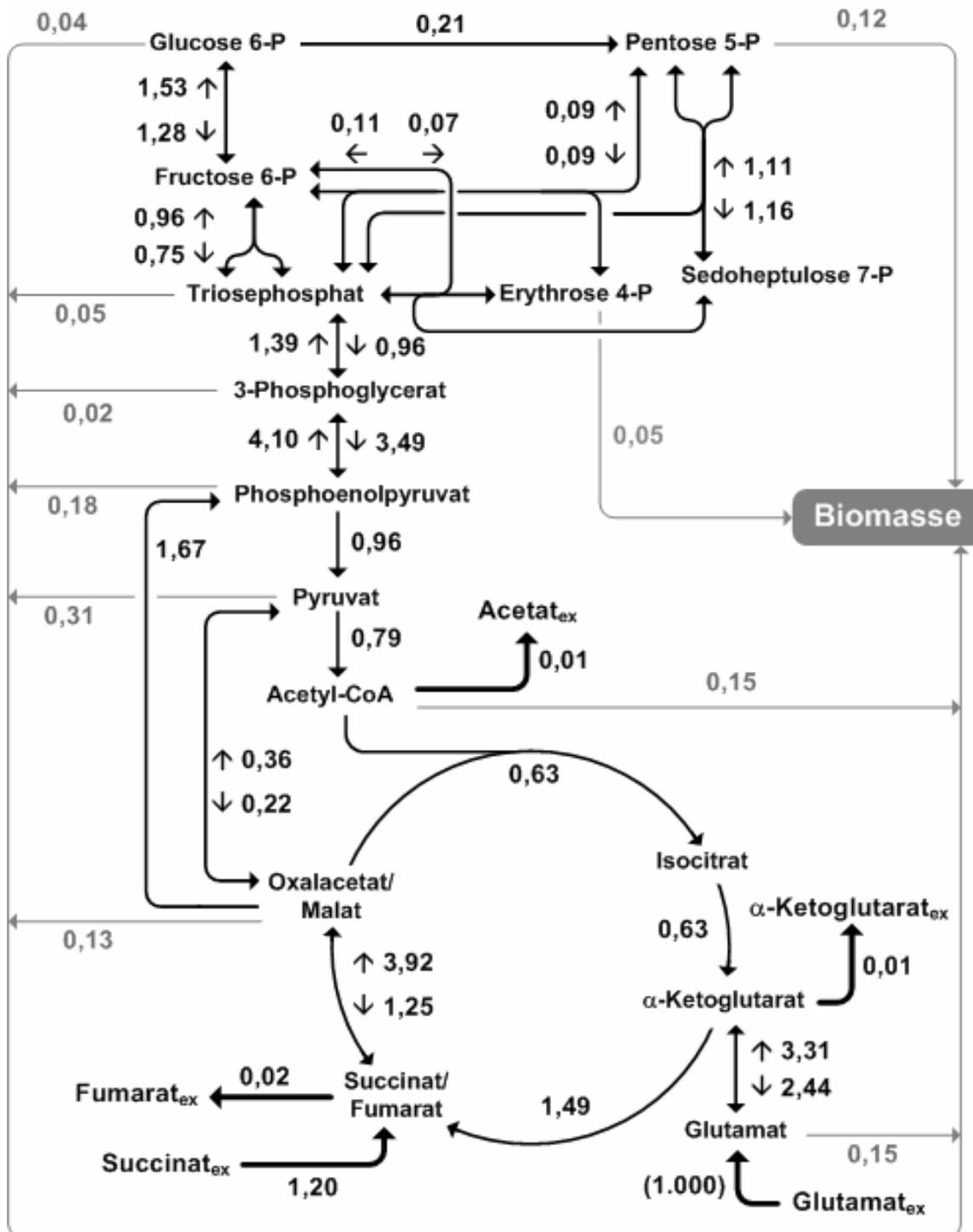
Die Anpassung ist dabei für die Kultivierung auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat nicht ganz so gut wie für die Kultivierung auf [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Markierung des verwendeten [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinats lediglich 97 % betrug, während die beiden anderen Tracersubstrate zu 99 % markiert waren.



**Abb. 6.5.6:** Graphische Auftragung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS-Messung bestimmten Massenisotopomerenverteilungen (MV) der proteinogenen Aminosäuren und des Glycogens für die Parallelkultivierung von *B. subtilis* 168 auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und unmarkiertem Glutamat (A), sowie [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat (B). Die exakten numerischen Werte der berechneten und experimentell bestimmten Massenisotopomerverteilungen sind im Anhang für die Kultivierung auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und Glutamat in Tab. 9.3.3 und die Kultivierung auf [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat in Tabelle 9.3.4 aufgeführt.

Es konnte nun für das Wachstum von *Bacillus subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat eine metabolische Flusskarte erstellt werden (Abb. 6.5.7). Diese stellt die metabolischen Flüsse als relative Flüsse dar, die auf die Glutamat-Aufnahmerate von 4,831 [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] als Referenz (1,0) normiert sind. Tabelle 9.2.2 im Anhang enthält zusätzlich sämtliche berechneten intrazellulären Flüsse einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz.

Im Gegensatz zu den Modellen für das Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose können bei diesem Modell keine Hauptflussrichtungen definiert werden. Es müssen grundsätzlich alle reversiblen Reaktionen innerhalb des Zentralmetabolismus als bidirektionale Flüsse definiert sein. Die dadurch erhöhte Anzahl der zur Bilanzierung notwendigen Gleichungen sowie die Verwendung von 2 unterschiedlichen Tracermedien und die komplexere Analytik führen dazu, dass die relativen Fehler der berechneten Stoffwechselflüsse grundsätzlich sehr hoch sind (Anhang Tab. 9.3.3, Tab. 9.3.4). Dennoch ist es als großer Erfolg zu verbuchen, dass die Bestimmung der metabolischen Flüsse unter diesen Wachstumsbedingungen überhaupt durchgeführt werden konnte.



**Abb. 6.5.7:** Metabolische Flusskarte von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat bei 37°C. Sämtliche Flüsse sind als dimensionslose Relativwerte angegeben, normiert auf die Glutamataufnahmerate (1,000). Bei als reversibel definierten Reaktionen sind jeweils die Nettoflüsse angegeben, sowie die Reversibilitäten in eckigen Klammern. Die exakten, numerischen Werte sowie die Intervalle für 90 % Konfidenz sind Tab. 9.2.2 im Anhang zu entnehmen.

Graue Pfeile: Flüsse zur Bildung von Biomasse; dicke Pfeile: extrazelluläre Flüsse;

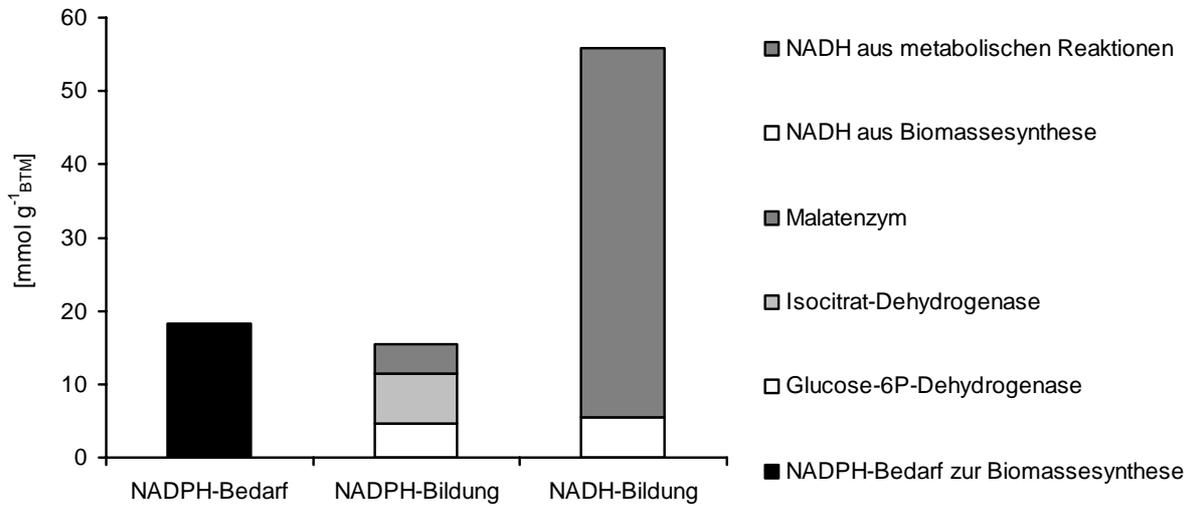
Index „ex“: extrazelluläre Metabolite

Der Fluss zwischen intrazellulärem Glutamat und  $\alpha$ -Ketoglutarat beträgt mehr als das Dreifache der Glutamataufnahme und zeigt eine sehr hohe Reversibilität (Abb. 6.5.7), was die bereits aus den Untersuchungen mit vollständig markiertem Succinat gemachte Beobachtung eines Flusses von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat (Abb. 6.5.4) bestätigt. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass Glutamat sowohl als Donator, als auch als Akzeptor an vielen Transaminasereaktionen in der Zelle beteiligt ist. Vermutlich muss der intrazelluläre Pool an Glutamat daher zusätzlich zur Glutamataufnahme durch Synthese aus  $\alpha$ -Ketoglutarat regeneriert werden. Für *Bacillus subtilis* existieren mehrere Möglichkeiten, Glutamat in den Stoffwechsel einzuschleusen. Einerseits kann Glutamat über die NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase unter NADH-Gewinn zu  $\alpha$ -Ketoglutarat desaminiert werden, andererseits ist Glutamat an vielen Transaminasereaktionen beteiligt. Ein weiteres, in diesem Zusammenhang relevantes Enzym ist die NADP-abhängige Glutamat-Synthase, welche theoretisch 2 mol Glutamat zu 1 mol Glutamin und 1 mol  $\alpha$ -Ketoglutarat umwandeln könnte, wobei insgesamt 1 mol NADPH gewonnen würde. Literaturangaben zufolge verläuft die Reaktion der Glutamat-Synthase jedoch ausschließlich ausgehend von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutamin in Richtung des Glutamat (Belitsky and Sonenshein, 1998; Miller and Stadtman, 1972), wodurch dieses Enzym als NADPH-verbrauchende Reaktion eingestuft werden muss.

Ob der metabolische Fluss von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat aus der Aktivität der Glutamat-Synthase oder aus der Glutamat-Dehydrogenase stammt, lässt sich anhand der metabolischen Flussanalyse nicht auflösen. Der Vergleich des in den intrazellulären Reaktionen gewonnenen NADPH mit dem NADPH-Bedarf (Abb. 6.5.8) zeigt, dass die Glutamat-Synthase unter den hier anliegenden Bedingungen durchaus aktiv sein kann, da die zur Berechnung des NADPH-Bedarfs verwendeten Literaturdaten die Biosynthese von Glutamat über die Glutamat-Synthase bereits mit einbeziehen (Dauner and Sauer, 2001). Da Glutamat ein wichtiger Aminogruppendonor und an vielen Transaminasereaktionen in der Zelle beteiligt ist (Sonenshein et al., 2002), liegt die Hauptursache für die hohe Reversibilität zwischen Glutamat und  $\alpha$ -Ketoglutarat wohl in der Aufrechterhaltung des Glutamat-Pools.

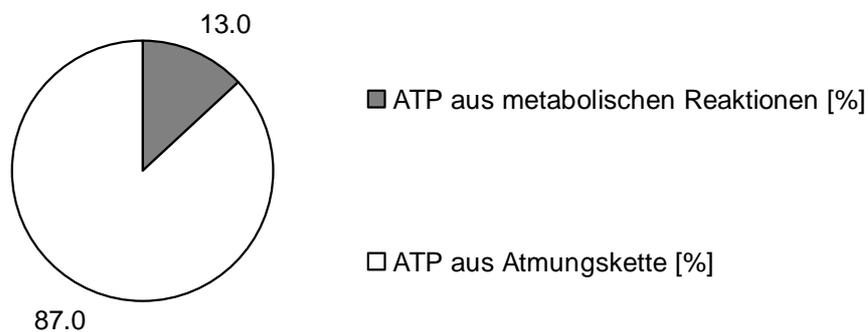
Unter der Annahme, dass der Fluss zwischen dem Oxalacetat/Malat-Pool und dem Pyruvat-Pool über das Malatenzym verläuft, ergibt sich eine ausgeglichene NADPH-Bilanz (Abb. 6.5.8). Die durch enzymatische Reaktionen unter diesen Bedingungen maximal erreichbare Menge von 20,9 [mmol  $g_{\text{BTM}}^{-1}$ ] liegt sogar deutlich über dem berechneten Bedarf von 18,2 [mmol  $g_{\text{BTM}}^{-1}$ ]. Zwar sind in *Bacillus subtilis* eine Reihe von ORFs (*ywkA*, *malS*, *ytsJ* und *mleA*) identifiziert worden, die für Pyruvat-Carboxylasen kodieren könnten (Doan et al., 2003), was einen reinen Fluss zwischen Oxalacetat und Pyruvat nur über das Malatenzym unwahrscheinlich macht. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt wurde, verfügt

*B. subtilis* jedoch über Transhydrogenasen, die Literaturquellen zufolge als reversibel und Energie-unabhängig betrachtet werden können (Sauer et al., 1998).



**Abb. 6.5.8:** Darstellung des für die Biomassesynthese benötigten, anhand von Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) berechneten Bedarfs an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ], der maximal gebildeten Menge an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.5.6) NADPH-generierender Reaktionen, sowie der maximal gebildeten Menge an NADH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.5.6) der NADH-generierenden Reaktionen und der Synthese von Biomassebestandteilen (Dauner and Sauer, 2001) bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glutamat und Succinat.

Die Menge an NADH, welche in den Reaktionen des Zentralmetabolismus und in der Synthese von Zellbestandteilen bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat gebildet wird (Abb. 6.5.8), ist mit einem Wert von etwa  $55,9 \text{ [mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}]$  sehr viel höher als bei Wachstum auf Glucose (Abb. 6.2.4) oder Glucose, Succinat und Glutamat (Abb. 6.3.5).



**Abb. 6.5.9:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] von Atmungskette und ATP-bildenden Reaktionen des Zentralmetabolismus an der Gesamtbildung von ATP bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat.

Die stark erhöhte NADH-Bildung resultiert aus der grundsätzlich höheren Aktivität der Dehydrogenase-Reaktionen des Tricarbonsäurezyklus, was dem Ausgleich der verringerten ATP-Bildung über Substratkettenphosphorylierung dient. Unter diesen Bedingungen werden lediglich 6,3 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] ATP aus den Reaktionen des Zentralmetabolismus gewonnen, der überwiegende Anteil des ATP-Bedarfs zur Biomassesynthese wird über die ATP-Generierung in der Atmungskette gedeckt (Abb. 6.5.9). Dennoch verbleiben bei Annahme einer Ausbeute der oxidativen Phosphorylierung von zwei mol ATP pro mol NADH nach Abzug des zum Ausgleich des ATP-Bedarfs über Atmungskettenphosphorylierung benötigten Anteils an NADH noch 34,9 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] NADH, welche zur NADPH-Gewinnung über Transhydrogenasen genutzt werden können. Die Aufnahme von Glutamat in *B. subtilis* geschieht über einen Protonensymport-Mechanismus, welcher einen H<sup>+</sup>-Transmembrangradienten erfordert (Tolner et al., 1995). An Membranvesikeln von *Bacillus subtilis* wurde nachgewiesen, dass NADH den hauptsächlichen Elektronendonator zum gerichteten Transport von Aminosäuren darstellt (Konings and Freese, 1972), so dass vermutlich ein nicht unwesentlicher Teil des gebildeten NADH zur Glutamataufnahme aufgewendet werden muss. Da die zur Bestimmung des NADH- und NADPH-Bedarfs verwendeten Literaturdaten für das Wachstum von *B. subtilis* auf Glucose gelten (Dauner and Sauer, 2001), ist der Bedarf an NADH zur Glutamat-Aufnahme in der Bilanzierung der Reduktionsäquivalente nicht enthalten.

Grundsätzlich betreibt *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Glutamat und Succinat Gluconeogenese, die Nettoflussrichtungen verlaufen ausgehend vom Tricarbonsäurezyklus über die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und die Glykolyse zum Glucose-6-P (Abb. 6.5.7). Der Fluss über die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase ist daher sehr hoch, ebenso wie die Flüsse über die Enzyme der unteren Glykolyse zwischen Phosphoenolpyruvat und Glycerinaldehyd-3-P. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Gluconeogenese vorwiegend zur Bereitstellung wichtiger, an der Biomassebildung beteiligter Precursormoleküle wie z.B. Glucose-6P und Ribose-5P dient (Sonenshein et al., 2002). Im vorliegenden Fall ist die Bereitstellung von Glucose-6P für die Biomassesynthese jedoch nicht der Hauptgrund für den Ablauf der Gluconeogenese. Lediglich 16 % des in der Gluconeogenese gebildeten Glucose-6P fließen in die Bildung der Biomasse, der überwiegende Anteil fließt in den Pentosephosphatweg. Der Bedarf an Pentosephosphat für die Bildung von Makromolekülen wird dabei allerdings fast ausschließlich über den oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs unter Bildung von NADPH durch Glucose-6P-Dehydrogenase und Gluconat-6P-Dehydrogenase gedeckt. Die Nettoflüsse führen keineswegs ausgehend von Glycerinaldehyd-3P, bzw. Fructose-6P über die Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen zu Pentosephosphat, sondern sogar in geringem Maße in die

Gegenrichtung. Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgern, dass bei *Bacillus subtilis* der NADPH-Bedarf der Zelle die treibende Kraft für die Gluconeogenese ist und weniger der Bedarf an Precursormolekülen, wie dies in der Literatur allgemein beschrieben ist. Diese Schlussfolgerung wird alleine schon dadurch gestützt, dass die Flüsse in Glucose-6P und von dort zu Ribulose-5P unter den hier vorliegenden Bedingungen grundsätzlich höher sind als der Bedarf dieser beiden Metabolite für die Biomassebildung.

Ein weiterer, interessanter Aspekt ergibt sich durch den beobachteten Fluss von Pyruvat über die Pyruvat-Carboxylase zu Oxalacetat. Diese Reaktion stellt zusammen mit den Reaktionen über PEP-Carboxykinase und Pyruvat-Kinase prinzipiell einen Futile Cycle dar. Pyruvat wird über die Pyruvat-Kinase aus Phosphoenolpyruvat synthetisiert, wobei ATP gewonnen wird. Anschließend findet die Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat und freiem, intrazellulärem Carbonat statt, wofür die Pyruvat-Carboxylase ATP benötigt, um die thermodynamisch ungünstige Carboxylierungsreaktion zu ermöglichen. Aus Oxalacetat wird nun über die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung und ATP-Verbrauch Phosphoenolpyruvat synthetisiert. In der Summe wird bei Durchlaufen der beschriebenen Reaktionen pro mol umgesetzter Metabolite 1 mol ATP verbraucht. Die physiologisch wichtige Bereitstellung von Acetyl-CoA über das Malatenzym und die Pyruvat-Dehydrogenase bei Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Malat wurde bereits nachgewiesen (Lerondel et al., 2006), ebenso wie das Vorliegen eines NADP-abhängigen Malatenzym, welches durch Malat induziert wird (Diesterhaft and Freese, 1973). Daher bestünde eine mögliche Erklärung für die beobachteten Vorgänge darin, dass *Bacillus subtilis* unter den hier vorliegenden Bedingungen einen nicht unwesentlichen Teil des für die Biomassebildung benötigten NADPH über das Malatenzym synthetisieren muss.

Das dabei gebildete Pyruvat wird über die Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches entweder in den TCA eingeschleust oder in Form von Acetat ausgeschieden werden kann. Des Weiteren ist Pyruvat ein wichtiger Metabolit zur Bildung von Biomassevorstufen, der beobachtete Fluss von Pyruvat in die Biomassebildung beträgt etwa 40% des Flusses über die Pyruvat-Dehydrogenase, während er bei Wachstum auf Glucose mit und ohne Addition von Glutamat und Succinat etwa ein Viertel des relativen Flusses über dieses Enzym betrug (Abb. 6.2.3, Abb. 6.3.3). Allerdings ist der sehr hohe, relative Anteil der Biomassebildung an den Flüssen aus dem Pyruvat-Pool bei Wachstum auf Succinat und Glutamat in erster Linie auf das Fehlen von fermentativer Stoffwechselaktivität zurückzuführen. Wie oben bereits erwähnt unterliegen die Gene des Überflusstoffwechsels der durch Glucose vermittelten Regulation durch CcpA, so dass unter diesen Bedingungen 80 % des gebildeten Acetyl-CoA in den TCA fließen. Untersuchungen an *E. coli* (Yang et al., 1999) zeigten, dass Mutanten mit Defekten in der Acetatbildung anstatt einer signifikanten

Erhöhung des TCA alternative Überflussmetabolite wie Pyruvat oder Lactat ausscheiden. Bei Eukaryonten, die unter aeroben Bedingungen einen Überflusstoffwechsel zeigen, resultiert die fermentative Aktivität nachweislich aus der begrenzten Kapazität des respiratorischen Systems mit dem Tricarbonsäurezyklus als Bottleneck (Frick and Wittmann, 2005).

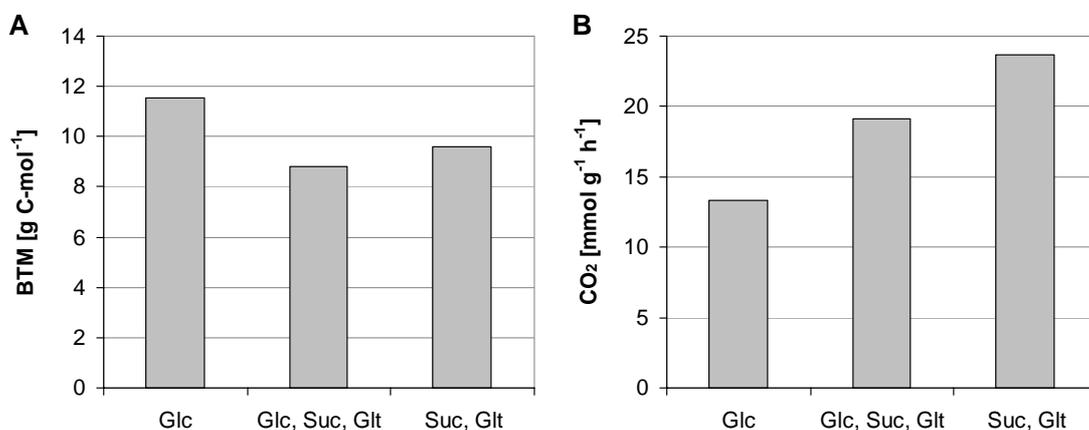
Der relative Fluss von Pyruvat über Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus ist insgesamt sehr hoch. Obwohl nur sehr wenig  $\alpha$ -Ketoglutarat von der Zelle ausgeschieden wird und der Fluss von Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat recht groß ist, besitzt der TCA-Zweig des Krebszyklus ausgehend von Oxalacetat und Acetyl-CoA über Isocitrat bis hin zu  $\alpha$ -Ketoglutarat mit einem zur Glutamataufnahme relativen Fluss von 63 % eine sehr hohe Aktivität. Betrachtet man die absoluten Flüsse, so zeigt sich bei Wachstum auf Glutamat und Succinat mit 3,04 [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] eine deutlich höhere Aktivität der Citrat-Synthase bei Wachstum auf Glutamat und Succinat als bei Wachstum auf Glucose (2,39 [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]) oder auf Glucose, Glutamat und Succinat (1,10 [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]).

Bei Wachstum auf Kohlehydraten gewinnt *Bacillus subtilis* einen relativ großen Anteil des benötigten ATP über Substratkettenphosphorylierung in der Glykolyse. Unter den hier vorliegenden Bedingungen ist eine solche Form der ATP-Gewinnung jedoch nicht möglich. Zusätzlich werden in der Gluconeogenese für die Synthese von 1 mol Glucose-6P aus 1 mol Oxalacetat insgesamt 3 mol ATP verbraucht. Gegenüber dem Wachstum auf Kohlehydraten herrscht unter diesen Bedingungen somit ein Mangel an ATP. Dieser kann nur durch eine erhöhte Aktivität der Atmungskettenphosphorylierung ausgeglichen werden. Bedingung hierfür wäre allerdings eine erhöhte Produktion von Reduktionsäquivalenten. Dies liefert eine plausible Erklärung für die insgesamt sehr hohe Aktivität des Tricarbonsäurezyklus, da die Zelle dazu gezwungen ist, über den Krebs-Zyklus ausreichend NADH für die Atmungskettenphosphorylierung bereit zu stellen.

Eine weitere Erklärung für die hohe Aktivität des Krebszyklus liegt im Bedarf von NADPH. Studien mit *E. coli* haben gezeigt, dass die Isocitrat-Dehydrogenase bei Wachstum auf Acetat ca. 90 % des für die Biomassesynthese benötigten NADPH bereit stellt (Dean and Golding, 1997). Im hier vorliegenden Fall wird zwar kein Acetat als Kohlenstoffquelle verwendet, aber die Bedingungen sind insofern ähnlich, dass keine Zucker zur Bereitstellung von ATP und NADPH verstoffwechselt werden können. Die Bilanzierung des NADPH zeigt, dass unter den hier vorliegenden Bedingungen die Isocitrat-Dehydrogenase den mit 44,8 % höchsten Anteil an der NADPH-Synthese besitzt (Abb. 6.5.8).

## 6.6 Die Rolle des Nährstoffangebots bei der Regulation des Zentralstoffwechsels von *Bacillus subtilis*

Die Verfügbarkeit unterschiedlicher Kohlenstoffquellen hat deutliche Einflüsse auf die Physiologie von *Bacillus subtilis*. Bezogen auf den mit der Summe aller verfügbaren Substrate insgesamt aufgenommenen Kohlenstoff ist die Ausbeute an Biomasse bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose mit 11,5 g gebildeter Biotrockenmasse pro aufgenommenem Mol Kohlenstoff am höchsten (Abb. 6.6.1 A). Auf Succinat und Glutamat werden 83 % der Ausbeute bei Wachstum auf Glucose erreicht, auf Glucose, Succinat und Glutamat lediglich 77 %. Die Unterschiede in der Biomasseausbeute resultieren in erster Linie aus der unterschiedlichen Bildung von Überflusmetaboliten und dem damit verbundenen Verlust von Kohlenstoff für die Biomassebildung, allerdings spielen auch Unterschiede in der Atmungsaktivität eine Rolle. Der Vergleich dieser drei Bedingungen zeigt, dass *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Succinat und Glutamat mit 23,7 [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] die größte beobachtete Menge an CO<sub>2</sub> bildet (Abb. 6.6.1 B), wenn man die anhand der intrazellulären, molaren Stoffflüsse berechnete Menge an gebildetem Kohlendioxid betrachtet. Auf Glucose, Succinat und Glutamat bildet *B. subtilis* 168 mit 19,1 [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] deutlich weniger CO<sub>2</sub>, die niedrigste CO<sub>2</sub>-Bildung von 13,3 [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] wurde für Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle beobachtet.



**Abb. 6.6.1:** Teilabbildung A: Ausbeute an Biotrockenmasse [g C-mol<sup>-1</sup>] in Bezug auf den mit allen Substraten aufgenommenen Gesamtkohlenstoff bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, auf Glucose, Succinat und Glutamat sowie auf Succinat und Glutamat.

Teilabbildung B: Anhand der intrazellulären, molaren Stoffflüsse berechnete Menge an gebildetem Kohlendioxid [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, auf Glucose, Succinat und Glutamat sowie auf Succinat und Glutamat.

Verwendete Abkürzungen: Glc = Glucose, Suc = Succinat, Glt = Glutamat

*Bacillus subtilis* zeigt somit bei Wachstum auf Succinat und Glutamat einen rein respirativen Metabolismus. Die gegenüber dem Wachstum auf Glucose fehlende Möglichkeit zur Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung muss daher über eine erhöhte Atmungsaktivität ausgeglichen werden, was zu sehr großen, molaren Stoffflüssen innerhalb des Tricarbonsäurezyklus führt (Tab. 6.6.1).

**Tab. 6.6.1:** Aus der metabolischen Flussanalyse resultierende, molare Stoffflüsse [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] charakteristischer Reaktionen des Zentralstoffwechsels für *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose, auf Glucose, Succinat und Glutamat, sowie auf Succinat und Glutamat unter der Annahme, dass die Glucoseaufnahme in ihrer Gesamtheit über das PTS verläuft.

Kohlenstoffquellen <sup>a</sup>	Glc	Glc, Suc, Glu	Suc, Glu
<b>molarer Fluss [<math>\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}</math>]</b>			
PTS <sup>b</sup>	9,1	10,0	0,0
Glucose-6-P-Dehydrogenase	3,0	4,4	1,0
Glucose-6-P-Isomerase <sup>c</sup>	5,9	5,5	-1,2
Pyruvat-Kinase und PTS	14,0	16,5	4,6
Pyruvat-Kinase (ohne PTS)	4,9	6,5	4,6
Pyruvat-Dehydrogenase	8,6	9,6	3,8
Lactat-Dehydrogenase	0,0	2,5	0,0
Acetat-Bildung	5,3	8,3	0,0
PEP-Carboxykinase	0,9	2,9	8,0
Pyruvat-Carboxylase/Malatenzym <sup>d</sup>	3,3	1,4	-0,7
Citrat-Synthase/Aconitase	2,5	0,5	3,0
$\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase	1,6	3,0	7,2
Fumarat-Hydratase	1,6	4,0	12,8

<sup>a</sup>: verwendete Abkürzungen: Glc = Glucose, Suc = Succinat, Glu = Glutamat

<sup>b</sup>: für das PTS wurde die gesamte molare Glucoseaufnahme angenommen

<sup>c</sup>: für die Glucosephosphat-Isomerase ist der Nettofluss in Richtung des Fructose-6-P angegeben

<sup>d</sup>: für Pyruvat-Carboxylase und Malatenzym ist die Summe beider Reaktionen als Nettofluss in Richtung des Malat/Oxalacetat-Pools angegeben

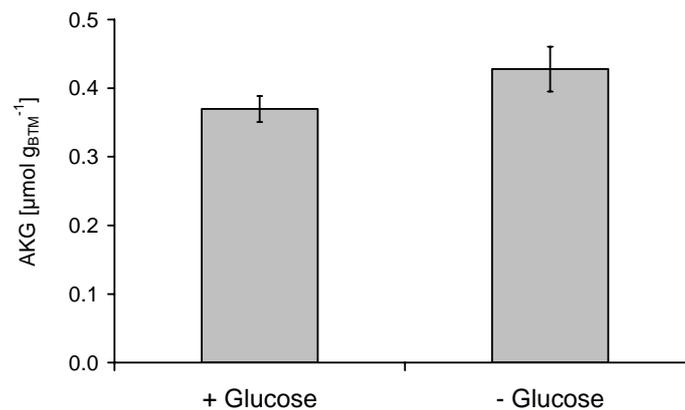
Im Gegensatz zu dem Wachstum auf Succinat und Glutamat ist die Atmungsaktivität auf Glucose allein sehr gering, was aufgrund der geringsten beobachteten  $\text{CO}_2$ -Bildung (Abb. 6.6.1 B) sowie des relativ geringen, metabolischen Flusses über die Reaktionen des Tricarbonsäurezyklus zwischen  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat deutlich wird (Tab. 6.6.1). Die Aktivität der Citrat-Synthase (*CitZ*), Aconitase (*CitB*) und Isocitrat-Dehydrogenase (*CitC*) liegt

dabei allerdings sehr hoch, was darauf zurückzuführen ist, dass *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose allein Glutamat und Glutamin über  $\alpha$ -Ketoglutarat synthetisieren muss. Der gesamte Tricarbonsäurezyklus wird unter diesen Bedingungen in erster Linie zur Produktion von Vorläufermolekülen für die Biomassesynthese anstatt zur Energiegewinnung in der Atmungskette genutzt. Bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat ist dies jedoch nicht der Fall, was sich in einem stark verminderten, molaren Fluss über die drei Enzyme des vorderen Tricarbonsäurezyklus, *CitZ*, *CitB* und *CitC* widerspiegelt. Die Aktivität des Tricarbonsäurezyklus zwischen  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat ist, bedingt durch die Metabolisierung zweier zusätzlicher Kohlenstoffquellen deutlich höher (Tab. 6.1.1), was einen Anstieg der CO<sub>2</sub>-Produktion im Vergleich zum Wachstum auf Glucose allein bewirkt (Abb. 6.6.1 B).

Literaturdaten über das Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Minimalmedium mit Glucose zeigen, dass die Expression von *citB* bei Nutzung von Ammonium als Stickstoffquelle sehr viel höher ist als bei Nutzung von Glutamat oder Glutamin (Rosenkrantz et al., 1985). Weitere Arbeiten zeigten, dass *citB* synergistisch durch Glucose in Kombination mit Glutamin oder Glutamat reprimiert wird, was der Funktion dieser Aminosäuren als Vorläufer für  $\alpha$ -Ketoglutarat zugeschrieben wurde (Jourlin-Castelli et al., 2000). Andere Untersuchungen ergaben, dass bei Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose als Kohlenstoffquelle eine Korrelation zwischen der Aktivität der Aconitase und der intrazellulären Konzentration an  $\alpha$ -Ketoglutarat besteht (Fisher and Magasanik, 1984a), was bedeuten könnte, dass dieses Enzym einer Feedback-Inhibierung durch  $\alpha$ -Ketoglutarat unterliegt. Der in dieser Arbeit beobachtete, metabolische Fluss in den Tricarbonsäurezyklus ist bei Wachstum auf Succinat und Glutamat wesentlich höher als auf Glucose, Succinat und Glutamat (Tab. 6.6.1). Die Bestimmung der Konzentration an intrazellulärem  $\alpha$ -Ketoglutarat bei *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat, sowie auf Succinat und Glutamat zeigte jedoch einen geringfügig höheren Level an intrazellulärem  $\alpha$ -Ketoglutarat bei Wachstum auf Succinat und Glutamat ohne Addition von Glucose (Abb. 6.6.2).

Daraus lässt sich schließen, dass  $\alpha$ -Ketoglutarat keine regulatorische Funktion der Citrat-Synthase oder Aconitase besitzt, da man für einen solchen Fall aufgrund der metabolischen Flüsse einen niedrigeren Level an intrazellulärem  $\alpha$ -Ketoglutarat für das Wachstum auf Succinat und Glutamat ohne Addition von Glucose erwarten würde. Die in der Literatur beschriebene Korrelation zwischen der Aktivität der Aconitase und der Konzentration an intrazellulärem  $\alpha$ -Ketoglutarat (Fisher and Magasanik, 1984a) bei Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose scheint daher von anderen Faktoren abhängig zu sein als von der Konzentration an  $\alpha$ -Ketoglutarat selbst. Aktuelle Literaturdaten zufolge stehen die Gene der

Citrat-Synthase (*citZ*) und Aconitase (*citB*) unter der Kontrolle der Regulatorproteine CcpA und CcpC, wobei für die Katabolitenrepression durch CcpC Citrat als Effektor angenommen wird (Blencke et al., 2006; Jourlin-Castelli et al., 2000). Leider lassen sich Unterschiede in den Konzentrationen an intrazellulärem Citrat bei *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf den in dieser Arbeit verwendeten Minimalmedien nicht quantifizieren. Um die Löslichkeit des Eisen(III) und damit dessen Aufnahme durch die Zellen zu gewährleisten, enthält das verwendete Kulturmedium Ammoniumeisen(III)-Citrat, welches sich bei der Zellextraktion mit intrazellulärem Citrat vermischt und dadurch nicht abschätzbare Fehler in der HPLC-Analytik verursacht.



**Abb. 6.6.2:** Konzentrationen an intrazellulärem  $\alpha$ -Ketoglutarat [ $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] für das Wachstum von *Bacillus subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat (+ Glucose), sowie auf Succinat und Glutamat (- Glucose).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen über die Beteiligung des Regulatorproteins CcpA an den intrazellulären Flussverteilungen des Tricarbonsäurezyklus sowie der übrigen Stoffwechselwege bei unterschiedlicher Verfügbarkeit von Glucose sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Die Aktivität der Citrat-Synthase und der beiden nachfolgenden Reaktionen hat bei *Bacillus subtilis* große Auswirkungen auf den restlichen Metabolismus. Dies zeigt sich vor allem in dem molaren Fluss in die Fermentationsprodukte Lactat und Acetat bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat, welcher in der Summe mit insgesamt  $10,8 \text{ [mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}]$  mehr als das Doppelte des Flusses in die Acetatbildung bei Wachstum auf Glucose beträgt (Tab. 6.6.1). Transkriptomstudien zeigen, dass die für die Enzyme der Acetatbildung kodierenden Gene *pta* und *ackA*, ebenso wie das die Pyruvat-Dehydrogenase kodierende Operon *pdhABCD* bei Wachstum auf Glucose deutlich nach oben reguliert sind (Blencke et al., 2003), was in der CcpA-vermittelten Aktivierung dieser Gene begründet liegt (Grundy et al., 1993a; Grundy et al., 1994). Dementsprechend konnte bei Wachstum auf Succinat und

Glucose keinerlei Bildung von Überflussmetaboliten festgestellt werden und die niedrigere Expression der Pyruvat-Dehydrogenase bewirkt eine Abnahme des metabolischen Flusses (Tab. 6.6.1). Allerdings lässt sich durch die CcpA-vermittelte Induktion der Phosphotransacetylase (*pta*) und Acetat-Kinase (*ackA*) nicht die Zunahme der fermentativen Aktivität bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat erklären. Vermutlich fungiert der unter diesen Bedingungen nach unten regulierte Tricarbonsäurezyklus als Bottleneck, was zu einem Stau auf der Stufe des Pyruvats führen und die Bildung von Acetat und Lactat zusätzlich begünstigen würde. Dieses Phänomen wurde in einer ähnlichen Studie bereits für den respiro-fermentativen Metabolismus von *S. cerevisiae* nachgewiesen (Frick and Wittmann, 2005). Ein weiterer Beweis für diese Annahme liegt in der beobachteten Lactatbildung. Da die Expression der Lactat-Dehydrogenase Literaturangaben zufolge nicht von der Konzentration an intrazellulärem Pyruvat (Yashphe et al., 1978), sondern vom Redoxzustand der Zelle abhängt (Cruz Ramos et al., 2000; Larsson et al., 2005), scheint der Überschuss an Pyruvat die Bildung von Fermentationsprodukten auf metabolischer Ebene über die erhöhte Verfügbarkeit des Substrats der an der Bildung von Acetat und Lactat beteiligten Enzyme zu begünstigen.

Gespeist wird der Pyruvat-Pool auf zwei verschiedene Arten, einerseits aus Phosphoenolpyruvat über die Pyruvat-Kinase bzw. das Enzym I des PTS, andererseits kann ein nicht unerheblicher Anteil aus dem Tricarbonsäurezyklus über das Malatenzym fließen. Unter der Annahme, dass die Glucoseaufnahme über das PTS verläuft und die Beteiligung der Glucose-Permease und Hexokinase vernachlässigbar klein ist, besitzt die Pyruvat-Kinase bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat in etwa die gleiche molare Flussrate wie bei Wachstum auf Glucose (Tab. 6.6.1). Der Grund für die relativ hohe Aktivität der Pyruvat-Kinase bei Metabolisierung von Succinat und Glutamat liegt vermutlich in der Bereitstellung von Acetyl-CoA zur Aufrechterhaltung des Tricarbonsäurezyklus und zur Bildung von Biomasse.

Leider fehlen Expressionsanalysen über den Transkriptionslevel des Malatenzyms und auch in der korrespondierenden Literatur wird dieses Enzym vollständig vernachlässigt (Blencke et al., 2003). Die Tatsache, dass der Nettofluss zwischen Pyruvat und dem Oxalacetat/Malat-Pool bei Wachstum auf Succinat und Glutamat ohne Glucose in Richtung des Pyruvat, bei Vorhandensein von Glucose jedoch in die Gegenrichtung verläuft (Tab. 6.6.1), macht eine Repression durch Glucose durchaus wahrscheinlich. Ob CcpA eine Auswirkung auf diese Reaktion besitzt, wird in den folgenden Kapiteln genauer untersucht werden. Denkbar wäre jedoch eine CcpA-vermittelte Repression um die Generierung von NADPH bei Wachstum auf Glucose vorwiegend über den Pentosephosphatweg zu bewerkstelligen, während diese Rolle bei Wachstum auf Succinat und Glutamat in stärkerem Maße dem Malatenzym

zukommt. Zusätzlich muss der Bedarf an Pyruvat zur Aufrechterhaltung des Tricarbonsäurezyklus gedeckt werden, was bei Wachstum auf Succinat und Glutamat ebenfalls zu einem signifikanten Anteil über das Malatenzym geschieht.

Eine für die Gluconeogenese sehr wichtige Rolle spielt die PEP-Carboxykinase, da unter Glucosemangelbedingungen über dieses Enzym der Bedarf an Phosphoenolpyruvat gedeckt wird. Für die PEP-Carboxykinase wurde ein sehr hoher, metabolischer Fluss bei Wachstum auf Succinat und Glutamat beobachtet (Tab. 6.6.1). Allerdings war der Fluss über diese Reaktion auch bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat im Vergleich zum Wachstum auf Glucose um etwa das Dreifache erhöht. Transkriptomstudien mit *Bacillus subtilis* auf Succinat und Glutamat mit und ohne Addition zeigen eine deutlich geringere Expression des für die PEP-Carboxykinase kodierenden Gens *pckA* auf Glucose, was einer Repression durch Glucose zugeschrieben wird (Blencke et al., 2003). Diese Annahme wird gestützt durch die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Expression von *pckA* bei Wachstum auf Glucose, sowie auf Glucose, Succinat und Glutamat nicht signifikant unterschiedlich ist (Kapitel 6.4), sowie durch die beobachtete, stark erhöhte metabolische Aktivität auf Succinat und Glutamat. Daraus lässt sich folgern, dass die metabolische Aktivität dieses Enzyms nicht nur von der Induktion unter Glucosemangel-Bedingungen, sondern auch in starkem Ausmaß von der Konzentration an intrazellulärem Oxalacetat abhängt.

Selbst bei Wachstum auf Succinat und Glutamat wird der größte Teil des Phosphoenolpyruvats über die Pyruvat-Kinase in den Pyruvat-Pool eingeschleust (Tab. 6.6.1). Dies dient einerseits dazu, ATP zu gewinnen, andererseits wird dadurch die Versorgung des Tricarbonsäurezyklus mit Acetyl-CoA bewerkstelligt und der Bedarf an Pyruvat für die Synthese von Biomassebausteinen gedeckt. Die metabolische Aktivität der Pyruvat-Kinase von *Bacillus subtilis* ist somit unter allen hier untersuchten Bedingungen vorhanden, was sich bei Wachstum auf Glucose und/oder organischen Säuren dadurch zeigt, dass der Gesamtfluss zwischen Pyruvat und PEP immer größer ist als der Bedarf an PEP für die Glucoseaufnahme über das PTS (Kap. 6.2 u. 6.3). Das für die Pyruvat-Kinase kodierende Gen *pykA* unterliegt nicht der CcpA-vermittelten Katabolitenrepression durch Glucose (Blencke et al., 2003; Tobisch et al., 1999). Somit findet keine direkte Regulation des Pyruvat-Pools aufgrund der Aktivität der Reaktion über die Pyruvat-Kinase statt, stattdessen wird der Pyruvat-Pool über das Verhältnis der metabolischen Flüsse zwischen Tricarbonsäurezyklus und Acetatbildung, sowie über die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase und die Ausschleusung von überschüssigem Pyruvat reguliert. Das bedeutet, dass die Regulation des Pyruvat-Pools nicht durch die Pyruvat bildenden, sondern durch die verbrauchenden Reaktionen erfolgt. Diese Strategie dient vermutlich dazu, Störfaktoren

auszuschließen, welche die Aufnahme und Phosphorylierung von Glucose über das PTS beeinflussen könnten. Eine Regulation der Pyruvat-Kinase würde nämlich sowohl die Größe des intrazellulären Pyruvat-Pools, als auch die des Phosphoenolpyruvat-Pools betreffen und dadurch indirekt über eine Änderung der Verfügbarkeit von Phosphoenolpyruvat die Aktivität des PTS beeinflussen.

Wie in Kap. 6.5 beschrieben, betreibt *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Succinat und Glutamat Gluconeogenese, während bei Addition von Glucose zu diesen beiden Substraten ein hoher metabolischer Fluss ausgehend von Glucose-6-Phosphat durch die Glykolyse in Richtung des PEP/Pyruvat beobachtet wurde (Kap. 6.3). Die glykolytischen Enzyme, welche reversible Reaktionen katalysieren sind in *Bacillus subtilis* konstitutiv exprimiert, wohingegen die Phosphofruktokinase (*pfkA*) und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gapA*) in Gegenwart von Glucose induziert werden (Fillinger et al., 2000; Ludwig et al., 2001). Interessanterweise unterliegt die Fructose-1,6-Bisphosphatase, welches ein für die Gluconeogenese sehr wichtiges Enzym darstellt, Literaturangaben zufolge keiner Repression durch Glucose, sondern ist bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat mit und ohne Glucose konstitutiv exprimiert (Blencke et al., 2003). Somit scheint das von *Bacillus subtilis* bevorzugte Substrat Glucose keinen regulatorischen Einfluss auf die Hauptflussrichtung der Glykolyse zu besitzen. Die Aktivität der Glykolyse scheint vielmehr von den intrazellulären Poolgrößen der beteiligten Metabolite abhängig zu sein.

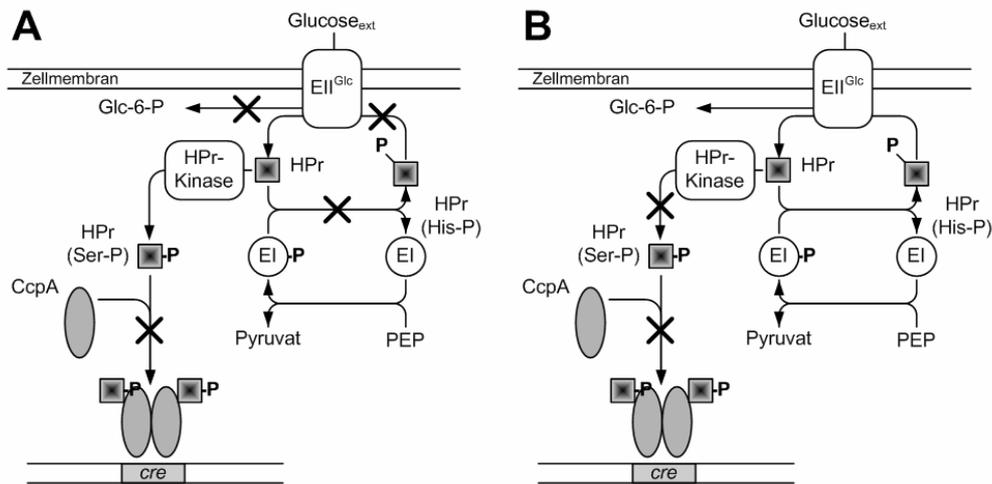
Dies gilt vermutlich ebenso für die Enzyme des Pentosephosphatwegs. Transkriptomstudien von *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Succinat und Glutamat mit und ohne Addition von Glucose zeigten keinen Einfluss der Verfügbarkeit von Glucose auf die Expression der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Blencke et al., 2003). Dennoch kann bei Wachstum auf Succinat und Glucose im Vergleich zum Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat eine starke Abnahme des molaren Flusses über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase beobachtet werden (Tab. 6.6.1). Der regulierende Faktor für die Aktivität des oxidativen Zweigs des PPP liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf metabolischer Ebene, bedingt durch die Verfügbarkeit von Glucose-6-Phosphat. Bei Wachstum auf Substraten, welche über den Tricarbonsäurezyklus in den Zentralmetabolismus eingeschleust werden, ist es für die Zelle energetisch günstiger, das zur Biomassebildung benötigte NADPH über die Reaktionen der Isocitrat-Dehydrogenase und des Malatenzyms zu generieren, als über den Pentosephosphatweg. Im Gegensatz zum Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat scheint der Pentosephosphatweg unter diesen Bedingungen vorwiegend zur Synthese von Biomassevorstufen zu dienen.

## 6.7 Die Rolle der Katabolitenrepression bei der Regulation des Zentralstoffwechsels von *Bacillus subtilis*

### 6.7.1 Phänotypische Charakteristika von *ccpA*-Deletionsmutanten

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt das Regulatorprotein CcpA in *Bacillus subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Transkription einer Vielzahl von Genen in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot dar. Die Auswirkungen des Nährstoffangebots auf die Physiologie von *Bacillus subtilis* soll daher anhand zweier *ccpA*-Deletionsmutanten genauer untersucht werden. Dazu wird zunächst der Stamm *B. subtilis* QB5407 verwendet, bei dem nur das Gen *ccpA* deletiert wurde (Faires et al., 1999). Die Gene, welche bei Wachstum auf Glucose durch CcpA aktiviert oder reprimiert werden, sind in diesem Stamm nicht mehr durch Glucose reguliert. Daher zeigt dieser Stamm eine Glutamat-Auxotrophie, welche auf der fehlenden Expression der Glutamat-Synthase beruht (Faires et al., 1999; Wacker et al., 2003). Des Weiteren hat *B. subtilis* QB5407 eine im Vergleich zum Wildtyp stark verminderte Glucoseaufnahme (Ludwig et al., 2002; Wacker et al., 2003). Da HPr nur entweder am Serin der Position 46 oder am Histidin der Position 15 phosphoryliert werden kann, führt die Deletion von CcpA zu einer Überaktivität der HPr-Kinase und damit zu einer Sättigung mit am Serinrest phosphoryliertem HPr (Abb. 6.7.1 A) (Ye and Saier, 1996). Da dadurch kein unphosphoryliertes HPr in der Zelle mehr vorliegt, kann die für die Aktivierung und Aufnahme der Glucose über das PTS notwendige Phosphorylierung am Histidinrest nicht mehr erfolgen (Reizer et al., 1998).

Wie in den Kapiteln 6.2 bis 6.5 dieser Arbeit gezeigt wurde, hat die Aufnahme und Metabolisierung von Glucose bei *Bacillus subtilis* gravierende Auswirkungen auf den gesamten Metabolismus, so dass physiologische Unterschiede zum Wildtyp bei dem Stamm QB 5407 nicht notwendigerweise auf die fehlende Regulation durch CcpA zurückzuführen sind. Daher wurde zusätzlich zu der *ccpA*-Deletionsmutante der Stamm *B. subtilis* GP335 eingesetzt, bei welchem es sich um eine *ccpA-ptsH1*-Doppelmutante handelt. Bei diesem Stamm ist das Serin an der Position 46 durch Alanin ersetzt, wodurch das HPr an dieser Stelle nicht mehr phosphoryliert werden kann und stattdessen die Phosphorylierungsstelle am Histidin der Position 15 wieder aktiviert wird (Abb. 6.7.1 B), was zu einer Wiederherstellung der Glucoseaufnahme führt (Ludwig et al., 2002; Wacker et al., 2003).



**Abb. 6.7.1:** Schematische Darstellung der Vorgänge im PTS bei den *B. subtilis* Stämmen QB5407 (A) und GP335 (B). Bei beiden Stämmen findet keine CcpA-vermittelte Regulation statt, bei GP335 ist Ser-46 des HPr zusätzlich durch Alanin ausgetauscht (B).

HPr = Hitzestabiles Protein, EII<sup>Glc</sup> = Glucosespezifische Permease, EI = Enzym I, cre = Catabolite responsive element, CcpA = Catabolite control protein A, Glc-6-P = Glucose-6-Phosphat

## 6.7.2 Wachstum und Produktbildung bei *ccpA*-Deletionsmutanten auf Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquellen

Die *ccpA*-Deletionsmutante *B. subtilis* QB 5407 zeigt auf Glucose, Succinat und Glutamat mit  $\mu = 0,34 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  eine deutlich niedrigere, spezifische Wachstumsrate (Tab. 6.7.1) als der Wildtyp *B. subtilis* 168 mit  $\mu = 0,81 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  (Tab. 6.3.1). QB5407 erreicht bei Addition von Glutamat und Succinat auch nicht die spezifische Wachstumsrate des Wildtyps 168 von  $\mu = 0,64 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  auf Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle, was bedeutet, dass die Deletion von *ccpA* neben der Glutamat-Auxotrophie noch weitere, für das Zellwachstum negative Einflüsse besitzt.

Der Stamm GP 335 erreicht auf Glucose, Glutamat und Succinat mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,63 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  zwar die Rate des Wildtyps 168 auf Glucose, allerdings wächst dieser Stamm immer noch bedeutend langsamer als der Wildtyp auf Glucose, Glutamat und Succinat.

Die Deletion von *ccpA* unterdrückt die Aufnahme von Glucose nicht vollständig, die spezifische Glucoseaufnahmerate von *B. subtilis* QB5407 von  $q_s = -1,7 \text{ [mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$  (Tab. 6.7.1) liegt immerhin noch bei fast 20% der Aufnahmerate des Wildtyps 168 unter diesen Bedingungen (Tab. 6.3.1). Bei dem Stamm *B. subtilis* GP335 wurde eine spezifische Glucoseaufnahmerate von  $q_s = -7,0 \text{ [mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$  beobachtet, was etwa 70 % der

Aufnahmerate des Wildtyps entspricht. Die spezifische Aufnahmerate von Glutamat des Stammes *B. subtilis* QB5407 liegt mit  $q_s = -3,6$  [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] etwa 14 % unter der des Wildtyps, wohingegen der Stamm GP335 mit  $q_s = -4,5$  [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] gegenüber *B. subtilis* 168 eine um etwa 7 % erhöhte spezifische Glutamataufnahmerate zeigt.

**Tab. 6.7.1:** Spezifische Raten für Wachstum, Substrataufnahme und Produktbildung sowie Ausbeutekoeffizienten von Biomasse und organischen Säuren für die beiden *ccpA*-Deletionsmutanten *B. subtilis* QB5407 und GP335, sowie den Wildtyp *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquellen bei 37°C. Die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten [mol mol<sup>-1</sup>] erfolgte sowohl für die Aufnahme von Glucose als auch von Glutamat als Bezugsgröße.

<i>B. subtilis</i> Stamm	QB5407	GP335	168
<b>Spezifische Wachstumsrate <math>\mu</math> [h<sup>-1</sup>]</b>	0,34	0,63	0,81
<b>Spezifische Raten [mmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>]</b>			
Glucose	-1,7	-7,0	-10,0
Glutamat	-3,6	-4,5	-4,2
Succinat	-5,0	-2,4	-1,0
Acetat	0,5	4,1	8,3
Pyruvat	0,0	0,1	0,6
Lactat	0,0	1,4	2,5
Fumarat	0,1	1,0	0,0
$\alpha$ -Ketoglutarat	0,6	2,5	0,6
<b>Ausbeutekoeffizienten [mol mol<sup>-1</sup><sub>Glucose</sub>]</b>			
Fumarat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,042	0,144	0,000
Acetat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,265	0,586	0,829
Pyruvat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,027	0,014	0,061
Lactat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,000	0,204	0,248
$\alpha$ -Ketoglutarat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,365	0,354	0,064
Biotrockenmasse [g mmol <sup>-1</sup> ]	0,194	0,087	0,075
<b>Ausbeutekoeffizienten [mol mol<sup>-1</sup><sub>Glutamat</sub>]</b>			
Fumarat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,020	0,221	0,000
Acetat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,126	0,902	1,974
Pyruvat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,013	0,022	0,145
Lactat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,000	0,315	0,590
$\alpha$ -Ketoglutarat [mol mol <sup>-1</sup> ]	0,173	0,546	0,152
Biotrockenmasse [g mmol <sup>-1</sup> ]	0,092	0,134	0,179

Bei beiden Deletionsmutanten lässt sich jedoch eine signifikant erhöhte, spezifische Aufnahmerate von Succinat beobachten. *B. subtilis* QB5407 nimmt mit  $q_s = -5,0$  [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] gegenüber dem Wildtyp die fünffache Menge an Succinat auf, während *B. subtilis* GP335 eine um den Faktor 2,4 erhöhte Aufnahmerate zeigt (Tab. 6.7.1).

Bezüglich des mit allen Substraten aufgenommenen Kohlenstoffs lässt sich festhalten, dass *B. subtilis* QB5407 seinen Kohlenstoffbedarf zu etwa 37 % aus der Glutamataufnahme, zu etwa 41 % aus der Succinataufnahme und zu immerhin noch etwa 21 % aus der Aufnahme von Glucose deckt. Diese hat bei *B. subtilis* GP335 mit etwa 57 % den größten Anteil an der Aufnahme des Gesamtkohlenstoffs, während die Aufnahme von Glutamat einen Anteil von etwa 30 % und die Succinataufnahme einen Anteil von ca. 13 % besitzt.

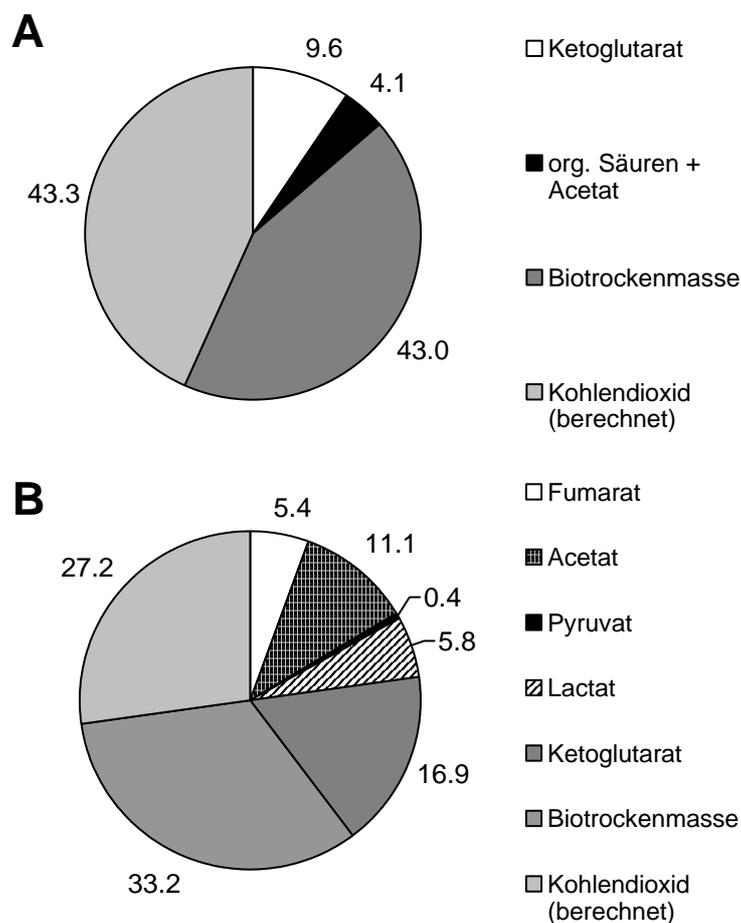
Die Berechnung des Biomasseausbeutekoeffizienten gestaltet sich für diese beiden Stämme unter den vorliegenden Bedingungen schwierig, da es kein hauptsächliches Substrat gibt, auf das man die Biomasseausbeute beziehen könnte. Daher lassen sich lediglich die Ausbeuten pro aufgenommenem Mol Kohlenstoff vergleichen. *B. subtilis* QB5407 bildet pro aufgenommenem Mol Kohlenstoff insgesamt 6,9 g Biotrockenmasse. Der Stamm GP335 liegt mit  $8,2$  [ $\text{g}_{\text{BTM}} \text{C-mol}^{-1}$ ] deutlich darüber. Insgesamt liegen beide Stämme damit unter den Biomasseausbeuten des Wildtyps 168 auf Glucose ( $11,5$  [ $\text{g}_{\text{BTM}} \text{C-mol}^{-1}$ ]), Glucose, Glutamat und Succinat ( $8,8$  [ $\text{g}_{\text{BTM}} \text{C-mol}^{-1}$ ]), sowie Glutamat und Succinat ( $9,6$  [ $\text{g}_{\text{BTM}} \text{C-mol}^{-1}$ ]).

Leider liegen für die beiden Deletionsmutanten keine Abgasmessungen vor, die Berechnung des Kohlendioxidanteils unter den gebildeten Produkten (Abb. 6.7.2) erfolgte daher durch Summation der anhand der metabolischen Flussanalyse (Abb. 6.7.5, Abb. 6.7.7) ermittelten Bildung von Kohlendioxid durch die Decarboxylierungsreaktionen des Zentralmetabolismus, sowie über die Stöchiometrie der  $\text{CO}_2$ -Bildung bei der Biomassesynthese (Kap. 5.4.7).

Die spezifischen Bildungsraten organischer Säuren zeigen bei *B. subtilis* QB5407 deutliche Unterschiede im Vergleich zu denen des Wildtyps auf Glucose, Succinat und Glutamat, sowie auf Glucose allein. So konnte bei diesem Stamm keinerlei Lactatbildung beobachtet werden und Bildung von Acetat nur in sehr geringem Maße. Etwa 14 % des in den gebildeten Produkten,  $\text{CO}_2$  und der gebildeten Biomasse insgesamt enthaltenen Kohlenstoffs werden über organische Säuren des Tricarbonsäurezyklus, vorwiegend über  $\alpha$ -Ketoglutarat ausgeschieden (Tab. 6.7.1, Abb. 6.7.2 A). Insgesamt lässt sich festhalten, dass *B. subtilis* QB5407 bezüglich der Ausbeutekoeffizienten und spezifischen Produktbildungsraten auf Glucose, Succinat und Glutamat ein ähnliches Verhalten zeigt wie der Wildtyp 168 auf Succinat und Glutamat ohne Zugabe von Glucose, ein signifikanter Unterschied besteht lediglich in der Ausschleusung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Fumarat.

Der Stamm *B. subtilis* GP335 hingegen bildet signifikante Mengen an organischen Säuren, lediglich die Ausschleusung von Pyruvat konnte nur in sehr geringem Maße beobachtet

werden (Tab. 6.7.1, Abb. 6.7.2 B). Die Acetatbildungsrate ist bei diesem Stamm immerhin etwa halb so groß wie bei dem Wildtyp 168 unter gleichen Bedingungen (Tab. 6.7.1). Ebenso konnte eine signifikante Bildung von Lactat beobachtet werden. Insgesamt werden etwa 40% des mit den Substraten aufgenommenen Kohlenstoffs als organische Säuren ausgeschieden, lediglich ein Drittel wird für die Biomassesynthese verwendet. Die Deletion von *ccpA* hat somit auf den Überflussmetabolismus von *Bacillus subtilis* zwar eine reprimierende Wirkung, vollständig unterdrückt wird die Bildung von Überflussmetaboliten bei Wiederherstellung der Glucoseaufnahme über das PTS jedoch offensichtlich nicht.



**Abb. 6.7.2:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] des Kohlenstoffs in den gebildeten Produkten von *B. subtilis* QB5407 (A) und *B. subtilis* GP335 (B) auf Glucose, Glutamat und Succinat. Der relative Anteil von CO<sub>2</sub> wurde aufgrund der in der metabolischen Flussanalyse ermittelten Kohlendioxidbildungsraten decarboxylierender Enzyme (Abb. 6.7.5, Abb. 6.7.7), sowie über die Stöchiometrie der CO<sub>2</sub>-Bildung bei der Biomassesynthese berechnet (Kap. 5.4.7).

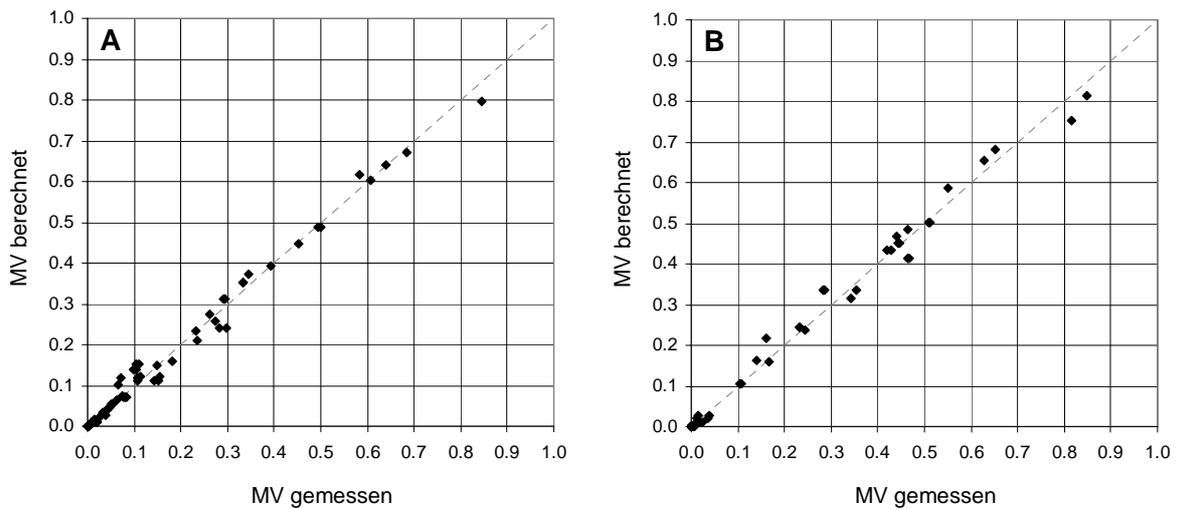
### 6.7.3 Metabolische Flussanalyse von *ccpA*-Deletionsmutanten auf Glucose, Glutamat und Succinat als Kohlenstoffquellen

Aufgrund der sehr geringen Glucoseaufnahmerate wurde für die Tracerstudien mit *B. subtilis* QB5407 auf die Verwendung von [1-<sup>13</sup>C]-Glucose als markiertes Substrat verzichtet. Stattdessen wurden in Analogie zu den Tracerstudien mit *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat Parallelkultivierungen mit [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und unmarkiertem Glutamat, sowie [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat durchgeführt.

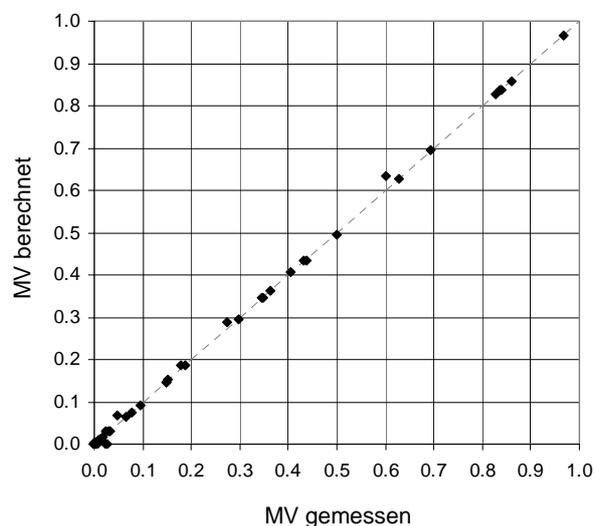
Die Anpassung der vom Modell berechneten an die experimentell bestimmten Markierungsverteilungen zeigt für die Kultivierung auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und Glutamat eine ähnlich gute Qualität (Abb. 6.7.3 (A), Anhang Tab. 10.3.5) wie bei der metabolischen Flussanalyse von *B. subtilis* 168 auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und Glutamat.

Die Anpassung für die Parallelkultivierung auf [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat war nicht ganz so gut (Abb. 6.7.3 (B), Anhang Tab. 10.3.6). Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Werte mit sehr hoher Abweichung zwischen experimentell bestimmter und berechneter Markierungsverteilung sich hauptsächlich aus den Massenverteilungen mit höherem Markierungsgehalt zusammensetzen, da bei diesen aufgrund der relativ geringen, absoluten Werte bereits sehr geringe Abweichungen große Fehler verursachen können. Dies wird in der Parameterschätzung durch eine unterschiedliche Gewichtung der einzelnen Massenisotopomerfraktionen in Abhängigkeit von der in der GC/MS-Messung experimentell bestimmten Standardabweichung berücksichtigt (Yang et al., 2007). In der Regel ergibt sich dadurch für die Massenisotopomere m+0 bis m+2 sämtlicher Analyte die stärkste Gewichtung, da deren relative Fehler aufgrund der guten Bestimmbarkeit dieser Fraktionen sehr gering sind.

Für die Kultivierung zur metabolischen Flussanalyse mit *B. subtilis* GP335 wurde aufgrund der recht hohen Glucoseaufnahmerate analog zu den Simulationen für *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat [1-<sup>13</sup>C]-Glucose als markiertes Substrat verwendet, während Succinat und Glutamat unmarkiert eingesetzt wurden. Diese Tracerstudie wurde ebenfalls als Parallelexperiment durchgeführt und die Markierungsverteilungen der zu analysierenden Metabolite beider Kultivierungen in den Simulationen zur Flussbestimmung eingesetzt. Dabei wurde eine hervorragende Anpassung zwischen den experimentell bestimmten und den berechneten Markierungsverteilungen der eingesetzten Massenisotopomere erreicht (Abb. 6.7.4, Anhang Tab. 9.3.7).



**Abb. 6.7.3:** Graphische Auftragung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS-Messung bestimmten Massenisotopomerverteilungen (MV) der proteinogenen Aminosäuren und des Glycogens für die Parallelkultivierung von *B. subtilis* QB5407 auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und unmarkiertem Glutamat (A), sowie [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat (B). Die exakten numerischen Werte der berechneten und experimentell bestimmten Massenisotopomerverteilungen sind im Anhang für die Kultivierung auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und Glutamat in Tab. 9.3.5 und die Kultivierung auf [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat in Tabelle 9.3.6 aufgeführt.



**Abb. 6.7.4:** Graphische Auftragung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS-Messung bestimmten Massenisotopomerverteilungen (MV) der proteinogenen Aminosäuren und des Glycogens für die Kultivierung von *B. subtilis* GP335 auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose, unmarkiertem Succinat und unmarkiertem Glutamat. Die exakten numerischen Werte der berechneten und experimentell bestimmten Massenisotopomerverteilungen sind in Tab. 9.3.7 im Anhang aufgeführt.

Anhand der Tracerstudien konnten metabolische Flusskarten für *B. subtilis* QB5407 und GP335 erstellt werden, welche die intrazellulären, metabolischen Flüsse als relative Flüsse darstellen. Diese sind aufgrund der sehr geringen Glucoseaufnahmerate des Stammes GB5407 und zur besseren Vergleichbarkeit beider Stämme auf die Glutamataufnahmerate als Referenz normiert. Die metabolische Flussbestimmung wurde dabei mit dem bereits für das Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glutamat und Succinat verwendeten MATLAB-Modell durchgeführt, weshalb alle reversiblen Reaktionen als bidirektionale Flüsse angegeben sind. Die metabolische Flusskarte für *B. subtilis* QB5407 auf Glucose, Glutamat und Succinat ist in Abb. 6.7.5, die Flusskarte für GP355 in Abb. 6.7.7 dargestellt. Zusätzlich sind die für *B. subtilis* QB5407 und *B. subtilis* GP335 berechneten intrazellulären Flüsse einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz im Anhang in Tabelle 9.2.2 aufgeführt.

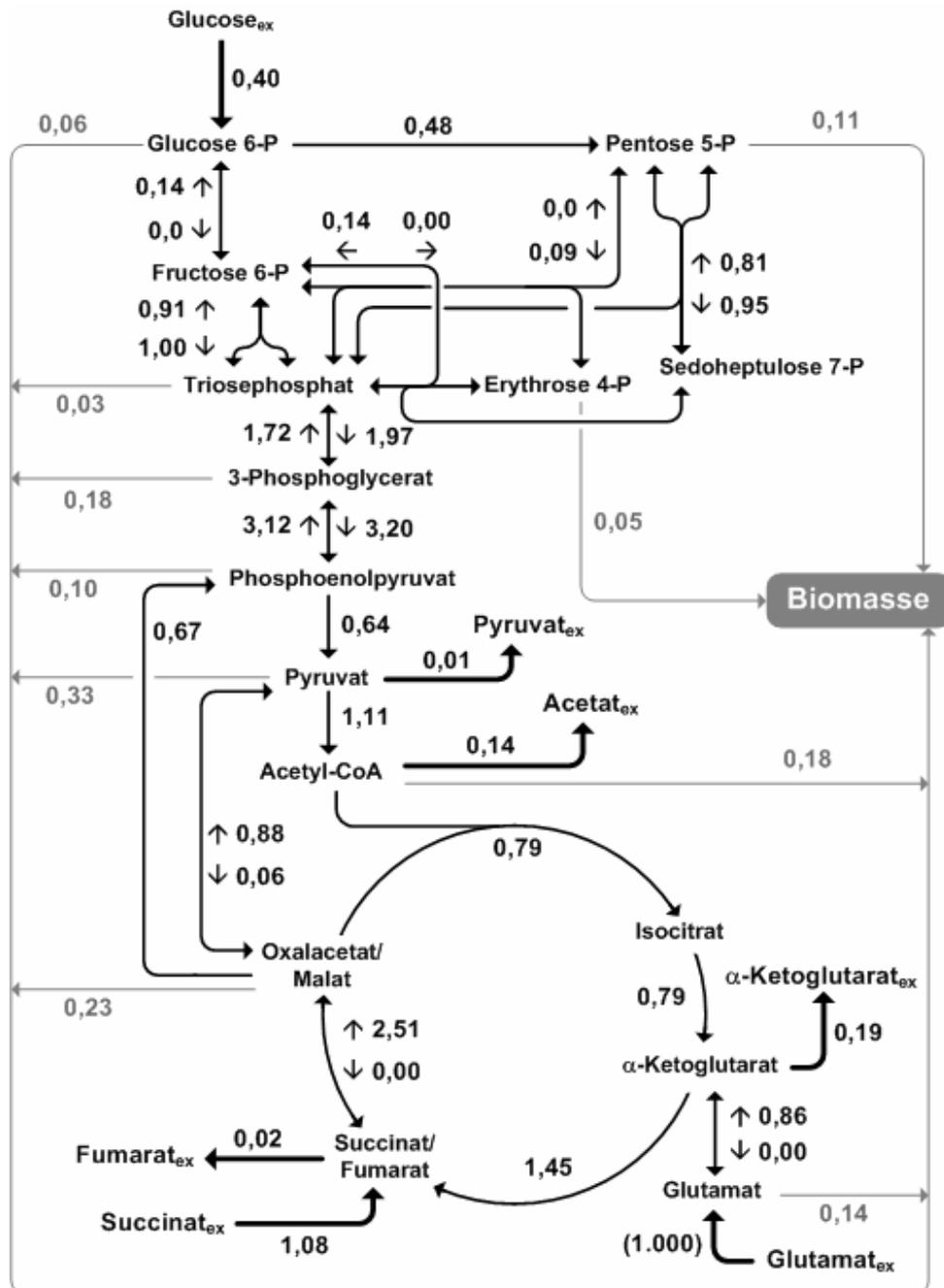
### 6.7.3.1 Intrazelluläre Flussverteilungen von *B. subtilis* QB5407 auf Glucose, Glutamat und Succinat

*B. subtilis* QB5407 deckt seinen Energie- und Kohlenstoffbedarf zu immerhin noch etwa 17% aus Glucose (Abb. 6.7.5), obwohl die Glucoseaufnahme über das PTS bei diesem Stamm durch die Deletion von *ccpA* ausgeschaltet oder zumindest sehr stark reprimiert sein sollte (Reizer et al., 1998).

Die intrazellulären Flussverteilungen zeigen, dass das gesamte Glucose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg fließt (Abb. 6.7.5). Der relative Fluss über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist sogar höher als die Glucoseaufnahme. Ermöglicht wird dies durch das Auffüllen des Glucose-6-Phosphat-Pools über die Glucosephosphat-Isomerase, für welche allerdings keinerlei metabolische Aktivität in Richtung des Fructose-6-Phosphats festgestellt werden konnte. Aus dem Fructose-6-Phosphat-Pool fließt etwa ein Drittel über die Glucosephosphat-Isomerase, etwa zwei Drittel fließen in den Triosephosphat-Pool. Ebenso wie für die Glucosephosphat-Isomerase, wurde für die Transaldolase- und Transketolase-Reaktionen keine Reversibilität beobachtet. Somit bilden die Reaktionen des Pentosephosphatwegs zusammen mit der Glucosephosphat-Isomerase einen Zyklus, in welchem der Fluss über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zusätzlich zur Glucoseaufnahme durch den Rückfluss von Fructose-6-Phosphat aus dem Pentosephosphatweg in die Glykolyse gespeist wird.

Bei der metabolischen Flussanalyse für *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat konnte eine starke gluconeogenetische Aktivität beobachtet werden, welche aus dem Bedarf an über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gebildetem NADPH resultiert (Kap. 6.3.2). In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis ist der NADPH-Bedarf der Zelle mit sehr hoher

Wahrscheinlichkeit auch in diesem Fall die Ursache für die Verteilung der intrazellulären Flüsse in oberer Glykolyse und Pentosephosphatweg.



**Abb. 6.7.5:** Metabolische Flusskarte von *B. subtilis* QB5407 auf Glucose, Succinat und Glutamat bei 37°C. Sämtliche Flüsse sind als dimensionslose Relativwerte angegeben, normiert auf die Glutamataufnahmerate (1,000). Bei als reversibel definierten Reaktionen sind jeweils die Nettoflüsse angegeben, sowie die Reversibilitäten in eckigen Klammern. Die exakten, numerischen Werte einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz sind Tab. 9.2.2 im Anhang zu entnehmen.

Graue Pfeile: Flüsse zur Bildung von Biomasse; dicke Pfeile: extrazelluläre Flüsse;

Index „ex“: extrazelluläre Metabolite

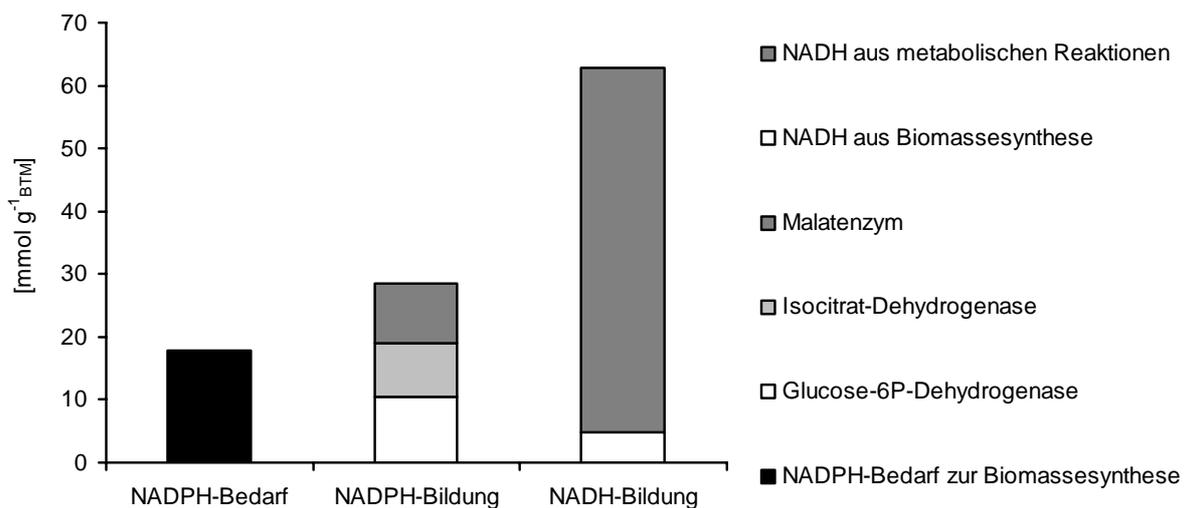
Etwa 40% des aus dem PPP stammenden Fructose-6-Phosphats fließen über den Triosephosphat-Pool in die Reaktionen der unteren Glykolyse. Für diese lässt sich eine Nettoflussrichtung ausgehend von Glycerinaldehyd-3-Phosphat in Richtung Phosphoenolpyruvat beobachten, wobei die Reversibilität der beteiligten Reaktionen sehr hoch ist. Dennoch wird der Phosphoenolpyruvat-Pool in der Nettosumme zu immerhin noch 10% aus den glykolytischen Reaktionen gespeist, die übrigen 90% entstammen der PEP-Carboxykinase-Reaktion. Diese ist bei *B. subtilis* QB5407 sehr viel geringer als bei dem Wildtyp auf Succinat und Glutamat mit und ohne Zusatz von Glucose. Dies resultiert vermutlich daraus, dass die Phosphorylierung von Glucose nun nicht mehr unter PEP-Verbrauch über das PTS, sondern über die Glucokinase unter ATP-Verbrauch bewerkstelligt wird, wodurch der Bedarf an PEP geringer und damit auch die Reaktion der PEP-Carboxykinase weniger wichtig ist. Des Weiteren ist *B. subtilis* QB5407 in der Lage, zu einem geringen Anteil Glucose zu metabolisieren. Dadurch verliert die gluconeogenetische Reaktion der PEP-Carboxykinase an Bedeutung, da der Bedarf an Biomassebausteinen wie Glucose-6-Phosphat und Ribose-5-Phosphat über die Glucoseaufnahme gedeckt werden kann.

Der nicht mehr vorhandene Bedarf an Phosphoenolpyruvat zur Aktivierung der Glucose über das PTS hat deutliche Auswirkungen auf den Zentralmetabolismus von *B. subtilis* QB5407, der Fluss zwischen Phosphoenolpyruvat und Pyruvat ist deutlich geringer als bei Wachstum des Wildtyps auf Succinat und Glutamat. Stattdessen wird der Pyruvat-Pool nicht mehr wie bei dem Wildtyp (siehe Kapitel 6.2 – 6.5) unter sämtlichen bisher untersuchten Nährstoffbedingungen vorwiegend aus dem Phosphoenolpyruvat-Pool gespeist, sondern aus dem Tricarbonsäurezyklus. So ergibt sich für den Fluss in den Pyruvat-Pool über das Malatenzym eine im Vergleich zum Wildtyp auf Succinat und Glutamat deutliche Steigerung, während der Fluss in die Gegenrichtung über die Pyruvat-Carboxylase fast vollständig zurückgegangen ist.

Der Hauptteil des Pyruvats wird wiederum über die Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt und in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust. Die für *B. subtilis* QB5407 beobachteten metabolischen Flüsse innerhalb des Tricarbonsäurezyklus spiegeln in ihrer Gesamtheit in etwa die Verhältnisse des Wildtyps 168 bei Wachstum auf Succinat und Glutamat wider. Aufgrund der sehr geringen Glucoseaufnahme wird die bei *B. subtilis* QB5407 und bei Wachstum des Wildtyps auf Succinat und Glutamat gegenüber dem Wachstum auf Kohlehydraten reduzierte ATP-Gewinnung der Glykolyse durch erhöhte Aktivität der Atmungskettenphosphorylierung ausgeglichen. Die dazu notwendige Menge an Reduktionsäquivalenten muss daher über eine erhöhte Aktivität des Tricarbonsäurezyklus gewonnen werden. Auffällig ist dabei jedoch der sehr hohe Anteil an Succinat, *B. subtilis*

QB5407 zeigt die in dieser Arbeit bislang höchste, beobachtete Succinataufnahme. Eine Erklärung liegt in der relativ großen Menge an ausgeschleustem  $\alpha$ -Ketoglutarat, was bedeuten könnte, dass der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenasekomplex einer Sättigung unterliegt und die Metabolisierung von Glutamat über  $\alpha$ -Ketoglutarat bereits in der maximal möglichen Geschwindigkeit verläuft. Der Bedarf an Reduktionsäquivalenten müsste dann verstärkt mittels Aufnahme von Succinat und Gewinnung von  $\text{FADH}_2$  über die Succinat-Dehydrogenase gedeckt werden. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass der Rückfluss in den Succinat/Fumarat-Pool aus dem Oxalacetat/Malat-Pool vollständig zurückgegangen ist, da ein reversibler Fluss über die Succinat-Dehydrogenase  $\text{FADH}_2$  verbrauchen würde.

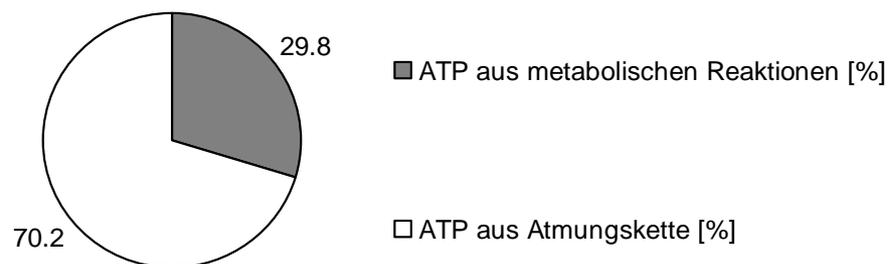
Der Vergleich des in den intrazellulären Reaktionen gewonnenen NADPH mit dem NADPH-Bedarf zeigt, dass bei *B. subtilis* QB5407 bereits die metabolischen Flüsse über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und die Isocitrat-Dehydrogenase ausreichen würden, den NADPH-Bedarf für die Biomassesynthese vollständig zu decken (Abb. 6.7.6).



**Abb. 6.7.6:** Darstellung des für die Biomassesynthese benötigten, anhand von Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) berechneten Bedarfs an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ], der maximal gebildeten Menge an NADPH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.7.5) NADPH-generierender Reaktionen, sowie der maximal gebildeten Menge an NADH [ $\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.7.5) der NADH-generierenden Reaktionen und der Synthese von Biomassebestandteilen (Dauner and Sauer, 2001) bei Wachstum von *B. subtilis* QB5407 auf Glucose, Glutamat und Succinat.

Da die Reaktion der Pyruvat-Carboxylase eine irreversible, ATP verbrauchende Reaktion darstellt, wird grundsätzlich davon ausgegangen, dass ein metabolischer Fluss in den Pyruvat-Pool über das Malatenzym verläuft (Diesterhaft and Freese, 1973). *B. subtilis* QB5407 generiert somit deutlich mehr NADPH, als die Zelle zur Biomassebildung benötigt (Abb. 6.7.6). Ebenso wie bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat (Abb.

6.5.8) zeigt sich auch bei *B. subtilis* QB5407 auf Glucose, Succinat und Glutamat ein deutlicher Überschuss an Reduktionsäquivalenten, insgesamt bildet *B. subtilis* QB5407 etwa 10,7 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] mehr NADPH als zur Biomassesyntese benötigt wird (Abb. 6.7.6). Der Überschuss an NADH beträgt sogar etwa 62,9 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>]. Bei der Berechnung der ATP-Ausbeute zeigt sich, dass die Substratkettenphosphorylierung mit einer ATP-Bildung von 13,7 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] etwa 30 % des Gesamtbedarfs an ATP von 45,8 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] deckt (Abb. 6.7.7). Zur Synthese des restlichen ATP durch oxidative Phosphorylierung müssen etwa 16,1 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] NADH aufgewendet werden, wonach sich in der Bilanz ein Gesamtüberschuss an NADH von etwa 46,8 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] ergibt. Zurückzuführen ist dieser Überschuss auf die bei *B. subtilis* QB5407 verminderte Glucoseaufnahme und den somit höheren Anteil an Glutamat am Metabolismus. Wie bereits in Kapitel 6.5.3 diskutiert wurde, muss *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Glutamat einen nicht unwesentlichen Anteil der gebildeten Reduktionsäquivalente in den Erhalt eines Transmembrangradienten zur Glutamataufnahme investieren, was sich in der Bilanzierung in einer scheinbaren Überschussproduktion an NADH, bzw. NADPH zeigt.



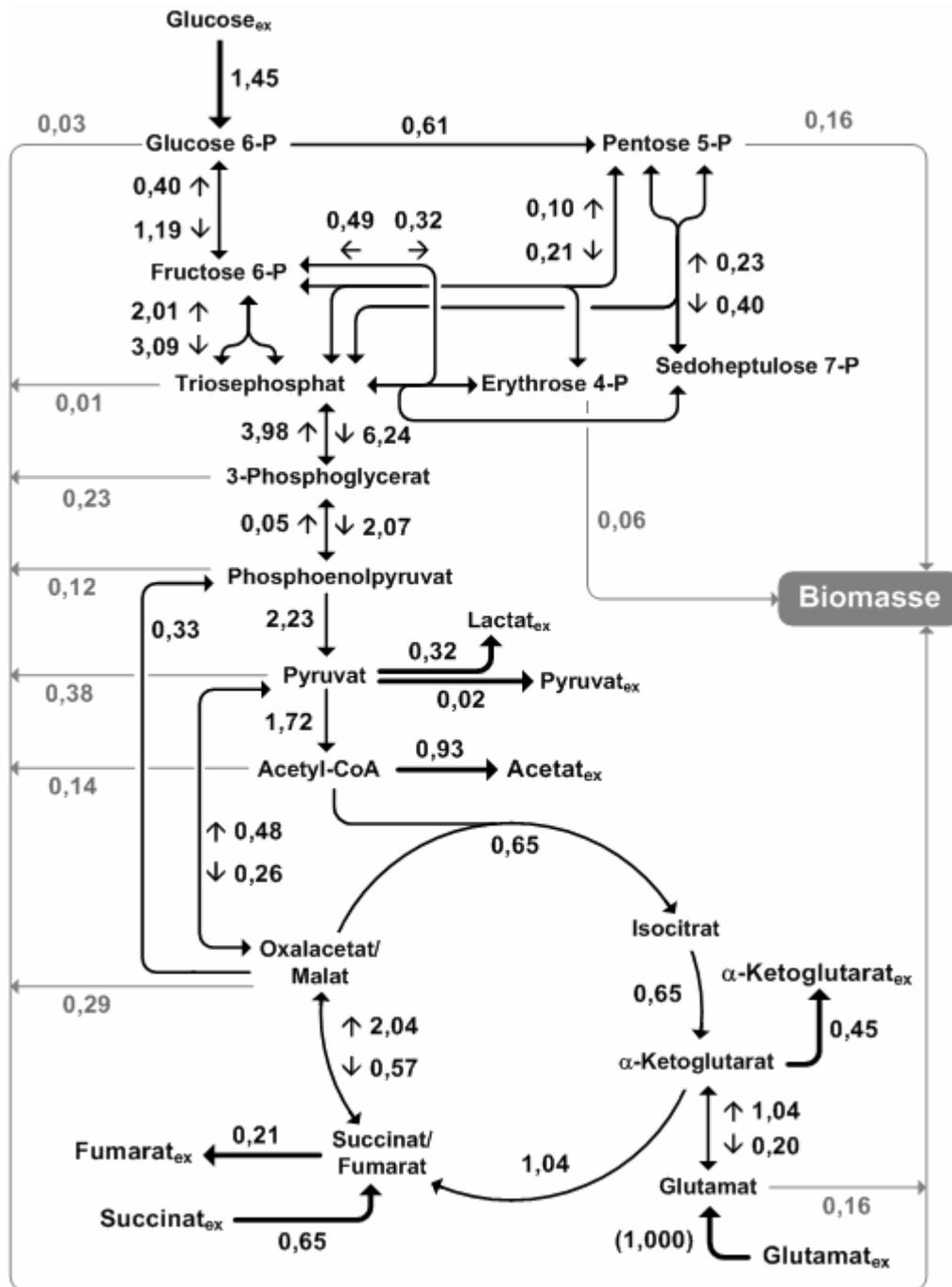
**Abb. 6.7.7:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] von Atmungskette und ATP-bildenden Reaktionen des Zentralmetabolismus an der Gesamtbildung von ATP bei Wachstum von *B. subtilis* QB5407 auf Glucose, Succinat und Glutamat.

### 6.7.3.2 Intrazelluläre Flussverteilungen von *B. subtilis* GP335 auf Glucose, Glutamat und Succinat

*B. subtilis* GP335 zeigt bei Wachstum auf Glucose, Glutamat und Succinat im Vergleich zu *B. subtilis* QB5407 deutliche Unterschiede in den intrazellulären Flussverteilungen (Abb. 6.7.8). Wie bereits bei der Betrachtung der Stöchiometrie von Wachstum und Produktbildung (Kap. 6.7.2) beobachtet wurde, ist Glucose das hauptsächlich von *B. subtilis* GP335 bevorzugte Substrat, der relative Fluss beträgt etwa das 1,5-fache der Glutamataufnahme. Somit werden bei *B. subtilis* GP335 mehr als 50% des Kohlenstoffbedarfs über Aufnahme und Phosphorylierung von Glucose durch das mittels HPr-Mutation reaktivierte PTS gedeckt.

Der relative Anteil, der aus dem Glucose-6-Phosphat-Pool in den Pentosephosphatweg fließt, beträgt bei *B. subtilis* GP335 44%, was exakt dem relativen PPP-Fluss bei *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat entspricht. Ebenso wie bei allen bisher durchgeführten Untersuchungen des Metabolismus von *Bacillus subtilis* verläuft auch bei *B. subtilis* GP335 die Nettoflussrichtung durch den Pentosephosphatweg über die Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen in Richtung des Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Fructose-6-Phosphat. Die relativen Nettoflüsse dieser Reaktionen liegen dabei ebenfalls in der gleichen Größenordnung wie bei *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat. Die relative Aktivität des Pentosephosphatwegs scheint daher bei *B. subtilis* GP335 ebenfalls wie bei dem Wildtyp 168 in erster Linie vom NADPH-Bedarf abzuhängen. Die Bilanzierung des NADPH zeigt, dass bei *B. subtilis* GP335 über die Hälfte des in den intrazellulären Reaktionen gewonnenen NADPH aus dem Fluss über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase stammt (Abb. 6.7.9).

Der Nettofluss durch die Glykolyse verläuft bei *B. subtilis* GP335 ausgehend von Glucose-6-Phosphat in Richtung Triosephosphat-Pool, wobei für die Glucosephosphat-Isomerase eine deutlich niedrigere Reversibilität beobachtet werden konnte als bei Wachstum des Wildtyps 168 auf dem gleichen Medium. Insgesamt fließen zusätzlich etwa 66% des über den oxidativen Zweig des PPP in den Ribose-5-Phosphat-Pool eingeschleusten Kohlenstoffs wieder über Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat zurück in die Glykolyse. Somit gelangen insgesamt 85% des mit der Glucose aufgenommenen Kohlenstoffs über den Triosephosphat-Pool in die untere Glykolyse. Die Flussverteilungen in Glykolyse und Pentosephosphatweg sind somit bei *B. subtilis* GP335 trotz *ccpA*-Deletion ähnlich zu denen des Wildtyps 168 bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat (Abb. 6.3.3).



**Abb. 6.7.8:** Metabolische Flusskarte von *B. subtilis* GP335 auf Glucose, Succinat und Glutamat bei 37°C. Sämtliche Flüsse sind als dimensionslose Relativwerte angegeben, normiert auf die Glutamataufnahmerate (1,000). Bei als reversibel definierten Reaktionen sind jeweils die Nett Flüsse angegeben, sowie die Reversibilitäten in eckigen Klammern. Die exakten, numerischen Werte einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz sind Tab. 9.2.2 im Anhang zu entnehmen.

Graue Pfeile: Flüsse zur Bildung von Biomasse; dicke Pfeile: extrazelluläre Flüsse;

Index „ex“: extrazelluläre Metabolite

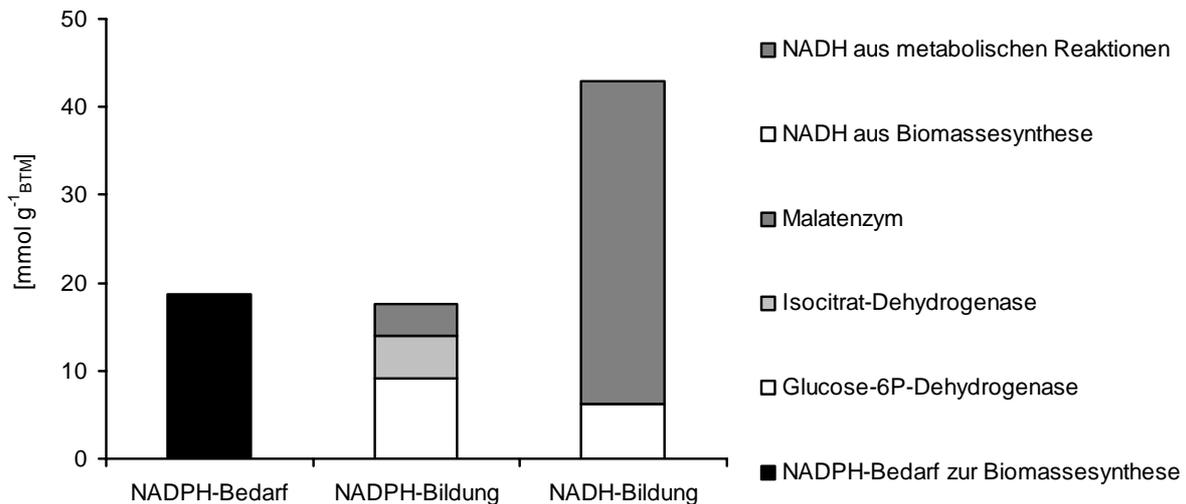
Der Phosphoenolpyruvat-Pool wird bei *B. subtilis* GP335 zu etwa 86% aus der Glykolyse gespeist, lediglich 14% entstammen der Reaktion der PEP-Carboxykinase. Die Flussverteilung um den Phosphoenolpyruvat-Pool herum spiegelt somit relativ genau das Verhältnis der Flüsse bei Wachstum des Wildtyps auf Glucose, Succinat und Glutamat wider (Abb. 6.3.3), die *ccpA*-Deletion bei *B. subtilis* GP335 scheint auf die relative Flussverteilung in diesem Bereich des Zentralmetabolismus keinen Einfluss zu haben.

Die Wiederherstellung des PTS bei *B. subtilis* GP335 führt zu einem sehr hohen metabolischen Fluss von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat. Da Pyruvat als wichtiger Schlüsselmetabolit an vielen Reaktionen beteiligt ist, hat dieser Umstand Auswirkungen auf den gesamten Zentralstoffwechsel. So lässt sich bei *B. subtilis* GP335 eine signifikante Acetat- und Lactatbildung beobachten. Der Anteil der Lactatbildung an den Flüssen aus dem Pyruvat-Pool hinaus beträgt etwa 14%, etwa 11% fließen über die Pyruvat-Carboxylase in den Oxalacetat-Pool des Krebszyklus und der größte Anteil von ca. 75% wird über die Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA umgesetzt. Abzüglich des Bedarfs zur Biomassesynthese fließen ca. 59% des gebildeten Acetyl-CoA in die Acetatbildung. Deren relativer Anteil am Acetyl-CoA ist somit bei *B. subtilis* GP335 auf Glucose, Glutamat und Succinat zwar nicht ganz so hoch wie bei Wachstum des Wildtyps auf Glucose mit 68% oder auf Glucose, Glutamat und Succinat mit 94%, jedoch lässt sich das Vorliegen eines Überflussmetabolismus bei diesem Stamm trotz *ccpA*-Deletion zweifelsfrei festhalten.

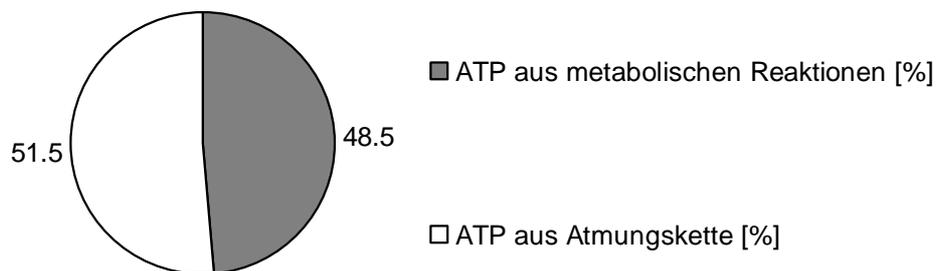
Der hohe Fluss von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat ermöglicht trotz Acetatbildung einen relativ großen Fluss von Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus. In diesem Punkt weicht *B. subtilis* GP335 deutlich von dem Wildtyp 168 ab, der Fluss in den Krebszyklus über die Citrat-Synthase umfasst in etwa 41% der gesamten metabolischen Flüsse aus dem Acetyl-CoA-Pool. Dies hat zur Folge, dass über die Isocitrat-Dehydrogenase 27,5% des Bedarfs an NADPH für die Biomassebildung gedeckt werden können (Abb. 6.7.9). Die wiederhergestellte Glucoseaufnahme bei der *ccpA*-Deletionsmutante hat auf die Flüsse durch den Tricarbonsäurezyklus den Effekt, dass die Succinataufnahme offenbar weniger relevant für das Zellwachstum ist als bei Stämmen mit unterdrücktem PTS. So hat der relative Anteil der Aufnahme extrazellulären Succinats am Krebszyklus bei *B. subtilis* GP335 gegenüber dem Stamm QB5407 deutlich abgenommen.

Die Bilanzierung des NADPH zeigt, dass der Bedarf an NADPH zur Biomassesynthese nahezu vollständig über die drei Bildungswege der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, der Isocitrat-Dehydrogenase und des Malatenzyms gedeckt werden kann (Abb. 6.7.9), lediglich 1,1 [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] NADPH müssen über Transhydrogenasen aus NADH synthetisiert werden. Die anhand der metabolischen Flüsse (Abb. 6.7.8) berechnete ATP-Bildung durch Substratkettenphosphorylierung liegt bei *B. subtilis* QB5407 mit insgesamt 25 [mmol g<sup>-1</sup><sub>BTM</sub>]

bei 48,5 % des Gesamtbedarfs an ATP (Abb. 6.7.10). Zum Ausgleich der verbleibenden 51,5 % des ATP-Bedarfs durch oxidative Phosphorylierung sind 13,3 [mmol g<sup>-1</sup><sub>BTM</sub>] NADH notwendig, was einen Gesamtüberschuss an NADH von 29,6 [mmol g<sup>-1</sup><sub>BTM</sub>] ergibt. Dieser Wert ist jedoch aufgrund der stöchiometrischen Variabilität der oxidativen Phosphorylierung lediglich näherungsweise zu betrachten.



**Abb. 6.7.9:** Darstellung des für die Biomassesynthese benötigten, anhand von Literaturdaten (Dauner and Sauer, 2001) berechneten Bedarfs an NADPH [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>], der maximal gebildeten Menge an NADPH [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.7.8) NADPH-generierender Reaktionen, sowie der maximal gebildeten Menge an NADH [mmol g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>] aus den Stoffflüssen (Abb. 6.7.8) der NADH-generierenden Reaktionen und der Synthese von Biomassebestandteilen (Dauner and Sauer, 2001) bei Wachstum von *B. subtilis* GP335 auf Glucose, Glutamat und Succinat.



**Abb. 6.7.10:** Graphische Darstellung der relativen Anteile [%] von Atmungskette und ATP bildenden Reaktionen des Zentralmetabolismus an der Gesamtbildung von ATP bei Wachstum von *B. subtilis* GP335 auf Glucose, Glutamat und Succinat.

#### 6.7.4 Die Rolle des Regulatorproteins CcpA von *Bacillus subtilis*

Das PTS wird allgemein bei Gram-positiven Bakterien und speziell bei *Bacillus subtilis* als das hauptsächliche System zur Aufnahme und Metabolisierung von Glucose betrachtet (Postma et al., 1993). *Bacillus subtilis* verfügt jedoch zusätzlich über ein weiteres System zur Glucoseaufnahme, sowie eine glucosespezifische Hexokinase, welche die ATP-abhängige Phosphorylierung freier, intrazellulärer Glucose ermöglicht (Wagner et al., 2000). Mutanten von *Bacillus subtilis*, die eine Deletion der Glucokinase enthalten, zeigen gegenüber dem Wildtyp zwar kein vermindertes Wachstum auf Glucose und anderen Kohlehydraten (Skarlatos and Dahl, 1998), die Deletion des Hexose:H<sup>+</sup>-Symporters *glcP* oder des Glucosetransportproteins *Glup* führt jedoch in beiden Fällen zu einer verminderten Glucoseaufnahme (Mesak et al., 2004; Paulsen et al., 1998).

Aufgrund der hier gemachten Beobachtungen liegt somit der Schluss nahe, dass die Metabolisierung von Glucose bei der *ccpA*-Deletionsmutante *B. subtilis* QB5407 vorwiegend über die Glucokinase verläuft, während dies bei dem Wildtyp 168 überwiegend über das PTS geschieht. Bei *B. subtilis* GP335 dagegen wurde aufgrund der bei diesem Stamm vorhandenen Deregulation der Glucoseaufnahme über das PTS ein relativer Anteil der Glucose am Gesamtsubstratverbrauch erwartet, welcher dem Wert des Wildtyps auf Glucose, Succinat und Glutamat nahe kommen oder sogar darüber liegen sollte. (Ludwig et al., 2002; Wacker et al., 2003). Tatsächlich hat der molare Fluss von Glucose an den aufgenommenen Substraten bei *B. subtilis* GP335 einen Anteil von etwa 47%, während er bei dem Wildtyp auf dem identischen Medium etwa 66% betrug. Die HPr-Kinase wirkt antagonistisch zur Phosphorylierung der Glucose durch das PTS (Kapitel 6.7.1), was bedeutet, dass eine Entkoppelung der HPr-Kinase durch Mutation ihres Substrates HPr eine höhere Glucoseaufnahme zur Folge haben müsste. Die relativ niedrige Glucoseaufnahmerate bei *B. subtilis* GP335 kann daher nicht auf einer geringen Funktionalität des PTS beruhen, vielmehr scheinen metabolische Faktoren dabei eine Rolle zu spielen.

Die Beobachtungen der letzten beiden Kapitel bestätigen somit die Funktion des PTS für das Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Glucose, allerdings spielt die Glucokinase dabei ebenfalls eine Rolle. Da sämtliche innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bei Glucoseüberschuss stattfanden, stellt die Glucokinase wohl einen Alternativweg dar, um die Versorgung von *Bacillus subtilis* unter Glucosemangelbedingungen zu gewährleisten. Dafür spricht die Koppelung der CcpA-vermittelten Katabolitenrepression an das PTS, da eine funktionelle Katabolitenrepression bei niedriger Glucosekonzentration extrem nachteilig für die Zelle wäre.

Tabelle 6.7.2 enthält eine ergänzende Auflistung der Ergebnisse der metabolischen Flussanalyse als molare Stoffflüsse [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] für charakteristische Reaktionen des

Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis*. Dabei sind die intrazellulären Stoffflüsse des Wildtypstamms 168 bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat sowie auf Succinat und Glutamat denen der beiden *ccpA*-Deletionsmutanten QB5407 und GP335 auf Glucose, Succinat und Glutamat gegenübergestellt.

**Tab. 6.7.2:** Spezifische Wachstumsraten  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ], sowie aus der metabolischen Flussanalyse resultierende, molare Stoffflüsse [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] charakteristischer Reaktionen des Zentralstoffwechsels für *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat, sowie Succinat und Glutamat, ebenso für *B. subtilis* QB5407 und GP335 jeweils auf Glucose, Succinat und Glutamat.

<i>Bacillus subtilis</i> Stamm	168	168	QB5407	GP335
<b>Kohlenstoffquellen</b> <sup>a</sup>	Glc, Suc, Glu	Suc, Glu	Glc, Suc, Glu	Glc, Suc, Glu
<b>spezifische Wachstumsrate <math>\mu</math> [<math>\text{h}^{-1}</math>]</b>	0,81	0,47	0,34	0,63
<b>molarer Fluss [<math>\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}</math>]</b>				
Glucose-6-P-Dehydrogenase	4,4	1,0	1,7	2,7
Glucose-6-P-Isomerase <sup>b</sup>	5,5	-1,2	-0,5	3,6
Pyruvat-Kinase + PTS	16,5	4,6	2,3	10,0
Lactat-Dehydrogenase	2,5	0,0	0,0	1,4
Acetat-Bildung	8,3	0,0	0,5	4,2
PEP-Carboxykinase	2,9	8,0	2,4	1,5
Pyruvat-Carboxylase	1,4	1,1	0,2	1,2
Malatenzym	n.b.	1,7	3,2	2,2
Citrat-Synthase	0,5	3,0	2,8	2,9

<sup>a</sup>: verwendete Abkürzungen: Glc = Glucose, Suc = Succinat, Glu = Glutamat

<sup>b</sup>: für die Glucosephosphat-Isomerase ist der Nettofluss in Richtung des Fructose-6-P angegeben

n.b.: nicht bestimmbar

Die relative Flussverteilung zwischen Glucosephosphat-Isomerase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase war bei *B. subtilis* 168 auf Glucose, Succinat und Glutamat zu der des Stammes GP335 zwar nahezu identisch, jedoch zeigt Tab. 6.7.2, dass der molare Fluss in den Pentosephosphatweg bei *B. subtilis* GP335 bedeutend niedriger ist als bei dem Wildtyp. Transkriptomstudien an dem Wildtyp mit und ohne Glucose sowie an *ccpA*-Deletionsmutanten mit und ohne PTS H1-Mutation zeigten, dass das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen *zwf* in *Bacillus subtilis* konstitutiv exprimiert ist und keiner Regulation durch CcpA unterliegt (Blencke et al., 2003). Für *Corynebacterium glutamicum* konnte nachgewiesen werden, dass die metabolische Aktivität der Enzyme des oxidativen Zweigs des PPP, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase über das Verhältnis der Konzentrationen an NADPH und NADP<sup>+</sup> in der Zelle

gesteuert wird (Moritz et al., 2000). Ein ähnlicher Mechanismus erscheint aufgrund der hier gemachten Beobachtungen auch bei *Bacillus subtilis* wahrscheinlich.

Die Enzyme des oberen Teils der Glykolyse, Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*), 6-Phosphofruktokinase (*pfk*) und Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (*fbaA*) sind in *Bacillus subtilis* konstitutiv exprimiert. Untersuchungen an *ccpA*-Deletionsmutanten mittels 2-D-Gelelektrophorese zeigten keinen negativen Effekt einer Deletion von CcpA auf die Enzymexpression (Tobisch et al., 1999). Des Weiteren zeigten Transkriptomstudien mit verschiedenen *ccpA*-Deletionsmutanten von *Bacillus subtilis* (Ludwig et al., 2002), dass die Induktion des *GapA*-Operons, welches die Gene für die Triosephosphat-Isomerase (*tpi*), die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gap*), die Phosphoglycerat-Kinase (*pgk*), die Phosphoglycerat-Mutase (*pgm*) und die Enolase (*eno*) enthält, bei der *ccpA*-Deletionsmutante unterdrückt ist. Die HPr-Mutation in *B. subtilis* GP335 macht die Unterdrückung der Transkription dieses Operons wieder rückgängig (Ludwig et al., 2002), allerdings konnte bei *B. subtilis* GP335 nur eine sehr geringe gluconeogenetische Aktivität beobachtet werden (Tab. 6.7.2). Literaturangaben zufolge verläuft die Gluconeogenese in *Bacillus subtilis* vorwiegend über eine Isoform der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GapB*), welche unabhängig von CcpA durch Glucose reprimiert wird (Servant et al., 2005; Yoshida et al., 2001).

Dies erklärt die in dieser Arbeit beobachtete, niedrige gluconeogenetische Aktivität des Stammes *B. subtilis* GP335. Aufgrund der hier vorliegenden Daten scheint der Regulator CcpA keine oder eine nur sehr geringe Rolle für die Regulation der Gluconeogenese zu spielen. Die Ursache für die unterschiedliche Aktivität der glykolytischen Enzyme des Wildtyps sowie der *ccpA*-Deletionsmutanten liegt vermutlich vorwiegend in der unterschiedlichen Fähigkeit begründet, Glucose aufzunehmen. Die Glucoseaufnahme selbst scheint der hauptsächliche Parameter zu sein, von welchem die Nettoflussrichtung und Stärke der an der Glykolyse beteiligten Reaktionen abhängig sind.

Eine besondere Rolle im Zentralstoffwechsel aller Mikroorganismen, welche fermentativen Stoffwechsel betreiben können nimmt der Phosphoenolpyruvat/Pyruvat-Knotenpunkt ein (Sauer and Eikmanns, 2005). Die bei GP335 sehr geringe Reversibilität in der unteren Glykolyse zwischen 3-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat lässt sich nicht durch eine geringere Induktion des *GapA*-Operons erklären (s. o.), da diese den metabolischen Fluss in beide Richtungen beeinflussen würde, sie beruht stattdessen vermutlich auf der wiederhergestellten Aktivität des PTS, wodurch sich der Bedarf an PEP zur Phosphorylierung der Glucose erhöht. Auf den metabolischen Fluss zwischen Phosphoenolpyruvat und Pyruvat hat die Deletion von *ccpA* nur bei *B. subtilis* QB5407 einen reprimierenden Einfluss, welcher durch die HPr-Mutation bei *B. subtilis* GP335 wieder

rückgängig gemacht wird (Tab. 6.7.2). Dies lässt sich gut mit der Kenntnis vereinbaren, dass die Pyruvat-Kinase (*pykA*) keiner CcpA-vermittelten Regulation durch Glucose unterliegt (Tobisch et al., 1999). Somit scheint der metabolische Fluss zwischen PEP und Pyruvat bei *Bacillus subtilis* vorwiegend auf der Aktivierung von Glucose im PTS zu beruhen, während die Pyruvat-Kinase vermutlich vorwiegend bei Wachstum auf alternativen Substraten wichtig ist.

Anhand der metabolischen Flüsse lässt sich ebenfalls die CcpA-vermittelte Aktivierung der Phosphotransacetylase (*pta*) und der Acetat-Kinase (*ackA*) beobachten (Grundy et al., 1993a; Presecan-Siedel et al., 1999). Die Expression beider Enzyme ist ohne Vorhandensein von Glucose oder bei Deletion von *ccpA* stark reprimiert (Tobisch et al., 1999). Der Stamm *B. subtilis* GP335 weist jedoch einen signifikanten Fluss in die Acetat-Bildung auf, welcher über 50% des molaren Flusses bei dem Wildtyp unter gleichen Kultivierungsbedingungen beträgt. Dies bedeutet, dass CcpA keinesfalls für die Expression der Gene der Acetatbildung essentiell ist. Ein regulatorischer Effekt konnte zwar dahingehend beobachtet werden, dass die Acetatbildung bei Deletion von *ccpA* abnimmt, vollständig unterdrückt wird sie jedoch nicht. In einer kürzlich erschienenen Studie konnte das Vorhandensein eines zweiten Regulators CodY nachgewiesen werden (Shivers et al., 2006). Dieser ist in der Lage, die Expression des für die Acetat-Kinase kodierenden Gens *ackA* einerseits unabhängig von CcpA, andererseits kumulativ mit CcpA positiv zu regulieren. Eine vollständige Induktion der Acetat-Kinase erfordert dieser Studie zufolge beide Faktoren, CcpA und CodY gemeinsam. Dies korreliert sehr gut mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, die zeigen, dass eine Deletion von *ccpA* die Acetatbildung in etwa um die Hälfte reduziert. Die stark unterdrückte Acetatbildung bei *B. subtilis* QB5407 ist daher ein Resultat der verminderten Glucoseaufnahme und eher durch metabolische Vorgänge um den Pyruvat-Knotenpunkt beeinflusst als durch regulatorische Effekte auf Transkriptionsebene. Dies gilt analog ebenso für die Bildung von Lactat, da die Lactat-Dehydrogenase ebenfalls von CcpA und CodY gemeinsam reguliert wird (Shivers et al., 2006).

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pckA*) zeigt bei Wachstum des Wildtyps *B. subtilis* 168 auf Glutamat und Succinat ohne Glucose eine sehr hohe Aktivität, während ihr Anteil am Metabolismus unter den übrigen Bedingungen deutlich geringer ist. Für dieses Enzym wurde Literaturangaben zufolge ebenfalls wie für das *GapB*-Operon eine reprimierte Expression durch Glucose nachgewiesen, welche allerdings unabhängig von CcpA ist (Blencke et al., 2003; Yoshida et al., 2001). In einer anderen Arbeit konnte ein weiteres Regulatorprotein (CcpN) identifiziert werden, welches in den Promoter-Regionen von *GapB* und *pckA* binden und deren Expression unterdrücken kann (Servant et al., 2005). Der genaue Mechanismus ist zwar noch nicht bekannt, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass diese Repression

Glucose-induziert abläuft. Es ist daher davon auszugehen, dass die niedrige Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bei dem Wildtyp 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat, sowie bei den Stämmen *B. subtilis* QB5407 und GP335 daher rührt. Dabei scheint die sehr niedrige Glucoseaufnahme bei *B. subtilis* QB5407 für eine Aktivierung der CcpN-vermittelten Katabolitenrepression bereits auszureichen.

Für das Malatenzym wurde Literaturangaben zufolge bislang keine Regulation durch CcpA nachgewiesen, *Bacillus subtilis* enthält mehrere Isoformen (*malS*, *mleA*, *maeA* und *ytsJ*), deren Transkription durch Malat induziert wird (Doan et al., 2003; Lerondel et al., 2006). Da der Anteil des Malatenzyms an der Gesamtmenge des gebildeten NADPH von 33% bei QB5407 auf ca. 20% bei GP335 absinkt, ist die Aktivität des Malatenzyms unter den hier untersuchten Bedingungen offenbar vorwiegend von metabolischen Faktoren abhängig. Vermutlich ist dabei der Eintrittspunkt der Substrate in den Metabolismus ausschlaggebend, bei Wachstum auf Glucose wird NADPH eher über den Pentosephosphatweg generiert, bei Wachstum auf Succinat und Glutamat, wäre die NADPH-Gewinnung über das Malatenzym energetisch günstiger.

Als negativer Regulator für die beiden Enzyme Citrat-Synthase *citZ* und Aconitase *citB* wurde in der Literatur das Kontrollprotein CcpC beschrieben, welches an spezifische *cre*-Sequenzen dieser beiden Gene binden kann und bei Ersatz von Glucose durch Citrat im Kulturmedium induziert wird (Jourlin-Castelli et al., 2000). Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, dass CcpA ebenfalls die Transkription von *citZ* direkt mittels Bindung an dessen *cre*-Sequenz, sowie die von *citB* indirekt über die Verfügbarkeit von Citrat, des Inducers von CcpC reguliert (Kim et al., 2002b). Zusätzlich befindet sich innerhalb der Promoterregion von *ccpC* eine *cre*-Sequenz als Bindungsstelle für CcpA, was bedeutet, dass dieses Regulatorprotein vermutlich selbst durch CcpA-vermittelte Katabolitenrepression reguliert ist (Kim et al., 2002a). Expressionsstudien zeigen, dass eine vollständige Repression der Citrat-Synthase und der Aconitase beide Regulatoren benötigt und dass die Expression von CcpC in Abwesenheit von Glucose zwar ansteigt, aber keine Repression von *citB* stattfindet (Blencke et al., 2006). Die oberste Ebene der Regulation der beiden Enzyme an der metabolischen Eintrittsstelle des Tricarbonsäurezyklus stellt CcpA dar, wohingegen CcpC auf einer unteren Ebene als spezifischer Repressor fungiert (Blencke et al., 2006). Diese durch Expressionsanalysen gewonnenen Schlussfolgerungen werden durch die in dieser Arbeit erfolgten Analysen der intrazellulären Stoffwechselflüsse eindeutig unterstützt. Eine vollständige Repression der metabolischen Flüsse über die Citrat-Synthase und Aconitase konnte nur bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose, Glutamat und Succinat beobachtet werden, während die *ccpA*-Deletion bei *B. subtilis* QB5407 und GP335 den

metabolischen Fluss in den Krebs-Zyklus auch bei wiederhergestellter Glucoseaufnahme ermöglicht.

## 7 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

---

### 7.1 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnten einige wichtige, neue Erkenntnisse über die Physiologie von *Bacillus subtilis* gewonnen werden. Es gelang, die metabolischen Flüsse innerhalb des Zentralmetabolismus bei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen zu quantifizieren und mit den Expressionsmustern beteiligter Gene in Bezug zu setzen. Eine wichtige Neuerung stellt die in dieser Arbeit durchgeführte, metabolische Flussanalyse ohne Verwendung von Glucose dar. Bisherige Arbeiten zur metabolischen Flussanalyse für Mikroorganismen allgemein und speziell für *Bacillus subtilis* betrafen entweder das Wachstum auf Glucose als alleinigem Substrat (Dauner et al., 2001a; Dauner and Sauer, 2001; Dauner et al., 2001b; Sauer et al., 1997; Sauer et al., 1998; Zamboni et al., 2005), oder das Wachstum auf Substratgemischen, wobei jedoch die Verwendung von Glucose (Dauner et al., 2002) oder Zuckeralkoholen (Zamboni and Sauer, 2004) unerlässlich war. Dieser Umstand verhinderte bislang eine detaillierte metabolische Charakterisierung von *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf organischen Säuren und Mangel an glykolytisch abbaubaren Substraten. In einem völlig neuen Ansatz unter Verwendung unterschiedlicher Kombinationen  $^{13}\text{C}$ -markierten Succinats und Glutamats gelang innerhalb dieser Arbeit erstmals die Quantifizierung intrazellulärer Flussraten ohne den Einsatz von Glucose als markiertem Substrat, was die metabolische Flussanalyse nicht nur unter Glucosemangelbedingungen, sondern auch bei Mutanten mit stark verminderter Glucoseaufnahme ermöglichte. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Untersuchung metabolischer Stoffflüsse einer Zelle bei der systembiologischen Charakterisierung eines Organismus essentiell ist und nicht mit Transkriptom- oder Proteomstudien alleine bewerkstelligt werden kann.

Besonders auffällig ist diese Tatsache bei der Betrachtung der Flussverteilung zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen haben gezeigt, dass die Zugabe von organischen Säuren wie Succinat und Glutamat bei Wachstum von *B. subtilis* auf Glucose eine deutliche Aktivitätserhöhung des Pentosephosphatwegs zur Folge hat, welche jedoch nicht von einer Expressionserhöhung der beteiligten Enzyme begleitet wird. Bei Wachstum auf Succinat und Glutamat alleine sinkt die Aktivität des Pentosephosphatwegs ab. In Anbetracht der Tatsache, dass *B. subtilis* unter diesen Bedingungen den Glucose-6-P-Pool nur durch Gluconeogenese auffüllen kann, ist die Aktivität der Glucose-6-P-Dehydrogenase allerdings immer noch relativ hoch. Die Glucose-6-P-Dehydrogenase scheint nach den hier vorliegenden Erkenntnissen eine essentielle Rolle

bei der Bildung von NADPH zu spielen, welche nicht durch das Malatenzym, die Isocitrat-Dehydrogenase oder Transhydrogenasen ausgeglichen werden kann. Diese Folgerung wird gestützt durch die Beobachtung, dass bei der *ccpA*-Deletionsmutante *B. subtilis* GP5407 aus dem Zusammenspiel der Glucose-6-P-Dehydrogenase, den Transaldolase- und Transketolase-Reaktionen sowie der Glucosephosphat-Isomerase ein Zyklus entsteht, welcher aus der Glucoseaufnahme gespeist wird und primär der Generierung von NADPH zu dienen scheint. Dieses Phänomen kann jedoch nicht aus der Deletion von CcpA resultieren, da das Verhältnis zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg bei der *ccpA*-Deletionsmutante *B. subtilis* GP335 fast exakt dem des Wildtyps bei gleichem Nährstoffangebot entspricht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen (Schilling et al., 2007) sowie frühere Transkriptomstudien an *ccpA*-Deletionsmutanten (Blencke et al., 2003) lassen eine Regulation der Glucose-6-P-Dehydrogenase auf Transkriptionsebene unwahrscheinlich erscheinen, ihre Kinetik wird vermutlich überwiegend durch die Konzentration ihres Substrates Glucose-6-P bestimmt.

Ein zentrales Thema dieser Arbeit besteht in der Untersuchung der metabolischen Vorgänge um den PEP/Pyruvat-Knotenpunkt sowie des damit zusammenhängenden Phänomens des Überflusstoffwechsels. Es hat sich gezeigt, dass sowohl der Wildtyp, als auch die *ccpA*-Deletionsmutante GP335 auf Glucose, Glutamat und Succinat signifikante Mengen an Lactat bilden. Bei Wachstum auf Glucose oder auf Succinat und Glutamat konnte dies nicht beobachtet werden. Die Transkriptionsanalyse zeigte keine erhöhte Expression der Lactat-Dehydrogenase bei Addition von Succinat und Glutamat zum Wachstum auf Glucose (Schilling et al., 2007). Die Lactat-Dehydrogenase von *Bacillus subtilis* scheint somit nicht unter der Kontrolle der CcpA-vermittelten Katabolitenrepression zu stehen. Die Ursache für das Fehlen der Lactatbildung bei Wachstum des Wildtyps auf Succinat und Glutamat, sowie bei dem Stamm QB5407 basiert daher nicht auf einem regulatorischen Vorgang auf Transkriptionsebene, was gut mit Transkriptomanalysen dieser beiden Stämme zu vereinbaren ist (Blencke et al., 2003). Vermutlich ist die Affinität der Lactat-Dehydrogenase zu ihrem Substrat Pyruvat geringer als die der übrigen am Pyruvatmetabolismus beteiligten Enzyme, so dass Lactat nur bei sehr hohen intrazellulären Konzentrationen an Pyruvat gebildet wird.

Weitere wichtige, in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnisse über den Überflusmetabolismus von *Bacillus subtilis* betreffen die Bildung von Acetat. Die Addition von Succinat und Glutamat bei Wachstum des Wildtypstammes *B. subtilis* 168 auf Glucose zeigte eine deutliche Steigerung der Acetat-Bildung, welche von einer erhöhten Expression der beteiligten Enzyme Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase begleitet wird, wobei insbesondere die Acetat-Kinase eine starke Induktion erfährt (Schilling et al., 2007). Da die Glucose-Konzentration unter beiden Bedingungen identisch war, kann die Regulation der an

der Acetat-Bildung beteiligten Gene auf Transkriptebene nicht nur von der substratspezifischen Induktion durch Glucose allein abhängig sein. *B. subtilis* 168 zeigt bei Wachstum auf Succinat und Glutamat ohne Zusatz von Glucose keinerlei Acetat-Bildung, für die *ccpA*-Deletionsmutante *B. subtilis* QB5407 konnte jedoch bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat eine geringe metabolische Aktivität der Acetat bildenden Enzyme nachgewiesen werden. Bei der *ccpA*-Deletionsmutante GP335 ist der molare Fluss in die Bildung von Acetat sogar in etwa halb so groß wie bei dem Wildtyp auf identischem Medium. Dennoch ist Transkriptomstudien zufolge bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat die Expression der Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase in *ccpA*-Deletionsmutanten gegenüber dem Wildtyp 168 stark erniedrigt (Blencke et al., 2003), woraus sich schließen lässt, dass die Regulation des Überflussmetabolismus in *Bacillus subtilis* keineswegs von der CcpA-vermittelten Induktion beteiligter Gene allein abhängt.

Die Rolle von CcpA als wichtigem, globalem Regulator des Kohlenstoffmetabolismus konnte in dieser Arbeit zwar bestätigt werden, jedoch zeigte die metabolische Charakterisierung, dass CcpA lediglich unterstützend in die Regulation des Zellstoffwechsels eingreift. Kein am Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis* beteiligter Stoffwechselweg wird durch die CcpA-vermittelte Katabolitenrepression vollständig reguliert. Besonders deutlich wird dies bei der Betrachtung der Vorgänge im Tricarbonsäurezyklus. Nur bei Wachstum des Wildtyps auf Glucose, Succinat und Glutamat konnte eine eindeutige Repression der Gene des TCA beobachtet werden, welche von den metabolischen Flüssen widerspiegelt wird. Zurückzuführen ist dies auf die Vernetzung der beiden Regulatorproteine CcpA und CcpC bei der Regulation der Citrat-Synthase und der Aconitase (Blencke et al., 2006). Wie die Fluxomanalyse des Wildtyps und der beiden *ccpA*-Deletionsmutanten gezeigt hat, ist keines der beiden Proteine alleine in der Lage, den oxidativen Teil des Tricarbonsäurezyklus vollständig zu reprimieren.

Abschließend lässt sich festhalten, dass der Zentralstoffwechsel in *Bacillus subtilis* stark in Abhängigkeit der jeweiligen Nährstoffbedingungen reguliert ist, wobei die Verfügbarkeit bestimmter Schlüsselsubstrate wie energiereicher Kohlehydrate oder Aminogruppendonatoren eine wichtige Rolle spielt. Die Anpassung des Metabolismus an spezielle Substratbedingungen geschieht einerseits aufgrund der Verfügbarkeit intrazellulärer Metabolite, andererseits durch Induktion, bzw. Repression beteiligter Enzyme, was mittels spezifischer Regulatorproteine bewerkstelligt wird. Das Regulatorprotein CcpA fungiert dabei als eine Art „Schalter“, der bei Vorhandensein von glykolytisch abbaubaren Substraten die Aufgabe besitzt, den Tricarbonsäurezyklus zu unterdrücken und gleichzeitig den metabolischen Fluss in Richtung der Acetatbildung zu lenken. Die dazu notwendigen, regulatorischen Mechanismen sind jedoch sehr komplex und die Regulation der Expression

beteiligter Enzyme wird nicht von CcpA ausschließlich, sondern im Zusammenspiel mit anderen Regulatoren bewerkstelligt.

## 7.2 Ausblick

Bis zum detaillierten Verständnis der regulatorischen Mechanismen im Zentralmetabolismus von *Bacillus subtilis* steht aufgrund der extremen Komplexität dieses Themas noch ein sehr langer Weg bevor, der möglicherweise noch Generationen von Forschern beschäftigen wird. Eine sehr wichtige Fragestellung besteht in der Klärung der Verknüpfung unterschiedlicher regulatorischer Proteine bei der Regulation des Zentralmetabolismus. Die Rolle des Proteins CcpC bei der Regulation des Tricarbonsäurezyklus war bereits Gegenstand von Untersuchungen auf Transkriptebeine (Blencke et al., 2006), jedoch stehen korrespondierende Untersuchungen der metabolischen Stoffflüsse bislang noch aus. Des Weiteren besteht in der Metabolisierung von Aminosäuren eine Verbindung zwischen dem Kohlenstoff- und dem Stickstoffmetabolismus, in welchem bei *Bacillus subtilis* ebenfalls eine Reihe von regulatorischen Proteinen vorkommt, die am Zentralmetabolismus beteiligte Gene auf Transkriptebeine in Abhängigkeit der Stickstoffquelle regulieren (Commichau et al., 2006). Die Aufklärung der Vernetzung regulatorischer Mechanismen zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus stellt daher wohl eine der größten Herausforderungen in der Zukunft dar.

Aber auch das Verständnis der CcpA-vermittelten Katabolitenrepression selbst kann bislang nicht als vollständig bezeichnet werden. Ein Hindernis bei der Charakterisierung regulatorischer Effekte der Glucose-induzierten Katabolitenrepression auf den Zentralstoffwechsel besteht darin, dass *Bacillus subtilis* bei Wachstum auf Glucose, Succinat und Glutamat seinen Energie- und Kohlenstoffbedarf immerhin noch zu 70% über die Aufnahme und Metabolisierung der Glucose deckt. Bei Reduktion der Glucose resultieren Änderungen im Zellmetabolismus alleine schon daraus, dass der Energie- und Kohlenstoffbedarf der Zelle anstatt durch Metabolisierung von Kohlehydraten über die Glykolyse nun durch Metabolisierung von organischen Säuren und Aminosäuren über den Tricarbonsäurezyklus gedeckt wird. Dies führt zu einer völligen Umkehr des Zentralmetabolismus und es ist nur eingeschränkt möglich, metabolische Effekte von den auf CcpA-vermittelter Katabolitenrepression basierenden, regulatorischen Effekten abzugrenzen. Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems besteht in der vergleichenden Charakterisierung bei Wachstum auf Substraten, die einen ähnlichen Energiegehalt und die gleichen Eintrittspunkte in den Metabolismus aufweisen, dabei allerdings verschiedene regulatorische Effekte verursachen. Eine mögliche Kombination für eine solche Untersuchung könnte in der Verwendung von Fructose und Sorbitol bestehen. Fructose wird analog zu Glucose über das

PTS aufgenommen und ist daher ebenso in der Lage, die CcpA-vermittelte Katabolitenrepression auszulösen (Martin-Verstraete et al., 1995). Der Zuckeralkohol Sorbitol dagegen kann in *Bacillus subtilis* nachgewiesenermaßen nicht über das PTS aufgenommen werden, sondern wird intrazellulär über die Sorbitol-Dehydrogenase in Fructose umgewandelt (Delobbe et al., 1975). Daher würde eine vergleichende Charakterisierung des Wildtyps auf diesen beiden Substraten vermutlich weitere Aufschlüsse über die Auswirkungen der Katabolitenrepression auf den Zentralmetabolismus geben. Zuvor muss jedoch untersucht werden, ob Sorbitol nicht ebenfalls in der Lage ist, die HPr-Kinase über den intrazellulären Level an Fructose-1,6-Bisphosphat zu stimulieren und somit die Katabolitenrepression auszulösen.

Ein eindeutiger Vorteil der Verwendung von Zuckeralkoholen besteht jedoch bei der Charakterisierung von *ccpA*-Deletionsmutanten. Da der Stamm *B. subtilis* GP5407 einen Wachstumsdefekt aufweist, der auf der Unfähigkeit beruht, Glucose über das PTS aufzunehmen, wäre Sorbitol als Substrat vermutlich sehr gut geeignet, um Glucose in weiteren Untersuchungen mit diesem Stamm zu ersetzen. Vermutlich könnten dadurch die genauen Auswirkungen der Deletion von CcpA ohne Wiederherstellung der Glucose-Aufnahme durch zusätzliche Mutation des HPr weiter untersucht werden.

Eine weitere Fragestellung besteht in der Beteiligung der Phosphotransacetylase an der Acetatbildung. Zusätzlich zu der durch die Phosphotransacetylase katalysierten Phosphorylierung von Acetyl-CoA zu Acetylphosphat kann *Bacillus subtilis* Acetylphosphat über die Pyruvat-Oxidase aus Pyruvat auch direkt bilden (Petersohn et al., 1999). Diese Tatsache führt dazu, dass auch Phosphotransacetylase-Deletionsmutanten signifikante Mengen an Acetat ausscheiden (Presecan-Siedel et al., 1999). In welchem Ausmaß die Pyruvat-Oxidase an der Acetatbildung beteiligt ist und ob sie unter dem Einfluss der Glucose-induzierten Katabolitenrepression steht, ist bislang jedoch noch völlig unklar. Da man in der metabolischen Flussanalyse nicht zwischen der Acetatbildung aus Pyruvat und Acetyl-CoA unterscheiden kann, wären zur Klärung dieser Frage die Durchführung von Expressionsanalysen sowie die Untersuchung von Pyruvat-Oxidase-Deletionsmutanten ratsam.

## 8 LITERATUR

---

### Datenbanken

- BSORF** (<http://bacillus.genome.jp/>)  
**KEGG** (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>)  
**MetaCyc** (<http://metacyc.org/>)  
**SubtiList** (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>)  
**TIGR** (<http://www.tigr.org/db.shtml>)

### Publikationen

- Ames, G. F. (1964). Uptake of Amino Acids by Salmonella Typhimurium. *Arch Biochem Biophys* 104, 1-18.
- Amoa-Awua, W. K., Terlabie, N. N. and Sakyi-Dawson, E. (2006). Screening of 42 Bacillus isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. *Int J Food Microbiol* 106, 343-7.
- Asai, K., Baik, S. H., Kasahara, Y., Moriya, S. and Ogasawara, N. (2000). Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in Bacillus subtilis. *Microbiology* 146 ( Pt 2), 263-71.
- Azevedo, E. C., Rios, E. M., Fukushima, K. and Campos-Takaki, G. M. (1993). Bacitracin production by a new strain of Bacillus subtilis. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 42, 1-7.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. and Richter, G. (2000). Biosynthesis of vitamin b2 (riboflavin). *Annu Rev Nutr* 20, 153-67.
- Becker, J., Klopprogge, C., Zelder, O., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005). Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in Corynebacterium glutamicum increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl Environ Microbiol* 71, 8587-96.
- Belitsky, B. R. and Sonenshein, A. L. (1998). Role and regulation of Bacillus subtilis glutamate dehydrogenase genes. *J Bacteriol* 180, 6298-305.
- Bell, S. C. and Turner, J. M. (1976). Bacterial catabolism of threonine. Threonine degradation initiated by L-threonine-NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Biochem J* 156, 449-58.
- Blencke, H. M., Homuth, G., Ludwig, H., Mader, U., Hecker, M. and Stülke, J. (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in Bacillus subtilis: regulation of the central metabolic pathways. *Metab Eng* 5, 133-49.

- Blencke, H. M., Reif, I., Commichau, F. M., Detsch, C., Wacker, I., Ludwig, H. and Stülke, J. (2006). Regulation of citB expression in *Bacillus subtilis*: integration of multiple metabolic signals in the citrate pool and by the general nitrogen regulatory system. *Arch Microbiol* 185, 136-46.
- Bouknight, R. R. and Sadoff, H. L. (1975). Transport of D- and L-tryptophan in *Bacillus megaterium* by an inducible permease. *J Bacteriol* 121, 65-9.
- Christensen, B. and Nielsen, J. (1999). Isotopomer analysis using GC-MS. *Metab Eng* 1, 282-90.
- Christensen, B., Gombert, A. K. and Nielsen, J. (2002). Analysis of flux estimates based on (<sup>13</sup>C)-labelling experiments. *Eur J Biochem* 269, 2795-800.
- Churchill, G. A. (2002). Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 32 Suppl, 490-5.
- Claus, D. and Berkeley, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, pp. 1105-1139.
- Commichau, F. M., Forchhammer, K. and Stülke, J. (2006). Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* 9, 167-72.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P. and Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* 182, 3072-80.
- Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M. and Bork, P. (1999). Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem J* 343 Pt 1, 115-24.
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M. L., Daran, J. M., van Gulik, W., de Winde, J. H. and Pronk, J. T. (2004). Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *J Biol Chem* 279, 9125-38.
- Dauner, M. and Sauer, U. (2000). GC-MS analysis of amino acids rapidly provides rich information for isotopomer balancing. *Biotechnol Prog* 16, 642-9.
- Dauner, M., Bailey, J. E. and Sauer, U. (2001a). Metabolic flux analysis with a comprehensive isotopomer model in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 76, 144-56.
- Dauner, M. and Sauer, U. (2001). Stoichiometric growth model for riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 76, 132-43.
- Dauner, M., Storni, T. and Sauer, U. (2001b). *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J Bacteriol* 183, 7308-17.
- Dauner, M., Sonderegger, M., Hochuli, M., Szyperski, T., Wüthrich, K., Hohmann, H. P., Sauer, U. and Bailey, J. E. (2002). Intracellular carbon fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis* during growth on two-carbon substrate mixtures. *Appl Environ Microbiol* 68, 1760-71.

- Dean, A. M. and Golding, G. B. (1997). Protein engineering reveals ancient adaptive replacements in isocitrate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3104-9.
- Delobbe, A., Chalumeau, H. and Gay, P. (1975). Existence of two alternative pathways for fructose and sorbitol metabolism in *Bacillus subtilis* Marburg. *Eur J Biochem* 51, 503-10.
- Deneer, H. G. and Spiegelman, G. B. (1987). *Bacillus subtilis* rRNA promoters are growth rate regulated in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169, 995-1002.
- Diesterhaft, M. D. and Freese, E. (1973). Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 248, 6062-70.
- Doan, T., Servant, P., Tojo, S., Yamaguchi, H., Lerondel, G., Yoshida, K., Fujita, Y. and Aymerich, S. (2003). The *Bacillus subtilis* *ywkA* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology* 149, 2331-43.
- Dopazo, J., Zanders, E., Dragoni, I., Amphlett, G. and Falciani, F. (2001). Methods and approaches in the analysis of gene expression data. *J Immunol Methods* 250, 93-112.
- Dubnau, D., Goldthwaite, C., Smith, I. and Marmur, J. (1967). Genetic mapping in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 27, 163-85.
- Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J. and Prenosil, J. E. (2003). *Biological Reaction Engineering: Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples*, 2. edn. Wiley-VCH, Weinheim.
- Engelen, K., Naudts, B., De Moor, B. and Marchal, K. (2006). A calibration method for estimating absolute expression levels from microarray data. *Bioinformatics* 22, 1251-8.
- Faires, N., Tobisch, S., Bachem, S., Martin-Verstraete, I., Hecker, M. and Stülke, J. (1999). The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1, 141-8.
- Fell, D. (1997). *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press.
- Fillinger, S., Boschi-Muller, S., Azza, S., Dervyn, E., Branlant, G. and Aymerich, S. (2000). Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J Biol Chem* 275, 14031-7.
- Fisher, S. H. and Magasanik, B. (1984a). 2-Ketoglutarate and the regulation of aconitase and histidase formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 158, 379-82.
- Fisher, S. H. and Magasanik, B. (1984b). Synthesis of oxaloacetate in *Bacillus subtilis* mutants lacking the 2-ketoglutarate dehydrogenase enzymatic complex. *J Bacteriol* 158, 55-62.
- Foerster, H. F. and Foster, J. W. (1966). Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. *J Bacteriol* 91, 1168-77.

- Frick, O. (2003). Diplomarbeit: Charakterisierung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch parallele Analytik von Metabolom und Transkriptom, *Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III*, Universität des Saarlandes.
- Frick, O. and Wittmann, C. (2005). Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative <sup>13</sup>C flux analysis. *Microb Cell Fact* 4, 30.
- Fujita, Y. and Freese, E. (1979). Purification and properties of fructose-1,6-bisphosphatase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 254, 5340-9.
- Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M. C., Jaquinod, M., Stulke, J., Deutscher, J. and Martin-Verstraete, I. (1997). The *Bacillus subtilis* crh gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8439-44.
- Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M. C., Deutscher, J. and Haiech, J. (1998). New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1823-8.
- Ghei, O. K. and Kay, W. W. (1973). Properties of an inducible C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid transport system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 114, 65-79.
- Gombert, A. K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B. and Nielsen, J. (2001). Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J Bacteriol* 183, 1441-51.
- Grundy, F. J., Waters, D. A., Allen, S. H. and Henkin, T. M. (1993a). Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J Bacteriol* 175, 7348-55.
- Grundy, F. J., Waters, D. A., Takova, T. Y. and Henkin, T. M. (1993b). Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 10, 259-71.
- Grundy, F. J., Turinsky, A. J. and Henkin, T. M. (1994). Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *J Bacteriol* 176, 4527-33.
- Henkin, T. M. (1996). The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 135, 9-15.
- Hoch, J. A. (1991). Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* 204, 305-20.
- Hood, L., Heath, J. R., Phelps, M. E. and Lin, B. (2004). Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science* 306, 640-3.
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kroger, A. and Uden, G. (2002). C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1553, 39-56.
- Jin, S., Levin, P. A., Matsuno, K., Grossman, A. D. and Sonenshein, A. L. (1997). Deletion of the *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. *J Bacteriol* 179, 4725-32.

- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M. M. and Sonenshein, A. L. (2000). CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 295, 865-78.
- Katz, E. and Demain, A. L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* 41, 449-74.
- Kiefer, P., Heinzle, E., Zelder, O. and Wittmann, C. (2004). Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol* 70, 229-39.
- Kim, H. J., Jourlin-Castelli, C., Kim, S. I. and Sonenshein, A. L. (2002a). Regulation of the *Bacillus subtilis* *ccpC* gene by *ccpA* and *ccpC*. *Mol Microbiol* 43, 399-410.
- Kim, H. J., Roux, A. and Sonenshein, A. L. (2002b). Direct and indirect roles of CcpA in regulation of *Bacillus subtilis* Krebs cycle genes. *Mol Microbiol* 45, 179-90.
- Kim, J. H., Guvener, Z. T., Cho, J. Y., Chung, K. C. and Chambliss, G. H. (1995). Specificity of DNA binding activity of the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *J Bacteriol* 177, 5129-34.
- Kitano, H. (2002). Systems biology: a brief overview. *Science* 295, 1662-4.
- Konings, W. N. and Freese, E. (1972). Amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 247, 2408-18.
- Krömer, J. O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2004). In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J Bacteriol* 186, 1769-84.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. and et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-56.
- Larsson, J. T., Rogstam, A. and von Wachenfeldt, C. (2005). Coordinated patterns of cytochrome *bd* and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 151, 3323-35.
- Lee, S. Y., Lee, D. Y. and Kim, T. Y. (2005). Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol* 23, 349-58.
- Lerondel, G., Doan, T., Zamboni, N., Sauer, U. and Aymerich, S. (2006). YtsJ has the major physiological role of the four paralogous malic enzyme isoforms in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188, 4727-36.
- Lorca, G. L., Chung, Y. J., Barabote, R. D., Weyler, W., Schilling, C. H. and Saier, M. H., Jr. (2005). Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* 187, 7826-39.

- Ludwig, H., Homuth, G., Schmalisch, M., Dyka, F. M., Hecker, M. and Stülke, J. (2001). Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol Microbiol* 41, 409-22.
- Ludwig, H. and Stülke, J. (2001). The *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA exerts all its regulatory functions by DNA-binding. *FEMS Microbiol Lett* 203, 125-9.
- Ludwig, H., Rebhan, N., Blencke, H. M., Merzbacher, M. and Stülke, J. (2002). Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol Microbiol* 45, 543-53.
- Marini, P. E., Perez, C. A. and de Mendoza, D. (2001). Growth-rate regulation of the *Bacillus subtilis* *accBC* operon encoding subunits of acetyl-CoA carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis. *Arch Microbiol* 175, 234-7.
- Martin-Verstraete, I., Stülke, J., Klier, A. and Rapoport, G. (1995). Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* 177, 6919-27.
- Matsuno, K., Blais, T., Serio, A. W., Conway, T., Henkin, T. M. and Sonenshein, A. L. (1999). Metabolic imbalance and sporulation in an isocitrate dehydrogenase mutant of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181, 3382-91.
- McCleary, W. R., Stock, J. B. and Ninfa, A. J. (1993). Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol* 175, 2793-8.
- Mesak, L. R., Mesak, F. M. and Dahl, M. K. (2004). Expression of a novel gene, *gluP*, is essential for normal *Bacillus subtilis* cell division and contributes to glucose export. *BMC Microbiol* 4, 13.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N. and Teller, A. H. (1953). Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* 21, 1087-1092.
- Miller, R. E. and Stadtman, E. R. (1972). Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein. *J Biol Chem* 247, 7407-19.
- Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M. and Fujita, Y. (2000). Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 28, 1206-10.
- Möllney, M., Wiechert, W., Kownatzki, D. and de Graaf, A. A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optimal design of isotopomer labeling experiments. *Biotechnol Bioeng* 66, 86-103.
- Moreno, M. S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W. and Saier, M. H., Jr. (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* 39, 1366-81.
- Moritz, B., Striegel, K., De Graaf, A. A. and 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. *Eur J Biochem* 267, 3442-52.

- Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P. and Clark, D. P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J Bacteriol* 179, 6749-55.
- Nazarenko, I., Pires, R., Lowe, B., Obaidy, M. and Rashtchian, A. (2002). Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Res* 30, 2089-195.
- Nielsen, J. (2001). Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 263-83.
- Niranjan, S. C. and San, K. Y. (1989). Analysis of a framework using material balances in metabolic pathways to elucidate cellular metabolism. *Biotechnol Bioeng* 34, 496-501.
- Oliver, D. J., Nikolau, B. and Wurtele, E. S. (2002). Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. *Metab Eng* 4, 98-106.
- Pasamontes, L., Hohmann, H. P. and Perkins, J. B. (2002). Industrial Bioprocess Development, Current Status and Future Outlook: Riboflavin Production as a Case Study. *Chemie Ingenieur Technik* 74, 663 - 663.
- Paulsen, I. T., Chauvaux, S., Choi, P. and Saier, M. H., Jr. (1998). Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H<sup>+</sup> symporter. *J Bacteriol* 180, 498-504.
- Petersohn, A., Antelmann, H., Gerth, U. and Hecker, M. (1999). Identification and transcriptional analysis of new members of the sigmaB regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145 ( Pt 4), 869-80.
- Piggot, P. J. and Coote, J. G. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol Rev* 40, 908-62.
- Portais, J. C. and Delort, A. M. (2002). Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can (13)C-NMR tell us? *FEMS Microbiol Rev* 26, 375-402.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57, 543-94.
- Powell, K. A., Ramer, S. W., Del Cardayre, S. B., Stemmer, W. P., Tobin, M. B., Longchamp, P. F. and Huisman, G. W. (2001). Directed Evolution and Biocatalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 3948-3959.
- Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P. and Martin-Verstraete, I. (1999). Catabolite regulation of the pta gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181, 6889-97.
- Ramaley, R. F. and Hudock, M. O. (1973). Purification and properties of isocitrate dehydrogenase (NADP) from *Thermus aquaticus* YT-1, *Bacillus subtilis*-168 and *Chlamydomonas reinhardtii*-Y-2. *Biochim Biophys Acta* 315, 22-36.
- Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier, M. H., Jr. and Hillen, W. (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* 27, 1157-69.

- Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M. H., Jr. and Stülke, J. (1999). Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 145 ( Pt 12), 3419-29.
- Renna, M. C., Najimudin, N., Winik, L. R. and Zahler, S. A. (1993). Regulation of the *Bacillus subtilis* alsS, alsD, and alsR genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* 175, 3863-75.
- Roels, J. A. (1983). *Energetics and Kinetics in Biotechnology*. Elsevier Science & Technology.
- Rosenkrantz, M. S., Dingman, D. W. and Sonenshein, A. L. (1985). *Bacillus subtilis* citB gene is regulated synergistically by glucose and glutamine. *J Bacteriol* 164, 155-64.
- Sagripani, J. L., Carrera, M., Insalaco, J., Ziemski, M., Rogers, J. and Zandomeni, R. (2007). Virulent spores of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species deposited on solid surfaces have similar sensitivity to chemical decontaminants. *J Appl Microbiol* 102, 11-21.
- Saier, M. H., Jr. (2000). Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology* 146 ( Pt 8), 1775-95.
- Saier, M. H., Jr., Goldman, S. R., Maile, R. R., Moreno, M. S., Weyler, W., Yang, N. and Paulsen, I. T. (2002). Transport capabilities encoded within the *Bacillus subtilis* genome. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 37-67.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
- Sarsero, J. P., Merino, E. and Yanofsky, C. (2000). A *Bacillus subtilis* gene of previously unknown function, yhaG, is translationally regulated by tryptophan-activated TRAP and appears to be involved in tryptophan transport. *J Bacteriol* 182, 2329-31.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H. P., Manneberg, M., van Loon, A. P. and Bailey, J. E. (1996). Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 62, 3687-96.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Hochuli, M., Szyperski, T. and Wuthrich, K. (1997). Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nat Biotechnol* 15, 448-52.
- Sauer, U., Cameron, D. C. and Bailey, J. E. (1998). Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleosides, riboflavin, and folic acid. *Biotechnol Bioeng* 59, 227-38.
- Sauer, U. and Eikmanns, B. J. (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29, 765-94.
- Schilling, O., Frick, O., Herzberg, C., Ehrenreich, A., Heinzle, E., Wittmann, C. and Stülke, J. (2007). Transcriptional and Metabolic Responses of *Bacillus subtilis* to the Availability of Organic Acids: Transcription Regulation Is Important but Not Sufficient To Account for Metabolic Adaptation. *Appl Environ Microbiol* 73, 499-507.

- Schmidt, K., Carlsen, M., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1997). Modeling Isotopomer Distributions in Biochemical Networks using Isotopomer Mapping Matrices. *Biotechnol Bioeng* 55, 831-840.
- Schmidt, K., Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Sahm, H., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1998). <sup>13</sup>C tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two approaches. *Biotechnol Bioeng* 58, 254-7.
- Schmidt, K., Norregaard, L. C., Pedersen, B., Meissner, A., Duus, J. O., Nielsen, J. O. and Villadsen, J. (1999). Quantification of intracellular metabolic fluxes from fractional enrichment and <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C coupling constraints on the isotopomer distribution in labeled biomass components. *Metab Eng* 1, 166-79.
- Seidel, G., Diel, M., Fuchsbauer, N. and Hillen, W. (2005). Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and cre in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *Febs J* 272, 2566-77.
- Servant, P., Le Coq, D. and Aymerich, S. (2005). CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA-independent catabolite repression of *Bacillus subtilis* gluconeogenic genes. *Mol Microbiol* 55, 1435-51.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101, 514-25.
- Shepherd, D. and Garland, P. B. (1969). The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J* 114, 597-610.
- Shivers, R. P., Dineen, S. S. and Sonenshein, A. L. (2006). Positive regulation of *Bacillus subtilis* ackA by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Mol Microbiol* 62, 811-22.
- Shulman, R. G. and Rothman, D. L. (2001). <sup>13</sup>C NMR of intermediary metabolism: implications for systemic physiology. *Annu Rev Physiol* 63, 15-48.
- Simic, P., Willuhn, J., Sahm, H. and Eggeling, L. (2002). Identification of glyA (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 68, 3321-7.
- Skarlatos, P. and Dahl, M. K. (1998). The glucose kinase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180, 3222-6.
- Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R. (2002). *Bacillus subtilis and its closest relatives : from genes to cells*. ASM Press.
- Spizizen, J. (1958). Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44, 1072-8.
- Stryer, L. (1996). *Biochemie*, 5 edn. Spektrum Akademischer Verlag.
- Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Zagorec, M., Rose, M., Klier, A. and Rapoport, G. (1997). Induction of the *Bacillus subtilis* ptsGHI operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* 25, 65-78.

- Stülke, J. and Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2, 195-201.
- Stülke, J. and Hillen, W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54, 849-80.
- Szyperski, T. (1998). <sup>13</sup>C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Q Rev Biophys* 31, 41-106.
- Terlabie, N. N., Sakyi-Dawson, E. and Amoa-Awua, W. K. (2006). The comparative ability of four isolates of *Bacillus subtilis* to ferment soybeans into dawadawa. *Int J Food Microbiol* 106, 145-52.
- Tobisch, S., Zuhlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J. and Hecker, M. (1999). Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181, 6996-7004.
- Tolner, B., Ubbink-Kok, T., Poolman, B. and Konings, W. N. (1995). Characterization of the proton/glutamate symport protein of *Bacillus subtilis* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177, 2863-9.
- Turinsky, A. J., Grundy, F. J., Kim, J. H., Chambliss, G. H. and Henkin, T. M. (1998). Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis* *ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J Bacteriol* 180, 5961-7.
- Turinsky, A. J., Moir-Blais, T. R., Grundy, F. J. and Henkin, T. M. (2000). *Bacillus subtilis* *ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. *J Bacteriol* 182, 5611-4.
- Urbanczyk-Wochniak, E., Luedemann, A., Kopka, J., Selbig, J., Roessner-Tunali, U., Willmitzer, L. and Fernie, A. R. (2003). Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. *EMBO Rep* 4, 989-93.
- van Hal, N. L., Vorst, O., van Houwelingen, A. M., Kok, E. J., Peijnenburg, A., Aharoni, A., van Tunen, A. J. and Keijer, J. (2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *J Biotechnol* 78, 271-80.
- Wacker, I., Ludwig, H., Reif, I., Blencke, H. M., Detsch, C. and Stülke, J. (2003). The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology* 149, 3001-9.
- Wagner, A., Kuster-Schock, E. and Hillen, W. (2000). Sugar uptake and carbon catabolite repression in *Bacillus megaterium* strains with inactivated *ptsHI*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 587-92.
- Warner, J. B. and Lolkema, J. S. (2003). CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 475-90.
- Wax, R. and Freese, E. (1968). Initiation of the germination of *Bacillus subtilis* spores by a combination of compounds in place of L-alanine. *J Bacteriol* 95, 433-8.
- Weart, R. B. and Levin, P. A. (2003). Growth rate-dependent regulation of medial FtsZ ring formation. *J Bacteriol* 185, 2826-34.

- Weickert, M. J. and Chambliss, G. H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6238-42.
- Wheeler, J. R. and Robert, P. (1983). Sterilization indicator, United States Patent 4416984.
- Wiechert, W. and de Graaf, A. A. (1997). Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks: I. Modeling and Simulation of Carbon Isotope Labeling Experiments. *Biotechnol Bioeng* 55, 101-117.
- Wiechert, W., Siefke, C., de Graaf, A. A. and Marx, A. (1997). Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks: II. Flux Estimation and Statistical Analysis. *Biotechnol Bioeng* 55, 118-135.
- Wiechert, W., Möllney, M., Isermann, N., Wurzel, M. and de Graaf, A. A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems. *Biotechnol Bioeng* 66, 69-85.
- Wiechert, W. (2001). <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Metab Eng* 3, 195-206.
- Wiechert, W., Mollney, M., Petersen, S. and de Graaf, A. A. (2001). A universal framework for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Metab Eng* 3, 265-83.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (1999). Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng* 62, 739-750.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2001a). Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacteria* by mass spectrometry. *Metab Eng* 3, 173-91.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2001b). Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: a novel approach for metabolic flux analysis. *Eur J Biochem* 268, 2441-55.
- Wittmann, C. (2002). Metabolic flux analysis using mass spectrometry. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74, 39-64.
- Wittmann, C., Hans, M. and Bluemke, W. (2002a). Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 19, 1351-63.
- Wittmann, C., Hans, M. and Heinzle, E. (2002b). In vivo analysis of intracellular amino acid labelings by GC/MS. *Anal Biochem* 307, 379-82.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2002). Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing *corynebacteria*. *Appl Environ Microbiol* 68, 5843-59.
- Wittmann, C., Kiefer, P. and Zelder, O. (2004a). Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* 70, 7277-87.
- Wittmann, C., Kim, H. M. and Heinzle, E. (2004b). Metabolic network analysis of lysine producing *Corynebacterium glutamicum* at a miniaturized scale. *Biotechnol Bioeng* 87, 1-6.

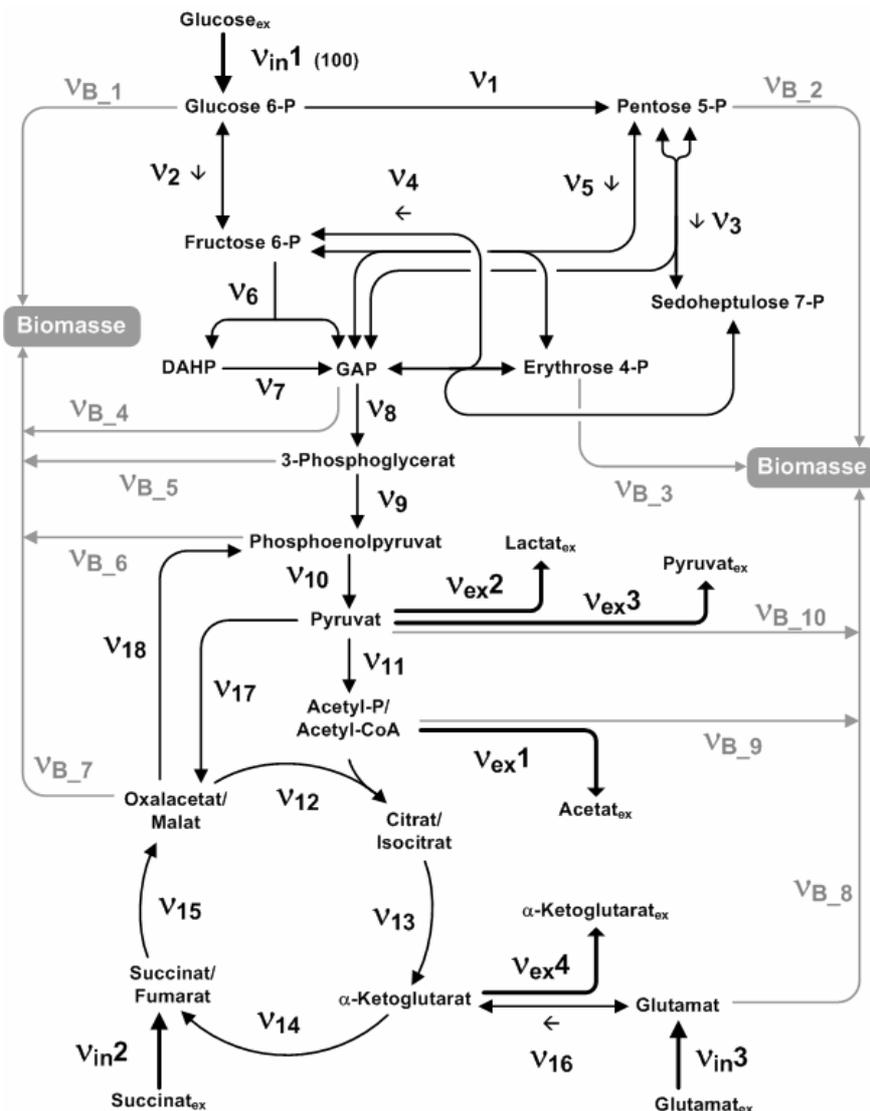
- Wittmann, C., Krömer, J. O., Kiefer, P., Binz, T. and Heinzle, E. (2004c). Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal Biochem* 327, 135-9.
- Wolfe, A. J. (2005). The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 12-50.
- Wood, T. (1986a). Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem Funct* 4, 241-7.
- Wood, T. (1986b). Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. *Cell Biochem Funct* 4, 235-40.
- Wuytack, E. Y., Soons, J., Poschet, F. and Michiels, C. W. (2000). Comparative study of pressure- and nutrient-induced germination of *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol* 66, 257-61.
- Yang, T. H., Wittmann, C. and Heinzle, E. E. (2004). Metabolic network simulation using logical loop algorithm and Jacobian matrix. *Metab Eng* 6, 256-67.
- Yang, T. H., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005). Theoretical aspects of  $^{13}\text{C}$  metabolic flux analysis with sole quantification of carbon dioxide labeling. *Comput Biol Chem* 29, 121-33.
- Yang, T. H. (2006). Dissertation: In vivo Respirometric  $^{13}\text{C}$  Flux Analysis - Design, Modeling, Optimization and Application, *Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes*.
- Yang, T. H., Frick, O. and Heinzle, E. (2007). Hybrid Optimization for  $^{13}\text{C}$  Metabolic Flux Network Parametrized by Compactification. *J. Comput. Biol.* submitted.
- Yang, Y. T., Aristidou, A. A., San, K. Y. and Bennett, G. N. (1999). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* deficient in the acetate production pathway and expressing the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase. *Metab Eng* 1, 26-34.
- Yashphe, J., Hoch, J. A. and Kaplan, N. O. (1978). Regulation of lactate dehydrogenase synthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* 544, 1-7.
- Ye, J. J. and Saier, M. H., Jr. (1996). Regulation of sugar uptake via the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems in *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* is mediated by ATP-dependent phosphorylation of seryl residue 46 in HPr. *J Bacteriol* 178, 3557-63.
- Ye, R. W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M. and Li, L. (2000). Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J Bacteriol* 182, 4458-65.
- Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C. M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T. and Fujita, Y. (2001). Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 29, 683-92.

- Zamboni, N., Maaheimo, H., Szyperski, T., Hohmann, H. P. and Sauer, U. (2004). The phosphoenolpyruvate carboxykinase also catalyzes C3 carboxylation at the interface of glycolysis and the TCA cycle of *Bacillus subtilis*. *Metab Eng* 6, 277-84.
- Zamboni, N. and Sauer, U. (2004). Model-independent fluxome profiling from 2H and 13C experiments for metabolic variant discrimination. *Genome Biol* 5, R99.
- Zamboni, N., Fischer, E., Muffler, A., Wyss, M., Hohmann, H. P. and Sauer, U. (2005). Transient expression and flux changes during a shift from high to low riboflavin production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 89, 219-32.
- Zupke, C. and Stephanopoulos, G. (1994). Modeling of Isotope Distributions and Intracellular Fluxes in Metabolic Networks using Atom Mapping Matrices. *Biotechnol Prog* 10, 489-498.

## 9 ANHANG

### 9.1 Metabolische Netzwerke

#### 9.1.1 Stöchiometrisches Netzwerk zur metabolischen Flussanalyse von *B. subtilis* 168 auf Glucose, sowie auf Glucose, Succinat und Glutamat



**Abb. 9.1.1:** Metabolisches Netzwerk des Zentralstoffwechsels von *Bacillus subtilis* zur metabolischen Flussanalyse von *B. subtilis* 168 auf Glucose, sowie auf Glucose, Succinat und Glutamat. Das Netzwerk enthält für 16 intrazelluläre Metabolite Stoffbilanzen, welche insgesamt 18 intrazelluläre, mittels Parameter-Schätzung bestimmbare Flüsse ( $v$ ,  $v_i$ ), 7 extrazelluläre Flüsse ( $v_{\text{in}}$ ,  $v_{\text{ex}}$ ) und 10 anabole Flüsse ( $v_B$ ) umfassen (Schilling et al., 2007).

Die stöchiometrischen Bilanzen für die 16 in Abb. 10.1.2 dargestellten Metabolite sind wie folgt definiert:

$$\text{Glucose-6P: } v_{in}1 - v_1 - v_2 - v_{B\_1} = 0$$

$$\text{Pentose-5P: } v_1 - 2 \cdot v_3 - v_5 - v_{B\_2} = 0$$

$$\text{Erythrose-4P: } v_4 - v_5 - v_{B\_3} = 0$$

$$\text{Sedoheptulose-7P: } v_3 - v_4 = 0$$

$$\text{Fructose-6P: } v_2 + v_4 + v_5 - v_6 = 0$$

$$\text{Dihydroxyacetonphosphat: } v_6 - v_7 = 0$$

$$\text{Glycerinaldehyd-3P: } v_3 + v_5 + v_6 + v_7 - v_4 - v_{B\_4} = 0$$

$$\text{3-Phosphoglycerat: } v_8 - v_9 - v_{B\_5} = 0$$

$$\text{Phosphoenolpyruvat: } v_9 + v_{18} - v_{10} - v_{B\_6} = 0$$

$$\text{Pyruvat: } v_{10} - v_{11} - v_{17} - v_{ex}2 - v_{ex}3 - v_{B\_10} = 0$$

$$\text{Acetyl-CoA: } v_{11} - v_{12} - v_{ex}1 - v_{B\_9} = 0$$

$$\text{Isocitrat: } v_{12} - v_{13} = 0$$

$$\alpha\text{-Ketoglutarat: } v_{13} + v_{16} - v_{14} - v_{ex}4 = 0$$

$$\text{Glutamat: } v_{in}3 - v_{16} - v_{B\_8} = 0$$

$$\text{Succinat: } v_{in}2 + v_{14} - v_{15} = 0$$

$$\text{Oxalacetat: } v_{15} + v_{17} - v_{12} - v_{18} - v_{B\_7} = 0$$

Dabei ist zu beachten, dass alle in dem Modell enthaltenen Flüsse als richtungsgebundene Nettoflüsse definiert sind. Zur Berechnung der Reversibilitäten ( $\zeta$ ) der Glucose-Isomerase, Transketolase und Transaldolase-Reaktionen wurden zusätzlich folgende Parameter definiert:

$$\text{Glucose-Isomerase: } \zeta_{PGI} = \frac{v_{r2}}{v_2}$$

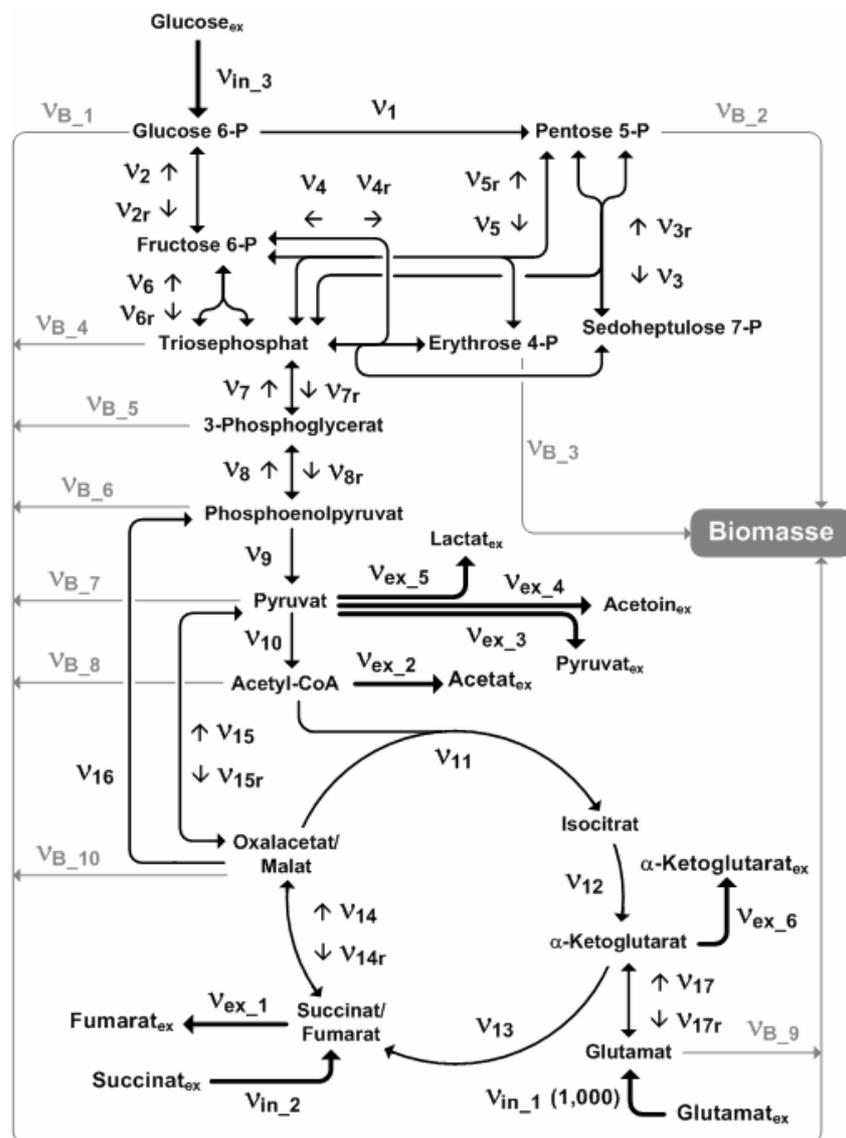
$$\text{Transketolase-Reaktion 1: } \zeta_{TK1} = \frac{v_{r3}}{v_3}$$

$$\text{Transketolase-Reaktion 2: } \zeta_{TK2} = \frac{v_{r4}}{v_4}$$

Transaldolase:  $\zeta_{TA} = \frac{v_{r5}}{v_5}$ ,

wobei der Parameter  $v_r$  jeweils den Rückfluss und  $v$  den Nettofluss über diese Reaktion bezeichnet.

### 9.1.2 Stöchiometrisches Netzwerk zur metabolischen Flussanalyse von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat, sowie von *B. subtilis* QB5407 und GP335 auf Glucose, Succinat und Glutamat



**Abb. 9.1.2:** Metabolisches Netzwerk des Zentralstoffwechsels von *Bacillus subtilis* zur metabolischen Flussanalyse von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat sowie für *B. subtilis* QB5407 und GP335 auf Glucose, Succinat und Glutamat. Das Netzwerk enthält für 15 intrazelluläre Metabolite Stoffbilanzen, welche insgesamt 27 intrazelluläre, mittels Parameter-Schätzung bestimmbare Flüsse ( $v$ ,  $v_r$ ), 9 extrazelluläre Flüsse ( $v_{in}$ ,  $v_{ex}$ ) und 10 anabole Flüsse ( $v_B$ ) umfassen (Yang et al., 2007).

Die stöchiometrischen Bilanzen für die 15 in Abb. 9.1.2 dargestellten Metabolite sind wie folgt definiert:

$$\text{Glucose-6P: } v_{in\_3} + v_2 - v_{2r} - v_1 - v_{B\_1} = 0$$

$$\text{Pentose-5P: } v_1 + 2 \cdot v_{3r} + v_{5r} - 2 \cdot v_3 - v_5 - v_{B\_2} = 0$$

$$\text{Erythrose-4P: } v_4 + v_{5r} - v_{4r} - v_5 - v_{B\_3} = 0$$

$$\text{Sedoheptulose-7P: } v_3 + v_{4r} - v_{3r} - v_4 = 0$$

$$\text{Fructose-6P: } v_{2r} + v_4 + v_5 + v_6 - v_2 - v_{4r} - v_{5r} - v_{6r} = 0$$

$$\text{Triosephosphat: } v_3 + v_{4r} + v_5 + 2 \cdot v_{6r} + v_7 - v_{3r} - v_4 - v_{5r} - 2 \cdot v_6 - v_{7r} - v_{B\_4} = 0$$

$$\text{3-Phosphoglycerat: } v_{7r} + v_8 - v_7 - v_{8r} - v_{B\_5} = 0$$

$$\text{Phosphoenolpyruvat: } v_{8r} + v_{16} - v_8 - v_9 - v_{B\_6} = 0$$

$$\text{Pyruvat: } v_9 + v_{15} - v_{10} - v_{15r} - v_{ex\_3} - v_{ex\_4} - v_{ex\_5} - v_{B\_7} = 0$$

$$\text{Acetyl-CoA: } v_{10} - v_{11} - v_{ex\_2} - v_{B\_8} = 0$$

$$\text{Isocitrat: } v_{11} - v_{12} = 0$$

$$\alpha\text{-Ketoglutarat: } v_{12} + v_{17} - v_{13} - v_{17r} - v_{ex\_6} = 0$$

$$\text{Glutamat: } v_{in\_1} + v_{17r} - v_{17} - v_{B\_9} = 0$$

$$\text{Succinat: } v_{in\_2} + v_{13} + v_{14r} - v_{14} - v_{ex\_1} = 0$$

$$\text{Oxalacetat: } v_{14} + v_{15r} - v_{11} - v_{14r} - v_{15} - v_{16} - v_{B\_10} = 0$$

## 9.2 Metabolische Flüsse

**Tab. 9.2.1:** Relative Werte der intrazellulären sowie der gemessenen extrazellulären Stoffflüsse als Dezimalzahl bezogen auf die Glucoseaufnahme (1,000), sowie berechnete Reversibilitäten ( $\zeta$ ) bei Wachstum von *B. subtilis* 168 auf Glucose sowie auf Glucose, Succinat und Glutamat (Glc+Suc+Glu) mit Angabe der Intervalle für 90 % Konfidenz.

<i>B. subtilis</i> 168		Glucose		Glc+Suc+Glu	
Nettofluss	Mittelwert	Intervall für 90% Konfidenz <sup>a</sup>	Mittelwert	Intervall für 90% Konfidenz <sup>a</sup>	
$v_{in1}$	1.000	[0.969 ; 1.031]	1.000	[0.965 ; 1.035]	
$v_{in2}$	0.000	n.b.	0.094	[0.086 ; 0.102]	
$v_{in3}$	0.000	n.b.	0.419	[0.386 ; 0.452]	
$v_1$	0.332	[0.241 ; 0.423]	0.437	[0.350 ; 0.524]	
$v_2$	0.644	[0.553 ; 0.735]	0.548	[0.461 ; 0.635]	
$v_3$	0.093	[0.063 ; 0.123]	0.124	[0.095 ; 0.153]	
$v_4$	0.059	[0.029 ; 0.089]	0.085	[0.056 ; 0.114]	
$v_5$	0.093	[0.063 ; 0.123]	0.124	[0.095 ; 0.153]	
$v_6$	0.796	[0.764 ; 0.828]	0.756	[0.711 ; 0.801]	
$v_7$	0.796	[0.764 ; 0.828]	0.756	[0.711 ; 0.801]	
$v_8$	1.639	[1.600 ; 1.679]	1.593	[1.508 ; 1.678]	
$v_9$	1.510	[1.345 ; 1.675]	1.442	[1.338 ; 1.546]	
$v_{10}$	1.546	[1.497 ; 1.595]	1.654	[1.452 ; 1.856]	
$v_{11}$	0.945	[0.846 ; 1.044]	0.959	[0.773 ; 1.145]	
$v_{12}$	0.271	[0.115 ; 0.427]	0.053	[-0.102 ; 0.208]	
$v_{13}$	0.271	[0.115 ; 0.427]	0.053	[-0.102 ; 0.208]	
$v_{14}$	0.174	[0.014 ; 0.334]	0.304	[0.139 ; 0.469]	
$v_{15}$	0.174	[0.014 ; 0.334]	0.399	[0.233 ; 0.565]	
$v_{16}$	0.000	n.b.	0.315	[0.276 ; 0.354]	
$v_{17}$	0.363	[0.206 ; 0.520]	0.136	[0.016 ; 0.256]	
$v_{18}$	0.104	[-0.045 ; 0.253]	0.293	[0.156 ; 0.430]	
$v_{ex1}$	0.581	[0.433 ; 0.729]	0.829	[0.576 ; 1.082]	
$v_{ex2}$	0.000	n.b.	0.248	[0.182 ; 0.314]	
$v_{ex3}$	0.015	[0.011 ; 0.019]	0.061	[0.044 ; 0.078]	
$v_{ex4}$	0.005	[0.004 ; 0.007]	0.064	[0.046 ; 0.082]	
Reversibilität <sup>b</sup>	Mittelwert	Intervall für 90% Konfidenz <sup>a</sup>	Mittelwert	Intervall für 90% Konfidenz <sup>a</sup>	
$\zeta_{PGI}$	1.897	[-2.083 ; 5.878]	2.989	[-0.882 ; 6.859]	
$\zeta_{TK1}$	0.124	[-0.333 ; 0.582]	0.791	[-0.332 ; 1.914]	
$\zeta_{TK2}$	0.169	[-0.409 ; 0.747]	0.000	[-0.003 ; 0.004]	
$\zeta_{TA}$	0.722	[-1.878 ; 3.323]	0.003	[-0.044 ; 0.050]	

<sup>a</sup> Die Konfidenzintervalle wurden mittels der Monte-Carlo-Methode ermittelt, wobei in 100 unabhängigen Parameterschätzungen die Markierungsdaten statistisch variiert wurden und eine Normalverteilung der experimentellen Fehler angenommen wurde.

<sup>b</sup> Die Reversibilität wurde definiert als Quotient aus Rückfluss und Nettofluss

n.b. : nicht bestimmbar

**Tab. 9.2.2:** Relative Werte der intrazellulären Stoffflüsse, sowie der gemessenen extrazellulären Flüsse als Dezimalzahl bezogen auf die normierte Glutamataufnahme (1,000) von *B. subtilis* 168 auf Succinat und Glutamat (Suc,Glu), sowie von *B. subtilis* QB5407 und GP335 auf Glucose, Succinat und Glutamat (Glc,Suc,Glu) mit Angabe der Intervalle für 90 % Konfidenz.

Stamm C-Quelle	<i>B. subtilis</i> 168		<i>B. subtilis</i> QB5407		<i>B. subtilis</i> GP335	
	Suc,Glu		Glc,Suc,Glu		Glc,Suc,Glu	
Fluss	Mittelwert	Intervall für 90% Konfidenz <sup>a</sup>	Mittelwert	Intervall für 90% Konfidenz <sup>a</sup>	Mittelwert	Intervall für 90% Konfidenz <sup>a</sup>
v <sub>in</sub> 2	1.198	[1.184 ; 1.212]	1.077	[0.886 ; 1.268]	0.646	[0.568 ; 0.724]
v <sub>in</sub> 3	0.000	n.b.	0.405	[0.358 ; 0.451]	1.445	[1.358 ; 1.532]
v1	0.209	[0.157 ; 0.260]	0.485	[0.423 ; 0.547]	0.614	[0.548 ; 0.680]
v2	1.528	[-0.933 ; 3.989]	0.140	[0.043 ; 0.236]	0.396	[0.143 ; 0.649]
v3	1.159	[-1.760 ; 4.077]	0.949	[0.812 ; 1.087]	0.400	[-0.019 ; 0.819]
v4	0.114	[0.044 ; 0.183]	0.141	[-1.498 ; 1.780]	0.494	[0.071 ; 0.917]
v5	0.093	[0.062 ; 0.125]	0.093	[0.052 ; 0.134]	0.210	[0.085 ; 0.335]
v6	0.956	[-0.663 ; 2.576]	0.906	[0.565 ; 1.246]	2.008	[-0.270 ; 4.287]
v7	1.393	[0.362 ; 2.424]	1.717	[1.038 ; 2.396]	3.985	[0.887 ; 7.082]
v8	4.099	[2.134 ; 6.065]	3.125	[1.035 ; 5.214]	0.046	[-0.537 ; 0.630]
v9	0.963	[0.683 ; 1.243]	0.638	[0.485 ; 0.791]	2.228	[1.939 ; 2.518]
v10	0.791	[0.771 ; 0.810]	1.110	[1.020 ; 1.200]	1.721	[1.672 ; 1.771]
v11	0.631	[0.611 ; 0.652]	0.787	[0.697 ; 0.876]	0.647	[0.611 ; 0.683]
v12	0.631	[0.611 ; 0.652]	0.787	[0.697 ; 0.876]	0.647	[0.611 ; 0.683]
v13	1.492	[1.469 ; 1.514]	1.454	[1.364 ; 1.544]	1.035	[0.982 ; 1.089]
v14	3.919	[2.590 ; 5.248]	2.509	[-1.214 ; 6.233]	2.044	[-0.736 ; 4.823]
v15	0.360	[0.146 ; 0.574]	0.879	[0.810 ; 0.947]	0.479	[0.244 ; 0.715]
v16	1.671	[1.387 ; 1.955]	0.669	[0.602 ; 0.737]	0.326	[0.039 ; 0.613]
v17	3.308	[3.114 ; 3.502]	0.861	[0.458 ; 1.264]	1.044	[-0.850 ; 2.937]
v2r	1.277	[-1.187 ; 3.742]	0.000	[0.000 ; 0.000]	1.193	[0.938 ; 1.448]
v3r	1.113	[-1.806 ; 4.032]	0.809	[0.686 ; 0.931]	0.229	[-0.193 ; 0.652]
v4r	0.067	[0.002 ; 0.133]	0.001	[-1.620 ; 1.622]	0.324	[-0.093 ; 0.741]
v5r	0.094	[0.051 ; 0.136]	0.000	[-0.035 ; 0.035]	0.098	[-0.030 ; 0.227]
v6r	0.752	[-0.870 ; 2.374]	1.000	[0.604 ; 1.396]	3.089	[0.811 ; 5.366]
v7r	0.962	[-0.068 ; 1.993]	1.968	[1.314 ; 2.595]	6.242	[3.140 ; 9.344]
v8r	3.491	[1.523 ; 5.459]	3.197	[1.130 ; 5.264]	2.071	[1.496 ; 2.647]
v14r	1.249	[-0.096 ; 2.594]	0.000	[-3.728 ; 3.728]	0.568	[-2.202 ; 3.337]
v15r	0.218	[0.025 ; 0.411]	0.057	[0.017 ; 0.097]	0.262	[0.182 ; 0.342]
v17r	2.439	[2.244 ; 2.634]	0.000	[-0.403 ; 0.403]	0.203	[-1.691 ; 2.098]
v <sub>ex</sub> 1	0.020	[0.019 ; 0.021]	0.020	[0.018 ; 0.021]	0.206	[0.195 ; 0.216]
v <sub>ex</sub> 2	0.012	[0.011 ; 0.013]	0.127	[0.117 ; 0.136]	0.933	[0.882 ; 0.985]
v <sub>ex</sub> 3	0.000	n.b.	0.013	[0.012 ; 0.014]	0.023	[0.014 ; 0.032]
v <sub>ex</sub> 4	0.000	n.b.	0.000	n.b.	0.000	n.b.
v <sub>ex</sub> 5	0.000	n.b.	0.000	n.b.	0.319	[0.300 ; 0.339]
v <sub>ex</sub> 6	0.009	[0.007 ; 0.011]	0.193	[0.180 ; 0.206]	0.452	[0.384 ; 0.520]

<sup>a</sup> Die Konfidenzintervalle wurden mittels der Monte-Carlo-Methode ermittelt, wobei in insgesamt 200 unabhängigen Parameterschätzungen die Markierungsdaten statistisch variiert wurden und eine Normalverteilung der experimentellen Fehler angenommen wurde.

n.b. : nicht bestimmbar

### 9.3 Massenisotopomerverteilungen

**Tab. 9.3.1:** In den Simulationen berechnete, sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose (die aufgeführten Daten entsprechen den in Abb. 6.2.2 dargestellten Werten).

Analysierte Metabolite	Massenisotopomerfraktionen		
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
Alanin ( <i>m/z</i> 260, C <sub>1-3</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.4626	0.3937	0.1099
gemessen <sup>b</sup>	0.4623	0.3976	0.1104
Valin ( <i>m/z</i> 288, C <sub>1-5</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.2804	0.4155	0.2198
gemessen <sup>b</sup>	0.2793	0.4188	0.2189
Threonin ( <i>m/z</i> 404, C <sub>1-4</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.3054	0.3879	0.2058
gemessen <sup>b</sup>	0.3052	0.3852	0.2058
Aspartat ( <i>m/z</i> 418, C <sub>1-4</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.3048	0.3872	0.2061
gemessen <sup>b</sup>	0.3032	0.3912	0.2053
Glutamat ( <i>m/z</i> 432, C <sub>1-5</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.2048	0.3646	0.2640
gemessen <sup>b</sup>	0.204	0.3644	0.2642
Lysin ( <i>m/z</i> 431, C <sub>1-6</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.1923	0.3567	0.2708
gemessen <sup>b</sup>	0.1982	0.3518	0.2674
Phenylalanin ( <i>m/z</i> 336, C <sub>1-9</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.2396	0.3946	0.2476
gemessen <sup>b</sup>	0.2389	0.3942	0.2477
Tyrosin ( <i>m/z</i> 466, C <sub>1-9</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.2063	0.3641	0.2616
gemessen <sup>b</sup>	0.2071	0.3645	0.2621

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten metabolischen Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS-Analytik der TBDMS-derivatisierten Aminosäuren erhalten.

**Tab. 9.3.2:** In den Simulationen berechnete, sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf Glucose, Glutamat und Succinat (die aufgeführten Daten entsprechen den in Abb. 6.3.2 dargestellten Werten).

Analysierte Metabolite	Massenisotopomerfraktionen		
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>
Alanin ( <i>m/z</i> 260, C <sub>1-3</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.5157	0.3553	0.1000
gemessen <sup>b</sup>	0.5165	0.3568	0.0983
Valin ( <i>m/z</i> 288, C <sub>1-5</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.3450	0.4042	0.1833
gemessen <sup>b</sup>	0.3444	0.4053	0.1831
Threonin ( <i>m/z</i> 404, C <sub>1-4</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.5597	0.2734	0.1230
gemessen <sup>b</sup>	0.5598	0.2732	0.1224
Aspartat ( <i>m/z</i> 418, C <sub>1-4</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.5586	0.2729	0.1239
gemessen <sup>b</sup>	0.5562	0.2746	0.1240
Glutamat ( <i>m/z</i> 432, C <sub>1-5</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.6288	0.2312	0.107
gemessen <sup>b</sup>	0.6286	0.2313	0.1065
Lysin ( <i>m/z</i> 431, C <sub>1-6</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.3758	0.3656	0.1728
gemessen <sup>b</sup>	0.374	0.367	0.1741
Phenylalanin ( <i>m/z</i> 336, C <sub>1-9</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.2478	0.3847	0.2449
gemessen <sup>b</sup>	0.2424	0.3943	0.2433
Tyrosin ( <i>m/z</i> 466, C <sub>1-9</sub> )			
simuliert <sup>a</sup>	0.2134	0.3564	0.2586
gemessen <sup>b</sup>	0.2123	0.3630	0.2558

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten metabolischen Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS-Analytik der TBDMS-derivatisierten Aminosäuren erhalten.

**Tab. 9.3.3:** In den Simulationen berechnete, sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und Glutamat (die aufgeführten Daten entsprechen den in Abb. 6.5.5 (A) dargestellten Werten).

Analysierte Metabolite	Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
Alanin ( <i>m/z</i> 260, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3593	0.1031	0.4738	0.0638			
gemessen <sup>b</sup>	0.3601	0.0995	0.4753	0.0651			
Glycin ( <i>m/z</i> 246, C <sub>1-2</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.4239	0.4658	0.1103				
gemessen <sup>b</sup>	0.4216	0.4710	0.1074				
Valin ( <i>m/z</i> 288, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.1343	0.0910	0.3646	0.1426	0.2370	0.0307	
gemessen <sup>b</sup>	0.1482	0.0828	0.3609	0.1297	0.2488	0.0296	
Serin ( <i>m/z</i> 390, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3574	0.1099	0.4687	0.0640			
gemessen <sup>b</sup>	0.3295	0.1684	0.4283	0.0739			
Threonin ( <i>m/z</i> 404, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3481	0.0694	0.4876	0.0468	0.0481		
gemessen <sup>b</sup>	0.3461	0.0645	0.5027	0.0389	0.0479		
Aspartat ( <i>m/z</i> 418, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3481	0.0694	0.4876	0.0468	0.0481		
gemessen <sup>b</sup>	0.3454	0.0678	0.4959	0.0410	0.0498		
Glutamat ( <i>m/z</i> 432, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.7201	0.0621	0.1026	0.0399	0.0666	0.0087	
gemessen <sup>b</sup>	0.7226	0.0624	0.1011	0.0370	0.0681	0.0088	
Phenylalanin ( <i>m/z</i> 336, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.0354	0.0495	0.1628	0.1621	0.2410	0.1659	0.1223
gemessen <sup>b</sup>	0.0419	0.0443	0.1647	0.1436	0.2476	0.1593	0.1344
Tyrosin ( <i>m/z</i> 466, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.0354	0.0495	0.1628	0.1621	0.2410	0.1659	0.1223
gemessen <sup>b</sup>	0.0492	0.0433	0.1580	0.1402	0.2475	0.1581	0.1340
Histidin ( <i>m/z</i> 440, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.1226	0.1778	0.2895	0.2373	0.1358	0.0342	0.0027
gemessen <sup>b</sup>	0.1079	0.1651	0.2269	0.2636	0.1753	0.0556	0.0055
Glucose ( <i>m/z</i> 612, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.1181	0.1104	0.3205	0.1840	0.2060	0.0565	0.0043
gemessen <sup>b</sup>	0.1182	0.1116	0.3145	0.1875	0.2115	0.0541	0.0026

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten metabolischen Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS-Analytik der TBDMS-derivatisierten Aminosäuren erhalten.

**Tab. 9.3.4:** In den Simulationen berechnete, sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *B. subtilis* 168 bei Wachstum auf [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat (die aufgeführten Daten entsprechen den in Abb. 6.5.5 (B) dargestellten Werten).

Analysierte Metabolite	Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
Alanin ( <i>m/z</i> 260, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3845	0.5989	0.0162	0.0004			
gemessen <sup>b</sup>	0.3852	0.5969	0.0169	0.0009			
Glycin ( <i>m/z</i> 246, C <sub>1-2</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3920	0.5969	0.0111				
gemessen <sup>b</sup>	0.3926	0.5968	0.0106				
Valin ( <i>m/z</i> 288, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3722	0.5916	0.0345	0.0017	0.0000	0.0000	
gemessen <sup>b</sup>	0.3667	0.6060	0.0260	0.0008	0.0002	0.0003	
Serin ( <i>m/z</i> 390, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3846	0.5952	0.0194	0.0008			
gemessen <sup>b</sup>	0.3793	0.6081	0.0126	0.0000			
Threonin ( <i>m/z</i> 404, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.2196	0.3594	0.4121	0.0088	0.0001		
gemessen <sup>b</sup>	0.2115	0.3339	0.4462	0.0083	0.0000		
Aspartat ( <i>m/z</i> 418, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.2196	0.3594	0.4121	0.0088	0.0001		
gemessen <sup>b</sup>	0.2200	0.3382	0.4270	0.0138	0.0010		
Glutamat ( <i>m/z</i> 432, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.1105	0.1740	0.6927	0.0225	0.0002	0.0000	
gemessen <sup>b</sup>	0.1116	0.1776	0.6876	0.0223	0.0009	0.0000	
Phenylalanin ( <i>m/z</i> 336, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.0801	0.3112	0.4015	0.1853	0.0202	0.0017	0.0001
gemessen <sup>b</sup>	0.0831	0.3066	0.4054	0.1889	0.0115	0.0015	0.0006
Tyrosin ( <i>m/z</i> 466, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.0801	0.3112	0.4015	0.1853	0.0202	0.0017	0.0001
gemessen <sup>b</sup>	0.0857	0.3020	0.4042	0.1898	0.0133	0.0004	0.0009
Histidin ( <i>m/z</i> 440, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.1872	0.4444	0.2931	0.0680	0.0069	0.0004	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.1990	0.4364	0.3151	0.0458	0.0022	0.0007	0.0008
Glucose ( <i>m/z</i> 612, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.1481	0.4370	0.3561	0.0528	0.0057	0.0003	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.1507	0.4268	0.3657	0.0538	0.0019	0.0006	0.0005

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten metabolischen Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS-Analytik der TBDMS-derivatisierten Aminosäuren erhalten.

**Tab. 9.3.5:** In den Simulationen berechnete, sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *B. subtilis* QB5407 bei Wachstum auf Glucose, [2,3-<sup>13</sup>C]-Succinat und Glutamat (die aufgeführten Daten entsprechen den in Abb. 6.7.3 A dargestellten Werten).

Analysierte Metabolite	Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
Alanin ( <i>m/z</i> 260, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.4488	0.1125	0.3916	0.0472			
gemessen <sup>b</sup>	0.4515	0.1057	0.3943	0.0485			
Glycin ( <i>m/z</i> 246, C <sub>1-2</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6716	0.2740	0.0544				
gemessen <sup>b</sup>	0.6840	0.2616	0.0544				
Valin ( <i>m/z</i> 288, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.2108	0.1178	0.3732	0.1221	0.1579	0.0182	
gemessen <sup>b</sup>	0.2344	0.1064	0.3447	0.1117	0.1820	0.0207	
Serin ( <i>m/z</i> 390, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6175	0.1220	0.2329	0.0277			
gemessen <sup>b</sup>	0.5844	0.1554	0.2312	0.0290			
Threonin ( <i>m/z</i> 404, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3531	0.0720	0.4891	0.0419	0.0440		
gemessen <sup>b</sup>	0.3334	0.0817	0.5009	0.0404	0.0436		
Aspartat ( <i>m/z</i> 418, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3531	0.0720	0.4891	0.0419	0.0440		
gemessen <sup>b</sup>	0.3332	0.0837	0.4954	0.0429	0.0447		
Glutamat ( <i>m/z</i> 432, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6390	0.0722	0.1504	0.0544	0.0752	0.0088	
gemessen <sup>b</sup>	0.6405	0.0779	0.1474	0.0494	0.0758	0.0090	
Phenylalanin ( <i>m/z</i> 336, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.2416	0.1540	0.3108	0.1374	0.1119	0.0330	0.0092
gemessen <sup>b</sup>	0.2976	0.1112	0.2918	0.0982	0.1427	0.0338	0.0191
Tyrosin ( <i>m/z</i> 466, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.2416	0.1540	0.3108	0.1374	0.1119	0.0330	0.0092
gemessen <sup>b</sup>	0.2816	0.1047	0.2953	0.1029	0.1510	0.0362	0.0199
Histidin ( <i>m/z</i> 440, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6040	0.2590	0.1015	0.0284	0.0064	0.0007	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.6071	0.2752	0.0669	0.0385	0.0084	0.0014	0.0025
Glucose ( <i>m/z</i> 612, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.7976	0.1179	0.0639	0.0154	0.0044	0.0008	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.8460	0.0727	0.0626	0.0137	0.0038	0.0009	0.0003

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten metabolischen Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS-Analytik der TBDMS-derivatisierten Aminosäuren erhalten.

**Tab. 9.3.6:** In den Simulationen berechnete, sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *B. subtilis* QB5407 bei Wachstum auf Glucose, [1,4-<sup>13</sup>C]-Succinat und [1,2-<sup>13</sup>C]-Glutamat (die aufgeführten Daten entsprechen den in Abb. 6.7.3 B dargestellten Werten).

Analysierte Metabolite	Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
Alanin ( <i>m/z</i> 260, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.4856	0.5027	0.0116	0.0001			
gemessen <sup>b</sup>	0.4629	0.5108	0.0246	0.0016			
Glycin ( <i>m/z</i> 246, C <sub>1-2</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6806	0.3153	0.0041				
gemessen <sup>b</sup>	0.6522	0.3417	0.0061				
Valin ( <i>m/z</i> 288, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.4687	0.5019	0.0286	0.0007	0.0000	0.0000	
gemessen <sup>b</sup>	0.4413	0.5103	0.0398	0.0056	0.0028	0.0003	
Serin ( <i>m/z</i> 390, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6548	0.3354	0.0097	0.0001			
gemessen <sup>b</sup>	0.6291	0.3532	0.0173	0.0005			
Threonin ( <i>m/z</i> 404, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.2435	0.3342	0.4134	0.0088	0.0000		
gemessen <sup>b</sup>	0.2330	0.2840	0.4668	0.0145	0.0018		
Aspartat ( <i>m/z</i> 418, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.2435	0.3342	0.4134	0.0088	0.0000		
gemessen <sup>b</sup>	0.2336	0.2853	0.4633	0.0152	0.0026		
Glutamat ( <i>m/z</i> 432, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.1580	0.2382	0.5848	0.0189	0.0002	0.0000	
gemessen <sup>b</sup>	0.1664	0.2430	0.5496	0.0357	0.0053	0.0000	
Phenylalanin ( <i>m/z</i> 336, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.4500	0.4331	0.1041	0.0120	0.0008	0.0000	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.4472	0.4188	0.1077	0.0157	0.0054	0.0013	0.0009
Tyrosin ( <i>m/z</i> 466, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.4500	0.4331	0.1041	0.0120	0.0008	0.0000	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.4429	0.4289	0.1032	0.0139	0.0042	0.0013	0.0018
Histidin ( <i>m/z</i> 440, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.7529	0.2184	0.0271	0.0016	0.0000	0.0000	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.8164	0.1604	0.0163	0.0019	0.0014	0.0007	0.0029
Glucose ( <i>m/z</i> 612, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.8146	0.1638	0.0204	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.8477	0.1407	0.0109	0.0000	0.0000	0.0004	0.0003

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten metabolischen Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS-Analytik der TBDMS-derivatisierten Aminosäuren erhalten.

**Tab. 9.3.7:** In den Simulationen berechnete, sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *B. subtilis* GP335 bei Wachstum auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose, Succinat und Glutamat (die aufgeführten Daten entsprechen den in Abb. 6.7.4 dargestellten Werten).

Analysierte Metabolite	Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
Alanin ( <i>m/z</i> 260, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6960	0.2956	0.0084	0.0001			
gemessen <sup>b</sup>	0.6933	0.2974	0.0093	0.0000			
Glycin ( <i>m/z</i> 246, C <sub>1-2</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.9676	0.0321	0.0003				
gemessen <sup>b</sup>	0.9676	0.0319	0.0005				
Valin ( <i>m/z</i> 288, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.4959	0.4082	0.0924	0.0035	0.0001	0.0000	
gemessen <sup>b</sup>	0.4987	0.4037	0.0938	0.0035	0.0000	0.0002	
Serin ( <i>m/z</i> 390, C <sub>1-3</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6280	0.3631	0.0088	0.0001			
gemessen <sup>b</sup>	0.6280	0.3618	0.0102	0.0000			
Threonin ( <i>m/z</i> 404, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.8377	0.1468	0.0150	0.0004	0.0000		
gemessen <sup>b</sup>	0.8376	0.1489	0.0135	0.0000	0.0000		
Aspartat ( <i>m/z</i> 418, C <sub>1-4</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.8377	0.1468	0.0150	0.0004	0.0000		
gemessen <sup>b</sup>	0.8384	0.1475	0.0140	0.0002	0.0000		
Glutamat ( <i>m/z</i> 432, C <sub>1-5</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.8278	0.1528	0.0180	0.0013	0.0000	0.0000	
gemessen <sup>b</sup>	0.8276	0.1529	0.0186	0.0008	0.0000	0.0000	
Phenylalanin ( <i>m/z</i> 336, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3470	0.4336	0.1858	0.0316	0.0020	0.0001	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.3450	0.4363	0.1861	0.0290	0.0017	0.0006	0.0007
Tyrosin ( <i>m/z</i> 466, C <sub>1-9</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.3470	0.4336	0.1858	0.0316	0.0020	0.0001	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.3474	0.4313	0.1774	0.0250	0.0021	0.0007	0.0023
Histidin ( <i>m/z</i> 440, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.6347	0.2885	0.0694	0.0073	0.0002	0.0000	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.6025	0.2736	0.0482	0.0181	0.0073	0.0275	0.0228
Glucose ( <i>m/z</i> 612, C <sub>1-6</sub> )							
simuliert <sup>a</sup>	0.0747	0.8592	0.0641	0.0020	0.0000	0.0000	0.0000
gemessen <sup>b</sup>	0.0764	0.8589	0.0647	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten metabolischen Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS-Analytik der TBDMS-derivatisierten Aminosäuren erhalten.

## 9.4 Stöchiometrie von Biomassebestandteilen

**Tab. 9.4.1:** Bedarf an Metaboliten [ $\text{mmol g}_{\text{Zellbestandteil}}^{-1}$ ] zur Synthese von Zellbestandteilen bei *Bacillus subtilis*. (Dauner and Sauer, 2001)

[mmol / g <sub>Zellbestandteil</sub> ]	G6P	P5P	E4P	T3P	PGA
Protein	0.000	0.289	0.747	-0.111	1.992
DNA + RNA	0.000	6.337	0.000	0.000	3.430
Lipide	0.000	0.000	0.000	1.929	0.263
Lipoteichonsäure	1.603	0.000	0.000	3.624	0.000
Zellwandkomponenten	3.011	0.000	0.000	1.076	0.000
Glycogen	6.173	0.000	0.000	0.000	0.000
Ionen + Metabolite	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
[mmol / g <sub>Zellbestandteil</sub> ]	PEP	PYR	ACA	OAA	AKG
Protein	1.493	4.482	0.759	2.684	1.891
DNA + RNA	0.000	0.000	0.000	2.907	0.000
Lipide	0.000	3.105	18.007	1.561	0.000
Lipoteichonsäure	0.000	1.683	2.364	0.144	0.000
Zellwandkomponenten	0.500	1.501	1.258	0.500	0.500
Glycogen	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ionen + Metabolite	0.000	0.000	0.000	0.000	2.379
[mmol / g <sub>Zellbestandteil</sub> ]	ATP	NADH	NADPH	C <sub>1</sub>	CO <sub>2</sub>
Protein	53.248	-3.772	22.678	-0.600	-3.847
DNA + RNA	75.598	-20.987	9.704	4.359	3.430
Lipide	25.383	-1.293	42.970	-0.002	-5.552
Lipoteichonsäure	18.843	3.344	5.414	0.000	-0.496
Zellwandkomponenten	12.521	1.076	4.004	0.000	0.000
Glycogen	6.173	0.000	0.000	0.000	0.000
Ionen + Metabolite	9.517	0.000	2.379	0.000	0.000

Verwendete Abkürzungen: G6P = Glucose-6-Phosphat; P5P = Pentose-5-Phosphat; E4P = Erythrose-4-Phosphat; T3P = Triose-3-Phosphat; 3PG = 3-Phosphoglycerat; PEP = Phosphoenolpyruvat; Pyr = Pyruvat; ACA = Acetyl-CoA; OAA = Oxalacetat; AKG =  $\alpha$ -Ketoglutarat; C<sub>1</sub> = Methyl-Tetrahydrofolat

**Tab. 9.4.2:** Biomassezusammensetzung [ $\text{g g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ] von *Bacillus subtilis*, interpoliert als Funktion der jeweiligen Zellkomponenten in Abhängigkeit von der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] (Dauner and Sauer, 2001).

<b><i>B. subtilis</i> Stamm</b>	<b>168</b>	<b>168</b>	<b>168</b>	<b>QB5407</b>	<b>GP335</b>
<b>C-Quelle</b>	Glucose	Glucose		Glucose	Glucose
		Succinat	Succinat	Succinat	Succinat
		Glutamat	Glutamat	Glutamat	Glutamat
Wachstumsrate $\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	0.64	0.81	0.47	0.34	0.63
<b>Gehalt [<math>\text{g g}_{\text{BTM}}^{-1}</math>]</b>					
Proteine	0.6442	0.7085	0.6236	0.5915	0.6656
RNA+DNA	0.1687	0.1855	0.1550	0.1335	0.1829
Lipide	0.0374	0.0212	0.0443	0.0550	0.0303
Lipoteichonsäure	0.0150	0.0085	0.0177	0.0220	0.0121
Zellwandkomponenten	0.1104	0.0625	0.1306	0.1622	0.0894
Glycogen	0	0	0	0	0
Ionen + Metabolite	0.0243	0.0138	0.0288	0.0357	0.0197

