

Prozessdynamiken bei der Tryptophansynthese
mit *Escherichia coli*

Process Dynamics during Tryptophan Synthesis
with *Escherichia coli*

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität
Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

TOM SCHUHMACHER

aus

KARLSRUHE

Hauptberichter: **Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors**

Mitberichter: **Prof. Dr. Georg Sprenger**

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2015

INSTITUT FÜR BIOVERFAHRENSTECHNIK
UNIVERSITÄT STUTTGART

2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Danksagung	iv
Erklärung	v
Nomenklatur	vii
Zusammenfassung	xv
Tabellenverzeichnis	xvii
Abbildungsverzeichnis	xx
1 Einleitung	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.1 Glukosestoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.2 Phosphatstoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	5
1.1.3 Stickstoffstoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	8
1.1.4 Schwefelstoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	9
1.1.5 L-Tryptophansynthese in <i>Escherichia coli</i>	10
1.1.6 Regulation der L-Tryptophansynthese	11
1.1.7 <i>Metabolic Engineering</i> der L-Tryptophansynthese in <i>E. coli</i>	13
1.2 Systembiologische Analyse	20
1.2.1 Kultivierung und Prozessstrategien	20
1.2.2 Transkriptomanalyse	21
1.2.3 Metabolomanalyse	22
1.2.4 Metabolische Modellierung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	25
2.1.2 Chemikalien	27
2.1.3 Lösungen	29
2.1.4 Medien	31
2.1.5 Stämme	36

2.1.6	Software	39
2.2	Methoden	39
2.2.1	Sterilisation von Medien und Materialien	39
2.2.2	Stammhaltung	39
2.2.3	Vorkulturen im Schüttelkolben	40
2.2.4	Kultivierung in Bioreaktoren	40
2.2.5	Kultivierung im 30 l Maßstab	40
2.2.6	Kultivierung in Parallelreaktorsystemen	43
2.2.7	Probenahme und Aufarbeitung	44
2.2.8	Analytik	49
2.2.9	Berechnung der Energieladung	54
2.2.10	Prozessdatenanalyse und Berechnungen	55
2.2.11	Fehlerrechnung	59
2.2.12	Transkriptomdatenanalyse	61
2.2.13	Modellierung	62
3	Ergebnisse	67
3.1	Probenahme und Analytik	67
3.1.1	Schnelle Probenahme	67
3.1.2	Perchlorsäure- <i>Quenching</i> , Probenaufarbeitung und Nukleotidbestimmung	71
3.2	Prozessanalyse	76
3.2.1	<i>Screening</i> zur Medienoptimierung	77
3.2.2	Referenzprozesse	80
3.2.3	Phosphatfütterung	83
3.2.4	Phosphatfütterungsszenario 3: Wildtypstudien	92
3.2.5	Glukoselimitierungen	96
3.2.6	<i>Screening</i> -Ansatz: alternative Elementarlimitierungen . . .	100
3.2.7	Glukoseaufnahme unter Phosphat- und Stickstofflimitierung	107
3.3	Transkriptomanalysen	109
3.3.1	<i>Clustering</i> -Analyse	111
3.4	Simulation	126
3.4.1	Flussverteilungsanalysen	127
3.4.2	Elementare Flussmoden	138

4 Diskussion	143
4.1 Prozessführung	143
4.2 Probennahme und Metabolomanalyse	145
4.3 Transkriptomanalyse	147
4.4 Flussverteilungsanalysen und Elementarmoden	150
4.5 Kohlenstoffverwertung und ATP-Effizienz	151
4.5.1 Entkopplungsszenario	152
4.6 Potential der L-Tryptophansynthese	155
4.7 Zusammenfassung und Ausblick	158
Literatur	161
A Anhang	180
A.1 Prozessdaten	180
A.1.1 Referenzprozesse	180
A.1.2 Phosphatfütterungsszenario 2	183
A.1.3 Phosphatfütterungsszenario 3	186
A.1.4 Phosphatfütterungsszenario 3, Wildtypstudien	190
A.1.5 Serielle Glukose- und Phosphatlimitierung	193
A.2 Modell	194
A.2.1 Randbedingungen und Modifikationen	195
A.2.2 Reaktionen	197
A.2.3 Transport	209
A.2.4 Polymerisation	212
A.2.5 Komponenten	213
A.2.6 Enzyme und Gene	223
A.2.7 Bilanzierte Komponenten	226
A.2.8 Elementarmodenanalyse	231
A.3 Transkriptomanalyse	234
A.4 Lebenslauf	278

Danksagung

Herrn Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die Vermittlung anwendungsbezogener Fragestellungen danken. Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die Begutachtung der Arbeit. Allen am Umlauf beteiligten Fakultätsratsmitgliedern danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit im Vorfeld zu prüfen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens und somit meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich mich bei dem beteiligten Industriepartner Evonik Industries AG, namentlich bei Dr. Ralf Kelle, Dr. Mechthild Rieping, Thomas Durhuus, Dr. Robert Gerstmeier, Dr. Jens Schneider, Dr. Kay Marin, Stefan Hans und Silke Jerrentrup bedanken. Darüber hinaus allen beteiligten Mitarbeitern am Standort Halle, die mich bei meinen Aufenthalten vor Ort umfangreich unterstützt haben.

Den Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Analytik am Institut für Bioverfahrenstechnik, namentlich Dr. Oliver Vielhauer, Mira Lenfers-Lücker und Lara Bogner danke ich für die umfangreiche Unterstützung bei der Methodenevaluierung und Umsetzung. Allen Technikumsmitarbeitern, insbesondere Andreas Freund, Salaheddine Laghrami und Alexander Dietrich danke ich für ihre umfangreiche Unterstützung. Die ständige Bereitschaft, neue technische Lösungen bereitzustellen und bestehende zu verbessern hatte einen wichtigen Beitrag zur abgeschlossenen Arbeit.

Ein besonderer Dank geht auch an die im Rahmen der Arbeit beteiligten und hochmotivierten Studenten Alexander Eck, Thilo Hurler, Michael Löffler, Achim Werner, Benjamin Gann, Veena Voigt und Silke Golob, die alle einen auf die eine oder andere Art wichtigen Beitrag geleistet haben. Die gemeinsame Arbeit hat mir viel Spass gemacht und wichtige Erfahrungen gebracht. Den in verschiedenen Bereichen am Institut tätigen Studenten, Doktoranden, technischen Mitarbeitern und Postdocs danke ich für die angenehme Atmosphäre, gegenseitige Unterstützung im Labor, Technikum und Büro, gemeinsame Essensaktivitäten, Gespräche und Diskussion, außeruniversitäre Aktivitäten und vieles mehr.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meines Studiums und meines Lebensweges. Meiner Frau danke ich für die Geduld und Unterstützung während meiner Arbeit, sie musste in der Endphase am meisten mittragen. Bei meiner Tochter entschuldige ich mir für die Stunden, die ich nicht mit ihr, sondern mit dem Fertigstellen der Arbeit verbracht habe.

Erklärung

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Artikel „*Phosphate limited Fed-Batch Processes: Impact on Carbon Usage and Energy Metabolism in Escherichia coli*“ [Schuhmacher et al., 2014] veröffentlicht. In der Veröffentlichung verwendete Abbildungen wurden als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Förderungsnummer 0313917A) sowie von Evonik Industries AG gefördert und finanziell unterstützt.

Weiterhin haben die Studenten Alexander Eck , Thilo Hurler, Michael Löffler und Achim Werner im Rahmen ihrer im Projekt betreuten Diplom- und Masterarbeiten an Teilaspekten der Arbeit mitgewirkt. Die Beiträge wurden jeweils referenziert [Eck, 2010, Hurler, 2011, Loeffler, 2012, Werner, 2014]. Weitere Unterstützungen durch Mitarbeiter des Institutes wurden ebenfalls aufgeführt, Ergebnisse und Gedankengut aus Literatur oder anderen Quellen wurden als solche referenziert.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut sowie Leistungen anderer Beteiligter habe ich als solche kenntlich gemacht.

Bielefeld, den

„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung“

Charles Darwin

Nomenklatur

ADP Adenosindiphosphat

AMP Adenosinmonophosphat

ATP Adenosintriphosphat

AcCoA Acetyl-Coenzym A

Ace Acetat

ANTA Anthranilat

ANTA-Synthase Anthranilat-Synthase, TrpD,E ; EC 4.1.3.27

aroA Gen der 5-Enolpyruvoylshikimat 3-Phosphat Synthase

aroB Gen der Dihydroquinonsäure Synthase

aroC Gen der Chorismat Synthase

aroD Gen der Dihydroquinonsäure Dehydratase

aroE Gen der Shikimat Dehydrogenase

aroF Gen der 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, tyrosinabhängig

aroG Gen der 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, phenylalaninabhängig

aroH Gen der 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, tryptophanabhängig

aroKL Gene der Shikimat-Kinasen I und II

AroP Unspezifischer Transporter für aromatische Aminosäuren

BSTFA N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

CaCl₂ x 2H₂O Calciumchlorid Dihydrat

c_{ATP} ATP-Konzentration

c_{ADP} ADP-Konzentration

- c_{AMP} AMP-Konzentration
- CHA** Chorismat
- CHA-Synthase** Chorismat-Synthase, AroC, EC 4.2.3.5
- CDRP** 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose 5-Phosphat
- CER** CO₂ Emissionsrate
- CIT** Citrat
- CoCl₂ x 6 H₂O** Cobaltdichlorid Hexahydrat
- CO₂** Kohlenstoffdioxid
- CuSO₄ x 5 H₂O** Kupfersulfat Pentahydrat
- c_s Substratkonzentration [g/l]
- csrA*** Regulatorgen zur Kohlenstoffspeicherung
- csrBC*** nicht-kodierende RNA, antagonistisch komplementär zu *csrA*
- c_p Produktkonzentration [g/l]
- c_x Biomassekonzentration [g/l]
- DAD** Diodenarray-Detektor
- DAH** 3-Deoxy-D-arabino-heptulonsäure
- DAHP** 3-Deoxy-D-arabino-heptulonsäurephosphat
- DAHP Synthase** 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, EC 2.5.1.54
- Dak1** Dihydroxyacetonkinase, EC 2.7.1.29
- DHQ** 3-Dehydroquinat
- DHQ-Synthase** 3-Dehydroquinat Synthase, AroB
- DHQ-Dehydratase** 3-Dehydroquinat Dehydratase, AroD
- DHS** 3-Dehydroshikimat

- DNA** Desoxy-Ribonukleinsäure
- (NH₃)₂HPO₄** Di-Ammoniumhydrogenphosphat
- E4P** Erythrose-4-Phosphat
- E. coli*** *Escherichia coli*
- EC** *Energy Charge*
- EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure
- EFM** Elementare Flussmoden
- EPSP** 5-Enolpyruvoylshikimat 3-Phosphat
- FAD** Flavinadeninnukleotid
- FBA** *Flux Balance Analysis*, Flussverteilungsanalyse
- fbr** *feedbackresistent*
- FeSO₄ x 7 H₂O** Eisensulfat Heptahydrat
- FeSO₄** Eisensulfat
- Fmoc** Fluorenylmethoxycarbonyl
- FUM** Fumarat
- F6P** Fruktose-6-Phosphat
- F1,6BP** Fruktose-1,6-Bisphosphat
- FeC₆H₅O₇ x H₂O** Eisen(III)Citrat Monohydrat
- GalP** Galaktose-Transporter
- GC-MS** Gaschromatographie-Massenspektrometrie
- G3P** Glycerinaldehyd-3-Phosphat
- G6P** Glukose-6-Phosphat
- G6P-DH** Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, EC 1.1.1.49

- GldA** Glycerin-Dehydrogenase, EC 1.1.1.6
- Glf** D-Glukosetransporter
- Glk** D-Glukose
- GLU** L-Glutamat
- GLN** L-Glutamin
- H⁺** Wasserstoffion
- H₃BO₃** Borsäure
- HPLC** Hochdruckflüssigchromatographie
- I3GP** Indol-3-Glycerolphosphat
- KCl** Kaliumchlorid
- KH₂PO₄** Kaliumdihydrogenphosphat
- K₂HPO₄** Dikaliumhydrogenphosphat
- KOH** Kaliumhydroxid
- K_m** Michaelis-Menten Koeffizient, Konzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit
- K₂SO₄** Dikaliumsulfat
- IBVT** Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart
- I3GP-Synthase** Indol-3-Glycerolphosphat-Synthase, TrpC, EC 4.1.1.48
- LB** *lysogeny broth*, Bertrani-Medium
- MgCl₂ x 6H₂O** Magnesiumchlorid Hexahydrat
- MgSO₄ x 7H₂O** Magnesiumsulfat Heptahydrat
- MnCl₂ x 4 H₂O** Mangandichlorid Tetrahydrat
- MOPS** N-morpholino-3-propansulfonsäure

mRNA *Messenger-Ribonukleinsäure*

Mtr L-Tryptophantransporter

N₂ Stickstoff, elementar

NaCl Natriumchlorid

Na₃C₆H₅O₇ x H₂O Trinatriumcitrat Monohydrat

NAD⁺ Nicotinamidadenindinukleotid, deprotoniert

NADH Nicotinamidadenindinukleotid, protoniert

NADP⁺ Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, deprotoniert

NADPH Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, protoniert

Na₂MoO₄ x 2H₂O Natriummolybdat Dihydrat

NaN₃ Natriumazid

Na₂HPO₄x 2H₂O Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat

Na₂B₄O₇ x 10H₂O Dinatriumborat Decahydrat

NH₄Cl Ammoniumchlorid

(NH₄)₂C₆H₆O₇ Diammoniumhydrogencitrat

(NH₄)₆Mo₂O₂₄ x H₂O Ammoniummolybdat Monohydrat

NH₄OH Ammoniaklösung

(NH₄)₂HPO₄ Diammoniumhydrogenphosphat

(NH₄)₂SO₄ Ammoniumsulfat

NIST-Datenbank Massenfragment-Metabolitdatenbank des *National Institute of Standards and Technology*

OAA Oxalacetat

OPA Ortho-Phthaldialdehyd

- OUR** Sauerstoffaufnahme, *Oxygen Uptake Rate*
- O₂** Sauerstoff, elementar
- pck** PckPyruvatcarboxykinase, EC 4.1.1.31
- Phe** L-Phenylalanin
- PEP** Phosphoenolpyruvat
- Pgi** Phosphoglucoseisomerase
- Pgl** 6-Phosphogluconatlactonase
- Ppk** Polyphosphat-Kinase, Ppk, EC 2.7.4.1
- Ppx** Polyphosphat-Phosphatase, Ppx, EC 3.6.1.11
- PpsA** Phosphoenolpyruvat-Synthetase
- PRAA** N-5-Phosphoribosylanthranilat
- PRAA-Isomerase** Phosphoribosylanthranilat-Isomerase, TrpC, EC 5.3.1.24
- APR-Transferase** Anthranilat-Phosphoribosyltransferase, TrpD, EC 2.4.2.18
- PRPP** 5-Phospho- α -D-Ribose-1-Phosphat
- PO₄** Phosphorsäure, vollständig deprotoniert
- PYR** Pyruvat
- PykA** Pyruvatkinase A, EC 2.7.1.40
- PykF** Pyruvatkinase F, EC 2.7.1.40
- PS-Carboxyvinyltransferase** 3-Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyltransferase (AroA), EC 2.5.1.19)
- Q_{O2}** volumenbezogenen Sauerstoffaufnahme
- Q_s** absolute Substrataufnahme
- q_s** spezifische Substrataufnahme

R_p absolute Produktbildungsrate

RP-HPLC *Reversed-Phase* Hochdruckflüssigchromatographie

RMA *robust multichip algorithm*

RNA Ribonukleinsäure

rRNA Ribosomale Ribonukleinsäure

RQ Respirationsquotient

R5P Ribose/Ribulose-5-Phosphat

SA Standardabweichung

SER L-Serin

SerA D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase/ α -Ketoglutaratreduktase

Shik Shikimat

Shik-Dehydrogenase Shikimat-Dehydrogenase, AroE, YdiB, EC 1.1.1.25, 1.1.1.282

Shik-Kinase Shikimat-Kinase, AroL, AroK, EC 2.7.1.71

SIR *selected ion recording*, Messmodus im Quadrupol-Massenspektrometer

SUC Succinat

SucCoA Succinyl-Coenzym A

S3P Shikimat 3-Phosphat

TBAS Tetrabutylammoniumsulfat

TIM Triosephosphatisomerase, EC 5.3.1.1

TktA Transketolase A, TktA, EC 2.2.1.1

TnaB L-Tryptophantransporter

tRNA Transfer-Ribonukleinsäure

Trp L-Tryptophan

Trp-Synthase Tryptophansynthase, TrpB, EC 4.2.1.122

Tyr L-Tyrosin

Val L-Valin

V_R Reaktionsvolumen

X Biomasse

YdiN Putatives protonengradientenkoppeltes Transportsystem

$Y_{\frac{p}{s}}$ Produktausbeutekoeffizienz

$Y_{\frac{x}{s}}$ Biomasseausbeutekoeffizient

ZnSO₄ x 7 H₂O Zinksulfat Heptahydrat

2OG 2-Oxoglutarat

¹³C Kohlenstoffisotop mit 13 Masseneinheiten

π_p spezifische Produktbildungsrate

π_{Trp} spezifische L-Tryptophanbildungsrate

π_{Ace} spezifische Acetatbildungsrate

μ spezifische Wachstumsrate

Zusammenfassung

Die energetische Effizienz bei der Verstoffwechslung von Kohlenstoff ist entscheidend für die Optimierung von biotechnologischen Produktionsprozessen. Während der Untersuchung von Dynamiken bei der L-Tryptophansynthese mit *Escherichia coli* wurden erhebliche Einflüsse der Wachstumslimitierungsstrategie auf die ATP- und Kohlenstoffeffizienz beobachtet. Für den L-Tryptophanproduzenten und einen Wildtypstamm konnte unter Phosphatlimitierung eine sinkende Energieladung beobachtet werden, obwohl die wachstumsunabhängige Glukoseaufnahme und Atmungsaktivität erhöht waren. Auf Basis von Transkriptomanalysen, Prozessbilanzierungen und Flussverteilungsanalysen sowie Vergleichen mit unabhängig veröffentlichten Studien zu ATP-stoffwechsel- und atmungskettendefizienten Stämmen wurde eine vierstufiges Szenario zur Beschreibung der beobachteten Phänomene entwickelt.

Eingeleitet durch eine Entkopplung des ATP-Synthasekomplexes (Stufe 1), wird die Effizienz durch modifizierte Atmungsaktivitäten weiter reduziert (Stufe 2). In der Folge kommt es zu Überflussreaktionen und Nebenproduktexport (Stufe 3), abschließend zu einer drastischen Reduktion der metabolischen Aktivität und zu Instabilitäten bis hin zum Zelltod (Stufe 4).

Die Phosphatlimitierung hatte dabei Einfluss auf die initiale Entkopplung, weitere Effekte wurden durch sinkende Energieladung vermittelt. In diesem Zusammenhang könnten zusätzliche Energiesenken durch Produktsynthesen oder alternative Elementarlimitierungen mit Einfluss auf den Energiehaushalt weiteren Einfluss haben. Für Stickstofflimitierungen konnten ebenfalls Einflüsse auf die Kohlenstoffeffizienz beobachtet werden.

Die reduzierte Effizienz hatte entscheidende Auswirkungen auf das Potential der L-Tryptophansynthese mit *Escherichia coli*. Zwar konnten durch Prozessoptimierung unter Verwendung des Modellstammes sowohl die Gesamtausbeuten (25 %) als auch die volumetrische Produktivität (47 %) signifikant erhöht werden, das Potential weiterer Verbesserungen ist allerdings bedingt durch die niedrigen Energieladungen eingeschränkt. Zusätzlich hat die sinkende Energieladung regulatorischen Einfluss auf Schlüsselenzyme der L-Tryptophansynthese. Durch Flussverteilungsanalysen und Elementarmodenanalysen konnte gezeigt werden, dass bei verminderter Verfügbarkeit von ATP eine Reduktion der maximalen theoretischen Ausbeute um bis zu 60 % auftreten kann.

Summary

Energetic efficiency of the carbon metabolism is essential for the successful optimization of biotechnological productions. Within the framework of investigations of the L-tryptophan synthesis with *Escherichia coli*, significant impacts of the growth limitation strategy on ATP and carbon efficiency became evident. For an L-tryptophan producer and a wildtype *Escherichia coli* strain, a decreasing energy charge was observed during phosphate limitation. At the same time, growth independent glucose uptake and respiration were elevated. Data from transcriptome analysis, process balancing, flux balance analysis and independent studies of ATP-synthesis- or respiratory chain-deficient strains was used to develop a 4-stage scenario.

Starting off with a potential influence on ATP-synthase efficiency (stage 1), decoupling is further increased by modified respiratory activity (stage 2) and by-product overflow (stage 3) finally resulting in a metabolic breakdown entering complete phosphate depletion (stage 4). The decoupling is initiated by phosphate limitation, further effects are mainly mediated on metabolic level through ATP availability and energy charge. In this context, energy sinks triggered by product synthesis or alternative growth limitations could have an additional impact. Screening approaches revealed that carbon efficiency was also affected by nitrogen limitation.

The observed reduced carbon efficiency had a critical impact on the potential of the L-tryptophan synthesis in *Escherichia coli*. Although, using the tryptophan producing model strain, the overall yield (25 %) as well as the volumetric productivity (47 %) could be improved significantly through process optimization, the potential of further improvement was limited. In addition to ATP limitation, the decreasing energy charge should mediate regulatory effects on essential enzyme activities. Under the given ATP limitation, flux balance analysis and elementary modes analysis revealed a significant reduction of the theoretical L-tryptophan yield.

Tabellenverzeichnis

1	Geräte	25
2	Chemikalien	27
3	Messkits	28
4	Analytik	28
5	Lösungen zur Probeninaktivierung und Extraktion	29
6	HPLC-Fließmittel	29
7	Aminosäure-HPLC Derivatisierungslösungen	30
8	Fütterungslösungen und Stammlösungen zur Medienherstellung	31
9	Kulturmedium-Stammlösung (x10)	32
10	Kulturmedium	32
11	<i>Seed</i> -Medium	33
12	Vorfermentationsmedium	34
13	Hauptfermentationsmedium: Phosphatlimitierung	34
14	Hauptfermentationsmedium: Stickstofflimitierung	35
15	Schüttelkolbenmedium: verringerter Schwefelanteil	35
16	Fermentationsmedium: verringerter Schwefelanteil	36
17	LB-Medium	36
18	Verwendete Software	39
19	Experimentell bestimmter RNA-Biomasseanteil (Referenzprozess)	48
20	Adeninnukleotidbestimmung mit integrierter Probenahme für <i>E. coli</i> K12 JP6015/pMU91 im Prozessverlauf (Phosphatfütterungsszenario 3)	75
21	Adeninnukleotidbestimmung mit integrierter Probenahme für <i>E. coli</i> K12 W3110 im Prozessverlauf (Phosphatfütterungsszenario 3)	76
22	Veränderte Medienkomponenten im Rahmen des Faktor- <i>Screenings</i>	77
23	Veränderte Medienkomponenten für das modifizierte Medium	79
24	<i>Cluster 6</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	114
25	<i>Cluster 1</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	115
26	<i>Cluster 2</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	116
27	<i>Cluster 5</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	117
28	<i>Cluster 5</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion (2)	118
29	<i>Cluster 3</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	119
30	<i>Cluster 8</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	121
31	<i>Cluster 4</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	123

32	<i>Cluster 7</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion	125
33	<i>Cluster 7</i> zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion (2)	126
34	Substratkonzentrationen der Referenzkultivierungen mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf	180
35	Produkt- und Biomassekonzentrationen der Referenzkultivierung mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf	181
36	Nebenproduktkonzentrationen der Referenzkultivierung mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf	182
37	Wiedergefundene Kohlenstoffmengenanteile normiert auf die auf- genommenen Stoffmenge (mol %) der Referenzkultivierungen mit <i>E.</i> <i>coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Tyr, L-Tyrosin;	182
38	Substratkonzentrationen der Kultivierungen mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 mit Phosphatfütterungsszenario 2 im Zeitverlauf	183
39	Produkt- und Biomassekonzentrationen des Phosphatfütterungs- szenario 2 mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf	184
40	Nebenproduktkonzentrationen des Phosphatfütterungsszenario 2 mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf	184
41	Wiedergefundene Kohlenstoff-Stoffmengenanteile normiert auf die aufgenommenen Stoffmenge (mol %) der Kultivierung mit Phosphat- fütterungsszenario 2 mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeit- verlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L- Glutamat; Phe, L-Phenylalanin;	185
42	Substratkonzentrationen der Kultivierungen mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 mit Phosphatfütterungsszenario 3 im Zeitverlauf	186
43	Produkt- und Biomassekonzentrationen des Phosphatfütterungs- szenario 3 mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf	187
44	Nebenproduktkonzentrationen des Phosphatfütterungsszenario 3 mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf	188
45	Wiedergefundene Kohlenstoff-Stoffmengenanteile normiert auf die aufgenommenen Stoffmenge (mol %) der Kultivierungen für Phos- phatfütterungsszenario 3 mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 im Zeit- verlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L- Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Val, L-Valin	189

46	Substratkonzentrationen der Kultivierungen von <i>E. coli</i> K12 W3110 mit Phosphatszenario 3 im Zeitverlauf	190
47	Produkt- und Biomassekonzentrationen des Phosphatfütterungszenario 3 mit <i>E. coli</i> K12 W3110 im Zeitverlauf	191
48	Wiedergefundene Kohlenstoff-Stoffmengenanteile normiert auf die aufgenommen Stoffmenge (mol %) der Kultivierungen mit Phosphatfütterungszenario 3 mit <i>E. coli</i> K12 W3110 im Zeitverlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat	192
49	Produkt- und Biomassekonzentrationen von <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 mit serieller Glukose- und Phosphatlimitierung im Zeitverlauf	193
50	Substratkonzentrationen der Kultivierungen von <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 mit serieller Glukose- und Phosphatlimitierung im Zeitverlauf	194
51	Molare Biomassezusammensetzung fuer ein artifizielles Biomassepolymer aus 100 Monomeren, angepasst nach [Taymaz-Nikerel et al., 2010]	195
52	Randbedingungen und Modellspezifikationen, <i>E.coli</i> JP6015 pMU91	196
53	Randbedingungen and Modellspezifikationen, <i>E. coli</i> W3110 . . .	196
54	Vergleich simulierter mit experimentell bestimmten Wachstumsraten für Prozessintervalle einer Fermentation mit Phosphatfütterungszenario 2 und <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) K12 JP6015 pMU91. Die angegebene Zeit stellt jeweils den Zeitpunkt der Intervallmitte dar.	197
55	Finale Stöchiometrie von Elementarmoden normiert auf die Glukoseaufnahme zur Berechnung maximaler theoretischer Ausbeuten	231
56	Finale Stöchiometrie von Elementarmoden normiert auf die Glukoseaufnahme zur Berechnung maximaler theoretischer Ausbeuten	232
57	Finale Stöchiometrie von Elementarmoden normiert auf die Glukoseaufnahme unter Berücksichtigung der Entkopplung der ATP-Synthese	233

Abbildungsverzeichnis

1	Syntheseweg der aromatischen Aminosäuren und dessen Regulation in <i>E. coli</i> . Gestrichelte Linien beschreiben transkriptionale und allosterische Regulation, gepunktete Linien ausschließlich allosterische Regulation, durchgezogene Linien ausschließlich transkriptionale Regulation. Die nicht im Text beschriebenen Abkürzungen umfassen PPA, Prephenat; PPY, Phenylpyruvat; HPP, 4-Hydroxyphenylpyruvat; L-Tyr, L-Tyrosin; L-Phe, L-Phenylalanin; α KG, α Ketoglutarat	11
2	Plasmid pMU91, [Camakaris et al., 1997]	38
3	Verlauf der Gesamt-RNA-Abnahme über der Phosphatkonzentration (logarithmische Anpassung)	48
4	Verlauf der Gesamt-RNA-Abnahme über der Prozesszeit (Referenzprozess, sigmoidale Anpassung)	49
5	Schematische Darstellung der Reaktionen der Atmungskette in ihrer Umsetzung im Referenzmodell. Dargestellt ist der Transport von H^+ -Ionen über die innere Zellmembran. Mögliche Effekte auf eine Entkopplung des Protonentransports sind durch schwarze Pfeile eingefügt. Transportierte Protonen werden in der Reaktionsstöchiometrie mit den im Modell verwendeten Bezeichnungen H_{ex} (extern) und H_{in} (intern) dargestellt. NADH:O, NADH-Oxidation (NADH-Dehydrogenase; CoQ, Ubiquinon; CoQH ₂ , Ubiquinol; CoQ:O Ubiquinon-Oxidation (Cytochrom-Oxidase); FADH:O, FADH ₂ -Oxidation	64
6	Vergleichsmessung von Filtrat und Gesamtaufschluss für ausgewählte Zentralstoffwechselmetabolite nach 12 h Prozesszeit. Pyr: Pyruvat; Suc: Succinat; Fum: Fumarat; Mal: Malat; α KG: α Ketoglutarat; Abkürzungen, PEP: Phosphoenolpyruvat; 1GP: 1-Glycerolphosphat; 2PG: 2-Phosphoglycerat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; Cit: Citrat; F6P: Fruktose-6-Phosphat; G6P: Glukose-6-Phosphat; 6PG: 6-Phosphoglukonat	68
7	Durch GC-MS detektierte Metabolite einer durch Methanol- <i>Quenching</i> und Ethanolextraktion prozessierten Probe. Dargestellt sind die Peakflächen der Messung im <i>Fullscan</i> Modus	70

8	Chromatogramm einer RP-HPLC Messung mit DAD zur Nukleotidbestimmung aus Perchlorsäurequenchingproben ohne Aufarbeitung (Probenahme nach 12 h Prozesszeit)	71
9	Chromatogramm einer RP-HPLC Messung mit DAD zur Nukleotidbestimmung aus Perchlorsäurequenchingproben mit integrierter Aufarbeitung (Probenahme nach 12 h Prozesszeit)	72
10	Adeninnukleotidbestimmung einer äquimolaren Standardlösung von ATP (schwarz), ADP (hellgrau) und AMP (dunkelgrau) nach der Aufarbeitung, nach [Loeffler, 2012]	73
11	Bestimmung der Energieladung einer äquimolaren Standardlösung von ATP, ADP und AMP nach der Aufarbeitung im Vergleich zur Einwaage, nach [Loeffler, 2012]	74
12	L-Tryptophantiter des intialen Faktor- <i>Screenings</i> über den Zeitverlauf der Kultivierungen (nach [Hurler, 2011])	78
13	L-Tryptophantiter für Versuche zum kombinatorischen Effekt von pH-Wert und der Spurenelementerhöhung über den Zeitverlauf der Kultivierungen (nach [Hurler, 2011])	79
14	L-Tryptophantiter des optimierten Medienansatzes im Zeitverlauf der Kultivierungen (nach [Hurler, 2011])	80
15	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Raute), L-Glutamat- (Quadrat) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Referenzkultivierung. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	81
16	Intervallweise, differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung und die integrale Gesamtbilanz für den Referenzprozess. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende. Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Tyr, Tyrosin; X, Biomasse	82
17	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) im Zeitverlauf der Referenzkultivierung. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	83
18	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Raute), Glutamat- (Quadrat) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 2	85

19	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 2	86
20	Kohlendioxidemissionsrate (CER, schwarz) und die Energieladung (Raute) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 2	87
21	Intervallweise differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung und die integrale Gesamtbilanz für den Prozess mit Phosphatfütterungsszenario 2. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende. Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Val, L-Valin; X, Biomasse	88
22	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Raute), Glutamat- (Quadrat) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	89
23	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	90
24	Kohlendioxidemissionsrate (CER, schwarz) und die Energieladung (Raute) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	91
25	Intervallweise differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung und die integrale Gesamtbilanz für Prozesse mit Phosphatfütterungsszenario 3. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende. Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Val, L-Valin; X, Biomasse	92
26	Acetat- (Raute) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit <i>E. coli</i> K12 W3110 und Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	93
27	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die Acetatbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit <i>E. coli</i> K12 W3110 und Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	94

28	Kohlendioxidemissionsrate (CER, schwarz) und die Energieladung (Raute) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit <i>E. coli</i> K12 W3110 und dem Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]	95
29	Intervallweise differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung bezogen auf den aufgenommenen Kohlenstoff und die integrale Gesamtbilanz. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende in Stunden Prozesszeit. Ace, Acetat; X, Biomasse	96
30	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der glukoselimitierten Kultivierung	97
31	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der glukoselimitierten Kultivierung	98
32	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der seriell glukose- und phosphatlimitierten Kultivierung	99
33	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der seriell glukose- und phosphatlimitierten Kultivierung. Die schwarze Linie markiert das Ende der Batch-Phase, die gestrichelte Linie das Ende der exponentiellen Glukosefütterung	100
34	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Referenzkultivierung im 200 ml Parallelreaktorsystem	101
35	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der Referenzkultivierung im 200 ml Parallelreaktorsystem	102
36	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 2 im 200 ml Parallelreaktorsystem	103
37	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 2 im 200 ml Parallelreaktorsystem	104

38	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 3 im 200 ml Parallelreaktorsystem	105
39	Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 3 im 200 ml Parallelreaktorsystem	106
40	L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit reduziertem Schwefelgehalt im 200 ml Parallelreaktorsystem	107
41	Spezifische Glukoseaufnahmerate über der spezifischen Wachstumsrate von <i>E. coli</i> K12 JP6015/pMU91 (Raute) und <i>E. coli</i> K12 W3110 (Kreis) für Fermentationen mit Phosphatfütterungsszenario 2. Die durchgezogenen Linien markieren eine lineare Regression der Verläufe	108
42	Kombinierte spezifische Glukoseaufnahmeraten über den spezifischen Wachstumsraten von <i>E. coli</i> K12 JP6015/pMU91 für Fed-Batch-Fermentationen mit Stickstofflimitierung im 200 ml Reaktorsystem	109
43	Dimensionslose Charakteristik und Gruppierung der <i>Cluster</i> nach zeitlicher Korrelation mit der Phosphatantwort	112
44	Vergleich der simulierten (FBA) und experimentell ermittelten spezifischen Wachstumsraten für eine Fermentation mit <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 mit Phosphatfütterungsszenario 3. Die Winkelhalbierende markiert die vollständige Übereinstimmung beider Werte	128
45	Verhältnis von simulierten (FBA) zu experimentell ermittelten Raten für Wachstum (μ), Sauerstoffaufnahme (OUR) und Kohlendioxidemission (CER) für eine Fermentation mit dem Modellstamm <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 (MS) und dem Wildtyp K12 W3110 (WT) für Prozessintervalle nach 18 und 21 h mit Phosphatfütterungsszenario 3. Die Werte von 90 und 110 % sind durch eine gepunktete Linie, 100 % durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet	130

46	Schematische Modelldarstellung mit einer ermittelten Flussverteilung (FBA) für <i>E. coli</i> K12 JP6015 pMU91 (schwarz) und W3110 (grau) nach 18 h Prozesszeit einer Fermentation mit Phosphatfütterungsszenario 3 unter Berücksichtigung einer Ineffizienz der ATP-Synthese mit der Zielfunktion Biomassebildung und experimentell bestimmten Austauschraten für Phosphat, Acetat und L-Tryptophan normiert auf die Glukoseaufnahme als zusätzliche Randbedingungen. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist.	132
47	Schematische Modelldarstellung der ermittelten Flussverteilung (FBA) zum Erreichen maximaler L-Trpyptophanausbeuten. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet	133
48	Schematische Modelldarstellung der ermittelten Flussverteilung (FBA) zum Erreichen maximaler L-Trpyptophanausbeuten unter Berücksichtigung des Entkopplungsszenarios. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet	135
49	Schematische Modelldarstellung der ermittelten Flussverteilung (FBA) zum Erreichen maximaler L-Trpyptophanausbeuten unter Berücksichtigung des Entkopplungsszenarios und fehlender PpsA- und Pck-Aktivität. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet	136
50	Schematische Modelldarstellung mit der ermittelten Flussverteilung (FBA) zum Erreichen maximaler L-Tryptophanausbeuten unter Berücksichtigung des Entkopplungsszenarios, fehlender PpsA-Aktivität und Wachstum. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet	137

51	Schematische Modelldarstellung mit der durch Elementarmodenanalyse ermittelten Flussverteilung zum Erreichen maximaler L-Trpyptophanausbeuten. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet	139
52	Schematische Modelldarstellung mit der durch Elementarmodenanalyse ermittelten Flussverteilung zum Erreichen maximaler L-Trpyptophanausbeuten unter Berücksichtigung einer Ineffizienz der ATP-Synthese. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet	141
53	Schematische Modelldarstellung mit der durch Elementarmodenanalyse ermittelten Flussverteilung zum Erreichen maximaler L-Trpyptophanausbeuten unter Berücksichtigung einer Ineffizienz der ATP-Synthese und fehlender PpsA- und Pck-Aktivität. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet	142

1 Einleitung

Die biotechnologische Produktion von Aminosäuren mit Hilfe von Bakterien hat eine über 50 jährige Tradition [Leuchtenberger et al., 2005]. Die Anwendungsgebiete der verschiedenen biotechnologisch produzierten Aminosäuren sind vielfältig. Sie kommen als Nahrungsergänzungsmittel, als Futtermittelzusatz, als Baustein für pharmazeutische Anwendungen oder Lebensmittelzusätze (Süßstoffe, Geschmacksverstärker) zum Einsatz. Ein Großteil der jährlich produzierten Aminosäuren wird zur Futtermittelergänzung in der Tiermast verwendet. Für die Futtermittelergänzung sind, abhängig vom Nutztier, insbesondere die essentiellen Aminosäuren D-, L-Methionin, L-Threonin, L-Lysin und L-Tryptophan (Trp) auf dem Markt vertreten [Ajinomoto, 2013, Evonik, 2012], die in pflanzlichem Futter nur in relativ geringen Mengen vorkommen. Für die meisten Aminosäuren (ausser D-, L-Methionin in Tierfutter, [Evonik, 2012]) spielt für die Anwendung als Futtermittelzusatz, Nahrungsergänzung oder pharmazeutische Komponente die stereochemische Ausrichtung (L-, oder D-Form) eine Rolle. Zur Erzeugung enantiomerenreiner Aminosäuren ergeben sich im Vergleich zur chemischen Synthese Vorteile für die fermentative Herstellung oder die enzymatische Katalyse. Aus ökonomischer Sicht weiter vorteilhaft sind die Substratauswahl und Skalierbarkeit der Prozesse der fermentativen Produktion. Für die Futtermittelaminosäure mit dem größten Marktanteil, L-Lysin, werden Produktionsvolumen von annähernd 2 Millionen Tonnen pro Jahr angegeben [Ajinomoto, 2013]. Das jährlichem Produktionsvolumen von L-Tryptophan ist mit etwa 9000 Tonnen deutlich geringer als das der anderen fermentativ hergestellten Aminosäuren. Allerdings ergibt sich aufgrund des im Vergleich zu anderen Aminosäuren relativ hohen Marktwertes für L-Tryptophan eine interessante Perspektive für die Optimierung der Synthese.

Die Anzahl der biotechnologisch in großem Maßstab zur Aminosäureproduktion eingesetzten Mikroorganismen ist relativ begrenzt. Heute wird ein Großteil der biotechnologisch relevanten Aminosäuren mit genetisch modifizierten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* oder *Escherichia coli* produziert. Beide Bakterienstämme sind sehr gut untersucht und werden seit Jahrzehnten in der biotechnologischen Produktion eingesetzt [Leuchtenberger et al., 2005]. Die umfassende Datenlage und die zahlreichen Werkzeuge zur genetischen Manipulation ermöglichen eine rationale Stammoptimierung durch sogenanntes *metabolic engineering*.

Die essentiellen Aminosäuren können bereits von nicht modifizierten Bakterienstämmen, den sogenannten Wildtyp-Stämmen, synthetisiert werden. Die Synthese ist allerdings ausschließlich für das Zellwachstum optimiert und streng reguliert. Durch genetische Modifikation in Verbindung mit einer geeigneten Kultivierungsstrategie wird daher versucht, die Ausbeuten und Produktivitäten bezogen auf das gewünschte Produkt zu steigern um ökonomische Prozesse zu ermöglichen.

Bei der Prozessanalyse und Optimierung einer biotechnologischen Aminosäureproduktion sind Einschränkungen von technischer und biologischer Seite zu beachten. Insbesondere im großvolumigen Maßstab gibt es technische Einschränkungen, beispielsweise den maximal möglichen Sauerstoffeintrag oder die anspruchsvolle Steuerung der inhomogenen Fermentationen. Die biologische Komponente bietet viele Ansatzpunkte zur Effizienzsteigerung. Die Schwierigkeit liegt in der Komplexität des biologischen Systems und der Interaktion mit äußeren Einflussfaktoren. Die Flexibilität der Organismen ist für eine Optimierung gleichzeitig Potential und Risiko. Zur gezielten Verbesserung der Stämme ist ein weitreichendes Verständnis des Verhaltens unter Prozessbedingungen nötig. Zur Untersuchung regulatorischer Phänomene und Optimierung der Stoffflüsse zur Produktsynthese spielen Interaktionen auf verschiedenen Ebenen des Organismus eine Rolle. Globale und lokale Regulationsphänomene bestimmen die Stoffflüsse in der Zelle und ermöglichen damit Adaptationen an Veränderungen der Umgebungsbedingungen. Induziert durch Substratlimitierungen oder Stressfaktoren können globale Regulatoren die Produktsynthese reduzieren. Eine komplette Inaktivierung des Regulators kann allerdings zur Instabilität der Zelle oder zum Zelltod führen. Im Falle einer künstlich verstärkten Überproduktion durch lokale Stoffwechselmodifikationen kann es zusätzlich zu ungewollten Interaktionen kommen, die im Extremfall eine Verschlechterung der Ausbeute oder Produktivität zur Folge haben können. Auch die Verknüpfung der modifizierten Stoffwechselwege mit lebenswichtigen Funktionen der Zelle bestimmt die Auswirkung eines Eingriffs. Insbesondere bei der Bereitstellung von Vorläufermolekülen oder Energieträgern muss zur Verbesserung direkt in essentielle Stoffwechselvorgänge eingegriffen werden. Für L-Tryptophan, aber auch für andere aromatische Aminosäuren, sind für verschiedene Bakterienstämme hochvernetzte Regulationsmechanismen bekannt, die eine Synthese der sehr energieaufwändigen Verbindungen stringent kontrollieren und eine Optimierung der L-Tryptophansynthese erschweren.

Zur Zielsetzung der vorliegenden Arbeit gehörte die Evaluierung und Anwendung

von Methoden zur systembiologischen Charakterisierung der L-Tryptophansynthese mit *E. coli* unter produktionsrelevanten Bedingungen. Im Fokus standen Vorgänge auf metabolischer und transkriptionaler Ebene, die Interaktion mit äußeren Prozessbedingungen sowie mögliche Einschränkungen bezüglich der Anwendung in der Produktion. Basierend auf Modellstammstudien und einem Referenzprozess [Camakaris et al., 1997] sollten Potentiale der L-Tryptophansynthese ermittelt und Ansätze zur Effizienzsteigerung erarbeitet werden.

1.1 *Escherichia coli*

E. coli ist gramnegativ, stäbchenförmig, peritrich begeißelt und gehört zur Familie der Enterobakterien, weiterhin zur Gattung *Escherichia*. *E. coli* wurde erstmals im Jahre 1886 in der Arbeit „Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung“ [Escherich, 1886] beschrieben und später nach seinem Entdecker Theodor Escherich benannt [Castellani, 1919]. *E. coli* gilt als Modellorganismus für diverse Forschungsbereiche und ist einer der am besten untersuchten Organismen überhaupt. Aus *E. coli* gelang Jonathan Beckwith 1969 die erste Isolierung eines einzelnen Gens [Shapiro et al., 1969], weiterhin wurde das *E. coli*-Genom als eines der ersten vollständig sequenziert [Blattner et al., 1997].

Aufgrund seines relativ robusten und schnellen Wachstums unter Labor- und Fermentationsbedingungen sowie der Fähigkeit verschiedene Kohlenstoffquellen zu nutzen ist *E. coli* auch in der biotechnologischen Anwendung von Bedeutung [Russo, 2003]. Aufgrund der außergewöhnlichen Datenlage zu *E. coli* ist es darüber hinaus möglich, umfangreiche rationale Ansätze zur Prozess- und Stammentwicklung umzusetzen.

Im Folgenden werden einige grundlegende Eigenschaften des Stoffwechsels von *E. coli* und seiner Regulation dargestellt.

1.1.1 Glukosestoffwechsel in *Escherichia coli*

E. coli ist in der Lage verschiedene Kohlenstoffquellen wie beispielsweise Glukose (D-Glukose), Laktose oder auch Glycerin zu nutzen. Allerdings werden einige Kohlenstoffquellen, insbesondere Glukose, bevorzugt verwertet. Solange diese vorhanden sind, werden Stoffwechselwege und Aufnahmesysteme anderer Koh-

lenstoffquellen stark reprimiert. Diesen Vorgang, der bereits 1942 von J. Monod beschrieben wurde, bezeichnet man als Katabolitrepression [Legout, 2010].

Transport Unter Glukoseüberschussbedingungen kann Glukose zunächst über das Porin OmpC [Mizuno et al., 1983] in den periplasmatischen Raum gelangen. Dort wird Glukose über das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase System (PTS) unter Phosphorylierung in das Cytoplasma transportiert. Bei der Reaktion werden äquimolare Mengen an Phosphoenolpyruvat (PEP) in Pyruvat umgesetzt. Unter Glukoselimitierung wird das Membranporin LamB mit einer höheren Glukosepermeabilität als OmpC in der äußeren Bakterienmembran vermehrt exprimiert. Die zunehmende Glukoselimitierung führt zu einer Vielzahl von aktivierten Transportern, teilweise mit unbekannter Funktion [Chang et al., 2002]. Bekannt ist dagegen die Funktion der Galaktose-Wasserstoffion (H^+)-Symporter (galP) und des Galaktose ABC-Transporters, kodiert durch die Gene *mglABC* [Death and Ferenci, 1994, Liu and Ferenci, 1998]. Diese transportieren den Zucker mit erhöhter Affinität ohne Phosphorylierung in die Zelle, wo er über das Enzym Glukokinase [Kawai et al., 2005] phosphoryliert wird. Nach längerer Hungerperiode werden die Elemente des hochaffinen Aufnahmesystems wieder reprimiert [Ferenci, 1999].

Zentraler Kohlenstoffstoffwechsel Nach Aufnahme und Phosphorylierung wird Glukose als Glukose-6-Phosphat hauptsächlich über die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg weiter verstoffwechselt. In der Glykolyse wird dabei nach einer weiteren Phosphorylierung das ringförmige, 6-Kohlenstoffatome (C6) enthaltende Zuckerphosphat (Fruktose-1,6-Bisphosphat) zunächst in zwei phosphorylierte 3-Kohlenstoffmoleküle (C3) umgesetzt (Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat). Als Endprodukt der Glykolyse entsteht Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat, das über eine Decarboxylierung in Acetyl-CoA umgesetzt, oxidiert oder als Vorläufermolekül für beispielsweise die Alaninsynthese genutzt werden kann. In der Glykolyse werden pro Glukosemolekül über die sogenannte Substratkettenphosphorylierung vier ATP-Moleküle gebildet, bei Aufnahme und Phosphorylierung der Glukose und der Weiterverstoffwechslung werden im Gegenzug ein Äquivalent PEP und ATP dephosphoryliert. Weiterhin werden in der Glykolyse wichtige Vorläufermoleküle für beispielsweise die Aminosäuresynthe-

se wie Glycerin-3-Phosphat (Serinsynthese) oder Phosphoenolpyruvat (Synthese aromatischer Aminosäuren) gebildet.

Der Pentosephosphatweg spielt eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Vorläufermolekülen für die Kofaktor- und Nukleotidsynthese, der Bereitstellung des für den Anabolismus essentiellen Reduktionsäquivalents Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, protoniert (NADPH) sowie bei der Erzeugung von Vorläufermolekülen für die Synthese aromatischer Aminosäuren [Stryer, 2002].

Regulation Die Reaktion auf Kohlenhydrat- oder im speziellen Glukoselimitierung wurde in der Vergangenheit umfangreich untersucht [Ferenci, 1999, Ramseier et al., 1993, Saier, 1996]. Die beteiligten Systeme werden unter Verwendung sogenannter Alarmone induziert. Das Alarmon cyclisches AMP (cAMP) interagiert mit dem Protein CRP, das Signal des Alarmons Guanosin-3´5´-Bisphosphat (ppGpp) wird in ein stark vernetztes Regulationssystem, die sogenannte *Stringent Response* integriert. Weiterhin reguliert das Katabolit-Repressor- und Aktivatorprotein Cra (FruR) die Richtung des Kohlenstoffflusses [Ramseier et al., 1995, Hardiman et al., 2007, Lemuth et al., 2008, Shimada et al., 2011]. Weiterführende regulatorische Effekte werden durch alternative σ -Faktoren vermittelt, die über eine Veränderung der Aktivität der RNA-Polymerase das Expressionsmuster beeinflussen [Stryer, 2002]. Das PTS, insbesondere das EI-Enzym, spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Koordination von Stickstoff- und Kohlenstoffaufnahme. Vermittelt über α -Ketoglutarat wird bei Stickstofflimitierung die Zuckeraufnahme reduziert [Doucette et al., 2011].

1.1.2 Phosphatstoffwechsel in *Escherichia coli*

Die Biotrockenmasse von *E. coli* enthält durchschnittlich 2-3 % Phosphor [Bauer and Ziv, 1976]. Trotz diesem, im Vergleich zu anderen Elementen kleinen Anteil spielt Phosphor in seiner oxidierten Form Phosphat eine zentrale Rolle im Energiehaushalt, bei der Signalübertragung und beim Wachstum [Makino et al., 2003]. Der Einfluss äußert sich in Form der Energieübertragung mit Hilfe von Nukleotidtriphosphaten, Fixierung und Weiterführung von Kohlenstoffverbindungen im zentralen Stoffwechsel, durch Aktivierung und Inaktivierung von Enzymaktivitäten durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung sowie in der Präsenz in Phospholipiden, RNA und DNA. Die Kontrolle des Phosphathaushaltes ist für

lebende Zellen essentiell, da die verfügbare Menge in vielen natürlichen Habitaten unter dem Bedarf liegt [Ishige et al., 2003, Krol and Becker, 2004]. Die regulatorische Antwort auf die Phosphatlimitierung wurde für *E. coli* auf molekularer, Proteom- und Transkriptomebene untersucht [Baek et al., 2007, Hsieh and Wanner, 2010, VanBogelen et al., 1996, Wanner and Boline, 1990, Wanner and Chang, 1987]. Dabei wurde eine starke Vernetzung der Phosphatregulation festgestellt [Baek et al., 2007]. Im Gegensatz zu beispielsweise *Corynebacterium glutamicum* wurde in frühen Arbeiten für *E. coli* keine Akkumulation von Polyphosphaten beschrieben, obwohl die Aktivitäten der Polyphosphatkinase (Ppk) und Phosphatase (Ppx) vorhanden sind [Kulaev, 1975]. In späteren Studien wurde offengelegt, dass die intrazellulären Polyphosphatkonzentrationen je nach Limitierungseinfluss stark variieren können [Kornberg et al., 1999]. Unter Phosphatlimitierung konnte allerdings gezeigt werden, dass der Polyphosphatstoffwechsel nicht über das *pho*-Regulon kontrolliert wird [Van Dien and Keasling, 1999]. Weiterhin wurde beschrieben, dass sehr hohe Phosphatkonzentrationen zur Erhaltung einer hohen intrazellulären Polyphosphatkonzentration nötig sind [Schurig-Briccio et al., 2009]. Dadurch ist unter Phosphatlimitierung von einer direkten Interaktion der Regulation mit extrazellulären Phosphatkonzentrationen auszugehen.

Phosphattransport *E. coli* besitzt zwei Transportergruppen mit unterschiedlicher Phosphataffinität [Rosenberg et al., 1977]. Das niedrigaffine System Pit (*pitA* und der putative Transporter *pitB*) importiert Phosphat angetrieben durch den Protonengradienten als H⁺-Symport. Für PitA wurde ein K_m-Wert für Phosphat von 0,38 μM bestimmt [Willisky and Malamy, 1980]. PitA wird konstitutiv exprimiert, während PitB möglicherweise der Kontrolle des *pho*-Regulons unterliegt [Harris et al., 2001].

Das hochaffine Aufnahmesystem PST (*pstABCS*) ist ein Transporter der „ATP-Binding-Cassette“-Superfamilie (ABC). Über PST wird Phosphat auch bei niedriger Konzentration, angetrieben durch ATP-Hydrolyse, in die Zelle transportiert. Für das PST-System wurde ein K_m-Wert für Phosphat von 0,2 μM bestimmt [Cox et al., 1981]. Das PST-System ist nicht nur unter Kontrolle, sondern ein Teil des Sensor- und Antwortsystems des *pho*-Regulons [Hsieh and Wanner, 2010].

Assimilierung Bevorzugte Phosphorquelle für *E. coli* ist Phosphat, welches als oxidierte Form des Phosphors nach dem Import direkt in Stoffwechsel- und Si-

gnaltransduktionsprozessen eingesetzt werden kann. Unter Phosphatlimitierung werden andere Phosphorquellen erschlossen, unter anderem Zucker- oder Alkoholphosphate. Auch das in *E. coli* K12 kryptisch vorliegende Phosphonatoperon zur Erschließung von Organophosphaten wird unter Phosphatlimitierung stark nach oben reguliert [Wanner and Metcalf, 1992]. Darüber hinaus findet eine Verwertung intrazellulärer Phosphatverbindungen statt. So wird beispielsweise der RNA-Gehalt der Zelle unter Phosphatlimitierung deutlich reduziert.

Regulation Zentrales Element des *pho*-Regulons ist das Zweikomponenten-Sensor-Regulatorsystem PhoB/PhoR. Für die Vermittlung der Phosphatantwort sind insgesamt sieben Komponenten essentiell (PhoR/PhoB, PstSCAB and PhoU) [Hsieh and Wanner, 2010]. Die Signalübertragung ist ein negativer Prozess, bei Phosphatüberfluss wird das Signal nicht übertragen. Der Phosphatsensor ist PstS, eine Komponente des hochaffinen Aufnahmesystems. Bei gebundenem Phosphat wird über den Transportkomplex PstCAB eine Verbindung von PhoU zu PhoR/PhoB vermittelt. PhoR besitzt keine Sensor-Bindestelle für Phosphat, das Signal wird über eine Kinaseaktivität übermittelt, die in Abwesenheit von gebundenem PhoU aktiv wird. Im Falle der Phosphatlimitierung und einer freien Sensorbindestelle für PstS wird keine Verbindung von PhoU durch PstSCAB übertragen und die Autophosphorylierung aktiviert. Über die Phosphorylierung wird der transkriptionale Regulator PhoB aktiviert, der die weitere Regulationsantwort initiiert. In der Vergangenheit wurden eine Vielzahl von Transkripten unter Kontrolle des *pho*-Regulons identifiziert. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die Rolle von PhoB als globaler Regulator postuliert [Alteri et al., 2011, Marzan and Shimizu, 2011, Richards and Vanderpool, 2012, Yoshida et al., 2012, Baek et al., 2007]. Für pathogene *E. coli*-Stämme hat die über das *pho*-Regulon vermittelte Regulation Einfluss auf die Virulenz [Crepin et al., 2011]. In scheinbarem Widerspruch zu der starken Vernetzung der Phosphatantwort konnte durch Inaktivierung zentraler Komponenten in *Knockout*-Studien gezeigt werden, dass die Inaktivierung des PhoB/PhoR-Systems selbst unter phosphatlimitierenden Bedingungen nicht lethal wirkt [Marzan and Shimizu, 2011].

1.1.3 Stickstoffstoffwechsel in *Escherichia coli*

E. coli kann eine Reihe anorganischer Stickstoffverbindungen assimilieren. Unter aeroben Bedingungen wird ausschließlich Ammonium als anorganische Stickstoffquelle verwertet [Neidhardt, 1996]. Als organische Stickstoffdonoren kann *E. coli* unter anderem Adenin, Adenosin, L- und D-Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, α -Aminobutyrat, Cytidin, Cytosin, Glukosamin, Glutamin, Glutamat, Glycin, Ornithin, Prolin, Putrescin, L- und D-Serin sowie Threonin verwerten [Neidhardt, 1996]. Ammonium ermöglicht die höchsten Wachstumsraten und wird deshalb als bevorzugte Stickstoffquelle eingestuft [Neidhardt, 1996].

Transport Ammonium (oder Ammoniak) kann mit Hilfe des Ammoniumtransporters AmtB über Diffusion in das Zellinnere gelangen. Dieser Transporter ist nur bei geringen Ammoniumkonzentrationen zur Erleichterung der Diffusion aktiv [Li et al., 2006], unter Ammoniumüberschuss kann außerdem Ammoniak durch die Zellmembran diffundieren.

Assimilierung Die größte Anteil des Ammoniums wird über die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) oder die Glutamin-Synthase (GS) assimiliert und über die Glutamat-Synthase (GOGAT) weiter verstoffwechselt. Die ATP-abhängige Assimilierung über GS und GOGAT wird hauptsächlich bei Energieüberschuss oder unter ammoniumlimitierten Bedingungen aktiv (niedriger K_m -Wert für Ammonium), während die Route über GDH (hoher K_m -Wert für Ammonium) und GOGAT unter Energielimitierung und Ammoniumüberschuss bevorzugt wird. Die Assimilation von Ammonium über den GS-GOGAT-Weg kann unter Wachstumsbedingungen bis zu 15 % des ATP-Umsatzes der Zelle verbrauchen [Lengeler et al., 1999] (S176 ff.).

Regulation Die Stickstofflimitierung in *E. coli* kontrolliert die Expression von Genen der sogenannten „*nitrogen regulated response*“ Ntr inklusive der Ammonium-assimilierenden Glutamin-Synthetase. Geringe intrazelluläre Glutaminkonzentrationen beeinflussen die Ntr-Antwort über verschiedene Regulatoren. Deren Aktivität wird zusätzlich durch eine Vielzahl von Metaboliten gesteuert. Die Ntr-Antwort vermittelt die Assimilation von Ammonium, die Verstoffwechslung verschiedener stickstoffhaltiger Verbindungen und scheint die Assimilation

von Ammonium mit anderen Stoffwechselwegen zu koordinieren (z.B. Glutamat-Synthese) [Reitzer, 2003]. Zusätzlich gibt es Verbindungen zum Leucin-Regulatorprotein Lrp, dass die Synthese der Glutamat-Synthase steuert. Weiterhin spielt auch Guanosintetraphosphat (ppGpp) als Aktivator der sogenannten „Stringent Response“ (Übersicht in [Kuroda, 2006]) mit Einfluss auf die Aminosäuresynthese und der Polyaminstoffwechsel eine wichtige Rolle. Eine umfassende Übersicht der systemischen Interaktionen des Stickstoffstoffwechsels wurde unter anderem von van Heeswijk et al. zusammengefasst [van Heeswijk et al., 2013].

1.1.4 Schwefelstoffwechsel in *Escherichia coli*

Transport Der Transport von Sulfat oder Thiosulfat findet über die Transporter CysAUW-Sbp beziehungsweise CysAUW-CysP statt [Wu et al., 1995]. Beide Transporter gehören zur Superfamilie der ABC-Transporter, CysA ist die ATP-bindende Domäne, CysU und CysW sind membrangebunden. Die Bindestellen (Periplasma) für Sulfat und Thiosulfat werden über CysP und Sbp vermittelt, die Aktivitäten der beiden Domänen können sich teilweise überlagern [Hryniewicz et al., 1990, Sirko et al., 1995].

Assimilierung Die Assimilierung von intrazellulärem Sulfat wird durch die Sulfat-Adenylyltransferase vermittelt. Um die weiteren Reaktionen der Sulfatasimilierung und Reduktion thermodynamisch zu begünstigen, wird dabei zusätzlich GTP hydrolysiert. Die GTPase Reaktion wird von der Untereinheit CysN katalysiert, während die Synthese von Adenosin-5-Phosphosulfat (APS) durch CysD vermittelt wird [Leyh et al., 1988].

Regulation An der Vermittlung der Reaktion auf Schwefellimitierung sind verschiedene Metabolite beteiligt. N-Acetylserin (aus O-Acetylserin), Sulfid und Adenosyl-5-Phosphosulfat (APS) und beispielsweise Thiosulfat modulieren Regulatoren und damit die Vermittlung der Regulationsantwort. Die wichtigsten der zahlreichen beteiligten Regulatoren sind CysB (moduliert durch N-Acetylserin, Sulfid und Thiosulfat) und Cbl (CysB-like, moduliert durch APS). Beide Regulatoren sind hauptsächlich Aktivatoren, die die Transkription über die $\sigma 70$ -Form der RNA-Polymerase kontrollieren. Durch die Aktivierung der betroffenen Gene

ist *E. coli* in der Lage, zusätzliche Schwefelquellen zu erschließen und Schwefel effizienter aufzunehmen [Iwanicka-Nowicka and Hryniewicz, 1995, Neidhardt, 1996].

1.1.5 L-Tryptophansynthese in *Escherichia coli*

Die Synthese der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tryptophan und L-Tyrosin in *E. coli* beginnt mit der Bildung von 3-Deoxy-D-arabino-heptulonsäurephosphat (DAHP) aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P). Katalysiert wird die Reaktion von drei Isoenzymen der 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, EC 2.5.1.54 (DAHP Synthase), die jeweils von einem Endprodukt (Phenylalanin: AroG; L-Tryptophan: AroH; Tyrosin: AroF) über eine sogenannte *Feedbackregulation*, also eine Rückkopplung, kontrolliert werden. Der erste Abschnitt der Synthese beinhaltet den gemeinsamen Syntheseweg der aromatischer Aminosäuren, in dem DAHP über 3-Dehydroquinat (DHQ) (katalysiert durch die 3-Dehydroquinat Synthase, AroB (DHQ-Synthase)), 3-Dehydroshikimat (DHS) (katalysiert durch DHQ-Dehydratase), Shikimat (Shik) (katalysiert durch Shik-Dehydrogenase), Shikimat 3-Phosphat (S3P) (katalysiert durch Shik-Kinase, Adenosintriphosphat (ATP) Umsetzung) und 5-Enolpyruvoylshikimat 3-Phosphat (EPSP) (katalysiert durch PS-Carboxyvinyltransferase) final zu Chorismat (CHA) (katalysiert durch Chorismat-Synthase, AroC, EC 4.2.3.5 (CHA-Synthase)) umgesetzt wird.

Chorismat wird im spezifischen L-Tryptophansyntheseweg zu Anthranilat (ANTA) (ANTA-Synthase), N-5-Phosphoribosylantranilat (PRAA) (APR-Transferase), 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose 5-Phosphat (CDRP) (PRAA-Isomerase), Indol-3-Glycerolphosphat (I3GP) (I3GP-Synthase) über das Zwischenprodukt Indol unter Kondensation mit L-Serin (SER) zu Trp umgesetzt. Für die L-Tryptophansynthese werden 1 ATP, 1 E4P, 1 L-Glutamin (GLN) (zu L-Glutamat (GLU)), 1 NADPH, 2 PEP, 1 5-Phospho- α -D-Ribose-1-Phosphat (PRPP) und 1 SER verbraucht. Der relativ hohe Energie- und Vorläufermolekülbedarf macht die stringente Regulation der L-Tryptophansynthese auf mehreren Ebenen nötig. Die Synthese der aromatischen Aminosäuren ist in Abbildung 1 dargestellt (Abbildung nach [Bongaerts et al., 2001]).

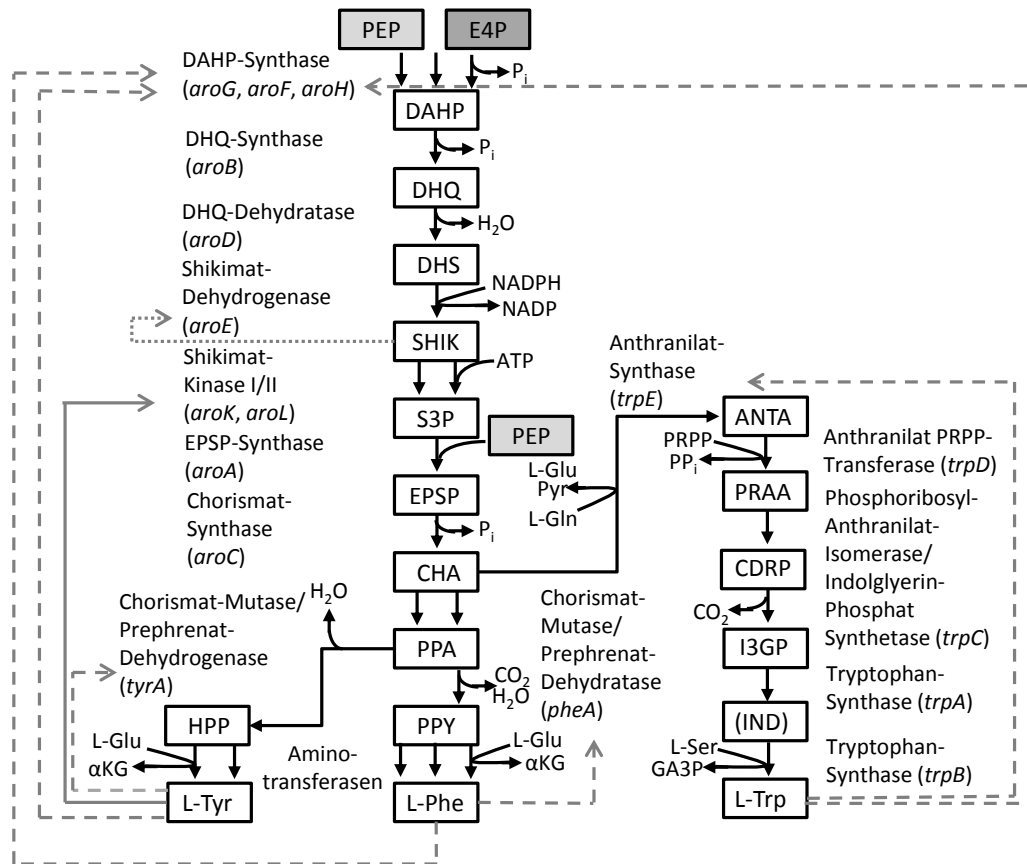


Abbildung 1: Syntheseweg der aromatischen Aminosäuren und dessen Regulation in *E. coli*. Gestrichelte Linien beschreiben transkriptionale und allosterische Regulation, gepunktete Linien ausschließlich allosterische Regulation, durchgezogene Linien ausschließlich transkriptionale Regulation. Die nicht im Text beschriebenen Abkürzungen umfassen PPA, Prephenat; PPY, Phenylpyruvat; HPP, 4-Hydroxyphenylpyruvat; L-Tyr, L-Tyrosin; L-Phe, L-Phenylalanin; α KG, α Ketoglutarat

Abbildung nach [Bongaerts et al., 2001], verändert

1.1.6 Regulation der L-Tryptophansynthese

Die Regulation der L-Tryptophanbiosynthese beinhaltet allosterische Feedbackinhibition, Attenuation und Repression verschiedener Schlüsselenzyme [Bongaerts et al., 2001, Ikeda, 2006, Berry, 1996].

Transkriptionale Kontrolle Die Kontrolle der L-Tryptophansynthese auf Transkriptionsebene wird hauptsächlich durch die Regulatoren TrpR und TyrR vermittelt (codiert durch *trpR* und *tyrR*). Während TrpR ausschließlich als Repressor und spezifisch auf die L-Tryptophansynthese wirkt, ist TyrR ein globaler Regulator, der auch als Aktivator fungieren kann [Pittard et al., 2005]. Ziele für TrpR sind Gen der 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, tryptophanabhängig (*aroH*), das *trp*-Operon, *aroKL* (Shikimatkinase II) und *mtr* (L-Tryptophan ArAAP Transporter). TyrR kontrolliert die Gen der 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, tyrosinabhängig (*aroF*), Gen der 2-Dehydro-3-deoxyphosphoheptonat Aldolase, phenylalaninabhängig (*aroG*), *tyrA* (Chorismatmutase), *tyrB* (Aminotransferase) und *aroP* (Transporter für aromatische Aminosäuren).

Attenuation Das L-Tryptophanoperon unterliegt einer weiteren Regulation durch Attenuation. Diese Form der Repression wird durch Kopplung von Translation und Transkription über eine Leader-Sequenz vermittelt [Oxender et al., 1979]. Abhängig von der Geschwindigkeit der Translation bilden sich auf dem mRNA-Fragment Haarnadelstrukturen aus, die den Ablesevorgang stoppen. Die Ablesegeschwindigkeit ist abhängig von der Verfügbarkeit beladener tRNA-Moleküle, für L-Tryptophan die Tryptophanyl-tRNA. Das Signal der Tryptophanverfügbarkeit wird durch zwei der Leadersequenz benachbarte Tryptophan-Codons vermittelt. Im Falle eines ausreichenden L-Tryptophanangebotes findet die Translation aufgrund der verfügbaren Tryptophanyl-tRNA mit hoher Geschwindigkeit statt, worauf sich die beschriebenen Strukturen ausbilden und die Translation beendet wird. Somit wird eine Überproduktion des energieaufwändigen Endprodukts verhindert.

Allosterische Regulation Kontrollpunkte der Synthese der aromatischen Aminosäuren auf allosterischer Ebene sind jeweils die ersten Reaktionsschritte eines spezifischen Synthesewegs wie die DAHP-Synthasen (AroFGH durch Trp, Tyr, Phe), die Anthanilatsynthase (TrpE durch Trp) und Chorismatmutasen (TyrA, PheA durch Tyr, Phe), die jeweils durch die Endprodukte des Syntheseweges gehemmt werden [Bongaerts et al., 2001, Ikeda, 2006, Berry, 1996]. Weiterhin wird die Shikimatdehydrogenase (AroE) durch erhöhte Konzentrationen von Shikimat gehemmt [Dell and Frost, 1993].

1.1.7 *Metabolic Engineering* der L-Tryptophansynthese in *E. coli*

Sofern Vorläufermoleküle in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen, kann durch Modifikationen der Biosynthesewege der aromatischen Aminosäuren der Stofffluss zum gewünschten Produkt weiter erhöht werden. Ansätze hierzu beziehen sich auf Modifikationen des gemeinsamen Synthesewegs der aromatischen Aminosäuren bis zur Chorismatsynthese und des spezielle Synthesewegs zu L-Tryptophan sowie einige Modifikationen der Zuckeraufnahme und des Zentralstoffwechsels zur Synthese anderer aromatischer Aminosäuren.

Regulation Um eine Regulation auf transkriptionaler Ebene zu vermeiden, werden in der Regel beide Regulatoren, TrpR und TyrR, ausgeschaltet [Camakaris et al., 1997]. Auf allosterischer Ebene wird die Feedbackinhibition durch feedbackresistente (fbr) Enzyme vermieden [Berry, 1996, Camakaris et al., 1997]. Für den Fall, dass die Reaktion von mehreren Isoenzymen katalysiert wird, werden möglichst alle Vertreter desensibilisiert (z.B. AroFGH) [Camakaris et al., 1997]. Für Enzyme, für die keine fbr-Varianten zur Verfügung stehen, kann der Effekt der Produktinhibition durch Überexpression ausgeglichen werden [Dell and Frost, 1993]. Allerdings steigt dadurch die metabolische Last der Zellen deutlich an. Der Einfluss der Attenuation kann durch Einbringen eines *trp*-Operons ohne Leader-Sequenz oder deren Veränderung umgangen werden [Matsui et al., 1987]. Ein weiterer Ansatz zur Reduktion des Effekts ist die Einführung einer weniger L-Tryptophan-affinen tRNA-Tryptophansynthase [Camakaris et al., 1997].

Chorismatsynthese Die ratenlimitierenden Schritte des Synthesewegs der aromatischen Aminosäuren wurden von Dell und Frost [Dell and Frost, 1993] durch sequentielle Verstärkung der Enzymaktivitäten und Messung der akkumulierten Zwischenprodukte untersucht. Dabei wurde ermittelt, dass bis auf die DihydroquinonsäureDehydratase (AroD) und Shikimatdehydrogenase (AroE, unterliegt Feedbackinhibition durch Shikimat) alle weiteren Enzyme (*aroB*, *aroKL*, *aroA*, *aroC*) bei erhöhtem Fluss durch diesen Syntheseweg ratenlimitierend wirken. Die Überexprimierung aller ratenlimitierenden Enzyme würde allerdings zu einer großen Belastung des Produktionsstammes führen [Frost and Draths, 1995].

Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass für die DHQ-Synthase (*aroB*) be-

reits eine Erhöhung der Aktivität um weniger als das Doppelte den ratenlimitierenden Effekt dieses Enzyms ausgleichen konnte [Dell and Frost, 1993]. Zusätzlich wurde vermutet, dass die ratenlimitierenden Eigenschaften der Shikimatkinase AroL einer möglichen Repression durch den Regulator *tyrR* (siehe Abschnitt 1.1.6) und die der EPSP-Synthase (AroA) einem begrenzten PEP-Pool zugeordnet werden können [Frost and Draths, 1995].

L-Tryptophansynthese Aufgrund der Operonstruktur der Gene der L-Tryptophansynthese werden diese in der Regel als Einheit überexprimiert [Berry, 1996, Camakaris et al., 1997]. Diese Vorgehensweise wird dabei von der Annahme gestützt, dass der L-Tryptophanbiosyntheseweg als eine funktionelle Einheit betrachtet werden kann, bei der die erste Reaktion (Anthranilatsynthese, TrpE) den Fluss kontrolliert [Santillan and Mackey, 2001, Schmid et al., 2004]. Eine weitere Erhöhung des Stoffflusses aus dem Aromatensyntheseweg zum L-Tryptophan wäre durch Deletion der Enzyme PheA und TyrA, die die Umsetzung von Chorismat zu Phenylalanin und Tyrosin einleiten, möglich. Diese Deletionen haben allerdings einen phenylalanin- und tyrosinauxotrophen Phänotyp zur Folge, was bei der Produktion die Supplementierung dieser Aminosäuren erfordern würde. Da die Anthranilatsynthase eine höhere Affinität zu Chorismat als diese beiden Chorismatmutasen aufweist [Dopheide et al., 1972, Hudson et al., 1983], kann in Produktionsstämmen mit überexprimierter Anthranilatsynthase (TrpE) der Verlust durch die Biosynthese von L-Phenylalanin und L-Tyrosin auch ohne Deletion von *pheA* und *tyrA* deutlich reduziert werden [Bongaerts et al., 2001].

L-Tryptophanabbau In *E. coli* wird L-Tryptophan durch die Tryptophanase (*tnaA*) in Indol und Pyruvat umgewandelt. Durch Deletion dieses Gens kann der Produktverlust durch Abbau deutlich reduziert werden [Aiba et al., 1982, Anderson et al., 1983, Camakaris et al., 1997].

Transport Für die Überproduktion von aromatischen Aminosäuren werden in der Regel deren Aufnahmesysteme ausgeschaltet. Dies gilt im Falle der L-Tryptophanproduktion für die spezifischen Aufnahmesysteme Mtr und TnaB sowie für das unspezifische Transportsystem für aromatische Aminosäuren AroP [Camakaris et al., 1997]. Zusätzlich kann auch das Ausschalten von Transportern

der *Major Facilitator Superfamily* wie YdiN zu verbesserten Ergebnissen führen [Gulevich et al., 2009].

Neben den Transportern für aromatische Aminosäuren sind auch andere Transportmechanismen für die Aminosäureproduktion von Interesse. Die Deletion des Kaliumtransporters KefB, ein Antiportsystem (K^+ , H^+) zum Schutz vor elektrophilen Substanzen durch Senken des pH-Werts [Ferguson, 1999], soll ebenfalls positiven Einfluss auf die Aminosäureproduktion haben [Filippov et al., 2009]. Weiterhin wurde ein System patentiert, bei dem die Na^+/H^+ Antiporter NhaA, ChaA und der $H^+/Multidrug$ Antiporter MdfA zur Verbesserung der Aminosäureproduktion überexprimiert wurden [Iyo et al., 2009].

Auch durch die erhöhte Exprimierung der Transkriptionsfaktoren codiert durch *evgAS*, *gadE* und *ydeO*, die unter anderem Drug-Efflux-Systeme beeinflussen [Eguchi et al., 2003], konnten Produktionssteigerungen von bis zu 5,5 % mit einem *E. coli*-Stamm erreicht werden [Iwatani et al., 2009].

Vorläufermolekül- und Energiebereitstellung Nach der Optimierung der terminalen Synthesewege ist eine weitere Verbesserung der Produktausbeute durch eine angepasste Bereitstellung von Vorläufermolekülen, Reduktionsäquivalenten und Energieträger möglich. Für die L-Tryptophansynthese, oder die Synthese aromatischer Aminosäuren und deren Vorläufermoleküle, spielen dabei insbesondere Phosphoenolpyruvat (PEP), Erythrose-4-Phosphat (E4P), die von 3-Phosphoglycerat (3PG) abgeleitete Aminosäure Serin (Ser) und 5-Phosphoribosyl- α -Pyrophosphat (PRPP, abgeleitet aus dem Pentose-Phosphatweg) eine Rolle. Veränderungen im Zentralstoffwechsel sind dabei eine besondere Herausforderung, da durch Umleiten der Flüsse bisher untergeordnete Regulationsmechanismen aktiviert oder essentielle Zwischenprodukte nicht mehr ausreichend bereitgestellt werden können. Dadurch kann die Zellphysiologie bis hin zum Zelltod beeinträchtigt werden [Liao et al., 1996].

Verfügbarkeit von Phosphoenolpyruvat Der größte Verbrauch an PEP fällt in *E. coli* durch das PTS (Phosphotransferasesystem) beim Transport und der Phosphorylierung von Glukose an. Etwa 50% des in der Glykolyse gebildeten PEP werden im stationären Fall auf diese Weise umgesetzt. Weiterhin kann PEP unter anderem durch anaplerotische Reaktion zu Oxalacetat, sowie durch Pyruvatkinasen in Pyruvat umgesetzt werden. Zusätzlich fließt PEP unter anderem

in die Lipopolysaccharid- und UDP-N-Acetyl-Muraminsäure-Synthese. Nur ein kleiner Teil (ca. 3,3%) wird unter Wachstumsbedingungen für die Synthese aromatischer Aminosäuren bereitgestellt [Valle et al., 1996].

Alternative Kohlenstoffquellen Der Wechsel auf alternative Kohlenstoffquellen zur Vermeidung des großen PEP-Verbrauchs durch das PTS erfordert zunächst kein *metabolic engineering*. Allerdings ergaben sich bei alternativen Nicht-PTS Kohlenstoffquellen oft erst nach der zusätzlichen Verstärkung von Enzymaktivitäten der beteiligten Stoffwechselwege (zum Beispiel der Pentosephosphatweg) erhöhte Produktausbeuten.

Xylose, Arabinose oder Glycerin wurden bereits als Substrate für die Synthese von 3-Dehydroshikimat oder diverse Aminosäuren eingesetzt [Li and Frost, 1999, Patnaik et al., 1995, Nagai et al., 2009]. Xylose und Arabinose können mit Hilfe einer ATP-abhängigen Permease [Hogg, 1977, Song and Park, 1998] aufgenommen und weiter über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt werden. Um den erhöhten Fluss durch den Pentosephosphatweg zu ermöglichen, wurde laut Literatur zusätzlich das Enzym Transketolase (TktA) überexprimiert. Weiterhin wurden verschiedene Mischungen von Glukose, Xylose und Arabinose auf ihren Einfluss auf Ausbeute und Produktivität getestet. Mit Hilfe dieser alternativen Zucker konnte zwar die Ausbeute an 3-Dehydroshikimat deutlich erhöht werden, die verwendeten Stämme zeigten allerdings auch ein deutlich reduziertes Wachstum und akkumulierten im Prozessverlauf Pentosen, 3-Deoxy-D-arabino-heptulonsäure (DAH), 3-Dehydroquinonsäure (DHQ) und Gallussäure [Li and Frost, 1999].

Für die Nutzung von Glycerin wurde die Umsetzung von Glycerin durch Überexprimierung der Glycerin-Dehydrogenase (GldA) und der Einführung einer ATP-abhängigen Dihydroxyacetonkinase (Dak1) aus *S. cerevisiae* erhöht. Weiterhin wurden die Aktivitäten der Triosephosphatisomerase (TIM), Fruktosebisphosphat-Aldolase, Fruktose 1,6-Bisphosphatase und Fruktose 6-Phosphat-Aldolase verstärkt, sowie die Aktivitäten der Glycerin-Kinase und einer membrangebundenen Glycerin 3-Phosphat-Dehydrogenase verringert [Nagai et al., 2009].

Alternativen zum Phosphotransferasesystem Für die Nutzung von PTS-Kohlenstoffquellen (insbesondere Glukose) besteht die Möglichkeit, dieses Transportsystem auszuschalten und auf alternative Transporter auszuweichen. Dabei können entweder exogene Transporter (zum Beispiel Glf aus *Zymomonas mobilis*) gekoppelt mit einer ATP-abhängigen Glukokinase (Glk) [Chandran et al., 2003, Sprenger et al., 2001] oder mutierte endogene Transporter, zum Beispiel den Galaktose“-MFS“-Transporter GalP [Cairns et al., 1991]), eingesetzt werden [Flores et al., 1996, Gosset et al., 1996, Valle et al., 2005]. Mit $pts^- glc^+$ Mutanten mit Glukosetransport über GalP konnte in Verbindung mit einer erhöhten Aktivität von TktA (Transketolase) eine im Vergleich zum Kontrollstamm 2,9-fach höhere Endkonzentration an DAHP erreicht werden [Flores et al., 1996], mit Hilfe der zusätzlichen Deletion der Pyruvatkinasen PykA und PykF konnte die DAHP Produktion um den Faktor 19,9 erhöht werden [Gosset et al., 1996]. Für die L-Tryptophansynthese konnte mit Hilfe einer $pts^- glc^+$ Mutante (*E. coli* K12 NF9/pBE7) eine um den Faktor 4,4 erhöhte L-Tryptophanproduktion im Vergleich zum Referenzstamm (pts^+) erreicht werden [Valle et al., 2005]. Stämme mit dem exogenen Transportsystem Glf (aus *Zymomonas mobilis*) und Phosphorylierung über eine Glukosekinase (aus *Zymomonas mobilis*) wurden unter anderem zur Synthese von Shikimat [Chandran et al., 2003] und Phenylalanin [Sprenger et al., 2001] eingesetzt.

Umsetzung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat Die Umwandlung von Pyruvat in PEP ermöglicht, unter zusätzlichem Energieverbrauch, eine Umleitung von weiteren drei Kohlenstoffatomen in die Aromatenbiosynthese. Die von Pyruvat ausgehende PEP-Synthese kann dabei entweder über die Phosphoenolpyruvatsynthase PpsA [Patnaik and Liao, 1994] oder über die Pyruvatcarboxykinase Pck und den Glyoxylatweg erfolgen [Liao et al., 1996]. Beide Ansätze wurden für die L-Tryptophanproduktion in Batchansätzen (Schüttelkolben) beschrieben [Kishino et al., 2001, Gulevich et al., 2006] und resultierten in einer 15 beziehungsweise 10 % erhöhten L-Tryptophankonzentration im Vergleich zu Referenzstämmen ohne diese Recyclingmechanismen. Die Ergebnisse wurden allerdings bei relativ geringen Produktkonzentrationen und mit geringen Ausbeuten der Referenzstämmen erzielt, eine Umsetzung im Produktionsmaßstab ist nicht beschrieben.

Minimierung des PEP-Verbrauchs ausserhalb der L-Tryptophansynthese

Weitere PEP-Verbraucher sind anaplerotische Reaktionen und die Umsetzung zu Pyruvat durch die beiden Pyruvatkinasen PykA und PykF [Valle et al., 1996]. Ppc vermittelt die Umsetzung von PEP und CO₂ zu Oxalacetat. Eine Inaktivierung von Ppc wurde bereits von Miller et al. durchgeführt, allerdings wuchsen die *ppc*⁻-Mutanten auf Glukose nur durch Zufütterung organischer C4-Säuren wie Succinat [Miller et al., 1987]. Alternativ kann der PEP-Verbrauch durch diese anaplerotische Reaktion durch Einführung eines exogenen Enzyms, der Pyruvat-carboxylase (*pyc*) deutlich reduziert werden [Anderlei et al., 2003]. Dieses Enzym ermöglicht die Umsetzung von Pyruvat und CO₂ zu Oxalacetat und ersetzt die Ppc-Reaktion. In weiteren Experimenten konnte durch Erhöhung der Aktivität des Glyoxylatzyklus unter glykolytischen Bedingungen CO₂-bildende Reaktionen umgangen und damit der Fluss über anaplerotische Stoffwechselwege reduziert werden [Koehn et al., 1994].

E. coli besitzt zwei Pyruvatkinasen, die unterschiedlicher allosterischer Kontrolle unterliegen [Valle et al., 1996]. Zusammen mit der Phosphofruktokinase sind diese Enzyme hauptsächlich für die allosterische Kontrolle der Glykolyse verantwortlich. Gemeinsam mit dem PTS sollen sie zusätzlich für eine streng kontrollierte, niedrige PEP-Konzentration verantwortlich sein [Ponce et al., 1995]. Bei *pykA*, *pykF* Knockoutmutanten, insbesondere in Verbindung mit einer erhöhten Aktivität der Transketolase und einem PEP-unabhängigen Zuckeraufnahmesystem wurde ein signifikant erhöhter Fluss in die Aromatenbiosynthese festgestellt [Berry, 1996, Gosset et al., 1996, Sprenger et al., 2001].

Globales *metabolic engineering* der Glykolyse und Inaktivierung der Glykogensynthese Eingriffe in die Regulation der Kohlenstoffspeicherung in *E. coli* verändern ebenfalls die Verfügbarkeit von PEP oder anderen Intermediaten der Glykolyse. Das Regulatorgen *csrA* hat einen negativen Einfluss auf die Glukoneogenese und Glykogenbildung und aktiviert glykolytische Reaktionen [Sabnis et al., 1995]. Eine Inaktivierung von *csrA* und der Glykogensynthese [Rybak et al., 2006] führt zu einer erhöhten Glukoneogeneseaktivität und zu einer erhöhten PEP-Bildung [Romeo, 1997, Tatarko and Romeo, 2001]. Interessanterweise kann der Einfluss des Regulators CsrA durch nicht-kodierende RNA-Moleküle *csrB* und *csrC* moduliert werden, die antagonistisch auf CsrA wirken [Romeo, 2003, Hashimoto et al., 2009]. Besonders bei Glukoseüberschuss und reduziertem

Wachstum ist die Inaktivierung von Kohlenstoffspeichersystemen, zum Beispiel der Glykogenbildung, von Interesse [Rybak et al., 2006, Romeo, 2003].

Phosphoenolpyruvat-unabhängige DAHP-Synthese Ran et al. wendeten gerichtete Evolutionsstrategien auf eine 2-keto-3-deoxy-6-Phosphogalactonat-Aldolase (KDPGal-Aldolase) an. Mit Hilfe dieses Enzyms kann Pyruvat mit Erythrose 4-Phosphat zu DAHP umgesetzt werden. Stämme, die zusätzlich eine erhöhte Transketolaseaktivität aufwiesen, erreichten bei der Shikimatproduktion eine Verbesserung der molaren Ausbeute um 8,5% [Ran and Frost, 2007].

Verfügbarkeit von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoribosylpyrophosphat Erythrose 4-Phosphat (E4P) ist eine C4-Aldose, die keine stabilen Pyranose- oder Furanoseringssysteme ausbilden kann. Daher neigt E4P in wässriger Lösung zur Dimerisierung und Polymerisierung [Duke et al., 1981], wodurch die intrazelluläre Verfügbarkeit des Monomers stark eingeschränkt ist. Die Konzentrationen von E4P in lebenden Zellen liegen daher oftmals unter der Nachweisgrenze, Synthese- und Verbrauchsraten sind annähernd gleich [Frost and Draths, 1995]. Beim *metabolic engineering* muss ein ähnlicher Zustand sichergestellt werden um Akkumulation, Dimerisierung und damit möglichen Verlust zu vermeiden. Ein häufig gewählter Ansatz, die Verfügbarkeit von E4P zu erhöhen, ist die Überexpression von Enzymen des nicht-oxidativen Teils des Pentosephosphatweges wie die Transketolase [Frost, 1992, Flores et al., 1996, Gosset et al., 1996, Kim et al., 2000] oder die Transaldolase [Lu and Liao, 1997, Sprenger et al., 2001]. Für die Überexpression von TktA mit Hilfe von Plasmiden wurde dabei festgestellt, dass entsprechende Mutanten deutlich schlechter wuchsen und das Plasmid innerhalb weniger Stunde wieder verloren, was für eine signifikante Belastung des Stoffwechsels ausgelöst durch die Überexpression der Transketolase oder toxische Nebenproduktbildung spricht [Kim et al., 2000]. Ebenfalls angewendet wurde die Verstärkung der 6-Phosphogluconolactonase (PgL) im oxidativen Teil des Pentosephosphatweges [Zimenkov et al., 2005] und eine Inaktivierung der Phosphoglukoseisomerase (Pgi). Der über den Pentosephosphatweg umgeleitete Stofffluss führte zu einer verbesserten Produktausbeute, gleichzeitig aber zu deutlich vermindertem Wachstum [Mascarenhas et al., 1991].

Verfügbarkeit von Serin Bei Serinmangel kann es bei der L-Tryptophanproduktion zur Akkumulation von Indol kommen [Azuma et al., 1993]. Erhöhte Verfügbarkeit von Serin kann durch Inaktivierung der Serin-Desaminase [Newman, 1985], durch Verwendung einer feedbackresistenten (Ser) D-3-Phosphoglyceratdehydrogenase/ α -Ketoglutaratreduktase (SerA) [Wich et al., 1994] oder 3-Phosphoglyceratdehydrogenase [Maier, 2004] erreicht werden.

Für die Synthese des aus einem L-Tryptophan-Dimer abgeleiteten Wirkstoffs Violacein führte eine mit anderen Syntheserouten koordinierte Verstärkung die L-Serinsynthese durch eine Feedbackresistenz von SerA und einer Inaktivierung der L-Serin-Dehydratase (SdaA) zu einer deutlichen Steigerung der Produktbildung [Rodrigues et al., 2013].

1.2 Systembiologische Analyse

Die weitgreifende Interaktion der verschiedenen Regulationsmechanismen erfordert eine möglichst ganzheitliche Systembetrachtung. In der Systembiologie wird versucht, möglichst viele Ebenen der Regulation und die Auswirkungen auf den Stoffwechsel in die Analyse zu integrieren. In der Regel wird dieser Vorgang durch Modellierung und Simulation unterstützt. In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse auf Transkriptom-, Metabolom- und Prozessebene berücksichtigt. Die Zielrichtung war dabei, ein weiterführendes Verständnis der Prozessdynamiken bei der L-Tryptophanproduktion zu entwickeln. Auf Basis der Information über Wechselwirkungen mit äußeren Einflüssen und Limitierungen des Stoffwechsels sollten Potentiale abgeschätzt und Ansätze zur Prozess- und Stammoptimierung entwickelt werden.

1.2.1 Kultivierung und Prozessstrategien

Die Prozess- und Vorkulturführung bildet die Grundlage der systembiologischen Analyse. Die Vorgehensweise sollte dabei sicherstellen, dass möglichst definierte Zustände (für Stamm und Prozess) vorliegen, auf deren Basis sich ein quantitatives Verständnis ableiten lässt. Zusätzlich war für die Arbeit eine produktionsnahe und damit auf die Anwendung übertragbare Strategie vorgegeben.

In der Produktion wird häufig im Zulaufverfahren, im sogenannten „Fed-Batch“-Prozess, kultiviert. Im Gegensatz zum Satz-Verfahren (Batch) wird dabei im Pro-

zessverlauf Substrat zugefüttert (auch mehrere Substrate sind möglich). Dadurch lassen sich bestimmte Prozessphasen verlängern, es kommt zur Akkumulation von Produkt und Biomasse. Die Akkumulation von Produkten ermöglicht eine effizientere Aufarbeitung und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Auslegung ökonomischer Prozesse. Die Zufütterung ist nötig, da in der Regel aufgrund osmotischer, regulatorischer oder toxischer Effekte keine unbegrenzte Substratvorlage möglich ist. Zusätzlich können über gezielte Fütterung bestimmte physiologische Zustände eingestellt werden. Im Gegensatz zu kontinuierlichen Verfahren kann dabei aufgrund der Akkumulierung maximal ein pseudo-stationärer Zustand erreicht werden. Zur Einstellung pseudo-stationärer Zustände werden exponentielle Fütterungsstrategien eingesetzt. Alternativ ist es mit Hilfe einer konstanten Zufütterung möglich, den Übergang von unlimitiertem zu limitiertem Wachstum zeitlich zu verlängern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war, aufgrund der umfangreichen Adaptation an und Wechselwirkung mit den Prozessbedingungen, insbesondere der Übergang in die Limitierung von Interesse. Daher wurden hauptsächlich angepasste Prozessstrategien mit konstanter Zufütterung eingesetzt. Die Prozesse wurden so ausgelegt, dass der wachstumslimitierende Effekt auf ein einziges Substrat zurückzuführen war. Durch die verbesserte zeitliche Auflösung des Übergangs können beispielsweise der Einfluss der Substratlimitierung und Stresszustände in der stationären Phase des Prozesses getrennt analysiert und diskutiert werden. Im Rahmen der Arbeit wurde der Einfluss von Kohlenstoff-, Phosphat- und Stickstofflimitierung (Ammonium) auf Wachstum, Atmung und Produktbildung untersucht.

1.2.2 Transkriptomanalyse

Die Transkriptomanalyse ermöglicht Einblicke in die Transkription der Erbinformation aus der DNA in RNA, einer zentralen Ebene der Regulation von Stoffwechselaktivitäten. In den letzten Jahrzehnten wurden zur Analyse des Transkriptoms zahlreiche globale und lokale Analysemethoden entwickelt. Die wichtigsten globalen Analysen sind dabei die Microarray-Analyse mit Hilfe vorgefertigter Sonden auf einem Chip und das hochparallele Sequenzieren von RNA- oder DNA-Molekülen (DNA/RNAseq) [Shendure and Ji, 2008, Roh et al., 2010, Costa et al., 2010]. Für lokale Analysen werden zusätzlich auf Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

[Mullis et al., 1986] basierende Methoden eingesetzt, beispielsweise bei der sogenannten „Real-Time-PCR“ [Bustin, 2002].

Im Verlauf dieses Projektes wurden Microarray-Analysen mit kommerziell verfügbaren und etablierten DNA-Chips (Affymetrix *E. coli_2*) durchgeführt. In Zeitreihenexperimenten wurde dabei die differentielle Genexpression während des Übergangs in die Phosphatlimitierung in hoher Auflösung untersucht. Die hohe Auflösung des Übergangs kann einerseits durch die Probenfrequenz, andererseits durch die Prozessführung erreicht werden (siehe Abschnitt 1.2.1).

1.2.3 Metabolomanalyse

Das Metabolom vermittelt die finale Reaktion des Stoffwechsels auf verschiedene Stimuli. Dabei zeigt es eine hohe chemische Diversität bei in der Regel kleinen Stoffmengen in einer komplexen Matrix. Zur Analyse sind für Molekülgruppen mit bestimmten chemischen Eigenschaften spezifische Aufarbeitungs- und Messmethoden nötig. Aufgrund der Dynamik des Stoffwechsels muss der Stoffwechsel nach der Probenahme möglichst schnell abgestoppt werden. Das sogenannte *Quenching* ist essentiell für die Analyse von Metabolitdynamiken, insbesondere für den Zentralstoffwechsel. Ein wichtiger Bestandteil der Metabolomanalyse sind daher schnelle Probenahmemethoden. Diese basieren in der Regel auf Hitze- oder Kälteinaktivierung des Stoffwechsels, bei Kälteinaktivierung unter Verwendung von tiefkalten Alkoholen. Abhängig vom Organismus und den Bedingungen in der Lösung haben beide Inaktivierungsstrategien einen Verlust der Membrantegrität zur Folge, wodurch ein Austausch von intra- und extrazellulärem Milieu verursacht wird (*Leakage*). Daher werden Extrakte unter Berücksichtigung aller Fraktionen differentiell quantifiziert, teilweise ist eine absolut quantitative Aussage nicht möglich [van Gulik, 2010]. Nach der Probenahme beeinflussen die gewählte Extraktionsstrategie und die verfügbare Messmethode die Analysemöglichkeiten. Für Markierungsexperimente mit stabilen Isotopen ist beispielsweise neben der Quantifizierung der Metabolitkonzentrationen eine Bestimmung des Markierungsverhältnisses über NMR oder Massenspektrometer nötig. Für Probenahme, Aufarbeitung und Messung muss in der Regel aufgrund der Eigenheiten des Organismus und des Kultivierungsmilieus eine spezifische Methode für die jeweilige Anwendung etabliert werden. Dabei spielt unter anderem der Zellaufschluss und die Probenmatrix eine Rolle. Durch das im Verhältnis deutlich

größere extrazelluläre Volumen können bereits geringe Konzentrationen eine differentielle Analyse beeinträchtigen

[Xu et al., 2010, Oldiges et al., 2007, Taymaz-Nikerel et al., 2009, Villas-Boas et al., 2005, Matuszewski et al., 2003]. Die Verfügbarkeit und der Umfang quantitativer Metabolomdaten bestimmt dabei in hohem Maße die Anwendungsmöglichkeiten datengetriebener Modellansätze in der systembiologischen Forschung.

1.2.4 Metabolische Modellierung

Die Beschreibung und Simulation metabolischer Vorgänge auf Basis mathematischer Modelle ist ein wichtiger Bestandteil einer systembiologischen Betrachtung. Durch die Integration verschiedener Einflüsse können Zusammenhänge dargestellt werden, die auf Basis einer lokalen Untersuchung nicht zugänglich wären. Weiterhin können durch Simulation Zustände dargestellt werden, die durch experimentelle Ansätze nicht erfassbar sind. Darunter fallen zum Beispiel metabolische Flüsse, also (stationäre) Raten, mit denen Metabolite in der Zelle umgesetzt werden [Varma and Palsson, 1994]. Konzentrationswerte einer Messung ergeben, falls überhaupt verfügbar, keine Informationen über den Umsatz der Metabolite. Sogenannte Fluss- und Flussverteilungsanalysen beschreiben auf Basis einer vorgegebenen Stöchiometrie und weiterer Informationen die Verteilung der Stoffflüsse durch die Zelle [Varma and Palsson, 1993]. Neben rein stöchiometrischen Ansätzen gibt es zusätzlich die Möglichkeit, durch Markierung mit stabilen Isotopen erweiterte Informationen über intrazelluläre Stoffverteilungen zu generieren [Wiechert, 2001]. Auf Basis eines Flusses können mit dem Einbringen von Stoffumsatzkinetiken dynamische Modelle beschrieben werden, die eine Reaktion des Systems auf äußere Stimuli simulieren können [Mauch et al., 1997]. Die Anwendung der jeweiligen Modellierungsstrategie richtet sich nach der Fragestellung sowie der verfügbaren Datenlage zur Parametrisierung der Modelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Ergänzung von Prozessbilanzierungen Flussverteilungsanalysen zur Simulation verschiedener Flussszenarien und Elementarmodenanalysen eingesetzt. Der Fokus lag dabei auf der Effizienz der Atmungskette und ATP-Synthese unter Prozessbedingungen sowie dem Potential der L-Tryptophansynthese unter Berücksichtigung einschränkender Randbedingungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Abgasanalyse	BlueSens, DE
Abluftfilter, Abluftfiltereinheit	Bioengineering, CH
Anstechbecher	Bioengineering, CH
Bioreaktor (Glas) 0,2 l	Schott Glas, DE
Bioreaktor (Glas), 2 l mit 2 Sechsbattrühren	HWS Labortechnik, DE
Bioreaktor, 30l	Bioengineering, CH
BioLog-Prozessleitsystem (Labview)	Eigenentwicklung IBVT Stuttgart (A. Freund)
Computer, Prozessleitsystem	Hewlett-Packard, US
Cryostat	RK20, MGW Lauda, DE
Dichte-Aräometer	Carl Roth GmbH, DE
Elementaranalysator	N/C 2100S, Analytik Jena, DE
Drucksonde	Keller, DE
Feinwaage	AE200, Mettler Toledo, DE
Filtrationseinheit	Flonamics Analytical Instruments, US
Gaschromatograph	Autsystem XL GC, Perkin Elmer, US
Glaswaren	Erlenmeyerkolben, Bechergläser, Flaschen, Zulaufflaschen, Schott Glas, DE
Halbautomatische Probenahme	Eigenentwicklung IBVT Stuttgart (A. Freund)
HPLC	1200, Agilent Technologies, US
Kondensatfalle	Bioengineering, CH
Magnetrührplatte mit Heizelement	IKA-Labortechnik, DE
Massenspektrometer	Turbomass, Perkin Elmer, US
Mass-Flow Controller	Analyt MTC, DE
Online Glukosesonde	ProcessTRACE, TRACE-Biotech AG, DE

Geräte	Hersteller
pH-Elektrode	Mettler Toledo, DE
pH-Regler	Mostec, CH
	Bioengineering, CH
Photometer	DR2800 UV/VIS, HACH LANGE,DE
	Ultrospec 1100 pro, Biochrom Ltd., GB
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf, DE
pO ₂ -Sonde	Mettler Toledo, DE
pO ₂ -Signalverstärker	Mettler, DE
Probenahmeventil	Bioengineering, CH
Reagenzglas-Rotationsschüttler	CMV-ROM,Fröbel Labortechnik, DE
Rührermotor und Steuerung (2 l Reaktor)	Lenze, DE
Rührkesselreaktor (30 l)	Bioengineering, CH
Schlauchpumpen	101 U,Watson Marlow, US
Steckdosenzeitschaltuhr	Grässling, DE
Stopfen	Bioengineering, CH
Temperatursonde	Bioengineering, CH
Thermoschüttler	Thermomixer comfort,Eppendorf, DE
Trockenschrank	UT6200, Heraeus, GB
Überdruckventil	Bioengineering, CH
Überkopfschüttler	Roto Shake Genie, Sci. Industries Inc., US
Vakuumkammer	spe-12G, J.T. Baker, US
Vakuumpumpen	MD 4C,RC 5,MZ 2C, vacuumbrand, DE
Vakuumrotationsevaporator	RVC, 2-33 IR, CT04-50, Martin Christ GmbH,DE
Vortex	Assisten-Reamix 2789, Karl Hecht KG, DE
Waagen	XS 6002S, 6001S, Mettler Toledo, DE
Wasserbad mit Thermostat	Lauda, DE
Zentrifugen	Megafuge 1-OR, Heraeus, GB
	Avant J-25, Beckman Coulter, US
	5417R, Eppendorf, DE
Zentrifugenbecher	100 mm, Carl Roth, DE
Zuluftfilter, Zuluftfiltereinheit	Sartorius, DE

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
Becton Dickinson, US	Difco Bacto TM Yeast Extract, Difco Bacto TM Trypton, Europäischer Agar
Fluka, US	Ammoniak, Ammoniumhydroxid, Calciumchlorid-Dihydrat, Diammoniumhydrogencitrat, Cobaltdichlorid-Hexahydrat, Eisen(III)Citrat Monohydrat, Eisensulfat-Heptahydrat, Essigsäure, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Mangandichlorid-Tetrahydrat, 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure(MOPS)-Puffer, Natriumcitrat-Dihydrat, o-Phthaldialdehyd, Tetrazyklin, Zinksulfat-Heptahydrat
Merck, DE	Ammoniummolybdat-Tetrahydrat, Borsäure, Natriummolybdat-Dihydrat
Riedel-de Haen, US	Natriumchlorid, Perchlorsäure
Roth, DE	Aceton, Acetonitril, Ammoniumchlorid, Diammoniumsulfat, Dikaliumhydrogenphosphat, Dikaliumsulfat, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Glukosemonohydrat, Glycerin, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Kupfersulfat-Pentahydrat, Methanol, Thiaminhydrochlorid

Hersteller	Chemikalien
Schill und Seilacher, DE	Struktol J 647
Sigma Aldrich, US	Aminosäurestandard, L-Asparagin, L-Glutamin, L-Tryptophan, ¹³ C markiertes Algenextrakt

Tabelle 3: Messkits

Bezeichnung	Hersteller
D-Glukose	Boehringer Mannheim, DE
Essigsäure (Acetat)	Boehringer Mannheim, DE
LCK 303 Ammonium-Stickstoff	Hach Lange, DE
LCK 348 ortho-Phosphat	Hach Lange, DE
LCK 353 Sulfat	Hach Lange, DE

Tabelle 4: Analytik

Bezeichnung	Hersteller
Dichte-Aräometer	Carl Roth GmbH, DE
Feinwaage	Mettler Toledo, CH
Heraeus Megafuge 1-OR	Heraeus, GB
HPLC Agilent 1200 Serie	Agilent Technologies, US
HPLC Säule Zorbax Eclipse Plus C18	Duratec Analysen Technik GmbH, DE
HPLC Säule Supercosil-LC-18T	Supelco (Sigma Aldrich), US
HPLC Vorsäule Agilent 820950-936	Agilent Technologies, US
HPLC Vorsäule BDS Hypersil C18 5 μ m	Thermo Fisher, US
Benzolsulfonsäure-Kationenaustauscher	Macherey-Nagel GmbH Co.KG, DE

2.1.3 Lösungen

Tabelle 5: Lösungen zur Probeninaktivierung und Extraktion

Bezeichnung	Zusammensetzung
Essigsäure-Elutionslösung	Essigsäure 5%
Ethanol-Quenchinglösung	40% Ethanol, 0,8% Natriumchlorid (NaCl)
Methanol-Quenchinglösung	60%(v/v) Methanol
Perchlorsäurelösung	35% Perchlorsäure, 80 μ M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Kaliumhydroxid-Neutralisierungslösung	1 M K_2HPO_4 , 5 M KOH (1:10)

Tabelle 6: HPLC-Fließmittel

Verwendung	Zusammensetzung
Aminosäure HPLC, Fließmittel A	1,8 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 3,8 g/l $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$; 32,5 mg/l NaN_3 ; mit HCl auf pH 8,2
Aminosäure HPLC, Fließmittel B	45% Acetonitril, 45% Methanol, 10% Wasser
Nukleotid HPLC, Fließmittel A	0,1 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 0,1 mol/l Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), 0,004 mol/l Tetrabutylammoniumsulfat (TBAS), mit Phosphorsäure / Kaliumhydroxid (KOH) auf pH 6,0
Nukleotid HPLC, Fließmittel B	0,1 mol/l KH_2PO_4 , 0,1 mol/l K_2HPO_4 , 4 mmol/l TBAS, mit Phosphorsäure/KOH auf pH 7,2, anschließend 30 % Methanol Zugabe

Tabelle 7: Aminosäure-HPLC Derivatisierungslösungen

Verwendung	Zusammensetzung
OPA-Reagenz	0,4 M Kaliumboratpuffer (pH 10,2), 10 mg/ml Ortho-Phthaldialdehyd (OPA), 8,7 μ l/ml 3-Mercaptopropionsäure
Fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC)-Reagenz	45% Acetonitril, 45% Methanol, 10% Wasser

Tabelle 8: Fütterungslösungen und Stammlösungen zur Medienherstellung

Komponente	Zusammensetzung
Ammoniumphosphatlösung	Di-Ammoniumhydrogenphosphat ($(\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4$) 396 g/l
Phosphat-Fütterungslösung	KH_2PO_4 / K_2HPO_4 (40 % /60 %), 23,81 g/l Phosphorsäure, vollständig deprotoniert (PO_4)
Spurenelementlösung 1 1000-fach konzentriert (Kulturmedium)	0,048 g/l H_3BO_3 0,014 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,32 g/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,057 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,008 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_2\text{O}_{24} \times \text{H}_2\text{O}$ 0,15 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
Spurenelementlösung 2 20-fach konzentriert (Seedmedium, Vorfermentation, Hauptfermentation)	0,0324 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l H_3BO_3 0,14 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,32 g/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
Thiaminhydrochloridlösungen 1000-fach konzentriert	5 g/l Thiaminhydrochlorid
Tetrazyklinstammlösung	0,2 g/l Tetracyclin

2.1.4 Medien

Alle verwendeten Medien basieren auf dem grundlegenden Patent [Camakaris et al., 1997]. Modifikation wurden auf Basis von Selektionstests (Schüttelkolbenmedien, Tetracyclinegehalt), eines Screening-Versuchs zur Medienoptimierung (Bioreaktormedien) und zur Reduktion von undefinierten Komplexanteilen (Bio-

reaktormedien) eingebracht. Weiterhin wurden zur Untersuchung verschiedener weiterer Elementarlimitierungen (Kohlenstoff, Schwefel und Stickstoff) modifizierte Medien auf Basis des phosphatlimitierten Ansatzes entwickelt. Alle Bestandteile der Medien wurden in deionisiertem Wasser gelöst.

Kulturmedium Das Kulturmedium wurde aus einer 10 fach konzentrierten Stammlösung und Einzelkomponenten (Glukose, Tetrazyklin, Spurenelemente) hergestellt, die steril vereinigt wurden. Der pH-Wert der Stammlösung wurde mittels Natriumlauge auf 7 eingestellt, anschließend wurde die Stammlösung autoklaviert. Das Kultur-Medium wurde zur Erstellung von Glycerinkulturen verwendet. Für Kultivierungen mit *E. coli* W3110 wurde kein Tetrazyklin zugegeben.

Tabelle 9: Kulturmedium-Stammlösung (x10)

Komponente	Konzentration
MOPS	167,44 g/l
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	1,41 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,13 g/l
NH_4Cl	19,2 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	4 g/l
KCl	2,4 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,00015 g/l
Spurenelementelösung 1	1 ml/l

Tabelle 10: Kulturmedium

Komponente	Konzentration
Glukose	4 g/l
Kultur-Stammlösung	100 ml/l
Hefeextrakt	1 g/l
Tetracyclin	3,5 mg/l

Seed-Medium Die als Stammlösungen angesetzten Salze wurden in den in Tabelle 11 gezeigten Konzentrationen vereinigt. Der pH-Wert wurde mit NH_4OH auf 7 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Anschließend wurden steril die

Glukosestammlösung (20 % w/w) und die Hefeextraktstammlösung (20 % w/w) zugegeben. Die Thiaminhydrochloridstammlösung, die Tetrazyklinstammlösung und die Spurenelementlösung 2 wurden ebenfalls steril zugegeben. Für Kultivierungen mit *E. coli* W3110 wurde kein Tetrazyklin zugefügt.

Tabelle 11: *Seed*-Medium

Komponente	Konzentration
Glukose	4 g/l
Hefeextrakt	1,1 g/l
MOPS	16,744 g/l
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	0,14 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,013 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,29 g/l
KCl	0,24 g/l
KH_2PO_4	1,1 g/l
Spurenelementelösung 2	50 ml/l
Thiamin HCl	0,005 g/l
Tetracyclin	0,0025 g/l

Vorfermentationsmedium Der Glasreaktor wurde mit den in 12 aufgeführten Salzen autoklaviert. Der pH-Wert wurde mit 25% Ammoniaklösung (NH_4OH) auf 6,7 eingestellt. Über einen Erlenmeyerkoben mit Bodenausfluss wurden Glukose, Spurenelemente, Tetrazyklin und Thiamin zugegeben. Um den Eintrag von Komplexanteilen in die Hauptfermentation zu verringern, wurde für spätere Prozesse auf 7,5 g/l Hefeextrakt (im ursprünglichen Medium) verzichtet. Für Kultivierungen mit *E. coli* W3110 wurde kein Tetrazyklin zugegeben.

Tabelle 12: Vorfermentationsmedium

Komponente	Konzentration
Glukose	27 g/l
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	1 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,1 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	3,15 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,65 g/l
KH_2PO_4	0,75 g/l
K_2SO_4	2,3 g/l
Spurenelementelösung 2	50 ml/l
Thiamin HCl	0,024 g/l
Tetracyclin	0,0025 g/l

Hauptfermentationsmedium: Phosphatlimitierung Das Hauptfermentationsmedium wurde nach einem Screeningexperiment im Vergleich zum Ausgangsmedium [Camakaris et al., 1997] modifiziert. Die Eisensulfat Heptahydrat ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) und Trinatriumcitrat Monohydrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$) Konzentrationen wurde um 30 % reduziert, der Anteil an Spurenelementen um 30 % erhöht. Für Prozesse mit Phosphatfütterung wurde zudem je nach Prozessführungsstrategie die Startkonzentration an KH_2PO_4 reduziert (30 und 44 %).

Tabelle 13: Hauptfermentationsmedium: Phosphatlimitierung

Komponente	Konzentration
Glukose	27 g/l
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	0,7 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	3,15 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	8,65 g/l
KH_2PO_4	1,5 g/l
K_2SO_4	2,3 g/l
Spurenelementelösung 2	26 ml/l

Hauptfermentationsmedium: Glukoselimitierung Das Medium zur Analyse glukoselimitierter Zustände entsprach dem Standardmedium (Tabelle 13).

Ausreichende Phosphatversorgung wurde über eine zusätzliche Fütterung mit einem Phosphatpuffer (siehe Tabelle 8) sichergestellt.

Hauptfermentationsmedium: Stickstofflimitierung Die Stickstofflimitierten Prozesse wurden in einer dreifach Bioreaktoranlage (200 ml Reaktorvolumen) durchgeführt. Die Komponenten wurden entsprechend des Bedarfs angepasst.

Tabelle 14: Hauptfermentationsmedium: Stickstofflimitierung

Komponente	Konzentration
Glukose	28 g/l
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	0,75 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,05 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,36 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,49 g/l
KH_2PO_4	1,13 g/l
K_2SO_4	1,73 g/l
Spurenelementelösung 2	4 ml/l

Medien: verringerter Schwefelanteil Zur Verringerung des Schwefelanteils wurden neben dem Hauptfermentationmedium auch ein schwefelreduziertes Schüttelkolbenmedium entwickelt um den Übertrag von Schwefelkomponenten zu minimieren.

Tabelle 15: Schüttelkolbenmedium: verringerter Schwefelanteil

Komponente	Konzentration
Glukose	3,7 g/l
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	0,009 g/l
MOPS	16,7 g/l
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,3 g/l
KCl	0,24 g/l
Tetracyclin	0,0025 g/l
Thiamin	0,005 g/l
Spurenelementelösung 1	2 ml/l

Tabelle 16: Fermentationsmedium: verringerter Schwefelanteil

Komponente	Konzentration
Glukose	25 g/l
FeC ₆ H ₅ O ₇ x H ₂ O	0,75 g/l
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,26 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,6 g/l
(NH ₄) ₂ C ₆ H ₆ O ₇	3,92 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
Spurenelementelösung 2	4 ml/l

LB-Medium Das LB-Medium wurde für die Kultivierung von *E. coli* verwendet. Alle Bestandteile des Mediums wurden in deionisiertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Bei Bedarf wurde nach Abkühlen des Mediums unter 60°C Tetracyclin (Endkonzentration 5 mg/l) zugegeben. Die Zusammensetzung des LB-Mediums ist in Tabelle 17 angegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wurde zusätzlich 15 g/L Agarose zugegeben.

Tabelle 17: LB-Medium

Komponente	Konzentration [g/L]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5

2.1.5 Stämme

***Escherichia coli* K12 W3110** Als Wildtypstamm wurde *Escherichia coli* K12 W3110 (DSM 5911) eingesetzt.

***Escherichia coli* K12 JP6015 /pMU91** Der zur Tryptophan-Produktion eingesetzte Stamm *Escherichia coli* K12 JP6015 /pMU91 [Camakaris et al., 1997] (DSM10123) zeigt einen folgendermaßen veränderten Genotyp:

1. Inaktivierte tyrosinsensitive DAHP-Synthase,	<i>aroF363</i>
2. Feedbackresistente phenylalaninsensitive DAHP-Synthase	<i>aroG103</i>
3. Feedbackresistente tryptophansensitive DAHP-Synthase	<i>aroH371</i>
4. Teilweise feedbackresistente Anthranilatsynthase (70% Aktivität bei 10 mM Tryptophan)	<i>trpE382</i>
5. Inaktivierter TrpR-Repressor	<i>trpR363</i>
6. Inaktivierter TyrR-Repressor	<i>tyrR366</i>
7. Temperatursensitive, modifizierte Trp-tRNA Synthetase mit einem erhöhten K_m -Wert für Tryptophan	<i>trpS378</i>
8. Defekt im Aufnahmesystem für aromatische Aminosäuren	<i>aroP519</i>
9. Defekt im hochaffinen Tryptophan-Aufnahmesystem	<i>mtr-24</i>
10. Inaktive Tryptophanase und vernachlässigbare TnaB Permease Aktivität (polarer Effekt auf <i>tnaB</i>)	<i>tnaA-1</i>
11. Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle zu nutzen	<i>sac</i> ⁺
12. Selektiert nach Serin-Prototrophie Stamm chromosomal <i>serA</i> ⁻ , plasmidstabilisierender Faktor	<i>ser</i> ⁺

Zusätzlich enthält der Stamm das Plasmid pMU91 (18,8 kb), abgeleitet von pSC101 [Cohen and Chang, 1977]. Auf dem Plasmid enthalten ist *serA*, das Gen der 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase (erste spezifische Reaktion der Serin-Biosynthese). Weiterhin ist das Tetracyclinresistenzgen *tetA* sowie das deregulierte L-Tryptophanoperon *trpE476DCBA* (siehe Abbildung 2).

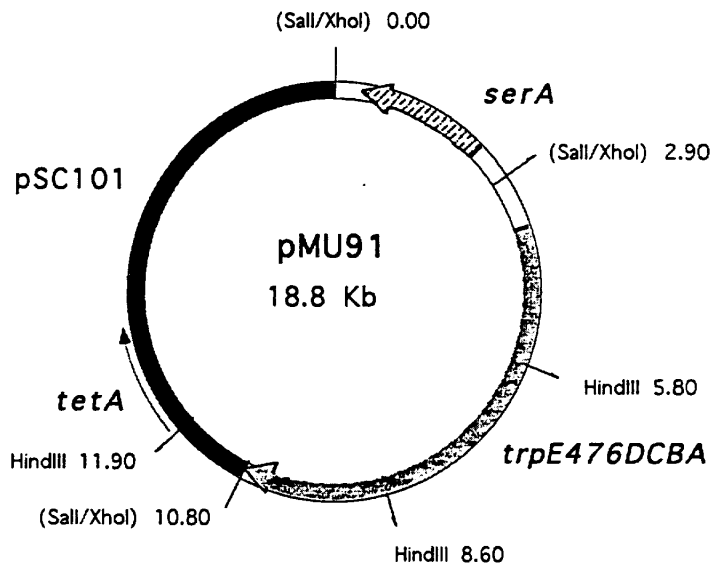


Abbildung 2: Plasmid pMU91, [Camakaris et al., 1997]

Durch Inaktivierung der Repressorproteine TrpR und TyrR und dem Einsatz feedbackresistenter DAHP-Synthasen werden Schlüsselpositionen der Tryptophansynthese dereguliert. Das Gen *trpE476* codiert eine teilweise feedbackresistente Anthranilatsynthase (Aktivitätshemmung von weniger als 10% bei 1 mM L-Tryptophan, 60% Aktivitätshemmung bei 13,5 g/l Tryptophan).

Neben der Deregulierung von Schlüsselenzymen spielt die Einführung einer teilweise defekten Tryptophanyl-tRNA-Synthetase *trpS378* in Verbindung mit inaktivierten Transportsystemen für Tryptophan (*aroP519*, *mtr-24*, *tnaB*) eine entscheidende Rolle für die Verbesserung der L-Tryptophanproduktion. Transportmutanten mit *trpS378* benötigen wenigstens 5 mM Tryptophan für eine gute Vermehrung [Camakaris et al., 1997]. Damit können unter bestimmten Wachstumsbedingungen Mutanten mit erhöhter L-Tryptophanproduktion selektiert werden. Zusätzlich reduziert die weniger tryptophanaffine Tryptophanyl-tRNA-Synthetase den Effekt der Attenuation. Damit erhöht sich zusätzlich die Plasmidstabilität während der Vermehrungsphasen (bei relativ geringen Tryptophankonzentrationen) im Produktionsprozess. Der Defekt in der Tryptophanase TnaA verhindert den Abbau von L-Tryptophan zu Indol und Pyruvat.

2.1.6 Software

Tabelle 18: Verwendete Software

Software	Firma/Autor	Applikation
Analyst 7.0	Genedata	Transkriptomdatenanalyse
Excel 2007	Microsoft	Datenanalyse, Statistik
Endnote X3	Thomson-Reuters	Literaturverwaltung
Insilico Discovery	Insilico biotechnology GmbH	Metabolische Modellierung
Jabref 2.5	general public license	Literaturverwaltung, BibteX
MikTeX 2.9	www.miktex.org	LateX Implementierung für Windows
Sigmaplot 12	Scientific Solutions	Erstellen von Graphen
TeXnicCenter	www.toolcenter.org	Editor für LateX

2.2 Methoden

2.2.1 Sterilisation von Medien und Materialien

Lösungen, Medien, Puffer und Materialien wurden vor ihrem Einsatz bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden mit 0,2 μm Sterilfiltern filtriert.

2.2.2 Stammhaltung

Um mögliche Mutationen und damit Abweichungen der kultivierten Mutanten vom Ursprungsstamm zu Vermeiden, wurden zur Reduktion der Generationenzahl bis zur Verwendung Dauer-Glycerinkulturen für alle verwendeten Stämme erstellt. Dazu wurden die Zellen in Kulturmedium (10, Wildtypstamm ohne Tetracyclin) kultiviert bis die mittlere exponentielle Phase erreicht war. Anschließend wurde die Zellsuspension aliquotiert und unter Zugabe von 20% sterilem Glycerin bei -70 °C bis zur Verwendung eingefroren.

2.2.3 Vorkulturen im Schüttelkolben

Alle Kultivierungen im Schüttelkolben wurden bei 30°C durchgeführt (96 rpm). Für Kultivierungen mit Kulturmedium 10 wurden Schüttelkolben mit 500 ml Gesamtvolumen verwendet, die mit 50 ml Medium befüllt wurden. Für alle weiteren Schüttelkolbenkultivierungen wurden Schüttelkolben mit Schikanen und 2 l Gesamtvolumen eingesetzt. Diese wurden mit 300 ml Medium (z.B. 11) befüllt. Die Kultivierungsdauer betrug 24 h.

2.2.4 Kultivierung in Bioreaktoren

Im Laufe der Arbeit wurden Bioreaktoren in verschiedensten Maßstäben eingesetzt. Für Medienoptimierungen wurde eine Vierfachanlage mit 50 ml Glasreaktoren, für Evaluierungen von Prozessstrategien eine Dreifachanlage mit 300 ml Glasreaktoren sowie einzelne 2l Glasreaktoren eingesetzt. Für Prozessbilanzierungen und Probenahmen zur Analyse intrazellulärer Metabolite und des Transkriptoms wurde ein 30 l Stahlreaktor verwendet

Prozessbilanzierung Zur vollständigen Erfassung des Stoffaustausches wurden die Prozesse umfangreich beprobt und analysiert. Neben Glukose und Essigsäure wurden Aminosäuren und die Stoffanteile von Kohlendioxid und Sauerstoff in der Abluft bestimmt. Darüber hinaus wurden Ammonium- und Phosphationen im Prozessverlauf quantifiziert. Sämtliche Zuläufe und Entnahmen, inklusive der Verdunstung, wurden berücksichtigt. Standardmässig wurden Kohlenstoffbilanzen zur Bewertung der Messungen und des Prozesses eingesetzt. Für einige Prozesse im 300 ml Maßstab wurde zudem eine Gesamtkohlenstoffanalyse der Flüssigphase durchgeführt. Phosphat- und Stickstoffbilanzen wurden zur Auslegung verschiedener Prozessstrategien mit Elementarlimitierung verwendet. Alle Bilanzen wurden sowohl differentiell als auch integral erstellt.

2.2.5 Kultivierung im 30 l Maßstab

Referenzprozess Bei dem sogenannten Referenzprozess handelt es sich um einen aus dem vorliegenden Patent [Camakaris et al., 1997] abgeleiteten phosphatlimitierten Prozess. Ausgehend von Glycerinkulturen wurden Schüttelkolben

(2 l) mit 300 ml Seedmedium (11) beimpft, die bei 30°C für 24 h geschüttelt wurden. Basierend auf Studien zur Plasmidstabilität wurde der Tetracyclinegehalt im Seedmedium im Vergleich zur Patentvorlage auf 2,5 mg/l erhöht. Mit 150 ml der Vorkultur wurden dann 1,35 l Vorfermentationsmedium (12 in einem 2 l Glasreaktor beimpft (1,5 l Gesamtvolumen)). Die Vorfermentation wurde bei 30 °C durchgeführt, der pH-Wert über Ammoniumhydroxidzugabe auf 6,7 geregelt und eine Sauerstoffsättigung größer 30 % durch Kontrolle der Rührerdrehzahl eingestellt. Die Prozesslaufzeit betrug 16 h. Im Vergleich zur Patentvorgabe war das Reaktionsvolumen vergrößert und basierend auf Wachstums- und Produktbildungsstudien die Kultivierungszeit verkürzt (24 auf 16 h). Darüber hinaus wurde zur Vermeidung undefinierter Medienanteile (auch Übertrag in Hauptfermentation möglich) auf Hefeextrakt verzichtet und die Tetracyclinkonzentration auf 2,5 mg/l erhöht. Die gesamten 1,5 l Vorfermentationsvolumen wurden zum Animpfen der Hauptkultur mit leichtem Überdruck über eine Verbindungsleitung in den 30 l Hauptreaktor mit 10,5 l Hauptfermentationsmedium (siehe Abschnitt 13) übertragen.

Die Hauptkultivierung wurde als Fed-Batch-Prozess für 32 h bei 33 °C durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 25 % Ammoniumhydroxidlösung auf 6,9 geregelt, zusätzlich wurde über Regelung der Rührerdrehzahl eine Sauerstoffsättigung größer 25 % sichergestellt. Als Fütterungslösung wurde 620 g/l Glukoselösung verwendet. Die Fütterung wurde so gesteuert, dass ein glukosegesättigter Zustand über den gesamten Prozessverlauf gegeben war. Wachstumslimitierendes Substrat war Phosphat, das im Hauptfermentationsmedium vorgelegt wurde. Die Sättigung aller übriger Makroelemente im Prozessverlauf wurde durch Analyse von Ammonium, Sulfat sowie Sauerstoff durch eine Sauerstoffsonde sichergestellt. Basierend auf Ergebnissen eines Screenings nach sensitiven Medienkomponenten (siehe folgender Abschnitt 2.2.6) wurde für spätere Prozesse zur Verbesserung der Stabilität und zur Reduktion zusätzlicher kohlenstoffhaltiger Komponenten der Eisensulfatgehalt und der Natriumcitratgehalt um 30 % im Vergleich zur Patentvorgabe reduziert und der Spurenelementeanteil um 30 % erhöht um für erhöhte Biomassekonzentrationen ausreichend Spurenelemente zur Verfügung zu stellen. Für die Hauptfermentation erfolgte eine vollständige Volumenbilanzierung, Abgasanalyse und Messungen aller relevanten Produkte und Nebenprodukte im Kulturüberstand zur Prozessbilanzierung.

Phosphatfütterung Alle Prozesse mit zusätzlicher Phosphatfütterung basierten auf dem Referenzprozess. Kulturführung, Hauptfermentationsmedium und Prozessparameter wurden bis auf die Phosphatkonzentration im Fermentationsmedium und die zusätzliche Phosphatfütterung übernommen. Im Vorfeld wurden Phosphatfütterungsprozesse mit konstanter und exponentieller Fütterung mit unverändertem Hauptfermentationsmedium durchgeführt. Für die folgenden Studien des Übergangs in die Phosphatlimitierung wurde die Phosphatkonzentration im Hauptfermentationsmedium auf 0,6 g/l reduziert um einen Übergang bei etwa 5 g/l Biotrockenmassekonzentration zu ermöglichen. Dadurch wurde ein definierter Limitierungszustand gewährleistet (Phosphatlimitierung). Die zu Prozessende erreichten Biomassen und Produktkonzentrationen bewegten sich innerhalb des Auslegungsbereichs des Mediums (Vorversuche, Referenzprozesse und Medien-*Screening*). Als Phosphatfütterungslösung wurde ein Kaliumphosphatpuffer (pH 7, siehe Tabelle 8) mit einer finalen Phosphatkonzentration von 23,81 g/l eingesetzt. Die Phosphatkonzentration der Feedlösung war anhand der Phosphataufnahmeraten des Referenzprozesses in der Übergangsphase und der technischen Rahmenbedingungen der Fütterungspumpen (minimale Förderrate, Förderbereich) festgelegt worden.

Glukoselimitierung Die Prozessführung der glukoselimitierten Prozesse wurde ebenfalls ausgehend vom Referenzprozess unter Beibehaltung der Prozessparameter entwickelt. Um eine definierte Limitierungsbedingung zu schaffen, musste der Stickstoff- und Phosphorgehalt des Mediums erhöht werden. Die Stickstoffzugabe war wegen der veränderten Titration unter Glukoselimitierung nötig geworden. Da insbesondere für Phosphor (über Phosphat) die Löslichkeit im Medium begrenzt war, musste die Versorgung über eine zusätzliche Fütterung gewährleistet werden. Um eine kombinierte Zugabe der Elemente zu ermöglichen, wurde eine Ammoniumphosphatlösung $((\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4)$, siehe Tabelle 8) eingesetzt. Der Bedarf und die Fütterungsrate wurde über Elementarbilanzierung des Referenzprozesses abgeschätzt. Die Glukoselimitierung wurde über exponentielle Fütterung erreicht. Die Fütterungsrate wurde basierend auf Biomasse- und Substratbilanz unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels berechnet. Die Fütterung wurde gestartet, nachdem die im Batch vorgelegte Glukose verbraucht war. Über die Fütterung wurde eine spezifische Wachstumsrate von 0,1 1/h eingestellt.

Serielle Glukose- und Phosphatlimitierung Für die serielle Glukose- und Phosphatlimitierung wurde im Vergleich zum Referenzprozess die Glukosevorlage im Hauptfermentationsmedium auf 5 g/l reduziert. Beim Erreichen einer Glukosekonzentration kleiner als 0,5 g/l wurde exponentiell Glukose zugefüttert (siehe Abschnitt 2.2.10). Die eingestellte spezifische Wachstumsrate betrug 0,3 1/h, da für geringere Wachstumsraten (siehe Abschnitt 2.2.5) ein Plasmidverlust festgestellt worden war. Die exponentielle Fütterung wurde bis zum Einsetzen der Phosphatlimitierung beibehalten. Mit Beginn der Phosphatlimitierung und akkumulierender Glukose wurde analog zum Referenzprozess auf eine manuell gesteuerte Fütterung umgestellt. Die Glukosekonzentration im Reaktor wurde zwischen 5 und 15 g/l gehalten.

2.2.6 Kultivierung in Parallelreaktorsystemen

Medienscreening Das Medien-Screening wurde in einer im Projektverlauf entwickelten Vierfach-Reaktoranlage mit Glasreaktoren mit 50 ml Gesamtvolumen durchgeführt. Die Etablierung und praktische Umsetzung des Ansatzes fand im Rahmen einer im Projekt durchgeführten Diplomarbeit statt [Hurler, 2011]. Um eine ausreichende, nicht-limitierende Sauerstoffversorgung sicherzustellen, wurde eine Begasung über Edelstahlfritten mit 5 μm Porengröße eingeführt, zusätzlich wurde mit einem Magnetrührer durchmischt. Die Ansätze orientierten sich am Referenzmedium [Camakaris et al., 1997], aufgrund des begrenzten Sauerstoffeintrags wurden alle Komponenten zunächst auf 75 % der ursprünglichen Stoffmengen reduziert. Der pH- Wert wurde über Zugabe von 10 % Ammoniumhydroxyd-lösung und 10 % Schwefelsäure geregelt, zusätzlich wurden 16,7 g/l N-morpholino-3-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer zugegeben um pH-Schwankungen zu Beginn der Kultivierung abzuschwächen. Die Kulturführung beinhaltete analog zur Referenzkultivierung eine aus Glycerinkulturen angeimpfte Schüttelkolbenkultivierung (24 h, Seed-Medium) und eine Vorfermentation (Vorfermentationsmedium, zusätzlich MOPS, 16 h), die ebenfalls im 50 ml Reaktor durchgeführt wurde. Im Laufe des eindimensionalen Screenings wurden insgesamt 11 Medienkomponenten modifiziert oder im Falle von Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) zusätzlich beigefügt. Als Bewertungskriterium dienten für drei standardisierte Zeitpunkte die Konzentrationen an Biomasse, Tryptophan und Acetat, die jeweils mit mehrfach im Ablauf identisch durchgeführten Referenzkultivierungen

(n größer 8) verglichen wurden. Bei einer signifikanten Abweichung einer Größe zu einem Zeitpunkt der Kultivierung wurden die entsprechenden Prozesse im Triplikат wiederholt um die Signifikanz der Abweichungen zu bewerten.

Stickstofflimitierung Versuche zur Stickstofflimitierung wurden in einer am Institut durch Andreas Freund entwickelten Dreifach-Reaktoranlage mit 300 ml Glasreaktoren durchgeführt. Die Anlage verfügte über eine pH-Regelung, eine pO_2 -Regelung über die Steuerung der Begasungsrate und der Rührerdrehzahl sowie ansteuerbare Pumpen zur Substratzufütterung. Aufgrund der verwendeten Magnetrührer und Begasungsfritten war der maximale Sauerstoffeintrag begrenzt, die Prozesse mussten daher in Füllvolumen, Laufzeit und maximaler Biomassekonzentration angepasst werden. Die Leistungsfähigkeit des Reaktorsystems wurde im Rahmen einer im Projekt betreuten Masterarbeit (Verfahrenstechnik) durch Achim Werner [Werner, 2014] charakterisiert und bedient. Prozesse zur Stickstofflimitierung wurden als Batch- und Fed-Batch-Ansatz mit bis zu 12 h Laufzeit durchgeführt. Die Prozesse waren am Referenzprozessszenario orientiert.

Schwefellimitierung Ziel der Verringerung des Schwefelanteils im Medium war es, eine Wachstumslimitierung zu erreichen ohne dabei Einfluss auf die Produktbildung oder den Energiemetabolismus zu nehmen. In Screeningversuchen im Schüttelkolbenmaßstab wurde daher ein Medium mit einem theoretisch stark reduzierten Schwefelgehalt entwickelt (siehe Tabellen 15 und 16). Aufgrund des geringen Schwefelgehalts der Biomasse verhindern bereits geringe Schwefelkontaminationen eine Wachstumslimitierung durch Schwefel. Im Rahmen des anwendungsbezogenen Projektes wurden keine hochreinen Medienkomponenten eingesetzt.

Prozesse zur Untersuchung der Schwefellimitierung wurden als Batch-Ansatz mit bis zu 12 h Laufzeit im 300 ml Parallelreaktorsystem durchgeführt.

2.2.7 Probenahme und Aufarbeitung

Zur quantitativen Analyse von Metaboliten, Zellmasse und RNA wurden verschiedene Probenahmetechniken eingesetzt. Ziel einer Probenahmestrategie war

die Stabilisierung des Analyten um ein möglichst exaktes Abbild des Zustandes zum Zeitpunkt der Probenahme zu erhalten.

Trockenmassebestimmung Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden abhängig von der Zellkonzentration im Reaktor 5 bis 10 ml Zellsuspension in gewogene, getrocknete Reagenzgläser gegeben und für 10 min bei 4000 *g* abzentrifugiert (4 °C). Anschließend wurde das Pellet zwei mal mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Zuletzt wurden die Pellets bei 120 °C für mindestens 24 Stunden getrocknet und anschließend gewogen.

Filtrationsproben Filtrationsproben wurden im 30 l Maßstab mit Hilfe eines Keramikfiltrationsmoduls direkt aus dem Bioreaktor entnommen. Für kleinere Maßstäbe wurden Sterilfilter (Cellulose-Actetat) mit 0,22 μm Porengröße verwendet.

Suspensionsproben Um die mögliche Ausfällung von Produkten zu überprüfen, wurden zusätzlich zu den Filtratproben Suspensionsproben entnommen. Die Zellsuspension wurde in ein gleiches Volumen destilliertes Wasser gegeben, durchmischt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 4000 *g* für 10 min abzentrifugiert, der Überstand weiterverwendet und mit den Filtratproben verglichen.

Methanol- und Ethanol-Quenching Angelehnt an etablierte Methoden wurden zur Inaktivierung des Metabolismus (Quenching) Versuche zum Methanolquenching

[Nöh et al., 2007, Winder et al., 2008, Gonzalez et al., 1997, Taymaz-Nikerel et al., 2009, van Gulik, 2010] und Ethanolquenching [Spura et al., 2009] durchgeführt. Beide Methoden basieren auf Kälteinaktivierung. Zur Extraktion wurde kochendes Ethanol [Winder et al., 2008, Gonzalez et al., 1997, Taymaz-Nikerel et al., 2009, Tweeddale et al., 1998] verwendet, die Probenaufarbeitung basiert auf am IBVT entwickelten Protokollen (Dr. Oliver Vielhauer).

Methanol-Quenching Jeweils ein Volumen Probe (2 ml) wurde in vier Volumen (8 ml) gekühlte Quenchinglösung (-40 °C, siehe Tabelle 5) gegeben, da-

nach folgte eine kurze Inkubation bei -40°C bis eine Proben­temperatur von -20°C erreicht war. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 5000 g und -20°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit kochendem Ethanol (95%) aufgeschlossen (Inkubation 3 min bei 90°C). Nach der Extraktion erfolgte eine schnelle Abkühlung im Eiswasserbad. Aufgrund der schlechten Löslichkeit einiger polarer Metabolite in Ethanol wurden die Proben bis 5 % Restvolumen evaporiert (Vaakuumrotationsevaporator) und in einem definierten Volumen destilliertem Wasser (HPLC Reinheitsgrad) resuspendiert. Abschließend folgte eine erneute Zentrifugation (3 min, 5000 g), der Überstand wurde abgenommen und bis zur Analyse bei -70°C gelagert.

Ethanol-Quenching Jeweils ein Volumen Probe (2 ml) wurde in vier Volumen (8 ml) gekühlte Quenchinglösung (-20°C , siehe Tabelle 5) gegeben, danach folgte eine kurze Inkubation bei -40°C bis eine Proben­temperatur von -10°C erreicht war. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 5000 g und -20°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit kochendem Ethanol (95%) aufgeschlossen (Inkubation 3 min bei 90°C). Nach der Extraktion erfolgte eine schnelle Abkühlung im Eiswasserbad. Aufgrund der schlechten Löslichkeit einiger polarer Metabolite in Ethanol wurden die Proben bis zu einem Restvolumen kleiner 5% evaporiert (Vaakuumrotationsevaporator) und in einem definierten Volumen destilliertem Wasser (HPLC Reinheitsgrad) resuspendiert. Abschließend folgte eine erneute Zentrifugation (3 min, 5000 g), der Überstand wurde abgenommen und bis zur Analyse bei -70°C gelagert.

Wärmetauscher Mit Hilfe eines automatisch ansteuerbaren Probenahmeventils wurde zur Probenahme, *Quenching* und Extraktion ein Wärmetauscher (Heizwendel) eingesetzt [Schaub et al., 2006]. Nach Evaluierung der Inaktivierung wurden Proben zusätzlich 1 min bei 95°C inkubiert. Der Wärmetauscher mit Doppel­mantel und die automatische Probenahme wurde am Institut entwickelt (Andreas Freund).

Perchlorsäureaufschluss Perchlorsäureaufschluss ist eine weit verbreitete und etablierte Quenching- und Extraktionsmethode für Adeninnukleotide [Lowry et al., 1971]. Die verwendeten Protokolle basieren auf Vorarbeiten der Analytikabtei-

lung (Oliver Vielhauer). Für den Perchlorsäureaufschluss wurde zunächst 1 ml Perchlorsäure-EDTA Lösung (35 % und 80 μ M EDTA) bei -40°C im Kryostat inkubiert. Bei der Probenahme wurden 4 ml Biosuspension direkt auf die Perchlorsäure-EDTA-Lösung gegeben und bei 6°C für 15 Minuten mit dem Überkopfschüttler durchmischt. Die Probe wurde entweder durch eine Festphasenextraktion aufgearbeitet (siehe 2.2.7) oder direkt mit einer KOH-Lösung (5 M KOH und 1 M KH_2PO_4 , Verhältnis 9:1) neutralisiert und das ausgefallene Perchlorat wurde abzentrifugiert (Megafuge, 4000 rpm, 4°C , Rotor 2704). Der Überstand wurde entnommen und bei -20°C gelagert.

Probenaufarbeitung zur Nukleotidbestimmung Zur Aufarbeitung von Nukleotidproben wurde eine Festphasenextraktion mit einem Benzolsulfonsäure-Kationenaustauscher (Macherey-Nagel, 3 ml) durchgeführt. Hierzu wurden die Extraktionssäulen zunächst mit 3 ml Methanol und 3 ml Wasser vorkonditioniert. In der Folge wurde 1 ml Perchlorsäure-Gesamtaufschlusslösung (siehe 2.2.7) aufgetragen. Abschließend wurde die Säule mit 1 ml 5 % Essigsäure eluiert. Nach vollständiger Absorption der Probe auf der Säule wurde die erste Fraktion (1 ml) neutralisiert (siehe 2.2.7), abzentrifugiert und zur Nukleotidbestimmung verwendet. Die Methode wurde im Verlauf des Projektes mit Unterstützung von Dr. Oliver Vielhauer entwickelt und im Rahmen einer Diplomarbeit evaluiert [Löffler, 2012].

Transkriptomprobennahme Transkriptomproben wurden zur Inaktivierung, Stabilisierung und zur besseren Handhabbarkeit bei Raumtemperatur direkt aus dem Reaktor in RNAProtect-Lösung (Bacterial Reagent, Qiagen) gegeben. Zur genauen Volumendosierung wurde ein kalibriertes halbautomatisches Probenahmeventil verwendet. Aufgrund der hohen Zellkonzentrationen wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in 3 ml RNAProtect-Lösung gegeben. Die Suspension wurde in der Folge so aliquotiert, dass für die Microarray-Analyse ausreichend Gesamt-RNA ($>5\mu\text{g}$) zur Verfügung stand. Dabei wurden jeweils Triplikate für drei verschiedene RNA-Mengen (5, 10, 20 μg) entnommen um eine sichere Analyse und Qualitätskontrolle zu gewährleisten. Da ausgelöst durch die Phosphatlimitierung signifikante Veränderungen des Gesamt-RNA-Gehaltes der Zelle auftraten, musste das Aliquotvolumen für den jeweiligen Probenahmezeitpunkt angepasst werden. Hierzu wurde in einem vorausgegangenem Experiment der Verlauf der Gesamt-

RNA-Menge über der extrazellulären Phosphatkonzentration bestimmt. An die Messpunkte (Tabelle 19) wurden zur kontinuierlichen Beschreibung eine logarithmische Funktion angepasst (Abbildung 3) über die ein Volumenkorrekturfaktor berechnet werden konnte.

Tabelle 19: Experimentell bestimmter RNA-Biomasseanteil (Referenzprozess)

c_{PO_4}	RNA Biomasseanteil (%)	Reduktionsverhältnis
1	14.678	1
0.65	14.365	1.022
0.03	1.134	12.945
0	0.582	25.214

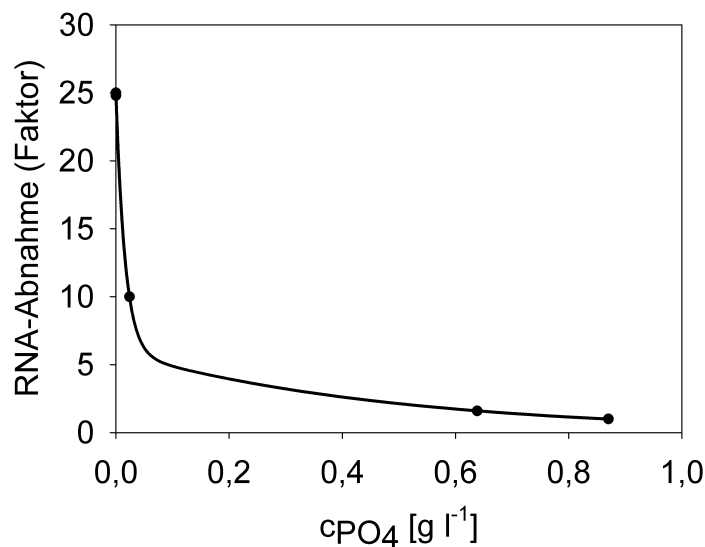


Abbildung 3: Verlauf der Gesamt-RNA-Abnahme über der Phosphatkonzentration (logarithmische Anpassung)

Da zur Anwendung im Prozessverlauf mit geänderter Fütterungsstrategie während des Prozesses noch keine Phosphatkonzentrationen vorlagen, wurde der Faktor der Gesamt-RNA-Abnahme über den Prozessverlauf [h] extrapoliert um anhand der kurz vor Probenahme gemessenen optischen Dichte die Aliquotvolumina zu berechnen. Die nichtlineare Regression wurde mittels einer sigmoidalen Funktion mit 5 Parametern durchgeführt (Sigmaplot 11.0, Abbildung 4).

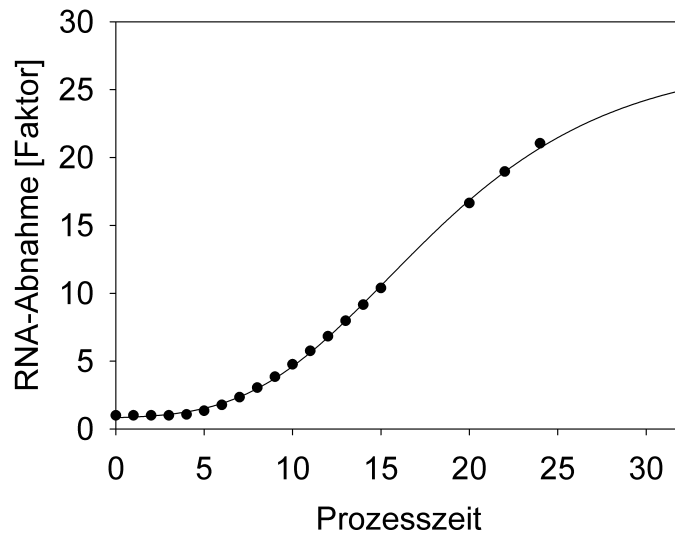


Abbildung 4: Verlauf der Gesamt-RNA-Abnahme über der Prozesszeit (Referenzprozess, sigmoide Anpassung)

Das Volumen des Aliquots wurde abschließend über folgende Gleichung berechnet:

$$V_{aliq} = \frac{D}{OD \times k \times z} \quad (1)$$

Dabei beschreibt D den Verdünnungsfaktor durch die RNAProtect-Lösung, k den Korrekturfaktor durch die Abnahme der Gesamt-RNA (Berechnet mit der angepassten Funktion aus Abbildung 4) und z einen Proportionalitätsfaktor zwischen RNA-Gehalt und der optischen Dichte (OD), der auf Basis der Herstellerangaben zur Probenahme mit RNAProtect abgeleitet wurde (Qiagen).

2.2.8 Analytik

Zur umfassenden Prozessbilanzierung wurden verschiedene analytische Plattformen eingesetzt. Über Messungen mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurden Probenahme-, Quenching und Extraktion intrazellulärer Metabolite evaluiert. Zur Bestimmung intrazellulärer Energieladung wurde eine sogenannte „Reversed Phase“-Chromatographie mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) durchgeführt. Zur Analyse extrazelluläre Aminosäuren wurde

ebenfalls HPLC-RP-Chromatographie eingesetzt. Zur Gesamtkohlenstoffbilanzierung kam ein Kohlenstoff/Stickstoff-Analysator (AnalytikJena, Multi N/C 2100s) zum Einsatz. Aufgrund der komplexen Probenmatrix kamen kommerzielle Messkits zum Einsatz, die photometrisch anorganische Ionen oder enzymatisch Glukose und Acetat bestimmbar machten. Zusätzlich wurden zur Prozesssteuerung eine Online-Glukosesonde eingesetzt. Prozesse im 30 l Maßstab waren zudem mit einer Abgasanalytik ausgestattet.

Glukosebestimmung durch ProcessTrace Sonde Zur Prozesssteuerung wurde eine Online-Glukosesonde von TRACE Analytik eingesetzt. Die Messung erlaubt eine volumenneutrale Glukosebestimmung. Der gewählte Messbereich (Sensor) lag zwischen 0,1 und 20 g/l

Abgasanalyse Zur Abgasanalyse wurden zunächst Systeme von Inova und Maihak evaluiert, die allerdings im Bezug auf den Messbereich und die Sensitivität gegenüber Veränderungen des Gasvolumenstroms Nachteile offenbarten. In der Folge wurden daher Module von BlueSense (CO₂ und O₂) eingesetzt. Beide Messungen sind aufgrund einer Membran zunächst diffusionsabhängig, was eine erhöhte Robustheit gegenüber Gasvolumenstromänderungen ermöglicht. Schnelle, dynamische Veränderungen können allerdings nicht erfasst werden, da durch den Diffusionsschritt (zusätzlich zum Totvolumen der Messstrecke) eine Messträgheit vorliegt. Die Sauerstoffmessung basiert dabei auf einem Zirkoniumoxidkatalysator, die Kohlendioxidmessung wird infrarotbasiert durchgeführt. Im Laufe des Projektes wurde die Messstrecke kontinuierlich durch Technikumsingenieur Andreas Freund weiterentwickelt. Durch Abluftkühleinheiten und Kondensatabscheidung konnte der Fehler durch hohe Wasseranteile in der Fermenterabluft deutlich reduziert werden. Zusätzlich beinhaltet die Anlage einen Überlaufschutz, der mit Leitfähigkeitssensoren und Ventilsteuerung ein Überlaufen in die Messeinheit verhindert. Dadurch kann die Messeinheit auch ohne Aufsicht am Reaktor angeschlossen bleiben.

Glukosebestimmung Die Glukosekonzentration wurde mit einem Testkit (Roche Diagnostics GmbH) enzymatisch bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Acetatbestimmung Die Acetatkonzentration wurde mit einem Testkit (Roche Diagnostics GmbH) enzymatisch bestimmt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Farbreaktionsbestimmungen Anorganische Ionen wie Phosphat und Ammonium wurden im Fermentationsüberstand mittels Farbreaktion und Absorptionsmessung bestimmt. Verwendet wurden Kits von Hach-Lange. Zunächst wurden dabei jeweils über den Prozessverlauf potentielle Störionenkonzentrationen abgeschätzt oder quantifiziert um die minimal mögliche Verdünnung zu ermitteln. Alle Messungen wurden dabei durch Verdünnungs- und Aufstockungsexperimente validiert und mindestens als Triplikat durchgeführt.

Phosphatmessung Zur Phosphatmessung wurde das Kit LCK 348 (ortho-Phosphat) von Hach-Lange nach Herstellerangaben eingesetzt.

Ammoniummessung Zur Ammoniummessung wurde das Kit LCK 303 von Hach-Lange nach Herstellerangaben eingesetzt.

Sulfatmessung Zur Sulfatmessung wurde das Kit LCK 353 von Hach-Lange nach Herstellerangaben eingesetzt.

Aminosäureanalytik mit HPLC Als Grundlage für die quantitative Erfassung von Aminosäurekonzentrationen in Fermentationsüberständen diente eine Veröffentlichung aus dem Jahre 2006 bezogen auf eine spezielle RP-Aminosäuren-Säule und eine Agilent HPLC-Plattform (Zorbax Eclipse Plus C18 Säule und eine Agilent HPLC der Serie 1200) [Henderson and Brooks, 2006]. Die Detektion erfolgte über ein Fluoreszenzsignal nach vorhergegangener Derivatisierung der Aminosäuren mit OPA. Dabei reagiert OPA mit der Aldehydgruppe primärer Amine zu ein fluoreszierendem Isoindolderivat. Durch die weitere Zugabe von FMOC können auch sekundäre Amine derivatisiert werden (FMOC wurde in Acetonitril gelöst). Die Probenderivatisierung erfolgte automatisch auf der Vorsäule, was eine hohe Reproduzierbarkeit, Stabilität und geringen Volumentransfer ermöglichte. Zunächst wurde 1 μ l Probe mit 2,5 μ l Boratpuffer versetzt. Anschließend

wurden 0,5 μl OPA-Reagenz, darauf folgend 0,4 μl FMOC und 32 μl Injektionslösung (Fließmittel A und Phosphorsäure) zugegeben. Als Standard wurde eine Aminosäurelösung von Sigma-Aldrich verwendet. L-Asparagin, L-Glutamin, L-Tryptophan wurden separat zur Standardlösung gegeben. Prozessproben wurden mehr als 500-fach in entionisiertem Wasser verdünnt. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min bei 40°C, der Fließmittelgradient ist in Tabelle 2.2.8 angegeben.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	98	2
0,34	98	2
33,4	43	57
33,5	0	100
39,3	0	100
39,4	98	2
40	98	2

Nukleotidanalytik mit HPLC Zur Bestimmung von Nukleotiden wurde eine Agilent HPLC der 1200er Serie mit einer C18-RP-Säule und UV-Detektor (260 nm) eingesetzt. Die Säulentemperatur betrug 30 °C, die Flussrate 1 ml/min. Die Trennung erfolgte über den in Tabelle 2.2.8 dargestellten Fließmittelgradienten. Als Standards wurden synthetische Nukleotidmischungen verwendet, die aus Einzelkomponenten (Sigma Aldrich) zusammengestellt wurden.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	100	0
3,5	100	0
20	60	40
22	55	45
40	45	55
48	0	100
55	0	100
60	100	0
67	100	0

Isokratische HPLC Sämtliche HPLC-Analysen von Zuckern und organischen Säuren wurden mit einem Agilent 1200 System mit einem RI-Detektor durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte isokratische bei 60 °C mit einer Flussrate von 0,4 ml/min. Das Flussmittel war verdünnte Schwefelsäure (5 mM), als Säulenmaterial wurde REZEX ROA (Ionenausschlusschromatographie ,Phenomenex) eingesetzt.

Probenvorbereitung Alle Proben wurden auf eine Maximalkonzentration von 5 g/l verdünnt und anschließend 1:5 mit verdünnter Schwefelsäure (100 mM) gemischt (Endkonzentration 1 g/l in 1 ml). Die Proben wurden daraufhin kurz geschüttelt für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 13 000 *g* für 10 min abzentrifugiert und etwa 800 μ l des Überstandes für die Analyse verwendet.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie Für alle GC-MS Messungen wurde ein System von Perkin Elmer verwendet. Der Gaschromatograph (AutoSystem XL GC, Perkin Elmer) war mit einer Kapillarsäule (26m x 0.25mm x 0.25 μ m, Phenomenex) bestückt, die über eine beheizte Kupplung direkt an das Massenspektrometer (TurboMass, Perkin Elmer) angeschlossen war. Der *Glas-Liner* des Injektors war mit silanisierter Glaswolle (Supelco) gepackt. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Gesamtlaufzeit der Prozesse betrug ca. 57 min. Es wurden zwei Quantifizierungsprotokolle zur Metabolitanalyse eingesetzt. Die erste Methode beinhaltete eine *Split*-Injektion mit einem *Fullscan* des Massenspektrums, die zweite Methode eine *Splitless*-Injektion mit anschließenden *Selected Ion Recording* (SIR) für bestimmte Massenbereiche. Die Temperatur des Ofens wurde in beiden Fällen für 2 min bei 70°C gehalten, dann mit 6°C/min auf 320°C erhöht und dort für 10 min gehalten. Für die *Split*-Methode wurde heiß bei 230°C mit einem *Split*-Injektionsverhältnis von 1:20 bei normaler Injektionsgeschwindigkeit injiziert. Für die *Splitless*-Methode wurde mit Aktivierung des *Splits* nach 1,3 min (51 ml/min) mit einem Druckpuls von 20 psi und schneller Injektionsmethode injiziert. Es wurde in beiden Fällen ein Injektionsvolumen von 1 μ l verwendet. Die Temperatur der Ionenquelle des Massenspektrometers (TurboMass, Perkin Elmer) betrug 230°C und die Elektronenstossionisierung (EI) wurde mit 70 eV betrieben. Je nach verwendetem Detektionsverfahren, *Fullscan* oder SIR, wurden unterschiedliche Parameter zur Aufzeichnung der Massenspektren verwendet [Tönnessen, 2008]. Für die

computergesteuerte Bedienung und zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm TurboMass 4.1 von Perkin Elmer verwendet. Zur Identifizierung von Komponenten aus Massenspektren wurde zusätzlich die NIST-Datenbank eingesetzt.

Probenvorbereitung GC-MS-Proben mit einer maximale Analytmenge von 50 nmol wurden nach Zugabe von 10 μL O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid gelöst in Pyridin (20 g/l) bei 5 mBar und 35 °C evaporiert (Vakuumrotations evaporator). Zu den trockenen Proben wurde 60 μl O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid gelöst in Pyridin (20 g/l) gegeben und die Probe für 90 min bei 30°C geschüttelt. Daraufhin wurde die Probe kurz stark geschüttelt um Kondensat und Probe zu vermischen und anschließend bei 10000 g für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 40 μl in ein GC-MS Vial übertragen und 64 μl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) zugefügt. Die Proben wurden daraufhin für 60 min bei 50°C geschüttelt und vor der Messung mittels GC-MS nochmals stark geschüttelt um Kondensat und Probe zu vermischen.

Quantifizierung Für Konzentrationsabschätzungen wurden die Metabolitkonzentrationen über eine durch synthetische Metabolitmischungen erzeugte Kalibrierung abgeschätzt. Zusätzlich wurde eine Blindprobe mitgeführt um störende Elemente der genutzten Derivatisierungsreagenzien und Gefäße zu identifizieren. Hierzu wurde ein leeres Eppendorfgefäß den gleichen Prozessschritten zur Probenvorbereitung unterzogen wie die Proben. Die quantifizierten Proben wurden mit den detektierten Mengen in der Blindprobe korrigiert. Für Quantifizierungen wurden ^{13}C markierte Algenextrakte (Sigma Aldrich) als interne Standards eingesetzt.

2.2.9 Berechnung der Energieladung

Die Energieladung der Zelle, der sogenannte „adenylate energy charge“ (EC) wurde nach Atkinson et al [Atkinson, 1968] folgendermaßen berechnet:

$$EC = \frac{c_{ATP} + 0,5 \times c_{ADP}}{c_{ATP} + c_{ADP} + c_{AMP}} \quad (2)$$

2.2.10 Prozessdatenanalyse und Berechnungen

Die Berechnung der Raten erfolgte abschnittsweise durch lineare Approximierung oder im Falle der Wachstumsrate durch Integration des Differentials. Die Kohlenstoffbilanzierung erfolgte sowohl integral als auch differentiell für Messintervalle.

Berechnung der spezifischen Wachstumsrate Die spezifische Wachstumsrate μ [1/h] ist folgendermaßen definiert:

$$\mu = \frac{1}{c_x} \times \frac{dc_x}{dt} \quad (3)$$

Um eine Massenbilanz darzustellen, wurde die Gleichung mit Volumentermen erweitert (Konzentration zu Masse):

$$\mu = \frac{1}{c_x \times V_r} \times \frac{d(c_x \times V_r)}{dt} \quad (4)$$

Für das Prozessintervall ergibt sich nach Integration:

$$\mu = \frac{\ln \frac{V_{r,i+1} \times c_{x,i+1}}{V_{r,i} \times c_{x,i}}}{t_{i+1} - t_i} \quad (5)$$

Berechnung der Aufnahmeraten Die absoluten Substrataufnahmeraten Q_s [g/h] wurden auf Grundlage von Gleichung 6 berechnet:

$$Q_s = -\frac{dc_s}{dt} + \frac{F}{V_R} \times (c_{s,Feed} - c_s) \quad (6)$$

Dabei wird die Zufütterung durch einen Verdünnungsterm und einen Substratdifferenzterm berücksichtigt. Intervallweise berechnet ergibt sich daraus folgende Gleichung:

$$Q_s = -\frac{c_{s,(i+1)} - c_{s,i}}{t_{i+1} - t_i} + \frac{2 \times \frac{V_{Feed,i+1} - V_{Feed,i}}{t_{i+1} - t_i}}{V_{r,i+1} + V_{r,i}} \times \left(c_{s,Feed} - \frac{c_{s,(i+1)} + c_{s,i}}{t_{i+1} - t_i} \right) \quad (7)$$

Die spezifischen Substrataufnahmeraten q_s [g/(g×h)] errechnen sich aus der Normierung auf eine mittlere Biomassekonzentration im Intervall:

$$q_s = \frac{2 \times Q_s}{c_{x,i+1} + c_{x,i}} \quad (8)$$

Produktbildungsraten Die absoluten Produktbildungsraten R_p [g/h] wurden ebenfalls unter Berücksichtigung der Verdünnung abschnittsweise auf folgender Grundlage berechnet:

$$R_p = \frac{dc_p}{dt} + \frac{F}{V_r} \times c_p \quad (9)$$

Für das Intervall ergibt sich daraus:

$$R_p = \frac{c_{p,i+1} - c_{p,i}}{t_{i+1} - t_i} + \frac{V_{r,i+1} - V_{r,i}}{t_{i+1} - t_i} \times (c_{p,i+1} + c_{p,i}) \quad (10)$$

Für die spezifische Produktbildungsrate π_p [g/(g×h)] ergibt sich durch Normierung auf die mittlere Biomassekonzentration im Intervall:

$$\pi_p = \frac{2 \times R_p}{c_{x,i+1} + c_{x,i}} \quad (11)$$

Ausbeuteberechnung Die Berechnung der Ausbeutekoeffizienten für Produkte und Biomasse erfolgte massenbasiert sowohl intervallweise als auch integral. Die Biomasseausbeute $Y_{\frac{x}{s}}$ errechnet sich nach:

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (12)$$

X beschreibt die Biomasse, S die Masse des Substrats.

Zur intervallweisen Berechnung des Substratverbrauchs muss die zugeführte Substratmasse (S_{Feed} [g]) berechnet werden:

$$S_{Feed} = V_{Feed} \times c_{s,Feed} \quad (13)$$

Für die Biomasseausbeute lässt sich intervallweise berechnen:

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{c_{x,i+1} \times V_{R,i+1} - c_{x,i} \times V_{R,i}}{c_{s,i+1} \times V_{R,i+1} - c_{s,i} \times V_{R,i} + S_{Feed,i+1} - S_{Feed,i}} \quad (14)$$

c_s beschreibt die Substratkonzentration, c_x die Biomassekonzentration, V_R das Reaktionsvolumen und S_{Feed} die zugefütterte Substratmasse.

Analog ergibt sich für die Produktausbeute Y_p :

$$Y_p = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (15)$$

P beschreibt die Produktmasse, S die Masse des Substrats.

Für die Produktausbeute lässt sich unter Berücksichtigung von Gleichung 13 intervallweise berechnen:

$$Y_p = \frac{c_{p,i+1} \times V_{R,i+1} - c_{p,i} \times V_{R,i}}{c_{s,i+1} \times V_{R,i+1} - c_{s,i} \times V_{R,i} + S_{Feed,i+1} - S_{Feed,i}} \quad (16)$$

c_s beschreibt die Substratkonzentration, c_p die Produktkonzentration, V_R das Reaktionsvolumen und S_{Feed} die zugefütterte Substratmasse.

Abgasanalyse Austauschraten für Sauerstoff und Kohlendioxid wurden auf Basis einer Stickstoffinertbilanz (Luftbestandteile: Kohlenstoffdioxid (CO₂), Sauerstoff, elementar (O₂), Stickstoff, elementar (N₂) inert), einer Startwertkalibration der zugeführten Luft und den detektierten Stoffmengenfraktionen in der Abluft berechnet. Theoretisch werden dabei nur Transferraten aus dem Bilanzraum bestimmt, unter Sättigungsbedingungen für die Komponenten in der Flüssigkeit oder vernachlässigbaren Konzentrationsveränderungen der detektierten Komponenten in der Flüssigphase kann die Transferrate näherungsweise mit einer Austauschrate (Bilanzraum: Mikroorganismen) gleichgesetzt werden. Die Aufzeichnung des Abgassignals wurden mit einer Frequenz von 1/min durchgeführt.

Sauerstoffaufnahme Die absolute Sauerstoffaufnahme (Oxygen Exchange Rate, OUR [mol/ h]) lässt sich durch folgende Gleichung berechnen:

$$OUR = \frac{V_G^\alpha \times P^\alpha}{R \times T} \times \left(y_{O_2}^\alpha - \frac{1 - y_{O_2}^\alpha - y_{CO_2}^\alpha}{1 - y_{O_2}^\omega - y_{CO_2}^\omega} \times y_{O_2}^\omega \right) \quad (17)$$

V_g beschreibt den Gasvolumenstrom [m³/h], P den Gesamtdruck [bar], R die Gaskonstante (ideales Gas), T die Temperatur [K]. Der Indizes α steht jeweils

für die Bedingungen bei Eingang des Gasvolumenstroms, ω für den Ausgang des Gasvolumenstroms, y beschreibt die Stoffmengenfraktion der Komponenten.

Die volumenbezogen Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$Q_{O_2} = \frac{OUR}{V_R} \quad (18)$$

V_R beschreibt das Reaktionsvolumen.

Die spezifische Sauerstoffaufnahme q_{O_2} [g/(g × h)] lässt sich nach Umrechnung der Stoffmenge in Masse (OUR_m ; Molekulargewicht 32 g/mol O_2) folgendermaßen berechnen:

$$q_{O_2} = \frac{OUR_m}{c_x \times V_R} \quad (19)$$

V_R beschreibt das Reaktorvolumen, c_x die Biomassekonzentration.

Kohlendioxidemissionsrate Die absolute Kohlendioxidemissionsrate (CO_2 -*Emission Rate*, CER [mol/h]) errechnet sich nach Gleichung 20:

$$CER = \frac{V_G^\alpha \times P^\alpha}{R \times T} \times \left(\frac{1 - y_{O_2}^\alpha - y_{CO_2}^\alpha}{1 - y_{O_2}^\omega - y_{CO_2}^\omega} \times y_{CO_2}^\omega - y_{CO_2}^\alpha \right) \quad (20)$$

V_g beschreibt den Gasvolumenstrom [m^3/h], P den Gesamtdruck [bar], R die Gaskonstante (ideales Gas), T die Temperatur [K]. Der Indizes α steht jeweils für die Bedingungen bei Eingang des Gasvolumenstroms, ω für den Ausgang des Gasvolumenstroms, y beschreibt die Stoffmengenfraktion der Komponenten.

Die volumenbezogen Sauerstoffaufnahme Q_{CO_2} lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$Q_{CO_2} = \frac{CER}{V_R} \quad (21)$$

V_R beschreibt das Reaktionsvolumen.

Die spezifische Kohlendioxidemissionsrate q_{CO_2} [g/(g × h)] lässt sich nach Umrechnung der Stoffmenge in Masse (CER_m ; Molekulargewicht 44 g/mol CO_2) folgendermaßen berechnen:

$$q_{CO_2} = \frac{CER_m}{c_x \times V_R} \quad (22)$$

V_R beschreibt das Reaktorvolumen, c_x die Biomassekonzentration.

Respirationsquotient Der Respirationsquotient RQ errechnet sich aus dem Verhältnis von CER zu OUR:

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (23)$$

Berechnung einer exponentiell ansteigenden Fütterungsrate Die exponentielle Fütterungsrate $F(t)$ zur Einstellung einer konstanten spezifischen Wachstumsrate μ wurde basierend auf Substrat- und Biomassebilanz nach folgender Gleichung berechnet:

$$F(t) = \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s \right) \times \frac{c_x^0 \times V_R^0 \times e^{\mu \times t}}{c_s^0} \quad (24)$$

$Y_{x/s}$ beschreibt den Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizient, m_s den Erhaltungsstoffwechselkoeffizient, c_x^0 die Biomassekonzentration zum Fütterungsstart, V_R^0 das Reaktionsvolumen zum Fütterungsstart, t die Fütterungszeit und c_s^0 die Substratkonzentration der Fütterungslösung. Für exponentielle Phosphatfütterung wurde kein Erhaltungsstoffwechselkoeffizient eingesetzt.

2.2.11 Fehlerrechnung

Zur Beschreibung des Fehlerbereichs wurde für Messungen mit mehr als drei Replikaten die Standardabweichung um den Mittelwert verwendet. Für Fehlerbereiche ist die Vorzeicheneigenschaft des Fehlers nicht bekannt, daher ergibt sich bei der Berechnung der Fehlerfortpflanzung der maximale Fehlerbereich, die sogenannte Fehlergrenze. Für die Fehlergrenze G_y des Messwertes y berechnet aus

mehreren unabhängigen Variablen x_i ergibt sich die ungünstigste Vorzeichenkombination nach Addition der Fehlerbeträge:

$$G_y = \left| \frac{\delta y}{\delta x_i} \right| \times G_i + \left| \frac{\delta y}{\delta x_{i+1}} \right| \times G_{i+1} \dots \quad (25)$$

Für die Grundrechenarten vereinfacht sich diese Berechnung zu einer Addition absoluter oder relativer Fehlerbereiche. Für Addition und Substraktion wurde der absolute Fehlerbereich der beteiligten Größen bei jeder Rechenoperation addiert, bei Division und Multiplikation wurde der relative Fehlerbereich addiert [1995-01,]. Die Darstellung der Fehlergrenzen in Abbildungen erfolgte über bidirektionale Fehlerbalken. Für große Symbole und Fehlergrenzen kleiner 5 % des Mittelwertes wurde aufgrund der Auflösung in der Darstellung auf Fehlerbalken verzichtet.

Volumenbilanzierung Zur Volumenbilanzierung wurden sämtliche zu- und abgeführten Volumina detektiert. Im Falle von Zufütterung und Titration geschah dies über Dichtebestimmung und gravimetrische Messung der Zuläufe (Waagensignal). Probenahmevolumen wurden notiert und berücksichtigt. Zusätzlich wurde in einem zellfreien Prozess eine durchschnittliche Verdunstungsrate unter Prozessbedingungen ermittelt. Zu Prozessende jeder Fermentation wurde darüber hinaus das Volumen der Zellsuspension im Reaktor über Gewicht- und Dichtebestimmung erfasst. Unter Verwendung aller Einflussgrößen wurde eine Volumenbilanz erstellt, die für die Massenbilanzierung des Prozesses genutzt wurde.

Elementarbilanzierung Die Berechnung der Elementarbilanzen erfolgte auf Stoffmengenbasis. Hierzu wurden die Massen einzelner Komponenten über die Elementarkomposition und das Molekulargewicht in Stoffmengenäquivalente der jeweiligen enthaltenen Elemente umgerechnet. Diese wurden sowohl in Messintervallen differentiell als auch über den Gesamtprozess integral berechnet. Als Elementarkomposition der Biomasse wurde eine von Bauer et al veröffentlichte Komposition eingesetzt [Bauer and Ziv, 1976]. Aufgrund massiver detektierter Veränderungen im Phosphorgehalt der Biomasse wurde die Biomasseelementarcomposition ausschließlich für Kohlenstoff und Stickstoffbilanzen verwendet. Dies war näherungsweise möglich, da die Veränderungen des Phosphorgehalts nur geringen Einfluss auf das Molekulargewicht der Biomasse hatte. Für Kohlenstoffbilanzen wurde der im Prozess bestimmte Anteil auf die zugeführte Stoffmenge normiert und somit eine Wiederfindung definiert.

2.2.12 Transkriptomdatenanalyse

Die Aufarbeitung der Transkriptomproben (RNA-Extraktion und Qualitätskontrolle), sowie die Durchführung des Microarray-Experimentes (Affymetrix *E. coli_2* Array) wurden vom Dienstleister MFT-Services (www.mft-services.de) in Tübingen nach standardisierten Protokollen durchgeführt. Die Rohdaten (Intensitäten) der Microarray-Analyse wurden im Rahmen des Projektes in Stuttgart mit Hilfe der Software Genedata Analyst 7.0 analysiert.

Rohdatenextraktion Die Rohdatenextraktion der Intensitätswerte der Affymetrix *E.coli_2* Microarrays erfolgte mit Hilfe des *robust multichip algorithm* (RMA) [Irizarry et al., 2003].

Differentielle Genexpression Nach Kontrolle der Datenverteilung wurde auf Grundlage der Zeitreihendaten ein Referenzzeitpunkt (2,5 h Prozesszeit, unlimitiertes Wachstum) für alle Prozessstrategien definiert. Auf diesen wurde jeder weitere Zeitpunkt global normiert (Mittelung über Median). Transkripte mit einer absoluten differentiellen Veränderung größer Faktor 2 für mindestens einen der Zeitpunkte bezogen auf den Referenzzeitpunkt wurden als differentiell exprimiert definiert.

K-means-Clustering Das Konzept des K-means Clustering geht auf Arbeiten des Mathematikers Hugo Dionizy Steinhaus zurück. Erstmals international veröffentlicht wurde der Ansatz durch J. MacQueen [MacQueen, 1967]. Der Ansatz ermöglicht eine Gruppierung von Transkripten, Zeitreihendaten oder anderen Größen mit ähnlicher Charakteristik. Der Ansatz wurde auf Transkriptom-Zeitreihendaten eines phosphatlimitierten Prozesses angewendet. Zur Gruppierung werden iterativ Gruppen gebildet. Nach Vorgabe der Clusteranzahl werden die untersuchten Einheiten (Zeitreihencharakteristik einzelner Transkripte) initial anhand zufällig gewählter Mittelpunkte zusammengefasst. Im nächsten Schritt werden über eine Distanzfunktion die Abstände der Einheiten zu den jeweiligen Mittelpunkten berechnet. In der Folge werden die Einheiten mit den jeweils geringsten Abständen den jeweiligen Mittelpunkten (Cluster-Zentren) zugeordnet.

Daraufhin erfolgt auf Basis der Neugruppierung eine Neuberechnung des Mittelpunktes. Dieser Vorgang wird wiederholt bis die Gruppenzusammensetzung auf eine gleich bleibende Verteilung konvergiert.

Unter Verwendung der Software Genedata Analyst 7.0 wurde hierzu basierend auf vorausgegangenen Berechnungen eine Clusterzahl von 8, zur Mittelpunktberechnung der Median und zur Distanzberechnung eine positive Korrelationsanalyse ausgewählt. Darüber hinaus wurden maximal 100 Iterationen bis zur Konvergenz zugelassen. Die durchschnittliche Zeitreihencharakteristik der Cluster wurde mittels Genedata Analyst 7.0 visualisiert.

2.2.13 Modellierung

Modellierungsansätze wurden zur Simulation von Szenarien auf metabolischer Ebene eingesetzt. Da aufgrund des durch die Prozessbedingungen erschwerten Zugriffs auf intrazelluläre Informationen keine Markierungs- und Stimulus-Response Experimente durchgeführt werden konnten, wurden stöchiometrische und stationäre Ansätze eingesetzt. Die verwendete Plattform war die Software Insilico Discovery 3.5 (insilico biotechnology). Die Software ermöglicht die Erstellung von Metabolit- und Reaktionsdatenbanken sowie die Erstellung stöchiometrischer Modelle mittels einer graphischen Oberfläche. Darüber hinaus sind Kontrollen zur Modellstruktur (Elementar- und Ladungsbilanzierung, „Dead Ends“, parallele und zirkuläre Stoffwechselwege etc.) sowie verschiedene Simulationsmethoden verfügbar.

Modell Das verwendete stöchiometrische Modell basierte auf Arbeiten von Chassagnole et al und Schmid et al [Chassagnole et al., 2002, Schmid et al., 2004] und dem *E. coli*-Ganzzellmodell in Insilico Discovery (Chassagnole, Schmid, Mauch et al). Modifikationen am Modell wurden im Bereich der Phosphat- und Ammoniumaufnahme, an Aminosäuretransportern, der Atmungskette und ATP-Synthase sowie an der Biomassekomposition umgesetzt. Die Synthese der Makromoleküle wurde dabei aus dem Insilico Discovery Modell übernommen, die finale Polymerisation wurde modifiziert. Zunächst wurde für einen Referenzzustand ohne Limitierung eine Makromolekülzusammensetzung der Biomasse aus einer Veröffentlichung von Taymaz-Nikerel et al übernommen [Taymaz-Nikerel et al., 2010]. Um den durch die Phosphatlimitierung auftretenden sinkenden Phosphorgehalt

der Biomasse zu berücksichtigen, wurde der Anteil der RNA abhängig vom Prozessintervall basierend auf einer experimentell bestimmten RNA-Abnahme (siehe Abbildung 3) reduziert. Da über 80 % des intrazellulären Phosphors in RNA-Spezies vorliegen [Makino et al., 2003] kann über die Reduktion des RNA-Gehalts die Phosphorabnahme in der Biomasse in guter Näherung simuliert werden (ein direkter Eingriff in die Elementarzusammensetzung des Modells ist nicht möglich). Im Falle der Simulationen für *E. coli* W3110 wurde mangels experimenteller RNA-Quantifizierung die veränderte Biomasse-Phosphatausbeute berücksichtigt. Das verwendete Modell umfasste 143 Reaktionen und Transportschritte. Insgesamt wurden 143 Komponenten bilanziert. Das Modell enthielt den zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsel (Glykolyse, Pentosephosphatweg und Citrat-Zyklus), die Aminosäuresynthese sowie Synthesen für verschiedene Biomassekomponenten (Nukleotide, Fettsäuren und Lipide, Murein, Polyzucker, Proteine, DNA). Um eine Bilanzierung des gesamten h^+ -Austausches über die Zellmembran zu vermeiden wurde, abgeleitet vom Insilico Referenzmodell, für die Atmungskette und ATP-Synthase zwei separate h^+ -Spezies für intra- und extrazelluläre Protonen verwendet (H_in und H_ex). Weiterhin wurde eine ATP-Hydrolyse-Reaktion eingeführt, die mögliche Ungleichverteilungen im ATP-Stoffwechsel ausgleichen sollte und über die eine stationäre Lösung auch im Falle einer Diskrepanz des ATP-Stoffwechsels ermöglicht wurde. Im Rahmen der Entkopplungshypothese [D'Alessandro et al., 2008] wurde das stöchiometrische Verhältnis von aufgenommenen h^+ -Ionen (H_ex zu H_in) zur ATP-Synthese bis zur vollständigen Entkopplung so verändert, dass möglichst eine ausgeglichene ATP-Bilanz erreicht wurde. Diese Modifikation ermöglichte die Simulation sämtlicher entkoppelnder Effekte wie veränderte Elektronenakzeptoren der Atmungskette, gestörte Membranintegrität, *Futile Cycling* von Protonen ebenso wie die Entkopplung des ATP-Synthasekomplexes.

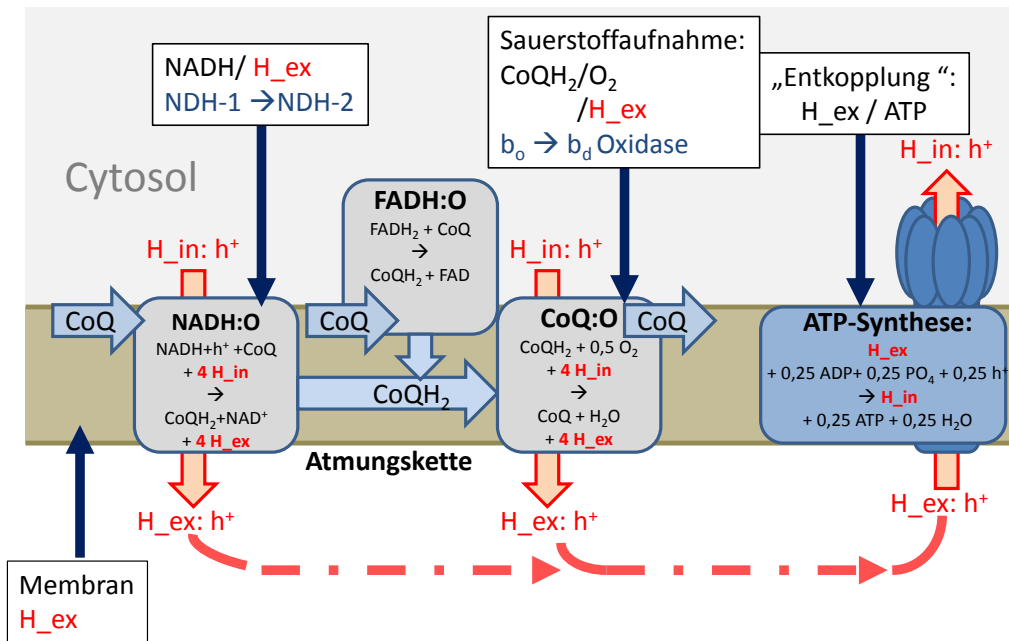


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Reaktionen der Atmungskette in ihrer Umsetzung im Referenzmodell. Dargestellt ist der Transport von H^+ -Ionen über die innere Zellmembran. Mögliche Effekte auf eine Entkopplung des Protonentransports sind durch schwarze Pfeile eingefügt. Transportierte Protonen werden in der Reaktionsstöchiometrie mit den im Modell verwendeten Bezeichnungen H_{ex} (extern) und H_{in} (intern) dargestellt. NADH:O, NADH-Oxidation (NADH-Dehydrogenase; CoQ, Ubiquinon; CoQH_2 , Ubiquinol; CoQ:O Ubiquinon-Oxidation (Cytochrom-Oxidase); FADH:O, FADH_2 -Oxidation

Abschließend wurde, um Diskrepanzen des Modells im Bezug auf experimentell bestimmte Sauerstoffaufnahme zu auszugleichen, das stöchiometrische Verhältnis der Sauerstoffaufnahme zur Cytochromoxidation der Cytochromoxidase um 10 % reduziert. Eine umfangreiche Beschreibung des Modells und die phasenspezifischen Anpassungen für die Flussverteilungsanalysen sind im Anhang beigefügt.

Elementarmodenanalyse Die Gesamtheit aller Lösungen des linearen Gleichungssystems $N \times v = 0$ (N : stöchiometrische Matrix; v : Ratenvektor) werden als elementare Flussmoden von N bezeichnet falls die Lösungen das Reversibilitätskriterium berücksichtigen und jedes Element ungleich Null des Ratenvektors v essentiell für die Einhaltung des stationären Zustandes ist [Schuster et al., 1999]. Extreme Stoffwechselwege sind eine echte Untergruppe der elementaren Flussmoden. In einem System ohne zirkuläre oder parallele Routen mit ausschließlich irreversiblen Reaktionen entsprechen die Elementarmoden den extremen Stoffwechselwegen. In Insilico Discovery wird zur Berechnung der elementaren Flussmoden der proprietäre Algorithmus ELMAR verwendet [InsilicoBiotechnology, 2013].

Elementarmoden ermöglichen auf Basis des stöchiometrischen Modells die Berechnung theoretisch maximaler Ausbeuten der Produkte und zeigen den entsprechenden extremen Stoffwechselweg auf.

Flussverteilungsanalyse Die Flussverteilungsanalyse (Flux Balance Analysis, FBA) basiert auf einem linearen Optimierungsansatz mit dessen Hilfe in einem durch Randbedingungen definierten Lösungsraum eine optimale stationäre Lösung bezogen auf eine vorgegebene Größe erreicht wird. Grundlagen der Methode wurden bereits in den 80er Jahre von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben [Papoutsakis, 1984, Fell and Small, 1986]. Randbedingungen des Lösungsraums sind dabei die Reaktionen, die in der stöchiometrischen Matrix S enthalten sind. Sie enthält den stöchiometrischen Zusammenhang aller beteiligten Metabolite. Weiterhin können einzelne Raten des Ratenvektors v definiert werden. Das Stationaritätskriterium $Sv = 0$ muss zusätzlich erfüllt sein. Als Zielfunktion kann eine beliebige Linearkombination von Raten (Flüssen) definiert werden. In der Regel werden als Zielfunktionen, orientiert an der biologischen Ausrichtung, die Biomassebildungsrate oder ATP Bildung gewählt. Es ist aber mit Hilfe des Ansatzes auch möglich theoretische Produktbildungsraten zu simulieren. Grundlagen und Anwendungen der Flussverteilungsanalyse wurden unter anderem von Orth und Palsson zusammengefasst [Orth et al., 2010]. Die Flussverteilungsanalyse ist ein in Insilico Discovery implementierter Ansatz, der über Definition der Stöchiometrie und weiteren Randbedingungen durchgeführt werden kann. Zur Optimierung wurde der präzise Berechnungsmodus mit Fehlertoleranzen von 10^{-4} und einer Null-Begrenzung von 10^{-8} verwendet. Die Flussverteilungsanalyse wurde zur Si-

mulation von metabolischen Prozessszenarien unter quasistationären Bedingungen eingesetzt. Dabei wurden die Randbedingungen (Stöchiometrische Matrix und Austauschraten) für jede Prozessphase basierend auf experimentellen Daten angepasst. Zur Bewertung der Güte der Simulation wurden Ergebnisse der Optimierungsgröße Biomassebildung sowie die nicht als Randbedingung eingesetzten simulierten Atmungsraten (CO_2 -Bildung und O_2 -Aufnahme) mit experimentell ermittelten Werten verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Probenahme und Analytik

Zur Evaluierung schneller Probenahmemethoden, Quenching, Aufschluss und Extraktion wurden Proben aus Referenzprozessen nach 12 h Laufzeit untersucht. Nach Probenahme, *Quenching* und Extraktion beziehungsweise Zellaufschluss wurden Gesamtproteingehalt, Lebendzellzahl und Biomasse bestimmt (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden mittels GC-MS intrazelluläre Metabolite des Zentralstoffwechsel quantifiziert. Dabei kam eine von Dr. Oliver Vielhauer entwickelte Methode mit ^{13}C -markiertem Algenextrakt als internen Standard zum Einsatz [Vielhauer et al., 2011]. Nukleotidmessungen wurden mittels RP-HPLC durchgeführt.

3.1.1 Schnelle Probenahme

Hitzeinaktivierung und Gesamtaufschluss Mit Hilfe einer automatischen Ventilsteuerung (Andreas Freund) und eines am Institut entwickelten Wärmetauschers [Schaub et al., 2006] wurden Zellen im schnellen Durchfluss hitzeinaktiviert und aufgeschlossen. Parallel wurden Filtratproben entnommen, die zu einer differentiellen Bestimmung der intrazellulären Stoffmengen genutzt wurden. Aufgrund der sehr großen Stoffmengen für Substrate und Produkte musste die Probenmenge für die GC-MS-Messung reduziert werden. Aus der differentiellen Analyse von Filtrat und Gesamtaufschluss wurde deutlich, dass insbesondere Intermediate der Glykolyse und des Pentosephosphatweges mit Ausnahme einer Glycerinphosphat- oder Glycerinaldehydphosphat-Verbindung und Glukose-6-Phosphat unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die organischen Säuren des Citratcyclus, Succinat, Malat, Fumarat und α -Ketoglutarat konnten in größeren Mengen detektiert werden. Allerdings lag beispielsweise bei Succinat die Stoffmenge im Filtrat in der gleichen Größenordnung wie im Gesamtaufschluss. Citrat war Bestandteil des Kultivierungsmediums und daher intrazellulär nicht differentiell bestimmbar.

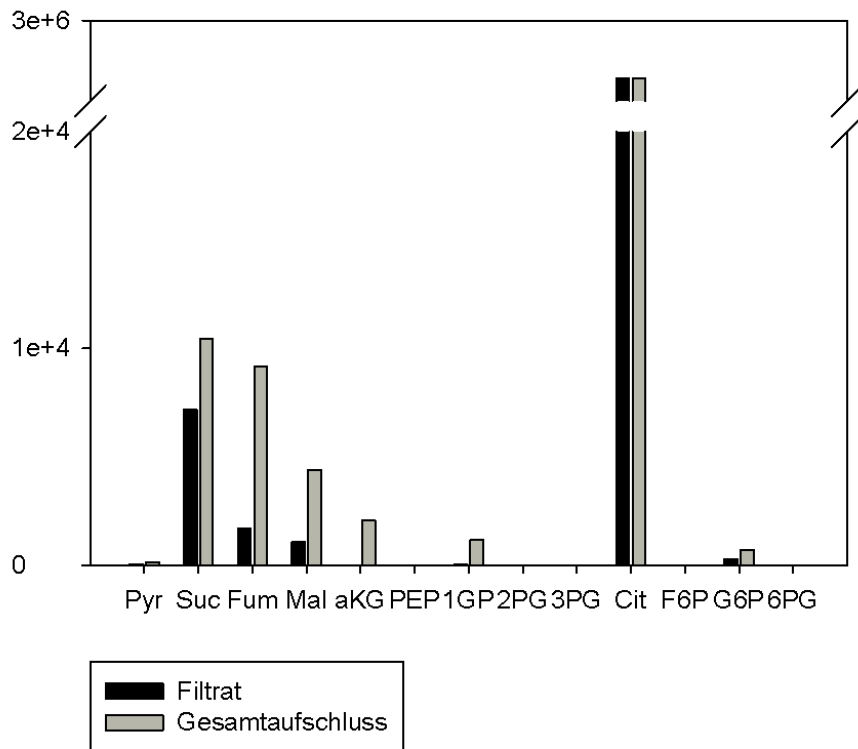


Abbildung 6: Vergleichsmessung von Filtrat und Gesamtaufschluss für ausgewählte Zentralstoffwechselmetabolite nach 12 h Prozesszeit. Pyr: Pyruvat; Suc: Succinat; Fum: Fumarat; Mal: Malat; αKG: αKetoglutarat; Abkürzungen, PEP: Phosphoenolpyruvat; 1GP: 1-Glycerolphosphat; 2PG: 2-Phosphoglycerat; 3PG: 3-Phosphoglycerat; Cit: Citrat; F6P: Fruktose-6-Phosphat; G6P: Glukose-6-Phosphat; 6PG: 6-Phosphoglukonat

Methanol- und Ethanol-Quenching Neben Hitzeinaktivierung und Gesamtaufschlussprobenahmen wurden auch lösungsmittelbasierte Kälteinaktivierungen mit anschließender Zellabtrennung und Extraktion untersucht. Um die Möglichkeiten der Methoden zu bewerten wurden in der GC-MS-Messung ein großer Masse-Ladungsbereiche im sogenannten *Fullscan*-Modus abgetastet. Die Kälteinaktivierung wurde zum einen in $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten Methanol-Wasser-Gemisch (siehe Abschnitt 2.2.7) und in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalter Ethanol-Kochsalzlösung (siehe Abschnitt 2.2.7) durchgeführt. Zur Extraktion wurde nach Evaluierung verschiedener Methoden kochendes Ethanol eingesetzt, der Überstand wurde bis auf 5 % Restvolumen evaporiert und mit Wasser auf das ursprüngliche Volumen verdünnt.

Bei Methanol-*Quenching*-Proben wurden abzüglich von Störverbindungen aus einer Leerderivatisierung 380 Verbindungen detektiert, davon konnten über die Massenfragmentverteilung 40 Verbindungen aus einer Metabolitdatenbank (NIST) identifiziert werden. Beim Ethanol-*Quenching* war die Anzahl der gemessenen Komponenten leicht reduziert, hier wurden etwa 330 Verbindungen detektiert. Auch die Anzahl der identifizierten Metabolite war geringer als beim Methanol-*Quenching* (33). In der Folge werden die Ergebnisse des Methanol-*Quenchings* kurz zusammengefasst.

Trotz Abtrennung des Überstands gab es einen Glukoseüberschuss in der Probe, zusätzlich wurden verschiedene Glukosederivate bestimmt (nicht gezeigt). Es wurde ein erwartungsgemäß hoher Tryptophananteil identifiziert (mehrere Derivate). Citrat, ebenfalls mit deutlichem Signal, war im Medium enthalten (1 g/l). Ebenfalls detektiert wurden weitere Aminosäuren und deren Derivate wie Alanin, Glycin, Serin, Threonin, Methionin, Oxoprolin, Aspartat, Glutamat, Phenylalanin und Tyrosin. Hohe Signalintensitäten wurden dabei bei Glutamat beobachtet, gefolgt von Oxoprolin und Phenylalanin. Weiterhin identifiziert wurden verschiedene Nukleobasen wie Uracil, Thymin und Adenin. Zusätzlich konnten diverse der L-Tryptophansynthese zugeordnete Verbindungen detektiert werden. Neben dem bereits erwähnten Serin wurde Quinat, Anthranilat sowie Chorismat identifiziert, wobei letzteres aufgrund seiner instabilen chemischen Eigenschaften nicht endgültig bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde eine relativ große Menge einer Verbindung mit einer charakteristischen Masse für das Indolringsystem detektiert. Hierbei könnte es sich um ein Nebenprodukt oder ein Vorläufermolekül der L-Tryptophansynthese handeln. Als einzige phosphorylierte Verbindung wurde ein Glycerinphosphat oder Glyceraldehydphosphat identifiziert. Die qualitative Bestimmung (*Peak*-Flächen) im Rahmen des Methanol-*Quenchings* ist in Abbildung 7 dargestellt.

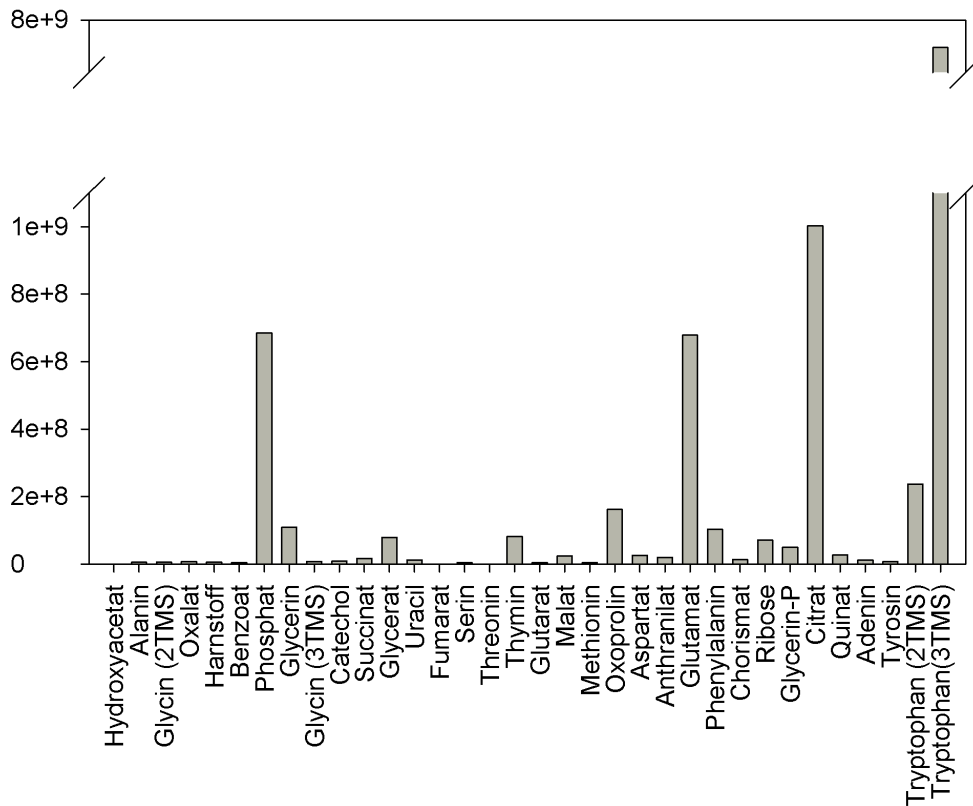


Abbildung 7: Durch GC-MS detektierte Metabolite einer durch Methanol-*Quenching* und Ethanolextraktion prozessierten Probe. Dargestellt sind die Peakflächen der Messung im *Fullscan* Modus

Zentralstoffwechselanalyse Mit allen angewendeten schnellen Probenahme-, Extraktions- und Messmethoden konnten aus Fermentationsproben bis auf ein Glycerinaldehyd- oder Glycerinphosphat (Glycerinaldehyd-3-Phosphat ist ein Nebenprodukt der L-Tryptophansynthese) keine Verbindungen aus der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg detektiert werden. Da insbesondere die Quantifizierung der Vorläufermoleküle Phosphoenolpyruvat sowie von Verbindungen und Folgeprodukten des Pentosephosphatwegs essentiell für die Aussage von Markierungs- oder Pulsexperimenten war, wurde die Methodenentwicklung zur Analyse der Zentralstoffwechselmetabolite nach Abschätzung des Aufwands und Potentials unter den gegebenen Randbedingungen nicht weitergeführt. Die in der Fachwelt bekannten Probleme bei Probenahme und Analyse [Bolten et al., 2007] wurden

durch die prozessbedingten hohen extrazellulären Konzentrationen weiter verstärkt. Der Fokus lag in der Folge auf der Detektion von intrazellulären Nucleotiden zur Bestimmung der Energieladung.

3.1.2 Perchlorsäure-*Quenching*, Probenaufarbeitung und Nucleotidbestimmung

Die Probenahme, Aufarbeitungs- und Messmethoden wurden, basierend auf etablierten Protokollen (Oliver Vielhauer), an die speziellen Anforderungen der Probenmatrix angepasst und evaluiert. Zunächst wurde in Vorversuchen Perchlorsäure-*Quenching* als Probenahme- und Extraktionsmethode ausgewählt (Daten nicht gezeigt). Erste HPLC-Messungen zeigten bereits zu frühen Prozesszeitpunkten eine sehr starkes Signal nach etwa 12,4 min Retentionszeit (siehe Abbildung 8).

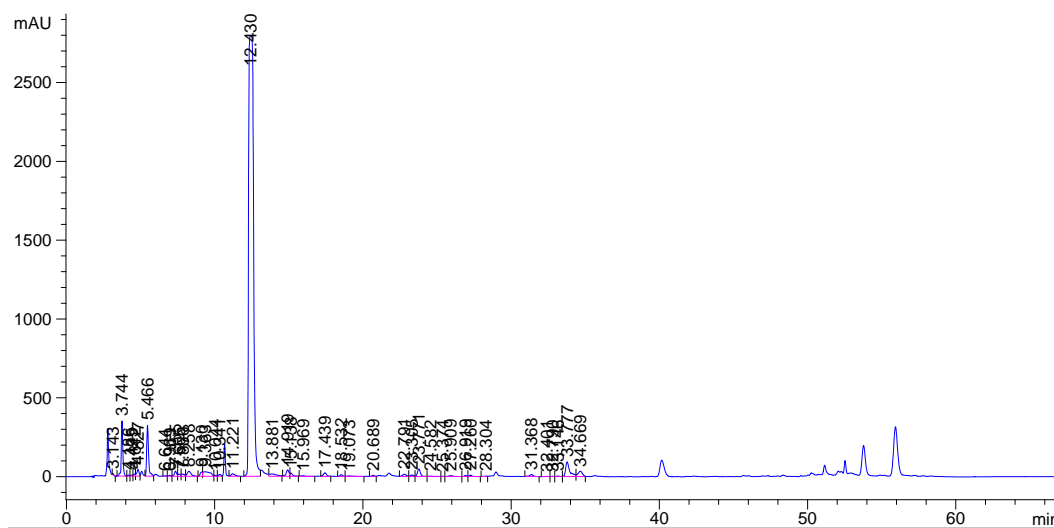


Abbildung 8: Chromatogramm einer RP-HPLC Messung mit DAD zur Nucleotidbestimmung aus Perchlorsäurequenchingproben ohne Aufarbeitung (Probenahme nach 12 h Prozesszeit)

In der Folge wurden Festphasenextraktionsmethoden zur selektiven Abreicherung der Störkomponenten evaluiert. Die Evaluierung und Etablierung wurde im Rahmen einer im Projekt durchgeführten Diplomarbeit von Michael Löffler bearbeitet [Loeffler, 2012].

Als Folge der Evaluierung wurde eine Strategie basierend auf einer pH-Absenkung

der Proben und der Abtrennung kationischer Verbindungen durch einen Kationenaustauscher entwickelt und zur Probenaufarbeitung von Prozessverlaufproben eingesetzt. Optional wurde der Aufarbeitungsschritt direkt mit perchlorsäureinaktivierten Proben durchgeführt (integrierte Probennahme) oder die Proben neutralisiert und zu einem späteren Zeitpunkt mit Schwefelsäure versetzt für die Aufarbeitung vorbereitet. Durch die integrierte Probenahme wurden dabei zusätzliche Verdünnungsschritte umgangen und die Proben zeitnah stabilisiert. Beide Aufarbeitungsstrategien ermöglichten eine deutliche Reduktion von Störkomponenten und somit eine Nukleotidmessung aus Prozessverlaufproben.

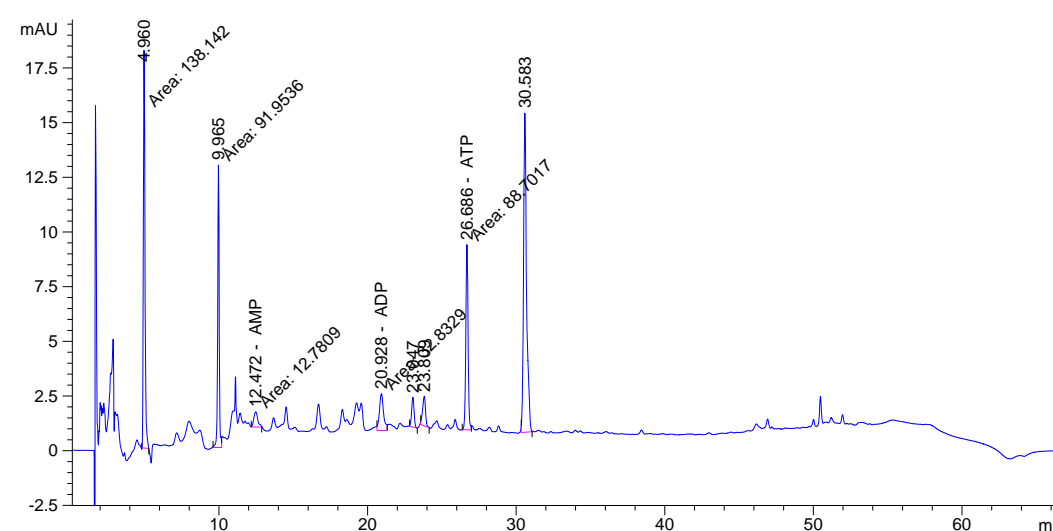


Abbildung 9: Chromatogramm einer RP-HPLC Messung mit DAD zur Nukleotidbestimmung aus Perchlorsäurequenchingproben mit integrierter Aufarbeitung (Probenahme nach 12 h Prozesszeit)

Die absolute Quantifizierung von Nukleotidkonzentrationen wurde durch die Säurezugabe, Festphasenextraktion und Neutralisierung erschwert. Es konnte aber gezeigt werden, dass das Verhältnis der Adeninnukleotide durch die Aufarbeitung nicht signifikant beeinträchtigt wurde (siehe Abbildungen 10 und 11). Daher wurden die bestimmten Konzentrationen zur Berechnung der Energieladung verwendet (siehe Abschnitt 2.2.9, Gleichung 2).

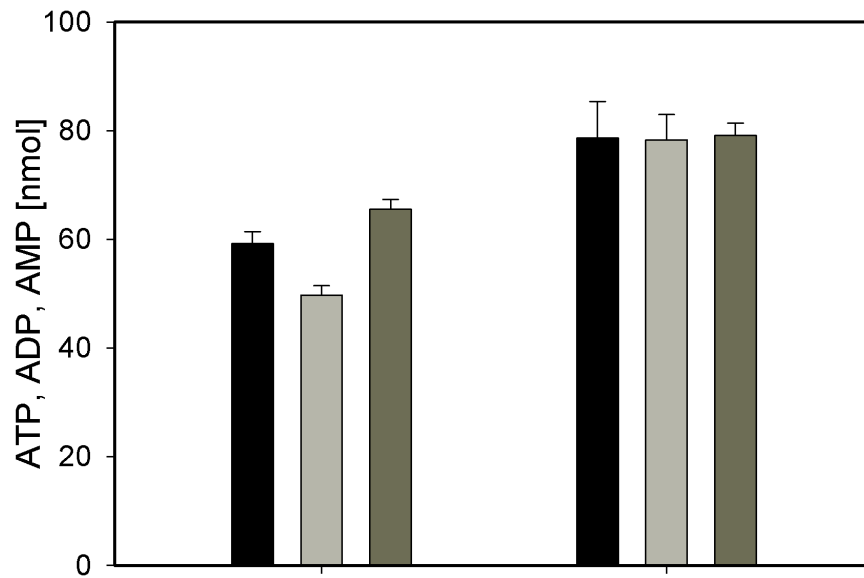


Abbildung 10: Adeninnukleotidbestimmung einer äquimolaren Standardlösung von ATP (schwarz), ADP (hellgrau) und AMP (dunkelgrau) nach der Aufarbeitung, nach [Loeffler, 2012]

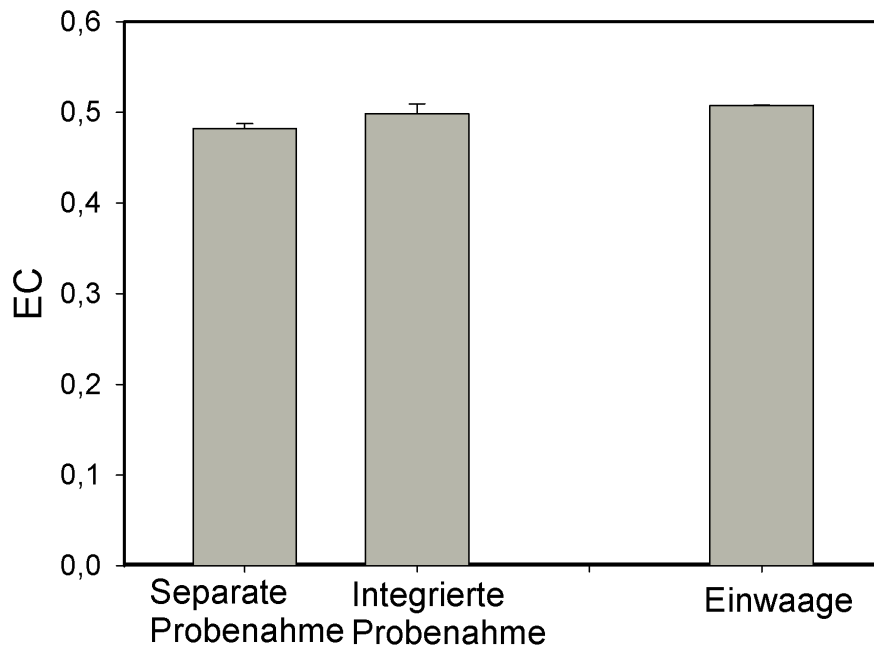


Abbildung 11: Bestimmung der Energieladung einer äquimolaren Standardlösung von ATP, ADP und AMP nach der Aufarbeitung im Vergleich zur Einwaage, nach [Loeffler, 2012]

Die Probenahme und Aufarbeitungsstrategie wurde zur Prozesscharakterisierung von phosphatlimitierten Prozessen mit *E. coli* K12 JP6015/pMU91 und *E. coli* K12 W3110 eingesetzt.

Tabelle 20: Adeninnukleotidbestimmung mit integrierter Probenahme für *E. coli* K12 JP6015/pMU91 im Prozessverlauf (Phosphatfütterungsszenario 3)

Zeit [h]	c_{AMP} [μM]	c_{ADP} [μM]	c_{ATP} [μM]	EC	SA EC
2,8	0	0,52	2,04		
	0	0,51	1,81		
	0,5	0,6	1,98	0,84	0,089
3,9	0	0,95	4,16		
	0	0,97	4,16		
	0,5	1,08	4,19	0,87	0,05
22	3,24	1,22	4,02		
	2,67	2,61	5,72		
	4,05	2,75	4,58	0,57	0,061
25	5,88	4,18	7,06		
	5,52	3,95	6,41		
	4,95	4,12	6,7	0,54	0,014
28	6,13	4,06	7,64		
	4,91	4,60	9,5		
	7,71	4,24	7,85	0,56	0,059
30	3,78	2,53	2,75		
	3,91	2,54	2,87		
	3,9	2,96	2,52	0,44	0,01

Tabelle 21: Adeninnukleotidbestimmung mit integrierter Probenahme für *E. coli* K12 W3110 im Prozessverlauf (Phosphatfütterungsszenario 3)

Zeit [h]	c_{AMP} [μM]	c_{ADP} [μM]	c_{ATP} [μM]	EC	SA EC
4	0	1,28	4,9		
	0	1,26	4,55		
	0,5	1,24	4,55	0,87	0,04
6	0	1,63	3,89		
	0	1,62	3,88		
	0,5	1,65	3,86	0,83	0,04
8	1,19	2,8	4,35		
	1,21	2,81	4,35		
	1,22	2,41	4,37	0,69	0,005
24	2,97	5,92	2,30		
	2,9	5,94	2,29		
	2,9	5,94	2,29	0,47	0,002
28	3,73	6,02	3,0		
	3,75	5,62	2,71		
	3,17	3,6	1,9	0,45	0,02
30	6,1	7,21	4,14		
	4,43	9,18	5,72		
	5,5	6,39	3,96	0,48	0,05

3.2 Prozessanalyse

Der Referenzprozess sowie Prozesse mit Phosphat- und Glukoselimitierung wurden im 30 l Bioreaktor durchgeführt. Für die Screeningansätze wurde ein Parallelreaktorsystem mit 50 bzw. 200 ml Reaktorvolumen eingesetzt.

Für die unter der Rubrik „Glukoselimitierung“ geführten Prozesse ergaben sich unerwünschte Effekte, worauf diese Ansätze nicht weiter verfolgt wurden.

Im Rahmen des Projektes waren die Studenten Alexander Eck, Thilo Hurler, Michael Löffler und Achim Werner an der Durchführung der Prozesse beteiligt, Teilaspekte wurden in den jeweiligen Diplom- und Masterarbeiten bearbeitet [Eck, 2010, Hurler, 2011, Loeffler, 2012, Werner, 2014].

3.2.1 *Screening* zur Medienoptimierung

Im *Screening* zur Medienoptimierung wurde der Einfluss von insgesamt 10 Medienkomponenten (auch Mischungen und Spurenelementlösungen) mit einem ein-dimensionalen Ansatz untersucht. Die Etablierung des Reaktorsystems und das *Screening* wurden im Rahmen des Projektes betreuten Diplomarbeit von Thilo Hurler durchgeführt [Hurler, 2011]. Die Auswahl und Modifikation relevanter Medienkomponenten (Zugabe oder Reduktion) fand im Vorfeld auf Basis von Literaturdaten und der Stoffbilanzen des Referenzprozesses statt.

Tabelle 22: Veränderte Medienkomponenten im Rahmen des Faktor-*Screenings*

Komponente	Konzentration [g/l]	Variation [%]
Eisensulfat (FeSO_4)	0,74	-30
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$; FeSO_4	0,53; 0,74	-30
$\text{CaCl}_2 \times 2 \times \text{H}_2\text{O}$	0,08	Zugabe
KCl	0,02	700
Hefeextrakt	1	30
Thiaminhydrochlorid	0,003	30
$\text{MgSO}_4 \times 7 \times \text{H}_2\text{O}$	3,1	30
Spurenelementelösung	3,9 [ml/l]	30
Tetracyclin	$10,8 \times 10^{-5}$	-99,8
K_2SO_4	2,2	30

Ziel der Analyse war es, neben der Optimierung des Mediums, mögliche weitere sensitive Medienkomponenten zu identifizieren.

Im Rahmen der Fermentationen wurden zu definierten Zeitpunkten die optische Dichte, die Acetatkonzentration und über Absorptionsmessung der L-Tryptophantiter bestimmt. In jedem Versuchsblock wurde eine auf 75% der Originalkonzentrationen skalierte Referenzkultivierung (basierend auf [Camakaris et al., 1997]) mitgeführt [Hurler, 2011]. Für die einzelnen *Screening*-Ansätze wurde jeweils eine Komponente des Mediums modifiziert oder zugefügt. Eine Ausnahme bildete hierbei FeSO_4 , das aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser zusammen mit dem enthaltenen Citratanteil (Komplexbildung) modifiziert wurde. Abweichungen außerhalb der Varianz der Referenzkultivierung zu mindestens zwei Zeitpunkten (siehe Abbildung 12) wurden mit Hilfe eines Dreifachansatzes weiter

überprüft.

Im initialen *Screening* der 10 Komponenten wurden für zwei Komponenten mit um 30 % erhöhten Konzentrationen, die Spurenelementlösung und Dikaliumsulfat (Dikaliumsulfat (K_2SO_4)), zu drei Zeitpunkten eine Erhöhung des L-Tryptophantiters im Vergleich zur Referenz ermittelt (siehe 12).

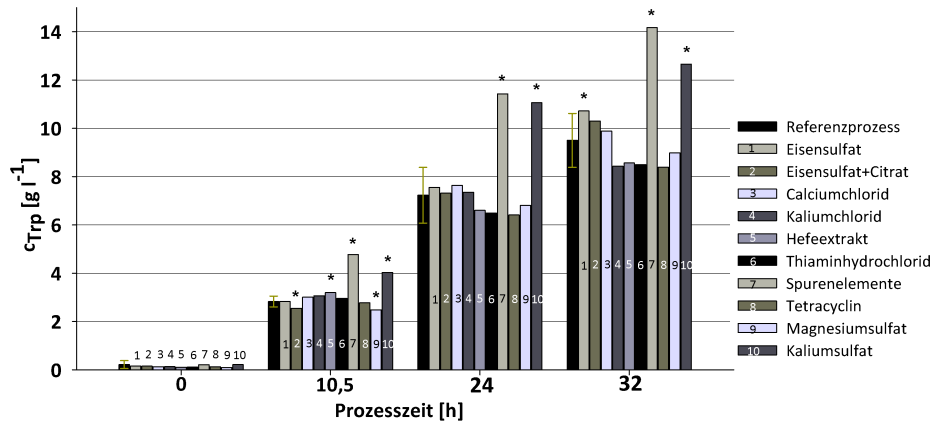


Abbildung 12: L-Tryptophantiter des initialen Faktor-*Screenings* über den Zeitverlauf der Kultivierungen (nach [Hurler, 2011])

Die ermittelte Erhöhung des Titers konnte für beide Komponenten in Folgeexperimenten nicht als statistisch relevant bestätigt werden. Für die Erhöhung der Spurenelemente wurde der Effekt in drei von insgesamt neun Ansätzen beobachtet. Für das Gesamtergebnis waren die Titer im Mittel nicht signifikant erhöht, lediglich die Varianz nahm zu (Daten nicht gezeigt). Weiterführende Versuche zu möglichen kombinatorischen Effekten ausgelöst durch pH-Abweichungen ergaben eine leichte Steigerung des L-Tryptophantiters bei erhöhtem Spurenelementanteil und einem pH-Wert von 6,9.

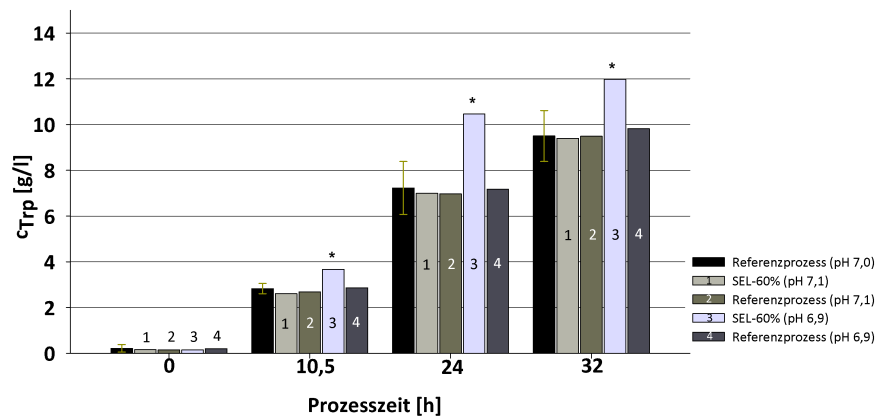


Abbildung 13: L-Tryptophantiter für Versuche zum kombinatorischen Effekt von pH-Wert und der Spurenelementerhöhung über den Zeitverlauf der Kultivierungen (nach [Hurler, 2011])

Die Reduktion der Konzentration von FeSO_4 und Citrat um 30 % hatte keine negativen Effekte (siehe Abbildung 12) auf die ermittelten Titer. Für einen optimierten Medienansatz wurden die Spurenelementeanteile und die Konzentration von K_2SO_4 um 30 % erhöht und die Anteile von FeSO_4 und Citrat um jeweils 30 % reduziert. Weiterhin wurde die Tetracyclinkonzentration in der Vorfermentation verringert.

Tabelle 23: Veränderte Medienkomponenten für das modifizierte Medium

Komponente	Konzentration [g/l]	Variation [%]
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}; \text{FeSO}_4$	0,53; 0,74	-30
Spurenelementelösung	3,9 [ml/l]	30
Tetracyclin	$10,8 \times 10^{-5}$	-99,8
K_2SO_4	2,2	30

Versuche zum optimierten Medienansatz im Mehrfachreaktorsystem ergaben einen lediglich innerhalb der Standardabweichung des Referenzprozesses erhöhten L-Tryptophantiter. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit und der im *Screening* beobachteten reduzierten Varianz wurde der Medienansatz für folgende Kultivierungen im 30 l Maßstab eingesetzt.

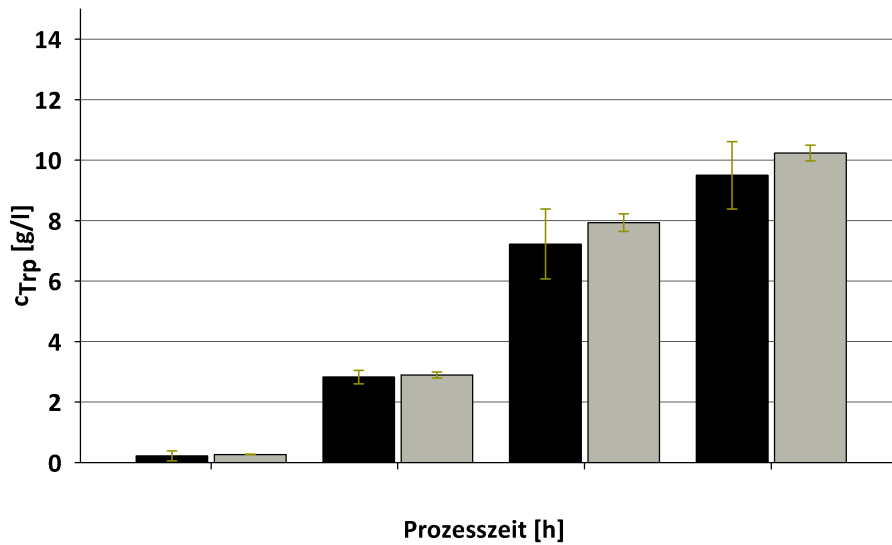


Abbildung 14: L-Tryptophantiter des optimierten Medienansatzes im Zeitverlauf der Kultivierungen (nach [Hurler, 2011])

3.2.2 Referenzprozesse

Auf Basis der Referenzkultivierung nach Camakaris et al [Camakaris et al., 1997], der Medienoptimierung im Parallelreaktorsystem und weiterer Anpassungen wurde ein Referenzprozessszenario mit *E. coli* K12 JP6015/pMU91 entwickelt (siehe Abschnitt 2.2.5). Final wurden mit dem Referenzprozess $19,55 \pm 0,21$ g/l Biomassekonzentration, $12,4 \pm 0,56$ g/l L-Tryptophan, $3,52 \pm 0,21$ g/l Acetat, $2,17 \pm 0,13$ g/l L-Glutamat, $1,76 \pm 0,06$ g/l L-Phenylalanin und $1,96 \pm 0,12$ g/l L-Tyrosin erreicht. Die Gesamtausbeute von L-Tryptophan bezogen auf die eingesetzte Glukose betrug 0,083 g/g. Die höchste differentielle Ausbeute von 0,13 g/g wurde im Intervall zwischen 6 und 11 h Prozesszeit ermittelt. Die Gesamtproduktivität betrug 0,387 g/(l h). Eine komplette Übersicht der Konzentrationsverläufe aller bestimmten Substrate und Produkte ist im Anhang beigefügt (siehe Abschnitt A.1.1).

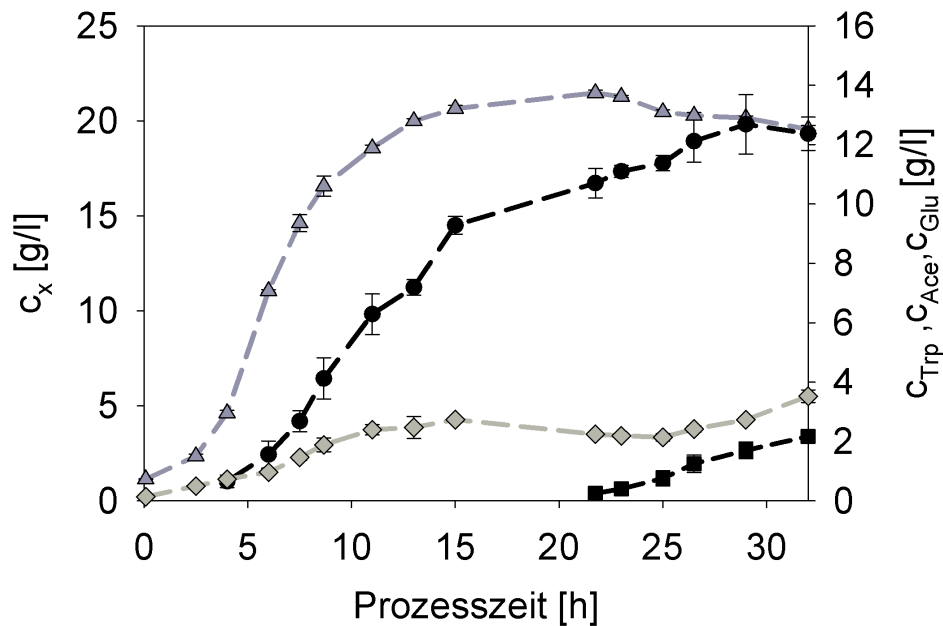


Abbildung 15: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Raute), L-Glutamat- (Quadrat) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Referenzkultivierung. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]

Die Kohlenstoffwiederfindung des Gesamtprozesses bezogen auf die aufgenommene Glukose betrug 83 %. Den größten Anteil stellte dabei mit 46 % CO_2 dar. Für ein Intervall zwischen 21,68 und 27 Stunden Prozesszeit wurde ein Höchstwert von 55 % CO_2 -Anteil bestimmt. Die Biomasse war über den Gesamtprozess für 16 % und L-Tryptophan für 14,6 % der Kohlenstoffwiederfindung verantwortlich. Weiterhin wurden Acetat (2,7 %), L-Glutamat (1,6 %), L-Tyrosin (2,1 %) und L-Phenylalanin (2,1 %) berücksichtigt (siehe Abbildung 16). Eine Darstellung der differentiell bestimmten Kohlenstoffbilanz ist im Anhang beigefügt (siehe Tabelle 37)

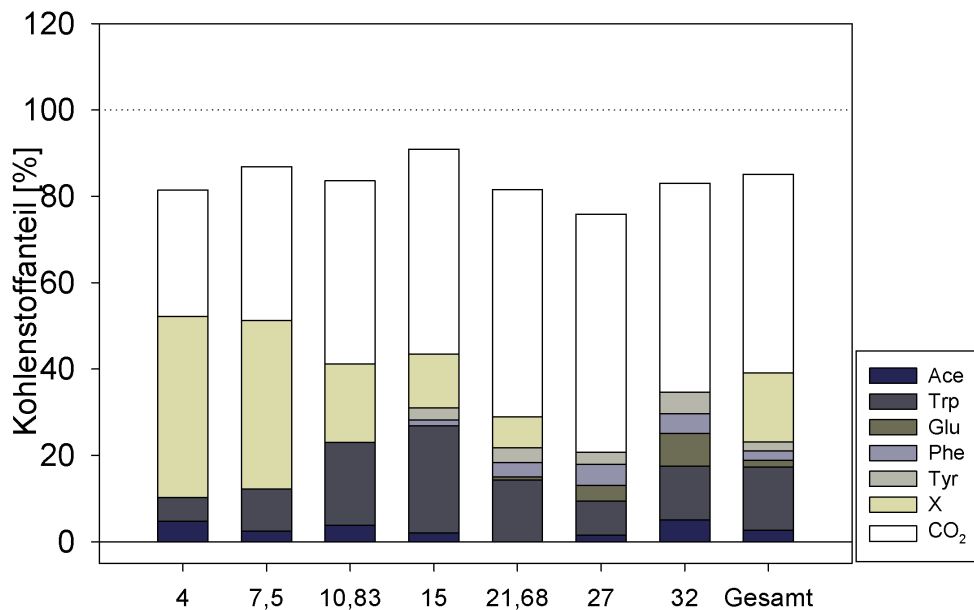


Abbildung 16: Intervallweise, differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung und die integrale Gesamtbilanz für den Referenzprozess. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende. Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Tyr, Tyrosin; X, Biomasse

Die höchste spezifische Wachstumsrate von $0,45 \pm 0,0345$ 1/h wurde nach 3,25 h Prozesszeit in der Batchphase ermittelt. Die Wachstumsrate reduzierte sich bereits nach 6,75 h auf $0,207 \pm 0,017$ 1/h. Die Konzentration des limitierenden Substrats (Phosphat) im vorliegenden Prozessintervall wurde auf über 0,2 g/l bestimmt. Annähernd zeitgleich mit dem Absinken der spezifischen Wachstumsrate erhöhte sich die spezifische L-Tryptophanbildungsrate. Nach 10 h Prozesszeit wurde der Höchstwert von $0,065 \pm 0,01$ g/(g h) erreicht, gefolgt von einem deutlichen Abfall der Rate bis auf einen Wert von 0,015 g/(g h) gegen Prozessende (siehe Abbildung 17).

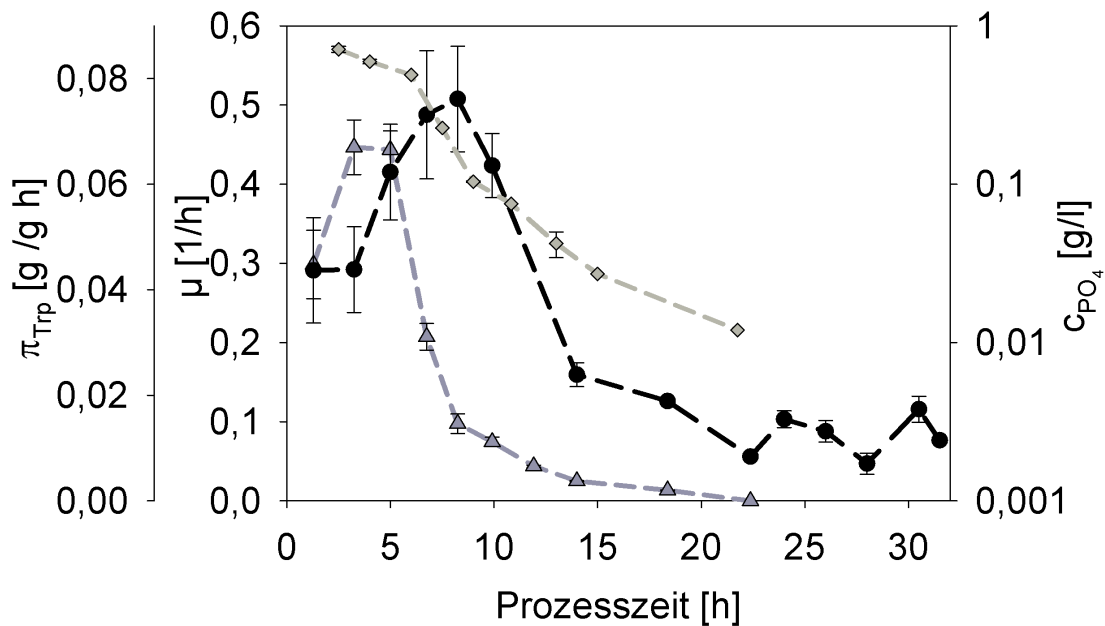


Abbildung 17: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) im Zeitverlauf der Referenzkultivierung. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]

3.2.3 Phosphatfütterung

Um den Übergang in die Phosphatlimitierung zeitlich zu verlängern, wurden Fütterungsstrategien mit konstanter Phosphatfütterung umgesetzt. Abhängig von der Biomasse um Zeitpunkt des Fütterungsstartes, der vorliegenden Phosphatkonzentration und der Phosphat-Fütterungsrate wurden verschiedene Fütterungsszenarien eingesetzt. Für die finale Analyse wurde Szenario 3 eingesetzt. Szenario 2 zeigte eine sehr hohe Produktivität und Substrataufnahmeraten, allerdings wurde der vollständige Übergang in die Limitierung durch Füllhöhenbegrenzung des Reaktors nicht erreicht. Daher wurde die Laufzeit des Prozessszenarios auf 24 h begrenzt. Für weitere Phosphatfütterungsszenarien mit geringeren Phosphatkonzentrationen und Fütterungsraten, die im Vorfeld getestet wurden, ergaben sich Prozessinstabilitäten in Form von starker Schaumbildung, stark verringerter Produktbildungsraten und Biomasseabnahme (Daten nicht gezeigt). Für alle Prozesse konnte eine zusätzliche Limitierung weiterer Makroelemente ausgeschlossen werden. Weiterhin zeigte sich in Medienoptimierungsansätzen (siehe Abschnitt

3.2.1) keine weitere limitierende Komponente.

Für Prozesse mit konstanter Phosphatfütterung waren aufgrund der umfangreichen Methodenentwicklung (siehe Abschnitt 3.1.2) Energieladungsmessungen möglich. Die Probenahme und Aufarbeitung wurden im Prozessverlauf durchgeführt.

Phosphatfütterungsszenario 2 Für den Phosphatfütterungsprozess wurden nach 24 h Laufzeit Endtiter von $27,8 \pm 0,22$ g/l Biomasse, $13,69 \pm 0,8$ g/l L-Tryptophan, $3,82 \pm 0,18$ g/l Acetat und $3,38 \pm 0,22$ g/l L-Glutamat bestimmt. Weiterhin wurden L-Phenylalanin ($0,36 \pm 0,02$ g/l) und L-Valin ($0,3 \pm 0,04$ g/l) detektiert. Die Gesamtausbeute an L-Tryptophan bezogen auf Glukose betrug $0,09$ g/g und war damit im Vergleich zum Referenzprozess im Rahmen der Messgenauigkeit leicht erhöht. Zwischen 10 und 17 h Prozesszeit wurden differentielle Ausbeuten von $0,11$ g/g bestimmt. Die Gesamtproduktivität betrug $0,57$ g/(l h) und lag damit 47 % über der des Referenzprozesses. Eine komplette Übersicht der Konzentrationsverläufe aller bestimmten Substrate und Produkte ist im Anhang beigefügt (siehe Abschnitt A.1.1).

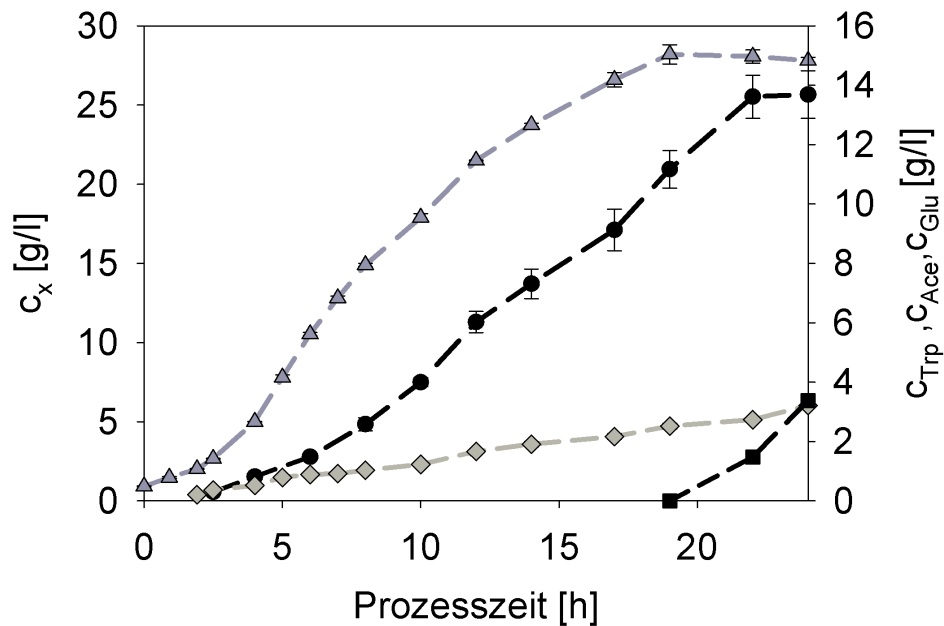


Abbildung 18: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Raute), Glutamat- (Quadrat) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 2

Die höchste, während der Batchphase ermittelte spezifische Wachstumsrate betrug $0,47 \pm 0,008$ 1/h. Nach 7,5 h Prozesslaufzeit verringerte sich die spezifische Wachstumsrate auf $0,17 \pm 0,003$ 1/h. Bis 18 h Prozesszeit sank die Wachstumsrate auf $0,05 \pm 0,001$ gefolgt von einem kaum detektierbaren Wachstum bis Prozessende. Die höchste spezifische L-Tryptophanbildungsrate betrug $0,056$ g/(g h) und wurde nach 11 h Prozesszeit ermittelt. Die spezifische L-Tryptophanbildungsrate blieb bis 18 h Prozesszeit in einem Bereich zwischen $0,044$ und $0,036$ g/(g h), gefolgt von einer starken Reduktion der Tryptophanbildung bis zum Prozessende.

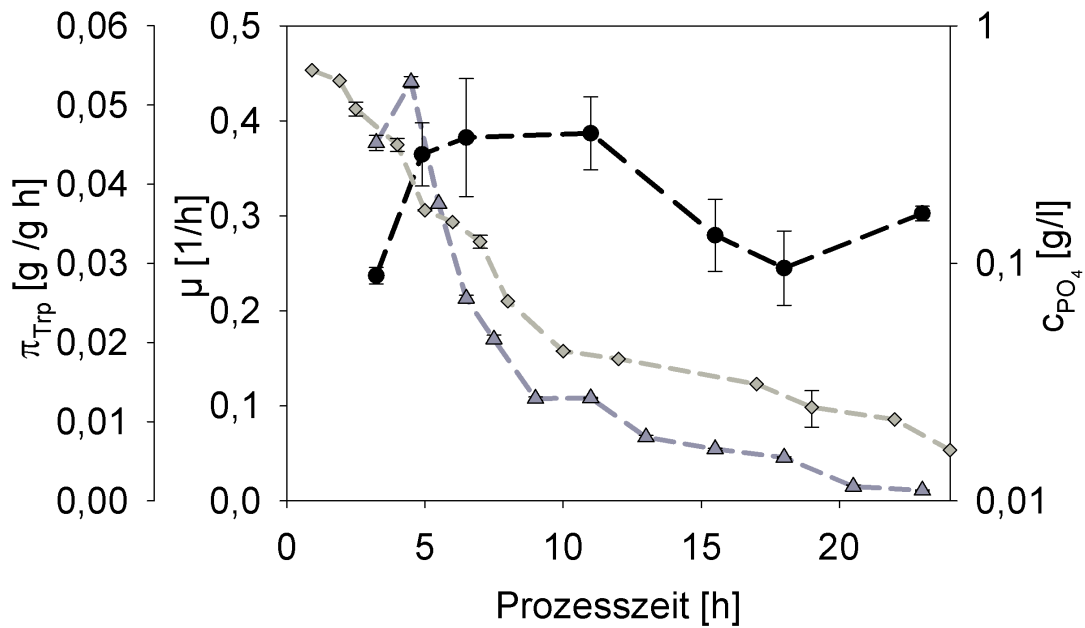


Abbildung 19: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 2

Für die Batchphase vor Einsetzen der Phosphatlimitierung wurde eine Energieladung größer 0,9 bestimmt. Mit Einsetzen der Phosphatlimitierung nach 6 h sank die Energieladung deutlich auf Werte bis zu 0,55 ab und stabilisierte sich in diesem Bereich bis zum Prozessende. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die Kohlendioxidemissionsrate eine stetige steigende Tendenz bis 20 h Prozesszeit, gefolgt von einer Reduktion der Kohlendioxidemission (siehe Abbildung 20) bis zum Prozessende.

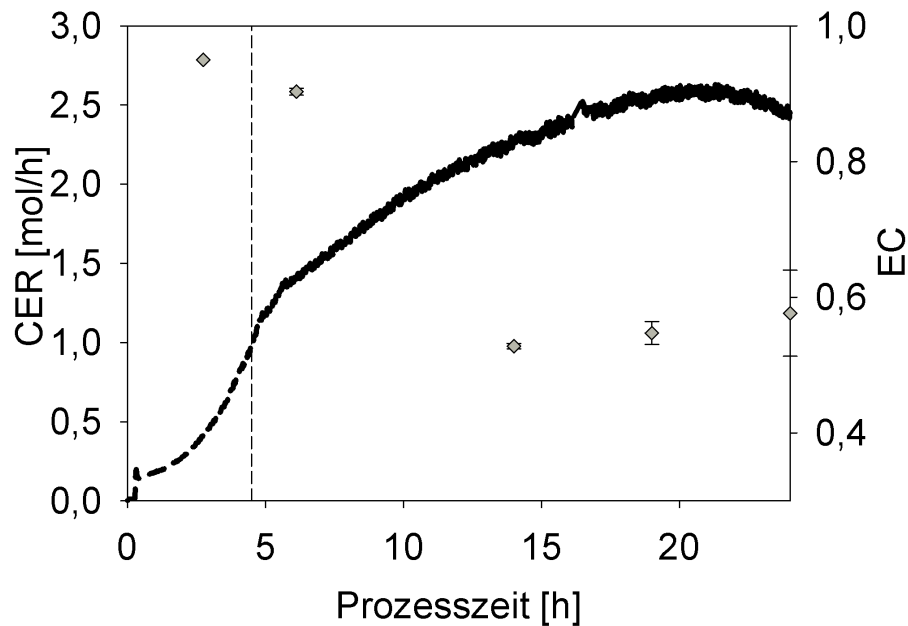


Abbildung 20: Kohlendioxidemissionsrate (CER, schwarz) und die Energieladung (Raute) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 2

Im Rahmen der Kohlenstoffbilanzierung konnten über den Gesamtprozess 95,19 % des eingegangenen Kohlenstoffs in den analysierten Komponenten wiedergefunden werden. Der größte Stoffanteil war dabei mit 54,64 % dem CO_2 zugeordnet. Der differentiell höchste Kohlenstoffanteil (60,2 %) für CO_2 wurde im Intervall zwischen 14 und 17 h Prozesszeit ermittelt. Der Kohlenstoffanteil des Gesamtprozesses war für die Biomasse 20,08 % und für L-Tryptophan 14,96 %. Weiterhin wurde Acetat (2,48 %), L-Glutamat (2,37 %) sowie L-Phenylalanin (0,4 %) und L-Valin (0,27 %) detektiert.

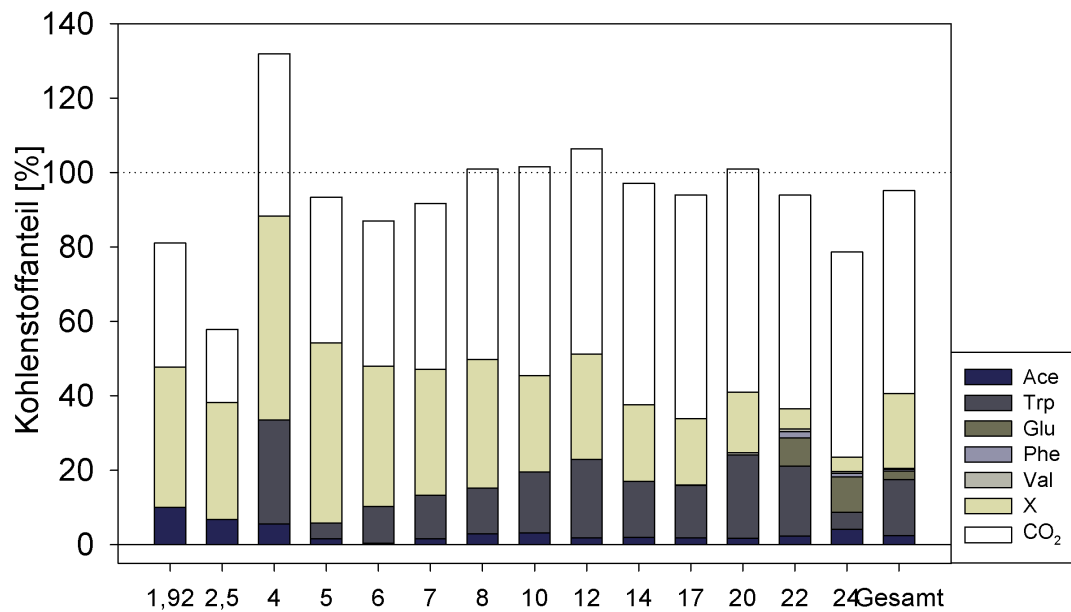


Abbildung 21: Intervallweise differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung und die integrale Gesamtbilanz für den Prozess mit Phosphatfütterungsszenario 2. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende. Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Val, L-Valin; X, Biomasse

Phosphatfütterungsszenario 3 Im Prozess mit Phosphatfütterungsszenario 3 für den Tryptophanproduzenten wurden zum Prozessende $22,3 \pm 0,02$ g/l Biomasse, $15,12 \pm 0,42$ g/l L-Tryptophan, $6,32 \pm 0,001$ g/l Acetat, $5,65 \pm 0,22$ g/l L-Glutamat, $1,38 \pm 0,11$ g/l L-Valin und $0,41 \pm 0,2$ g/l L-Phenylalanin bestimmt. Die Gesamtausbeute für L-Tryptophan bezogen auf Glukose betrug $0,105$ g/g und war damit im Vergleich zum Referenzprozess um 25 % erhöht. Die höchsten differentiellen L-Tryptophanausbeuten ($0,136$ g/g) wurden im Zeitraum zwischen 17 und 22 h Prozesszeit erreicht. Die Gesamtproduktivität betrug $0,47$ g/(l h) und lag damit um 21 % über der des Referenzprozesses. Eine komplette Übersicht der Konzentrationsverläufe aller bestimmten Substrate und Produkte ist im Anhang beigefügt (siehe Abschnitt A.1.1).

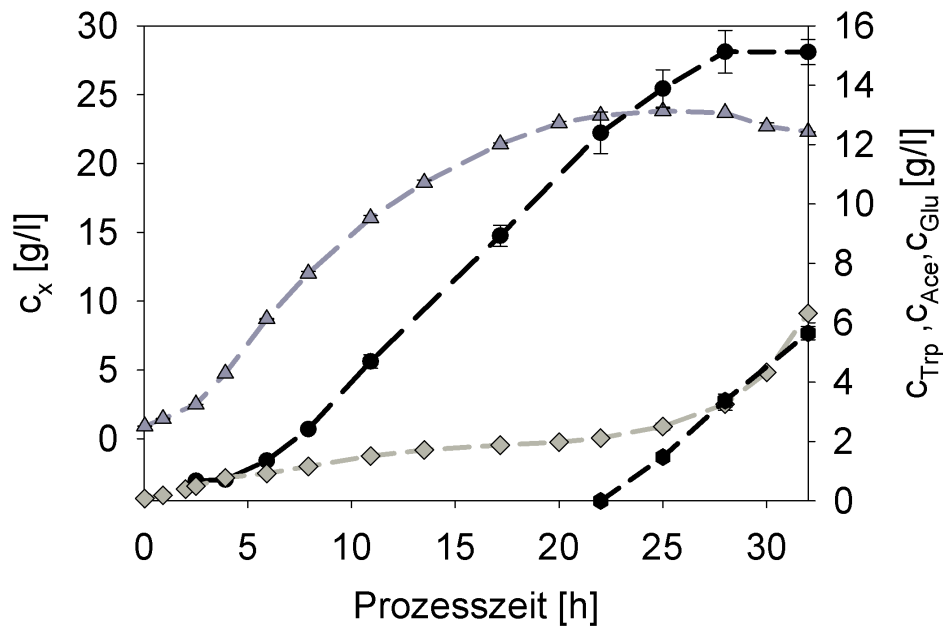


Abbildung 22: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Raute), Glutamat- (Quadrat) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]

Die ermittelte maximale spezifische Wachstumsrate während der Batch-Phase betrug $0,5 \text{ 1/h}$. Nach $3,2 \text{ h}$ Prozesszeit reduzierte sich die Wachstumsrate, nach $6,9 \text{ h}$ wurde eine Wachstumsrate von $0,17 \text{ 1/h}$ bestimmt. Es folgte eine weitere Reduktion des Wachstums bis $26,5 \text{ h}$ Prozesszeit, für die verbleibenden Stunden bis Prozessende wurde keine Biomassezunahme mehr festgestellt. Die höchste spezifische L-Tryptophanbildungsrate von $0,056 \pm 0,052 \text{ g/(g h)}$ wurde nach $9,4 \text{ h}$ Prozesszeit bestimmt. In den folgenden 17 h reduzierte sich die spezifische L-Tryptophanbildungsrate langsam auf $0,027 \pm 0,0029 \text{ g/(g h)}$, gefolgt von einem plötzlichen Abfall auf annähernd keine L-Tryptophanbildung (siehe Abbildung 23). In der frühen Übergangsphase in die Phosphatlimitierung wurden nur geringe spezifische Acetatbildungsgraten ($0,003$ bis $0,009 \text{ g/(g h)}$) bestimmt, gegen Ende der Kultivierung stieg die Acetatbildung deutlich an. Zum Prozessende wurden Acetatbildungsgraten von $0,044 \text{ g/(g h)}$ ermittelt. Kurz vor dem Anstieg der Acetatbildung wurde erstmals Glutamatbildung mit einer maximalen spezifischen Bildungsrate von $0,029 \text{ g/(g h)}$ detektiert (siehe Abbildung 23).

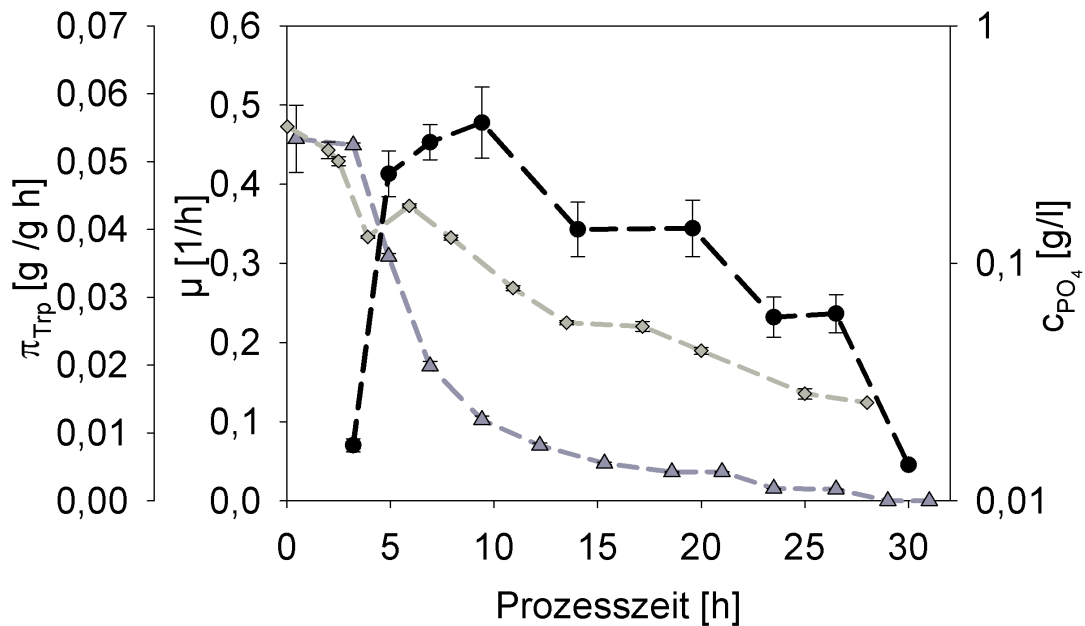


Abbildung 23: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalt in [Schuhmacher et al., 2014]

Zu Beginn des Prozesses wurden Energieladungen zwischen 0,9 und 0,89 bestimmt. Nach 22 h Prozesszeit war die Energieladung auf 0,54 abgesunken, zum Prozessende wurden Energieladungen von 0,5 bestimmt. Die Kohlendioxidemissionsrate stieg im Prozessverlauf zunächst kontinuierlich an. Nach der 24 h kam es zu einer Reduktion der Kohlendioxidemission (siehe Abbildung 24).

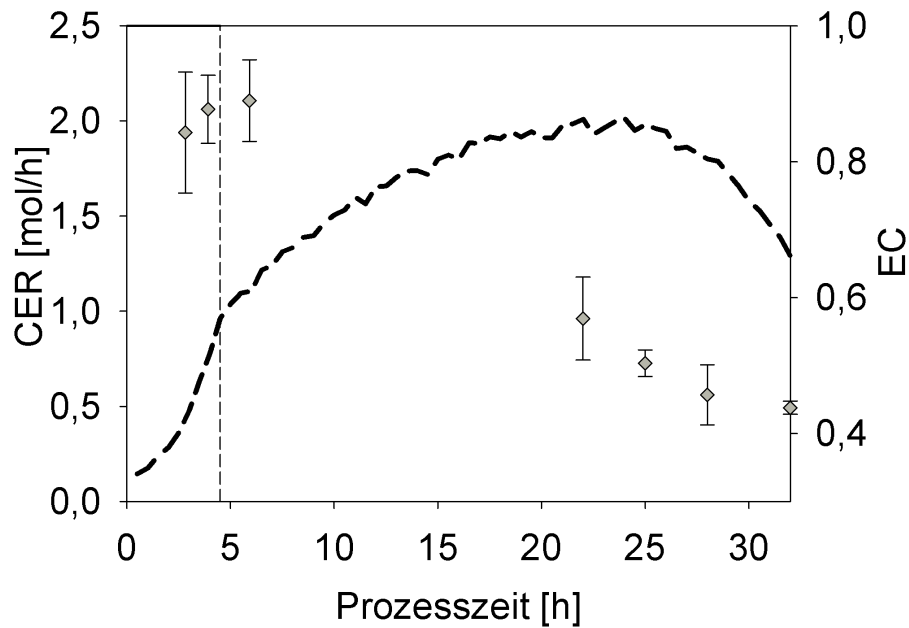


Abbildung 24: Kohlendioxidemissionsrate (CER, schwarz) und die Energieladung (Raute) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalt in [Schuhmacher et al., 2014]

Im Rahmen der Kohlenstoffbilanzierung für den Gesamtprozess konnten 96,31 % des aufgenommenen Kohlenstoffs durch die quantifizierten Komponenten wiedergefunden werden. Den mit Abstand größten Stoffmengenanteil hatte CO_2 mit 56 %. Im Prozessintervall zwischen 17 und 22 h entfielen 62,78 % des eingegangenen Kohlenstoffs auf CO_2 . Auf die L-Tryptophan entfiel 16,27 %, auf die Biomasse 15,02 %, auf Acetat 3,91 % und auf L-Glutamat 3,6 %. Weiterhin wurden L-Phenylalanin (0,42 %) und L-Valin (1,11 %) detektiert (siehe Abbildung 25).

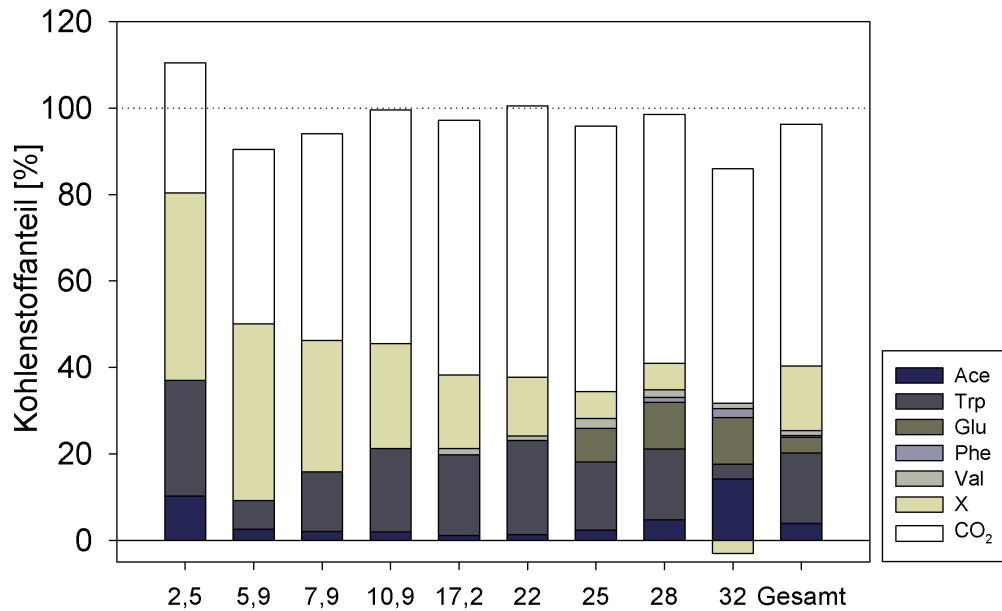


Abbildung 25: Intervallweise differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung und die integrale Gesamtbilanz für Prozesse mit Phosphatfütterungsszenario 3. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende. Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Val, L-Valin; X, Biomasse

3.2.4 Phosphatfütterungsszenario 3: Wildtypstudien

Bei den Kultivierungen mit *E. coli* K12 W3110 mit Phosphatfütterung wurden zum Prozessende $34,51 \pm 0,21$ g/l Biomasse und $2,81 \pm 0,02$ g/l Acetat bestimmt (siehe Abbildung 26). Es konnten keine messbaren Mengen an weiteren Nebenprodukten in der Reaktionslösung identifiziert werden. Eine Auflistung der Substrat- und Produktkonzentrationen ist im Anhang beigefügt (siehe Abschnitt A.1.5)

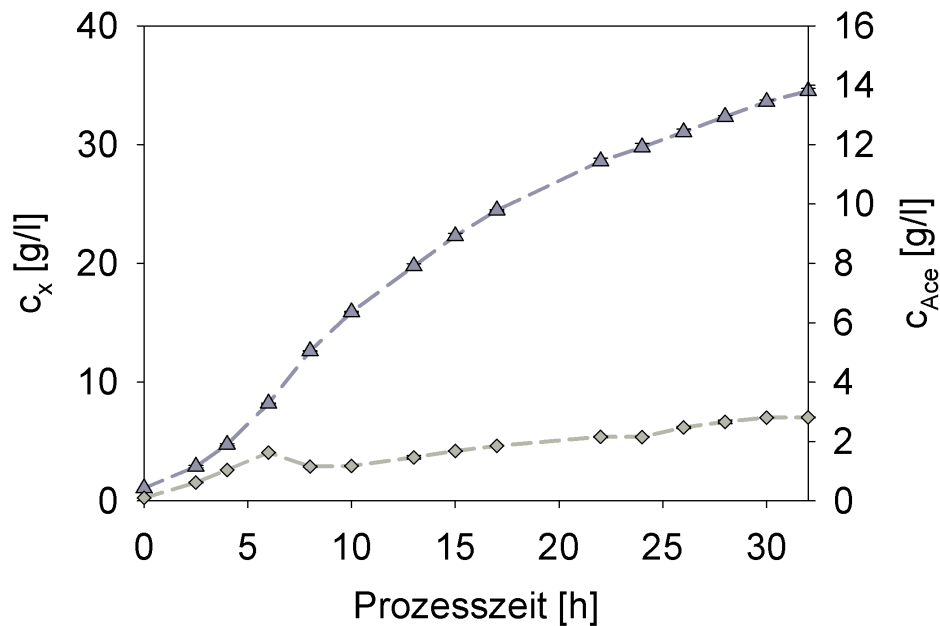


Abbildung 26: Acetat- (Raute) und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit *E. coli* K12 W3110 und Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]

Die spezifische Wachstumsrate reduzierte sich von einem Maximalwert von 0,33 1/h nach 3,2 h Prozesszeit signifikant bei Phosphatkonzentrationen zwischen $0,31 \pm 0,01$ g/l und $0,16 \pm 0,004$ g/l. Eine geringe Wachstumsrate zwischen 0,03 und 0,02 1/h konnte bis zum Prozessende bestimmt werden (siehe Abbildung 27). Die während der Batch-Phase maximale spezifische Acetatbildungsrate reduzierte sich unter Einfluss der Phosphatlimitierung deutlich von 0,09 auf 0,003 g/(g h) und blieb über den weiteren Prozessverlauf annähernd konstant (siehe Abbildung 27).

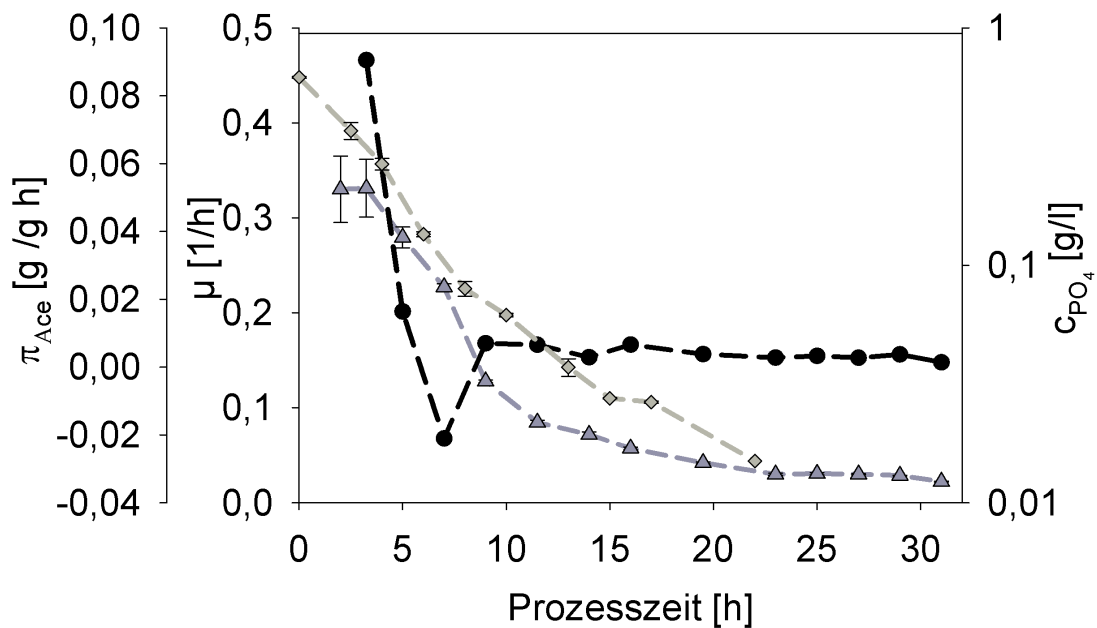


Abbildung 27: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die Acetatbildungsraten (Kreis) und Phosphatkonzentrationen (Raute, logarithmisch) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit *E. coli* K12 W3110 und Phosphatfütterungsszenario 3. Enthalten in [Schuhmacher et al., 2014]

Während der Batchphase wurden Energieladungen von maximal $0,87 \pm 0,042$ bestimmt. Mit Reduktion der Wachstumsrate reduzierte sich die Energieladung nach 8 h Prozesszeit auf $0,69 \pm 0,005$, zum Prozessende wurden Energieladungen von $0,46 \pm 0,09$ bestimmt. Die Kohlendioxidemissionsrate stieg nach Einsetzen der Phosphatlimitierung bis zum Prozessende annähernd linear an (siehe Abbildung 28).

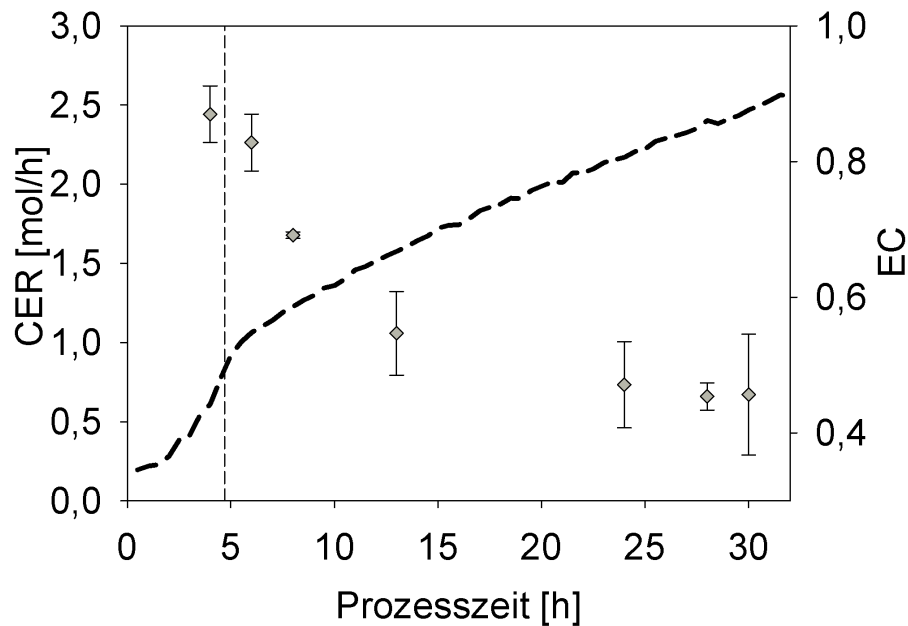


Abbildung 28: Kohlendioxidemissionsrate (CER, schwarz) und die Energieladung (Raute) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit *E. coli* K12 W3110 und dem Phosphatfütterungsszenario 3. Enthaltene in [Schuhmacher et al., 2014]

Die Gesamtkohlenstoffbilanz konnte durch die Quantifizierung von Biomasse, Acetat und Kohlendioxid zu 99% geschlossen werden. Der größte Kohlenstoffanteil wurde mit 70 % für CO_2 bestimmt. In Prozessintervallen nach 30 h Prozesslaufzeit wurden über 80 % CO_2 -Anteil ermittelt. Weiterhin wurden für die Biomasse 27 % und für Acetat 2 % Kohlenstoffanteil bestimmt (siehe Abbildung 29).

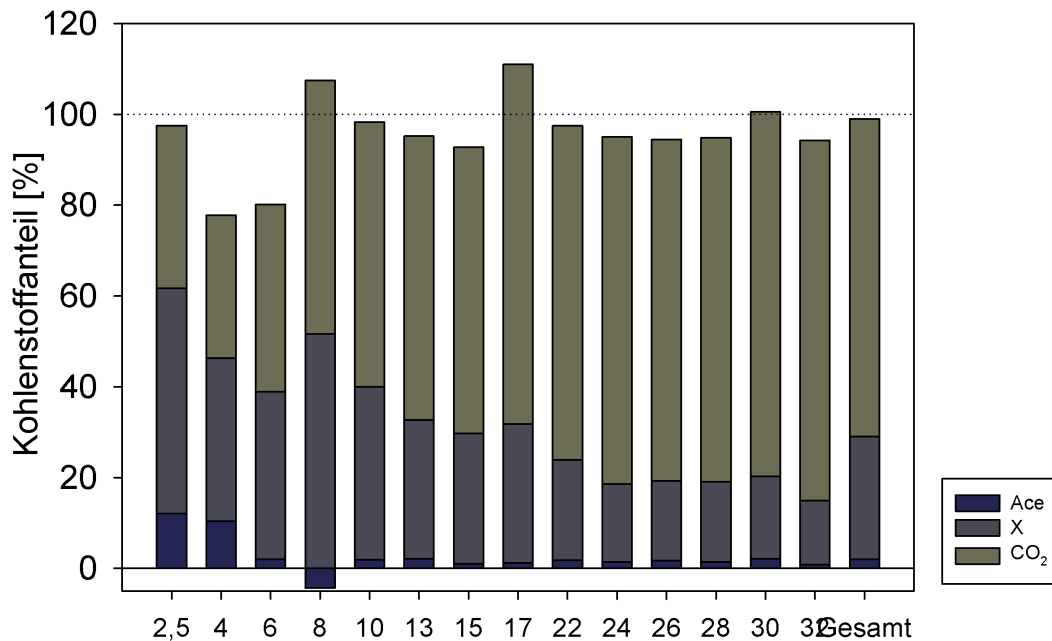


Abbildung 29: Intervallweise differentiell bestimmte Kohlenstoffwiederfindung bezogen auf den aufgenommenen Kohlenstoff und die integrale Gesamtbilanz. Die Intervallzeitpunkte bezeichnen jeweils das Intervallende in Stunden Prozesszeit. Ace, Acetat; X, Biomasse

3.2.5 Glukoselimitierungen

Glukoselimitierte Prozesse wurden zu verschiedenen Fragestellungen durchgeführt. Im ersten Fall wurde für die Fed-Batch-Phase eine konstante Wachstumsrate von 0,1 1/h durch exponentielle Glukosezufütterung eingestellt. Alle übrigen Elemente waren im Überschuss vorhanden.

In einem weiteren Szenario wurde die Batchphase des Referenzprozesses stark verkürzt und die Wachstumsphase mit einer Wachstumsrate von 0,35 1/h über exponentielle Glukosezufütterung gesteuert. Phosphat wurde in diesem Ansatz nicht erhöht, beim Übergang in die Phosphatlimitierung wurde auf eine konstante Glukosezufütterung auf Glukoseüberschuss umgestellt. Ziel des Ansatzes war eine Reduktion der Acetatbildung in der Batch- und Wachstumsphase des Prozesses.

Glukoselimitierung Innerhalb von 17 h wurde eine Biomassekonzentration von 23,5 g/l und eine Tryptophankonzentration von 7,3 g/l erreicht. Die Tryptophankonzentration wurde mit Hilfe einer Absorptionsmessung näherungsweise bestimmt. Die Gesamtausbeute von L-Tryptophan bezogen auf Glukose lag bei 0,09 g/g, allerdings war die Differenz zum Referenzprozess aufgrund des Fehlerbereichs der Absorptionsmessung nicht signifikant. Über den Gesamtprozess wurden 96 % des eingesetzten Kohlenstoffes durch die Messungen wiedergefunden, auf die Biomasse entfiel dabei Stoffmengenbezogen (C-Mol) 35,6 %, auf Kohlendioxid 42 %, auf L-Tryptophan 15 % und auf Acetat 0,2 %.

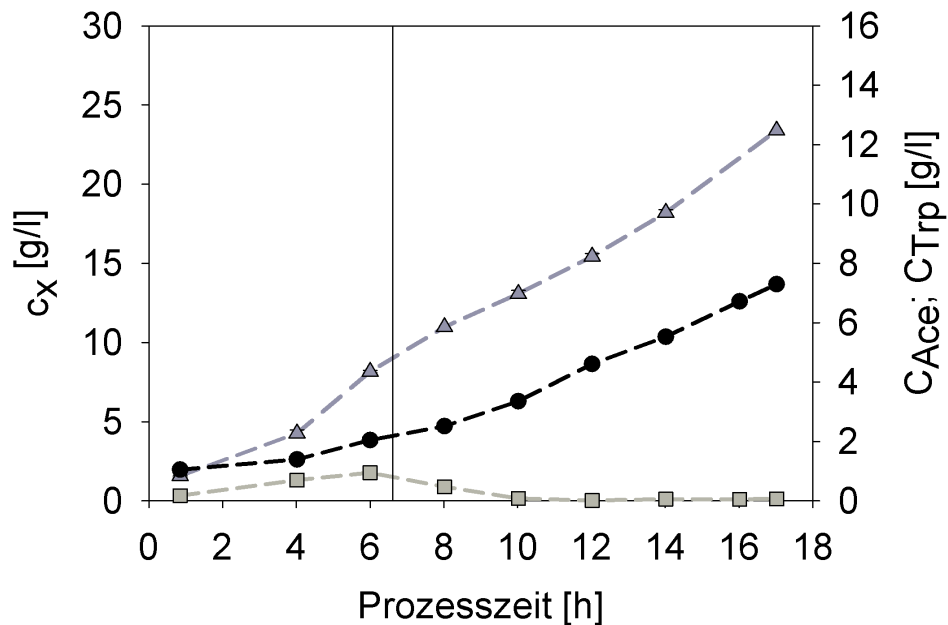


Abbildung 30: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der glukoselimitierten Kultivierung

Die spezifische Wachstumsrate betrug während der Batchphase maximal 0,3 1/h, für die Fed-Batch-Phase wurde die angestrebte Wachstumsrate von 0,1 1/h erreicht. Die spezifische Tryptophanbildungsrate betrug während der Batchphase maximal 0,052 g/(g h), in der Fed-Batch-Phase schwankte sie zwischen 0,024 und 0,046 g/(g h).

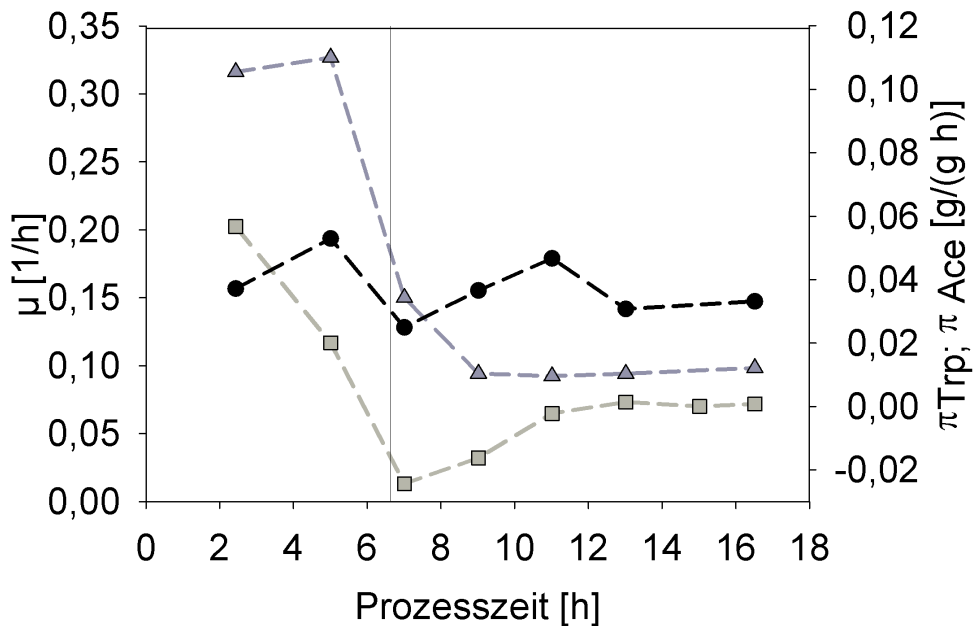


Abbildung 31: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der glukoselimitierten Kultivierung

Die zum Prozessende durchgeführten Selektionstests zeigten einen verbleibenden Anteil von 35 % tetracyclinresistenter Zellen. Neben *E. coli* Kolonien konnten auf ausplattierten Agarplatten keine auffälligen Kolonien identifiziert werden. Für vergleichbare Referenzkultivierungen oder Kultivierungen mit Phosphatfütterung lag der Wert bei über 97 %. Für die Vorstufen der Kultivierung wurde im Rahmen der Selektionstests keine Auffälligkeit festgestellt. Im Hauptprozess wurden nur 25 % der Biomasse während der Batchphase im Glukoseüberschuss produziert, der Großteil wurde unter starker Glukoselimitierung erzeugt. Aufgrund des deutlichen Einflusses der Glukoselimitierung auf die Plasmidstabilität in Verbindung mit den Prozessvorgaben für produktionsrelevante Fermentationen (keine Antibiotikazugabe) wurde dieser Ansatz für den Modellstamm *E. coli* K12 JP6015/pMU91 trotz eines vorhandenen Optimierungspotentials (Ausbeute) nicht weiter verfolgt.

Kombinierte Glukose- und Phosphatlimitierung Zum Prozessende nach 32 h wurden Biomassekonzentrationen von $15,92 \pm 0,22$ g/l erreicht, die maximale Biomassekonzentration von $18,24 \pm 0,02$ g/l wurde nach 16,5 h detektiert. Die Acetatkonzentration lag bei $6,21 \pm 0,1$, die L-Tryptophankonzentration bei 9,35 g/l. Die Gesamtausbeute von L-Tryptophan auf Glukose war 0,06 g/g. Eine Auflistung der Substrat- und Produktkonzentrationen ist im Anhang beigelegt (siehe Abschnitt A.1.5)

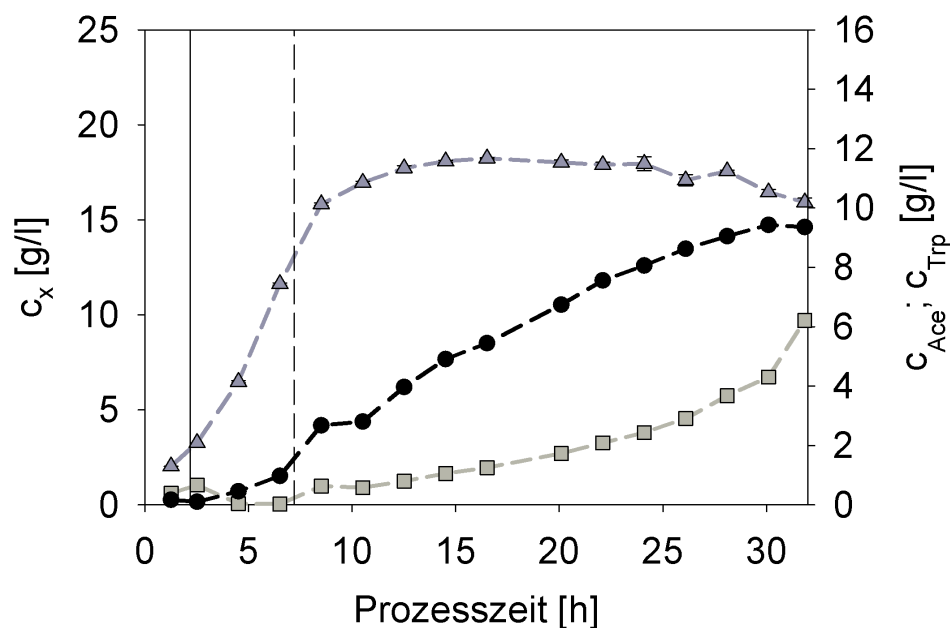


Abbildung 32: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der seriell glukose- und phosphatlimitierten Kultivierung

Die spezifische Wachstumsrate reduzierte sich nach der verkürzten Batchphase in der Phase der exponentiellen Glukosefütterung von 0,38 auf 0,17 1/h. In der Übergangsphase in die Phosphatlimitierung kam es zu einer weiteren Reduktion der Wachstumsrate, nach 24 h Prozesslaufzeit konnte kein Wachstum mehr festgestellt werden. Die spezifische Acetatbildungsrate reduzierte sich nach Erreichen des Maximalwertes von 0,09 g/(g h) in der Batchphase unter Glukoselimitierung signifikant, es konnte Acetataufnahme detektiert werden. Beim Übergang in die Phosphatlimitierung und den Glukoseüberschuss erhöhte sich die spezifische Ace-

tatbildungsrate auf $0,021 \text{ g}/(\text{g h})$. Im weiteren Prozessverlauf blieb sie annähernd konstant, ab 30 h Prozesslaufzeit konnte eine deutliche Erhöhung der Acetatbildung beobachtet werden (siehe Abbildung 33).

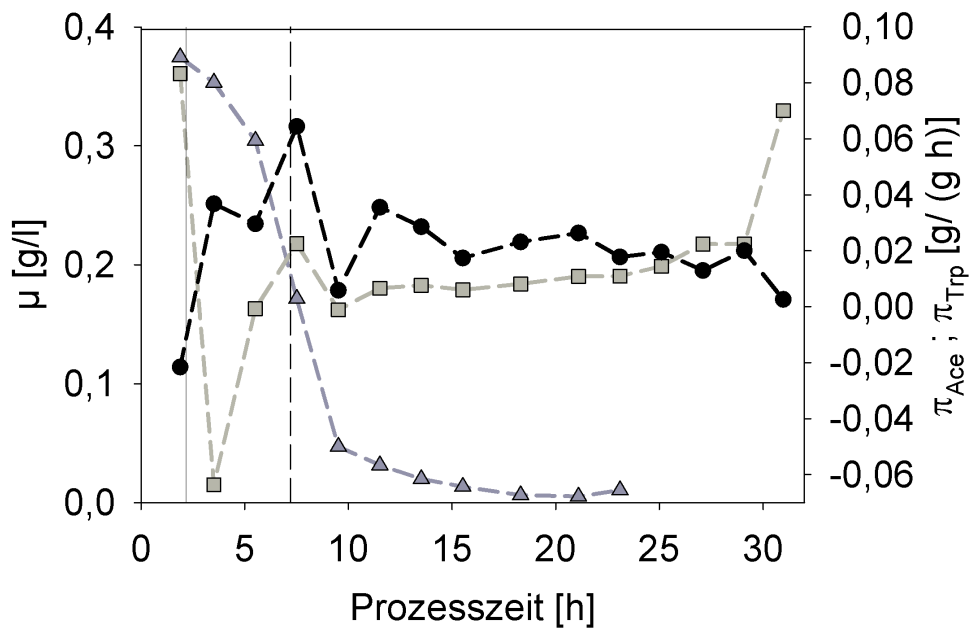


Abbildung 33: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsrate (Kreis) und Acetatbildungsrate (Quadrat) über den Zeitverlauf der seriell glukose- und phosphatlimitierten Kultivierung. Die schwarze Linie markiert das Ende der Batch-Phase, die gestrichelte Linie das Ende der exponentiellen Glukosefütterung

3.2.6 *Screening*-Ansatz: alternative Elementarlimitierungen

Ansätze zur Stickstoff- und Schwefellimitierung wurden in einem Parallelreaktor-system mit 200 ml Glasreaktoren durchgeführt. Aufgrund des begrenzten Sauerstoffeintrags und Einschränkungen bei der Steuerung der Fütterungsraten wurde zunächst ein phosphatlimitierter Referenzprozess etabliert [Werner, 2014]. In der Folge wurden mit vergleichbarer Laufzeit Experimente zur Stickstoff- und Schwefellimitierung durchgeführt. Die Charakterisierung des Reaktorsystems sowie die Durchführung der Fermentationen erfolgte im Rahmen einer im Projekt betreuten

Masterarbeit Verfahrenstechnik durch Achim Werner [Werner, 2014]. Im Prozessverlauf aller im Parallelreaktorsystem durchgeführten Fermentationen wurde die Biomasse, die Acetatkonzentration und photometrisch die L-Tryptophankonzentration bestimmt.

Referenzkultivierung Im Rahmen der im Batch-Verfahren durchgeführten phosphatlimitierten Referenzkultivierung wurden nach 8 h Laufzeit $8,66 \pm 0,21$ g/l Biomasse, $0,54 \pm 0,01$ g/l Acetat und $1 \pm 0,08$ g/l L-Tryptophan bestimmt. Die L-Tryptophanausbeute bezogen auf Glukose lag bei $0,054$ g/g (siehe Abbildung 34). Zum Prozessende konnte kein Phosphat im Medium nachgewiesen werden.

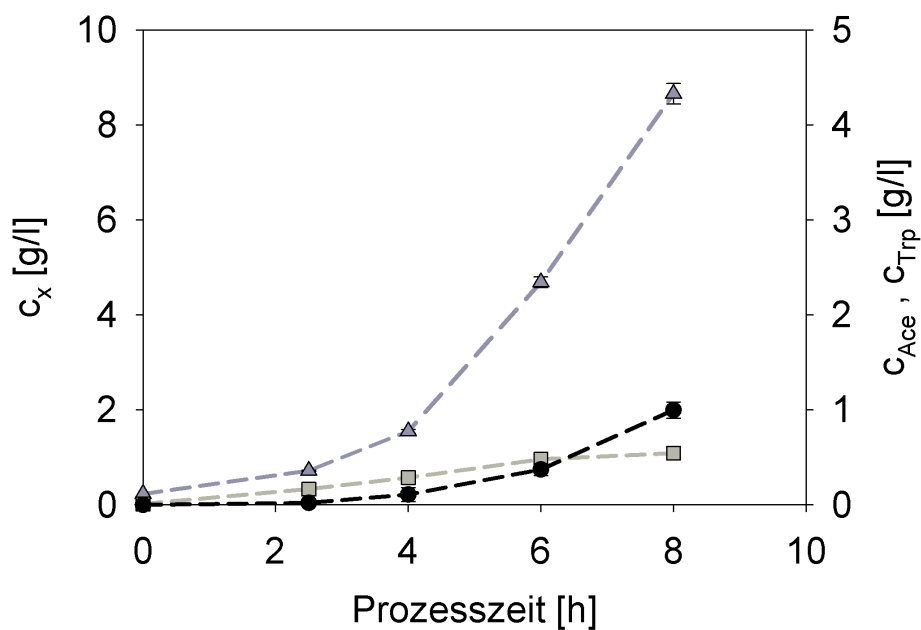


Abbildung 34: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Referenzkultivierung im 200 ml Parallelreaktorsystem

Die spezifische Wachstumsrate reduzierte sich im Prozessverlauf von maximal $0,55$ auf $0,3$ 1/h. Die maximale spezifische Acetatbildungsrate von $0,014$ g/(g h) wurden nach 5 h, die maximale spezifische L-Tryptophanbildungsrate von $0,042$ g/(g h) wurde nach 7 h erreicht (siehe Abbildung 35).

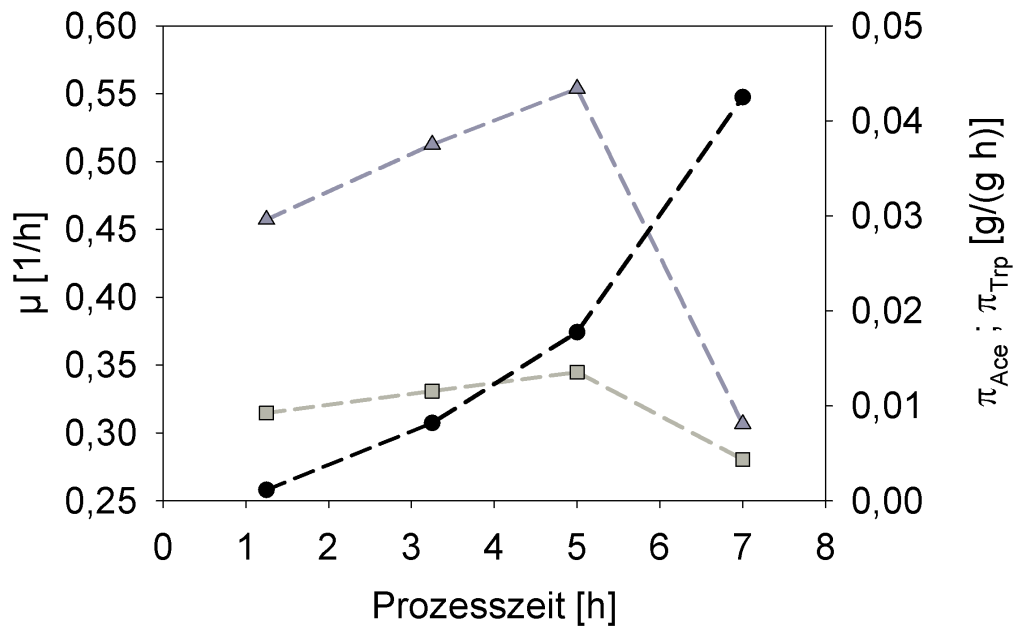


Abbildung 35: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der Referenzkultivierung im 200 ml Parallelreaktorsystem

Stickstofflimitierung Für die stickstofflimitierten Fermentationen mit konstanter Ammoniumsulfatfütterung wurde jeweils mit identischer Rate zugefüttert. Um den Übergang in die Stickstofflimitierung zu erfassen wurden für verschiedene Ansätze Fütterungslösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Für die hier gezeigten Fütterungsszenarien 2 und 3 wurden 44 g/l beziehungsweise 22 g/l Ammoniumsulfatlösung eingesetzt. Die Glukosekonzentration wurde durch diskontinuierliche Fütterung über die gesamte Laufzeit auf über 2 g/l gehalten. Zum Prozessende wurden neben der Bestimmung von Biomasse, L-Tryptophan, Glukose und Acetat Gesamtkohlenstoffmessungen der Suspension durchgeführt. Dabei konnten über eine differentielle Analyse keine weiteren kohlenstoffhaltigen Verbindungen detektiert werden.

Für die Fermentation mit Ammoniumfütterungsszenario 2 konnten nach 10 h Prozesszeit $6,91 \pm 0,22$ g/l Biomasse, $0,78 \pm 0,007$ g/l Acetat und $1,21 \pm 0,02$ g/l L-Tryptophan bestimmt werden (siehe Abbildung 36). Die Gesamtausbeu-

te von L-Tryptophan bezogen auf Glukose betrug 0,058 g/g. Nach 10 h konnten noch 0,1 g/l Phosphat 0,003 g/l Ammonium detektiert werden. Zum Prozessende wurden trotz des erhöhten Phosphatgehalts im Medium Restkonzentrationen von 0,15 g/l Phosphat gemessen. Die spezifische Phosphataufnahmerate war daher deutlich erhöht. Ein zusätzlicher Einfluss einer Phosphatlimitierung gegen Prozessende konnte nicht ausgeschlossen werden.

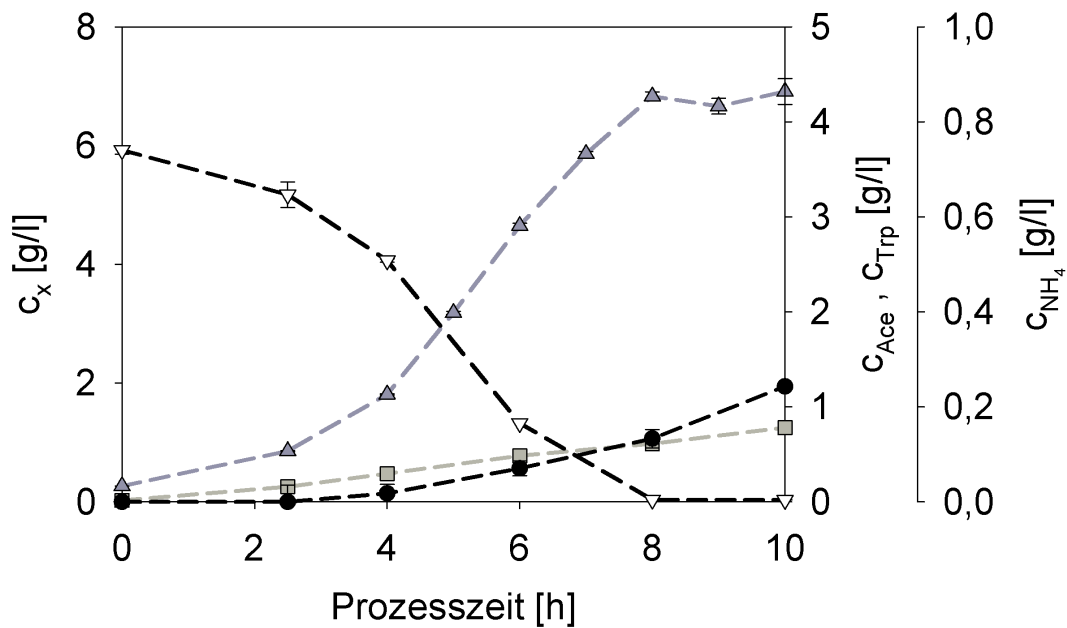


Abbildung 36: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 2 im 200 ml Parallelreaktorsystem

Die spezifische Wachstumsrate reduzierte sich von 0,501 1/h nach 10 h auf 0,035 1/h. Die maximale spezifische L-Tryptophanbildungsrate von 0,036 g/(g h) wurde nach 9 h erreicht (siehe Abbildung 37). In der Flüssigphase konnten nur 30,5 % des eingesetzten Kohlenstoffs durch Produkt- und Gesamtkohlenstoffanalyse wiedergefunden werden. Die verbleibenden 69,5 % wurden der Kohlendioxidemission zugeordnet.

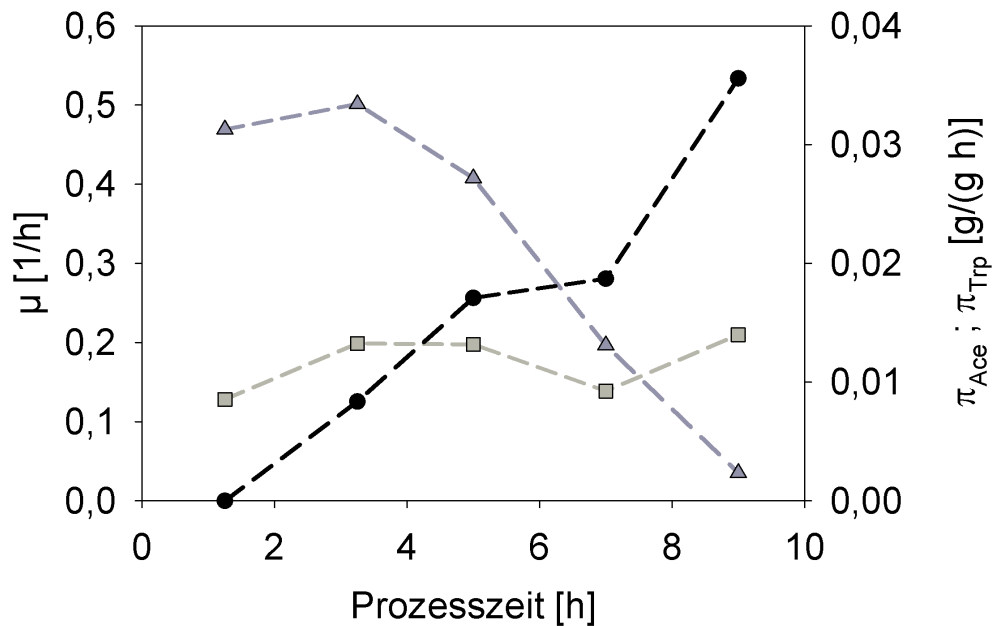


Abbildung 37: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 2 im 200 ml Parallelreaktor-system

Für das Ammoniumfütterungsszenario 3 wurden $9,19 \pm 0,19$ g/l Biomasse, $1,09 \pm 0,007$ g/l Acetat und $1,356 \pm 0,035$ g/l L-Tryptophan zum Prozessende bestimmt (siehe Abbildung 38). Die L-Tryptophan Gesamtausbeute bezogen auf Glukose lag bei 0,063 g/g. Zum Prozessende wurden trotz des erhöhten Phosphatgehalts im Medium Restkonzentrationen von 0,15 g/l Phosphat gemessen. Die spezifische Phosphataufnahmerate war daher deutlich erhöht. Ein zusätzlicher Einfluss einer Phosphatlimitierung gegen Prozessende konnte nicht ausgeschlossen werden.

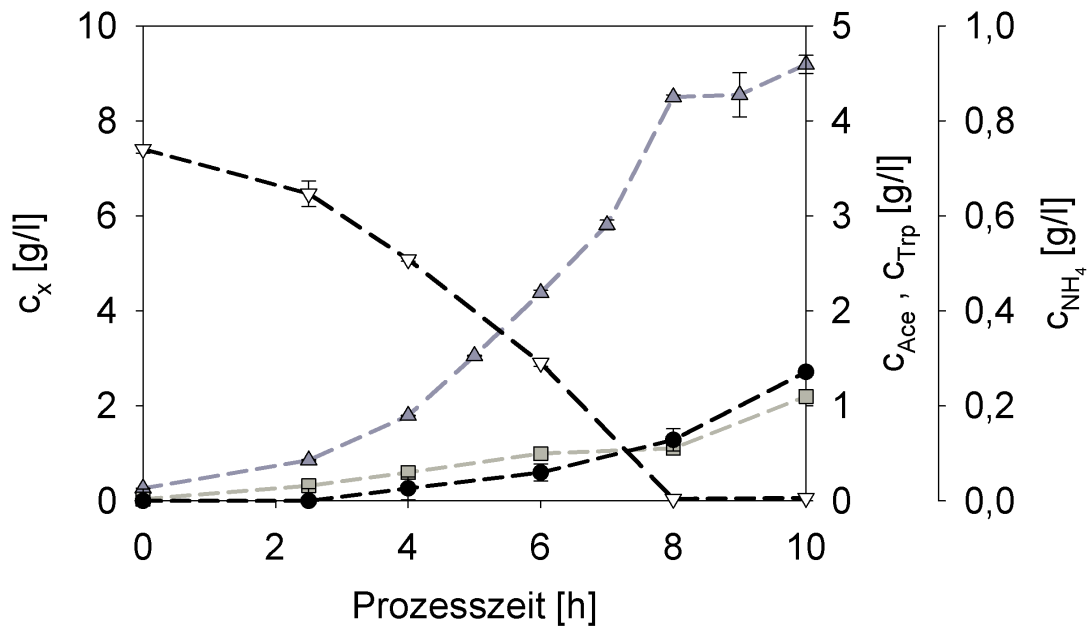


Abbildung 38: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 3 im 200 ml Parallelreaktorsystem

Die spezifische Wachstumsrate reduzierte sich im Prozessverlauf von 0,495 auf 0,068 1/h. Die maximale L-Tryptophanbildungsrate 0,045 g/(g h) wurde nach 9 h erreicht (siehe Abbildung 39). In der Flüssigphase konnten nur 22,4 % des eingesetzten Kohlenstoffs durch Produkt- und Gesamtkohlenstoffanalyse wiedergefunden werden. Die verbleibenden 77,6 % wurden der Kohlendioxidemission zugeordnet.

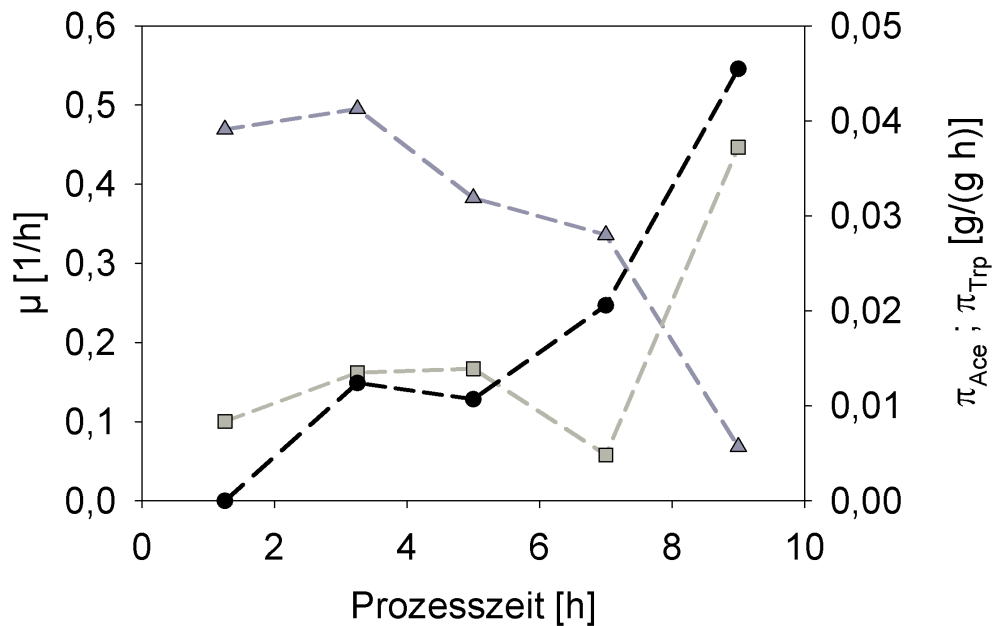


Abbildung 39: Spezifische Wachstumsraten (Dreieck) sowie die L-Tryptophanbildungsraten (Kreis) und Acetatbildungsraten (Quadrat) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit Ammoniumfütterungsszenario 3 im 200 ml Parallelreaktorsystem

Schwefellimitierung Prozesse mit dem schwefelreduzierten Medium (siehe Tabelle 16) erreichten nach 10 h Laufzeit Konzentrationen von $7,72 \pm 0,23$ g/l Biomasse, $0,2 \pm 0,011$ g/l Acetat und $1,09 \pm 0,07$ g/l L-Tryptophan (siehe Abbildung 40). Die Gesamtausbeute von Tryptophan bezogen auf Glukose betrug 0,038 g/g. Zum Prozessende wurde eine Glukosekonzentration von 0,09 g/l bestimmt, wodurch eine Kohlenstofflimitierung gegeben war.

Die erreichte Biomasse lag um zwei Größenordnungen über der auf Basis des theoretischen Schwefelgehalts errechneten Biomasse (nach [Norland et al., 1995]). Daher war von einer signifikanten Kontamination durch Schwefel auszugehen. Aufgrund der fehlenden Relevanz für eine Produktion wurde der Ansatz nicht weiterverfolgt.

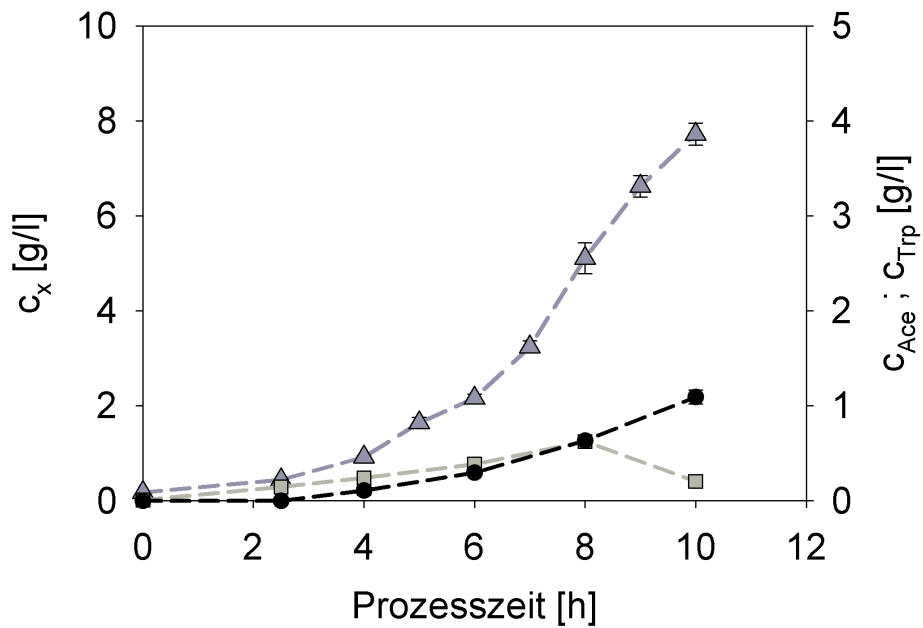


Abbildung 40: L-Tryptophan- (Kreis), Acetat- (Quadrat), und Biomassetiter (Dreieck) über den Zeitverlauf der Kultivierung mit reduziertem Schwefelgehalt im 200 ml Parallelreaktorsystem

3.2.7 Glukoseaufnahme unter Phosphat- und Stickstofflimitierung

Für Fermentationen des Tryptophanproduzenten mit Phosphatlimitierung konnte eine Teilentkopplung der Glukoseaufnahme vom Wachstum beobachtet werden. Für *E. coli* K12 W3110 wurden unter Phosphatlimitierung qualitativ ähnliche Phänomene beobachtet (siehe Abbildung 41).

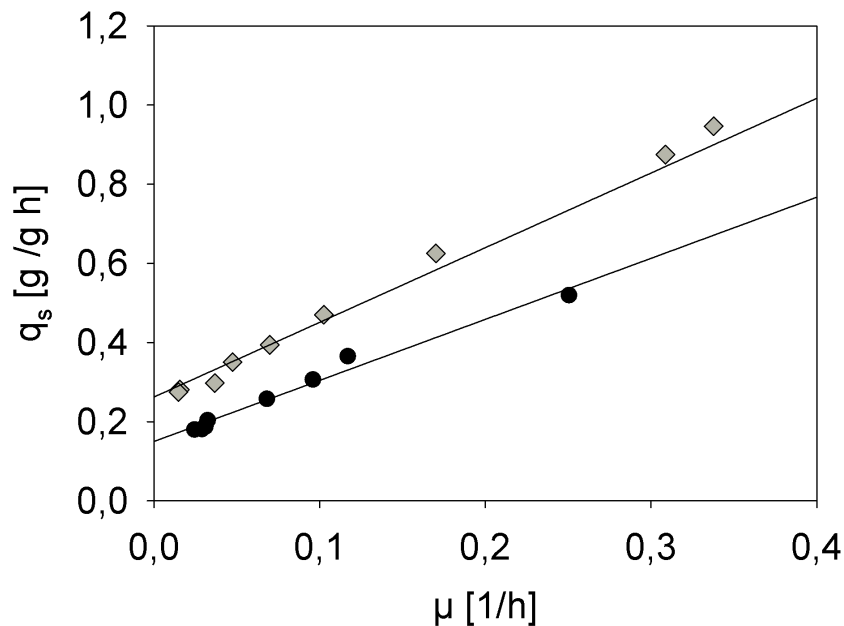


Abbildung 41: Spezifische Glukoseaufnahme über der spezifischen Wachstumsrate von *E. coli* K12 JP6015/pMU91 (Raute) und *E. coli* K12 W3110 (Kreis) für Fermentationen mit Phosphatfütterungsszenario 2. Die durchgezogenen Linien markieren eine lineare Regression der Verläufe

Auf Basis des linearen Zusammenhangs von Glukoseaufnahme und Wachstum kann der Verlauf durch die bekannte Pirt-Gleichung $qs = \frac{\mu}{Y_{xs}} + k$ beschrieben werden. Dabei steht Y_{xs} für die wachstumsgekoppelte und k für die wachstumsunabhängige Glukoseaufnahme. Aufgrund der Produkt- und Nebenproduktbildung beschreibt k nicht ausschließlich den Erhaltungsstoffwechsel. Eine lineare Parameterregression angewendet auf die Experimentaldaten ergab für *E. coli* K12 JP6015/pMU91: $k = 0,247 \pm 0,007$, $Y_{xs} = 0,481 \pm 0,007$ und für *E. coli* K12 W3110 $k = 0,169 \pm 0,018$, $Y_{xs} = 0,64 \pm 0,045$.

Für die unter Stickstofflimitierung durchgeführten Versuche mit *E. coli* K12 JP6015/pMU91 im 200 ml Maßstab ergab sich für alle durchgeführten Experimente eine noch deutlichere Entkopplung der Glukoseaufnahme vom Wachstum (siehe Abbildung 42).

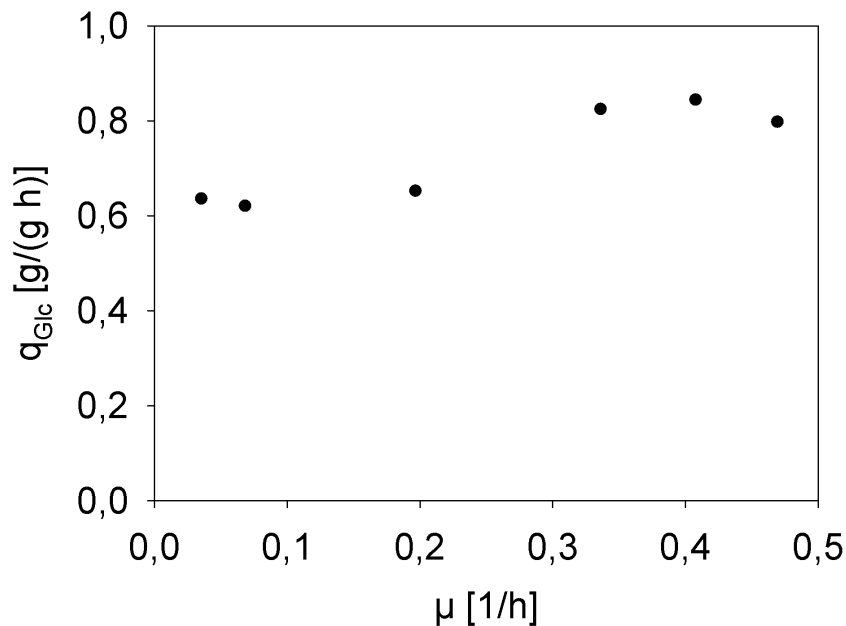


Abbildung 42: Kombinierte spezifische Glukoseaufnahmeraten über den spezifischen Wachstumsraten von *E. coli* K12 JP6015/pMU91 für Fed-Batch-Fermentationen mit Stickstofflimitierung im 200 ml Reaktorsystem

Der Verlauf der Zuckeraufnahme im Verhältnis zum Wachstum war nicht durch lineare Regression beschreibbar. Bei spezifischen Wachstumsraten von 0,034 1/h wurden spezifische Glukoseaufnahmeraten von 0,64 g/g h bestimmt. In diesem Zusammenhang muss aufgrund der niedrigen Phosphatkonzentrationen zum Prozessende der mögliche zusätzliche Einfluss einer Phosphatlimitierung erwähnt werden.

3.3 Transkriptomanalysen

Genexpressionsanalysen über Zeitreihen von Microarray-Daten wurden für zwei Prozessstrategien unter Phosphatlimitierung durchgeführt. Um die transkriptionale Regulationsantwort auf die Phosphatlimitierung zu verfolgen, wurden zu fünf Zeitpunkten des Referenzprozessszenarios Transkriptomproben entnommen und ausgewertet. Die Zeitpunkte wurden anhand der Prozessdynamik der extrazellulär messbaren Produkte, Nebenprodukte und Biomasse ausgewählt. Zur späteren

Normierung wurde ein Zeitpunkt nach 2,5 Stunden in der Phase des unlimitierten Wachstums festgelegt. Weitere Zeitpunkte nach 6 und 11 Stunden dienten der Erfassung der Übergangsphase, darauf folgten Zeitpunkte nach 24 und 32 Stunden (Prozessende) zur Erfassung der stationären Phase und Absterbephase. Zur Ermittlung der differentiellen Genexpression wurden alle Zeitpunkte auf den ersten Zeitpunkt (2,5 h) normalisiert.

Insgesamt zeigten 1674 Transkripte eine mehr als zweifache Veränderung im Prozessverlauf. Transkripte von Genen, die der Phosphatantwort zugeordnet werden, zeigten bereits eine deutliche Hochregulierung in unter 11 Stunden Prozesslaufzeit. Das gesamte *pho*-Regulon (*phoABEHRU*) sowie Transkripte des hochaffinen Phosphataufnahmesystems PST (*pstABCS*) zeigten bereits nach 6 Stunden signifikante Veränderungen. Im Falle des PST-Systems wurden mehr als fünffache Veränderungen beobachtet (*pstC* 17,3-fach), für Gene des *pho*-Regulons war die Expression bereits zu diesem Zeitpunkt bis zu 91-fach erhöht (*phoE*). Das Transkript der alkalinen Phosphatase *phoA* zeigte eine 59-fache Hochregulierung. Ebenfalls aktiviert wurden Transkripte des Phosphonatoperons (*phnBCDEFGHIJLMNOP*), das in *E. coli* K12 Stämmen unter Kontrolle der Phosphatantwort steht [Wanner and Boline, 1990]. Ebenfalls in Verbindung mit der Phosphatantwort stand die Hochregulierung des Glycerin-3-Phosphattransporters Ugp (*ugpABCEQ*).

Aufgrund der schnellen Phosphatantwort wurde eine veränderte Prozessstrategie mit verlängerter Übergangsphase in die Phosphatlimitierung eingesetzt (siehe 2.2.5), zusätzlich wurde die Probenahmefrequenz für Transkriptomproben erhöht. Der Normierungszeitpunkt wurde zur besseren Vergleichbarkeit identisch zum Referenzprozess auf 2,5 Stunden Prozesszeit gesetzt. Die folgenden Zeitpunkte der Transkriptomprobenahme waren 4, 6, 8, 11, 17, 22, 25, 28 und 32 Stunden. Für den modifizierten Prozess zeigten 1512 Transkripte eine differentielle Expression. Die Dynamik war durch den verlängerten Übergang im Vergleich zum Referenzprozess abgeschwächt, qualitativ gab es bei verbesserter zeitlicher Auflösung eine weitreichende Übereinstimmung mit der Übergangsphase in die Phosphatlimitierung des Referenzprozesses. Insgesamt wurden 1069 Transkripte in beiden Prozessen mit identischer Tendenz differentiell exprimiert. Insgesamt waren 605 (36,2 %) Gene ausschließlich im Referenzprozess, im modifizierten Prozesses 449 (29,6 %) differentiell exprimiert. Die vollständige Liste differentiell exprimierter Gene inklusive aller durchgeführten Analysen ist im Anhang beigefügt.

3.3.1 *Clustering*-Analyse

Um Transkripte nach ihrer Zeitreihencharakteristik zu gruppieren, wurde ein *K-means Clustering*-Ansatz angewendet (siehe 2.2.12). Ziel des Vorgehens war es hierbei, Transkripte zu identifizieren, die zeitgleich zur Aktivierung der Phosphatantwort eine Reaktion zeigten. Dadurch sollten Hinweise auf mögliche regulatorische Vernetzungen des *pho*-Regulons mit weiteren relevanten Stoffwechselwegen dargestellt werden. Der *Clustering*-Ansatz wurde auf den hochauflösenden Datensatz des modifizierten Prozesses mit konstanter Phosphatfütterung angewendet. Dabei wurden ausschließlich Transkripte gruppiert, die sowohl im Referenzprozess als auch im modifizierten Prozess zu mindestens einem Zeitpunkt eine mehr als zweifach differentielle Expression zeigten (1069 Transkripte). Die anhand von Vorversuchen mit verschiedenen *Cluster*-Anzahlen ausgewählte *Cluster*-Anzahl von 8 sollte dabei möglichst ohne Redundanz die Charakteristik aller Transkriptgruppierungen darstellen. Im Folgenden werden aufgrund der großen Anzahl nur eine Auswahl an Transkripten beschrieben.

Transkripte mit zeitlicher Korrelation zur Phosphatantwort Transkripte die zeitgleich mit dem *pho*-Regulon eine Veränderung zeigten, wurden den *Clustern* 6 und 1 (Hochregulierung, Gruppe A), sowie den *Clustern* 5 und 2 (Herunterregulierung, Gruppe B) zugeordnet. Insgesamt zeigten 318 Transkripte eine zeitliche Korrelation mit der Phosphatantwort. Die übrigen 751 Transkripte zeigten keine zeitliche Korrelation mit der Phosphatantwort (Gruppe C). Die Gruppierung und durchschnittliche Charakteristik (dimensionslos, visualisiert durch Genedata Analyst 7.0) der *Cluster* über den Zeitverlauf ist in Abbildung 43 dargestellt.

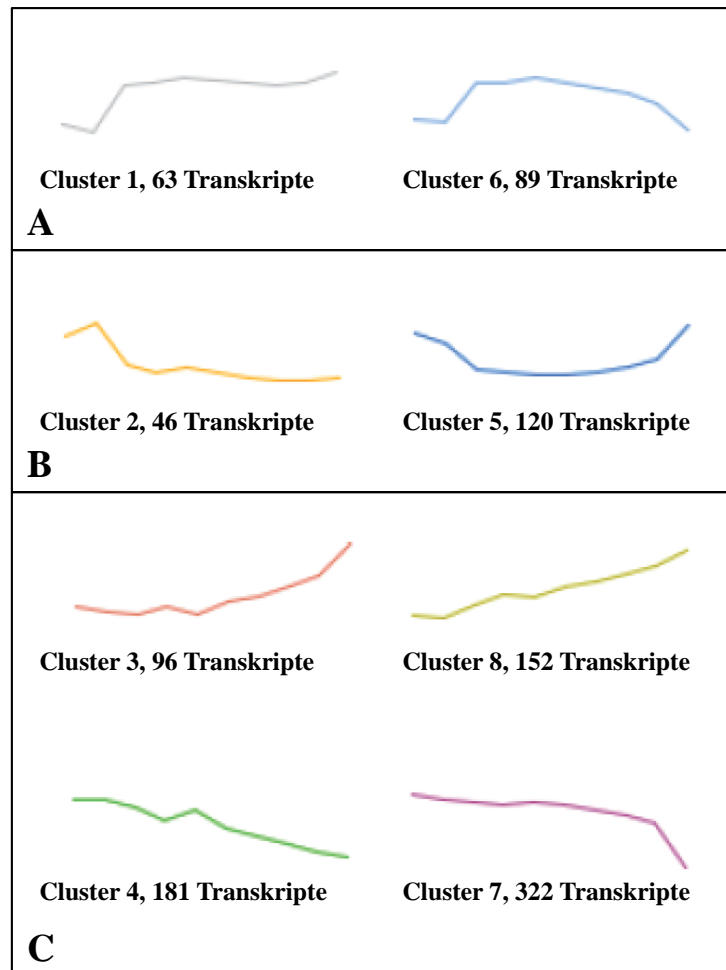


Abbildung 43: Dimensionslose Charakteristik und Gruppierung der *Cluster* nach zeitlicher Korrelation mit der Phosphatantwort

Cluster 6 Transkripte des *pho*-Regulons wurden *Cluster 6* (89 Transkripte) zugeordnet. Transkripte dieses *Clusters* zeigten eine deutliche Hochregulierung zu Beginn der Übergangsphase in die Phosphatlimitierung (6 h Prozesszeit). Die erhöhte Expression wurde bis 28 h Prozesszeit mit leicht nachlassender Tendenz aufrechterhalten, zum Prozessende hin zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung.

Neben dem *pho*-Operon (*phoABEHRU*) wurden in *Cluster 6* andere der Phosphatantwort zugehörige Gene gruppiert. Diese umfassten das AMP-Nucleosidasegen *amn* [Zhang et al., 2004], das Phosphataseaktivatorgen *appY* [Atlung et al.,

1997] sowie Transkripte des hochaffinen Phosphataufnahmsystems (*pstABC*), des Glycerinphosphattransporters (*ugpABCEQ*), des Phosphonat-Katabolismus (*phnEF- GHIJKLMN*OP), der Metallionenstressantwort (*yibD*) [Baek and Lee, 2006] und die unter Phosphatlimitierung induzierten Gene *psiEF* [Kim et al., 2000].

Darüber hinaus Transkripte der Säure-Stressantwort (*adiY*, *gadABC*, *hcaABC**CD*, *hdeAB*, *slp*), der osmotischen Stressantwort (*otsA*, *osmEF*), verschiedener Stressantwort-Systeme und der Biofilmbildung (*uspAB*, *glmY*, *pgaD*). Weiterhin die Fumaratreduktasegene *frdABCD*, Gene des Phenylpropionatabbauwegs (*hcaBCDEF*), der Glycerin 3-Phosphat-Dehydrogenase (*glpD*) und der Polymyxin-Sensitivität (*arnEF*).

Tabelle 24: *Cluster 6* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Phosphatlimitierung	<i>phoABEHRU</i>
	<i>amn</i>
	<i>appY</i>
	<i>pstABC</i>
	<i>ugpABCEQ</i>
	<i>phnEFGHIJKLMNOP</i>
	<i>yibD</i>
	<i>psiEF</i>
Säurestress	<i>adiY</i>
	<i>gadABC</i>
	<i>hcaABCD</i>
	<i>hdeAB</i>
	<i>slp</i>
Osmotischer Stress	<i>otsA</i>
	<i>osmEF</i>
Universelle Stressreaktion	<i>uspAB</i>
	<i>glmY</i>
Biofilmbildung	<i>pgaD</i>
Fumaratreduktase	<i>frdABCD</i>
Phenylpropionatabbau	<i>hcaBCDEF</i>
Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	<i>glpD</i>
Polymyxinresistenz	<i>arnEF</i>

Cluster 1 *Cluster 1* (63 Transkripte) zeigte im frühen Prozessverlauf eine ähnliche Charakteristik wie *Cluster 6*. Zu Beginn der Übergangsphase in die Phosphatlimitierung kam es zu einem deutlichen Signalanstieg, dessen Niveau mit leicht nachlassender Tendenz bis 28 h Prozesszeit aufrechterhalten wurde. Zum Prozessende hin kam es im Gegensatz zu *Cluster 6* zu einem leichten Anstieg des Signals.

Auch *Cluster 1* wurden Transkripte unter Kontrolle der Phosphatantwort zugeordnet (*pepN*, *phnD*), zusätzlich Transkripte der Säureregulation (*adiC*, *ariR*, *asr*, *dctR*, *gadE*, *hchA*, *hdeB*, *hyaAB*), der Stressantwort auf osmotische Verän-

derungen (*osmC*, *otsB*, *treA*) und der Biofilmbildung (*bssR*). Zusätzlich wurden diesem *Cluster* verschiedene Stressindikatoren (*dps*, *rpoH*, *uspCG*) zugeordnet.

Tabelle 25: *Cluster* 1 zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Phosphatlimitierung	<i>pepN</i>
	<i>phnD</i>
Säureregulation	<i>adiC</i>
	<i>ariR</i>
	<i>asr</i>
	<i>dctR</i>
	<i>gadE</i>
	<i>hchA</i>
	<i>hdeB</i>
	<i>hyaAB</i>
Osmotischer Stress	<i>osmC</i>
	<i>otsB</i>
	<i>treA</i>
Universelle Stressreaktion	<i>dps</i>
	<i>rpoH</i>
	<i>uspCG</i>
Biofilmbildung	<i>bssR</i>

Cluster 2 *Cluster* 2 (46 Transkripte) zeigte eine annähernd gegenläufige Charakteristik zu *Cluster* 1. Beim Eintritt in die Übergangsphase der Phosphatlimitierung kam es zu einer deutlichen Signalabnahme, das Signalniveau wurde bis zum Prozessende niedrig gehalten.

Diesem *Cluster* wurden Gene des Eisenstoffwechsels (*bfd*, *efeBOU*, *exbD*, *fecA-DEI*, *feoAB*, *fepB*, *fhuAF*), der Flagellensynthese und Chemotaxis (*flgE*, *flhB*, *fliEF*, *motA*) und des Schwefelmetabolismus (*cysCNW*) zugeordnet.

Tabelle 26: *Cluster 2* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Eisenstoffwechsel	<i>bfd</i>
	<i>efeBOU</i>
	<i>exbD</i>
	<i>fecADEI</i>
	<i>feoAB</i>
	<i>fepB</i>
	<i>fhuAF</i>
Flagellensynthese	<i>flgE</i>
Chemotaxis	<i>flhB</i>
	<i>fliEF</i>
	<i>motA</i>
Schwefelmetabolismus	<i>cysCNW</i>

Cluster 5 *Cluster 5* (118 Transkripte) zeigte eine annähernd gegenläufige Charakteristik zu *Cluster 6*. Nach einer Signalreduktion beim Eintritt in die Phosphatlimitierung und einem niedrigen Signalniveau bis 28 h Prozesszeit kam es zum Prozessende hin zu einem Signalanstieg, womit annähernd das Anfangsniveau der Signalintensität erreicht wurde.

Diesem *Cluster* wurde eine große Gruppe an Transkripten des Aminosäuremetabolismus und Transports (*argABCDEFGH*, *aroFL*, *asnB*, *cysMU*, *gcvH*, *glnAL*, *hisQ*, *ilvB*, *lysACP*, *metL*, *pheST*, *proV*, *thrBC*, *tyrAP*) zugeordnet. Weiterhin Transkripte der Flagellensynthese und Chemotaxis (*flgABCDEFGHIJKL*, *fliADGHIJKLMNOQSTZ*, *motb*, *tap*, *tar*, *tsr*) sowie der Biotinsynthese (*bioABF*). Abschließend Gene die für ribosomale Einheiten codieren oder für eine Modifikation der Ribosomen verantwortlich sind (*rlhE*, *rimO*, *rplAFOVW*, *rpmD*, *rpsHOS*, *rumB*), diverse Transporter (*ampG*, *cusA*, *dctA*, *fadL*, *fecB*, *kup*, *mtlAD*, *uraA*) und Gene der Succinat-Dehydrogenase (*sdhAB*).

Tabelle 27: *Cluster 5* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Aminosäurestoffwechsel	<i>argABCDEFGH</i>
Aminosäuretransport	<i>aroFL</i>
	<i>asnB</i>
	<i>cysMU</i>
	<i>gcvH</i>
	<i>glnAL</i>
	<i>hisQ</i>
	<i>ilvB</i>
	<i>lysACP</i>
	<i>metL</i>
	<i>pheST</i>
	<i>proV</i>
	<i>thrBC</i>
	<i>tyrAP</i>
Flagellensynthese	<i>flgABCDEFGHIJKL</i>
Chemotaxis	<i>fliADGHIJKLMNOQSTZ</i>
	<i>motB</i>
	<i>tap</i>
	<i>tar</i>
	<i>tsr</i>
Biotinsynthese	<i>bioABF</i>
Ribosom	<i>rlhE</i>
	<i>rimO</i>
	<i>rplAFOVW</i>
	<i>rpmD</i>
	<i>rpsHOS</i>
	<i>rumB</i>
Transport	<i>ampG</i>
	<i>cusA</i>
	<i>dctA</i>
	<i>fadL</i>
	<i>fecB</i>
	<i>kup</i>

Tabelle 28: *Cluster 5* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion (2)

Funktion	Gen
Transport	<i>mtlAD</i>
	<i>uraA</i>
Succinat-Dehydrogenase	<i>sdhAB</i>

Transkripte ohne zeitliche Korrelation zur Phosphatantwort Die übrigen 751, die den *Clustern* 3, 4, 7 und 8 zugeordnet wurden zeigten keine zeitgleiche Veränderung mit dem Beginn der Phosphatlimitierung. Transkripte der *Cluster* 3 und 8 zeigten über den Prozessverlauf ein ansteigendes Signal, während Transkripte der *Cluster* 4 und 7 eine kontinuierlich abnehmende Tendenz zeigten (siehe Abbildung 43).

Cluster 3 Die Signalintensität der Transkripte in *Cluster* 3 (96 Transkripte) blieb bis 17 h Prozesszeit auf Anfangsniveau, gefolgt von einem bis Prozessende andauernden Anstieg.

Transkripte verschiedener Transporter und der Proteinsekretion (*afuC*, *adpZ*, *araE*, *ccmC*, *celCD*, *cmtA*, *dcmD*, *ddpD*, *dtpA*, *focB*, *glpT*, *gntV*, *gspEG*, *hofQ*, *kdgT*, *mfdL*, *mglAC*, *nepI*, *pitB*, *potE*, *setB*, *ssnB*, *umpT*, *xapB*), des Fimbrialmetabolismus (*sfmD*) sowie Gene der Hitzeschockantwort, Proteinfehlfaltungsstress, Multi-Resistenz und der Regulation der stationären Phase (*djlBC*, *elfC*, *htrE*, *ibpAB*, *pphA*) wurden diesem *Cluster* zugeordnet.

Tabelle 29: *Cluster 3* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Transport	<i>afuC</i>
Proteinsekretion	<i>adpZ</i>
	<i>araE</i>
	<i>ccmC</i>
	<i>celCD</i>
	<i>cmtA</i>
	<i>dcmD</i>
	<i>ddpD</i>
	<i>dtpA</i>
	<i>focB</i>
	<i>glpT</i>
	<i>gntV</i>
	<i>gspEG</i>
	<i>hofQ</i>
	<i>kdgT</i>
	<i>mfdL</i>
	<i>mglAC</i>
	<i>nepI</i>
	<i>pitB</i>
	<i>potE</i>
	<i>setB</i>
	<i>ssnB</i>
	<i>umpT</i>
	<i>xapB</i>
Fimbrialstoffwechsel	<i>sfmD</i>
Hitzeschock	<i>ibpAB</i>
Proteinfaltung	<i>djlB</i>
	<i>pphA</i>
Multiresistenz	<i>elfC</i>
	<i>htrE</i>

Cluster 8 Die Signalintensität für Transkripte aus *Cluster 8* (152 Transkripte) nahm von Prozessbeginn bis zum Prozessende kontinuierlich zu.

In diesem *Cluster* wurden ebenfalls Transkripte verschiedener Transporter und der Proteinsekretion (*abgT*, *acrDEF*, *alsCEK*, *citT*, *dgoT*, *eamB*, *emrKY*, *fepE*, *frwBC*, *gspADJKMO*, *leuE*, *mdtG*, *narK*, *ompGLN*, *tatE*, *wzxC*, *xylF*, *znuAC*), des Fimbrialmetabolismus (*fimEZ*), sowie Gene der allgemeinen Stressantwort, Proteinfehlfaltungsstress, Multi-Resistenz und der Regulation der stationären Phase (*cpXP*, *cspI*, *iraD*, *marABR*, *osmB*, *smfC*, *spy*, *raiA*, *rybB*, *ssnA*) gruppiert.

Tabelle 30: *Cluster 8* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Transport	<i>abgT</i>
	<i>acrDEF</i>
	<i>alsCEK</i>
	<i>citT</i>
	<i>dgoT</i>
	<i>eamB</i>
	<i>emrKY</i>
	<i>fepE</i>
	<i>frwBC</i>
	<i>leuE</i>
	<i>mdtG</i>
	<i>narK</i>
	<i>ompGLN</i>
	<i>wxC</i>
	<i>xylF</i>
<i>znuAC</i>	
Proteinsekretion	<i>gspADJKMO</i>
Proteintransport	<i>tatE</i>
Fimbrialmetabolismus	<i>fimEZ</i>
Resistenz	<i>cpXP</i>
	<i>marABR</i>
Kälteschock	<i>cspI</i>
Stationäre Phase	<i>iraD</i>
	<i>raiA</i>
	<i>rybB</i>
	<i>ssnA</i>
Osmotischer Stress	<i>osmB</i>
Chaperon	<i>spy</i>

Cluster 4 *Cluster 4* (176 Transkripte) zeigte mit Ausnahme eines kurzen Anstiegs nach 17 h Prozesszeit von Prozessbeginn an eine kontinuierlich abnehmende Charakteristik. Diesem *Cluster* wurden Gene der Aminosäuresynthese

se (*dapB*, *gltBD*, *hisMP*, *ilvADEGHIM*, *leuABC*, *livFGHJKM*, *metABCEFHIJKNR*, *proCWX*, *thrA*, *tyrB*), des Mureinmetabolismus (*mtdD*, *murACDE*), der Nukleotidsynthese (*purEFKLMPRT*, *pyrDG*, *pntAB*), des Energiemetabolismus und der Atmungskette (*cyoD*, *nuoBFGHIJKLMN*, *sdhAD*) sowie diverser Transporter und des Zuckerstoffwechsels (*arnT*, *codB*, *cusB*, *dppBDF*, *gatABC*, *glpFK*, *lamB*, *ompF*, *potBC*, *ptsG*, *rbsB*, *sapA*) zugeordnet.

Tabelle 31: *Cluster 4* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Aminosäuresynthese	<i>dapB</i>
	<i>gltBD</i>
	<i>hisMP</i>
	<i>ilvADEGHIM</i>
	<i>leuABC</i>
	<i>livFGHJKM</i>
	<i>metABCEFHIJKNR</i>
	<i>proCWX</i>
	<i>thrA</i>
	<i>tyrB</i>
Mannitolstoffwechsel	<i>mtlD</i>
Mureinsynthese	<i>murACDE</i>
Nukleotidsynthese	<i>purEFKLM PRT</i>
	<i>pyrDG</i>
	<i>pntAB</i>
Atmungskette	<i>cyoD</i>
	<i>nuoBFGHIJKLMN</i>
Succinat-Dehydrogenase	<i>sdhAD</i>
Transport	<i>arnT</i>
	<i>codB</i>
	<i>cusB</i>
	<i>dppBDF</i>
	<i>gatABC</i>
	<i>glpFK</i>
	<i>lamB</i>
	<i>ompF</i>
	<i>potBC</i>
	<i>ptsG</i>
	<i>rbsB</i>
<i>sapA</i>	

Cluster 7 Die mit 322 Transkripten größte Gruppe wurde *Cluster 7* zugeordnet. Der *Cluster* zeigte über den gesamten Prozessverlauf eine leicht abnehmende Charakteristik, zum Prozessende kam es zu einer deutlichen Signalabnahme.

Gene des Aminosäuremetabolismus, der Proteinsynthese und ribosomaler Proteine (*alaS*, *ansA*, *argPT*, *aroABCGK*, *bamABC*, *carA*, *dapDF*, *glnHPQ*, *glyAQ*, *metGQ*, *lysS*, *metG*, *miaB*, *proAB*, *rplBIPQST*, *rpmACF*, *rpsBCIJNRT*, *rsgA*, *trmB*, *tyrS*, *valS*), des Energiestoffwechsels und der Atmungskette (*atpABCDEFGH*, *cyoABCE*, *nuoACE*), des Nukleotidmetabolismus, der Nicotinamidadenindinukleotid, deprotoniert (NAD⁺)- und Acetyl- und Malonyl-CoA-Synthese (*accACD*, *coaAE*, *gpt*, *guaAB*, *nadC*, *purACDHNU*, *pyrCF*, *udp*, *upp*), der Pyridoxal-synthese (*pdxAJ*), der Peptidoglykan und Mureinsynthese (*lpp*, *mepA*, *mtlBC*, *mreB*, *murF*), des Fettsäuremetabolismus, der Lipidsynthese und Modifikation (*arnABCD*, *fabDFGHRZ*, *lpxABD*, *plsX*), der Zellteilung, DNA-Modifikation und Replikation (*dam*, *damX*, *dnaANTX*, *gyrA*, *holA*, *nfi*, *polA*, *zipA*) sowie Regulatortorgene (*arcA*, *asnC*, *crp*, *fis*, *fruR*, *lrp*, *nagC*, *spoT*, *tas*) wurden in diesen *Cluster* gruppiert.

Tabelle 32: *Cluster 7* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion

Funktion	Gen
Aminosäuretransport	<i>argPT</i> <i>glnHPQS</i>
Aminosäuresynthese	<i>aroABCGK</i> <i>dapDF</i> <i>glyAQ</i> <i>proAB</i>
Asparaginase	<i>ansA</i>
Proteinsynthese	<i>alaS</i> <i>metG</i> <i>miaB</i> <i>trmB</i> <i>tyrS</i> <i>valS</i>
Energiestoffwechsel	<i>atpABCDEFGH</i>
Atmungskette	<i>cyoABCE</i> <i>nuoACE</i>
Ribosom	<i>rplBIPQST</i> <i>rpmACF</i> <i>rpsBCIJNRT</i> <i>rsgA</i>
Membranproteinsynthese	<i>bamABC</i>
Carbamoylphosphat-Synthase	<i>carA</i>
Nukleotidabbau	<i>gpt</i> <i>udp</i> <i>upp</i>
Nukleotidsynthese	<i>guaAB</i> <i>purACDHNU</i> <i>pyrCF</i>
NAD ⁺ -Synthese	<i>nadC</i>
Acetyl-Coenzym A-Synthese	<i>accACD</i>
Malonyl-Coenzym A-Synthese	<i>coaAE</i>
Pyridoxalsynthese	<i>pdxAJ</i>

Tabelle 33: *Cluster 7* zugeordnete Gene, sortiert nach ihrer Funktion (2)

Funktion	Gen
Peptidoglykan und Mureinsynthese	<i>lpp</i>
	<i>mepA</i>
	<i>mtlBC</i>
	<i>mreB</i>
	<i>murF</i>
DNA-Modifikation	<i>dam</i>
DNA-Replikation	<i>damX</i>
	<i>dnaANTX</i>
	<i>gyrA</i>
	<i>hola</i>
	<i>nfi</i>
	<i>polA</i>
Zellteilung	<i>zipA</i>
Regulatoren	<i>arcA</i>
	<i>asnC</i>
	<i>crp</i>
	<i>fis</i>
	<i>fruR</i>
	<i>lrp</i>
	<i>nagC</i>
	<i>spoT</i>
<i>tas</i>	

3.4 Simulation

Im Rahmen des Projektes wurden Szenariensimulationen zur Erweiterung der Prozessbilanzierung sowie Analysen zur Ausbeuteoptimierung und zur Berechnung maximaler Ausbeuten unter Berücksichtigung bestimmter Schlüsselaktivitäten durchgeführt. Angewendet wurden stöchiometrische Betrachtungen mittels Elementarmodenanalyse sowie auf linearer Optimierung basierende Flussverteilungsanalysen (FBA). Das verwendete Modell basierte auf Arbeiten von Chassagnole et al. [Chassagnole et al., 2002] und Schmid et al. [Schmid et al., 2004],

sowie auf dem *E. coli* Ganzzellmodell in Insilico Discovery (Schmid, Mauch et al.). Stöchiometrische Modellmodifikationen zur Simulation verschiedener Szenarien wurden entweder aus experimentellen Daten, aus Literaturangaben zu für die effiziente L-Tryptophansynthese essentiellen Stoffwechselaktivitäten oder aus vorhergegangenen stöchiometrischen Analysen abgeleitet. Insbesondere Einflüsse auf die Biomassezusammensetzung, die ATP-Synthese und Regeneration von Reduktionsäquivalenten sowie Kohlenstoffrückführung über Phosphoenolpyruvat (über PpsA oder Pck) [Schuster et al., 1999] wurden berücksichtigt.

3.4.1 Flussverteilungsanalysen

Essentiell für die Szenariensimulation war die Auswahl einer geeigneten Zielfunktion und die Definition weiterer Randbedingungen. Für die Simulation von Prozessszenarien war zusätzlich die Auswahl geeigneter Prozessintervalle zur Ermittlung der als Randbedingung eingesetzten Austauschraten nötig. Für die stationäre Analyse wurden quasistationäre Zustände im Fed-Batch-Prozess identifiziert, die in ausreichender Näherung das Stationaritätskriterium erfüllten. Für die Optimierung der L-Tryptophansynthese wurden neben Flussverteilungsanalysen zusätzlich Elementarmoden auf Basis des stöchiometrischen Modells berechnet (siehe Abschnitt 3.4.2).

Prozessintervallsimulation: Entkopplungsszenarien Für Fermentationen mit *E. coli* K12 JP6015/pMU91 und W3110 mit konstanter Phosphatfütterung (Fütterungsszenario 3, siehe Abschnitt 3.2.4) konnten im Laufe des verlängerten Übergangs in die Phosphatlimitierung quasistationäre Zustände mit Intervallen von 2 bis 4 h Dauer bestimmt werden. Für grundlegende Aussagen zur Kohlenstoffverwertung und dem ATP-Stoffwechsel wurden für beide eingesetzten Stämme Intervalle nach 18 und 21 Stunden Prozesszeit untersucht. Für die Bewertung der Übereinstimmung des Simulationsergebnisses mit Prozessdaten wurden nicht als Randbedingung gesetzte Austauschraten (CO_2 und O_2 -Transfer) sowie die Ergebnisse der Optimierung (Zielfunktion: Wachstum) mit experimentellen Daten verglichen.

Grundlage der Szenariensimulation für Prozessintervalle war die Darstellung der Phosphatlimitierung und der Einfluss auf Wachstum, Glukoseaufnahme und Produktbildung. Als Zielfunktion für Prozessintervalle bis 26 h Laufzeit mit verblei-

bendem Wachstum wurde die Biomassebildung ausgewählt. Mit Hilfe der Veränderung des RNA-Gehaltes der Biomasse (basierend auf experimentellen Daten, siehe Abschnitt 2.2.13) konnten für *E. coli* K12 JP6015/pMU91 über experimentell bestimmte Phosphataufnahmeraten als Randbedingung realistische Wachstumsraten für quasistationäre Prozessintervalle simuliert werden. Lediglich für Phasen ohne Wachstum nach 26 h Prozesszeit (ungeeignete Zielfunktion) und in der hochdynamischen Prozessphase zwischen 6 und 12 h Laufzeit bei spezifischen Wachstumsraten zwischen 0,1 und 0,06 1/h konnten keine realistischen Szenarien simuliert werden (Abweichung zu Experimentaldaten größer als 10 %). Der Vergleich der simulierten und auf Basis experimenteller Daten ermittelten spezifischen Wachstumsraten ist in Abbildung 44 dargestellt, die zugrundeliegenden Raten sind im Anhang beigefügt (siehe Tabelle 54).

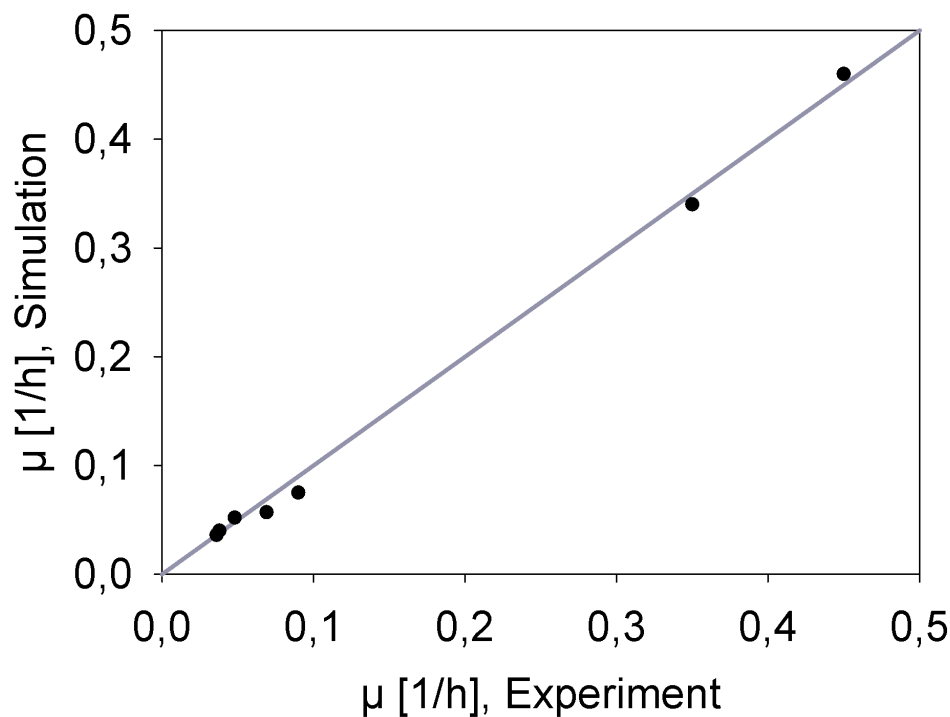


Abbildung 44: Vergleich der simulierten (FBA) und experimentell ermittelten spezifischen Wachstumsraten für eine Fermentation mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 mit Phosphatfütterungsszenario 3. Die Winkelhalbierende markiert die vollständige Übereinstimmung beider Werte

Mit Ausnahme der Prozessintervalle zwischen 8 und 12 h war die Abweichung der Simulation von experimentell bestimmten Daten kleiner als 10 % (3h , 2,4 %; 5 h, 2,8 %; 10 h, 24,7 %; 12 h, 17,7 %; 18 h, 5,5 %; 21 h, 9,3 %).

Unter Berücksichtigung der Glukose-, L-Tryptophan- und Acetataustauschraten als weitere Randbedingungen konnten realistische CO₂ Bildungsraten und damit der gesamte Kohlenstofffluss simuliert werden. Im Falle der Sauerstoffaufnahme wurde eine annähernd konstante Abweichung von 10 % für alle durchgeführten Simulationen zwischen den experimentell ermittelten und simulierten Sauerstoffaufnahmeleistungen festgestellt. Um diesen Umstand auszugleichen, wurde die Stöchiometrie der Cytochrom-Oxidase-Reaktion in der Atmungskette um einen konstanten Faktor verändert. Für Simulationen von Prozessszenarien für *E. coli* K12 W3110 wurde aufgrund der leicht unterschiedlichen Biomasseausbeute auf Phosphat zusätzlich die Anpassung des Biomasse-RNA-Gehalts um einen weiteren Faktor erweitert (siehe Anhang, Tabelle 52).

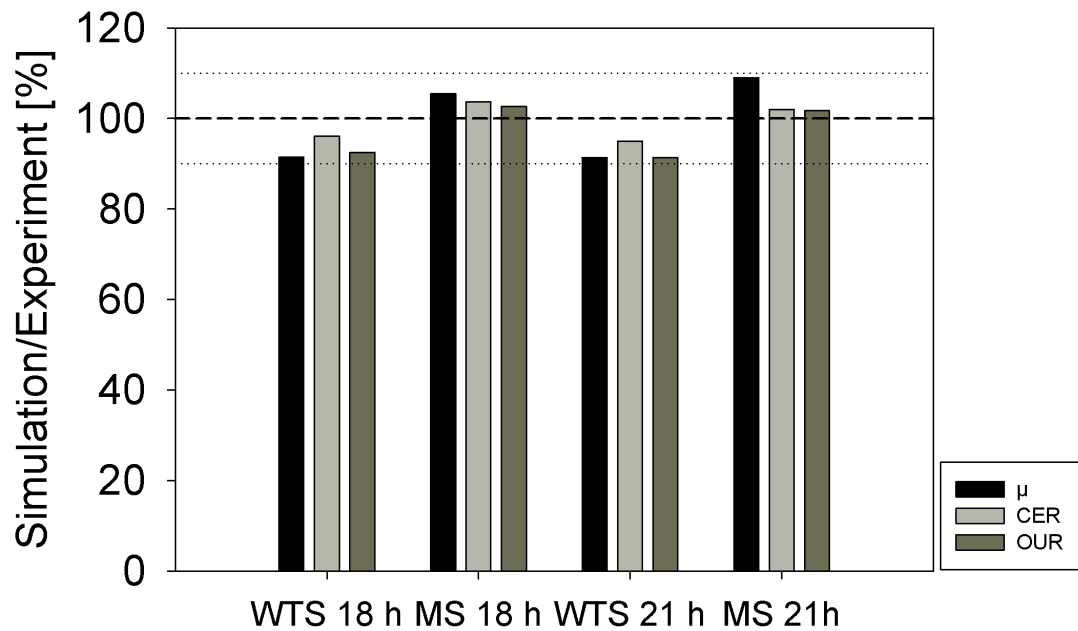


Abbildung 45: Verhältnis von simulierten (FBA) zu experimentell ermittelten Raten für Wachstum (μ), Sauerstoffaufnahme (OUR) und Kohlendioxidemission (CER) für eine Fermentation mit dem Modellstamm *E. coli* K12 JP6015 pMU91 (MS) und dem Wildtyp K12 W3110 (WT) für Prozessintervalle nach 18 und 21 h mit Phosphatfütterungsszenario 3. Die Werte von 90 und 110 % sind durch eine gepunktete Linie, 100 % durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet

In Anlehnung an die Energieladungsmessungen im Prozessverlauf und die simultan beobachteten hohen Glukoseaufnahme- und CO_2 -Emissionsraten wurde die Effizienz der ATP-Synthese im Rahmen der Prozessszenariensimulation untersucht. Für die im Referenzmodell gegebenen Verhältnisse von H^+ -Import zu ATP-Synthese (4 importierte H^+ Ionen pro ATP) ergab sich sowohl für den Wildtypstamm *E. coli* K12 W3110 und den L-Tryptophanproduzenten *E. coli* K12 JP6015 pMU91 in der späten Übergangsphase in die Phosphatlimitierung (18 - 26 h Prozesszeit) ein deutliches Ungleichgewicht in der ATP-Synthese, das in der Simulation zum Erreichen einer stationären Lösung in der zusätzlich eingeführten ATP-Senke ausgeglichen wurde. Bei einem P/O Verhältnis von 1,1 bei modifizierter Cytochrom-Oxidase-Stöchiometrie und 8 importierten H^+ -Ionen pro ATP wurden für das Prozessintervall nach 18 h für den Tryptophanproduzenten ein

ATP-Überschuss von 74 %, für den Wildtypstamm 81,5 % des gesamten ATP-Umsatzes ermittelt. In der Folge wurde die Stöchiometrie der ATP-Synthase so verändert, dass eine ausgeglichene ATP-Bilanz mit minimalem Anteil der zusätzlichen ATP-Senke erreicht werden konnte. Dabei zeigte sich, dass für Prozessszenarien im Verlauf der Übergangsphase (nach 16 h Prozesszeit) aufgrund der hohen Glukoseaufnahme bei gleichzeitig geringer Produktbildungsrate und geringem Wachstum der ATP-Bedarf vollständig durch die Substratkettenphosphorylierung gedeckt war. Für diese Szenarien waren stationäre Lösungen mit einer vollständig entkoppelten ATP-Synthase möglich (zur Beschreibung der Entkopplung, siehe Abschnitt 2.2.13). Eine auf Basis des Entkopplungsszenarios simulierte Flussverteilung eines Prozessintervalls nach 18 h Prozesszeit für den Tryptophanproduzenten und den Wildtypstamm ist in Abbildung 46 dargestellt.

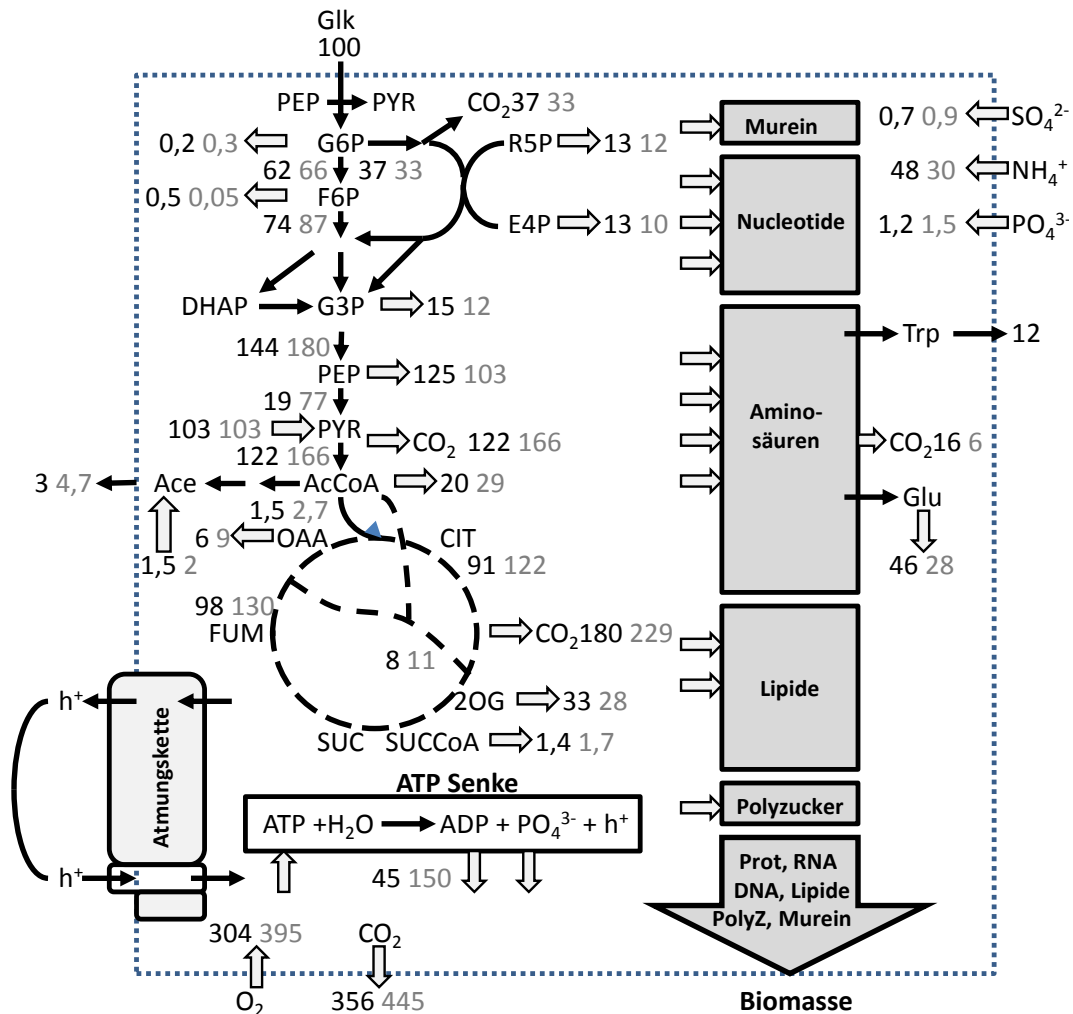


Abbildung 46: Schematische Modelldarstellung mit einer ermittelten Flussverteilung (FBA) für *E. coli* K12 JP6015 pMU91 (schwarz) und W3110 (grau) nach 18 h Prozesszeit einer Fermentation mit Phosphatfütterungsszenario 3 unter Berücksichtigung einer Ineffizienz der ATP-Synthese mit der Zielfunktion Biomassebildung und experimentell bestimmten Austauschraten für Phosphat, Acetat und L-Tryptophan normiert auf die Glukoseaufnahme als zusätzliche Randbedingungen. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist.

Optimierung der Produktbildung Neben der Simulation von Prozessszenarien wurden auch Studien zur Erfassung maximaler L-Tryptophanausbeuten

Weiterhin wurden maximale Ausbeuten unter Berücksichtigung des Entkopplungsszenarios mit entkoppelter ATP-Synthese und Veränderungen an der Cytochrom-Oxidase berechnet. Zielfunktion der Optimierung war der L-Tryptophan-export, als weitere Randbedingung wurde die Glukoseaufnahme angegeben. Die unter Berücksichtigung der Entkopplung ermittelte maximale Ausbeute betrug 0,25 mol/mol (0,29 g/g) L-Tryptophan bezogen auf Glukose. Die zugrundeliegende Flussverteilung ist in Abbildung 48 dargestellt.

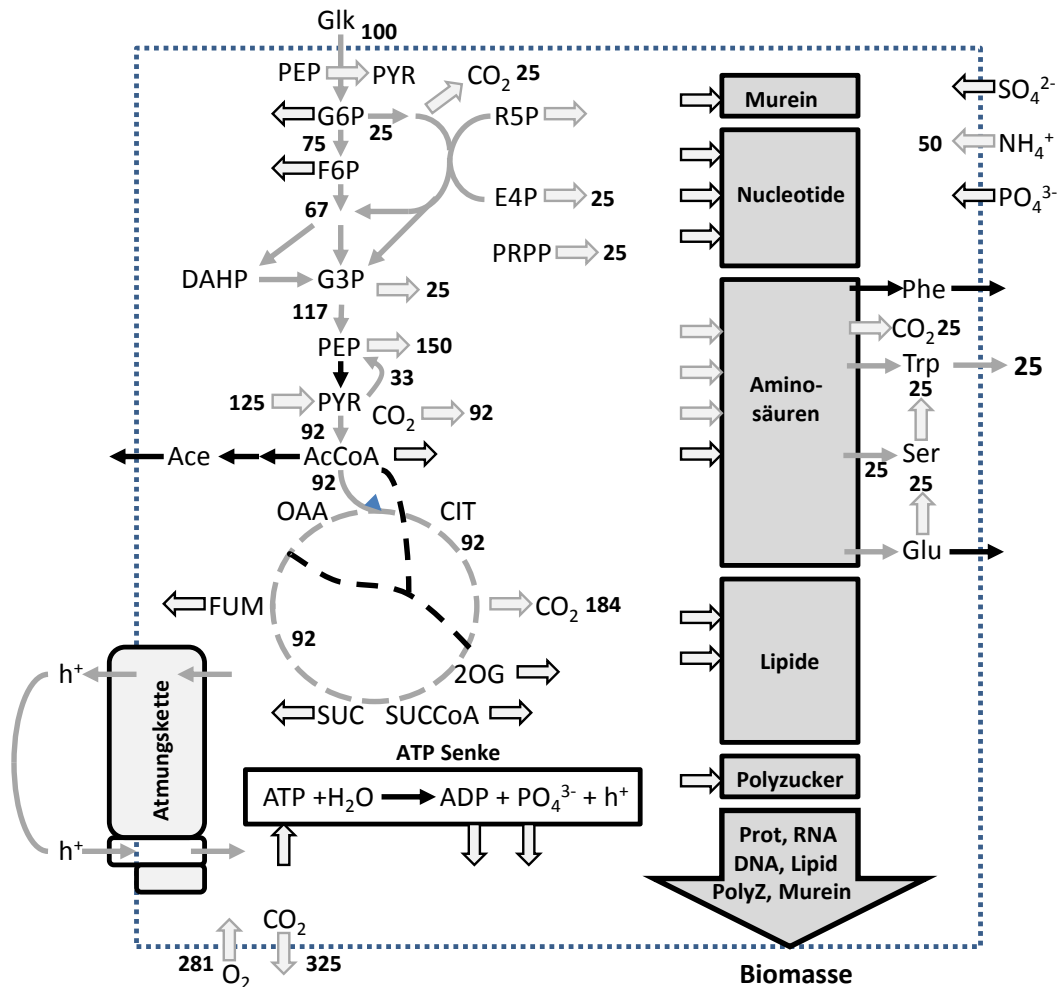


Abbildung 48: Schematische Modelldarstellung der ermittelten Flussverteilung (FBA) zum Erreichen maximaler L-Tryptophanausbeuten unter Berücksichtigung des Entkopplungsszenarios. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet

Über die Entkopplung der ATP-Synthase hinaus wurden Szenarien mit ATP-Synthese Ineffizienz und fehlender PpsA-Aktivität simuliert. Als Zielfunktion wurde der L-Tryptophanexport, als weitere Randbedingung wurde die Glukoseaufnahme gewählt. Die maximale L-Tryptophanausbeute bezogen auf Glukose betrug 0,1875 mol/mol (0,2175 g/g), die ermittelte Flussverteilung ist in Abbildung 49 dargestellt.

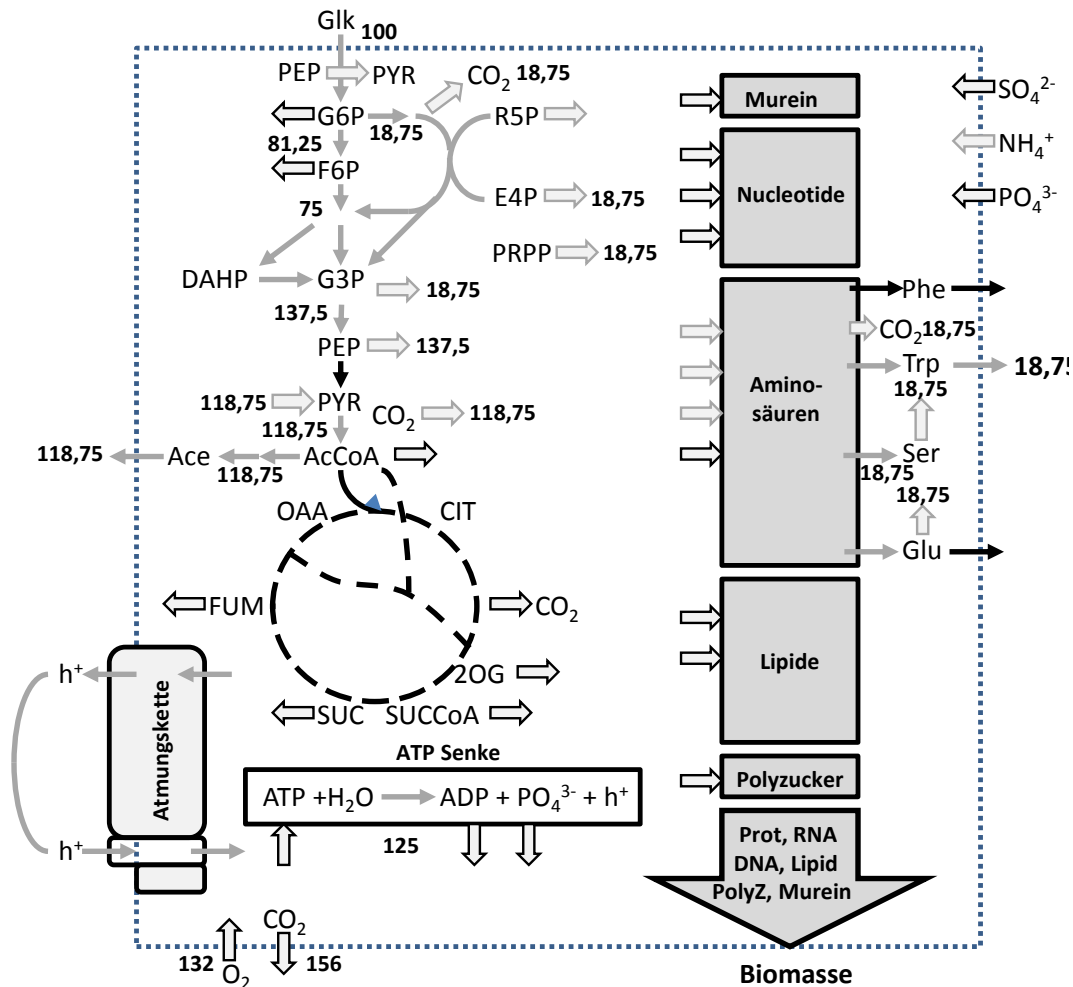


Abbildung 49: Schematische Modelldarstellung der ermittelten Flussverteilung (FBA) zum Erreichen maximaler L-Tryptophanausbeuten unter Berücksichtigung des Entkopplungsszenarios und fehlender PpsA- und Pck-Aktivität. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet

Zur Potentialbestimmung im Bezug auf die differentielle L-Tryptophanausbeute unter realen Prozessbedingungen wurde eine Optimierung der L-Tryptophansynthese unter Berücksichtigung weiterer potentiell einschränkenden Faktoren durchgeführt. Dabei wurden die Biomassekompositionsveränderungen, die Modifikation der Cytochrom-Oxidase, die Entkopplung der ATP-Synthase sowie aus Experi-

mentaldaten abgeleitete Wachstumsraten (18 h Prozesszeit, Phosphatfütterungs-szenario 3 für den L-Tryptophanproduzenten) als zusätzliche Beschränkungen berücksichtigt. Im resultierenden Szenario wurde eine maximale L-Tryptophan-ausbeute von 0,16 mol/mol (0,19 g/g) errechnet. Die ermittelten Flussverteilun-gen sind in Abbildung 50 dargestellt.

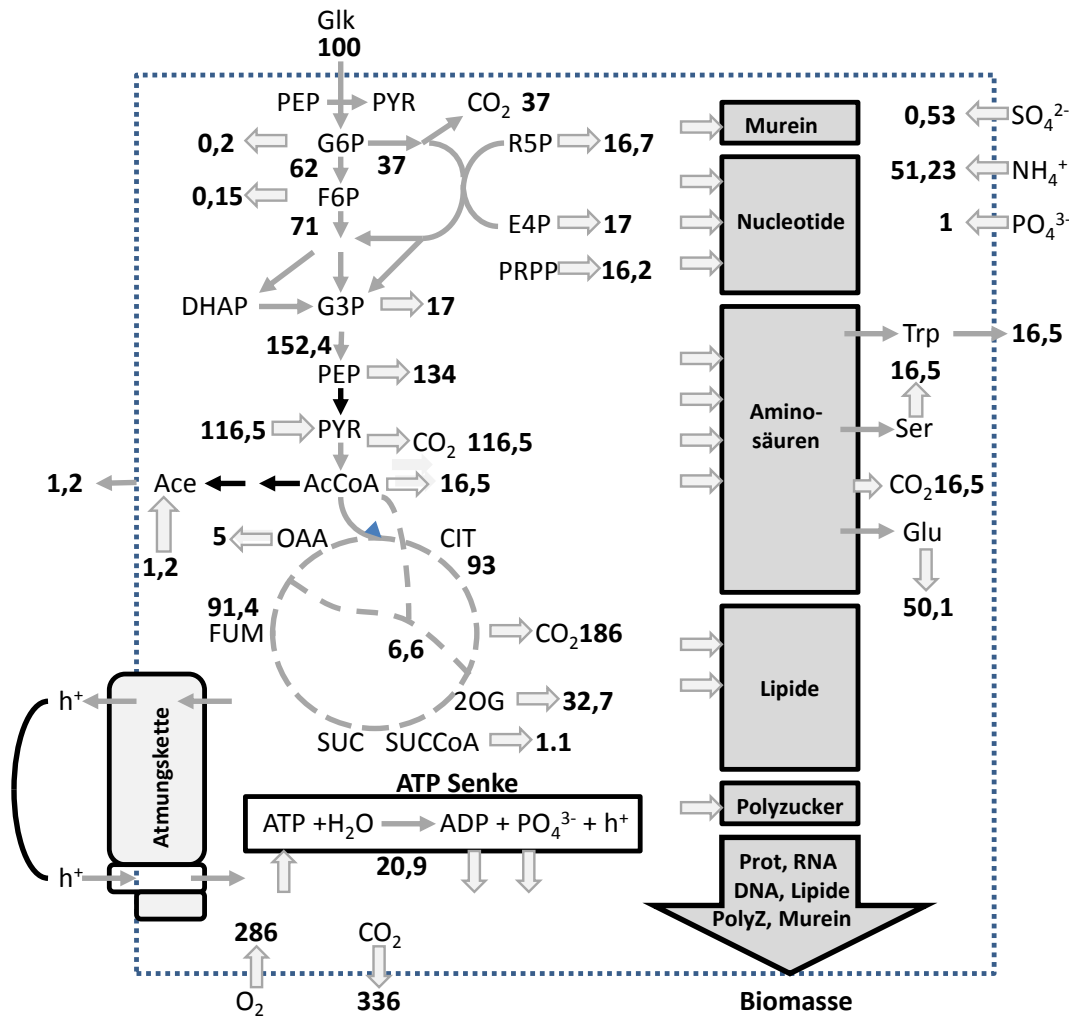


Abbildung 50: Schematische Modelldarstellung mit der ermittelten Flussverteilung (FBA) zum Erreichen maximaler L-Tryptophanausbeuten unter Berücksichtigung des Entkopplungsszenarios, fehlender PpsA-Aktivität und Wachstum. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet

3.4.2 Elementare Flussmoden

Als zusätzliche Methode zur Erfassung von Potentialen der L-Tryptophansynthese wurden elementare Flussmoden bestimmt. Grundlage waren dabei die auf Basis der Szenariensimulation durch Flussverteilungsanalysen stöchiometrisch modifizierten Modelle.

Ermittlung maximaler theoretischer Ausbeuten Zunächst wurde unter Verwendung des Referenzmodells mit einem P/O Verhältnis von 2 die maximale theoretische Ausbeute und die zugrundeliegende Flussverteilung des extremen Stoffwechselweges bestimmt. Basierend auf den Flussverteilungsanalysen waren in den Modellen die Aktivitäten von PpsA (Phosphoenolpyruvatsynthetase) und zusätzlich Pck (Phosphoenolpyruvatcarboxykinase) enthalten. Die maximale theoretische Ausbeute von L-Tryptophan auf Glukose betrug 0,44 mol/mol (0,51 g/g), die Rückführung von Kohlenstoff in die L-Tryptophansynthese über Phosphoenolpyruvat wurde vollständig über die PpsA-Aktivität erreicht. Die zugrundeliegende Flussverteilung ist in Abbildung 51 dargestellt.

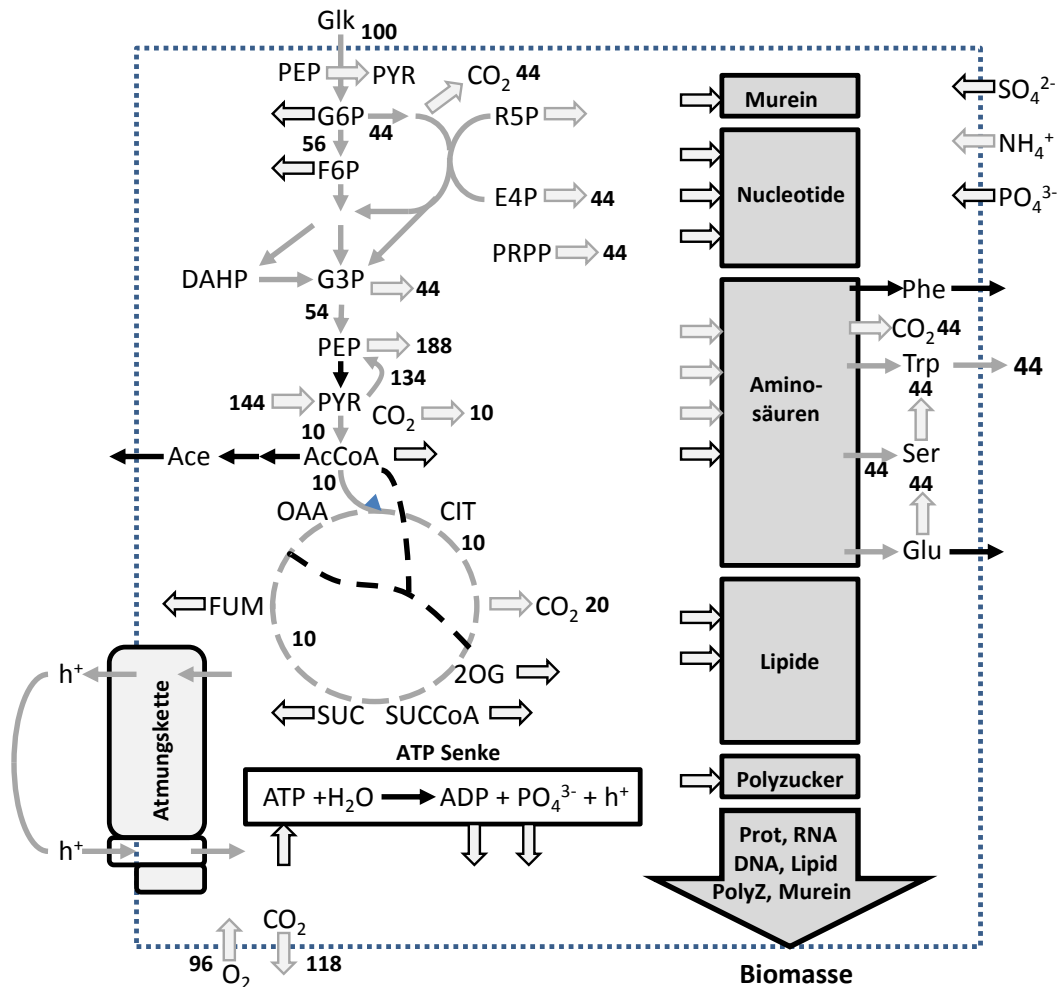


Abbildung 51: Schematische Modelldarstellung mit der durch Elementarmodenanalyse ermittelten Flussverteilung zum Erreichen maximaler L-Tryptophan-Ausbeuten. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet

Die Aktivität der Phosphoenolpyruvatsynthetase ermöglichte die höchsten Ausbeuten, eine Regeneration von Phosphoenolpyruvat über Pck in Verbindung mit einem aktiven Glyoxylatzyklus ermöglichte Ausbeute von L-Tryptophan auf Glukose von 0,33 mol/mol (0,38 g/g, Daten nicht gezeigt).

Maximale Ausbeuten bei entkoppelter ATP-Synthese Prozessdaten und Flussverteilungsanalysen zeigten eine signifikante Veränderung in der Kohlenstoffnutzung und der ATP-Synthese. Zur Beurteilung der Auswirkung dieser Veränderung auf die maximalen theoretischen Ausbeuten wurden Elementarmodenanalysen mit den auf Basis der Flussverteilungsszenarien modifizierten Modellstöchiometrien durchgeführt. Die Stöchiometrie der Cytochrom-Oxidase und der ATP-Synthase Reaktionen wurden entsprechend verändert (siehe Abschnitt 3.4.1, Szenario 18 h Prozesszeit). Bei vollständiger Entkopplung der ATP-Synthase wurde eine maximale L-Tryptophan-Ausbeute von 0,25 mol/mol (0,29 g/g) errechnet. Durch die stark reduzierte ATP-Effizienz war die Ausbeute somit im Vergleich zu Szenarien mit einem P/O-Verhältnis von 2 um 43 % reduziert. Die errechnete Flussverteilung für die ermittelte maximale Ausbeute ist in Abbildung 52 schematisch dargestellt.

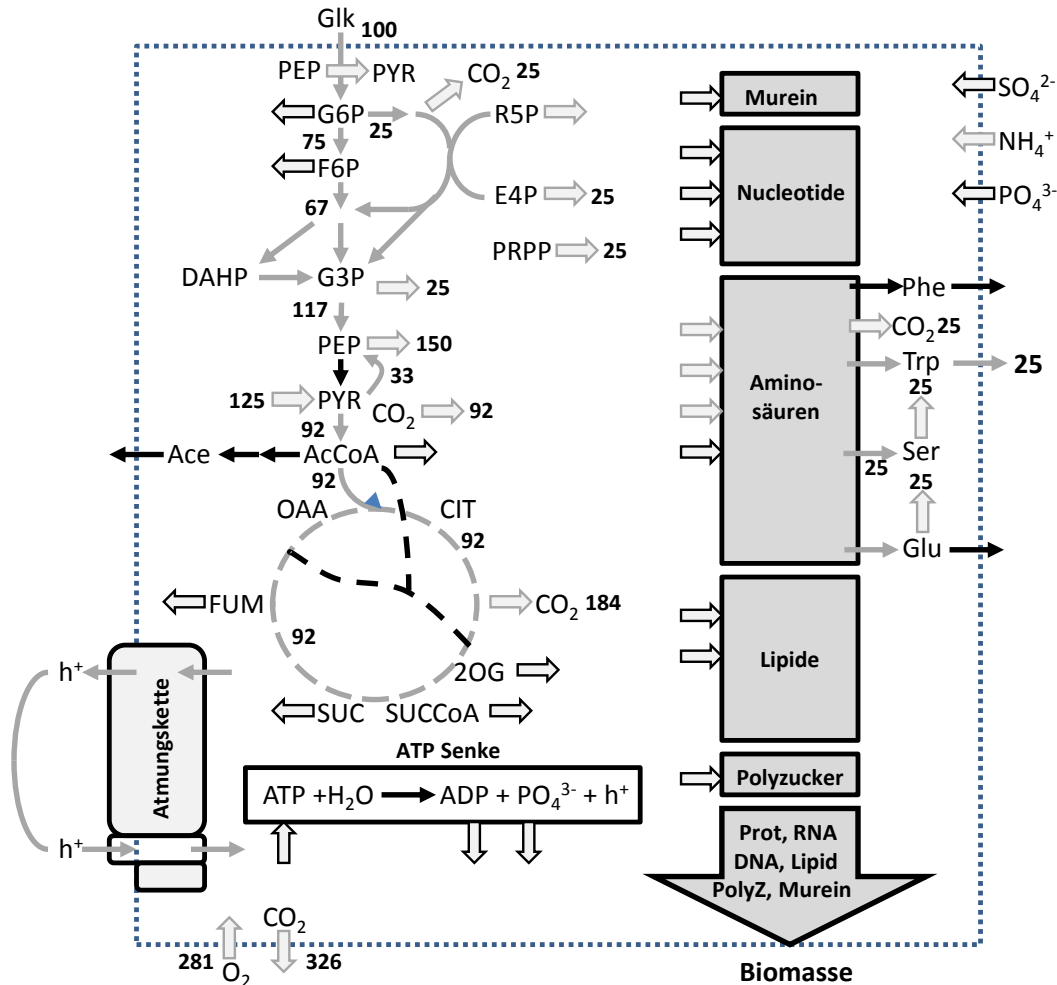


Abbildung 52: Schematische Modelldarstellung mit der durch Elementarmodenanalyse ermittelten Flussverteilung zum Erreichen maximaler L-Tryptophan-Ausbeuten unter Berücksichtigung einer Ineffizienz der ATP-Synthese. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet

Maximale Ausbeuten mit entkoppelter ATP-Synthese und fehlender PpsA und Pck-Aktivität Aufgrund eines regulatorischen Einflusses der ermittelten niedrigen Energieladung auf Reaktionen zur Rückführung von Kohlenstoff in Phosphoenolpyruvat (PpsA und Pck) wurde der Einfluss der Entkopplung der

ATP-Synthese in Verbindung mit der Entfernung von PpsA- und Pck-Aktivitäten auf die maximale Ausbeute untersucht. Die ermittelte maximale L-Tryptophan-ausbeute reduzierte sich unter den gegebenen Bedingungen auf 0,19 mol/mol (0,22 g/g).

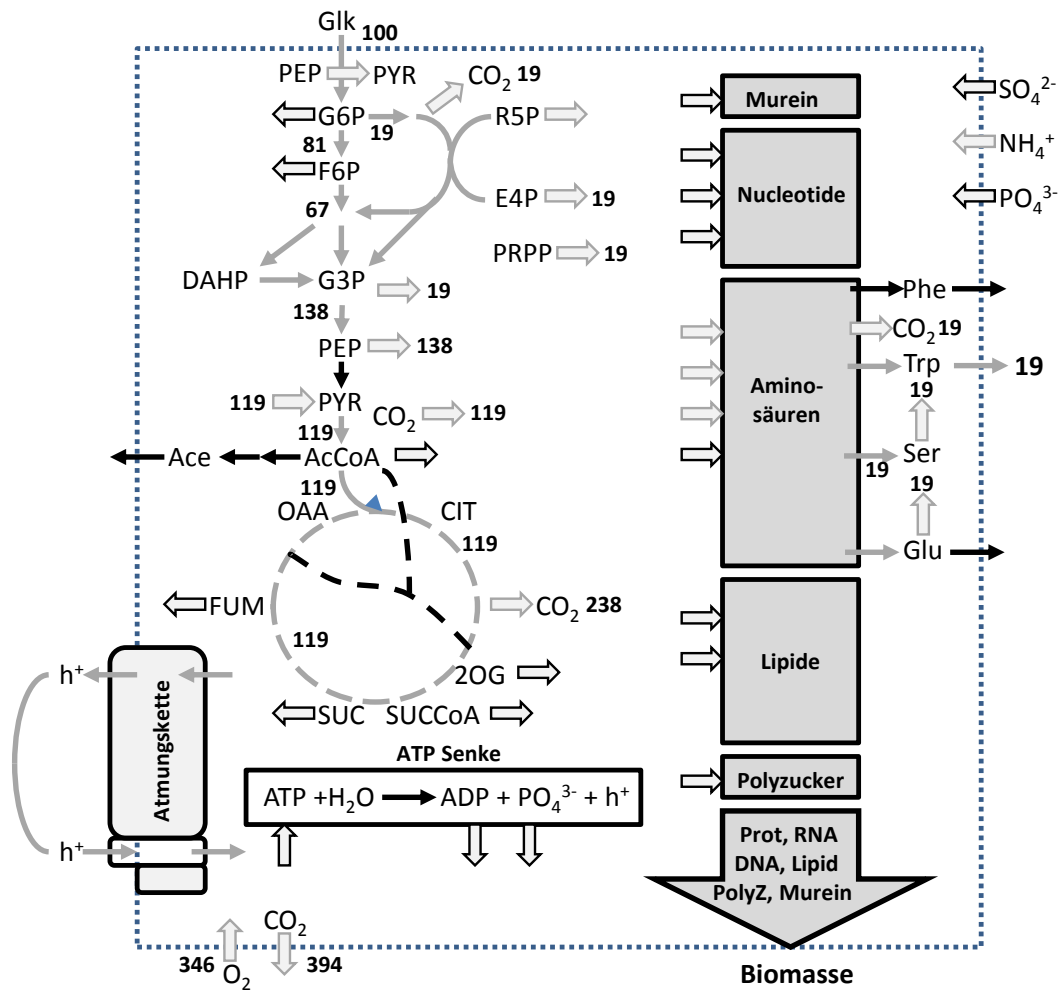


Abbildung 53: Schematische Modelldarstellung mit der durch Elementarmodenanalyse ermittelten Flussverteilung zum Erreichen maximaler L-Tryptophan-Ausbeuten unter Berücksichtigung einer Ineffizienz der ATP-Synthese und fehlender PpsA- und Pck-Aktivität. Breite Pfeile beschreiben eine Umsetzung eines Metaboliten, die nicht direkt mit dem Ausgangsstoffwechselweg verbunden ist. Beteiligte Flüsse sind durch graue Pfeile gekennzeichnet

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Prozessdynamiken bei der L-Tryptophansynthese mit *E. coli*. Auf Basis eines Modellstammes sollte der Gesamtprozess unter produktionsrelevanten Bedingungen charakterisiert und Ansatzpunkte für eine Effizienzsteigerung erarbeitet werden. Im Laufe des Projektes wurden Methoden zur Erfassung der verschiedenen Einflussgrößen evaluiert und eine Strategie zur Charakterisierung durch angepasste Prozessführung unter Anwendung verschiedener Elementarlimitierungen, Medienoptimierung, erweiterte Analytik und Probenahme zu Erfassung der Energieladung, Transkriptomanalysen sowie Szenariensimulationen eingesetzt. Im Hinblick auf regulatorische Fragestellungen wurden zusätzlich Wildtypstudien durchgeführt.

4.1 Prozessführung

Reaktorsysteme Der Einsatz von verschiedenen Reaktorsystemen zur Bearbeitung spezifischer Fragestellungen ermöglichte eine deutliche Beschleunigung der Analyse. Der Einsatz eines Vierfachsystems im 50 ml Maßstab zur Identifizierung sensitiver Medienkomponenten und zur Medienoptimierung bildete die Grundlage späterer Untersuchungen. Durch die Untersuchungen des Einflusses der Medienkomponenten konnte bereits im Frühstadium des Projektes die beobachtete Wachstumsratenreduktion einer im gegebenen Konzentrationsbereich unerwarteten Phosphatsensitivität zugeordnet werden. Die frühe Reaktion auf das Phosphatangebot konnte später in Zeitreihen-Transkriptomanalysen bestätigt werden. Die im Vergleich zum Schüttelkolben deutlich erhöhten Biomassekonzentrationen und Produkttiter (75 % der Konzentrationen des Originalmaßstabs) waren für Aussagen zur Prozessrelevanz und dem späteren Übertrag in größere Maßstäbe entscheidend. Die Anwendung des Dreifachsystems im 200 ml Maßstab mit erweiterter *Online*-Analyse und Prozesssteuerung machte eine qualitative Analyse verschiedener Limitierungsszenarien in eine kurzen Zeitintervall möglich. Die weitere Verwendung von 2 l Glasreaktoren und Bioreaktoren im 30 l Maßstab ermöglichte final quantitative Prozessanalysen und umfangreiche Probennahmen. Der Einsatz von *Online*-Glukosesonden ermöglichte eine präzise Prozesssteuerung, die Optimierung der Kohlendioxidmessung hatte zusätzlich großen Anteil an der Verbesserung der Kohlenstoffbilanzierung. Annähernd ge-

schlossene Kohlenstoffbilanzen für Prozesse mit konstanter Phosphatfütterung waren die Grundlage für Szenariensimulationen und Aussagen zur Kohlenstoffeffizienz (siehe auch Abschnitt 4.5).

Wachstumslimitierungsstrategien Durch die Anwendung von Prozessstrategien mit konstanter Zufütterung konnten Übergangszustände in die Limitierung zeitlich verlängert und Einflüsse der Elementarlimitierung von weiteren Stressreaktionen oder Einflüssen der stationären Wachstumsphase differenziert werden. Die Auslegung richtete sich dabei darauf aus, in einem gegebenen zeitlichen Rahmen ein möglichst vollständiges Bild der Übergangssituation zu erzeugen. Zusätzlich konnte eine identische Prozessstrategie für Wildtypstudien eingesetzt werden, wodurch allgemeine regulatorische Einflüsse von stammspezifischen Eigenschaften unterschieden werden konnten. Die Prozessführungsstrategie war sowohl für die Aussage der Transkriptom-Zeitreihendaten für den L-Tryptophanproduzenten als auch für die quantitative Analyse und Flussverteilungssimulation von Bedeutung. Obwohl die Prozessführung nicht auf die Maximierung der L-Tryptophansynthese optimiert war, wurde für Prozesse mit konstanter Phosphatfütterung eine im Vergleich zum Referenzprozess deutlich gesteigerte Produktivität bei gleichbleibenden oder erhöhten Ausbeuten ermittelt. Die Produktivität wurden um bis zu 47 % gesteigert und Ausbeuteverbesserungen von bis zu 25 % im Vergleich zum Referenzprozess erreicht. Die Kombination aus Wachstumsratenreduktion bei vergleichsweise hoher Glukoseaufnahmerate im Übergang in die Phosphatlimitierung hatte positive Auswirkungen auf die L-Tryptophansynthese, in Übergangsphasen wurden differentiell die höchsten Ausbeuten ermittelt. Durch gezielte exponentielle oder angenäherte lineare Phosphatfütterung könnten produktive Prozessphasen verlängert und Phasen mit hoher Nebenproduktbildung, die bei vollständigem Durchlaufen der Übergangsphase zu Prozessende auftraten, verkürzt oder vermieden werden. Im Rahmen des Projekts wurde das Potential derartiger Strategien evaluiert, eine Optimierung für den Modellstamm wurde aufgrund von stammspezifischen Einflüssen und einer fehlenden Relevanz des Stammes für die Produktion nicht durchgeführt. Basierend auf der Kohlenstoffverteilung und der ermittelten sinkenden ATP-Effizienz (siehe Abschnitte 3.2.3, 3.1.2 und 3.2.7) im Übergang in die Phosphatlimitierung zeigten sich auch Einschränkungen der Strategie im Hinblick auf weitere Ausbeutesteigerungen. Der auch im Wildtypstamm gezeigte

Einfluss der Phosphatlimitierung auf die Kohlenstoffverwertung bei Glukoseüberschuss und die sinkende Energieladung im Prozessverlauf stellen die Anwendung derartiger Strategien für stärker optimierte Stämme in Frage (siehe Abschnitt 4.6). Die Anwendung verschiedener Limitierungsstrategien sollte diese Problematik aufgreifen und mögliche Alternativen zur Prozessverbesserung aufzeigen. Für stickstofflimitierte Prozesse wurden dabei im Vergleich zur Phosphatlimitierung noch deutlichere Veränderungen der Kohlenstoffverwertung festgestellt. Die erreichten L-Tryptophanausbeuten in der frühen Übergangsphase lagen deutlich unterhalb der Werte aus der Phosphatlimitierung, zusätzlich deutete eine Gesamtkohlenstoffanalyse der Flüssigphase auf eine weiter verstärkte Umsetzung in Kohlendioxid hin. Zusätzlich war auch die Phosphataufnahme erhöht, was in einer Fermentation zu möglichen kombinatorischen Effekten führen könnte. Für eine definierte Anwendung der Stickstofflimitierung im Produktionsmaßstab wäre zusätzlich eine Umstellung der üblichen pH-Regelung über Ammoniakgas zu bedenken, was sowohl technische Veränderungen als auch die Zugabe einer alternativen pH-regulierenden Komponente in der Produktion nötig machen würde. Der vielversprechende Ansatz der Kohlenstofflimitierung führte im Falle des plasmidtragenden Modellstammes zu einem Plasmidverlust im Prozessverlauf (siehe Abschnitt 3.2.5). Der Ansatz wurde für den Modellstamm nicht weiter verfolgt, da eine zusätzliche Stabilisierung des Plasmids über Antibiotikazugabe nicht anwendungsrelevant und die ermittelten Daten nicht repräsentativ für eine Potentialabschätzung wären. Aufgrund der bereits unter gegebenen Bedingungen bei Verwendung des Modellstammes erreichten relativ hohen L-Tryptophanausbeuten ergäbe ein solcher Ansatz für plasmidfreie Produktionsstämme eine interessante Perspektive. Die Kohlenstofflimitierung adressierte dabei die signifikante Umsetzung von Glukose in Kohlendioxid unter Glukoseüberschuss, die sowohl für phosphor- als auch für stickstofflimitierte Prozesse beobachtet wurden. Der Kohlendioxidanteil am Gesamtkohlenstoff unter Glukoselimitierung fiel mit 42,5 % bezogen auf den eingesetzten Kohlenstoff deutlich geringer aus als in anderen Limitierungsszenarien (siehe Abschnitt 3.2.5).

4.2 Probennahme und Metabolomanalyse

Bei der Anwendung von schnellen Probenahmemethoden zur dynamischen Metabolomanalyse zeigte sich bereits in einer frühen Phase die Schwierigkeiten ei-

ner quantitativen Analyse intrazellulärer Verbindungen aus Fermentationsbrühen mit hohen Substrat- und Produktkonzentrationen. Für Hitzaufschlussmethoden [Schaub et al., 2006] konnten aufgrund der hohen Stoffmengen im deutlich größeren extrazellulären Volumen keine quantitativen differentiellen Messungen für die Mehrzahl wichtiger Zentralstoffwechselmetabolite durchgeführt werden. Für Kälteschockinaktivierung war aufgrund des sogenannten „Leakage“ [van Gulik, 2010] von Metaboliten keine schnelle Inaktivierung und Abtrennung intakter Zellen möglich, wodurch in der Folge ebenfalls differentielle Messungen aller Fraktionen aus Probenahme und Extraktion nötig wurden. Mit dem eingesetzten Gaschromatograph-Quadrupol-Massenspektrometer war auch in diesen Fraktionen keine Quantifizierung wichtiger Zentralstoffwechselmetabolite möglich. Obwohl durch Reduktion von Komplexanteilen versucht wurde, den Anteil intrazellulärer Metabolite im extrazellulären Volumen zu reduzieren, kam es im Prozessverlauf durch Zellyse zur Anreicherung intrazellulärer Komponenten in der Fermentationsbrühe.

Adeninnukleotidbestimmung Die Adeninnukleotid-Stoffmenge war im Gegensatz zu anderen Metabolitstoffmengen im extrazellulären Volumen sehr gering. Da zusätzlich im Prozessverlauf keine signifikante Anreicherung detektiert werden konnte, war es für diese Stoffklasse möglich, eine differentielle Messung durchzuführen. Die etablierte Methode der schnellen Probenahme, Inaktivierung und Extraktion unter Verwendung kalter Perchlorsäure ermöglichte eine schnelle Prozessierung der Proben. Aufgrund von Störkomponenten war allerdings eine umfangreiche Aufarbeitung der Probe nötig. Das entwickelte und evaluierte Protokoll verknüpfte die Perchlorsäureprobenahme mit einer Kationenaustausch-Festphasenextraktion und ermöglichte eine deutliche Reduktion von Störkomponenten. Darüber hinaus wurden die Proben durch die direkte Aufarbeitung stabilisiert, aufgearbeitete Proben zeigten im Rahmen der HPLC-Analyse über 24 Stunden keine Veränderung der Messsignale. Die ursprünglich auf die Entfernung von Aminosäuren ausgelegte Methode führte zu einer deutlichen Entfärbung und Stabilisierung der Fermentationsproben. Möglicherweise wurde weitere kationische Störkomponenten entfernt, die bisher nicht identifiziert wurden. Im Rahmen der Wildtypstudien bestätigte sich diese Annahme, da auch Nukleotidproben dieser Fermentationen nur mit Hilfe der Aufarbeitung stabilisiert und damit quantifizierbar wurden. Die Bestimmung der Energieladung war für die Bewertung

physiologischer Zustände im Fermentationsverlauf essentiell. Hierbei war zusätzlich vorteilhaft, dass nur die relative Stoffmenge der Adeninnukleotide und keine absolute Quantifizierung nötig war. Die beschriebene Aufarbeitungsmethode bietet ein Potential für die qualitative Analyse weiterer phosphorylierter Verbindungen, für quantitative Messungen ergeben sich durch die differentielle Messung von Gesamtaufschluss und Filtrat sowie die umfangreiche Aufarbeitung mit fehlerbehafteter Volumenbilanzierung zusätzliche Herausforderungen.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit wurden die grundsätzlichen Schwierigkeiten bei der quantitativen Analyse von Metabolitdynamiken deutlich. Weiterführende datengetriebene systembiologische Analysen wie die ^{13}C -Stoffflussanalyse oder die Parametrisierung von Reaktionskinetiken für die dynamische Modellierung sind direkt von derartigen Methoden abhängig. Während beispielsweise in kontinuierlichen Fermentationen mit Wildtypstämmen aufgrund günstiger Konzentrationsverhältnisse etablierte Methoden zumindest mit Einschränkungen anwendbar sind, gibt es bisher keine validierte quantitative Methode für unter Produktionsbedingungen kultivierte Prokaryonten. Ansätze wie die schnelle Filtration könnten die Schwierigkeiten der Abtrennung intakter Zellen aus der Fermentationsbrühe lösen, in Studien zeigten sich allerdings auch organismusspezifische und biomassekonzentrationsabhängige Besonderheiten [Da Luz et al., 2013]. Zusätzlich ergeben sich für bislang publizierte Methoden Inaktivierungszeiten von mehr als 15 Sekunden [Da Luz et al., 2013]. Falls zusätzlich Waschschriffe zur Entfernung angehafteter Substrate und Produkte nötig sind, könnte sich die Aufarbeitungszeit um ein Vielfaches verlängern.

4.3 Transkriptomanalyse

Die kombinierten Ergebnisse differentieller Genexpressionsanalysen aus dem Referenzprozess und Phosphatfütterungsszenario 3 mit verlängerter Übergangsphase in die Phosphatlimitierung ergaben 1041 in beiden Szenarien differentiell exprimierte Gene.

Globaler Einfluss der Phosphatantwort Auf Basis der Clustering-Analyse zeigte ein Anteil von 31,7 % (330 Transkripte) eine zeitgleiche Veränderung mit der Phosphatantwort (*pho*-Regulon). Das gesamte *pho*-Regulon sowie weitere Komponenten des 7-Komponentensystems zur Signalintegration und Regulation

[Hsieh and Wanner, 2010] waren vollständig Cluster 6 zugeordnet. Für viele weitere in Cluster 1 und 6 gruppierte Gene war bereits eine Verbindung zur Phosphatantwort beschrieben [Baek and Lee, 2006, Alteri et al., 2011, Richards and Vanderpool, 2012, Yoshida et al., 2012], beispielsweise für Gene der Säurestressantwort [Baek et al., 2007, Marzan and Shimizu, 2011, Suziedeliene et al., 1999]. Die Expression könnte unter gegebenen Bedingungen allerdings zusätzlich durch Aktivatoren wie Acetat oder Indol beeinflusst werden [Hirakawa et al., 2010]. Eine Verbindung der Phosphatantwort mit der Stressantwort auf Metallionen, wie sie von Baek und Lee postuliert wurde [Baek and Lee, 2006], erklärt möglicherweise die Zuordnung von Genen verantwortlich für Aktivitäten des Eisentransports und der Eisenverstoffwechslung. Die Transkripte zeigten im Prozessverlauf eine der Phosphatantwort gegenläufige Dynamik, die auch aufgrund der gleichbleibend hohen Eisensulfatkonzentrationen in den Fermentationsmedien verschiedener Stufen nicht erklärbar war. Eine derartiger negativer Effekt der *pho*-Regulation wurde noch nicht beschrieben. Auch für eine Verbindung der Stressantwort auf osmotische Veränderungen oder der Biofilmbildung mit der Phosphatantwort, die aus der Korrelation im Rahmen der Clustering-Analyse ableitbar wäre, gab es bisher keine unterstützende Studien.

Im Widerspruch zur postulierten Rolle des *pho*-Regulons als globaler Regulator [Baek et al., 2007] stehen Studien mit *Knockout*-Mutanten ohne *phoBR*, die keine lethale Auswirkungen der Inaktivierung des zentralen Systems der Phosphatantwort unter phosphatlimitierten Bedingungen zeigten [Marzan and Shimizu, 2011]. Auch im Rahmen der Clustering-Analyse konnte für den Großteil der differentiell exprimierten Gene und viele essentielle Stoffwechselbereiche (unter anderem die Aminosäuresynthese, Nukleotidsynthese, Atmungskette, ATP-Stoffwechsel, zentraler Kohlenstoffstoffwechsel, Fettsäure- und Lipidsynthese, Zellteilung, DNA-Synthese) sowie viele Regulatoren und Aufnahmesysteme (Cluster 4 und 7) keine Verbindung zur Phosphatantwort ermittelt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch keine Aktivität der „Stringenten Kontrolle“ (*stringent response*) beobachtet. In früheren Studien wurde eine über IraP (*iraP*) gesteuerte Integration des Phosphat-Hungersignals in die über SpoT und RelA vermittelte Antwort auf Hungerzustände postuliert [Bougdour and Gottesman, 2007]. In den vorliegenden Analysen der phosphatlimitierten Kultivierungen waren die Gene der GDP Pyrophosphokinase / GTP-Pyrophosphokinase RelA und des Mediators IraP nicht differentiell exprimiert, für SpoT zeigte sich sogar eine negative Regulation. Da die veröffentlichten Daten auf Schüttelkolbenexperimenten mit

einer begrenzten zeitlichen Auflösung des Übergangs in die Phosphatlimitierung basierten, könnten zusätzliche Einflüsse der stationären Phase oder Sekundärlimitierungen eine Rolle spielen. Durch die in dieser Arbeit gewählten Kultivierungs- und Probenahmestrategien konnten diese Einflüsse möglicherweise von der Reaktion auf die Phosphatlimitierung differenziert werden. Es gilt allerdings in diesem Kontext zu beachten, dass ein selektionierter Aminosäureproduzent möglicherweise Mutationen im Bereich der „Stringent Response“ aufweisen könnte und daher die Aussagen nicht auf ein Wildtyp-Stamm übertragbar wären.

Regulation der Atmungskette Im Zusammenhang mit der hohen Atmungsaktivität in der Übergangsphase in die Phosphatlimitierung war die Herunterregulierung der NADH-Dehydrogenase 1 (*nuoBFGHIJKLMN*, NDH-1) und Untereinheiten der *bo*-Cytochrom-Oxidase (*cyoD*) nach 25 Stunden Prozesszeit bemerkenswert. Interessanterweise wurde ein ähnliches Verhalten bereits für ATP-Synthase defiziente Stämme beobachtet [Noda et al., 2006]. In der zugrundeliegenden Studie konnten Noda et al. durch Enzymaktivitätsmessungen zusätzlich zeigen, dass unter den gegebenen Bedingungen die Atmungsaktivität durch Isoenzyme (NDH-2 und *bd*-Cytochrom-Oxidase) kompensiert wurde, die in geringerem Maße zum Protonengradienten beitragen [Noda et al., 2006]. Weiterführende Analysen mit Mutanten ohne NDH-1 und *bo*-Cytochromoxidase-Aktivität resultierten in einer signifikanten Glutamatexkretion im Laufe der Kultivierung [Kihira et al., 2012], ähnlich wie sie für den L-Tryptophanproduzenten in der späten Prozessphase beobachtet wurden. Eine weiter reduzierte NADH-Dehydrogenaseaktivität zum Prozessende könnte die Ursache für die gegen Prozessende beobachtete, signifikant ansteigende Acetatbildung sein.

Transhydrogenaseaktivität Zeitgleich zur Veränderung der Atmungskettenexpression wurde eine reduzierte Expression der membrangebunden Transhydrogenase PntAB (*pntAB*) beobachtet. Möglicherweise ist diese Regulation ein Hinweis auf einen Überfluss an reduzierten Reduktionsäquivalenten. Insbesondere NADPH sollte durch die über die verstärkte Kohlendioxidbildung abgeleitete hohen Isocitratdehydrogenase- und Pentosephosphatwegaktivitäten sowie aufgrund des sinkenden anabolischen Bedarfs im Überfluss verfügbar sein. Die Reduktion der protonengradientengetriebenen Umwandlung von NADH in NADPH könnte

eine Gegenmaßnahme zur Akkumulation des NADPH darstellen. Weiterhin könnte auch die beobachtete Glutamatexkretion der Oxidation von NADPH dienen [Dodge and Gerstner, 2002].

4.4 Flussverteilungsanalysen und Elementarmoden

Im Rahmen der Arbeit erwies sich die Anwendung der Flussverteilungsanalyse als flexibles Werkzeug zur Simulation von Szenarien und Hypothesen sowie zur Potentialabschätzung unter Berücksichtigung bestimmter Schlüsselaktivitäten. Die Möglichkeit der Analyse unterbestimmter Systeme, insbesondere mit inneren Freiheitsgraden, war nur durch diese Methode gegeben.

Durch ergänzende Elementarmodenanalysen konnten die Ergebnisse der Optimierungen mit der Produktsynthese als Zielfunktion bestätigt werden. Die Abweichungen der errechneten Ausbeuten beider Methoden waren kleiner als 2 % (relativ), die zugrundeliegenden Flussverteilungen zeigten eine weitreichende Übereinstimmung. Lediglich für ein Szenario unter Berücksichtigung der Entkopplung und fehlender Pck- und PpsA-Aktivität wurde eine unterschiedliche Verstoffwechslung von Acetyl-CoA simuliert. Im Falle der Elementarmodenanalyse wurde der Fluss durch den Citratzyklus und eine hohe Aktivität der Atmungskette simuliert, im Falle der Simulation durch die Flussverteilungsanalyse wurde Acetyl-CoA zu Acetat umgesetzt und exportiert. Der daraus resultierende Unterschied im ATP-Umsatz war aber aufgrund fehlender PEP-Rückgewinnung nicht relevant, die errechneten L-Tryptophanausbeuten wurden dadurch nicht beeinträchtigt. Die durch unterschiedliche Analysen ermittelten Szenarien zum Erreichen einer maximalen Ausbeute könnten im Einzelfall Hinweise auf mögliche Reaktionen des Organismus auf Modifikationen des ATP-Stoffwechsels oder Veränderungen der Vorläufermolekülbereitstellung geben.

Die Simulation von Flussverteilungsszenarien unter Berücksichtigung zusätzlicher Informationen über Biomassekomposition und Austauschraten ergab eine gute Übereinstimmung mit experimentell erzeugten Daten. Vorteilhaft war dabei der hohe Fluss durch stöchiometrisch gut definierte Stoffwechselwege in Verbindung mit einer geschlossenen Kohlenstoffbilanz der Fermentationen, auf deren Basis intervallweise Austauschraten bestimmt wurden. Der aufgrund der komplexen Zusammensetzung und Skalierung potentiell fehlerbehaftete Fluss in die Biomasse hatte in den untersuchten Szenarien einen relativ geringen Anteil. Zusätzlich wa-

ren aufgrund der für die Biosynthese des L-Tryptophan nötigen Vorläufermoleküle (PEP, PRPP, E4P, Ser, Glu) Flüsse durch den Zentralstoffwechsel gut bestimmbar. Die Dimension der ermittelten Diskrepanzen in der ATP-Bilanzierung, die durch die beobachteten Atmungsraten gestützt wurden, war zusätzlich ein starker Hinweis auf Veränderungen der Kohlenstoffeffizienz.

Basierend auf potentiellen regulatorischen Effekten konnte durch die Simulation von Flussverteilungen der signifikante Einfluss der PpsA- und Pck-Aktivität auf die theoretischen L-Tryptophanausbeuten gezeigt werden.

Weiterhin entscheidend für die Szenariensimulation waren in Näherung stationäre Prozessintervalle, für dynamische Prozessintervalle (3- 12 h Prozesszeit) konnte mit Hilfe der stationären Analyse erwartungsgemäß keine gute Übereinstimmung von Simulation und Experiment erreicht werden.

Die Anwendung der Simulation erwies sich auf Basis der verfügbaren Daten als hilfreiche Erweiterung zur Prozessbilanzierung. Aufgrund der angesprochenen Schwierigkeiten bei der Analyse intrazellulärer Metabolite konnten Hypothesen und Szenarien überprüft werden, die anderweitig nicht zugänglich waren.

4.5 Kohlenstoffverwertung und ATP-Effizienz

Unter Phosphorlimitierung bei gleichzeitigem Glukoseüberschuss wurde für beide eingesetzten *E. coli*-Stämme ein größer werdender Anteil wachstumsunabhängiger Glukoseaufnahme und Atmungsaktivität beobachtet. Derartig erhöhte Glukoseaufnahme und Kohlendioxidemission wurde bereits für andere *E. coli*-Stämme unter Phosphatlimitierung beobachtet [Marzan and Shimizu, 2011, Johansson and Liden, 2005]. Johansson et al. [Johansson and Liden, 2005] argumentierten auf Basis der Analyse eines Shikimatproduzenten unter phosphatlimitierten Bedingungen mit einer Entkopplung von Anabolismus und Katabolismus [Russell and Cook, 1995] sowie verstärktem *Futile Cycling* aufgrund eines postulierten ATP-Überschusses. Eine Messung der Energieladung wurde im Rahmen der Studie nicht durchgeführt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen zeigten allerdings eine unter Einfluss der Phosphatlimitierung sinkende Energieladung für *E. coli* K12 JP6015/pMU91 und K12 W3110 bis auf Werte von 0,5 mit signifikantem Einfluss auf Wachstum, Produkt- und Nebenproduktbildung [Chapman et al., 1971]. Daher konnte ein ATP-Überschuss ausgeschlossen werden. Die resultierenden sinkenden Energieladungen beeinflussen

in der Folge das Wachstum [Chapman et al., 1971], die Glukoseaufnahme [Koebmann et al., 2002] und die Produkt- und Nebenproduktbildung. Für die bei der Stickstofflimitierung beobachteten erhöhten wachstumsunabhängigen Glukoseaufnahmeraten waren aufgrund der Unterschiede in der Dynamik möglicherweise andere Mechanismen beteiligt, die ebenfalls Einfluss auf die Energieladung beziehungsweise die intrazellulären Konzentrationen von Adeninnukleotiden hatten. Weiterhin könnten über den Einfluss sinkender Energieladungen der Effekt der zusätzlichen ATP-Senke durch die L-Tryptophansynthese integriert und Unterschiede im Verhalten des Wildtyp-Stammes und des L-Tryptophanproduzenten erklärt werden.

Grundsätzlich wären für die Ursache sinkender Energieladungen bei einem Überangebot an Kohlenstoff zwei Szenarien denkbar:

Im ersten Fall könnte durch Nebenproduktbildung oder *Futile Cycling* eine zusätzliche signifikante ATP-Senke entstehen. Allerdings wäre auf Basis der nahezu vollständigen Kohlenstoffwiederfindungen der Fermentationen mit Phosphatfütterung eine undetektierte signifikante Nebenproduktbildung sehr unwahrscheinlich, die ermittelte sinkende Energieladung spräche auch gegen einen Einfluss des *Futile Cycling* zum Ausgleich eines ATP-Überschusses.

Das zweiten Szenario beruhte auf einer sinkenden Effizienz der ATP-Synthese. Die Folge einer derartigen Veränderung wären geringere ATP-Syntheseraten trotz hoher Substrataufnahme- und Atmungsraten. In diesem Kontext ergaben sich für Fermentationen unter Phosphatlimitierung interessante Parallelen zu Studien mit ATP-Synthase-defizienten Stämmen sowie Stämmen mit erhöhter ATPase-Aktivität oder veränderten Atmungskettenaktivitäten [Koebmann et al., 2002, Noda et al., 2006, Kihira et al., 2012]. Mögliche Ursachen und Auswirkungen der Entkopplung der ATP-Synthese wurden zudem durch Szenariensimulationen unterstützt.

4.5.1 Entkopplungsszenario

Kinetische Studien des ATP-Synthasekomplexes von Iino et al. ergaben einen überraschend hohen K_m -Wert für Phosphat von 4,2 mM [Iino et al., 2009]. Da für *E. coli* keine Pufferung des intrazellulären Phosphatgehaltes über Phosphatspeicher wie Polyphosphate beschrieben ist [Kulaev, 1975], wäre damit bereits bei extrazellulären Konzentrationen von 0,4 g/l eine deutliche Reduktion des ATP-

Umsatzes durch den ATP-Synthasekomplex zu erwarten. Die unter Phosphatlimitierung ermittelten hohen wachstumsunabhängigen Atmungs- und Glukoseaufnahmeraten deuteten allerdings auf eine hohe Aktivität der Atmungskette und der über den Protonengradienten gekoppelten ATP-Synthase hin. In diesem Zusammenhang ergab sich aus von D'Alessandro et al. durchgeführten *in vitro* Studien an ATP-Synthasekomplexuntereinheiten eine mögliche Erklärung dieser scheinbaren Diskrepanz [D'Alessandro et al., 2008, D'Alessandro et al., 2011]. In den beschriebenen Versuchen wurde gezeigt, dass Phosphat- und ADP-Konzentrationen das Verhältnis der Protonentransportrate zur ATPase/ATP-Synthaseaktivität beeinflussen können. Insbesondere bei sinkenden Phosphatkonzentrationen kam es zu einer Entkopplung des Protonentransports von der ATPase/ATP-Synthaseaktivität [D'Alessandro et al., 2008, D'Alessandro et al., 2011]. Der angegebene Bereich des halbmaximalen Entkopplungseffekts bei Phosphatkonzentrationen von 0,51 mM (0,05 g/l) liegt dabei durchaus im Rahmen der Phosphatkonzentrationen, die in der Übergangsphase in die Phosphatlimitierung bestimmt wurden. Auf Basis des beschriebenen Entkopplungseffektes und der kinetischen Eigenschaften des ATP-Synthasekomplexes könnte die ATP-Synthese im Übergang in die Phosphatlimitierung einen über die Atmungskette erzeugten Protonengradienten bei gleichzeitig sinkender ATP-Sytheserate umsetzen. Die in der Folge beobachteten erhöhten wachstumsunabhängigen Glukoseaufnahme- und Atmungsraten stellen dabei möglicherweise eine Gegenmaßnahme zu der durch die sinkende Phosphatkonzentration ausgelöste Ineffizienz der oxidativen Phosphorylierung dar. Derartige Effekte könnten durch den Export schwacher organischer Säuren oder Aminosäuren, zusätzlichen Protonentransportvorgängen oder Membrandefizienzen weiter verstärkt werden [Russell, 2007]. Im Rahmen der Simulation von Entkopplungsszenarien mittels Flussverteilungsanalyse konnte gezeigt werden, dass die im Prozess beobachteten Transferraten für Biomasse, Produkte und Kohlendioxid auch unter vollständiger Entkopplung der ATP-Synthase möglich wären. In der Konsequenz wurde für Szenarien ohne Entkopplungseffekte ein signifikanter ATP-Überschuss berechnet. Die Ergebnisse der Simulation zeigten trotz möglicher Fehlereinflüsse der Cofaktorbilanzierung in reduzierten Modellen und Ungenauigkeiten bei der Polymerisationsreaktion der Biomasse eine gute Übereinstimmung mit dem beobachteten Prozessverhalten. Fehlerbehaftete Größen wie die artifizielle Biomasse trugen nur mit kleinem Anteil zum Gesamtkohlenstofffluss bei, der Hauptanteil lag in stöchiometrische gut definierten Bereichen des Zentralstoffwechsels. Auch im Vergleich der berechneten Raten mit expe-

rimentell ermittelten Daten zeigten sich im Rahmen üblicher Messvarianzen eine sehr gute Übereinstimmung, insbesondere für den L-Tryptophanproduzenten. Aus der Analyse und dem Vergleich mit ATP-Synthasedefizienten Stämmen [Kobmann et al., 2002, Noda et al., 2006] wurde ein 4-stufiges Szenario entwickelt, mit dessen Hilfe das beobachtete Verhalten erklärt werden konnte.

Stufe 1: ATP-Synthase Entkopplung Die reduzierte Phosphatkonzentration führt zur initialen Entkopplung des ATP-Synthasekomplexes. Dieser Vorgang verursacht, ausgelöst durch die sinkende Energieladung beziehungsweise sinkende ATP-Konzentrationen, eine erhöhte wachstumsunabhängige Glukoseaufnahme und erhöhte Atmungsaktivität. Durch die erhöhte Substrataufnahme steigt die NADH-Verfügbarkeit an.

Stufe 2: Atmungskettenentkopplung Als Folge von Stufe 1 bleibt die NADH und NADPH-Generierung (verknüpft über Transhydrogenaseaktivitäten *pntAB*) auf hohem Niveau, während der Bedarf durch anabole Reaktionen ständig abnimmt. Als Gegenreaktion erfolgt eine Verschiebung der Atmungskettenaktivität hin zu Isoenzymen mit geringerem Beitrag zum Protonengradienten (NDH-1 zu NDH-2 und *bo*-Oxidase zu *bd*-Oxidase). Als direkte Folge wird die ATP-Syntheseeffizienz weiter reduziert. Die Annahme dieser Entwicklung wurde durch Ergebnisse der Transkriptomanalyse im Kontext veröffentlichter Arbeiten von Noda et al. unterstützt [Noda et al., 2006].

Stufe 3: Überflusmetabolismus Falls die Gegenmaßnahmen aus Stufe 2 eine Akkumulation von NADH und NADPH nicht ausreichend verhindern können, werden zur Erhaltung des zellulären Reduktionsstatus Überflusmetabolite exkretiert. Während Acetat einen bekannter Überschussmetabolit für *E. coli* darstellt, scheint die Exkretion von L-Glutamat, die für den L-Tryptophanproduzenten beobachtet wurde, überraschend. In früheren Studien wurde bereits vermutet, dass NADPH-Überschuss für die L-Glutamatexkretion bei der L-Tryptophansynthese mit *E. coli* verantwortlich sein könnte [Dodge and Gerstner, 2002]. Die durch die hohen Kohlendioxidbildungsraten und die respiratorischen Quotienten abgeleiteten hohen Flüsse durch den Citratzyklus sollten über die Isoci-

trat-Dehydrogenaseaktivität [Csonka and Fraenkel, 1977] in hohem Durchsatz NADPH erzeugt werden. Gleichzeitig ist allerdings der Bedarf durch sinkende Wachstums- und Produktbildungsraten deutlich reduziert. Auch die im Rahmen der Transkriptomanalyse ermittelte negative Regulation der membrangebundenen Transhydrogenase PntAB könnte ein Hinweis auf einen NADPH-Überfluss sein. Interessanterweise zeigten unabhängige Studien, dass eine NDH-1, *bo*-Oxidase Doppel-*knockout*-Mutante ebenfalls L-Glutamat exkretierte, was die Hypothese der vorausgegangenen Atmungskettenentkopplung (Stufe 2) zusätzlich stützt.

Stufe 4: Vollständige Phosphatlimitierung Die finale Stufe wird nach vollständigem Verbrauch der Phosphorsubstrate eingeleitet. Die Folgen sind eine massive globale Reduktion der Expression und signifikant reduzierte metabolische Aktivitäten. Dieser Zustand wurde in Referenzprozessen mit dem L-Tryptophanproduzenten beobachtet, im Falle einer Phosphatfütterung wurde diese Stufe im gegebenen Zeitrahmen nicht erreicht.

Für das vorgeschlagene 4-stufige Szenario ergab sich nur für die erste Stufe eine direkte Verbindung mit einer Phosphatlimitierung, folgende Effekte wurden der sinkenden Energieladung zugeordnet. Vor diesem Hintergrund spielt auch die energieaufwändige Produktsynthese eine Rolle, die ebenfalls eine sinkende Energieladung verursachen könnte. Somit wäre ein solches Entkopplungsszenario auch für andere energieaufwändige Synthesen unter Zuckerüberschuss relevant. Auch die beobachteten Effekte bei der Stickstofflimitierung ließen sich einem solchen Szenario zuordnen. Bei der Ammoniumassimilation unter Limitierung wird in *E. coli* der GS-GOGAT-Weg aktiv (siehe Abschnitt 1.1.3). Die ATP-abhängige Umsetzung kann dabei eine signifikante ATP-Senke darstellen [Lengeler et al., 1999]. Dieser zusätzliche ATP-Verbrauch war möglicherweise der Auslöser einer Entkopplung der ATP-Synthese, die in der Folge analog zu den Stufen 2 bis 4 des Entkopplungsszenarios verlaufen könnte.

4.6 Potential der L-Tryptophansynthese

Auf Basis der ermittelten Daten und Szenarien ergibt sich ein signifikanter Einfluss auf das Potential der L-Tryptophansynthese. In Flussverteilungsszenarien

und Elementarmodenanalysen wurden die Einflüsse der Entkopplung der ATP-Synthese sowie der Beitrag bestimmter Schlüsselaktivitäten auf die L-Tryptophansynthese simuliert.

Als zentraler Punkt für die Synthese von L-Tryptophan wurde die Bereitstellung von Phosphoenolpyruvat identifiziert. Bereits in frühen Arbeiten zur Elementarmodenanalyse konnte gezeigt werden, dass mit einer Rückführung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat ein theoretisches molares Ausbeutemaximum von größer 0,45 (0,50 g/g) erreicht werden konnte. Ohne PpsA Aktivität verringert sich diese Ausbeute deutlich [Schuster et al., 1999]. Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Simulationen wurden in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schuster et al. über Elementarmodenanalysen maximale molare Ausbeuten von 0,44 und über Flussverteilungsanalysen mit der Optimierung der L-Tryptophansynthese Ausbeuten von 0,437 berechnet. Eine alternative Regenerierung über Oxalacetat und die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pck) wäre nur in Verbindung mit dem Glyoxylatzyklus relevant. Die mit Hilfe dieser Stoffwechselroute ohne PpsA berechneten theoretischen molaren L-Tryptophanausbeuten beliefen sich auf 0,33 (Daten nicht gezeigt) und damit deutlich unter der errechneten maximalen Ausbeute. Aus der zentralen Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Regenerierung wurde auf Basis der stöchiometrischen Analysen für Ausbeuten größer als 0,19 mol/mol ein erhöhter ATP-Bedarf für die L-Tryptophansynthese abgeleitet. Unter Berücksichtigung der niedrigen Energieladung und des Entkopplungsszenarios ergäbe sich ein Ausbeute-Schwellenwert, der nur mit Hilfe Phosphoenolpyruvat bereitstellender Aktivitäten und ausreichender ATP-Verfügbarkeit überschritten werden könnte. Die Szenariensimulationen zeigten eine deutliche Reduktion der maximalen theoretischen Ausbeute auf 0,25 mol/mol unter Berücksichtigung der Entkopplung der ATP-Synthese. Darüber hinaus wird die Aktivität von PpsA regulatorisch von niedrigen Phosphatkonzentrationen und steigenden ADP-Konzentrationen signifikant reduziert [Burnell, 2010]. Aufgrund der Tatsache, dass die Pck-Aktivität der Katabolitrepression unterliegt [Romeo et al., 1993], wäre unter Phosphatlimitierung keine signifikante Aktivität zur Regenerierung von Phosphoenolpyruvat vorhanden. In Simulationen mit Berücksichtigung der ATP-Syntheseentkopplung und fehlender PpsA- und Pck-Aktivitäten reduzierte sich die theoretische Ausbeute weiter auf 0,1875 mol/mol (0,2175 g/g) und damit auf lediglich 42 % der ohne Einschränkungen errechneten maximalen molaren Ausbeute. Unter Einfluss einer ATP-Limitierung und regulatorischer Hemmung hätte beispielsweise eine Über-

expression von PpsA nur begrenzte Auswirkungen. Eine erhöhte Phosphoenolpyruvatverfügbarkeit wäre alternativ über eine PTS unabhängige Zuckeraufnahme gegeben, beispielsweise über den exogenen Transporter Glf und die Glukokinase Glk [Sprenger et al., 2001]. Allerdings ergäbe sich in diesem Fall eine Kopplung der Zuckerphosphorylierung mit der ATP-Verfügbarkeit. Somit wäre die Zuckeraufnahme und Vitalität der Zellen von der Auswirkung der initialen Entkopplung und der ATP-Affinität der jeweiligen Enzyme abhängig (Phase 1). Zusätzlich könnte die Verfügbarkeit von Vorläufermolekülen, die aus dem oberen Teil der Glykolyse oder aus dem Pentosephosphatweg stammen (Serin und Phosphoribosylpyrophosphat) beeinträchtigt werden. Um diese Problematik auszugleichen, wären kombinierte Transportaktivitäten denkbar. Eine Reduktion des Phosphoenolpyruvatverbrauchs durch anaplerotische Reaktionen könnte durch Einbringen einer Pyruvatcarboxylase erreicht werden [Anderlei et al., 2003], allerdings hängt diese Aktivität ebenfalls von der ATP-Verfügbarkeit ab. Weiterhin könnte eine Inaktivierung der Pyruvatkinaseaktivität (*pykA*, *pykF*) eine verbesserte Phosphoenolpyruvatverfügbarkeit ermöglichen [Berry, 1996, Gosset et al., 1996, Sprenger et al., 2001].

Eine Modifikation der ATP-Synthase und der Atmungskette zur Vermeidung der Entkopplung wäre angesichts der komplexen Interaktionen der Untereinheiten, falls überhaupt möglich, nur mit unverhältnismäßig großem Aufwand umsetzbar. Möglicherweise wäre daher eine alternative Produktionsplattform, beispielsweise *Corynebacterium glutamicum*, eine interessante Alternative. Ein Bodenbakterium wie *C. glutamicum* könnte eine andere Reaktion auf die Phosphatlimitierung zeigen als ein Darmbakterium wie *E. coli*, in dessen Habitat Kohlenstoffüberschuss bei gleichzeitiger Phosphorlimitierung durchaus eine Rolle spielen könnte. Für *C. glutamicum* sind darüber hinaus umfangreiche intrazelluläre Phosphatspeicher in Form von Polyphosphaten bekannt [Lindner et al., 2009], mit deren Hilfe in Phosphathungerperioden zeitweise der intrazelluläre Phosphathaushalt ausgeglichen werden kann.

Auf Grund der massiven Effekte der Wachstumslimitierungsstrategie auf das Potential der L-Tryptophansynthese, spielt neben möglichen Stammmodifikationen die Wahl der Prozessführungsstrategie eine entscheidende Rolle bei der Optimierung. Im Falle einer Phosphat- und, mit Einschränkungen, einer Stickstofflimitierung wurden signifikante Veränderungen der Kohlenstoffverwertung beobachtet und negative Einflüsse auf die maximalen L-Tryptophanausbeuten abgeleitet. Für eine potentiell relevante Schwefellimitierung wurden aufgrund hoher Schwefelkon-

taminationen in den verwendeten Medienkomponenten ein Einsatz im Produktionsmaßstab mit Rohstoffen technischer Qualität als nicht geeignet eingeschätzt. Für eine Kohlenstofflimitierung wurden für den Modellstamm Plasmidverluste beobachtet, die erzielten Ausbeuten deuteten aber auf ein deutliches Verbesserungspotential hin. Für einen Produktionsorganismus mit stabilisiertem Plasmid oder einer chromosomalen Integration der relevanten Gene könnte dieser Ansatz eine Verbesserung der Ausbeute möglich machen. Im Falle eines reduzierten Kohlenstoffflusses könnten sich im Gegensatz zu Kohlenstoffüberschusszenarien Einschränkungen durch die fehlende Substrataffinität essentieller Kontrollreaktionen der L-Tryptophansynthese ergeben. Derartige Prozessführungsstrategien könnten daher eine spezifische Stammoptimierung notwendig machen. Durch Modifikation von Affinitäten und Aktivitäten von Schlüsselenzymen wie der DAHP-Synthase, der Anthranilat-Synthase sowie im Bereich der Vorläufermolekülbereitstellung könnten Kohlenstoffflüsse unter Limitierung stärker in Richtung L-Tryptophan geleitet werden. Neben der erhöhten L-Tryptophansynthese wäre auch eine resultierende Wachstumsreduktion bei höheren Zuckeraufnahmeraten vorteilhaft.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Analyse des Modellstammes im Referenzprozess unter Phosphatlimitierung wurden signifikante Auswirkungen der Kultivierungsbedingungen auf die Kohlenstoffeffizienz und die L-Tryptophansynthese festgestellt. Der Modellstamm zeigte bereits bei Phosphatkonzentrationen über 0,3 g/l eine deutliche Wachstumsreduktion sowie erhöhte wachstumsunabhängige Zuckeraufnahme und Atmungsaktivität sowie in der frühen Übergangsphase erhöhte L-Tryptophanproduktion. Zur Verbesserung der zeitlichen Auflösung dieses Übergangs wurden modifizierte Prozessstrategien mit konstanter Phosphatfütterung eingesetzt. Weiterhin wurden unter identischen Kultivierungsbedingungen Wildtypstudien durchgeführt, die eine Differenzierung von stammspezifischen Effekten und einer allgemeinen Adaptation ermöglichten. Über Transkriptomzeitreihenanalysen konnten vielfältige Interaktionen des Phosphat-Regulons identifiziert werden. Durch Clustering und Korellationsanalyse konnte allerdings keine direkte Verbindung der Phosphatantwort zu den beobachteten Phänomenen der Wachstumsreduktion und Kohlenstoffverwertung ermittelt werden. Durch Energieladungsmessungen

im Prozessverlauf wurden für beide untersuchte Stämme eine im Prozessverlauf deutlich sinkende Energieladung bei gleichzeitig steigender wachstumsunabhängiger Kohlenstoffaufnahme und Atmungsaktivität bestimmt. Unter Berücksichtigung der Prozessbilanzierung wurden über Flussverteilungsanalysen Szenarien mit einer entkoppelten ATP-Synthase simuliert. Auf Basis dieser Simulationen konnte gezeigt werden, dass der ATP-Bedarf in der Übergangsphase aufgrund des hohen Kohlenstoffflusses vollständig über die Substratkettenphosphorylierung gedeckt wurde. Um unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels eine ausgeglichene ATP-Bilanz zu ermöglichen, musste die ATP-Synthase für Intervallsimulationen der Übergangsphase in die Phosphatlimitierung vollständig entkoppelt werden.

Auf Basis kinetischer Parameter der ATP-Synthase, der Prozessbilanzierung, der Transkriptomanalyse, Vergleichen mit Studien zu *E. coli* ATP-Synthase oder Atmungskettenmutanten und der Simulationen wurde ein Entkopplungsszenario entwickelt, mit dessen Hilfe die beobachteten Effekte erklärt werden könnten. Das vorgeschlagene Szenario beinhaltet eine ATP-Synthaseentkopplung (1), eine Entkopplung der Atmungskette (2), Überflussmetabolismus (3) und eine Absterbephase (4). Im Rahmen des Szenarios steht nur die erste Phase direkt in Zusammenhang mit einer Phosphatlimitierung, weitere Effekte werden durch die sinkende Energieladung beziehungsweise die Adeninnukleotidkonzentrationen vermittelt. Damit wäre das Szenario auch für alternative Strategien mit Glukoseüberschuss relevant. Starke ATP-Senken, beispielsweise durch Produktsynthese oder der Einfluss weiterer Elementarlimitierungen, könnten Entkopplungsphänomene äquivalent zu den Phasen 2 bis 4 auslösen.

Auf Basis der Entkopplungsszenarien und dem regulatorischen Einfluss der Energieladung auf essentielle Aktivitäten wurden über Elementarmodenanalysen und Flussverteilungsanalysen Potentiale der L-Tryptophansynthese bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zur theoretischen maximalen L-Tryptophan-ausbeute. Für den Modellstamm waren die Ausbeutemaxima noch nicht erreicht, durch Prozessmodifikationen konnten Ausbeuten und Produktivitäten signifikant erhöht werden. Die Szenariensimulationen zeigten allerdings mit den gegebenen Randbedingungen nur ein begrenztes Potential für weitere Steigerungen. Neben Stammmodifikationen im Bereich der Phosphoenolpyruvatbereitstellung könnten kohlenstofflimitierte Prozesse erhöhte Ausbeuten ermöglichen. Ein direkter Einfluss auf die Ursachen der Entkopplung der ATP-Synthase und Atmungskette würde eine sehr umfassende Verständnis der Interaktionen der Komplex-

Untereinheiten sowie der Grenzflächen und Transportvorgängen zwischen dem periplasmatischem Raum, der Zellmembran und dem Cytosol vorraussetzen, das nach heutigem Kenntnisstand nicht gegeben ist. Möglicherweise bieten sich in diesem Zusammenhang andere Produktionsplattformen mit Stämmen anderer Gattungen an, die andere Strategie im Umgang mit Limitierungszuständen als *E. coli* aufweisen. So ist beispielsweise für *C. glutamicum* eine Speicherung großer Phosphatmengen in Form von Polyphosphaten bekannt [Lindner et al., 2009], die möglicherweise einen positiven Einfluss auf das Verhalten unter Phosphatlimitierung aufweisen.

Literatur

- [1995-01, | 1995-01, D. .-. Din 1319-1 1995-01, grundlagen der messtechnik nr. 5.12.
- [Aiba et al., 1982] Aiba, S., Tsunekawa, H., and Imanaka, T. (1982). *New approach to tryptophan production by Escherichia coli: genetic manipulation of composite plasmids in vitro*. *Appl Environ Microbiol*, 43(2):289–97.
- [Ajinomoto, 2013] Ajinomoto (2013). *AJINOMOTO CO., INC, Financial Report*.
- [Alteri et al., 2011] Alteri, C. J., Lindner, J. R., Reiss, D. J., Smith, S. N., and Mobley, H. L. T. (2011). *The broadly conserved regulator PhoP links pathogen virulence and membrane potential in Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 82(1):145–163.
- [Anderlei et al., 2003] Anderlei, B., Sprenger, G., Sahm, H., and Bongaerts, J. (DE 10219714; 2003). *Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von aromatischen Aminosäuren und anderen Metaboliten des aromatischen Aminosäurenbiosyntheseweges*.
- [Anderson et al., 1983] Anderson, D. M., Herrmann, K. M., and Somerville, R. L. (US 4371614; 1983). *E.coli bacteria carrying recombinant plasmids and their use in the fermentative production of L-tryptophan*.
- [Atkinson, 1968] Atkinson, D. E. (1968). *The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers*. *Biochemistry*, 7(11):4030–4034.
- [Atlung et al., 1997] Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L., and Brondsted, L. (1997). *Effects of sigma(S) and the transcriptional activator AppY on induction of the Escherichia coli hya and cbdAB-appA operons in response to carbon and phosphate starvation*. *Journal of Bacteriology*, 179(7):2141–2146.
- [Azuma et al., 1993] Azuma, S., Tsunekawa, H., Okabe, M., Okamoto, R., and Aiba, S. (1993). *Hyper-Production of L-Tryptophan Via Fermentation with Crystallization*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4-5):471–476.

- [Baek et al., 2007] Baek, J. H., Kang, Y. J., and Lee, S. Y. (2007). *Transcript and protein level analyses of the interactions among PhoB, PhoR, PhoU and CreC in response to phosphate starvation in Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 277(2):254–9.
- [Baek and Lee, 2006] Baek, J. H. and Lee, S. Y. (2006). *Novel gene members in the Pho regulon of Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters*, 264(1):104–109.
- [Bauer and Ziv, 1976] Bauer, S. and Ziv, E. (1976). *Dense Growth of Aerobic Bacteria in a Bench-Scale Fermentor*. *Biotechnology and Bioengineering*, 18(1):81–94.
- [Berry, 1996] Berry, A. (1996). *Improving production of aromatic compounds in Escherichia coli by metabolic engineering*. *Trends Biotechnol*, 14(7):250–6.
- [Blattner et al., 1997] Blattner, F. R., Plunkett, 3rd, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. *Science*, 277(5331):1453–1462.
- [Bolten et al., 2007] Bolten, C. J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J. C., and Wittmann, C. (2007). *Sampling for metabolome analysis of microorganisms*. *Analytical Chemistry*, 79(10):3843–3849.
- [Bongaerts et al., 2001] Bongaerts, J., Kramer, M., Muller, U., Raeven, L., and Wubbolts, M. (2001). *Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds*. *Metab Eng*, 3(4):289–300.
- [Bougdour and Gottesman, 2007] Bougdour, A. and Gottesman, S. (2007). *ppG_{pp} regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31):12896–12901.
- [Burnell, 2010] Burnell, J. N. (2010). *Cloning and characterization of Escherichia coli DUF299: a bifunctional ADP-dependent kinase–Pi-dependent pyrophosphorylase from bacteria*. *BMC Biochem*, 11:1. Burnell, Jim N England BMC biochemistry BMC Biochem. 2010 Jan 3;11:1.

- [Bustin, 2002] Bustin, S. A. (2002). *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. *J Mol Endocrinol*, 29(1):23–39.
- [Cairns et al., 1991] Cairns, M. T., McDonald, T. P., Horne, P., Henderson, P. J., and Baldwin, S. A. (1991). *Cytochalasin B as a probe of protein structure and substrate recognition by the galactose/H⁺ transporter of Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 266(13):8176–83.
- [Camakaris et al., 1997] Camakaris, H., Cowen, P., and Pittard, J. (US 5756345A; 1997). *Production of tryptophan by the bacterium Escherichia coli*.
- [Castellani, 1919] Castellani, A. Chalmers, A. (1919). *Manual of Tropical Medicine*. Williams Wood and Co., New York, 3rd edition.
- [Chandran et al., 2003] Chandran, S. S., Yi, J., Draths, K. M., von Daeniken, R., Weber, W., and Frost, J. W. (2003). *Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid*. *Biotechnol Prog*, 19(3):808–14.
- [Chang et al., 2002] Chang, D.-E., Smalley, D. J., and Conway, T. (2002). *Gene expression profiling of Escherichia coli growth transitions: an expanded stringent response model*. *Mol Microbiol*, 45(2):289–306.
- [Chapman et al., 1971] Chapman, A. G., Fall, L., and Atkinson, D. E. (1971). *Adenylate energy charge in Escherichia coli during growth and starvation*. *J Bacteriol*, 108(3):1072–1086.
- [Chassagnole et al., 2002] Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J. W., Mauch, K., and Reuss, M. (2002). *Dynamic modeling of the central carbon metabolism of Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 79(1):53–73.
- [Cohen and Chang, 1977] Cohen, S. N. and Chang, A. C. Y. (1977). *Revised Interpretation of Origin of Psc101 Plasmid*. *Journal of Bacteriology*, 132(2):734–737.
- [Costa et al., 2010] Costa, V., Angelini, C., De Feis, I., and Ciccodicola, A. (2010). *Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

- [Cox et al., 1981] Cox, G. B., Rosenberg, H., Downie, J. A., and Silver, S. (1981). *Genetic analysis of mutants affected in the Pst inorganic phosphate transport system. J Bacteriol*, 148(1):1–9.
- [Crepin et al., 2011] Crepin, S., Chekabab, S. M., Le Bihan, G., Bertrand, N., Dozois, C. M., and Harel, J. (2011). *The Pho regulon and the pathogenesis of Escherichia coli. Veterinary Microbiology*, 153(1-2):82–88.
- [Csonka and Fraenkel, 1977] Csonka, L. N. and Fraenkel, D. G. (1977). *Pathways of NADPH Formation in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry*, 252(10):3382–3391. Dg808 Times Cited:31 Cited References Count:64.
- [Da Luz et al., 2013] Da Luz, J., Hans, E., and Zeng, A.-P. (2013). *Automated fast filtration and on-filter quenching improve the intracellular metabolite analysis of microorganisms. Engineering in Life Sciences*, 14:135–142.
- [D’Alessandro et al., 2008] D’Alessandro, M., Turina, P., and Melandri, B. A. (2008). *Intrinsic uncoupling in the ATP synthase of Escherichia coli. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1777(12):1518–1527.
- [D’Alessandro et al., 2011] D’Alessandro, M., Turina, P., and Melandri, B. A. (2011). *Quantitative evaluation of the intrinsic uncoupling modulated by ADP and P-i in the reconstituted ATP synthase of Escherichia coli. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1807(1):130–143.
- [Death and Ferenci, 1994] Death, A. and Ferenci, T. (1994). *ABetween feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of Escherichia coli to growth with limiting carbohydrates. J Bacteriol*, 176(16):5101–5107.
- [Dell and Frost, 1993] Dell, K. A. and Frost, J. W. (1993). *Identification and Removal of Impediments to Biocatalytic Synthesis of Aromatics from D-Glucose - Rate-Limiting Enzymes in the Common Pathway of Aromatic Amino-Acid Biosynthesis. Journal of the American Chemical Society*, 115(24):11581–11589.
- [Dodge and Gerstner, 2002] Dodge, T. C. and Gerstner, J. (2002). *Optimization of the glucose feed rate profile for the production of tryptophan from recombinant E.coli. Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77:1238–1245.

- [Dopheide et al., 1972] Dopheide, T. A., Crewther, P., and Davidson, B. E. (1972). *Chorismate mutase-prephenate dehydratase from Escherichia coli K-12. II. Kinetic properties. J Biol Chem*, 247(14):4447–52.
- [Doucette et al., 2011] Doucette, C. D., Schwab, D. J., Wingreen, N. S., and Rabinowitz, J. D. (2011). *α -Ketoglutarate coordinates carbon and nitrogen utilization via enzyme I inhibition. Nature Chemical Biology*, 7(12):894–901.
- [Duke et al., 1981] Duke, C. C., Macleod, J. K., and Williams, J. F. (1981). *Nuclear Magnetic-Resonance Studies of D-Erythrose 4-Phosphate in Aqueous-Solution - Structures of the Major Contributing Monomeric and Dimeric Forms. Carbohydrate Research*, 95(1):1–26.
- [Eck, 2010] Eck, A. (2010). *Establishment, Characterisation, and Scale-up of a Fermentation Process for the Production of L-Tryptophan by Escherichia coli JP6015 pMU91*. Master’s thesis, University of Stuttgart.
- [Eguchi et al., 2003] Eguchi, Y., Oshima, T., Mori, H., Aono, R., Yamamoto, K., Ishihama, A., and Utsumi, R. (2003). *Transcriptional regulation of drug efflux genes by EvgAS, a two-component system in Escherichia coli. Microbiology*, 149(Pt 10):2819–28.
- [Escherich, 1886] Escherich, T. (1886). *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung*.
- [Evonik, 2012] Evonik (2012). *Evonik Industries AG annual Report*.
- [Fell and Small, 1986] Fell, D. A. and Small, J. R. (1986). *Fat synthesis in adipose tissue. An examination of stoichiometric constraints. Biochem J*, 238(3):781–786.
- [Ferenci, 1999] Ferenci, T. (1999). *Regulation by nutrient limitation. Curr Opin Microbiol*, 2(2):208–213.
- [Ferguson, 1999] Ferguson, G. P. (1999). *Protective mechanisms against toxic electrophiles in Escherichia coli. Trends Microbiol*, 7(6):242–7.
- [Filippov et al., 2009] Filippov, D., Voroshilova, E., and Gusyatiner, M. (US 11 934890; 2009). *Method for producing an L-amino acid using bacterium of the enterobacteriaceae family with attenuated expression of the kefb gene*.

- [Flores et al., 1996] Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., and Valle, F. (1996). *Pathway engineering for the production of aromatic compounds in Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 14(5):620–3.
- [Frost, 1992] Frost, J. W. (US 5168056; 1992). *Enhanced production of common aromatic pathway compounds*.
- [Frost and Draths, 1995] Frost, J. W. and Draths, K. M. (1995). *Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds*. *Annu Rev Microbiol*, 49:557–79.
- [Gonzalez et al., 1997] Gonzalez, B., Francois, J., and Renaud, M. (1997). *A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol*. *Yeast*, 13(14):1347–55.
- [Gosset et al., 1996] Gosset, G., Yong-Xiao, J., and Berry, A. (1996). *A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in Escherichia coli*. *J Ind Microbiol*, 17(1):47–52.
- [Gulevich et al., 2006] Gulevich, A., Biryukova, I. V., Zimenkov, D. V., Skorokhodova, Y., Kivero, A., Belareva, A. V., and Mashko, S. V. (US 0035348; 2006). *Method for producing an l-aminoacid using a bacterium having enhanced expression of the pckA gene*.
- [Gulevich et al., 2009] Gulevich, A., Gaydenko, T. A., Ermishev, V. Y., Skorokhodova, A., Biryukova, I. V., and Mashko, S. V. (12 372060; 2009). *Method for producing an L-amino acid using bacterium of the enterobacteriaceae family with attenuated expression of the ydin gene or the ydib gene or combination thereof*.
- [Hardiman et al., 2007] Hardiman, T., Lemuth, K., Keller, M. A., Reuss, M., and Siemann-Herzberg, M. (2007). *Topology of the global regulatory network of carbon limitation in Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 132(4):359–374.
- [Harris et al., 2001] Harris, R. M., Webb, D. C., Howitt, S. M., and Cox, G. B. (2001). *A characterization of PitA and PitB from Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 183(17):5008–5014.
- [Hashimoto et al., 2009] Hashimoto, S., Harada, K., Kamada, N., and Nishitani, T. (US 12 374991; 2009). *Method for producing amino acid*.

- [Henderson and Brooks, 2006] Henderson, J., P. and Brooks, A. (2006). *Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals*. Technical report, Agilent Technology.
- [Hirakawa et al., 2010] Hirakawa, H., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A., and Nishino, K. (2010). *Indole enhances acid resistance in Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 49(3):90–94. 630IV Times Cited:2 Cited References Count:56.
- [Hogg, 1977] Hogg, R. W. (1977). *L-Arabinose transport and the L-arabinose binding protein of Escherichia coli*. *J Supramol Struct*, 6(3):411–417.
- [Hryniewicz et al., 1990] Hryniewicz, M., Sirko, A., Palucha, A., Boeck, A., and Hulanicka, D. (1990). *Sulfate and thiosulfate transport in Escherichia coli K-12 identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding*. *J Bacteriol*, 172(6):3358–3366.
- [Hsieh and Wanner, 2010] Hsieh, Y. J. and Wanner, B. L. (2010). *Global regulation by the seven-component Pi signaling system*. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2):198–203.
- [Hudson et al., 1983] Hudson, G. S., Howlett, G. J., and Davidson, B. E. (1983). *The binding of tyrosine and NAD+ to chorismate mutase/prephenate dehydrogenase from Escherichia coli K12 and the effects of these ligands on the activity and self-association of the enzyme. Analysis in terms of a model*. *J Biol Chem*, 258(5):3114–20.
- [Hurler, 2011] Hurler, T. (2011). *Prozessoptimierung und Charakterisierung der mikrobiellen Tryptophan-Produktion mit Escherichia coli JP6016/pMU91*. Master’s thesis, University of Stuttgart.
- [Iino et al., 2009] Iino, R., Hasegawa, R., Tabata, K. V., and Noji, H. (2009). *Mechanism of inhibition by C-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of Escherichia coli FoF1-ATP synthase*. *J Biol Chem*, 284(26):17457–17464.
- [Ikeda, 2006] Ikeda, M. (2006). *Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69(6):615–26.

- [InsilicoBiotechnology, 2013] InsilicoBiotechnology (2013). *User Manual Insilico Discovery Development Version 3.4*.
- [Irizarry et al., 2003] Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., and Speed, T. P. (2003). *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. *Biostatistics*, 4(2):249–264.
- [Ishige et al., 2003] Ishige, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V. F., and Sahm, H. (2003). *The phosphate starvation stimulon of Corynebacterium glutamicum determined by DNA microarray analyses*. *Journal of Bacteriology*, 185(15):4519–4529.
- [Iwanicka-Nowicka and Hryniewicz, 1995] Iwanicka-Nowicka, R. and Hryniewicz, M. M. (1995). *A new gene, cbl, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to Escherichia coli cys regulon*. *Gene*, 166(1):11–17.
- [Iwatani et al., 2009] Iwatani, S., Imaizumi, A., Usuda, Y., and Matsui, K. (US 12 055438; 2009). *L-amino acid-producing bacterium and a method for producing an L-amino acid*.
- [Iyo et al., 2009] Iyo, M., Takeshita, R., and Sugimoto, S. (US 12 137666; 2009). *L-amino acid producing bacterium and method for producing L-amino acid*.
- [Johansson and Liden, 2005] Johansson, L. and Liden, G. (2005). *Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of Escherichia coli W3110 at carbon- and phosphate-limited conditions*. *Journal of Biotechnology*, 118:S4–S5.
- [Kawai et al., 2005] Kawai, S., Mukai, T., Mori, S., Mikami, B., and Murata, K. (2005). *Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family*. *J Biosci Bioeng*, 99(4):320–330.
- [Kihira et al., 2012] Kihira, C., Hayashi, Y., Azuma, N., Noda, S., Maeda, S., Fukiya, S., Wada, M., Matsushita, K., and Yokota, A. (2012). *Alterations of glucose metabolism in Escherichia coli mutants defective in respiratory-chain enzymes*. *Journal of Biotechnology*, 158(4):215–223.
- [Kim et al., 2000] Kim, S. K., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A., Lee, K. S., Wanner, B. L., and Makino, K. (2000). *Dual transcriptional regulation of*

- the Escherichia coli phosphate-starvation-inducible psiE gene of the phosphate regulon by PhoB and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. Journal of Bacteriology*, 182(19):5596–5599.
- [Kishino et al., 2001] Kishino, H., Izui, M., Ono, Y., Ito, H., and Kurahashi, O. (US 09 011762; 2001). *Process for producing L-amino acids*.
- [Koebmann et al., 2002] Koebmann, B. J., Westerhoff, H. V., Snoep, J. L., Nilsson, D., and Jensen, P. R. (2002). *The glycolytic flux in Escherichia coli is controlled by the demand for ATP. Journal of Bacteriology*, 184(14):3909–3916.
- [Koehn et al., 1994] Koehn, S., Nelson, R., and P., T. (WO 9428154; 1994). *Methods for increasing carbon conversion efficiency in microorganisms*.
- [Kornberg et al., 1999] Kornberg, A., Rao, N. N., and Ault-Riche, D. (1999). *Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. Annual Review of Biochemistry*, 68:89–125.
- [Krol and Becker, 2004] Krol, E. and Becker, A. (2004). *Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in Sinorhizobium meliloti strains 1021 and 2011. Molecular Genetics and Genomics*, 272(1):1–17.
- [Kulaev, 1975] Kulaev, I. S. (1975). *Biochemistry of inorganic polyphosphates. Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 73:131–158.
- [Kuroda, 2006] Kuroda, A. (2006). *A polyphosphate-lon protease complex in the adaptation of Escherichia coli to amino acid starvation. Biosci Biotechnol Biochem*, 70(2):325–331.
- [Legout, 2010] Legout, S. (2010). *Jacques Monod (1910-1976) and his publications in the Annales de l'Institut Pasteur. Res Microbiol*, 161(2):74–76.
- [Lemuth et al., 2008] Lemuth, K., Hardiman, T., Winter, S., Pfeiffer, D., Keller, M. A., Lange, S., Reuss, M., Schmid, R. D., and Siemann-Herzberg, M. (2008). *Global transcription and metabolic flux analysis of Escherichia coli in glucose-limited fed-batch cultivations. Appl Environ Microbiol*, 74(22):7002–7015.
- [Lengeler et al., 1999] Lengeler, J., Drews, G., and Schlegel, H. (1999). *Biology of the Prokaryotes*. Blackwell Science.

- [Leuchtenberger et al., 2005] Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., and Drauz, K. (2005). *Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69(1):1–8.
- [Leyh et al., 1988] Leyh, T. S., Taylor, J. C., and Markham, G. D. (1988). *The sulfate activation locus of Escherichia coli K12 cloning, genetic, and enzymatic characterization*. *J Biol Chem*, 263(5):2409–2416.
- [Li and Frost, 1999] Li, K. and Frost, J. W. (1999). *Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: a comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources*. *Biotechnol Prog*, 15(5):876–83.
- [Li et al., 2006] Li, X.-D., Lupo, D., Zheng, L., and Winkler, F. (2006). *Structural and functional insights into the AmtB/Mep/Rh protein family*. *Transfus Clin Biol*, 13(1-2):65–69.
- [Liao et al., 1996] Liao, J. C., Hou, S. Y., and Chao, Y. P. (1996). *Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism*. *Biotechnol Bioeng*, 52(1):129–40.
- [Lindner et al., 2009] Lindner, S. N., Knebel, S., Wesseling, H., Schoberth, S. M., and Wendisch, V. F. (2009). *Exopolyphosphatases PPX1 and PPX2 from Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 75(10):3161–3170.
- [Liu and Ferenci, 1998] Liu, X. and Ferenci, T. (1998). *Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 180(15):3917–3922.
- [Loeffler, 2012] Loeffler, M. (2012). *Monitoring energy states of tryptophan biosynthesis under production relevant conditions, energy charge determination for Escherichia coli K12 JP6015 pMU91 in a fed-batch process*. Master’s thesis, University of Stuttgart.
- [Lowry et al., 1971] Lowry, O. H., Carter, J., Ward, J. B., and Glaser, L. (1971). *The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 246(21):6511–6521.
- [Lu and Liao, 1997] Lu, J. L. and Liao, J. C. (1997). *Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase*. *Biotechnol Bioeng*, 53(2):132–8.

- [MacQueen, 1967] MacQueen, J. (1967). *Some methods for classification and analysis of multivariate observations. Proc. Fifth Berkeley Symposium on Math. Statist. and Prob.*, 1:281–297.
- [Maier, 2004] Maier, T. (EP 1950287; 2004). *Varianten der β -Phosphoglyceratdehydrogenase mit reduzierter Hemmung durch L-Serin und dafuer codierende Gene.*
- [Makino et al., 2003] Makino, W., Cotner, J. B., Sterner, R. W., and Elser, J. J. (2003). *Are bacteria more like plants or animals? Growth rate and resource dependence of bacterial C : N : P stoichiometry. Functional Ecology*, 17(1):121–130.
- [Marzan and Shimizu, 2011] Marzan, L. W. and Shimizu, K. (2011). *Metabolic regulation of Escherichia coli and its phoB and phoR genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. Microbial Cell Factories*, 10.
- [Mascarenhas et al., 1991] Mascarenhas, D., Ashworth, D. J., and Chen, C. S. (1991). *Deletion of pgi alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of Escherichia coli. Appl Environ Microbiol*, 57(10):2995–9. Mascarenhas, D Ashworth, D J Chen, C S United states Applied and environmental microbiology Appl Environ Microbiol. 1991 Oct;57(10):2995-9.
- [Matsui et al., 1987] Matsui, K., Miwa, K., and Sano, K. (1987). *Two single-base-pair substitutions causing desensitization to tryptophan feedback inhibition of anthranilate synthase and enhanced expression of tryptophan genes of Brevibacterium lactofermentum. J Bacteriol*, 169(11):5330–5332.
- [Matuszewski et al., 2003] Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., and Chavez-Eng, C. M. (2003). *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal Chem*, 75(13):3019–30.
- [Mauch et al., 1997] Mauch, K., Arnold, S., and Reuss, M. (1997). *Dynamic sensitivity analysis for metabolic systems. Chemical Engineering Science*, 52(15):2589–2598.
- [Miller et al., 1987] Miller, J., Backman, K., OConnor, M., and Hatch, R. (1987). *Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolcarboxylase deficient mutants of E.coli. Journal of Industrial Microbiology*, 2:146–149.

- [Mizuno et al., 1983] Mizuno, T., Chou, M. Y., and Inouye, M. (1983). *A comparative study on the genes for three porins of the Escherichia coli outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated ompC gene. J Biol Chem*, 258(11):6932–6940.
- [Mullis et al., 1986] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–273.
- [Nagai et al., 2009] Nagai, Y., Hayashi, K., Ueda, T., Usuda, Y., and Matsui, K. (EP 2113570A1; 2009). *Method of producing L-Amino Acid*.
- [Neidhardt, 1996] Neidhardt, FC. Curtiss R. Ingraham JL. Lin, L. M. B. R. R. M. S. M. U. (1996). *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, Second Edition*.
- [Newman, 1985] Newman, E. (EP 0149539; 1985). *Mutant strains deficient in L-serine deaminase and use thereof*.
- [Nöh et al., 2007] Nöh, K., Gronke, K., Luo, B., Takors, R., Oldiges, M., and Wiechert, W. (2007). *Metabolic flux analysis at ultra short time scale: isotopically non-stationary ^{13}C labeling experiments. J Biotechnol*, 129(2):249–67.
- [Noda et al., 2006] Noda, S., Takezawa, Y., Mizutani, T., Asakura, T., Nishiumi, E., Onoe, K., Wada, M., Tomita, F., Matsushita, K., and Yokota, A. (2006). *Alterations of cellular physiology in Escherichia coli in response to oxidative phosphorylation impaired by defective F1-ATPase. J Bacteriol*, 188(19):6869–6876.
- [Norland et al., 1995] Norland, S., Fagerbakke, K. M., and Heldal, M. (1995). *Light element analysis of individual bacteria by x-ray microanalysis. Appl Environ Microbiol*, 61(4):1357–1362.
- [Oldiges et al., 2007] Oldiges, M., Lutz, S., Pflug, S., Schroer, K., Stein, N., and Wiendahl, C. (2007). *Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3):495–511.
- [Orth et al., 2010] Orth, J. D., Thiele, I., and Palsson, B. O. (2010). *What is flux balance analysis? Nature Biotechnology*, 28(3):245–248.

- [Oxender et al., 1979] Oxender, D. L., Zurawski, G., and Yanofsky, C. (1979). *Attenuation in the Escherichia coli tryptophan operon: role of RNA secondary structure involving the tryptophan codon region. Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(11):5524–5528.
- [Papoutsakis, 1984] Papoutsakis, E. T. (1984). *Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. Biotechnol Bioeng*, 26(2):174–187.
- [Patnaik and Liao, 1994] Patnaik, R. and Liao, J. C. (1994). *Engineering of Escherichia coli central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. Appl Environ Microbiol*, 60(11):3903–3908.
- [Patnaik et al., 1995] Patnaik, R., Spitzer, R. G., and Liao, J. C. (1995). *Pathway engineering for production of aromatics in Escherichia coli: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. Biotechnol Bioeng*, 46(4):361–370.
- [Pittard et al., 2005] Pittard, J., Camakaris, H., and Yang, J. (2005). *The TyrR regulon. Mol Microbiol*, 55(1):16–26.
- [Ponce et al., 1995] Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F., and Bolivar, F. (1995). *Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from Escherichia coli: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. J Bacteriol*, 177(19):5719–22.
- [Ramseier et al., 1995] Ramseier, T. M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R., and Saier, M. H., Jr. (1995). *The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in Escherichia coli. Mol Microbiol*, 16(6):1157–69.
- [Ramseier et al., 1993] Ramseier, T. M., Nègre, D., Cortay, J. C., Scarabel, M., Cozzone, A. J., and Saier, Jr, M. (1993). *In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the fru, pps, ace, pts and icd operons of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J Mol Biol*, 234(1):28–44.
- [Ran and Frost, 2007] Ran, N. and Frost, J. W. (2007). *Directed evolution of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase to replace 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase. J Am Chem Soc*, 129(19):6130–9.
- [Reitzer, 2003] Reitzer, L. (2003). *Nitrogen assimilation and global regulation in Escherichia coli. Annu Rev Microbiol*, 57:155–176.

- [Richards and Vanderpool, 2012] Richards, G. R. and Vanderpool, C. K. (2012). *Induction of the Pho Regulon Suppresses the Growth Defect of an Escherichia coli sgrS Mutant, Connecting Phosphate Metabolism to the Glucose-Phosphate Stress Response. Journal of Bacteriology*, 194(10):2520–2530.
- [Rodrigues et al., 2013] Rodrigues, A. L., Trachtmann, N., Becker, J., Lohanatha, A. F., Blotenberg, J., Bolten, C. J., Korneli, C., de Souza Lima, A. O., Porto, L. M., Sprenger, G. A., and Wittmann, C. (2013). *Systems metabolic engineering of Escherichia coli for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. Metab Eng*, 20:29–41.
- [Roh et al., 2010] Roh, S. W., Abell, G. C. J., Kim, K. H., Nam, Y. D., and Bae, J. W. (2010). *Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. Trends in Biotechnology*, 28(6):291–299.
- [Romeo, 1997] Romeo, T. (US 5684144; 1997). *Escherichia Coli csrA gene, protein encoded thereby, and methods of use thereof.*
- [Romeo, 2003] Romeo, T. (US 6,537,815 B2; 2003). *Method of altering the expression of CSRB to modify the Properties of a cell.*
- [Romeo et al., 1993] Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y., and Brun-Zinkernagel, A. M. (1993). Identification and molecular characterization of csra, a pleiotropic gene from escherichia coli that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol*, 175(15):4744–4755.
- [Rosenberg et al., 1977] Rosenberg, H., Gerdes, R. G., and Chegwidde, K. (1977). *Two systems for the uptake of phosphate in Escherichia coli. J Bacteriol*, 131(2):505–11. Rosenberg, H Gerdes, R G Chegwidde, K United states Journal of bacteriology J Bacteriol. 1977 Aug;131(2):505-11.
- [Russell, 2007] Russell, J. B. (2007). *The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1-3):1–11. 201CF Times Cited:31 Cited References Count:87.
- [Russell and Cook, 1995] Russell, J. B. and Cook, G. M. (1995). *Energetics of Bacterial-Growth - Balance of Anabolic and Catabolic Reactions. Microbiological Reviews*, 59(1):48–62. Qk986 Times Cited:258 Cited References Count:135.

- [Russo, 2003] Russo, E. (2003). *The birth of biotechnology*. *Nature*, 421(6921):456–457.
- [Rybak et al., 2006] Rybak, K., Slivinskaya, E., Voroshilova, E., and Kozlov, Y. (US 0160192; 2006). *A method for producing L-amino acid using a bacterium of the enterobacteriacear family having a pathway of glycogen biosynthesis disrupted*.
- [Sabnis et al., 1995] Sabnis, N. A., Yang, H., and Romeo, T. (1995). *Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in Escherichia coli via the gene csrA*. *J Biol Chem*, 270(49):29096–104.
- [Saier, 1996] Saier, Jr, M. (1996). *Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview*. *Res Microbiol*, 147(6-7):439–447.
- [Santillan and Mackey, 2001] Santillan, M. and Mackey, M. C. (2001). *Dynamic regulation of the tryptophan operon: a modeling study and comparison with experimental data*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4):1364–9.
- [Schaub et al., 2006] Schaub, J., Schiesling, C., Reuss, M., and Dauner, M. (2006). *Integrated sampling procedure for metabolome analysis*. *Biotechnol Prog*, 22(5):1434–42.
- [Schmid et al., 2004] Schmid, J. W., Mauch, K., Reuss, M., Gilles, E. D., and Kremling, A. (2004). *Metabolic design based on a coupled gene expression-metabolic network model of tryptophan production in Escherichia coli*. *Metab Eng*, 6(4):364–77.
- [Schuhmacher et al., 2014] Schuhmacher, T., Löffler, M., Hurler, T., and Takors, R. (2014). *Phosphate limited fed-batch processes: impact on carbon usage and energy metabolism in Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 190:96–104.
- [Schurig-Briccio et al., 2009] Schurig-Briccio, L. A., Farias, R. N., Rintoul, M. R., and Rapisarda, V. A. (2009). *Phosphate-Enhanced Stationary-Phase Fitness of Escherichia coli Is Related to Inorganic Polyphosphate Level*. *Journal of Bacteriology*, 191(13):4478–4481.
- [Schuster et al., 1999] Schuster, S., Dandekar, T., and Fell, D. A. (1999). *Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering*. *Trends Biotechnol*, 17(2):53–60.

- [Shapiro et al., 1969] Shapiro, J., Machattie, L., Eron, L., Ihler, G., Ippen, K., and Beckwith, J. (1969). *Isolation of pure lac operon DNA*. *Nature*, 224(5221):768–774.
- [Shendure and Ji, 2008] Shendure, J. and Ji, H. (2008). *Next-generation DNA sequencing*. *Nat Biotechnol*, 26(10):1135–1145.
- [Shimada et al., 2011] Shimada, T., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2011). *Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 193(3):649–59. Shimada, Tomohiro Yamamoto, Kaneyoshi Ishihama, Akira Research Support, Non-U.S. Gov't United States Journal of bacteriology J Bacteriol. 2011 Feb;193(3):649-59. Epub 2010 Nov 29.
- [Sirko et al., 1995] Sirko, A., Zatyka, M., Sadowy, E., and Hulanicka, D. (1995). *Sulfate and thiosulfate transport in Escherichia coli K-12 evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins*. *J Bacteriol*, 177(14):4134–4136.
- [Song and Park, 1998] Song, S. and Park, C. (1998). *Utilization of D-ribose through D-xylose transporter*. *FEMS Microbiol Lett*, 163(2):255–261.
- [Sprenger et al., 2001] Sprenger, G., Siewe, R., Sahm, H., Karutz, M., and Sonke, T. (US 6316232; 2001). *Microbial preparation of substances from aromatic metabolism*. US 6,316,232.
- [Spura et al., 2009] Spura, J., Reimer, L. C., Wieloch, P., Schreiber, K., Buchinger, S., and Schomburg, D. (2009). *A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast*. *Anal Biochem*, 394(2):192–201.
- [Stryer, 2002] Stryer, L. B. J. T. J. (2002). *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 5 edition.
- [Suziedeliene et al., 1999] Suziedeliene, E., Suziedelis, K., Garbenciute, V., and Normark, S. (1999). *The acid-inducible asr gene in Escherichia coli: Transcriptional control by the phoBR operon*. *Journal of Bacteriology*, 181(7):2084–2093.
- [Tatarko and Romeo, 2001] Tatarko, M. and Romeo, T. (2001). *Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 43(1):26–32.

- [Taymaz-Nikerel et al., 2010] Taymaz-Nikerel, H., Borujeni, A. E., Verheijen, P. J., Heijnen, J. J., and van Gulik, W. M. (2010). *Genome-derived minimal metabolic models for Escherichia coli MG1655 with estimated in vivo respiratory ATP stoichiometry*. *Biotechnol Bioeng*, 107(2):369–81.
- [Taymaz-Nikerel et al., 2009] Taymaz-Nikerel, H., de Mey, M., Ras, C., ten Pierick, A., Seifar, R. M., van Dam, J. C., Heijnen, J. J., and van Gulik, W. M. (2009). *Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in Escherichia coli*. *Anal Biochem*, 386(1):9–19.
- [Tönnessen, 2008] Tönnessen, S. (2008). *Etablierung einer GC/MS Methode zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite in E. coli im Fed-Batch Prozess*. Master’s thesis, Universität Stuttgart, Fachhochschule Esslingen.
- [Tweeddale et al., 1998] Tweeddale, H., Notley-McRobb, L., and Ferenci, T. (1998). *Effect of slow growth on metabolism of Escherichia coli, as revealed by global metabolite pool mmetabolomeänalysis*. *J Bacteriol*, 180(19):5109–5116.
- [Valle et al., 1996] Valle, F., Munoz, E., Ponce, E., Flores, N., and Bolivar, F. (1996). *Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node*. *Journal of Industrial Microbiology*, 17:458–462.
- [Valle et al., 2005] Valle, F., Noemi, M., and Berry, A. (US 0282257; 2005). *Application of glucose transport mutants for production of aromatic pathway compounds*.
- [Van Dien and Keasling, 1999] Van Dien, S. J. and Keasling, J. D. (1999). *Control of polyphosphate metabolism in genetically engineered Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(1-2):21–25.
- [van Gulik, 2010] van Gulik, W. M. (2010). *Fast sampling for quantitative microbial metabolomics*. *Curr Opin Biotechnol*, 21(1):27–34.
- [van Heeswijk et al., 2013] van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., and Boogerd, F. C. (2013). *Nitrogen assimilation in Escherichia coli: putting molecular data into a systems perspective*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(4):628–695.
- [VanBogelen et al., 1996] VanBogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L., and Neidhardt, F. C. (1996). *Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178(15):4344–4366.

- [Varma and Palsson, 1993] Varma, A. and Palsson, B. O. (1993). *Metabolic capabilities of Escherichia coli: I. synthesis of biosynthetic precursors and cofactors*. *J Theor Biol*, 165(4):477–502.
- [Varma and Palsson, 1994] Varma, A. and Palsson, B. O. (1994). *Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type Escherichia coli W3110*. *Appl Environ Microbiol*, 60(10):3724–3731.
- [Vielhauer et al., 2011] Vielhauer, O., Zakhartsev, M., Horn, T., Takors, R., and Reuss, M. (2011). *Simplified absolute metabolite quantification by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry on the basis of commercially available source material*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(32):3859–3870.
- [Villas-Boas et al., 2005] Villas-Boas, S. G., Hojer-Pedersen, J., Akesson, M., Smedsgaard, J., and Nielsen, J. (2005). *Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods*. *Yeast*, 22(14):1155–1169.
- [Wanner and Boline, 1990] Wanner, B. L. and Boline, J. A. (1990). *Mapping and Molecular-Cloning of the Phn (Psid) Locus for Phosphonate Utilization in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172(3):1186–1196.
- [Wanner and Chang, 1987] Wanner, B. L. and Chang, B. D. (1987). *The Phobr Operon in Escherichia coli K-12*. *Journal of Bacteriology*, 169(12):5569–5574.
- [Wanner and Metcalf, 1992] Wanner, B. L. and Metcalf, W. W. (1992). *Molecular Genetic-Studies of a 10.9-Kb Operon in Escherichia-Coli for Phosphonate Uptake and Biodegradation*. *Fems Microbiology Letters*, 100(1-3):133–139.
- [Werner, 2014] Werner, A. (2014). *Prozesstechnische Untersuchung elementarlimitierter Kultivierungen mit Echerichia coli*. Master’s thesis, University of Stuttgart.
- [Wich et al., 1994] Wich, G., Leinfelder, M., and Backman, K. (EP 0662143B1; 1994). *Microorganisms for the production of tryptophan and process for producing the same*.
- [Wiechert, 2001] Wiechert, W. (2001). *^{13}C metabolic flux analysis*. *Metab Eng*, 3(3):195–206.

- [Willsky and Malamy, 1980] Willsky, G. R. and Malamy, M. H. (1980). *Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 144(1):356–65.
- [Winder et al., 2008] Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S., Broadhurst, D., Jarvis, R., Stephens, G. M., and Goodacre, R. (2008). *Global metabolic profiling of Escherichia coli cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites*. *Anal Chem*, 80(8):2939–48.
- [Wu et al., 1995] Wu, L. F., Mandr, and Berthelot, M. A. (1995). *A family of homologous substrate-binding proteins with a broad range of substrate specificity and dissimilar biological functions*. *Biochimie*, 77(9):744–750.
- [Xu et al., 2010] Xu, F. G., Zou, L., and Ong, C. N. (2010). *Experiment-originated variations, and multi-peak and multi-origination phenomena in derivatization-based GC-MS metabolomics*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 29(3):269–280.
- [Yoshida et al., 2012] Yoshida, Y., Sugiyama, S., Oyamada, T., Yokoyama, K., and Makino, K. (2012). *Novel members of the phosphate regulon in Escherichia coli O157:H7 identified using a whole-genome shotgun approach*. *Gene*, 502(1):27–35.
- [Zhang et al., 2004] Zhang, Y., Cottet, S. E., and Ealick, S. E. (2004). *Structure of Escherichia coli AMP nucleosidase reveals similarity to nucleoside phosphorylases*. *Structure*, 12(8):1383–1394.
- [Zimenkov et al., 2005] Zimenkov, D. V., Gulevich, A., Skorokhodova, Y., Katschykina, J., Kivero, A., Biryukova, I. V., V.G., D., and Mashko, S. V. (US7531332?; 2005). *Method for producing L-aminoacids*.

A Anhang

Beigefügt sind ergänzende Daten aus Fermentationen, der Transkriptomanalyse sowie Modellbeschreibungen und Simulationsergebnisse.

A.1 Prozessdaten

Im Folgenden werden Konzentrationen und Kohlenstoffbilanzen einiger Prozesse dargestellt.

A.1.1 Referenzprozesse

Tabelle 34: Substratkonzentrationen der Referenzkultivierungen mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glc} [g/l]	SA [g/l]	c_{PO4} [g/l]	SA [g/l]	NH_4 [g/l]	V_r [l]
0,08	24,31	0,13			2,52	11,939
2,50	20,71	0,09	0,71	0,030	2,640	11,883
4,00	15,31	0,37	0,60	0,020	2,680	11,853
6,00	6,87	0,11	0,49	0,000	2,700	12,027
7,50	11,10	0,15	0,23	0,000	2,860	12,405
9,00	10,32	0,32	0,10	0,001	2,820	12,665
10,83	9,88	0,17	0,08	0,000	2,990	12,958
13,00	9,24	0,65	0,04	0,008	2,980	13,225
15,00	9,46	0,20	0,03	0,000	2,760	13,464
21,75	12,56	0,53	0,01	0,000	3,130	14,159
23,00	14,63	0,15			3,070	14,252
25,00	12,79	0,28			3,310	14,352
27,00	10,41	0,29			3,360	14,431
29,00	9,52	0,15			3,360	14,546
32,00	9,02	0,16			3,860	14,761

Tabelle 35: Produkt- und Biomassekonzentrationen der Referenzkultivierung mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_x [g/l]	SA [g/l]	c_{Ace} [g/l]	SA [g/l]	c_{Trp} [g/l]	SA [g/l]
0,08	1,14	0,02	0,14	0,01		
2,50	2,36	0,11	0,50	0,01	0,22	0,02
4,00	4,62	0,14	0,73	0,01	0,52	0,05
6,00	11,05	0,07	0,96	0,07	1,19	0,12
7,50	14,61	0,45	1,46	0,10	1,99	0,15
8,67	16,57	0,53	1,89	0,23	2,97	0,29
11,00	18,56	0,17	2,40	0,17	4,61	0,48
13,00	19,99	0,12	2,47	0,37	6,67	0,26
15,00	20,64	0,18	2,73	0,04	7,37	0,30
21,75	21,47	0,14	2,24	0,08	10,21	0,49
23,00	21,27	0,06	2,19	0,03	10,86	0,21
25,00	20,47	0,10	2,14	0,12	11,09	0,25
26,50	20,27	0,17	2,42	0,11	11,59	0,71
29,00	20,15	0,11	2,73	0,07	11,97	1,00
32,00	19,55	0,21	3,52	0,21	12,39	0,56

Tabelle 36: Nebenproduktkonzentrationen der Referenzkultivierung mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glu} [g/l]	SA [g/l]	c_{Phe} [g/l]	SA [g/l]	c_{Tyr} [g/l]	SA [g/l]
0,08						
2,50						
4,00						
6,00						
7,50						
8,67						
11,00			0,05	0,08		
13,00			0,28	0,04		
15,00			0,43	0,00	0,25	0,03
21,75	0,25	0,03	0,89	0,10	0,91	0,09
23,00	0,41	0,10	1,03	0,05	1,09	0,09
25,00	0,76	0,26	1,13	0,01	1,33	0,10
26,50	1,25	0,29	1,29	0,02	1,58	0,15
29,00	1,70	0,28	1,48	0,19	1,82	0,05
32,00	2,17	0,13	1,76	0,06	1,96	0,12

Tabelle 37: Wiedergefundene Kohlenstoffmengenanteile normiert auf die aufgenommenen Stoffmenge (mol %) der Referenzkultivierungen mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Tyr, L-Tyrosin;

Intervalle [h]	X	Ace	Trp	Glu	Phe	Tyr	CO ₂	Summe
0,08 - 4,0	42,01	4,76	5,44				29,22	81,44
4,0 - 7,5	39,03	2,42	9,79				35,62	86,86
7,5 - 10,83	18,22	3,80	19,19				42,40	83,61
10,83 - 15,0	12,40	2,04	24,83		1,33	2,80	47,51	90,91
15,0 - 21,68	7,19		14,33	0,65	3,38	3,42	52,54	81,50
21,68 - 27,0		1,50	7,91	3,61	4,92	2,75	55,20	75,88
27,0 - 32,0		5,03	12,44	7,61	4,61	4,98	48,36	83,02
Gesamt	16,02	2,70	14,60	1,60	2,10	2,10	46,00	83,32

A.1.2 Phosphatfütterungsszenario 2

Tabelle 38: Substratkonzentrationen der Kultivierungen mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 mit Phosphatfütterungsszenario 2 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glc} [g/l]	SA [g/l]	c_{PO_4} [g/l]	SA [g/l]	NH_4 [g/l]	V_r [l]
0	24,51	0,46	0,73	0,02	2,52	12,000
0,92	23,43	0,58	0,65	0,000	2,640	11,989
1,92	21,94	0,77	0,59	0,000	2,680	11,946
2,50	19,72	0,25	0,45	0,000	2,700	11,905
4,00	15,09	0,11	0,32	0,000	2,860	11,852
5,00	8,83	0,15	0,17	0,001	2,820	11,809
6,00	7,00	0,27	0,15	0,000	2,990	11,950
7,00	8,12	0,10	0,12	0,008	2,980	12,157
8,00	10,28	0,17	0,07	0,000	2,760	12,388
10,00	11,06	0,21	0,04	0,000	3,130	12,791
12,00	10,29	0,09	0,04	0,000	3,070	13,224
14,00	11,08	0,23	0,02	0,004	3,310	13,686
17,00	10,25	0,28	0,03	0,000	3,360	14,381
19,00	9,34	0,30	0,02	0,004	3,360	14,856
22,00	7,23	0,21	0,02	0,000	3,860	15,619
24,00	5,90	0,04	0,02	0,000	4,280	16,113

Tabelle 39: Produkt- und Biomassekonzentrationen des Phosphatfütterungszenario 2 mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_x [g/l]	SA [g/l]	c_{Ace} [g/l]	SA [g/l]	c_{Trp} [g/l]	SA [g/l]
0,00	0,92	0,03				
0,92	1,47	0,06	0,21	0,02		
1,92	2,01	0,03	0,37	0,01		
2,50	2,67	0,02	0,52	0,03	0,30	0,02
4,00	5,00	0,02	0,79	0,02	0,82	0,05
5,00	7,79	0,16	0,89	0,03		0,03
6,00	10,53	0,10	0,91	0,04	1,49	0,03
7,00	12,81	0,13	1,03	0,03		0,03
8,00	14,90	0,10	1,23	0,05	2,58	0,22
10,00	17,89	0,24	1,66	0,05	4,00	0,15
12,00	21,49	0,03	1,91	0,09	6,02	0,36
14,00	23,74	0,11	2,17	0,10	7,31	0,50
17,00	26,59	0,46	2,52	0,10	9,12	0,70
19,00	28,20	0,61	2,74	0,06	11,17	0,63
22,00	28,06	0,42	3,21	0,06	13,61	0,72
24,00	27,80	0,22	3,82	0,18	13,69	0,80

Tabelle 40: Nebenproduktkonzentrationen des Phosphatfütterungszenario 2 mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glu} [g/l]	SA [g/l]	c_{Phe} [g/l]	SA [g/l]	c_{Tyr} [g/l]	SA [g/l]
0,00						
10,00						
12,00						
14,00						
17,00					0,03	0,02
19,00					0,11	0,03
22,00	1,47	0,02	0,28	0,02	0,25	0,03
24,00	3,38	0,22	0,36	0,02	0,31	0,04

Tabelle 41: Wiedergefundene Kohlenstoff-Stoffmengenanteile normiert auf die aufgenommenen Stoffmenge (mol %) der Kultivierung mit Phosphatfütterungsszenario 2 mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin;

Intervalle [h]	Ace	Trp	Glu	Phe	Val	X	CO ₂	Summe
0,92 - 1,92	10,05	0,00				37,63	33,36	81,03
1,92 - 2,5	6,78	0,00				31,37	19,65	57,81
2,5 - 4,0	5,61	27,95				54,69	43,63	131,87
4,0 - 5,0	1,53	4,25				48,40	39,22	93,40
5,0 - 6,0	0,40	9,90				37,68	39,00	86,98
6,0 - 7,0	1,65	11,68				33,84	44,46	91,62
7,0 - 8,0	2,87	12,38				34,55	51,11	100,91
8,0 - 10,0	3,20	16,30				25,91	56,18	101,59
10,0 - 12,0	1,82	21,15				28,18	55,22	106,36
12,0 - 14,0	2,00	15,00				20,57	59,52	97,08
14,0 - 17,0	1,83	14,06			0,15	17,87	60,02	93,94
17,0 - 20,0	1,76	22,40			0,62	16,22	60,00	100,99
20,0 - 22,0	2,37	18,77	7,50	1,75	0,73	5,34	57,44	93,90
22,0 - 24,0	4,10	4,65	9,53	0,88	0,48	3,90	55,11	78,65
Gesamt	2,48	14,96	2,37	0,40	0,27	20,08	54,64	95,19

A.1.3 Phosphatfütterungsszenario 3

Tabelle 42: Substratkonzentrationen der Kultivierungen mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 mit Phosphatfütterungsszenario 3 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glc} [g/l]	SA [g/l]	c_{PO_4} [g/l]	SA [g/l]	NH_4 [g/l]	V_r [l]
0,00					2,49	12,000
0,03	22,90	0,05	0,38	0,008	2,560	11,989
0,92	22,10	0,25	0,33	0,014	2,650	11,946
2,00	19,73	0,50	0,30	0,024	2,810	11,905
2,50	19,13	0,33	0,27	0,012	2,860	11,852
3,92	13,79	0,10	0,19	0,002	2,980	11,809
5,92	8,97	0,24	0,17	0,003	3,050	11,950
7,92	9,43	0,19	0,13	0,003	3,010	12,157
10,92	8,12	0,13	0,08	0,002	3,110	12,388
13,50	8,45	0,27	0,06	0,001	3,050	12,791
17,17	8,36	0,20	0,05	0,003	2,960	13,224
20,00	8,26	0,25	0,04	0,001	2,970	13,686
22,00	7,54	0,17	0,05	0,001	2,990	14,381
25,00	6,51	0,08	0,03	0,001	3,300	14,856
28,00	5,10	0,06	0,03	0,000	3,870	15,619
30,00	4,58	0,10			4,370	16,113
32,00	4,69	0,06			5,090	16,139

Tabelle 43: Produkt- und Biomassekonzentrationen des Phosphatfütterungszenario 3 mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_x [g/l]	SA [g/l]	c_{Ace} [g/l]	SA [g/l]	c_{Trp} [g/l]	SA [g/l]
0,00						
0,03	0,93	0,01	0,08	0,01		
0,92	1,46	0,03	0,19	0,01		
2,00			0,40	0,01		
2,50	2,50	0,01	0,49	0,01	0,67	0,05
3,92	4,75	0,00	0,78	0,04	0,71	0,03
5,92	8,71	0,04	0,92	0,04	1,35	0,03
7,92	12,02	0,15	1,16	0,03	2,41	0,03
10,92	16,04	0,19	1,51	0,01	4,69	0,22
13,50	18,61	0,20	1,71	0,05		
17,17	21,41	0,09	1,88	0,02	8,93	0,36
20,00	22,94	0,14	1,98	0,02		
22,00	23,49	0,00	2,11	0,03	12,39	0,70
25,00	23,82	0,19	2,50	0,12	13,89	0,63
28,00	23,67	0,00	3,26	0,21	15,13	0,72
30,00	22,69	0,25	4,33	0,05		
32,00	22,30	0,02	6,32	0,00	15,12	0,42

Tabelle 44: Nebenproduktkonzentrationen des Phosphatfütterungsszenario 3 mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glu} [g/l]	SA [g/l]	c_{Phe} [g/l]	SA [g/l]	c_{Tyr} [g/l]	SA [g/l]
0,00						
0,03						
0,92						
2,00						
2,50						
3,92						
5,92						
7,92						
10,92						
13,50						
17,17					0,47	0,02
20,00						
22,00					0,67	0,03
25,00	1,47	0,02			0,99	0,03
28,00	3,38	0,22	0,14	0,02	1,21	0,04
30,00						
32,00	5,65	0,22	0,41	0,27	1,38	0,11

Tabelle 45: Wiedergefundene Kohlenstoff-Stoffmengenanteile normiert auf die aufgenommenen Stoffmenge (mol %) der Kultivierungen für Phosphatfütterungsszenario 3 mit *E. coli* K12 JP6015 pMU91 im Zeitverlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat; Trp, L-Tryptophan; Glu, L-Glutamat; Phe, L-Phenylalanin; Val, L-Valin

Intervalle [h]	Ace	Trp	Glu	Phe	Val	X	CO₂	Summe
0 - 2,5	10,21	26,83	0,00	0,00	0,00	43,36	30,11	110,51
2,5 - 5,92	2,57	6,56	0,00	0,00	0,00	40,91	40,39	90,42
5,92 - 7,92	1,98	13,84	0,00	0,00	0,00	30,39	47,83	94,04
7,92 - 10,92	1,92	19,32	0,00	0,00	0,00	24,27	54,05	99,56
10,92 - 17,17	1,11	18,64	0,00	0,00	1,45	17,07	58,92	97,19
17,17 - 22	1,26	21,85	0,00	0,00	0,98	13,64	62,78	100,51
22 - 25	2,35	15,76	7,75	0,00	2,28	6,21	61,46	95,80
25 - 28	4,67	16,48	10,71	1,19	1,81	6,04	57,68	98,58
28 - 32	14,14	3,46	10,84	2,01	1,20	-3,03	54,30	82,92
Gesamt	3,91	16,27	3,60	0,42	1,11	15,02	55,98	96,31

A.1.4 Phosphatfütterungsszenario 3, Wildtypstudien

Tabelle 46: Substratkonzentrationen der Kultivierungen von *E. coli* K12 W3110 mit Phosphatszenario 3 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glk} [g/l]	SA [g/l]	c_{PO_4} [g/l]	SA [g/l]	NH_4 [g/l]	V_r [l]
0,00	24,36	0,10	0,58	0,01	2,49	12,00
2,50	20,24	0,05	0,45	0,02	2,56	12,01
4,00	14,51	0,09	0,31	0,01	2,65	11,98
6,00	8,49	0,10	0,13	0,00	2,81	12,06
8,00	11,26	0,05	0,08	0,00	2,86	12,48
10,00	13,36	0,13	0,06	0,00	2,98	12,69
13,00	14,34	0,00	0,04	0,00	3,05	12,99
15,00	14,57	0,10	0,03	0,00	3,01	13,19
17,00	16,04	0,20	0,02	0,00	3,11	13,44
22,00	14,74	0,13	0,02	0,00	3,05	14,31
24,00	13,73	0,15	0,00		2,96	14,64
26,00	12,03	0,13			2,97	14,97
28,00	10,08	0,13			2,99	15,29
30,00	8,81	0,15			3,30	15,61
32,00	6,71	0,05			3,87	15,92

Tabelle 47: Produkt- und Biomassekonzentrationen des Phosphatfütterungszenario 3 mit *E. coli* K12 W3110 im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_x [g/l]	SA [g/l]	c_{Ace} [g/l]	SA [g/l]
0,00	1,07		0,10	0,00
2,50	2,88	0,10	0,62	0,01
4,00	4,73	0,08	1,04	0,01
6,00	8,20	0,05	1,62	0,01
8,00	12,61	0,03	1,15	0,02
10,00	15,89	0,05	1,18	0,02
13,00	19,77	0,20	1,47	0,06
15,00	22,29	0,24	1,68	0,02
17,00	24,47	0,06	1,85	0,01
22,00	28,60	0,26	2,16	0,02
24,00	29,77	0,34	2,15	0,01
26,00	31,05	0,26	2,47	0,03
28,00	32,35	0,10	2,66	0,06
30,00	33,61	0,15	2,80	0,01
32,00	34,51	0,21	2,81	0,02

Tabelle 48: Wiedergefundene Kohlenstoff-Stoffmengenanteile normiert auf die aufgenommenen Stoffmenge (mol %) der Kultivierungen mit Phosphatfütterungs-szenario 3 mit *E. coli* K12 W3110 im Zeitverlauf. X, Biomasse; Ace, Acetat

Intervalle [h]	Ace	X	CO₂	Summe
2,50	12,10	49,54	35,92	97,56
4,00	10,41	35,94	31,39	77,75
6,00	1,99	36,95	41,22	80,16
8,00	-4,36	51,62	55,87	103,12
10,00	1,88	38,11	58,33	98,32
13,00	2,14	30,55	62,50	95,19
15,00	1,04	28,69	63,04	92,77
17,00	1,17	30,58	79,27	111,02
22,00	1,80	22,16	73,53	97,48
24,00	1,43	17,18	76,44	95,04
26,00	1,69	17,52	75,28	94,49
28,00	1,44	17,61	75,81	94,86
30,00	2,13	18,16	80,31	100,59
32,00	0,79	14,15	79,34	94,28
Gesamt	2,00	27,00	70,00	99,00

A.1.5 Serielle Glukose- und Phosphatlimitierung

Tabelle 49: Produkt- und Biomassekonzentrationen von *E. coli* K12 JP6015 pMU91 mit serieller Glukose- und Phosphatlimitierung im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_x [g/l]	SA c_x [g/l]	c_{Ace} [g/l]	SA c_{Ace}	c_{Trp} [g/l]
1,27	2,03	0,01	0,39	0,00	0,17
2,52	3,27	0,00	0,67	0,01	0,10
4,52	6,48	0,06	0,04	0,01	0,45
6,52	11,62	0,06	0,02	0,03	0,97
8,52	15,82	0,07	0,63	0,03	2,68
10,52	16,96	0,07	0,58	0,03	2,80
12,52	17,72	0,13	0,80	0,04	3,97
14,52	18,08	0,05	1,05	0,04	4,90
16,52	18,24	0,03	1,25	0,06	5,44
20,10	18,02	0,14	1,73	0,02	6,74
22,10	17,89	0,15	2,09	0,08	7,56
24,10	17,95	0,37	2,44	0,06	8,06
26,10	17,09	0,29	2,91	0,10	8,62
28,10	17,56	0,05	3,67	0,06	9,05
30,10	16,45	0,15	4,30	0,14	9,43
31,85	15,92	0,22	6,21	0,10	9,35

Tabelle 50: Substratkonzentrationen der Kultivierungen von *E. coli* K12 JP6015 pMU91 mit serieller Glukose- und Phosphatlimitierung im Zeitverlauf

Prozesszeit [h]	c_{Glc} [g/l]	SA [g/l]	c_{PO_4} [g/l]	SA [g/l]	NH_4 [g/l]	V_r [l]
0	2,15	0,02	0,93	0,02	2,04	11,980
1,27	0,03	0,00	0,74	0,000	2,140	11,897
2,52	0,01	0,00	0,35	0,000	2,010	12,159
4,52	0,01	0,00	0,12	0,000	2,110	12,457
6,52	0,37	0,02	0,04	0,000	2,170	12,891
8,52	0,74	0,04	0,07	0,001	2,110	13,214
10,52	0,94	0,04	0,03	0,000	2,230	13,470
12,52	0,77	0,03	0,02	0,008	2,320	13,737
14,52	0,72	0,07	0,02	0,000	2,460	13,988
16,52	0,65	0,04	0,02	0,000	2,790	14,475
20,10	0,76	0,02	0,02	0,000	3,140	14,731
24,10	0,81	0,02			3,400	14,991
26,10	0,78	0,00			3,840	15,207
28,10	0,64	0,01			4,100	15,251
30,10	0,59	0,00			4,460	15,761
31,85	0,68	0,02			4,980	16,005

A.2 Modell

Modellname: *E. coli* Gesamtzelle

Datum: 12.12.2013 19:10:50

Alle durchgeführten Simulationen basierten auf einem gegebenen Referenzmodell mit einer Referenzbiomassekomposition (Taymaz-Nikerel et al 2010). Alle Austauschraten wurden auf eine Glukoseaufnahme von 100 [mol/(g h)] normiert. Abgeleitet von einem Insilico Discovery Standardmodell für *E. coli* (Chassagnole, Schmidt, Mauch et al) wurde zur Vermeidung einer Bilanzierung des gesamten h^+ Austausches für den Protonentransport der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung eine separate h^+ -Spezies eingeführt. Dabei wurden die Identifikatoren H_{in} und H_{out} für interne und externe h^+ -Ionen verwendet. Zusätzlich

zu Randbedingungen, die aus experimentell bestimmten Austauschraten abgeleitet wurden, wurden phasenspezifische Modellanpassungen für Aminosäuretransporter, das Verhältnis von H_{in} zu ATP (Entkopplung) der ATP-Synthase, die Stöchiometrie der Cytochromoxidase (UO) und die Biomassezusammensetzung angewendet. Letzteres beinhaltete den sinkenden Phosphorgehalt der Biomasse durch Reduktion des RNA-Gehalts. Zum Erhalt der Polymerkettenlänge wurde dabei RNA durch Wasser ersetzt. Im Falle der Cytochromoxidase wurde das stöchiometrische Verhältnis von Sauerstoffaufnahme zur Cytochromoxidation um 10 % reduziert.

A.2.1 Randbedingungen und Modifikationen

Tabelle 51: Molare Biomassezusammensetzung fuer ein artifizielles Biomassepolymer aus 100 Monomeren, angepasst nach [Taymaz-Nikerel et al., 2010]

Makromolekuel	Stoffmengenanteil [%]	Molekulargewicht [g]
Protein	23,1	71954,424
DNA	5,4	5318,588
RNA	49,90	3752,848
Lipide	2,2	40594,88
PolyZucker	8,7	1980
Murein	0,7	10307

Tabelle 52: Randbedingungen und Modellspezifikationen, *E. coli* JP6015 pMU91

Phase	Randbedingung	RNA-Reduktion [%]
18 h	Phosphataufnahme: 1.5 Acetat Export: 3 Trp Export: 12	81.4
21 h	Phosphataufnahme: 1.2 Acetat Export: 3 Trp Export: 11	82.6

Tabelle 53: Randbedingungen and Modellspezifikationen, *E. coli* W3110

Phase	Randbedingung	RNA-Reduktion [%]
18 h	Phosphataufnahme: 1.6 Acetat Export: 4.7	88.9
21 h	Phosphataufnahme: 1.2 Acetat Export: 5.2	90.6

Tabelle 54: Vergleich simulierter mit experimentell bestimmten Wachstumsraten für Prozessintervalle einer Fermentation mit Phosphatfütterungsszenario 2 und *E. coli* K12 JP6015 pMU91. Die angegebene Zeit stellt jeweils den Zeitpunkt der Intervallmitte dar.

Zeit [h]	μ , Experiment [1/h]	μ , Simulation [1/h]	Abweichung [%]
3	0,45	0,46	2,4
5	0,34	0,35	2,8
9	0,1	0,075	24,7
12	0,069	0,057	17,7
18	0,034	0,036	5,4
21	0,037	0,04	9,3
26	0,015	0,0165	10

A.2.2 Reaktionen

Identifikator : ACK

Gleichung : Acetylphosphat + ADP = Acetat + ATP

Identifikator : ADK

Gleichung : AMP + ATP = 2*ADP

Identifikator : AHyd

Gleichung : H₂O + ATP => ADP + Orthophosphat + h

Identifikator : AKDH

Gleichung : 2-Oxoglutarat + NAD + CoA => Succinyl-CoA + NADH + CO₂

Identifikator : AMPS

Gleichung : IMP + L-Aspartat + ATP => AMP + ADP + Orthophosphat + Fumarat + h

Identifikator : AceA

Gleichung : Isocitrat = Glyoxylat + Succinat

Identifikator : AceB

Gleichung : Acetyl-CoA + Glyoxylat + H₂O = L-Malat + CoA + h

Identifikator : AicarS

Gleichung : PRPP + 2*L-Glutamin + Glycin + 5*ATP + L-Aspartat + 10-Formyltetrahydrofolat + 4*H₂O + CO₂ => AICAR + 5*ADP + 7*Orthophosphat + 2*L-Glutamat + Tetrahydrofolat + Fumarat + 9*h

Identifikator : AkiS

Gleichung : 2*Pyruvat + NADPH + 2*h => 3-Methyl-2-oxobutanoat + CO₂ + NADP + H₂O

Identifikator : AlaR

Gleichung : L-Alanin = D-Alanin

Identifikator : AlaS

Gleichung : Pyruvat + L-Glutamat = L-Alanin + 2-Oxoglutarat

Identifikator : Aldo

Gleichung : D-Fruktose 1,6-bisphosphat = Glycerinphosphat + D-Glyceraldehyd 3-phosphat

Identifikator : ArgS

Gleichung : L-Ornithin + Carbamoylphosphat + L-Aspartat + ATP + H₂O = L-Arginin + Fumarat + AMP + 3*Orthophosphat + 4*h

Identifikator : AsnS

Gleichung : L-Aspartat + NH₄ + ATP + H₂O => L-Asparagin + 2*Orthophosphat + AMP + h

Identifikator : AspS

Gleichung : Oxaloacetat + L-Glutamat = L-Aspartat + 2-Oxoglutarat

Identifikator : CDPK

Gleichung : CTP + ADP = CDP + ATP

Identifikator : CMPK

Gleichung : CDP + ADP = CMP + ATP

Identifikator : CSA

Gleichung : Oxaloacetat + Acetyl-CoA + H₂O = Isocitrat + CoA + h

Identifikator : CTPS

Gleichung : UTP + L-Glutamin + ATP + H₂O => CTP + ADP + Orthophosphat + 2*h + L-Glutamat

Identifikator : CarpS

Gleichung : 2*H₂O + CO₂ + L-Glutamin + 2*ATP => Carbamoylphosphat + L-Glutamat + Orthophosphat + 2*ADP + 3*h

Identifikator : ChoS

Gleichung : 2-Dehydro-3-deoxy-D-arabino-heptonat 7-phosphat + Phosphoenolpyruvat + NADPH + ATP => Chorismat + ADP + 3*Orthophosphat + NADP + H₂O

Identifikator : CysS

Gleichung : L-Serin + Acetyl-CoA + H₂S => L-Cystein + CoA + Acetat + h

Identifikator : DAHPS

Gleichung : Phosphoenolpyruvat + D-Erythrose 4-phosphat + H₂O => 2-Dehydro-3-deoxy-D-arabino-heptonat 7-phosphat + Orthophosphat

Identifikator : DipS

Gleichung : L-Aspartat + Pyruvat + L-Glutamat + Succinyl-CoA + ATP + 2*NADPH + h => LL-2,6-Diaminoheptanedioat + 2-Oxoglutarat + Succinat + CoA + ADP + 2*NADP + Orthophosphat

Identifikator : ENO

Gleichung : D-Glycerat 2-phosphat = Phosphoenolpyruvat + H2O

Identifikator : FADHO

Gleichung : FADH2 + CoQ => CoQH2 + FAD

Identifikator : FATP

Gleichung : H out + 0.25*ADP + 0.25*Orthophosphat + 0.25*h => H in + 0.25*ATP + 0.25*H2O

Identifikator : FDH

Gleichung : Formiat + NAD = NADH + CO2

Identifikator : FU

Gleichung : Fumarat + H2O = L-Malat

Identifikator : G1PAT

Gleichung : alpha-D-Glukose 1-phosphat + ATP => ADP-Glukose + Pyrophosphat

Identifikator : G3PDH

Gleichung : Glyceronphosphat + NADH + h = sn-Glycerin 3-phosphat + NAD

Identifikator : G6PDH

Gleichung : beta-D-Glukose 6-phosphat + NADP + H2O => 6-Phospho-D-gluconate + NADPH + 2*h

Identifikator : GAPDH

Gleichung : D-Glyceraldehyd 3-phosphat + Orthophosphat + NAD = 3-Phospho-D-Glycerinphosphat + NADH + h

Identifikator : GMPS

Gleichung : IMP + NAD + ATP + L-Glutamin + 3*H₂O => GMP + AMP + NADH + 2*Orthophosphat + 4*h + L-Glutamat

Identifikator : GluR

Gleichung : L-Glutamat = D-Glutamat

Identifikator : GlumS

Gleichung : L-Glutamat + NH₄ + ATP = L-Glutamin + ADP + Orthophosphat

Identifikator : GlutS

Gleichung : NH₄ + 2-Oxoglutarat + NADPH + h => L-Glutamat + NADP + H₂O

Identifikator : GlyS

Gleichung : L-Serin + Tetrahydrofolat = Glycin + 5,10-Methylenetetrahydrofolat + H₂O

Identifikator : HisS

Gleichung : PRPP + L-Glutamin + ATP + 2*NAD + 5*H₂O => L-Histidin + AICAR + 2-Oxoglutarat + 2*NADH + 7*h + 5*Orthophosphat

Identifikator : HomS

Gleichung : L-Aspartat + ATP + 2*NADPH + 2*h = L-Homoserin + ADP + Orthophosphat + 2*NADP

Identifikator : ICD

Gleichung : Isocitrat + NAD = NADH + 2-Oxoglutarat + CO₂

Identifikator : IMPS

Gleichung : AICAR + 10-Formyltetrahydrofolat => Tetrahydrofolat + IMP + H₂O + 2*h

Identifikator : Ileus

Gleichung : L-Threonin + Pyruvat + NADPH + L-Glutamat + 2*h => L-Isoleucin + NH₄ + NADP + H₂O + CO₂ + 2-Oxoglutarat

Identifikator : LeuS

Gleichung : 3-Methyl-2-oxobutanoat + L-Glutamat + Acetyl-CoA + H₂O + NAD => L-Leucin + 2-Oxoglutarat + CoA + NADH + h + CO₂

Identifikator : LysS

Gleichung : LL-2,6-Diaminoheptanedioat + h => L-Lysin + CO₂

Identifikator : MDH

Gleichung : L-Malat + NAD = OxaloAcetat + NADH + h

Identifikator : MetS

Gleichung : L-Homoserin + Succinyl-CoA + L-Cystein + 5-Methyltetrahydrofolat + H₂O => L-Methionin + CoA + Succinat + Pyruvat + NH₄ + h + Tetrahydrofolat

Identifikator : MurS

Gleichung : 2*beta-D-Fruktose 6-phosphat + 2*L-Glutamin + 2*Acetyl-CoA + 7*ATP + Phosphoenolpyruvat + NADPH + L-Alanin + D-Glutamat + LL-2,6-Diaminoheptanedioat + D-Alanin + 5*H₂O => Murein subunit + 2*CoA + 2*L-Glutamat + 6*ADP + AMP + NADP + 11*Orthophosphat + 11*h

Identifikator : NADHO

Gleichung : NADH + h + CoQ + 4*H in => CoQH₂ + NAD + 4*H out

Identifikator : OrnS

Gleichung : $2 \cdot \text{L-Glutamat} + \text{Acetyl-CoA} + \text{ATP} + \text{NADPH} + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{L-Ornithin} + \text{2-Oxoglutarat} + \text{CoA} + \text{ADP} + \text{Orthophosphat} + \text{NADP} + \text{Acetat}$

Identifikator : PDH

Gleichung : $\text{Pyruvat} + \text{CoA} + \text{NAD} \Rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$

Identifikator : PFK

Gleichung : $\text{beta-D-Fruktose 6-phosphat} + \text{ATP} \Rightarrow \text{ADP} + \text{D-Fruktose 1,6-bisphosphat} + \text{h}$

Identifikator : PGDH

Gleichung : $\text{6-Phospho-D-gluconate} + \text{NADP} \Rightarrow \text{D-Ribulose 5-phosphat} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$

Identifikator : PGI

Gleichung : $\text{beta-D-Glukose 6-phosphat} = \text{beta-D-Fruktose 6-phosphat}$

Identifikator : PGK

Gleichung : $\text{3-Phospho-D-Glycerinphosphat} + \text{ADP} = \text{D-Glycerat 3-Phosphat} + \text{ATP}$

Identifikator : PGM

Gleichung : $\text{beta-D-Glukose 6-phosphat} = \text{alpha-D-Glukose 1-phosphat}$

Identifikator : PGluMu

Gleichung : $\text{D-Glycerat 3-Phosphat} = \text{D-Glycerat 2-phosphat}$

Identifikator : PK

Gleichung : $\text{Phosphoenolpyruvat} + \text{ADP} + \text{h} \Rightarrow \text{Pyruvat} + \text{ATP}$

Identifikator : PPase

Gleichung : Pyrophosphat + H₂O => 2*Orthophosphat

Identifikator : PTA

Gleichung : Orthophosphat + Acetyl-CoA = Acetylphosphat + CoA

Identifikator : PheS

Gleichung : Chorismat + L-Glutamat + h => L-Phenylalanin + 2-Oxoglutarat + CO₂ + H₂O

Identifikator : PpsA

Gleichung : Pyruvat + ATP + H₂O => Phosphoenolpyruvat + AMP + Orthophosphat + 2*h

Identifikator : ProS

Gleichung : L-Glutamat + ATP + 2*NADPH + h => L-Prolin + ADP + Orthophosphat + H₂O + 2*NADP

Identifikator : R5PI

Gleichung : D-Ribose 5-phosphat = D-Ribulose 5-phosphat

Identifikator : RPE

Gleichung : D-Ribulose 5-phosphat = D-Xylulose 5-phosphat

Identifikator : RPPK

Gleichung : ATP + D-Ribose 5-phosphat => AMP + h + PRPP

Identifikator : SDH

Gleichung : Succinat + FAD = Fumarat + FADH₂

Identifikator : SUS

Gleichung : Succinyl-CoA + ADP + Orthophosphat = Succinat + CoA + ATP

Identifikator : SerS

Gleichung : D-Glycerat 3-Phosphat + L-Glutamat + NAD + H₂O = L-Serin +
2-Oxoglutarat + Orthophosphat + NADH + h

Identifikator : SulRed

Gleichung : Sulfat + 2*ATP + 4*NADPH + 4*h => H₂S + 4*NADP + 2*ADP
+ 2*Orthophosphat + 2*H₂O

Identifikator : TA

Gleichung : Sedoheptulose 7-phosphat + D-Glyceraldehyd 3-phosphat = beta-D-
Fruktose 6-phosphat + D-Erythrose 4-phosphat

Identifikator : TIS

Gleichung : Glyceronphosphat = D-Glyceraldehyd 3-phosphat

Identifikator : TKa

Gleichung : D-Ribose 5-phosphat + D-Xylulose 5-phosphat = Sedoheptulose 7-
phosphat + D-Glyceraldehyd 3-phosphat

Identifikator : TKb

Gleichung : beta-D-Fruktose 6-phosphat + D-Glyceraldehyd 3-phosphat = D-
Erythrose 4-phosphat+ D-Xylulose 5-phosphat

Identifikator : ThrS

Gleichung : L-Homoserin + ATP + H₂O = L-Threonin + ADP + Orthophosphat
+ h

Identifikator : TrpS

Gleichung : Chorismat + L-Glutamin + PRPP + L-Serin => L-Tryptophan +

2*Orthophosphat + CO2 + D-Glyceraldehyd 3-phosphat + L-Glutamat + Pyruvat + H2O + 2*h

Identifikator : TyrS

Gleichung : Chorismat + L-Glutamat + NAD => L-Tyrosin + 2-Oxoglutarat + CO2 + NADH

Identifikator : UDPK

Gleichung : UDP + ATP = UTP + ADP

Identifikator : UMPK

Gleichung : UMP + ATP = UDP + ADP

Identifikator : UMPS

Gleichung : Carbamoylphosphat + L-Aspartat + 0.5*O2 + PRPP => UMP + H2O + CO2 + 3*Orthophosphat + h

Identifikator : UO

Gleichung : CoQH2 + 0.5*O2 + 4*H in => CoQ + H2O + 4*H out

Identifikator : ValS

Gleichung : 3-Methyl-2-oxobutanoat + L-Glutamat = L-Valin + 2-Oxoglutarat

Identifikator : accADBC fabD

Gleichung : 1.0*ACP + 1.0*Acetyl-CoA + 1.0*HCO3 + 1.0*ATP = 1.0*Malonyl-ACP + 1.0*CoA + 1.0*h + 1.0*ADP + 1.0*Orthophosphat

Identifikator : cynT

Gleichung : H2O + CO2 = HCO3 + h

Identifikator : dAS

Gleichung : $\text{ATP} + \text{NADPH} + \text{h} = \text{dATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}$

Identifikator : dCS

Gleichung : $\text{CDP} + \text{ATP} + \text{NADPH} + \text{h} = \text{dCTP} + \text{ADP} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$

Identifikator : dGS

Gleichung : $\text{GMP} + 2*\text{ATP} + \text{NADPH} + \text{h} = \text{dGTP} + 2*\text{ADP} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$

Identifikator : dTS

Gleichung : $\text{UDP} + 3*\text{ATP} + 2*\text{NADPH} + \text{H}_2\text{O} + 5,10\text{-Methylenetetrahydrofolat}$
 $\Rightarrow \text{dTTP} + 3*\text{ADP} + 2*\text{NADP} + 2*\text{Orthophosphat} + \text{Tetrahydrofolat}$

Identifikator : fThfS

Gleichung : $\text{Tetrahydrofolat} + \text{ATP} + \text{NADH} + \text{CO}_2 \Rightarrow 10\text{-Formyltetrahydrofolat}$
 $+ \text{ADP} + \text{Orthophosphat} + \text{NAD}$

Identifikator : fabABFGIZ

Gleichung : $1.0*\text{Acetoacetyl-ACP} + 7.0*\text{NADPH} + 10.0*\text{h} + 3.0*\text{Malonyl-ACP}$
 $= 1.0*2\text{-trans-Decenoyl-ACP} + 7.0*\text{NADP} + 4.0*\text{H}_2\text{O} + 3.0*\text{CO}_2 + 3.0*\text{ACP}$

Identifikator : fabABGIZ 161

Gleichung : $1.0*2\text{-trans-Decenoyl-ACP} + 3.0*\text{Malonyl-ACP} + 9.0*\text{h} + 6.0*\text{NADPH}$
 $= 3.0*\text{CO}_2 + 3.0*\text{ACP} + 6.0*\text{NADP} + 3.0*\text{H}_2\text{O} + 1.0*\text{cis-Hexadecenoyl-ACP}$

Identifikator : fabABGI 140

Gleichung : $1.0*\text{Dodecanoyl-ACP} + 3.0*\text{h} + 1.0*\text{Malonyl-ACP} + 2.0*\text{NADPH}$
 $= 1.0*\text{CO}_2 + 1.0*\text{ACP} + 2.0*\text{NADP} + 1.0*\text{Tetradecanoyl-ACP} + 1.0*\text{H}_2\text{O}$

Identifikator : fabAFGI 120

Gleichung : $3.0*\text{h} + 1.0*\text{Decanoyl-ACP} + 1.0*\text{Malonyl-ACP} + 1.0*\text{NADH} +$
 $1.0*\text{NADPH} = 1.0*\text{ACP} + 1.0*\text{CO}_2 + 1.0*\text{NAD} + 1.0*\text{Dodecanoyl-ACP} + 1.0*\text{NADP}$
 $+ 1.0*\text{H}_2\text{O}$

Identifikator : fabAFGI 160

Gleichung : $3.0 \cdot h + 1.0 \cdot \text{Tetradecanoyl-ACP} + 1.0 \cdot \text{Malonyl-ACP} + 2.0 \cdot \text{NADPH}$
 $= 1.0 \cdot \text{ACP} + 1.0 \cdot \text{CO}_2 + 1.0 \cdot \text{H}_2\text{O} + 1.0 \cdot \text{Hexadecanoyl-ACP} + 2.0 \cdot \text{NADP}$

Identifikator : fabAGHI 50

Gleichung : $3.0 \cdot h + 2.0 \cdot \text{NADPH} + 1.0 \cdot \text{Propionyl-CoA} + 1.0 \cdot \text{Malonyl-ACP} =$
 $1.0 \cdot \text{CO}_2 + 1.0 \cdot \text{CoA} + 2.0 \cdot \text{NADP} + 1.0 \cdot \text{H}_2\text{O} + 1.0 \cdot \text{Pentanoyl-ACP}$

Identifikator : fabBGIZ 150

Gleichung : $15.0 \cdot h + 10.0 \cdot \text{NADPH} + 1.0 \cdot \text{Pentanoyl-ACP} + 5.0 \cdot \text{Malonyl-ACP}$
 $\Rightarrow 5.0 \cdot \text{CO}_2 + 5.0 \cdot \text{ACP} + 10.0 \cdot \text{NADP} + 5.0 \cdot \text{H}_2\text{O} + 1.0 \cdot \text{Pentadecanoyl-ACP}$

Identifikator : fabBGIZ 170

Gleichung : $3.0 \cdot h + 1.0 \cdot \text{Pentadecanoyl-ACP} + 1.0 \cdot \text{Malonyl-ACP} + 2.0 \cdot \text{NADPH}$
 $= 1.0 \cdot \text{ACP} + 1.0 \cdot \text{CO}_2 + 1.0 \cdot \text{H}_2\text{O} + 1.0 \cdot \text{Heptadecanoyl-ACP} + 2.0 \cdot \text{NADP}$

Identifikator : fabBGIZ 181

Gleichung : $3.0 \cdot h + 1.0 \cdot \text{cis-Hexadecenoyl-ACP} + 1.0 \cdot \text{Malonyl-ACP} + 2.0 \cdot \text{NADPH}$
 $= 1.0 \cdot \text{ACP} + 1.0 \cdot \text{CO}_2 + 2.0 \cdot \text{NADP} + 1.0 \cdot \text{H}_2\text{O} + 1.0 \cdot \text{cis-Octadecenoyl-ACP}$

Identifikator : fabI 100

Gleichung : $2\text{-trans-Decenoyl-ACP} + \text{NADH} + h \Rightarrow \text{Decanoyl-ACP} + \text{NAD}$

Identifikator : fab BH

Gleichung : $1.0 \cdot h + 1.0 \cdot \text{Acetyl-CoA} + 1.0 \cdot \text{Malonyl-ACP} = 1.0 \cdot \text{CO}_2 + 1.0 \cdot \text{CoA}$
 $+ 1.0 \cdot \text{Acetoacetyl-ACP}$

Identifikator : fatty

Gleichung : $0.04 \cdot \text{Dodecanoyl-ACP} + 0.11 \cdot \text{Tetradecanoyl-ACP} + 0.11 \cdot \text{Pentadecanoyl-ACP}$
 $+ 0.35 \cdot \text{Hexadecanoyl-ACP} + 0.15 \cdot \text{cis-Hexadecenoyl-ACP} + 0.12 \cdot \text{Heptadecanoyl-ACP}$
 $+ 0.12 \cdot \text{cis-Octadecenoyl-ACP} = \text{Fettsaeure-ACP}$

Identifikator : meThfS

Gleichung : $\text{NADH} + \text{NH}_4 + \text{CO}_2 + 5,10\text{-Methylenetetrahydrofolat} = \text{NAD} + \text{Glycin} + \text{Tetrahydrofolat}$

Identifikator : myThfS

Gleichung : $\text{Tetrahydrofolat} + \text{CO}_2 + 3*\text{NADH} + 3*\text{h} \Rightarrow 5\text{-Methyltetrahydrofolat} + 3*\text{NAD} + 2*\text{H}_2\text{O}$

Identifikator : pgsA pgpA

Gleichung : $1.0*\text{H}_2\text{O} + 1.0*\text{sn-Glycerin 3-phosphat} + 1.0*\text{CDP-Diacylglycerin} = 1.0*\text{CMP} + 1.0*\text{h} + 1.0*\text{Orthophosphat} + 1.0*\text{Phosphatidylglycerin}$

Identifikator : plsB cdsA

Gleichung : $0.5*\text{CTP} + 0.5*\text{sn-Glycerin 3-phosphat} + 1.0*\text{Fettsaeure-ACP} = 1.0*\text{ACP} + 0.5*\text{Pyrophosphat} + 0.5*\text{CDP-Diacylglycerin}$

Identifikator : pssA psd

Gleichung : $1.0*\text{L-Serin} + 1.0*\text{CDP-Diacylglycerin} = 1.0*\text{CMP} + 1.0*\text{CO}_2 + 1.0*\text{Phosphatidylethanolamin}$

Identifikator : sdaA 1

Gleichung : $\text{L-Threonin} \Rightarrow 2\text{-Oxobutytrat} + \text{NH}_4$

Identifikator : tdcE 2

Gleichung : $2\text{-Oxobutytrat} + \text{CoA} = \text{Formiat} + \text{Propionyl-CoA}$

A.2.3 Transport

Identifikator : Ex.Bio

Gleichung : $\text{bio Fermenter} \Rightarrow \text{bio external}$

Identifikator : Ex.H2O

Gleichung : $\text{H}_2\text{O Fermenter} = \text{H}_2\text{O external}$

Identifikator : Ex.Acetat

Gleichung : $\text{Acetat Fermenter} = \text{Acetat external}$

Identifikator : Ex.co2

Gleichung : $\text{CO}_2 \text{ Fermenter} = \text{CO}_2 \text{ external}$

Identifikator : Ex.h

Gleichung : $\text{h Fermenter} = \text{h external}$

Identifikator : Ex.nh4

Gleichung : $\text{NH}_4 \text{ Fermenter} = \text{NH}_4 \text{ external}$

Identifikator : Ex.p

Gleichung : $\text{Orthophosphat Fermenter} = \text{Orthophosphat external}$

Identifikator : Ex.so4

Gleichung : $\text{Sulfat Fermenter} = \text{Sulfat external}$

Identifikator : Feed

Gleichung : $\text{beta-D-Glukose Fermenter} \leq \text{beta-D-Glukose external}$

Identifikator : Glu T

Gleichung : $1 * \text{L-Glutamat Cytosol} = > 1 * \text{L-Glutamat Fermenter}$

Identifikator : PTS

Gleichung : $\text{beta-D-Glukose Fermenter} + \text{Phosphoenolpyruvat Cytosol} = > \text{beta-D-Glukose 6-phosphat Cytosol} + \text{Pyruvat Cytosol}$

Identifikator : Phe Tirr

Gleichung : $1 \cdot \text{L-Phenylalanin Cytosol} \Rightarrow 1 \cdot \text{L-Phenylalanin Fermenter}$

Identifikator : T.Bio

Gleichung : $\text{bio Cytosol} \Rightarrow \text{bio Fermenter}$

Identifikator : T.H2O

Gleichung : $\text{H}_2\text{O Cytosol} = \text{H}_2\text{O Fermenter}$

Identifikator : T.NH4

Gleichung : $\text{NH}_4 \text{ Fermenter} = \text{NH}_4 \text{ Cytosol}$

Identifikator : T.O2

Gleichung : $1 \cdot \text{O}_2 \text{ Fermenter} \Rightarrow 1 \cdot \text{O}_2 \text{ Cytosol}$

Identifikator : T.h

Gleichung : $\text{h Cytosol} = \text{h Fermenter}$

Identifikator : T.o2 ex

Gleichung : $\text{O}_2 \text{ Fermenter} = \text{O}_2 \text{ external}$

Identifikator : T.p

Gleichung : $2 \cdot \text{Orthophosphat Cytosol} + \text{h Cytosol} + \text{ADP Cytosol} \leq \text{Orthophosphat Fermenter} + \text{ATP Cytosol} + \text{H}_2\text{O Cytosol}$

Identifikator : T.so4

Gleichung : $\text{Sulfat Cytosol} + \text{h Cytosol} + \text{ADP Cytosol} + \text{Orthophosphat Cytosol} \leq \text{Sulfat Fermenter} + \text{ATP Cytosol} + \text{H}_2\text{O Cytosol}$

Identifikator : T CO2

Gleichung : $1 \cdot \text{CO}_2 \text{ Fermenter} \leq 1 \cdot \text{CO}_2 \text{ Cytosol}$

Identifikator : T Glu EX

Gleichung : $1 \cdot \text{L-Glutamat Fermenter} \Rightarrow 1 \cdot \text{L-Glutamat external}$

Identifikator : T Phe EX

Gleichung : $1 \cdot \text{L-Phenylalanin Fermenter} \Rightarrow 1 \cdot \text{L-Phenylalanin external}$

Identifikator : T Tyr EX

Gleichung : $1 \cdot \text{L-Tyrosin Fermenter} \Rightarrow 1 \cdot \text{L-Tyrosin external}$

Identifikator : T Acetat export

Gleichung : $1 \cdot \text{Acetat Cytosol} \Rightarrow 1 \cdot \text{Acetat Fermenter}$

Identifikator : Trp Tirr

Gleichung : $1 \cdot \text{L-Tryptophan Cytosol} \Rightarrow 1 \cdot \text{L-Tryptophan Fermenter}$

Identifikator : Trp ex

Gleichung : $\text{L-Tryptophan Fermenter} = \text{L-Tryptophan external}$

Identifikator : Tyr Tirr

Gleichung : $1 \cdot \text{L-Tyrosin Cytosol} \Rightarrow 1 \cdot \text{L-Tyrosin Fermenter}$

A.2.4 Polymerisation

Identifikator : Bios Nikerel

Gleichung : $5.4 \cdot \text{DNA} + 10 \cdot \text{H}_2\text{O} + 2.2 \cdot \text{Lipid} + 0.7 \cdot \text{Mur} + 23.1 \cdot \text{Protein} + 49.9 \cdot \text{RNA} + 8.7 \cdot \text{polys} = \text{bio}$

Identifikator : DNAPol

Gleichung : $2.71 \cdot \text{dATP} + 2.79 \cdot \text{dGTP} + 2.71 \cdot \text{dTTP} + 2.79 \cdot \text{dCTP} + 10 \cdot \text{ATP} + 10 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{DNA} + 10 \cdot \text{ADP} + 10 \cdot \text{Orthophosphat} + 10 \cdot \text{h}$

Identifikator : LipidPol

Gleichung : $31.99 \cdot \text{Phosphatidylglycerin} + 97.01 \cdot \text{Phosphatidylethanolamin} = \text{Lipid}$

Identifikator : MurPol

Gleichung : $11 \cdot \text{Murein subunit} = \text{Mur} + 20 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Identifikator : Protpol

Gleichung : $35.84 \cdot \text{L-Alanin} + 16 \cdot \text{L-Arginin} + 16 \cdot \text{L-Aspartat} + 16 \cdot \text{L-Asparagin} + 5.44 \cdot \text{L-Cystein} + 17.92 \cdot \text{L-Glutamat} + 17.92 \cdot \text{L-Glutamin} + 27.52 \cdot \text{Glycin} + 5.44 \cdot \text{L-Histidin} + 14.72 \cdot \text{L-Isoleucin} + 29.12 \cdot \text{L-Leucin} + 17.92 \cdot \text{L-Lysin} + 7.68 \cdot \text{L-Methionin} + 10.88 \cdot \text{L-Phenylalanin} + 13.44 \cdot \text{L-Prolin} + 15.68 \cdot \text{L-Serin} + 16.96 \cdot \text{L-Threonin} + 3.52 \cdot \text{L-Tryptophan} + 8.96 \cdot \text{L-Tyrosin} + 23.04 \cdot \text{L-Valin} + 1276 \cdot \text{ATP} + 1276 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{Protein} + 1276 \cdot \text{ADP} + 1276 \cdot \text{Orthophosphat} + 1276 \cdot \text{h}$

Identifikator : RNAPol

Gleichung : $2.88 \cdot \text{AMP} + 3.54 \cdot \text{GMP} + 2.38 \cdot \text{UMP} + 2.2 \cdot \text{CMP} + 30 \cdot \text{ATP} + 30 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{RNA} + 30 \cdot \text{ADP} + 30 \cdot \text{Orthophosphat} + 30 \cdot \text{h}$

Identifikator : SPol

Gleichung : $10 \cdot \text{ADP-Glukose} + 1 \cdot \text{alpha-D-Glukose 1-phosphat} = \text{polys} + 10 \cdot \text{ADP} + 10 \cdot \text{h}$

A.2.5 Komponenten

Identifikator : 10-Formyltetrahydrofolat

Identifikator : 2-Dehydro-3-deoxy-D-arabino-heptonate 7-phosphat

Identifikator : 2-Oxobutytrat

Identifikator : 2-Oxoglutarat

Identifikator : 2-trans-Decenoyl-ACP

Identifikator : 3-Methyl-2-oxobutanoat

Identifikator : 3-Phospho-D-Glycerinphosphat

Identifikator : 5,10-Methylenetetrahydrofolat

Identifikator : 5-Methyltetrahydrofolat

Identifikator : 6-Phospho-D-gluconate

Identifikator : ACP

Identifikator : ADP

Identifikator : ADP-Glukose

Identifikator : AICAR

Identifikator : AMP

Identifikator : ATP

Identifikator : Acetat

Identifikator : Acetoacetyl-ACP

Identifikator : Acetyl-CoA

Identifikator : Acetylphosphat

Identifikator : CDP

Identifikator : CDP-Diacylglycerin

Identifikator : CMP

Identifikator : CO₂

Identifikator : CTP

Identifikator : Carbamoylphosphat

Identifikator : Chorismat

Identifikator : CoA

Identifikator : CoQ

Identifikator : CoQH₂

Identifikator : D-Alanin

Identifikator : D-Erythrose 4-phosphat

Identifikator : D-Fruktose 1,6-bisphosphat

Identifikator : D-Glutamat

Identifikator : D-Glyceraldehyd 3-phosphat

Identifikator : D-Glycerat 2-phosphat

Identifikator : D-Glycerat 3-Phosphat

Identifikator : D-Ribose 5-phosphat

Identifikator : D-Ribulose 5-phosphat

Identifikator : D-Xylulose 5-phosphat

Identifikator : DNA

Identifikator : Decanoyl-ACP

Identifikator : Dodecanoyl-ACP

Identifikator : FAD

Identifikator : FADH₂

Identifikator : Formiat

Identifikator : Fumarat

Identifikator : GMP

Identifikator : Glyceronphosphat

Identifikator : Glycin

Identifikator : Glyoxylat

Identifikator : H₂O

Identifikator : H₂O

Identifikator : H₂O

Identifikator : H₂S

Identifikator : HCO₃

Identifikator : H in

Identifikator : H out

Identifikator : Heptadecanoyl-ACP

Identifikator : Hexadecanoyl-ACP

Identifikator : IMP

Identifikator : Isocitrat

Identifikator : L-Alanin

Identifikator : L-Arginin

Identifikator : L-Asparagin

Identifikator : L-Aspartat

Identifikator : L-Cystein

Identifikator : L-Glutamat

Identifikator : L-Glutamin

Identifikator : L-Histidin

Identifikator : L-Homoserin

Identifikator : L-Isoleucin

Identifikator : L-Leucin

Identifikator : L-Lysin

Identifikator : L-Malat

Identifikator : L-Methionin

Identifikator : L-Ornithin

Identifikator : L-Phenylalanin

Identifikator : L-Prolin

Identifikator : L-Serin

Identifikator : L-Threonin

Identifikator : L-Tryptophan

Identifikator : L-Tyrosin

Identifikator : L-Valin

Identifikator : LL-2,6-Diaminoheptanedioat

Identifikator : Lipid

Identifikator : Malonyl-ACP

Identifikator : Mur

Identifikator : Murein subunit

Identifikator : NAD

Identifikator : NADH

Identifikator : NADP

Identifikator : NADPH

Identifikator : NH₄

Identifikator : O₂

Identifikator : Orthophosphat

Identifikator : OxaloAcetat

Identifikator : PRPP

Identifikator : Pentadecanoyl-ACP

Identifikator : Pentanoyl-ACP

Identifikator : Phosphatidylethanolamin

Identifikator : Phosphatidylglycerin

Identifikator : Phosphoenolpyruvat

Identifikator : Propionyl-CoA

Identifikator : Protein

Identifikator : Pyrophosphat

Identifikator : Pyruvat

Identifikator : RNA

Identifikator : Sedoheptulose 7-phosphat

Identifikator : Succinat

Identifikator : Succinyl-CoA

Identifikator : Sulfat

Identifikator : Tetradecanoyl-ACP

Identifikator : Tetrahydrofolat

Identifikator : UDP

Identifikator : UMP

Identifikator : UTP

Identifikator : alpha-D-Glukose 1-phosphat

Identifikator : beta-D-Fruktose 6-phosphat

Identifikator : beta-D-Glukose

Identifikator : beta-D-Glukose 6-phosphat

Identifikator : bio

Identifikator : cis-Hexadecenoyl-ACP

Identifikator : cis-Octadecenoyl-ACP

Identifikator : dATP

Identifikator : dCTP

Identifikator : dGTP

Identifikator : dTTP

Identifikator : Fettsaeure-ACP

Identifikator : h

Identifikator : polys

Identifikator : sn-Glycerin 3-phosphat

A.2.6 Enzyme und Gene

Source ID : EG10078

Gen : *aroF*

Source ID : EG11699

Gen : *pgmA*

Source ID : EG12100

Gen : *tktB*

Source ID : EG12164

Gen : *ytjC*

Source ID : EG11827

Gen : *alsI*

Source ID : EG10774

Gen : *prsA*

Source ID : EG10358

Gen : *fumC*

Source ID : EG10934

Gen : *sdhD*

Source ID : EG10357

Gen : *fumB*

Source ID : EG10933

Gen : *sdhC*

Source ID : EG10356

Gen : *fumA*

Source ID : EG10932

Gen : *sdhB*

Source ID : EG10931

Gen : *sdhA*

Source ID : EG10930

Gen : *sdaA*

Source ID : EG11015

Gen : *tpiA*

Source ID : EG10804

Gen : *pykF*

Source ID : EG10803

Gen : *pykA*

Source ID : EG10258

Gen : *eno*

Source ID : EG10576

Gen : *mdh*

Source ID : EG11528

Gen : *fabI*

Source ID : EG11556

Gen : *talB*

Source ID : EG10282

Gen : *fbaA*

Source ID : EG10703

Gen : *pgk*

Source ID : EG10702

Gen : *pgi*

Source ID : G7129

Gen : *fbaB*

Source ID : EG10700

Gen : *pfkB*

Source ID : EG10411

Gen : *gnd*

Source ID : EG11427

Gen : *tktA*

Source ID : EG10699

Gen : *pfkA*

Source ID : EG10982

Gen : *sucD*

Source ID : EG10981

Gen : *sucC*

Source ID : EG12144

Gen : *pgm*

Source ID : M004

Gen : *rpe*

Source ID : EG10176

Gen : *cynT*

Source ID : EG12296

Gen : *pgmI*

Source ID : EG11797

Gen : *talA*

Source ID : EG11443

Gen : *rpiA*

Source ID : G7627

Gen : *tdcE*

Source ID : EG10367

Gen : *gapA*

A.2.7 Bilanzierte Komponenten

10-Formyltetrahydrofolat Cytosol

2-Dehydro-3-deoxy-D-arabino-heptonate 7-phosphat Cytosol

2-Oxobutyrat Cytosol

2-Oxoglutarat Cytosol

2-trans-Decenoyl-ACP Cytosol
3-Methyl-2-oxobutanoat Cytosol
3-Phospho-D-Glycerinphosphat Cytosol
5,10-Methylenetetrahydrofolat Cytosol
5-Methyltetrahydrofolat Cytosol
6-Phospho-D-gluconate Cytosol
ACP Cytosol
ADP Cytosol
ADP-Glukose Cytosol
AICAR Cytosol
AMP Cytosol
ATP Cytosol
Acetat Cytosol
Acetat Fermenter
Acetoacetyl-ACP Cytosol
Acetyl-CoA Cytosol
Acetylphosphat Cytosol
CDP Cytosol
CDP-Diacylglycerin Cytosol
CMP Cytosol
CO₂ Cytosol
CO₂ Fermenter
CTP Cytosol
Carbamoylphosphat Cytosol
Chorismat Cytosol
CoA Cytosol
CoQ Cytosol
CoQH₂ Cytosol
D-Alanin Cytosol
D-Erythrose 4-phosphat Cytosol
D-Fruktose 1,6-bisphosphat Cytosol
D-Glutamat Cytosol
D-Glyceraldehyd 3-phosphat Cytosol
D-Glycerat 2-phosphat Cytosol
D-Glycerat 3-Phosphat Cytosol
D-Ribose 5-phosphat Cytosol

D-Ribulose 5-phosphat Cytosol
D-Xylulose 5-phosphat Cytosol
DNA Cytosol
Decanoyl-ACP Cytosol
Dodecanoyl-ACP Cytosol
FAD Cytosol
FADH2 Cytosol
Formiat Cytosol
Fumarat Cytosol
GMP Cytosol
Glyceronphosphat Cytosol
Glycin Cytosol
Glyoxylat Cytosol
H2O Cytosol
H2O Fermenter
H2S Cytosol
HCO3 Cytosol
H in Cytosol
H out Cytosol
Heptadecanoyl-ACP Cytosol
Hexadecanoyl-ACP Cytosol
IMP Cytosol
Isocitrat Cytosol
L-Alanin Cytosol
L-Arginin Cytosol
L-Asparagin Cytosol
L-Aspartat Cytosol
L-Cystein Cytosol
L-Glutamat Cytosol
L-Glutamat Fermenter
L-Glutamin Cytosol
L-Histidin Cytosol
L-Homoserin Cytosol
L-Isoleucin Cytosol
L-Leucin Cytosol
L-Lysin Cytosol

L-Malat Cytosol
L-Methionin Cytosol
L-Ornithin Cytosol
L-Phenylalanin Cytosol
L-Phenylalanin Fermenter
L-Prolin Cytosol
L-Serin Cytosol
L-Threonin Cytosol
L-Tryptophan Cytosol
L-Tryptophan Fermenter
L-Tyrosin Cytosol
L-Tyrosin Fermenter
L-Valin Cytosol
LL-2,6-Diaminoheptanedioat Cytosol
Lipid Cytosol
Malonyl-ACP Cytosol
Mur Cytosol
Murein subunit Cytosol
NAD Cytosol
NADH Cytosol
NADP Cytosol
NADPH Cytosol
NH₄ Cytosol
NH₄ Fermenter
O₂ Cytosol
O₂ Fermenter
Orthophosphat Cytosol
Orthophosphat Fermenter
OxaloAcetat Cytosol
PRPP Cytosol
Pentadecanoyl-ACP Cytosol
Pentanoyl-ACP Cytosol
Phosphatidylethanolamin Cytosol
Phosphatidylglycerin Cytosol
Phosphoenolpyruvat Cytosol
Propionyl-CoA Cytosol

Protein Cytosol
Pyrophosphat Cytosol
Pyruvat Cytosol
RNA Cytosol
Sedoheptulose 7-phosphat Cytosol
Succinat Cytosol
Succinyl-CoA Cytosol
Sulfat Cytosol
Sulfat Fermenter
Tetradecanoyl-ACP Cytosol
Tetrahydrofolat Cytosol
UDP Cytosol
UMP Cytosol
UTP Cytosol
alpha-D-Glukose 1-phosphat Cytosol
beta-D-Fruktose 6-phosphat Cytosol
beta-D-Glukose Fermenter
beta-D-Glukose 6-phosphat Cytosol
bio Fermenter
bio Cytosol
cis-Hexadecenoyl-ACP Cytosol
cis-Octadecenoyl-ACP Cytosol
dATP Cytosol
dCTP Cytosol
dGTP Cytosol
dTTP Cytosol
Fettsaeure-ACP Cytosol
h Cytosol
h Fermenter
polys Cytosol
sn-Glycerin 3-phosphat Cytosol

Tabelle 56: Finale Stöchiometrie von Elementarmoden normiert auf die Glukoseaufnahme zur Berechnung maximaler theoretischer Ausbeuten

$1.0 \times \text{Glukose} + 0.9 \times \text{Ammonium} + 0.72\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0.21\text{E-}1 \times \text{Sulfat} + 1.91 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.75 \times h + 2.23 \times \text{CO}_2 + 7.13\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3.85 \times \text{H}_2\text{O}$
$1.0 \times \text{Glukose} + 2.0 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 2.0 \times h + 2.0 \times \text{Acetat} + 2.0 \times \text{CO}_2 + 2.0 \times \text{H}_2\text{O}$
$1.0 \times \text{Glukose} + 6.0 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 6.0 \times \text{CO}_2 + 6.0 \times \text{H}_2\text{O}$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.92 \times \text{Ammonium} + 0.74\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0.22\text{E-}1 \times \text{Sulfat} + 1.82 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.76 \times h + 2.15 \times \text{CO}_2 + 7.29\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3.80 \times \text{H}_2\text{O}$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.9 \times \text{Ammonium} + 0.72\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0.21\text{E-}1 \times \text{Sulfat} + 1.83 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.79 \times h + 0.47\text{E-}1 \times \text{Acetat} + 2.15 \times \text{CO}_2 + 7.11\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3.76 \times \text{H}_2\text{O}$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.5 \times \text{Ammonium} + 1.16 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 1.41 \times h + 0.91 \times \text{Acetat} + 1.41 \times \text{CO}_2 + 3.15 \times \text{H}_2\text{O}$
$+ 0.25 \times \text{L-Tryptophan} + 0.25 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.5 \times \text{Ammonium} + 2.81 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.5 \times h + 3.24 \times \text{CO}_2 + 4.62 \times \text{H}_2\text{O} + 0.25 \times \text{L-Tryptophan} + 0.62 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.51 \times \text{Ammonium} + 0.52\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.28\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1.25 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 1.35 \times h + 0.85 \times \text{Acetat} + 1.54 \times \text{CO}_2 + 9.23\text{E-}6 \times \text{Bio} + 3.10 \times \text{H}_2\text{O}$
$+ 0.2 \times \text{L-Tryptophan} + 0.27 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.51 \times \text{Ammonium} + 0.52\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.28\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1.26 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 1.35 \times h + 0.85 \times \text{Acetat} + 1.55 \times \text{CO}_2 + 9.23\text{E-}6 \times \text{Bio} + 3.11 \times \text{H}_2\text{O} +$
$0.2 \times \text{L-Tryptophan} + 0.28 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.51 \times \text{Ammonium} + 0.52\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.28\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 2.78 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.5 \times h + 0.62\text{E-}2 \times \text{Acetat} + 3.24 \times \text{CO}_2 + 9.23\text{E-}6 \times \text{Bio} + 4.46 \times \text{H}_2\text{O}$
$+ 0.2 \times \text{L-Tryptophan} + 0.61 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.51 \times \text{Ammonium} + 0.52\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.28\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 2.79 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.5 \times h + 3.26 \times \text{CO}_2 + 9.23\text{E-}6 \times \text{Bio} + 4.47 \times \text{H}_2\text{O} + 0.2 \times \text{L-Tryptophan} + 0.62 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.37 \times \text{Ammonium} + 1.32 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 1.56 \times h + 1.18 \times \text{Acetat} + 1.56 \times \text{CO}_2 + 2.76 \times \text{H}_2\text{O} + 0.18 \times \text{L-Tryptophan} + 0.29 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.37 \times \text{Ammonium} + 3.45 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.37 \times h + 3.93 \times \text{CO}_2 + 4.66 \times \text{H}_2\text{O} + 0.18 \times \text{L-Tryptophan} + 0.76 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.43 \times \text{Ammonium} + 0.44\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.23\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1.33 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 1.45 \times h + 1.03 \times \text{Acetat} + 1.61 \times \text{CO}_2 + 7.78\text{E-}6 \times \text{Bio} + 2.86 \times \text{H}_2\text{O}$
$+ 0.17 \times \text{L-Tryptophan} + 0.29 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.43 \times \text{Ammonium} + 0.44\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.23\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1.34 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 1.45 \times h + 1.03 \times \text{Acetat} + 1.62 \times \text{CO}_2 + 7.78\text{E-}6 \times \text{Bio} + 2.87 \times \text{H}_2\text{O}$
$+ 0.17 \times \text{L-Tryptophan} + 0.29 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.43 \times \text{Ammonium} + 0.44\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.23\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 3.19 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.42 \times h + 0.52\text{E-}2 \times \text{Acetat} + 3.68 \times \text{CO}_2 + 7.78\text{E-}6 \times \text{Bio} + 4.51 \times \text{H}_2\text{O}$
$+ 0.17 \times \text{L-Tryptophan} + 0.71 \times \text{H}_2$
$1.0 \times \text{Glukose} + 0.43 \times \text{Ammonium} + 0.44\text{E-}2 \times \text{Phosphat} + 0.23\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 3.20 \times \text{O}_2$
$\Rightarrow 0.42 \times h + 3.69 \times \text{CO}_2 + 7.78\text{E-}6 \times \text{Bio} + 4.52 \times \text{H}_2\text{O} + 0.17 \times \text{L-Tryptophan} + 0.71 \times \text{H}_2$

Tabelle 57: Finale Stöchiometrie von Elementarmoden normiert auf die Glukoseaufnahme unter Berücksichtigung der Entkopplung der ATP-Synthese

$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,12\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,63\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1,36 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 1,28 \times \text{h} + 0,78 \times \text{Acetat} + 1,71 \times \text{CO}_2 + 2,09\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3,03 \times \text{H}_2\text{O}$ $+ 0,15 \times \text{L-Tryptophan} + 0,3 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,12\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,63\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 2,74 \times \text{O}_2$ $0,51 \times \text{h} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Acetat} + 3,24 \times \text{CO}_2 + 2,10\text{E-}5 \times \text{Bio} + 4,25 \times \text{H}_2\text{O}$ $+ 0,15 \times \text{L-Tryptophan} + 0,61 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,12\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,63\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 2,77 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 0,5 \times \text{h} + 3,27 \times \text{CO}_2 + 2,10\text{E-}5 \times \text{Bio} + 4,28 \times \text{H}_2\text{O}$ $+ 0,15 \times \text{L-Tryptophan} + 0,61 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,12\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,63\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1,39 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 1,26 \times \text{h} + 0,76 \times \text{Acetat} + 1,74 \times \text{CO}_2 + 2,09\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3,05 \times \text{H}_2\text{O}$ $+ 0,15 \times \text{L-Tryptophan} + 0,3 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,76\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1,42 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 1,26 \times \text{h} + 0,77 \times \text{Acetat} + 1,78 \times \text{CO}_2 + 2,51\text{E-}5 \times \text{Bio} + 2,97 \times \text{H}_2\text{O}$ $+ 0,13 \times \text{L-Tryptophan} + 0,31 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,76\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 1,44 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 1,25 \times \text{h} + 0,75 \times \text{Acetat} + 1,81 \times \text{CO}_2 + 2,51\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3,00 \times \text{H}_2\text{O}$ $+ 0,13 \times \text{L-Tryptophan} + 0,32 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,76\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 2,78 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 0,51 \times \text{h} + 0,16\text{E-}1 \times \text{Acetat} + 3,29 \times \text{CO}_2 + 2,51\text{E-}5 \times \text{Bio} + 4,18 \times \text{H}_2\text{O}$ $+ 0,13 \times \text{L-Tryptophan} + 0,61 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,76\text{E-}2 \times \text{Sulfat} + 2,81 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 0,49 \times \text{h} + 3,33 \times \text{CO}_2 + 2,51\text{E-}5 \times \text{Bio} + 4,21 \times \text{H}_2\text{O} + 0,13 \times \text{L-Tryptophan} + 0,62 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,27\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Sulfat} + 1,71 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 1,17 \times \text{h} + 0,73 \times \text{Acetat} + 2,17 \times \text{CO}_2 + 4,86\text{E-}5 \times \text{Bio} + 2,68 \times \text{H}_2\text{O} + 0,38 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 5,4 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 6,0 \times \text{CO}_2 + 4,8 \times \text{H}_2\text{O} + 1,2 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,27\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Sulfat} + 1,77 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 1,14 \times \text{h} + 0,7 \times \text{Acetat} + 2,23 \times \text{CO}_2 + 4,86\text{E-}5 \times \text{Bio} + 2,72 \times \text{H}_2\text{O} + 0,39 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,27\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Sulfat} + 2,97 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 0,47 \times \text{h} + 0,32\text{E-}1 \times \text{Acetat} + 3,57 \times \text{CO}_2 + 4,87\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3,79 \times \text{H}_2\text{O} + 0,66 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 0,53 \times \text{Ammonium} + 0,27\text{E-}1 \times \text{Phosphat} + 0,14\text{E-}1 \times \text{Sulfat} + 3,03 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 0,44 \times \text{h} + 3,64 \times \text{CO}_2 + 4,87\text{E-}5 \times \text{Bio} + 3,84 \times \text{H}_2\text{O} + 0,67 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 1,8 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 2,0 \times \text{h} + 2,0 \times \text{Acetat} + 2,0 \times \text{CO}_2 + 1,6 \times \text{H}_2\text{O} + 0,4 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 5,4 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 6,0 \times \text{CO}_2 + 4,8 \times \text{H}_2\text{O} + 1,2 \times \text{H}_2$
$1,0 \times \text{Glukose} + 1,8 \times \text{O}_2$ $\Rightarrow 2,0 \times \text{h} + 2,0 \times \text{Acetat} + 2,0 \times \text{CO}_2 + 1,6 \times \text{H}_2\text{O} + 0,4 \times \text{H}_2$

A.3 Transkriptomanalyse

Tabelle: Differentielle Genexpression und Clustering

Differentiell exprimierte Transkripte (faktorielle Veränderung); C: Cluster-Nummer

R1-R4, Referenzprozess; Probenahme nach 6 h, 11 h, 24 h, 32 h

T1-T9 Phosphatfütterung; Probenahme nach 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 17 h, 22 h, 25 h, 28 h, 32 h

Gen	R1	R2	R3	R4	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	C
<i>aat</i>					-1,3	-1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	-1,1	-1,4	-2,6	8
<i>abgA</i>					-1,0	-1,2	-1,2	-1,4	-1,1	1,1	1,3	1,4	2,5	
<i>abgT</i>	1,2	1,4	3,1	10,2	1,3	1,2	1,3	1,2	1,5	1,4	1,7	2,4	2,9	8
<i>accA</i>	-0,5	-1,4	-2,4	-11,9	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,5	-2,4	7
<i>accB</i>	-1,3	-1,6	-4,6	-35,7										
<i>accC</i>	-1,7	-2,6	-8,4	-23,2	-1,2	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-1,7	-1,8	-1,9	-3,7	7
<i>accD</i>	1,2	-1,1	-1,6	-6,6	-1,1	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-2,6	7
<i>aceA</i>	2,0	-1,7	-3,1	-2,4	-1,2	-1,1	-1,2	-1,5	-2,0	-2,8	-3,4	-3,8	-4,0	4
<i>aceB</i>	2,7	-2,1	-7,3	-4,2	-1,2	-1,2	-1,9	-2,0	-3,0	-3,4	-4,0	-3,5	-3,2	4
<i>aceE</i>	-1,6	-1,8	-1,4	-8,6										
<i>aceF</i>	-2,1	-2,5	-2,2	-16,2										
<i>aceK</i>					-1,2	-1,2	-1,2	-1,5	-1,2	-1,2	1,1	1,4	2,8	7
<i>ackA</i>	-1,2	-1,3	-2,9	-7,7										
<i>acnB</i>	0,0	-1,2	-1,3	-17,5	-1,0	-1,1	-1,2	1,3	-1,0	-1,3	-1,5	-1,6	-5,3	7
<i>acpD</i>	2,3	3,5	-1,6	-1,0	-1,3	1,1	1,5	1,7	1,3	-1,2	-1,9	-2,5	-3,3	7
<i>acpP</i>	-0,1	-0,6	-0,6	-5,7										
<i>acpS</i>					-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,7	-2,1	-2,5	-4,6	
<i>acpT</i>	-0,9	-1,3	-1,6	-4,0	1,0	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,3	-1,3	-1,4	-2,6	7
<i>acrD</i>	3,7	2,2	5,8	5,1	-1,2	1,6	1,4	1,3	1,7	3,3	4,3	4,7	3,9	8
<i>acrE</i>	0,0	-1,6	2,5	9,7	1,6	1,0	1,3	1,0	1,7	2,1	2,8	3,3	5,1	8
<i>acrF</i>	-1,2	1,3	1,9	6,0	1,4	1,1	1,4	1,2	1,4	1,8	1,9	2,1	3,4	8
<i>acrF</i>	-1,5	-0,7	2,2	4,3	1,3	1,0	1,4	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	3,5	8
<i>acrR</i>	1,4	0,7	3,0	-0,7										
<i>acs</i>					-1,0	-1,2	-1,5	-1,5	-1,7	-2,0	-2,1	-2,3	-2,3	
<i>add</i>	0,4	3,4	1,5	0,7	-1,6	-1,5	-1,5	-1,5	-1,7	-1,9	-2,2	-2,0	-1,6	4
<i>ade</i>					-1,0	-1,6	-1,6	-1,7	-1,8	-1,9	-2,0	-1,7	-1,6	
<i>adhE</i>	1,5	2,4	-1,6	-4,4										
<i>adhP</i>	0,6	3,1	1,4	2,8										
<i>adiA</i>					-1,1	2,0	2,3	1,7	1,8	1,7	1,7	1,7	2,1	
<i>adiC</i>	0,6	1,6	2,7	4,7	1,4	1,6	1,9	2,1	1,9	1,8	2,1	2,5	2,3	1
<i>adiY</i>	3,6	6,7	3,0	5,8	1,0	3,2	3,9	3,9	3,5	2,9	2,1	1,7	2,0	6
<i>adk</i>	-0,1	1,1	-2,6	-19,7	-1,2	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-2,0	7
<i>adrA</i>	1,2	1,5	3,3	5,0	1,2	2,0	2,4	2,2	2,4	2,2	2,3	2,2	3,8	1
<i>adrB</i>	2,2	3,8	3,2	3,6										
<i>aes</i>	1,7	2,0	1,8	3,3										
<i>afuC</i>					-1,0	-2,0	1,0	-1,2	1,4	1,2	1,6	2,9	3,1	3
<i>agaB</i>	2,3	3,5	7,0	5,5	1,4	4,0	4,5	4,8	4,9	4,1	3,6	3,8	5,3	1
<i>agaC</i>	2,0	2,6	3,9	2,9	-1,4	1,6	2,1	2,0	1,8	1,8	1,8	1,8	2,7	1
<i>agal</i>	2,3	1,8	2,4	5,0	1,0	2,0	1,7	1,8	1,5	1,2	1,1	1,2	1,8	1
<i>agaS</i>	-1,7	-1,2	1,8	5,8	1,1	-1,5	1,0	1,0	1,2	1,3	1,6	2,0	2,7	3
<i>agaV</i>					-1,0	-1,1	1,3	1,4	1,9	1,6	1,8	2,9	4,1	
<i>agaW</i>					1,2	-1,6	1,2	-1,5	1,5	1,5	2,0	2,2	3,3	
<i>agp</i>					1,1	1,2	1,2	1,3	1,5	1,4	1,6	2,1	3,9	
<i>ahpC</i>	0,8	2,0	2,3	-9,7										

A.3 Transkriptomanalyse

<i>argP</i>	1,3	1,3	1,4	-2,3	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	-1,1	-1,4	-2,2	7
<i>argS</i>	-2,5	-1,7	-3,4	-2,7	-1,3	-1,4	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-1,8	-2,0	-2,6	4
<i>argT</i>					1,2	1,1	-1,1	1,1	-1,0	-1,2	-1,2	-1,6	-2,8	7
<i>ariR</i>	3,0	3,7	6,8	16,3	1,4	2,3	2,5	3,0	2,5	2,6	3,4	2,5	7,1	1
<i>arnA</i>	18,1	15,0	1,1	1,3	1,8	2,5	2,4	2,4	2,0	1,4	-1,1	-1,9	-3,2	7
<i>arnB</i>	10,9	8,7	2,1	1,4	1,6	1,9	1,8	1,9	1,5	1,2	-1,1	-1,8	-2,2	7
<i>arnC</i>	15,1	12,8	2,7	1,8	2,0	2,6	2,6	2,5	2,0	1,5	1,1	-1,3	-1,7	7
<i>arnD</i>	26,6	19,6	2,6	2,0	2,3	4,0	4,1	4,0	2,8	1,7	-1,1	-2,2	-3,4	7
<i>arnE</i>	23,3	22,5	2,3	2,1	2,2	3,5	3,7	3,8	2,9	1,9	1,2	-1,5	-1,6	6
<i>arnF</i>	3,0	3,1	1,3	0,0	1,5	2,0	2,0	2,1	1,7	1,3	1,1	1,1	-1,1	6
<i>arnT</i>	16,5	16,3	2,6	3,8	1,7	3,2	3,4	3,1	1,9	-1,1	-1,7	-1,4	-1,2	4
<i>aroA</i>	-0,3	-2,7	-5,7	-9,5	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,8	-4,4	7
<i>aroB</i>	-1,5	-1,6	-3,2	-10,0	-1,0	-1,2	-1,3	-1,2	-1,4	-1,4	-1,5	-1,9	-4,3	7
<i>aroC</i>	-0,1	-1,7	-3,3	-14,4	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,7	-1,9	-2,2	-2,4	-5,4	7
<i>aroE</i>	0,9	2,0	3,0	7,9	-1,3	1,8	1,9	2,2	2,1	1,7	1,7	1,3	2,1	1
<i>aroF</i>	-4,4	-13,7	-8,6	-9,2	-1,2	-1,9	-3,4	-4,5	-5,0	-4,8	-5,6	-6,3	-4,7	5
<i>aroG</i>	-0,7	-0,5	-1,6	-13,8	-1,8	-1,9	-2,2	-2,0	-2,3	-2,3	-2,2	-2,5	-2,5	7
<i>aroH</i>	-1,3	-0,6	-1,7	-18,8										
<i>aroK</i>	-1,7	-2,0	-3,1	-4,3	1,0	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-2,4	7
<i>aroL</i>	-0,8	-2,1	-1,8	-10,7	1,0	-1,2	-1,6	-1,7	-1,7	-1,7	-1,8	-1,7	-2,1	5
<i>aroM</i>					1,0	-1,7	-2,0	-2,1	-2,1	-2,1	-1,7	-1,9	-1,3	
<i>aroP</i>	-3,8	-8,3	-5,2	-5,3	-1,5	-2,0	-2,9	-2,8	-3,4	-3,3	-3,4	-3,8	-3,3	5
<i>arpA</i>	-1,3	-1,5	3,8	13,2	4,9	1,6	4,4	1,5	4,5	6,6	9,1	12,7	18,0	8
<i>arpB</i>	0,6	1,4	5,5	19,2										
<i>arrQ</i>	1,5	0,8	4,0	21,0										
<i>arsC</i>	0,6	-0,6	1,7	4,7										
<i>arsR</i>	-0,3	-1,8	0,8	4,9										
<i>artI</i>	-2,5	0,6	-2,6	-5,5										
<i>artJ</i>	-10,4	-4,2	-11,9	-17,9	-1,1	-2,5	-1,7	-1,6	-1,8	-1,9	-2,0	-2,4	-2,3	5
<i>artM</i>	-3,3	-1,6	-2,3	-0,9										
<i>artP</i>	-2,6	-1,2	-2,5	-7,4										
<i>artQ</i>	-2,7	-1,3	-2,7	-3,7										
<i>ascB</i>	0,1	1,2	2,6	5,5	-1,3	-1,0	-1,0	-1,2	-1,0	1,0	1,2	1,4	2,4	3
<i>asd</i>	0,0	-1,3	-1,8	-18,8										
<i>aslA</i>					1,4	2,1	1,7	1,9	1,6	1,3	1,3	1,9	2,1	
<i>aslB</i>	-0,1	0,1	2,8	10,3	1,6	-1,0	1,3	1,1	1,7	2,2	2,6	3,7	5,0	8
<i>asnA</i>					-1,1	-1,8	-2,0	-2,0	-1,4	1,3	1,9	2,3	2,7	
<i>asnB</i>	0,0	-1,6	-3,5	-2,4	1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,6	-1,9	-2,1	-4,0	5
<i>asnC</i>	-1,6	-1,3	-3,3	-9,3	-1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-2,3	7
<i>aspC</i>	1,3	1,1	-2,4	-23,6	-1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-2,4	7
<i>aspS</i>	-1,4	-1,5	-2,4	-6,7										
<i>asr</i>	2,2	4,6	3,3	0,9	1,4	2,0	2,3	2,5	3,1	3,7	3,9	4,1	2,4	1
<i>astA</i>					1,6	2,0	1,9	1,9	1,9	1,8	1,9	2,8	3,6	
<i>astB</i>	-0,6	-0,6	2,9	10,1	1,4	1,4	1,8	-1,1	2,6	2,5	3,4	4,6	9,9	8
<i>astD</i>					-1,5	1,3	1,4	-1,0	1,3	1,4	1,7	2,0	3,3	
<i>astE</i>					1,2	1,5	1,8	1,4	2,3	2,2	2,8	3,8	7,1	
<i>atoB</i>					-1,6	-1,5	-1,1	-1,0	1,0	1,0	1,1	1,4	2,2	
<i>atoS</i>	0,7	0,7	1,9	4,8										
<i>atpA</i>	-1,8	-3,1	-11,5	-30,6	-1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-2,0	-8,7	7
<i>atpB</i>	-1,4	-1,7	-3,8	-23,5	-1,0	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-3,7	7

A.3 Transkriptomanalyse

<i>argP</i>	1,3	1,3	1,4	-2,3	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	-1,1	-1,4	-2,2	7
<i>argS</i>	-2,5	-1,7	-3,4	-2,7	-1,3	-1,4	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-1,8	-2,0	-2,6	4
<i>argT</i>					1,2	1,1	-1,1	1,1	-1,0	-1,2	-1,2	-1,6	-2,8	7
<i>ariR</i>	3,0	3,7	6,8	16,3	1,4	2,3	2,5	3,0	2,5	2,6	3,4	2,5	7,1	1
<i>arnA</i>	18,1	15,0	1,1	1,3	1,8	2,5	2,4	2,4	2,0	1,4	-1,1	-1,9	-3,2	7
<i>arnB</i>	10,9	8,7	2,1	1,4	1,6	1,9	1,8	1,9	1,5	1,2	-1,1	-1,8	-2,2	7
<i>arnC</i>	15,1	12,8	2,7	1,8	2,0	2,6	2,6	2,5	2,0	1,5	1,1	-1,3	-1,7	7
<i>arnD</i>	26,6	19,6	2,6	2,0	2,3	4,0	4,1	4,0	2,8	1,7	-1,1	-2,2	-3,4	7
<i>arnE</i>	23,3	22,5	2,3	2,1	2,2	3,5	3,7	3,8	2,9	1,9	1,2	-1,5	-1,6	6
<i>arnF</i>	3,0	3,1	1,3	0,0	1,5	2,0	2,0	2,1	1,7	1,3	1,1	1,1	-1,1	6
<i>arnT</i>	16,5	16,3	2,6	3,8	1,7	3,2	3,4	3,1	1,9	-1,1	-1,7	-1,4	-1,2	4
<i>aroA</i>	-0,3	-2,7	-5,7	-9,5	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,8	-4,4	7
<i>aroB</i>	-1,5	-1,6	-3,2	-10,0	-1,0	-1,2	-1,3	-1,2	-1,4	-1,4	-1,5	-1,9	-4,3	7
<i>aroC</i>	-0,1	-1,7	-3,3	-14,4	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,7	-1,9	-2,2	-2,4	-5,4	7
<i>aroE</i>	0,9	2,0	3,0	7,9	-1,3	1,8	1,9	2,2	2,1	1,7	1,7	1,3	2,1	1
<i>aroF</i>	-4,4	-13,7	-8,6	-9,2	-1,2	-1,9	-3,4	-4,5	-5,0	-4,8	-5,6	-6,3	-4,7	5
<i>aroG</i>	-0,7	-0,5	-1,6	-13,8	-1,8	-1,9	-2,2	-2,0	-2,3	-2,3	-2,2	-2,5	-2,5	7
<i>aroH</i>	-1,3	-0,6	-1,7	-18,8										
<i>aroK</i>	-1,7	-2,0	-3,1	-4,3	1,0	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-2,4	7
<i>aroL</i>	-0,8	-2,1	-1,8	-10,7	1,0	-1,2	-1,6	-1,7	-1,7	-1,7	-1,8	-1,7	-2,1	5
<i>aroM</i>					1,0	-1,7	-2,0	-2,1	-2,1	-2,1	-1,7	-1,9	-1,3	
<i>aroP</i>	-3,8	-8,3	-5,2	-5,3	-1,5	-2,0	-2,9	-2,8	-3,4	-3,3	-3,4	-3,8	-3,3	5
<i>arpA</i>	-1,3	-1,5	3,8	13,2	4,9	1,6	4,4	1,5	4,5	6,6	9,1	12,7	18,0	8
<i>arpB</i>	0,6	1,4	5,5	19,2										
<i>arrQ</i>	1,5	0,8	4,0	21,0										
<i>arsC</i>	0,6	-0,6	1,7	4,7										
<i>arsR</i>	-0,3	-1,8	0,8	4,9										
<i>artI</i>	-2,5	0,6	-2,6	-5,5										
<i>artJ</i>	-10,4	-4,2	-11,9	-17,9	-1,1	-2,5	-1,7	-1,6	-1,8	-1,9	-2,0	-2,4	-2,3	5
<i>artM</i>	-3,3	-1,6	-2,3	-0,9										
<i>artP</i>	-2,6	-1,2	-2,5	-7,4										
<i>artQ</i>	-2,7	-1,3	-2,7	-3,7										
<i>ascB</i>	0,1	1,2	2,6	5,5	-1,3	-1,0	-1,0	-1,2	-1,0	1,0	1,2	1,4	2,4	3
<i>asd</i>	0,0	-1,3	-1,8	-18,8										
<i>aslA</i>					1,4	2,1	1,7	1,9	1,6	1,3	1,3	1,9	2,1	
<i>aslB</i>	-0,1	0,1	2,8	10,3	1,6	-1,0	1,3	1,1	1,7	2,2	2,6	3,7	5,0	8
<i>asnA</i>					-1,1	-1,8	-2,0	-2,0	-1,4	1,3	1,9	2,3	2,7	
<i>asnB</i>	0,0	-1,6	-3,5	-2,4	1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,6	-1,9	-2,1	-4,0	5
<i>asnC</i>	-1,6	-1,3	-3,3	-9,3	-1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-2,3	7
<i>aspC</i>	1,3	1,1	-2,4	-23,6	-1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-2,4	7
<i>aspS</i>	-1,4	-1,5	-2,4	-6,7										
<i>asr</i>	2,2	4,6	3,3	0,9	1,4	2,0	2,3	2,5	3,1	3,7	3,9	4,1	2,4	1
<i>astA</i>					1,6	2,0	1,9	1,9	1,9	1,8	1,9	2,8	3,6	
<i>astB</i>	-0,6	-0,6	2,9	10,1	1,4	1,4	1,8	-1,1	2,6	2,5	3,4	4,6	9,9	8
<i>astD</i>					-1,5	1,3	1,4	-1,0	1,3	1,4	1,7	2,0	3,3	
<i>astE</i>					1,2	1,5	1,8	1,4	2,3	2,2	2,8	3,8	7,1	
<i>atoB</i>					-1,6	-1,5	-1,1	-1,0	1,0	1,0	1,1	1,4	2,2	
<i>atoS</i>	0,7	0,7	1,9	4,8										
<i>atpA</i>	-1,8	-3,1	-11,5	-30,6	-1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-2,0	-8,7	7
<i>atpB</i>	-1,4	-1,7	-3,8	-23,5	-1,0	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-3,7	7

A.3 Transkriptomanalyse

<i>atpC</i>	-2,1	-3,0	-12,2	-36,6	-1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-2,0	-8,0	7
<i>atpD</i>	-1,5	-2,4	-7,5	-26,7	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,9	-6,2	7
<i>atpE</i>	-1,4	-1,5	-2,2	-18,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,3	-2,0	7
<i>atpF</i>	-1,4	-1,7	-3,6	-35,9	1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-3,9	7
<i>atpG</i>	-1,6	-2,8	-12,1	-50,8	-1,0	-1,2	-1,4	-1,3	-1,4	-1,6	-1,8	-2,3	-17,5	7
<i>atpH</i>	-1,3	-1,5	-2,1	-16,0	1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-2,6	7
<i>atpI</i>					-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,5	-1,8	-2,1	-2,3	-3,6	4
<i>avtA</i>	-1,3	-1,0	-4,6	-8,6	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-2,7	3
<i>bacA</i>	-0,6	-0,5	1,8	3,8	1,2	-1,0	1,1	-1,0	1,1	1,2	1,5	1,6	2,6	3
<i>baeR</i>	1,3	0,6	-2,0	-3,4										
<i>bamA</i>	-1,3	-2,5	-5,0	-7,2	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-1,8	-2,7	7
<i>bamB</i>	0,5	-1,6	-1,9	-7,5	1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-1,4	-1,6	-1,9	-3,9	7
<i>bamC</i>	0,7	-1,7	-3,7	-13,2	-1,2	-1,1	-1,3	-1,2	-1,5	-1,7	-1,9	-2,3	-4,7	7
<i>bamD</i>	0,1	0,0	-2,1	-11,3										
<i>bamE</i>	1,5	1,2	-1,5	-3,5										
<i>basR</i>	17,9	2,2	0,5	-1,0	2,4	4,1	3,4	2,1	1,2	-1,1	-1,2	-1,4	-1,2	4
<i>basS</i>	11,9	1,9	-0,2	-0,7	2,6	3,8	3,1	1,9	1,2	-1,1	-1,3	-1,4	-1,2	4
<i>bax</i>	-2,5	-1,8	-2,8	-10,0										
<i>bcp</i>	1,1	-1,1	-2,9	-16,2	-1,2	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-4,0	7
<i>bcsB</i>	0,3	-2,1	-1,9	1,4	-1,1	1,2	1,0	-1,2	-1,8	-2,2	-2,0	-2,1	-1,4	4
<i>bcsC</i>					-1,3	1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-1,9	-2,1	-2,4	-2,1	
<i>bcsC</i>					-1,1	1,2	-1,2	-1,3	-1,9	-2,3	-2,5	-2,7	-2,2	
<i>bcsE</i>	2,0	-0,5	-2,9	-2,6	-1,0	1,2	1,1	-1,0	-1,2	-1,4	-1,7	-2,3	-3,1	4
<i>bcsF</i>	1,6	-1,4	-4,7	-5,3	-1,0	1,3	1,1	1,0	-1,3	-1,6	-1,9	-2,9	-5,3	7
<i>bcsG</i>	1,5	-1,9	-4,3	-2,0	-1,0	1,2	-1,0	-1,3	-1,7	-2,3	-2,4	-2,5	-2,2	4
<i>bcsQ</i>	1,4	-1,4	-3,7	-2,8	-1,2	-1,0	-1,3	-1,3	-1,6	-2,2	-2,4	-2,2	-1,5	4
<i>bcsZ</i>	1,4	-1,6	-4,6	-3,1	-1,0	1,2	-1,1	-1,4	-1,9	-2,5	-3,1	-3,1	-2,0	4
<i>bdm</i>	-0,5	0,6	2,5	9,7										
<i>beeE</i>					1,4	1,0	1,6	-1,1	1,9	2,5	2,3	3,2	4,9	
<i>betA</i>					-1,1	-1,3	-1,5	-1,6	-1,7	-1,9	-1,9	-2,2	-2,1	
<i>betB</i>	-0,2	-2,4	-3,2	-6,6	-1,0	-1,5	-1,6	-1,7	-1,9	-2,4	-2,4	-2,5	-2,9	4
<i>betI</i>					-1,4	-1,8	-2,4	-2,4	-3,2	-3,2	-3,5	-3,3	-3,4	
<i>betT</i>					-1,1	-1,9	-2,0	-2,5	-2,3	-2,3	-2,2	-1,5	1,0	
<i>bfd</i>	-3,5	-2,6	1,6	2,2	-2,1	-5,8	-4,5	-5,4	-3,5	-2,8	-2,2	-1,9	-1,3	2
<i>bfr</i>	2,0	4,7	2,6	4,6										
<i>bglB</i>	1,3	-1,9	0,3	4,8										
<i>bglG</i>	15,3	7,9	5,1	6,4	2,6	4,3	3,9	3,5	2,3	2,0	1,6	1,3	1,5	6
<i>bglI</i>	-1,5	-1,6	3,0	8,9	-2,6	-5,9	-2,5	-4,2	-2,4	-2,0	-1,4	-1,2	1,5	3
<i>bglX</i>					-1,1	-1,1	-1,3	-1,3	-1,6	-1,8	-1,8	-2,0	-2,4	
<i>bhsA</i>	1,9	7,6	22,8	9,8	-1,1	1,2	1,9	2,5	3,5	4,3	5,2	6,7	8,0	8
<i>bioA</i>	-10,5	-14,9	-6,0	-7,5	-1,8	-3,6	-2,6	-6,0	-3,1	-3,8	-3,2	-2,8	-2,5	5
<i>bioB</i>	-6,3	-10,9	-4,7	-3,7	-1,3	-2,3	-1,9	-4,3	-2,7	-3,0	-2,9	-2,8	-2,5	5
<i>bioC</i>					-1,1	-1,4	-1,6	-1,5	-1,9	-2,5	-2,6	-2,6	-3,2	
<i>bioD</i>					1,1	-1,1	-1,3	-1,1	-1,3	-1,4	-1,7	-1,9	-2,2	
<i>bioD</i>					1,1	1,3	1,3	1,4	1,4	1,7	1,8	2,0	2,9	
<i>bioF</i>	-10,0	-24,9	-10,1	-18,8	-1,4	-3,3	-3,2	-11,9	-5,0	-5,7	-5,5	-5,1	-4,2	5
<i>birA</i>	-0,7	-1,4	0,2	3,8										
<i>bIc</i>	4,8	8,4	5,3	3,5	-1,1	2,5	2,5	2,7	2,2	2,0	1,6	1,5	1,3	6
<i>blr</i>	1,6	1,1	-1,6	-2,2										
<i>borD</i>					-1,6	-1,7	-1,9	-1,5	-2,2	-2,0	-2,1	-2,2	-2,3	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>bssR</i>	6,3	28,2	26,7	6,8	1,1	4,8	5,7	6,8	8,4	9,2	9,3	10,0	6,4	1
<i>bssS</i>					-1,0	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,5	3,0	
<i>btuB</i>	-1,4	-2,3	-2,5	-2,5	-1,1	-1,4	-1,6	-1,6	-1,8	-2,0	-2,5	-2,8	-3,5	4
<i>btuC</i>					-1,4	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,3	-1,6	-1,5	-2,7	
<i>btuD</i>	1,2	1,5	-2,0	-4,1	-1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	-1,2	-2,5	7
<i>btuF</i>					-1,3	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,5	-1,4	-1,7	-2,5	
<i>c0119</i>					-1,3	-1,4	-1,5	-1,4	-1,6	-1,8	-1,7	-1,9	-2,1	
<i>c1106</i>					-1,1	1,4	1,4	1,5	1,3	1,2	1,1	-1,1	-2,3	
<i>c1934/ydeT</i>					2,0	-1,7	1,4	-1,2	1,9	2,5	3,2	4,1	7,5	
<i>c2019/rsxA</i>					-1,6	-2,2	-2,7	-2,6	-2,9	-3,0	-2,9	-3,1	-3,3	
<i>c2020/rsxB</i>					-1,2	-2,0	-2,1	-2,1	-2,2	-2,3	-2,5	-2,3	-3,2	
<i>c2021/rsxC</i>					-1,5	-2,0	-2,2	-2,2	-2,4	-2,5	-3,4	-4,0	-3,5	
<i>c2023/rsxG</i>					-1,4	-1,8	-1,8	-2,0	-2,2	-2,3	-2,4	-2,3	-2,3	
<i>c2383</i>					-1,3	-1,5	-1,8	-1,9	-2,1	-2,1	-2,3	-2,1	-2,7	
<i>c2558</i>					-1,2	-1,7	-1,7	-1,7	-1,9	-1,9	-2,0	-1,8	-2,2	
<i>c2623</i>					1,0	2,8	2,8	3,0	3,0	2,6	2,2	2,0	-1,2	
<i>c2931/mntH</i>					1,1	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4	2,4	
<i>c2985/eutQ</i>					-1,2	-1,2	1,2	-1,1	1,2	1,2	1,7	2,0	3,0	
<i>c2986/eutP</i>					1,3	2,1	1,8	1,4	2,3	2,5	2,7	3,7	5,0	
<i>c2987/eutS</i>					1,2	1,2	1,3	1,4	1,7	1,9	2,2	3,1	4,0	
<i>c3957/kdsD</i>					-1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,6	-2,3	
<i>c3976</i>					-1,0	-1,4	-1,9	-1,5	-2,0	-2,1	-2,3	-2,5	-2,5	
<i>c4758</i>					1,2	-1,3	-1,3	-1,1	-1,1	-1,3	-1,3	-1,7	-2,3	
<i>c4759</i>					-1,0	-1,0	-1,3	1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-2,2	-1,4	
<i>c4764</i>					-1,2	-1,5	-1,4	-1,4	-1,5	-1,7	-1,8	-2,1	-2,0	
<i>c4983</i>					1,1	-1,2	-1,5	-1,2	-1,4	-1,6	-1,9	-2,2	-2,8	
<i>c5388/nanM</i>					-1,1	1,4	1,4	1,3	1,1	1,0	1,1	1,1	2,1	
<i>cadA</i>	0,3	1,9	3,0	4,5	1,1	1,1	1,4	1,4	1,5	1,6	1,4	1,9	2,9	8
<i>cadB</i>	0,6	-1,3	3,7	11,7	2,0	1,5	1,8	1,3	2,1	3,1	3,9	4,6	8,8	8
<i>cadC</i>	1,3	1,5	2,0	3,5										
<i>cafA/rng</i>					-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,8	-2,5	
<i>caiB</i>	2,4	1,6	1,8	4,7										
<i>caiB</i>	1,5	1,7	1,3	8,2										
<i>caiD</i>					-1,1	-1,0	1,2	-1,1	1,3	1,5	1,7	2,1	2,6	
<i>caiE</i>	0,0	0,1	1,7	6,2	1,2	1,0	1,2	-1,0	1,2	1,3	1,6	1,9	3,4	3
<i>caiT</i>	2,1	1,9	2,9	9,2	2,3	3,7	4,7	4,2	4,5	3,8	4,8	5,7	7,1	1
<i>can</i>	0,0	0,0	-0,8	-6,5										
<i>carA</i>	-5,9	-13,5	-48,7	-35,7	-1,2	-1,6	-1,6	-1,6	-1,7	-2,1	-2,2	-2,4	-6,5	7
<i>carB</i>	-6,8	-13,1	-27,2	-19,5	-1,3	-2,3	-2,2	-2,1	-2,3	-3,0	-3,8	-4,5	-7,2	4
<i>casA</i>	1,1	-1,2	2,8	10,2	1,1	1,3	1,1	1,1	-1,0	1,3	1,5	1,5	2,8	3
<i>casC</i>	1,8	-0,6	1,3	4,7										
<i>casE</i>	1,4	1,1	1,0	3,9										
<i>cbl</i>	-1,6	-1,8	1,6	4,5	-1,1	-1,9	-1,8	-1,8	-1,8	1,1	1,5	2,1	1,9	3
<i>cbpA</i>	2,3	4,4	-1,4	-3,0										
<i>cbpM</i>	2,7	5,3	2,0	2,3	1,3	1,8	2,1	2,1	1,9	1,8	1,8	1,9	2,1	1
<i>cbrA</i>	5,7	7,7	12,3	5,7	1,3	3,6	3,7	3,9	3,5	3,4	3,1	2,1	2,4	1
<i>cbrB</i>	3,6	3,8	4,6	2,1	1,2	2,3	2,4	2,3	2,1	2,1	1,8	1,5	1,5	6
<i>cbrC</i>	3,4	3,3	3,8	5,4	1,2	2,3	2,4	2,3	2,1	2,1	2,0	1,8	2,3	1
<i>cchB/eutN</i>					1,4	1,3	1,7	1,2	1,7	2,0	2,6	3,3	5,1	
<i>ccmC</i>	-1,2	0,0	2,1	5,9	-1,0	-1,2	-1,0	-1,2	1,0	1,0	1,3	1,7	2,9	3

A.3 Transkriptomanalyse

<i>ccmH</i>					-1,3	-1,6	-1,6	-1,2	-1,6	-1,8	-1,9	-2,2	-1,6	
<i>ccmH</i>					-1,8	-1,8	-1,8	-1,6	-2,2	-2,0	-2,3	-2,1	-2,2	
<i>cdaR /yc</i>	-0,8	-0,8	1,7	6,2										
<i>cdd</i>	-1,4	-1,3	0,8	-5,9	-1,3	-1,3	-1,5	-1,5	-1,6	-1,6	-1,8	-2,3	-3,7	7
<i>cdh</i>	2,3	2,4	3,3	0,7	-1,3	-1,5	-1,7	-1,5	-2,0	-1,6	-1,5	-1,5	-1,2	
<i>cdh</i>					1,2	2,1	2,2	2,3	2,1	1,9	1,8	1,6	1,8	
<i>cdsA</i>					-1,1	-1,6	-1,6	-1,5	-1,7	-1,7	-1,8	-1,7	-2,9	
<i>celB</i>	1,3	0,6	1,9	7,6										
<i>celC</i>	1,4	0,7	4,3	13,5	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	1,1	2,3	3
<i>celD</i>	1,1	0,0	4,0	12,1	1,0	1,1	1,2	1,1	1,2	1,6	1,8	2,1	4,1	3
<i>celF</i>	0,1	-0,6	3,9	15,2	1,1	-1,1	1,1	-1,2	1,1	1,8	2,0	2,2	4,6	3
<i>chaB</i>	2,1	2,9	1,9	0,9										
<i>chbF</i>	-0,3	-1,3	3,7	12,4	2,0	1,1	2,0	1,1	2,1	3,9	5,0	7,2	12,6	8
<i>chbG</i>	1,7	1,7	2,0	4,2										
<i>cheA</i>	-1,1	-12,1	-10,2	-5,2	2,9	2,2	-2,3	-3,2	-3,0	-2,9	-2,9	-2,2	-1,5	5
<i>cheB</i>	-0,7	-6,4	-3,7	-0,4	2,5	2,1	-1,8	-2,1	-1,9	-1,9	-1,7	-1,4	-1,3	5
<i>cheR</i>	-1,8	-7,5	-3,1	-2,8	2,4	2,0	-2,2	-3,1	-1,8	-1,9	-1,5	-1,2	1,2	2
<i>cheW</i>	0,0	-8,0	-6,0	-0,2	2,9	2,6	-1,8	-2,6	-1,9	-1,8	-1,3	-1,1	1,3	5
<i>cheY</i>	-1,3	-6,2	-4,0	-0,1	3,0	2,5	-1,4	-1,7	-1,3	1,0	1,3	1,3	2,7	2
<i>cheZ</i>	-1,3	-4,3	-2,9	-2,0	2,7	1,9	-1,4	-1,6	-1,6	-1,5	-1,5	-1,6	1,1	5
<i>chiA</i>	0,7	-0,6	1,7	4,8										
<i>chiP</i>					1,4	-3,2	-2,5	-4,5	-1,7	-2,4	-1,7	-1,1	1,4	
<i>chiQ</i>	-1,5	0,6	2,7	6,5										
<i>chpB</i>	0,1	0,0	2,2	5,7	1,1	1,1	1,2	1,0	1,3	1,5	1,9	2,1	4,3	3
<i>chpS</i>	1,4	1,8	2,4	3,4										
<i>cirA</i>					-4,2	-5,3	-3,6	-3,5	-3,0	-2,7	-2,5	-2,0	-1,4	
<i>citA</i>	-0,6	-0,7	1,8	4,5	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1	1,1	1,3	1,2	2,1	3
<i>citC</i>	-1,4	-1,5	1,5	5,3	1,5	-1,9	1,9	1,3	2,2	2,7	3,6	4,4	7,0	8
<i>citD</i>					1,2	-1,1	2,1	-1,1	1,7	2,3	2,5	2,7	4,9	
<i>citE</i>					-1,0	-1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,3	1,5	2,4	
<i>citF</i>					1,7	1,5	1,5	1,2	2,1	1,9	2,6	3,6	5,1	
<i>citG</i>					1,4	1,1	1,7	1,3	2,3	3,1	3,4	3,2	4,6	
<i>citT</i>	0,8	1,5	3,7	11,4	1,2	-1,1	1,3	1,3	1,3	1,6	1,9	2,2	3,7	8
<i>citX</i>					1,4	-1,6	1,2	-1,2	1,3	1,5	2,3	2,6	4,2	
<i>cld</i>	-0,6	-1,3	-1,6	-5,8	1,0	-1,0	-1,0	1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-2,2	7
<i>clpA</i>	1,4	1,2	-0,1	-5,0										
<i>clpB</i>					-1,0	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	1,2	1,3	2,0	
<i>clpP</i>	1,2	-1,5	-3,4	-15,8										
<i>clpX</i>	-1,5	-1,4	-4,9	-21,1										
<i>cmk</i>	-1,2	-1,1	-1,5	-4,8										
<i>cmoA</i>	-0,6	-1,4	-2,8	-4,3	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,6	-1,7	-2,0	-2,5	4
<i>cmr</i>	1,9	2,1	2,9	4,4										
<i>cmtA</i>	0,0	-1,3	2,6	7,4	1,3	-1,1	1,1	-1,1	1,2	1,3	1,8	2,2	4,1	3
<i>cmtB</i>	0,2	0,6	0,6	4,0										
<i>cnu</i>	1,4	-0,5	-2,8	-1,7	-1,1	1,2	1,3	1,2	-1,2	-1,4	-1,7	-2,6	-2,4	4
<i>coaA</i>	-0,7	-1,4	-3,0	-1,5	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,4	-1,6	-3,3	7
<i>coaD</i>					-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,6	-1,9	-2,6	
<i>coaE</i>	-1,1	-0,6	-2,1	-7,3	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,5	-2,5	7
<i>cobB</i>	1,4	0,0	-2,1	-4,9	-1,1	1,0	1,0	1,1	-1,1	-1,1	-1,3	-1,5	-2,9	7
<i>cobT</i>					-1,2	-1,1	-1,3	-1,0	-1,4	-1,6	-1,7	-2,2	-2,4	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>cobT</i>					-1,0	-1,2	-1,2	-1,0	-1,2	-1,3	-1,5	-2,1	-2,3	
<i>codA</i>					-1,8	-1,6	-1,8	-1,3	-2,0	-1,8	-2,0	-2,1	-2,4	
<i>codA</i>	-3,3	-4,7	-8,9	-18,0	-1,2	-1,5	-1,4	-1,4	-1,8	-2,3	-3,0	-3,7	-7,2	7
<i>codB</i>	-3,3	-10,2	-10,3	-7,0	1,0	-1,6	-1,4	-1,4	-1,6	-2,0	-2,3	-2,6	-3,1	4
<i>copA</i>	-1,6	-0,6	-2,3	-4,5										
<i>corA</i>					-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,5	-1,6	-1,7	-2,5	
<i>cpdA</i>	0,0	-0,1	-1,6	-5,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,3	-1,4	-1,6	-1,9	-2,3	-4,8	7
<i>cpsB</i>					2,5	8,4	8,2	8,8	9,6	9,7	8,8	7,2	7,3	
<i>cpsG</i>	7,4	9,3	27,9	10,3	1,1	4,5	4,7	4,8	4,1	4,0	3,5	2,8	2,6	1
<i>cpxP</i>	2,7	4,8	7,8	5,8	-1,0	1,4	1,5	1,7	1,9	2,1	2,1	2,1	2,2	8
<i>creA</i>	0,6	-1,2	0,3	4,6										
<i>creB</i>	0,6	-0,5	0,7	1,2	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-2,1	
<i>creD</i>	2,8	2,8	4,8	12,0										
<i>crp</i>	0,7	-0,6	-2,1	-11,3	1,0	1,1	1,1	1,1	1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-2,8	7
<i>crr</i>	-0,7	0,0	-1,9	-22,1										
<i>csdE</i>	1,3	1,1	-1,4	-3,0										
<i>csgA</i>	4,6	6,0	7,0	3,6	1,3	3,3	3,8	3,6	2,9	2,7	2,3	2,1	1,6	6
<i>csgB</i>	5,2	3,0	4,9	12,6	2,0	3,6	3,6	3,9	2,3	2,1	1,9	2,1	3,7	1
<i>csgC</i>	2,7	2,8	1,6	3,9	1,2	1,8	1,7	1,9	1,3	1,2	1,5	1,4	2,4	
<i>csgD</i>	1,7	-1,2	0,9	2,5	-1,3	-1,0	1,1	-1,0	-1,4	-2,0	-2,2	-2,4	-1,6	4
<i>csrD</i>					-1,3	1,0	-1,0	-1,2	-2,2	-2,6	-3,0	-3,7	-1,9	
<i>csiR</i>	1,4	2,0	2,1	3,1										
<i>cspA</i>	-2,6	-2,6	-1,9	-1,5	-1,1	-2,0	-1,9	-1,8	-1,8	-1,9	-1,9	-1,9	-2,3	5
<i>cspB</i>	1,3	1,4	6,3	20,2	1,4	-1,0	1,3	1,2	1,9	2,5	3,4	3,1	7,0	3
<i>cspC</i>	-1,7	-2,0	-2,8	-3,4										
<i>cspF</i>	0,0	-0,5	2,9	6,2										
<i>cspH</i>	1,8	2,3	3,7	2,6										
<i>cspI</i>	2,5	3,2	8,5	32,4	1,0	1,7	1,9	2,1	2,4	3,6	5,3	8,1	10,4	8
<i>csrC</i>	0,4	3,7	3,9	3,6	1,2	2,4	3,0	3,6	3,5	3,4	3,5	3,7	4,0	1
<i>csrD</i>					-1,1	-1,1	-1,4	-1,4	-1,5	-1,9	-2,1	-2,1	-2,0	
<i>cstA</i>	-2,0	-3,6	-2,5	-2,0	-1,4	-2,0	-2,1	-2,8	-2,7	-3,0	-2,6	-2,4	-1,4	2
<i>cueO</i>					-1,3	-1,4	-1,7	-1,8	-2,3	-2,3	-2,5	-3,0	-4,4	
<i>cueR</i>	2,1	2,7	2,6	-1,1										
<i>cueR</i>	2,0	4,1	1,9	-1,9										
<i>cusA</i>	-3,4	-2,8	-1,6	-0,9	-1,4	-2,6	-2,7	-2,8	-3,1	-3,4	-3,4	-3,4	-2,7	5
<i>cusB</i>	-4,3	-3,2	-1,6	-9,4	-1,3	-2,6	-2,7	-2,5	-2,7	-3,1	-3,7	-4,6	-7,0	4
<i>cusC</i>	-5,6	-3,8	-2,9	-13,7	-1,3	-2,5	-3,2	-3,4	-3,8	-3,8	-4,5	-6,5	-10,9	
<i>cusF</i>					-1,2	-1,3	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-5,2	
<i>cusF</i>					-1,4	-1,7	-1,5	-1,2	-1,4	-1,5	-1,7	-2,3	-12,9	
<i>cusR</i>	-1,4	1,1	0,5	-2,8										
<i>cusS</i>	-1,2	-1,2	-1,3	-3,5	-1,2	-1,4	-1,4	-1,4	-1,6	-1,5	-1,6	-1,8	-2,7	7
<i>cutF / nlpE</i>					1,1	-1,1	-1,3	-1,2	-1,4	-1,5	-1,9	-2,2	-3,0	
<i>cvpA</i>	-4,3	-8,1	-6,7	-8,9	-1,1	-1,6	-1,6	-1,5	-1,6	-1,8	-1,8	-1,7	-2,4	3
<i>cyaA</i>	1,1	0,6	0,0	-8,2	-1,1	1,0	-1,0	1,1	1,1	1,0	-1,0	-1,1	-2,1	7
<i>cyaR</i>	-3,0	-2,1	-3,4	-2,3										
<i>cydA</i>	1,5	1,5	-1,7	-3,8										
<i>cydB</i>	1,5	1,5	-2,4	-8,3										
<i>cydC</i>	-1,2	-1,5	-2,7	-6,2										
<i>cydD</i>	-1,3	-1,7	-3,0	-2,5										
<i>cynS</i>	2,0	3,6	5,8	0,7										

A.3 Transkriptomanalyse

<i>dedA</i>	1,9	0,5	-0,1	-3,1	1,1	1,4	1,3	1,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,5	-3,5	7
<i>def</i>	1,1	-1,1	-1,7	-6,5	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-2,2	7
<i>degP</i>					-1,0	1,7	1,6	1,7	2,0	2,5	2,7	2,7	2,1	
<i>degS</i>					-1,1	-1,1	-1,1	1,0	-1,1	-1,0	-1,2	-1,3	-2,2	
<i>deoA</i>					-1,3	1,1	-1,2	-1,0	-1,3	-1,6	-2,4	-2,0	-3,2	
<i>deoD</i>	-1,3	-1,3	-2,1	-7,1										
<i>der/engA</i>					-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-2,2	
<i>dgkA</i>	3,1	1,8	0,7	-0,8	1,0	2,0	2,1	1,5	-1,1	-1,3	-1,6	-1,7	-1,9	4
<i>dgoT</i>	-0,5	0,6	2,4	6,6	1,4	1,2	1,7	1,3	1,8	2,5	2,8	3,1	4,7	8
<i>diaA</i>	0,0	-1,1	-1,6	-3,3										
<i>dicB</i>	0,1	1,7	3,7	18,2	1,3	1,8	2,3	1,6	1,9	2,7	3,0	3,2	7,3	8
<i>dicC</i>	1,9	-1,6	3,8	22,2	-1,3	-1,7	-1,4	-1,9	-1,4	1,2	1,5	1,8	3,2	3
<i>dicF</i>	0,1	-0,7	1,3	8,7	-1,2	1,4	1,4	1,3	2,1	1,7	2,5	3,0	5,0	8
<i>dicF1</i>					-1,5	1,3	1,4	1,3	2,0	1,5	2,6	2,3	4,2	
<i>dinI</i>					-1,4	-1,1	-1,0	1,0	-1,1	-1,4	-1,2	-1,6	-2,2	
<i>dinD</i>	-0,1	-1,3	1,1	2,8										
<i>dipZ</i>	0,0	-1,6	-2,5	-4,6	-1,1	-1,2	-1,4	-1,4	-1,5	-1,6	-1,7	-1,8	-2,6	7
<i>djlB</i>	0,6	-0,7	2,1	10,0	1,1	1,1	1,2	1,0	1,1	1,2	1,3	1,7	3,4	3
<i>djlC</i>	0,8	0,7	2,6	9,6	1,1	1,0	1,0	-1,2	1,1	1,2	1,3	1,4	2,4	3
<i>dkgA</i>	1,9	5,1	2,2	0,2	-1,3	2,1	2,2	2,4	2,7	2,4	2,6	2,8	1,7	1
<i>dkgB</i>	1,7	3,4	1,6	2,0	-1,3	1,4	1,7	2,0	2,0	1,7	1,3	-1,0	-1,2	6
<i>dkxA</i>	-1,5	-1,1	-2,5	-9,9										
<i>dld</i>					-1,2	1,3	1,2	1,3	1,1	-1,1	-1,3	-1,8	-2,6	
<i>dmlA</i>	2,2	2,7	1,7	3,5										
<i>dmsC</i>	0,9	1,2	2,6	4,3	1,1	2,0	2,1	1,7	2,2	2,4	2,3	2,3	2,3	1
<i>dnaA</i>	-1,4	-1,4	-2,9	-25,7	1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,5	-1,6	-3,2	7
<i>dnaB</i>	-1,5	-0,8	-4,1	-4,9	-1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-2,9	4
<i>dnaE</i>	-1,5	-1,9	-2,6	-4,3	-1,4	-1,3	-1,5	-1,3	-1,5	-1,7	-2,1	-2,4	-3,0	4
<i>dnaG</i>	-1,6	-1,8	-2,3	-6,4										
<i>dnaN</i>	-1,3	-0,7	-4,0	-6,7	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,9	-3,5	7
<i>dnaT</i>	1,3	1,5	0,5	-3,4	-1,3	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-2,0	7
<i>dnaX</i>	-0,6	-1,5	-0,1	-15,5	-1,0	-1,3	-1,4	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-2,8	7
<i>dosC</i>	3,3	2,1	3,3	4,7										
<i>dosP</i>	2,3	1,8	2,5	3,4										
<i>dosP</i>	2,2	2,1	2,7	3,5										
<i>dppA</i>	-0,1	-1,3	-4,9	-54,3	1,0	1,0	1,0	1,1	-1,1	-1,2	-1,6	-2,0	-6,4	7
<i>dppB</i>	-1,7	-4,1	-21,5	-25,5	1,1	-1,4	-1,6	-1,5	-1,8	-3,7	-7,4	-10,0	-8,0	4
<i>dppC</i>					-1,2	-1,8	-2,1	-2,0	-2,6	-4,6	-6,3	-6,6	-5,0	
<i>dppD</i>	-1,2	-3,0	-12,3	-12,6	-1,0	-1,5	-1,4	-1,3	-1,7	-2,9	-4,6	-7,7	-9,7	4
<i>dppF</i>	-1,3	-2,0	-12,5	-12,3	-1,0	-1,2	-1,1	-1,0	-1,3	-2,6	-4,6	-6,1	-5,9	4
<i>dps</i>	4,3	7,9	3,1	2,3	1,2	2,4	2,3	2,3	2,4	2,3	2,2	2,2	2,0	1
<i>dsbC</i>	0,6	1,3	1,4	-3,1										
<i>dsrA</i>	3,4	9,4	4,5	3,4	-1,3	3,6	3,9	4,3	3,9	3,1	2,4	1,9	1,6	6
<i>dsrB</i>	1,7	2,2	2,3	4,5										
<i>dtD</i>	0,6	-1,2	-3,7	-12,8	1,1	1,0	-1,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,6	-1,7	-2,9	7
<i>dtpA</i>	0,0	1,6	3,5	6,9	-1,1	-1,2	-1,1	1,0	1,4	1,6	1,8	2,5	3,2	3
<i>dtpD</i>	-3,1	-1,2	1,2	1,6	-1,2	-2,0	-1,5	-1,4	-1,1	1,2	1,3	1,4	1,4	3
<i>dusB</i>	-5,0	-3,8	-12,5	-8,5	-1,1	-2,1	-1,8	-1,7	-1,6	-1,6	-1,6	-1,6	-2,5	5
<i>dusC</i>	-2,4	-1,9	-4,4	-4,8	-1,2	-2,3	-1,9	-2,0	-2,1	-2,1	-1,9	-1,9	-1,4	2
<i>dut</i>	-1,1	1,2	1,4	-4,6	-1,3	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	-1,0	-1,3	-3,3	7

A.3 Transkriptomanalyse

<i>dxr</i>					-1,0	-1,5	-1,5	-1,4	-1,5	-1,6	-1,8	-2,0	-2,7	
<i>dxs</i>	-1,4	-1,5	-2,4	-4,3	-1,4	-1,5	-1,5	-1,4	-1,5	-1,6	-1,9	-2,5	-4,7	7
<i>eaeH</i>	-0,5	-0,7	2,7	7,8	1,7	1,5	1,5	1,1	1,6	2,1	2,5	3,8	8,2	3
<i>eamA</i>	1,2	0,0	1,2	3,9										
<i>eamB</i>	0,7	-0,6	3,6	9,6	1,8	1,7	2,2	1,9	2,4	2,7	3,3	3,7	6,3	8
<i>ebgA</i>					1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,0	1,3	1,1	1,8	2,2	
<i>ebgA</i>					1,2	-1,1	1,1	-1,2	1,1	1,3	1,7	1,7	3,3	
<i>ebgC</i>	-0,2	1,5	1,6	5,3	1,4	-1,4	1,3	-1,1	1,4	2,4	2,7	2,9	6,5	3
<i>ecnA</i>	-1,4	-1,2	-1,9	-5,0	-1,0	-1,4	-1,2	-1,3	-1,2	-1,4	-1,5	-1,6	-3,7	7
<i>ecnB</i>	2,0	5,7	0,1	0,9										
<i>eco</i>	2,9	7,1	6,7	0,8	1,0	1,8	2,2	2,7	2,9	3,0	3,1	2,8	1,8	1
<i>ecpD</i>	2,0	1,4	4,5	11,8	1,3	1,8	2,1	2,0	2,0	2,1	2,1	2,5	5,4	8
<i>eda</i>	-1,6	-0,1	-3,1	-10,0	-1,2	1,1	1,0	1,0	-1,1	-1,1	-1,3	-1,6	-2,9	7
<i>efeB</i>	-2,1	-2,0	-0,6	1,9	-2,6	-3,6	-3,1	-3,0	-2,9	-2,6	-2,3	-2,2	-1,8	2
<i>efeO</i>	-5,7	-6,9	-5,0	-0,4	-3,9	-11,0	-9,2	-9,9	-8,5	-7,7	-6,1	-4,9	-4,0	2
<i>efeU</i>	-5,2	-6,6	-3,0	1,2	-3,1	-13,7	-3,9	-9,8	-2,4	-2,1	-1,4	-1,0	1,5	2
<i>efeU</i>	-6,1	-7,1	-0,8	2,3										
<i>efp</i>	-1,4	-1,2	-2,2	-6,9										
<i>elaA</i>	1,1	0,6	1,4	2,6										
<i>elaB</i>	1,7	3,3	-0,1	1,4										
<i>elaD</i>	1,2	1,6	5,5	13,2	1,6	1,6	1,8	1,5	1,8	2,5	3,1	3,2	4,4	8
<i>elfA</i>	1,9	1,8	4,5	13,4										
<i>elfC</i>	0,2	1,1	3,8	9,5	-1,1	-1,2	1,1	1,0	1,2	1,3	1,5	1,5	3,0	3
<i>elfC</i>	0,7	0,0	2,8	9,2	-1,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,0	1,1	1,1	2,2	
<i>elfC</i>	0,0	0,2	3,0	11,7	1,2	-1,1	1,2	1,0	1,5	1,8	2,2	2,7	5,3	8
<i>elfD</i>	1,3	0,1	3,2	12,7										
<i>elfG</i>	1,3	1,2	2,3	7,5										
<i>emrA</i>	-1,9	-3,4	-2,7	-4,3	-1,2	-1,6	-1,9	-1,9	-2,4	-2,9	-3,0	-2,9	-2,3	5
<i>emrD</i>					1,6	-1,0	1,4	1,4	2,5	3,2	3,4	3,3	5,1	
<i>emrK</i>	0,7	-1,8	4,1	18,4	1,5	1,9	2,1	1,9	2,0	2,2	3,1	3,5	8,9	8
<i>emrY</i>	1,4	-1,5	3,7	14,6	1,2	1,4	1,7	1,2	1,4	1,8	2,5	2,8	5,6	8
<i>eno</i>	0,1	0,6	1,1	-10,5										
<i>entB</i>					-1,9	-3,1	-2,0	-2,5	-1,5	-1,2	-1,2	1,0	1,8	
<i>entC</i>					-6,9	-11,4	-5,8	-13,8	-5,4	-5,3	-4,3	-3,3	-2,4	
<i>entD</i>					-4,8	-3,2	-2,8	-2,8	-2,8	-2,7	-2,8	-2,4	-3,2	
<i>entE</i>					-11,8	-12,0	-8,7	-10,0	-8,1	-8,1	-6,2	-4,9	-3,2	
<i>entF</i>					-2,3	-2,4	-1,9	-2,0	-1,9	-1,7	-1,7	-1,6	-1,2	
<i>entH</i>					-3,0	-3,0	-2,5	-2,5	-2,0	-2,3	-1,7	-1,3	1,0	
<i>entS</i>					-1,8	-3,6	-2,4	-4,2	-1,9	-1,8	-1,2	1,0	1,7	
<i>envC</i>					-1,4	-1,4	-1,8	-1,8	-2,4	-2,7	-3,5	-3,0	-3,8	
<i>envR</i>	-0,8	-1,8	2,7	8,6	1,4	-1,9	1,1	-1,6	1,3	1,5	1,7	2,8	4,9	
<i>envZ</i>					-1,1	-1,0	-1,2	-1,1	1,0	1,1	1,1	-1,1	-2,1	
<i>epd</i>	1,1	-1,3	0,7	-5,4	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,3	-1,6	-1,8	-2,2	4
<i>eptA</i>	20,2	2,5	-0,1	2,3	4,6	6,3	4,7	2,7	1,1	-1,4	-1,6	-1,3	-1,2	4
<i>era</i>	-2,0	-1,7	-2,2	-7,0	-1,1	-1,5	-1,4	-1,4	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-2,9	7
<i>erfK</i>	1,7	2,3	1,7	3,4										
<i>erfK</i>	0,0	1,4	1,5	2,7										
<i>erpA</i>	0,8	1,3	1,3	-2,7										
<i>essQ</i>	2,5	0,3	4,5	42,4										
<i>etk</i>					-1,3	3,2	3,1	3,0	2,8	2,4	2,1	1,6	1,2	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>etp</i>	9,5	10,1	8,1	1,1	-1,0	5,7	5,6	5,4	4,9	4,5	3,4	2,4	-1,1	6
<i>eutB</i>	2,2	2,6	1,7	-0,1										
<i>eutD</i>					1,2	1,4	1,5	1,5	1,7	1,4	1,7	2,1	2,3	
<i>eutE</i>	-1,2	-0,4	2,3	5,4	1,5	1,4	2,3	1,8	2,8	3,0	3,8	5,3	9,9	8
<i>eutH</i>	0,7	1,8	2,4	5,9	1,5	1,4	1,8	1,2	2,1	2,3	2,4	3,1	5,8	8
<i>eutI</i>					1,5	1,5	2,1	1,5	2,2	2,4	3,1	3,4	5,2	
<i>eutQ</i>	1,3	0,6	2,3	4,3										
<i>eutR</i>	2,0	2,1	2,8	0,6										
<i>evgS</i>					-1,1	1,2	1,2	1,2	-1,0	-1,4	-1,7	-2,2	-2,6	
<i>exbB</i>	-8,1	-11,7	-2,0	-5,3	-3,1	-7,1	-7,1	-5,9	-5,5	-5,6	-6,4	-7,3	-7,2	5
<i>exbD</i>	-7,0	-9,7	-1,8	-5,5	-3,0	-10,7	-8,9	-8,9	-6,9	-6,3	-6,2	-5,5	-4,5	2
<i>exoD</i>	0,0	1,2	2,9	7,0										
<i>fabA</i>	-0,6	0,0	1,4	-4,0										
<i>fabB</i>	1,3	1,7	1,5	-14,2										
<i>fabD</i>	-0,1	-1,3	-3,9	-21,0	1,1	-1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-3,2	7
<i>fabF</i>	-1,4	-2,3	-4,8	-14,9	-1,1	-1,3	-1,6	-1,6	-1,8	-1,9	-2,3	-2,7	-4,9	7
<i>fabG</i>	-1,1	-1,6	-5,4	-20,3	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,4	-1,4	-1,6	-2,2	7
<i>fabH</i>	-1,3	-1,5	-4,2	-15,0	-1,1	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,8	-4,7	7
<i>fabI</i>	-0,6	-1,2	-2,1	-11,0										
<i>fabR</i>	1,4	0,5	1,1	-1,4	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-2,3	7
<i>fabZ</i>	-0,6	-1,3	-1,3	-7,7	1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-2,5	7
<i>fadA</i>					-1,1	-1,3	-1,4	-1,2	-1,5	-1,8	-2,1	-2,3	-3,0	
<i>fadB</i>					-1,2	-1,1	-1,3	-1,3	-1,7	-1,9	-1,9	-2,1	-2,7	
<i>fadD</i>					-1,2	-1,8	-2,0	-2,1	-2,4	-2,5	-2,2	-2,4	-2,0	
<i>fadH</i>	-1,4	-1,8	2,1	7,3										
<i>fadK</i>					1,0	1,1	1,5	1,7	1,7	1,7	1,6	2,1	2,5	
<i>fadL</i>	-2,7	-4,4	-5,5	-2,2	-1,1	-2,4	-2,4	-2,4	-3,0	-3,1	-3,5	-3,4	-2,3	5
<i>fbaA</i>	0,5	-0,7	-1,5	-18,3	1,0	1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-2,3	7
<i>fbp</i>	1,1	0,0	-1,8	-7,1	-1,2	1,0	1,0	1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-1,6	-2,5	7
<i>fcl / wcaG</i>					1,0	-1,0	1,3	1,0	1,5	1,5	1,7	2,5	3,1	
<i>fdnH</i>					1,4	-1,4	1,2	-1,0	1,4	1,6	1,8	2,5	4,0	
<i>fdnI</i>					1,2	1,2	1,4	1,5	2,3	2,3	2,3	2,6	2,8	
<i>fdoG</i>	-0,1	-0,5	0,6	-7,2	-1,1	-1,0	-1,2	1,3	-1,1	-1,1	-1,1	-1,6	-2,1	7
<i>fdrA</i>					1,2	1,0	-1,4	-1,2	-1,6	-1,8	-2,0	-2,5	-3,3	
<i>fdx</i>	-0,2	-1,2	-0,5	-12,6	-1,3	-1,5	-1,4	-1,5	-1,4	-1,5	-1,6	-1,5	-2,3	7
<i>feaB</i>	0,0	-1,3	1,6	6,6	-1,0	-1,3	-1,2	-1,6	-1,1	-1,0	1,1	1,4	2,4	3
<i>feaR</i>	-0,9	-1,5	1,2	3,8	-1,4	-2,1	-1,8	-2,0	-2,0	-1,8	-1,6	-1,5	-1,1	2
<i>fecA</i>	-14,2	-17,3	-13,2	-14,3	-2,4	-14,0	-17,9	-19,4	-15,0	-15,2	-11,7	-11,0	-6,1	2
<i>fecB</i>	-6,8	-6,8	-4,9	-6,4	-2,4	-6,3	-6,9	-6,9	-7,4	-7,9	-7,4	-8,5	-8,0	5
<i>fecC</i>					-2,6	-4,1	-4,3	-4,7	-3,6	-3,3	-3,0	-2,7	-1,8	
<i>fecD</i>	-3,3	-3,6	-2,0	-0,4	-3,2	-5,6	-5,1	-5,4	-3,9	-4,8	-3,8	-3,5	-2,7	2
<i>fecE</i>	-2,6	-2,5	-2,0	-0,4	-1,9	-2,5	-2,3	-2,4	-2,5	-2,6	-2,6	-2,4	-1,4	2
<i>fecl</i>	-3,1	-3,0	-1,4	0,1	-2,9	-5,8	-5,4	-6,4	-5,3	-4,5	-4,4	-3,3	-2,3	2
<i>fecR</i>					-2,6	-4,5	-4,6	-6,0	-3,3	-4,0	-3,4	-3,2	-2,2	
<i>feoA</i>	-2,5	-1,8	0,6	-0,7	-1,8	-4,4	-4,9	-4,7	-2,6	-1,9	-1,6	-1,3	-1,6	2
<i>feoB</i>	-2,6	-2,2	-1,7	-1,2	-2,3	-6,1	-4,1	-5,1	-2,9	-2,5	-2,2	-1,9	-1,6	2
<i>fepA</i>					-4,2	-3,6	-3,5	-4,0	-3,7	-3,4	-2,7	-2,6	-2,0	
<i>fepB</i>	-2,6	-2,3	-0,8	0,3	-2,9	-3,8	-3,8	-3,7	-3,2	-3,3	-3,1	-2,2	-1,8	2
<i>fepC</i>					-3,4	-7,2	-4,8	-6,9	-4,8	-3,7	-3,8	-2,6	-1,7	
<i>fepD</i>					-3,4	-8,2	-5,9	-8,4	-5,0	-4,7	-4,7	-2,9	-2,1	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>fepE</i>	-1,2	-0,9	3,1	11,3	-1,1	-1,5	1,2	1,1	1,4	1,6	1,9	2,4	3,5	8
<i>fepG</i>					-2,5	-2,5	-2,0	-1,9	-2,3	-2,3	-2,6	-2,8	-2,6	
<i>fes</i>					-2,3	-3,7	-2,9	-3,8	-2,0	-1,7	-1,4	-1,1	1,5	
<i>ffh</i>	-0,1	-1,4	-0,6	-5,5										
<i>ffs</i>	-2,3	-0,5	33,6	169,6	-1,1	-1,6	-1,1	-1,1	2,2	6,7	9,9	13,7	16,2	8
<i>fhuA</i>	-9,1	-5,7	-2,4	-2,0	-6,8	-7,0	-6,0	-5,4	-5,8	-5,6	-6,3	-5,9	-5,0	2
<i>fhuC</i>					-2,8	-2,8	-2,9	-2,4	-2,6	-2,8	-2,6	-2,7	-1,7	
<i>fhuD</i>					-2,5	-2,9	-3,1	-2,9	-2,1	-2,1	-2,1	-1,6	-1,2	
<i>fhuE</i>					-2,1	-2,2	-1,9	-2,1	-1,7	-1,7	-1,2	-1,0	1,7	
<i>fhuF</i>	-7,0	-7,8	0,7	-1,1	-8,0	-9,3	-10,0	-9,3	-9,3	-8,9	-8,3	-7,5	-6,1	2
<i>fhuF</i>	-6,1	-7,8	0,3	-0,9	-7,5	-16,4	-13,2	-15,4	-12,5	-10,5	-9,2	-7,0	-4,7	2
<i>fic</i>	2,0	4,0	1,3	0,9										
<i>fimA</i>	-0,8	-2,1	-2,6	-1,1	-1,0	-1,4	-1,5	-1,6	-2,0	-2,9	-3,6	-3,9	-3,0	4
<i>fimB</i>	-2,8	-5,8	-0,9	2,9	-1,0	-2,9	-3,1	-3,2	-3,0	-2,6	-1,9	-1,7	1,1	2
<i>fimC</i>	0,6	-1,6	-0,8	2,5										
<i>fimD</i>	1,3	0,1	2,1	7,9										
<i>fimE</i>	1,6	1,6	5,2	9,4	-1,0	-1,2	-1,1	-1,0	1,2	1,6	2,0	2,1	2,6	8
<i>fimF</i>	1,6	1,8	2,4	7,2										
<i>fimH</i>	1,7	1,7	1,8	2,6										
<i>fimI</i>	1,5	0,0	1,8	6,5										
<i>fimZ</i>	0,7	0,6	3,3	10,1	2,0	2,0	2,5	2,3	2,3	3,8	3,6	4,4	6,2	8
<i>fis</i>	-4,5	-5,0	-14,6	-8,6	-1,1	-1,9	-1,7	-1,6	-1,6	-1,6	-1,6	-1,6	-3,1	7
<i>fiu</i>					-9,8	-6,5	-3,7	-4,4	-3,3	-2,6	-2,9	-2,0	-1,5	
<i>fixX</i>	-0,5	-1,2	4,1	8,3										
<i>fkIB</i>	-1,2	0,0	-1,7	-2,5										
<i>fkpA</i>	1,3	-1,5	-2,0	-2,8	-1,2	-1,2	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-3,0	7
<i>fkpB</i>	-1,8	-2,2	-4,2	-8,1										
<i>fldA</i>	1,4	1,6	1,7	-8,3	-1,0	-1,4	-1,5	-1,4	-1,4	-1,6	-1,5	-1,5	-2,4	8
<i>fldB</i>	-0,6	-1,1	0,1	-2,5										
<i>flgA</i>	-6,3	-11,4	-6,3	-6,5	-1,1	-4,3	-5,5	-5,7	-5,2	-4,9	-4,5	-4,7	-2,6	5
<i>flgB</i>	-11,0	-80,0	-30,6	-23,0	1,0	-4,9	-25,3	-32,9	-19,2	-21,3	-17,8	-13,0	-8,0	5
<i>flgC</i>	-5,6	-73,2	-37,8	-12,6	1,1	-3,4	-16,0	-28,0	-16,0	-11,2	-11,0	-8,3	-4,1	5
<i>flgD</i>	-6,5	-74,9	-37,7	-25,9	1,1	-3,4	-12,8	-15,9	-12,5	-13,6	-11,0	-9,3	-6,4	5
<i>flgE</i>	-3,7	-29,2	-20,4	-9,3	-1,0	-2,3	-6,7	-7,6	-6,1	-5,7	-4,3	-4,0	-2,3	2
<i>flgE</i>	-5,8	-36,3	-34,6	-24,7	1,1	-2,6	-8,8	-9,1	-8,3	-7,4	-6,7	-6,6	-3,9	2
<i>flgF</i>	-8,2	-39,0	-25,3	-13,2	1,1	-4,6	-14,8	-28,4	-16,6	-12,0	-10,4	-6,9	-5,4	5
<i>flgG</i>	-7,6	-16,8	-20,9	-24,9	-1,0	-3,2	-7,0	-6,2	-6,4	-6,3	-7,2	-6,1	-5,6	5
<i>flgH</i>	-6,2	-12,3	-9,5	-6,6	1,2	-5,0	-6,6	-9,7	-7,6	-8,0	-6,0	-4,8	-3,3	5
<i>flgI</i>	-13,7	-18,4	-13,6	-17,7	-1,1	-4,1	-8,0	-7,7	-8,4	-8,7	-10,5	-9,0	-7,7	5
<i>flgJ</i>	-6,9	-20,1	-11,5	-8,1	1,0	-4,3	-6,8	-6,6	-7,2	-6,9	-6,3	-6,2	-4,0	5
<i>flgK</i>	-2,2	-15,4	-10,3	-5,4	1,5	-1,1	-4,4	-5,1	-4,4	-4,2	-4,3	-3,1	-2,3	5
<i>flgL</i>	-1,5	-4,7	-4,2	-4,7	1,5	-1,1	-2,7	-2,6	-2,7	-2,8	-2,9	-2,9	-2,4	5
<i>flgM</i>	-1,5	-2,7	-3,4	-11,7	1,2	1,2	-1,4	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-1,7	-2,2	4
<i>flgN</i>	-1,7	-2,8	-3,7	-5,8	1,2	1,1	-1,5	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-1,8	-2,2	4
<i>flhA</i>					-1,1	-2,0	-1,8	-1,5	-1,4	-1,3	-1,2	-1,2	1,0	
<i>flhB</i>	-3,1	-3,4	-1,6	1,7	-1,3	-6,6	-5,4	-6,8	-5,0	-4,1	-3,2	-2,4	-1,8	2
<i>flhC</i>	-3,3	-3,3	-3,1	-5,0	-1,2	-1,4	-1,7	-1,7	-2,0	-2,4	-3,0	-3,8	-4,8	4
<i>flhD</i>	-2,4	-2,7	-2,0	-4,2	-1,1	-1,4	-1,5	-1,5	-1,7	-1,9	-2,4	-3,3	-3,3	4
<i>flhE</i>	-1,9	-2,4	2,1	7,2	1,2	-3,8	-2,2	-4,2	-1,1	1,1	1,5	2,0	3,7	3
<i>fliA</i>	-7,1	-52,0	-30,4	-15,8	-1,0	-3,4	-20,0	-28,0	-25,1	-20,9	-22,7	-17,7	-13,6	5

A.3 Transkriptomanalyse

<i>fruR</i>	-0,1	-1,1	-2,6	-10,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-2,9	7
<i>fruA</i>	-1,8	-1,9	2,2	8,6										
<i>fruR</i>	1,5	1,3	2,2	5,5										
<i>fruX</i>					1,3	1,0	1,3	1,2	1,3	1,5	1,6	1,7	2,0	
<i>fruB</i>	-0,6	1,1	3,8	9,8	1,8	1,1	1,6	1,1	1,7	2,8	3,6	4,0	11,5	8
<i>fruC</i>	-1,9	-1,6	2,1	6,5	1,5	-1,8	1,7	-1,0	2,3	2,0	2,8	4,1	4,8	8
<i>fruY</i>	1,7	2,3	4,5	4,1										
<i>fsaB</i>					1,3	1,0	1,2	1,1	1,4	1,7	1,2	1,5	2,4	
<i>ftn</i>	0,7	1,3	-0,7	-3,0										
<i>ftnB</i>	2,0	1,6	0,7	2,7										
<i>ftsA</i>	-0,5	-1,5	-2,1	-2,5	1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,3	-1,4	-1,5	-2,3	7
<i>ftsB</i>	-1,2	-1,1	-0,2	-8,6										
<i>ftsE</i>	-1,3	-1,7	-2,2	-3,8										
<i>ftsH</i>	-0,8	-2,1	-2,4	-6,9										
<i>ftsI</i>	-1,4	-1,8	-2,2	-2,5										
<i>ftsK</i>	-1,5	-2,1	-3,6	-6,9	-1,1	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-1,7	-2,0	-2,6	-4,7	7
<i>ftsL</i>	-1,1	-1,2	-1,8	-6,6	1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	1,0	-1,0	-1,1	-2,6	7
<i>ftsN</i>	-1,5	-1,6	-2,3	-4,5										7
<i>ftsP</i>					-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,7	-1,8	-2,2	
<i>ftsQ</i>	-1,1	-1,3	-1,5	-3,4	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,0	-1,1	-1,3	-2,2	7
<i>ftsW</i>	-0,7	-2,0	-0,9	3,1										
<i>ftsX</i>	-0,7	-1,6	-2,3	-2,8										
<i>ftsY</i>	-1,1	-1,4	-1,9	-3,0										
<i>ftsZ</i>	-0,1	-1,1	-2,1	-6,7	1,1	1,1	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,3	-3,2	7
<i>fucA</i>	1,7	1,5	4,7	14,8	1,5	3,2	3,5	3,3	3,4	3,4	3,1	2,5	3,9	1
<i>fucO</i>	0,3	0,1	3,1	8,6	1,2	1,3	1,4	1,3	1,4	1,4	1,7	1,9	2,8	8
<i>fucP</i>	0,0	0,1	3,3	8,4	1,1	-1,5	1,1	1,0	1,2	1,5	1,8	2,3	4,1	8
<i>fucU</i>	1,9	2,0	-1,6	-2,2	-1,0	1,6	1,5	1,4	1,4	1,2	1,1	-1,0	-2,4	7
<i>fumA</i>	0,0	-1,4	-2,2	-3,8	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-1,7	-2,5	7
<i>fumC</i>	1,7	1,4	5,8	0,6										
<i>fur</i>	-1,2	-0,6	0,0	-8,7										
<i>fusA</i>	-1,2	-1,2	0,0	-8,6										
<i>gabD</i>					-1,1	1,7	1,1	1,1	-1,1	-1,4	-1,7	-2,0	-2,4	
<i>gabT</i>					-1,4	1,1	-1,2	-1,1	-1,6	-1,5	-1,7	-1,8	-2,1	
<i>gadA</i>	2,9	28,0	3,2	6,1	-1,2	8,3	10,6	11,6	7,4	3,4	2,7	1,8	1,9	6
<i>gadB</i>	7,6	21,9	-1,2	1,0	1,2	14,3	16,7	15,9	11,4	5,6	3,6	2,9	2,4	6
<i>gadC</i>	3,4	14,4	-0,7	3,9	1,3	9,4	12,0	9,3	6,6	3,3	2,4	2,1	2,3	6
<i>gadE</i>	6,0	17,6	2,6	4,0	1,6	8,8	9,8	10,3	7,7	5,7	5,0	3,8	4,3	6
<i>gadW</i>	2,6	3,4	-2,5	-1,3	1,0	2,1	2,0	1,9	1,2	-1,4	-1,9	-2,1	-2,5	4
<i>gadX</i>	3,1	4,4	0,0	-2,8	-1,1	1,7	1,7	1,8	1,5	1,4	1,3	1,2	-1,4	
<i>gadY</i>	4,0	5,7	-2,4	-1,0	-1,1	2,4	2,6	2,4	1,8	1,3	1,0	-1,4	-2,6	7
<i>galE</i>	0,0	-1,6	-3,5	-16,7	-1,0	-1,1	-1,3	-1,2	-1,5	-1,9	-2,2	-3,3	-5,1	7
<i>galF</i>	-1,1	-1,1	-2,9	-5,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-2,1	7
<i>galM</i>	1,2	0,1	-2,2	-7,3	-1,1	1,1	1,1	1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-2,8	7
<i>galP</i>	3,3	2,3	1,3	0,9	1,3	2,3	2,3	2,2	1,6	1,2	-1,0	-1,2	1,0	6
<i>galR</i>	1,3	1,6	3,2	-1,0	-1,2	2,3	2,5	2,8	3,1	3,1	2,8	2,3	-1,3	6
<i>galT</i>	-0,2	-2,1	-3,5	-7,0	-1,1	-1,3	-1,5	-1,5	-1,7	-2,3	-2,7	-2,7	-2,8	4
<i>galU</i>	1,1	-1,3	-2,6	-3,2	-1,1	1,1	-1,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-2,4	7
<i>gapA</i>	-0,1	-1,2	-0,8	-8,4										
<i>gapC</i>	1,2	1,5	-1,4	-6,9										

A.3 Transkriptomanalyse

<i>garD</i>	-1,5	-1,5	1,6	3,5													
<i>garL</i>					1,2	1,5	1,5	1,6	1,4	1,4	1,4	1,6	2,8				
<i>garP</i>	-1,1	1,7	4,6	6,8													
<i>gatA</i>	-1,3	-3,0	-2,7	-9,7	-1,0	-1,3	-1,5	-1,5	-1,8	-1,8	-2,1	-2,6	-4,1	4			
<i>gatB</i>	-1,3	-6,0	-8,9	-4,5	1,1	-1,3	-1,6	-1,8	-2,9	-3,7	-4,0	-6,1	-3,9	4			
<i>gatC</i>	-1,5	-5,1	-6,3	-4,2	1,1	-1,2	-1,7	-2,1	-2,9	-3,8	-4,4	-4,5	-4,5	4			
<i>gatD</i>	-1,7	-5,4	-3,1	0,8	1,0	-1,5	-1,9	-2,7	-2,2	-1,6	-1,3	1,1	2,1	2			
<i>gatR</i>	1,1	1,7	6,0	18,8													
<i>gatY</i>	-1,4	-1,6	-1,1	-6,7													
<i>gatZ</i>	-1,4	-2,4	-2,0	-9,8													
<i>gcl</i>	-1,2	-1,2	1,5	4,7	-1,2	-1,1	-1,0	-1,0	1,1	1,2	1,3	1,8	2,3				
<i>gcp</i>	-0,6	1,4	-0,5	-4,1	-1,2	-1,4	-1,4	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-2,2	7			
<i>gcvB</i>	0,0	4,3	10,0	8,7	1,1	-1,3	-1,1	1,2	1,7	1,8	2,0	2,3	2,6	3			
<i>gcvH</i>	-2,6	-3,9	-3,3	-10,9	1,0	-2,0	-1,9	-1,6	-1,6	-2,1	-2,2	-2,0	-1,7	5			
<i>gcvP</i>	-7,0	-9,1	-9,9	-10,4	-1,1	-3,0	-2,8	-2,1	-2,0	-3,4	-3,5	-3,6	-3,6	5			
<i>gcvR</i>	1,1	-1,1	-2,6	-6,9													
<i>gcvT</i>	-5,8	-9,5	-7,2	-9,2	-1,1	-2,4	-2,5	-2,2	-2,3	-3,4	-3,9	-3,6	-2,7	5			
<i>gdhA</i>	-1,4	-2,1	-5,4	-9,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,8	-2,2	-2,3	-4,3	7			
<i>gef</i>	1,8	0,9	2,0	4,1													
<i>gfcE</i>	9,2	12,4	16,4	3,7	-1,0	4,8	4,8	4,4	4,3	4,1	3,6	2,8	-1,2	6			
<i>ggt</i>					-1,2	-1,1	-1,3	-1,0	-1,4	-1,6	-1,8	-2,2	-2,8				
<i>ghrA</i>	0,7	-0,6	-1,5	-6,2													
<i>ghrB</i>	1,3	1,2	-2,3	-4,4	-1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	-1,1	-2,1	7			
<i>gidA</i>	-2,5	-1,6	-4,9	-4,3	-1,1	-1,6	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-2,2	7			
<i>gidB / rsmG</i>					-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-2,1				
<i>gip</i>	-1,2	1,5	3,0	6,2	1,4	1,4	1,6	1,6	1,6	1,8	1,9	2,5	4,0	8			
<i>glcB</i>	2,0	4,0	0,6	1,1	-1,1	1,7	2,1	2,1	1,6	1,2	1,1	-1,1	-1,1	6			
<i>glcD</i>	4,1	11,9	1,1	1,0	-1,3	3,3	3,8	3,8	3,0	2,2	1,8	1,5	1,0	6			
<i>glcG</i>	2,9	6,1	-2,2	-2,8	-1,1	2,3	2,4	2,2	1,8	1,3	-1,0	-1,3	-2,3	6			
<i>glcA</i>	14,2	24,4	26,5	2,2	1,4	9,6	10,5	11,2	10,7	10,1	8,6	5,9	2,2	6			
<i>glgA</i>	1,8	1,7	1,8	-8,7	-1,0	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,1	-3,7	7			
<i>glgB</i>	1,3	-1,3	-3,2	-9,1	-1,0	1,2	1,1	1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-2,3	7			
<i>glgC</i>	1,5	-0,2	-3,8	-4,9	1,0	1,4	1,2	1,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-2,8	7			
<i>glgP</i>	2,4	2,0	2,1	-4,6	-1,0	1,8	1,7	1,8	1,8	1,7	1,5	1,1	-2,8	6			
<i>glgS</i>	2,7	4,2	1,2	1,8	1,0	2,0	1,9	2,0	2,0	1,8	1,8	1,7	1,4	6			
<i>glgX</i>	1,4	-0,7	-2,9	-6,0	-1,0	1,3	1,1	1,1	1,0	-1,0	-1,2	-1,3	-2,6	7			
<i>glmM</i>					-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-2,2	-2,5				
<i>glmS</i>	0,7	-0,7	-3,1	-7,3	-1,3	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,8	-3,3	7			
<i>glmU</i>	1,2	-1,6	-3,0	-7,0	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-2,2	-4,5	7			
<i>glmY</i>	-0,1	1,4	1,8	4,3	1,6	3,0	4,1	4,7	5,1	3,4	2,5	2,1	1,5	6			
<i>glnA</i>	-5,5	-4,1	-7,9	-4,7	-1,2	-3,8	-3,0	-2,7	-3,4	-4,5	-5,0	-4,4	-6,2	5			
<i>glnB</i>	0,1	0,0	-1,6	-3,5													
<i>glnD</i>	-1,1	1,2	1,5	-2,5													
<i>glnE</i>					-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-1,8	-2,3				
<i>glnG</i>					-1,2	-1,6	-1,5	-1,6	-1,7	-2,1	-1,9	-1,6	-1,6				
<i>glnH</i>	0,0	0,0	-2,1	-9,8	-1,0	1,1	1,1	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-2,0	7			
<i>glnK</i>					1,1	-1,9	1,1	-1,6	1,1	1,7	2,2	2,5	3,8				
<i>glnL</i>	-5,0	-2,9	-4,8	-9,8	1,1	-2,3	-2,2	-2,1	-2,3	-2,3	-2,7	-1,9	-1,8	5			
<i>glnP</i>	-0,5	-1,8	-6,6	-6,6	1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,7	-1,9	-2,8	-4,5	7			
<i>glnQ</i>	-1,6	-2,0	-3,8	-5,9	-1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,7	-2,4	-4,5	7			

A.3 Transkriptomanalyse

<i>glnS</i>	-1,3	-1,9	-3,5	-10,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,6	-1,8	-2,4	-4,5	7
<i>gloA</i>	0,6	1,5	1,5	-4,8										
<i>glpA</i>	0,6	-0,7	-3,0	-4,9										
<i>glpD</i>	0,6	0,7	0,6	-9,4	-1,2	-1,0	-1,2	1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-1,9	-2,1	6
<i>glpE</i>	1,3	-0,6	-1,4	-2,3										
<i>glpF</i>	-1,7	-2,0	-1,8	-6,0	-1,0	-1,2	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-1,7	-1,9	-2,3	4
<i>glpG</i>	-0,7	-1,4	-1,8	-9,1	1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-2,3	7
<i>glpK</i>	-2,1	-3,7	-3,6	-15,7	-1,2	-1,5	-1,8	-1,8	-2,2	-2,2	-2,7	-3,2	-4,1	4
<i>glpQ</i>	0,2	1,2	1,8	4,3										
<i>glpR</i>	1,3	-0,6	-1,6	-7,0	-1,1	1,1	1,0	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,5	-2,9	7
<i>glpT</i>	-0,5	-1,5	1,7	2,6	1,1	-1,2	1,0	-1,5	1,1	1,5	2,0	2,7	4,6	3
<i>glpX</i>					-1,4	-1,5	-1,7	-1,7	-1,9	-2,0	-2,5	-2,4	-2,2	
<i>gltA</i>	-1,2	-1,5	-1,5	-3,5										
<i>gltB</i>	-2,5	-7,5	-15,7	-11,8	-1,2	-2,0	-2,6	-2,7	-3,8	-4,7	-5,6	-7,5	-6,6	4
<i>gltD</i>	-2,2	-10,2	-17,6	-12,8	-1,2	-1,9	-2,8	-3,3	-4,3	-5,4	-6,9	-8,7	-8,9	4
<i>gltF</i>	-2,1	-3,8	-2,2	2,3	-1,2	-2,2	-2,2	-2,4	-3,1	-3,3	-2,8	-2,3	-1,7	5
<i>gltI</i>	1,3	1,4	-2,2	-20,1										
<i>gltJ</i>	0,0	-1,2	-2,5	-4,1										
<i>gltS</i>	-1,5	1,2	1,9	4,6										
<i>gltX</i>	-0,1	-1,2	-2,0	-6,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-2,2	7
<i>glxR</i>	-0,4	-0,1	2,3	7,4	1,6	1,2	1,5	1,2	1,8	2,0	2,0	2,4	4,1	8
<i>glyA</i>	-0,8	-3,3	-10,4	-11,3	1,1	-1,2	-1,6	1,1	-1,6	-2,1	-2,4	-2,9	-3,2	7
<i>glyQ</i>	-1,4	-1,7	-3,2	-8,2	-1,1	-1,5	-1,5	-1,4	-1,5	-1,6	-1,8	-1,9	-3,2	7
<i>glyS</i>	-1,6	-2,4	-4,5	-13,0	-1,1	-1,5	-1,6	-1,5	-1,6	-1,7	-1,7	-1,9	-2,3	4
<i>gmd</i>					1,1	1,1	1,2	1,3	1,3	1,3	1,5	1,9	3,1	
<i>gmhA / lpcA</i>					-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,8	-2,7	
<i>gmk</i>	-1,2	-1,4	-1,8	-6,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,3	-1,3	-1,5	-1,8	-2,9	7
<i>gmm //</i>	-1,2	0,1	2,1	3,4	-1,2	-1,1	1,1	-1,1	1,1	1,1	1,2	1,7	2,0	3
<i>gnd</i>	1,1	0,0	-1,7	-8,0	1,2	1,1	-1,1	1,2	-1,1	-1,4	-1,8	-2,3	-3,6	7
<i>gntP</i>					1,3	1,2	1,4	1,3	1,6	1,6	1,8	2,4	3,3	
<i>gntT</i>	-2,4	-2,1	-1,7	1,3										
<i>gntU</i>	-0,8	1,2	2,4	3,5	1,1	-1,1	1,1	-1,3	1,2	1,0	1,4	1,6	2,6	3
<i>gntX</i>					-1,1	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,6	-1,6	-1,7	-2,2	
<i>gor</i>	0,5	0,7	-2,2	-4,5	-1,3	1,1	1,0	1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,4	-3,8	7
<i>gph</i>	1,3	-1,3	-3,9	-6,3	-1,1	1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,6	-1,9	-3,6	7
<i>gpmA</i>	0,0	1,2	-0,5	-9,2	-1,0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	-1,1	
<i>gpmB</i>					-1,4	-1,3	-1,6	-1,3	-1,7	-1,7	-1,8	-2,0	-1,7	
<i>gpmM</i>	-0,1	-1,5	-6,1	-36,1	-1,2	-1,0	-1,1	-1,2	-1,5	-1,8	-1,8	-2,2	-6,2	7
<i>gpp</i>					-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,6	-3,2	
<i>gpsA</i>	-1,7	-2,2	-13,4	-45,7	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,8	-1,9	-2,1	-5,4	7
<i>gpt</i>	-2,5	-1,3	-4,3	-5,5	-1,1	-1,3	-1,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-2,8	7
<i>greA</i>	-0,2	-1,7	-1,9	-10,8	-1,0	-1,3	-1,4	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,7	-2,7	7
<i>greB</i>					1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,3	1,4	1,3	-1,3	
<i>groEL</i>	0,6	-1,4	-9,3	-21,8	-1,0	1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	1,1	
<i>groES</i>	0,6	-1,4	-7,2	-5,4	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	1,2	
<i>grxB</i>	1,3	1,7	1,6	-4,1										
<i>grxC</i>	-0,5	-0,6	-3,2	-57,3										
<i>grxD</i>	-0,1	0,6	0,0	-6,4										
<i>gshB</i>	-1,1	-1,3	-2,5	-17,5	-1,1	-1,2	-1,7	-1,3	-1,8	-2,3	-2,1	-2,3	-2,9	7
<i>gsiA</i>	-1,7	-1,6	-2,2	-5,6										

A.3 Transkriptomanalyse

<i>gsk</i>	-1,8	1,4	-1,7	-2,7													
<i>gspA</i>	0,0	-0,8	2,8	13,4	1,6	1,2	1,5	1,1	1,6	2,1	3,1	3,4	5,9				8
<i>gspB</i>	0,1	-0,6	1,6	4,2													
<i>gspC</i>	-1,3	-1,5	2,3	8,3													
<i>gspD</i>	-1,2	-1,3	1,0	6,2	-1,1	1,1	1,2	1,3	1,2	1,2	1,3	1,2	2,1				8
<i>gspE</i>	-1,6	-1,6	1,8	6,3	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,2	-1,0	-1,1	1,0	2,2				3
<i>gspF</i>	-1,3	-0,1	0,7	4,0													
<i>gspG</i>	0,6	0,7	2,9	14,2	1,2	-1,3	1,2	-1,0	1,2	1,5	1,8	2,3	3,4				3
<i>gspH / hofH</i>					1,2	-1,1	1,0	-1,0	1,2	1,2	1,4	1,7	2,9				
<i>gspI</i>	-0,8	0,0	2,1	12,8	1,3	-1,3	1,2	-1,1	1,3	1,7	1,8	2,5	4,6				3
<i>gspJ</i>	-0,2	1,2	3,1	8,5	1,7	-1,1	1,4	1,0	1,6	2,1	3,0	3,8	6,4				8
<i>gspK</i>	0,0	1,2	3,7	7,7	1,1	1,1	1,3	1,3	1,3	1,4	1,5	1,7	2,2				8
<i>gspL</i>	2,2	3,6	9,5	9,5	1,2	1,8	2,1	2,2	2,1	2,3	2,1	1,9	2,0				1
<i>gspM</i>	1,3	0,7	1,9	6,8	1,1	1,2	1,3	1,3	1,2	1,2	1,4	1,5	2,1				8
<i>gspO</i>	1,3	1,9	2,5	3,9	1,1	1,2	1,3	1,3	1,5	1,5	1,6	1,8	2,2				8
<i>guaA</i>	-2,0	-3,1	-6,6	-14,2	-1,3	-1,2	-1,1	-1,1	-1,4	-1,9	-2,3	-3,2	-7,6				7
<i>guaB</i>	-2,1	-2,4	-3,8	-9,2	-1,2	-1,1	-1,3	-1,0	-1,3	-1,8	-1,9	-2,4	-2,4				7
<i>guaC</i>	1,4	1,3	-1,0	-3,8													
<i>guaD</i>	1,1	-1,5	-0,6	2,9													
<i>gudD</i>	2,5	3,4	2,2	3,0													
<i>gudP</i>	-0,6	-1,4	2,8	9,6													
<i>gutQ</i>					-2,1	-1,4	-1,6	-1,6	-2,1	-2,2	-2,4	-2,5	-2,1				
<i>gyrA</i>	-1,4	-1,6	-3,1	-17,3	-1,3	-1,1	-1,4	-1,1	-1,4	-1,7	-1,5	-1,9	-2,3				7
<i>gyrB</i>	-1,5	-2,4	-3,8	-16,6	-1,0	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-1,7	-1,8	-2,0	-2,6				4
<i>hcaE</i>	6,8	15,4	21,8	2,6	-1,1	4,2	5,0	5,6	5,9	5,8	5,2	4,0	1,3				6
<i>hcaF</i>	11,4	25,4	36,3	3,1	-1,0	4,6	5,7	6,3	6,7	6,5	6,2	5,0	2,3				6
<i>hcaB</i>	10,7	26,8	33,2	1,9	-1,4	5,0	5,8	6,2	6,4	5,9	5,1	3,5	-1,1				6
<i>hcaC</i>	8,5	16,5	19,7	2,3	-1,1	4,5	5,4	5,8	5,8	5,7	4,8	3,4	1,7				6
<i>hcaD</i>	11,5	16,5	14,1	3,3	1,2	5,1	5,8	6,0	5,6	5,0	4,3	2,7	1,7				6
<i>hchA</i>	3,1	5,8	1,3	6,2	-1,2	2,9	2,6	2,5	2,5	2,1	1,8	1,5	1,9				1
<i>hcp</i>					-1,0	-1,2	-1,1	-1,8	1,0	1,0	1,5	2,0	2,4				
<i>hdeA</i>	4,3	10,6	-0,1	1,4	1,1	3,2	3,6	3,7	2,9	2,4	2,0	1,5	-1,4				6
<i>hdeB</i>	1,8	3,6	-1,4	-0,8	1,2	2,8	3,0	2,9	2,5	2,1	1,9	1,5	1,0				6
<i>hdeD</i>	3,2	10,9	2,2	8,8	1,2	4,4	5,7	5,9	3,8	2,5	2,3	2,3	3,5				1
<i>hdfR</i>	2,5	3,7	4,1	3,9	1,0	1,3	1,7	1,8	2,0	2,0	2,1	2,3	3,1				8
<i>hdhA</i>					1,1	2,0	2,0	2,2	2,3	2,3	2,3	2,2	1,7				
<i>hemA</i>	-0,5	0,6	-0,1	-5,8													
<i>hemB</i>	-0,6	-0,5	0,4	-5,6													
<i>hemC</i>	1,1	-1,1	-0,1	-5,4													
<i>hemD</i>	0,1	0,0	-0,8	-7,0													
<i>hemE</i>	-0,7	-1,3	-2,5	-6,7													
<i>hemG</i>	1,1	-1,4	-2,0	-3,3													
<i>hemK / prnC</i>					-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,6	-1,7	-1,8	-2,2	-2,2				
<i>hemL</i>	0,9	-0,8	-2,0	-5,7	-1,3	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-1,8	-2,5				7
<i>hemX</i>	-0,8	-1,5	-2,7	-4,0													
<i>hemY</i>	-1,5	-1,8	-3,2	-3,7													
<i>hepA</i>					-1,3	-2,1	-2,1	-1,9	-2,0	-2,3	-2,5	-2,6	-2,2				
<i>hflC</i>	-0,6	-1,9	-3,5	-7,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-3,2				7
<i>hflD</i>	-1,8	-1,7	-3,0	-10,8													
<i>hflK</i>	-0,7	-2,0	-3,1	-11,7	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,1	-1,0	-1,0	-1,2	-2,4				7

A.3 Transkriptomanalyse

<i>lepB</i>	-0,7	-1,3	-1,9	-3,3	-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-2,7	7
<i>leuA</i>	-2,1	-5,1	-15,3	-10,0	1,1	-1,5	-1,8	-1,9	-2,2	-2,7	-3,3	-4,8	-3,8	4
<i>leuB</i>	-1,9	-7,0	-27,8	-21,2	1,2	-1,8	-2,2	-2,3	-2,7	-4,0	-6,0	-11,2	-13,4	4
<i>leuC</i>	-1,8	-6,6	-18,9	-22,1	1,1	-1,6	-1,8	-2,0	-2,3	-3,3	-3,8	-6,7	-8,6	4
<i>leuD</i>	-2,5	-4,2	-5,9	-4,5	1,1	-2,0	-2,5	-2,6	-3,0	-3,3	-3,8	-4,9	-3,7	5
<i>leuE</i>	0,7	2,9	4,3	6,7	1,0	1,2	1,5	1,8	2,2	2,3	2,2	2,2	2,4	8
<i>leuL</i>	0,5	-1,3	-0,6	0,7	1,2	-1,1	-1,2	-1,1	-1,2	-1,5	-2,1	-2,2	-1,9	
<i>leuS</i>	-1,3	-1,7	-2,1	-6,8										
<i>lgt</i>	-1,3	-1,8	-2,8	-4,7	-1,2	-1,3	-1,4	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-1,5	-2,9	7
<i>ligB</i>	-0,7	-2,1	1,4	7,1										
<i>ligT</i>	1,2	0,0	-2,0	-5,1	1,0	-1,1	-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-2,5	7
<i>lipB</i>	1,2	0,0	-1,8	-1,8	-1,3	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,4	-1,7	-3,0	
<i>lit</i>	0,6	2,2	1,8	3,8	-1,1	1,4	1,8	2,1	2,2	2,4	2,3	1,9	1,5	
<i>livF</i>	-1,8	-5,6	-17,2	-13,6	-1,1	-1,7	-2,0	-2,2	-2,9	-3,9	-4,8	-4,7	-4,3	4
<i>livG</i>	-2,0	-7,0	-15,3	-10,1	-1,4	-1,9	-2,2	-2,4	-3,5	-5,5	-7,5	-10,5	-7,7	4
<i>livH</i>	-2,0	-7,5	-13,1	-5,3	1,0	-1,6	-2,0	-2,1	-2,7	-3,5	-3,6	-3,4	-3,4	4
<i>livJ</i>	-0,1	-3,1	-42,7	-65,2	-1,0	-1,0	-1,2	-1,3	-1,9	-3,2	-5,2	-10,2	-18,4	4
<i>livK</i>	-1,7	-5,3	-25,7	-36,0	1,0	-1,5	-1,6	-1,8	-2,3	-3,0	-3,9	-4,8	-5,3	4
<i>livM</i>	-2,0	-7,9	-20,9	-8,8	-1,1	-2,1	-2,9	-2,9	-3,9	-7,5	-9,0	-8,9	-8,3	4
<i>Int</i>	-0,2	-2,1	-3,0	-3,8	-1,2	-1,4	-1,6	-1,6	-1,9	-1,9	-2,5	-3,0	-3,4	4
<i>lolA</i>	0,6	-1,3	-2,5	-16,0	-1,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-4,0	7
<i>lolB</i>					-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,8	-2,9	
<i>lolD</i>					-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,3	-1,5	-1,5	-2,4	
<i>lomR</i>					-1,1	-1,2	-1,5	1,1	-1,5	-1,6	-1,8	-2,0	-2,4	
<i>lon</i>	1,5	-2,4	-6,2	-7,1	-1,1	-1,3	-1,6	-1,7	-2,3	-2,4	-2,7	-2,9	-2,0	4
<i>lpd</i>	-1,3	-1,4	-1,2	-6,9										
<i>lpp</i>	0,1	-0,1	-3,0	-1,7	-1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	-1,1	-1,1	-1,4	-2,3	7
<i>lptA</i>	0,0	-1,2	-1,9	-16,2										
<i>lptB</i>	1,1	-1,2	-2,9	-9,7										
<i>lptC</i>	-0,6	-1,3	-2,9	-9,5										
<i>lptE</i>	-1,1	-1,8	-1,6	-4,4	-1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-2,8	7
<i>lpxA</i>	-1,4	-1,8	-1,4	-5,4	-1,0	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-2,8	7
<i>lpxB</i>	-1,5	-1,9	-2,3	-8,9	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,8	-2,1	-3,3	7
<i>lpxD</i>	-0,7	-1,7	-3,3	-13,3	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,7	-1,8	-2,8	7
<i>lpxH</i>					-1,1	-1,2	-1,1	-1,2	-1,4	-1,4	-1,6	-2,0	-2,1	
<i>lpxK</i>	-2,0	-1,8	-2,1	-2,6										
<i>lrp</i>	-1,3	-1,4	-1,7	-10,7	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-2,0	7
<i>lspA</i>	-1,6	-1,8	-3,0	-16,4	1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-2,8	7
<i>lsrB</i>	2,4	5,1	3,3	4,4										
<i>ltaE</i>	1,3	1,4	-1,6	-3,3										
<i>luxS</i>	1,0	1,9	-2,1	-9,7	-1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	-1,0	-3,8	7
<i>lysA</i>	-1,9	-6,7	-4,1	-0,7	-1,0	-1,9	-2,3	-2,7	-2,9	-3,0	-3,0	-2,6	-2,0	5
<i>lysC</i>	-1,8	-5,3	-4,9	-5,4	-1,1	-1,7	-2,2	-2,1	-2,5	-2,7	-2,7	-2,8	-3,1	5
<i>lysP</i>	-5,9	-7,6	-16,9	-10,3	-1,1	-3,5	-4,7	-5,4	-6,1	-6,8	-7,8	-7,2	-5,3	5
<i>lysR</i>					-1,0	-1,0	-1,1	-1,0	-1,0	1,1	1,3	1,2	3,2	
<i>lysS</i>	-2,3	-2,8	-6,9	-8,9	-1,1	-1,3	-1,4	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,8	-2,7	7
<i>lysS</i>	0,6	1,2	2,9	2,4	1,0	1,1	1,0	1,1	1,2	1,5	1,7	2,0	2,3	8
<i>lyxK</i>	-1,7	-1,6	1,9	7,7	1,7	1,2	1,9	1,2	2,1	2,4	3,5	4,3	7,8	8
<i>maeA</i>	0,0	-1,4	-3,5	-5,2	-1,1	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,4	-1,6	-1,9	-3,3	7
<i>maeB</i>	-1,5	-2,4	-6,3	-7,0	-1,0	-1,0	-1,3	-1,3	-1,5	-1,7	-2,0	-1,9	-2,6	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>maf</i>	-0,6	-1,3	-1,7	-5,6	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,8	-3,3	7
<i>malE</i>	-3,8	-19,6	-41,9	-12,3	1,4	1,1	-1,1	-2,5	-6,9	-9,6	-9,2	-7,1	-6,6	
<i>malF</i>	-3,3	-7,1	-3,1	-1,4	1,2	-1,1	-1,2	-1,9	-2,1	-2,2	-1,7	-1,7	-1,4	5
<i>malG</i>	-1,6	-2,8	-2,5	-0,8	1,3	-1,1	-1,3	-2,2	-2,7	-2,7	-2,5	-2,5	-1,5	5
<i>malI</i>	-1,2	-0,1	1,9	5,8										
<i>malK</i>	-3,1	-15,0	-7,8	-3,4	1,4	-1,0	-1,2	-2,8	-8,0	-7,2	-5,5	-3,9	-3,7	5
<i>malM</i>	-3,0	-4,0	-2,5	-1,8	1,3	-1,0	-1,1	-2,1	-2,8	-2,6	-2,6	-2,2	-1,7	5
<i>malP</i>	-0,5	-1,9	-5,7	-4,9	1,3	2,0	2,1	1,2	-1,6	-1,7	-1,9	-1,9	-2,8	4
<i>malQ</i>	-1,5	-2,5	-4,4	-3,3	1,2	2,0	2,0	1,1	-1,4	-1,5	-1,8	-2,2	-1,7	4
<i>malS</i>					1,0	1,8	1,8	1,1	-1,9	-1,3	-2,3	-2,5	-3,2	
<i>malT</i>	-1,8	-2,4	-2,9	-3,2	-1,2	-1,4	-1,5	-1,5	-1,8	-2,2	-2,4	-2,8	-4,0	4
<i>malT</i>	-1,9	-3,7	-5,7	-10,6	-1,2	-1,7	-2,3	-2,6	-4,0	-5,5	-6,6	-7,0	-6,3	4
<i>malX</i>	1,6	1,8	2,7	3,9										
<i>malZ</i>	-1,5	-0,6	0,8	3,4										
<i>manA</i>	1,3	1,4	-1,2	-4,1										
<i>manC</i>					-1,1	-1,4	-1,5	-1,4	-1,5	-1,7	-2,0	-2,0	-1,9	
<i>manX</i>	-1,5	-2,4	-3,7	-5,9	1,1	-1,1	-1,4	-1,5	-1,7	-2,0	-2,3	-2,2	-2,2	4
<i>manY</i>	-1,6	-1,7	-3,9	-4,7	1,0	-1,0	-1,2	-1,3	-1,4	-1,8	-1,8	-2,1	-3,0	4
<i>manZ</i>	-1,9	-1,7	-3,6	-2,8	-1,1	-1,1	-1,3	-1,2	-1,3	-1,5	-1,7	-2,0	-2,4	4
<i>map</i>	-1,5	-1,6	0,6	-3,7										
<i>marA</i>	0,8	3,3	11,4	1,5	-1,3	1,5	1,6	2,0	2,8	3,4	3,7	4,0	3,9	8
<i>marB</i>	1,4	1,7	3,8	5,7	-1,0	1,2	1,3	1,4	1,8	2,3	2,6	2,9	2,8	8
<i>marR</i>	0,4	3,3	11,1	1,3	-1,1	1,3	1,3	1,5	2,2	2,7	2,9	3,3	3,2	8
<i>matA</i>	0,0	-1,3	4,8	14,9										
<i>matB</i>	0,7	-0,5	0,2	2,6										
<i>matC</i>	0,5	0,0	1,9	4,9										
<i>mazG</i>					-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-1,6	-1,9	-2,3	-3,2	
<i>mcbR</i>	1,7	2,1	2,1	7,3										
<i>mcrA</i>	1,4	0,7	3,8	9,5	-1,0	1,1	1,2	1,2	1,2	1,4	1,7	1,8	3,3	3
<i>mcrB</i>					-1,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,8	-2,0	-2,2	-2,1	-1,0	
<i>mcrC</i>					1,0	-1,0	-1,2	-1,4	-1,9	-1,9	-1,8	-2,1	1,0	
<i>mdaA</i>					-1,2	-1,3	-1,5	-1,4	-1,2	-1,0	-1,0	-1,1	-2,0	
<i>mdaB</i>	2,0	4,5	2,0	-1,8	-1,2	1,3	1,7	2,1	2,2	1,9	1,5	1,3	-1,5	6
<i>mdh</i>	0,1	1,4	1,2	-7,3										
<i>mdlA</i>	0,8	1,4	2,7	4,5										
<i>mdoB</i>	-4,5	-5,7	-2,9	-0,9	-1,0	-4,3	-3,9	-4,2	-3,3	-3,1	-2,7	-2,0	-1,2	2
<i>mdoC</i>					-1,2	-1,6	-1,6	-1,5	-1,6	-1,8	-1,9	-2,1	-2,0	
<i>mdoD</i>					-1,4	-1,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-2,7	
<i>mdoG</i>	0,5	-1,2	-1,9	-4,9										
<i>mdoH</i>	-0,7	-2,0	-3,7	-4,2	-1,2	-1,2	-1,4	-1,4	-1,5	-1,8	-2,4	-2,8	-3,9	4
<i>mdtA</i>	3,0	2,3	2,1	0,0	1,1	1,9	1,7	2,0	2,0	1,9	1,8	2,1	4,5	1
<i>mdtB</i>					1,0	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	2,2	
<i>mdtC</i>					1,1	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	1,9	2,6	
<i>mdtD</i>					-1,2	2,3	2,6	2,9	2,7	3,1	3,0	4,5	5,3	
<i>mdtE</i>	2,6	7,7	0,9	5,0	1,4	6,6	8,6	7,3	3,6	2,3	2,0	2,2	3,1	1
<i>mdtF</i>					2,3	18,0	22,4	20,9	6,9	4,6	5,0	6,6	10,5	
<i>mdtG</i>	1,7	2,6	4,8	3,0	1,3	1,0	1,1	1,2	1,6	1,8	2,0	2,1	2,0	8
<i>mdtL</i>	-1,6	-1,5	1,0	4,6	-1,0	-1,2	-1,0	-1,1	1,0	1,2	1,1	1,6	2,6	3
<i>mdtN</i>					1,5	1,6	1,6	1,5	2,1	1,9	2,4	3,1	4,6	
<i>mdtO</i>					2,2	1,1	2,0	1,6	2,6	2,8	4,2	3,9	7,0	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>melA</i>					-1,2	1,0	1,0	-1,0	-1,0	1,1	1,1	1,4	2,1	
<i>melB</i>	1,2	1,4	1,9	4,0										
<i>melR</i>	0,4	1,3	2,3	3,9										
<i>menB</i>	0,1	1,2	-1,5	-5,1	-1,2	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-2,3	-2,8	7
<i>menC</i>					-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,6	-1,9	-2,4	-2,9	
<i>menE</i>					1,5	-1,5	-1,6	-1,6	-1,8	-1,8	-1,9	-2,0	-2,0	
<i>menF</i>					-1,2	1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-1,5	-1,5	-2,0	
<i>menH</i>					-1,1	1,3	1,1	1,1	-1,1	-1,3	-1,7	-2,2	-2,7	
<i>mepA</i>	-1,4	-1,9	-5,7	-13,6	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,8	-2,5	-5,2	7
<i>metA</i>	-2,0	-2,9	-15,6	-3,6	1,0	-1,6	-1,4	-1,5	-1,7	-3,0	-4,1	-4,3	-4,0	4
<i>metB</i>	-2,1	-2,2	-3,3	-2,8	1,0	-1,5	-1,3	-1,4	-1,7	-2,1	-2,4	-2,5	-2,4	4
<i>metC</i>	-2,0	-2,9	-9,8	-7,4	-1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,5	-2,3	-3,5	-4,8	-3,7	4
<i>metE</i>	-3,0	-12,3	-88,5	-59,3	-1,0	-1,9	-1,4	-1,4	-1,8	-4,0	-9,6	-16,7	-16,5	4
<i>metF</i>	-4,4	-8,5	-41,3	-14,8	1,0	-2,2	-1,6	-1,6	-2,1	-3,7	-6,9	-9,1	-6,7	4
<i>metG</i>	-1,6	-1,9	-10,6	-12,7	-1,0	-1,2	-1,5	-1,2	-1,5	-1,6	-1,9	-2,1	-2,4	7
<i>metH</i>	-1,6	-4,7	-11,5	-8,2	-1,2	-1,8	-2,3	-2,3	-2,7	-3,3	-3,7	-4,1	-4,3	4
<i>metI</i>	-2,0	-2,3	-4,6	-3,2	1,1	-1,3	-1,3	-1,3	-1,7	-1,9	-2,2	-2,9	-3,2	4
<i>metJ</i>	-1,3	-1,2	-2,3	-4,3	1,0	-1,2	-1,3	-1,2	-1,5	-2,0	-2,5	-3,1	-3,1	4
<i>metJ</i>	-1,4	-1,4	-3,8	-2,6	1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,8	-2,1	-3,1	4
<i>metK</i>	-2,1	-1,9	-25,9	-24,8	-1,0	-1,1	1,0	-1,0	-1,1	-1,5	-2,2	-3,1	-3,2	4
<i>metL</i>	-2,1	-3,5	-4,0	-3,0	-1,0	-1,5	-1,6	-1,5	-1,8	-2,2	-2,4	-2,4	-2,2	5
<i>metN</i>	-3,0	-4,2	-17,3	-7,5	-1,1	-2,0	-1,6	-1,7	-2,1	-4,0	-5,9	-5,8	-5,5	4
<i>metQ</i>	-1,3	-1,9	-8,8	-10,8	1,0	-1,1	-1,0	-1,1	-1,3	-1,7	-2,2	-2,7	-5,9	7
<i>metR</i>	-2,2	-3,3	-8,9	-5,4	1,1	-1,5	-1,3	-1,3	-1,6	-2,8	-5,0	-5,9	-4,0	4
<i>mfd</i>	-0,1	-1,1	-2,0	-4,7										
<i>mglA</i>	-0,7	-0,8	3,2	11,3	-1,2	-1,2	-1,0	-1,3	-1,0	1,0	1,2	1,3	2,2	3
<i>mglB</i>	2,3	2,8	3,2	0,2										
<i>mglC</i>	0,6	0,1	3,2	8,4	1,3	-1,1	1,4	-1,1	1,6	1,9	2,7	3,3	5,9	3
<i>mgsA</i>	1,3	1,1	-1,4	-4,5										
<i>mgta</i>	-3,8	-4,0	-0,8	-1,1	-1,1	-2,4	-3,0	-2,9	-2,7	-2,8	-2,1	-1,6	-2,6	5
<i>mhpA</i>					1,2	1,1	1,4	1,0	1,9	2,5	2,8	3,4	5,7	
<i>mhpB</i>					1,1	1,5	1,3	1,2	1,4	1,5	1,5	1,8	2,6	
<i>mhpE</i>	-1,3	0,1	2,4	5,2	1,3	1,2	1,3	1,1	1,4	1,4	1,7	2,0	3,8	3
<i>mhpF</i>					1,3	1,3	1,3	1,2	1,3	1,3	1,5	1,6	2,1	
<i>miaB</i>	-2,0	-1,8	-7,8	-9,5	-1,2	-1,5	-1,4	-1,3	-1,4	-1,4	-1,4	-1,7	-3,4	7
<i>micC</i>	1,3	1,3	3,4	7,9	2,2	-1,1	2,1	1,3	4,0	5,2	6,6	7,7	9,9	8
<i>micF</i>	1,5	1,6	3,8	5,8										
<i>mioC</i>	-1,3	-0,1	-1,7	-6,0										
<i>mipA</i>	2,1	1,8	3,3	-3,3										
<i>mIaB</i>	-0,7	-0,2	2,3	6,6										
<i>mlrA</i>	3,7	8,1	3,3	3,1										
<i>mltA</i>					-1,4	-1,4	-1,6	-1,4	-1,6	-1,8	-2,1	-2,6	-3,1	
<i>mltB</i>	-0,1	0,0	3,9	12,8	1,5	1,3	1,9	1,4	2,1	2,3	2,9	4,3	5,4	8
<i>mltB</i>	-0,7	0,1	-4,3	-5,3	-1,2	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,8	-3,6	7
<i>mltC</i>	-1,3	-1,6	-3,5	-2,6	-1,1	-1,3	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-1,7	-2,2	-3,1	7
<i>mltD</i>	-2,3	-2,8	-1,8	-6,1	-1,6	-1,6	-2,2	-1,2	-1,8	-2,3	-2,3	-3,1	-3,7	4
<i>mmuP</i>	-2,7	-2,5	-2,1	0,2	-1,1	-2,2	-2,0	-2,5	-2,0	-1,9	-1,7	-1,6	-1,1	2
<i>mngA</i>					-1,1	-1,5	1,3	-1,2	1,4	1,4	2,1	3,0	4,1	
<i>mngB</i>	1,2	0,0	1,8	5,9	-1,0	1,2	1,2	1,1	1,1	1,2	1,4	1,7	2,5	8
<i>mnmA</i>	-1,4	-1,1	-1,7	-11,0										

A.3 Transkriptomanalyse

<i>mutS</i>	-1,5	-1,9	-3,5	-4,8	-1,2	-1,4	-1,4	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-2,4	-3,9	7
<i>mutT</i>					-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,6	-1,8	-2,2	-2,7	
<i>mutY</i>	-1,3	-1,5	-5,6	-4,1	-1,0	-1,3	-1,5	-1,4	-1,5	-1,7	-1,9	-2,4	-3,3	4
<i>nac</i>	1,4	1,4	2,8	9,8										
<i>nadA</i>	-2,0	-2,9	-2,5	-1,8										
<i>nadB</i>					-1,1	-2,3	-2,5	-2,2	-1,9	-1,8	-1,9	-2,0	-1,6	
<i>nadC</i>	1,1	-1,1	-2,4	-6,8	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-3,2	7
<i>nadE</i>	1,2	1,2	-1,2	-6,5										
<i>nadK</i> //	1,2	1,3	-2,0	-3,7										
<i>nadR</i>	-1,4	-1,7	-2,6	-1,9	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,7	-1,8	-2,0	-2,3	4
<i>nagC</i>	1,2	0,5	-0,4	-4,6	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,5	-2,9	7
<i>nagD</i>					-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-2,5	
<i>nagE</i>	-1,6	-2,9	-2,6	0,0	-1,1	-1,8	-2,0	-2,0	-2,9	-2,6	-2,6	-2,4	-1,3	2
<i>nagK</i>	0,5	-1,1	-1,2	-3,1										
<i>nagZ</i>					1,0	1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,5	-2,0	-2,6	
<i>nanA</i>					-1,2	-1,6	-1,8	-2,0	-2,0	-1,8	-1,6	-1,4	1,0	
<i>nanC</i>	1,6	-1,3	4,5	16,3										
<i>nanM</i>	1,4	1,1	2,1	9,7										
<i>nanS</i>	0,0	1,1	1,6	8,6										
<i>napB</i>					-1,3	-1,1	1,0	-1,0	1,0	1,0	1,2	1,4	2,0	
<i>napG</i>					1,3	1,2	1,8	1,6	1,9	2,2	2,6	2,9	4,4	
<i>napH</i>	0,1	-0,3	1,0	5,1	1,2	1,1	-1,0	1,1	1,2	1,3	1,9	1,8	3,4	8
<i>narG</i>					-1,3	-1,2	-1,7	-1,0	-1,4	-1,4	-1,5	-2,0	-2,0	
<i>narI</i>					-1,0	1,3	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,7	2,4	
<i>narK</i>	1,7	1,4	2,2	7,1	1,7	1,9	2,1	1,7	2,1	2,3	3,0	3,1	5,5	8
<i>narL</i>	0,0	1,1	-2,3	-3,2										
<i>narU</i>	2,8	6,5	2,2	4,9	1,3	7,5	8,7	8,0	7,0	4,6	3,9	4,1	5,2	1
<i>narV</i>	1,4	3,8	2,0	4,1	1,2	1,8	2,1	2,1	2,3	2,0	2,0	2,4	3,1	1
<i>narW</i>					-1,1	3,2	3,7	3,8	3,2	2,0	1,6	1,2	1,4	
<i>narY</i>	2,8	6,5	0,0	2,3	-3,3	1,3	1,4	1,5	1,3	-1,2	-1,6	-1,9	-2,6	6
<i>narZ</i>	2,7	9,5	-0,9	0,1	-1,3	3,5	4,1	4,2	3,6	2,5	1,9	1,3	-1,4	6
<i>ndk</i>	-2,8	-3,3	-5,4	-7,4	-1,3	-2,3	-2,1	-2,1	-2,3	-2,7	-3,3	-3,6	-5,1	4
<i>nemA</i>	-0,5	0,6	3,2	-0,4										3
<i>nemR</i>					-1,1	-1,0	-1,4	-1,2	-1,1	-1,0	1,3	1,6	3,8	
<i>nepl</i>	-0,7	-0,9	1,0	4,4	1,2	-1,2	1,0	-1,2	1,2	1,4	1,9	2,1	3,1	3
<i>nfi</i>	0,5	0,5	-3,0	-8,6	1,1	1,1	1,0	1,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-4,2	7
<i>nfsB</i>	1,3	1,1	0,0	-8,7										
<i>nhaB</i>					-1,2	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-1,8	-2,1	-2,2	-2,5	
<i>nhoA</i>	0,1	1,4	3,0	6,9	-1,0	1,2	1,2	1,2	1,7	2,1	2,3	2,5	3,6	8
<i>nikB</i>					1,0	-1,2	1,4	1,3	2,3	2,0	2,1	3,2	2,9	
<i>nikR</i>	2,1	2,1	-1,6	-5,7										
<i>ninE</i>	0,6	1,6	3,2	9,8										
<i>nirD</i>					1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,4	1,4	1,9	3,1	
<i>nlpA</i>	-2,4	-2,4	-1,7	-1,0										
<i>nlpD</i>	0,0	0,0	0,4	-4,1										
<i>nohB</i>	0,8	1,3	5,1	16,6	1,7	1,4	1,7	1,6	1,9	2,5	2,8	3,4	7,1	8
<i>norR</i>	0,0	-1,1	2,1	3,8	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	1,2	1,1	1,2	1,3	2,1	3
<i>norV</i>	1,5	2,2	3,4	3,6										
<i>nrdA</i>	-1,7	-2,4	-3,7	-8,8	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,5	-2,9	7
<i>nrdB</i>					-1,4	-1,3	-1,5	-1,3	-1,4	-1,4	-1,7	-2,2	-3,3	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>nrdE</i>					-2,4	-3,5	-3,4	-3,5	-3,4	-3,3	-3,3	-3,0	-2,6	
<i>nrdF</i>	-2,1	-2,0	-0,3	2,2	-6,5	-4,9	-5,0	-8,8	-4,4	-4,8	-3,6	-2,8	-1,5	2
<i>nrdG</i>	-0,6	0,7	2,4	5,2										
<i>nrdH</i>	-2,2	-3,7	-1,1	0,9	-2,4	-6,8	-4,9	-8,3	-4,4	-4,2	-3,4	-2,3	-2,2	2
<i>nrdI</i>	-4,2	-5,5	-3,5	-1,4	-3,0	-9,4	-10,5	-9,4	-5,8	-4,8	-4,6	-3,9	-2,3	2
<i>nrdR</i>	0,1	1,1	-1,3	-3,6	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,4	-2,5	7
<i>nrfB</i>					1,4	1,0	1,1	-1,4	1,1	-1,0	1,6	1,9	2,8	
<i>nrfC</i>					1,1	-1,5	-1,0	-1,3	1,1	1,0	1,4	1,9	2,4	
<i>nrfD</i>					1,7	1,0	1,4	1,2	1,5	1,7	1,9	2,3	3,5	
<i>nrfF</i>	0,8	1,4	2,6	6,7	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,8	1,9	2,4	8
<i>nrfG</i>	2,1	1,5	2,7	8,7	-1,1	-1,2	-1,2	-1,7	-1,2	-1,1	1,3	1,3	2,7	3
<i>nsrR</i>	1,6	1,3	0,6	-5,3	-1,0	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,0	-1,6	6
<i>nth</i>	-1,4	-2,3	-4,0	-2,1	-1,3	-1,8	-2,0	-2,2	-2,3	-2,3	-2,5	-3,0	-2,0	5
<i>ntpA</i>	-1,6	-2,0	-3,3	-8,8	1,1	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-2,7	7
<i>nudC</i>	1,1	0,1	-1,9	-2,7										
<i>nudI</i>	2,7	2,9	1,1	-2,7										
<i>nudJ</i>	0,6	1,2	0,0	-2,9										
<i>nudL</i>	1,2	1,4	-0,1	-4,2										
<i>nuoA</i>	-1,2	-1,3	-1,7	-5,7	1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,8	-2,1	-4,4	7
<i>nuoB</i>	-1,2	-1,5	-3,6	-14,0	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-1,6	-1,9	-2,4	-3,3	4
<i>nuoC</i>	-1,7	-2,2	-7,8	-29,5	-1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,8	-2,2	-2,9	-5,3	7
<i>nuoE</i>	-1,3	-1,3	-3,3	-25,7	1,1	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-1,6	-2,1	-3,2	7
<i>nuoF</i>	-1,8	-2,0	-9,8	-17,9	-1,1	-1,3	-1,5	-1,6	-2,0	-3,0	-4,5	-5,6	-4,1	4
<i>nuoG</i>	-1,9	-2,4	-10,4	-26,6	1,0	-1,2	-1,4	-1,5	-1,9	-2,8	-4,1	-6,6	-9,2	4
<i>nuoH</i>	-1,7	-2,6	-8,6	-12,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,8	-2,5	-3,7	-4,1	-4,9	4
<i>nuoI</i>	-1,5	-2,1	-8,0	-14,0	1,0	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-2,1	-2,8	-3,7	-3,8	4
<i>nuoJ</i>	-1,8	-2,9	-8,9	-8,4	1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,7	-2,1	-2,4	-2,5	-2,1	4
<i>nuoK</i>	-1,9	-2,7	-13,3	-25,4	1,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,8	-2,2	-2,8	-3,4	-2,8	4
<i>nuoL</i>	-1,8	-2,8	-8,6	-11,7	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,8	-2,6	-3,2	-4,2	-4,8	4
<i>nuoM</i>	-1,7	-2,9	-13,8	-11,3	-1,1	-1,3	-1,5	-1,8	-2,3	-3,3	-4,3	-5,1	-4,7	4
<i>nuoN</i>	-1,3	-2,2	-7,1	-10,0	-1,0	-1,2	-1,3	-1,6	-1,9	-2,4	-3,2	-4,2	-6,5	4
<i>nupC</i>	-2,3	-2,8	-3,8	-3,7	-1,2	-1,7	-1,7	-1,7	-2,1	-2,4	-3,1	-4,6	-8,0	4
<i>nupG</i>					-1,0	-1,3	-1,5	-1,7	-1,9	-2,0	-2,0	-2,1	-2,2	
<i>nupX</i>	0,0	0,0	2,7	8,2	1,7	1,1	1,4	-1,0	2,0	2,8	3,9	4,6	8,7	8
<i>nusA</i>	-1,5	-2,3	-2,1	-10,8										
<i>nusB</i>	-1,3	-1,8	-10,1	-22,7	-1,2	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-1,9	-2,4	-4,8	7
<i>nusG</i>	-1,4	-1,7	-4,5	-11,1	1,0	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,6	-1,9	-5,9	7
<i>obgE</i>					-1,1	-1,8	-1,5	-1,4	-1,4	-1,3	-1,5	-1,6	-2,4	
<i>ogrK</i>	-0,1	-0,2	2,2	12,4	1,3	1,1	1,5	1,0	1,3	1,3	1,6	2,0	3,0	3
<i>ompA</i>	-1,3	-0,6	-0,7	-15,0										
<i>ompC</i>	-1,4	-0,6	-1,4	-9,7										
<i>ompF</i>	-2,1	-5,0	-5,3	-17,3	1,1	-1,2	-1,4	-1,7	-3,1	-4,1	-4,7	-5,2	-6,3	4
<i>ompG</i>	-0,2	-1,3	5,2	20,4	1,8	1,2	1,5	1,0	1,9	2,4	3,3	4,4	5,7	8
<i>ompL</i>	1,3	-0,6	3,4	11,2	2,6	1,2	2,6	1,5	3,5	4,8	5,9	6,7	12,1	8
<i>ompN</i>	-1,5	-1,3	1,9	4,9	1,5	1,3	1,6	-1,0	1,7	2,2	3,5	3,3	6,2	8
<i>ompN</i>	0,6	0,3	5,0	9,3	1,2	1,0	1,4	1,1	1,4	1,4	1,7	1,9	2,6	8
<i>ompR</i>	1,3	1,6	0,0	-4,9	-1,2	-1,0	-1,0	1,1	1,2	1,4	1,3	1,2	-1,9	
<i>ompT</i>	-1,4	-1,2	-4,8	-4,5										
<i>ompW</i>					1,3	3,3	3,3	3,9	3,6	3,3	2,6	2,1	1,9	
<i>omrA</i>	1,6	5,7	7,5	5,0	1,5	1,3	1,4	2,2	4,3	5,6	6,6	7,0	5,1	8

A.3 Transkriptomanalyse

<i>omrB</i>	-0,6	0,6	4,1	12,2	1,6	-1,1	1,1	1,4	2,2	3,2	3,5	4,3	4,7	8
<i>oppA</i>	1,2	0,6	1,4	-5,6										
<i>orn</i>	1,5	1,5	-0,2	-8,0	-1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0	-1,1	-2,0	7
<i>osmB</i>	2,2	9,0	5,3	2,8	-1,0	1,5	1,8	2,1	2,8	3,2	3,1	3,5	3,0	8
<i>osmC</i>	1,2	4,8	1,8	1,8	-1,2	1,8	1,9	2,1	2,2	1,9	1,8	1,8	1,5	4
<i>osmE</i>	1,7	3,0	-1,7	-0,6	1,0	2,0	1,9	1,8	1,7	1,5	1,4	1,4	1,3	6
<i>osmF</i>	1,7	6,2	0,9	0,3	-1,3	2,4	2,4	2,5	2,4	1,9	1,8	1,9	1,2	6
<i>osmY</i>	1,5	1,7	-8,2	-6,2										
<i>otsA</i>	2,5	7,1	1,0	0,9	-1,4	2,3	2,3	2,4	2,4	2,1	1,9	1,7	-1,2	6
<i>otsB</i>	2,6	7,5	2,9	2,7	-1,1	2,0	2,1	2,2	2,4	2,1	2,2	2,3	1,9	
<i>oxc</i>	-0,7	-1,4	1,6	5,4										
<i>oxyS</i>					-2,0	-5,2	-4,1	-3,3	-4,1	-3,7	-3,3	-2,3	-1,8	
<i>paaA</i>	-1,2	-1,3	3,4	11,0	-1,1	-1,7	-1,1	-1,4	1,0	1,1	1,5	1,9	3,8	3
<i>paaB</i>	-1,3	-1,7	3,7	15,8	2,0	1,2	1,9	1,1	2,4	2,4	4,3	5,1	6,3	8
<i>paaC</i>					1,6	1,9	1,9	2,0	2,4	2,2	2,4	3,3	4,1	
<i>paaD</i>					1,3	2,5	2,9	3,2	3,3	3,3	3,0	2,3	2,3	
<i>paaE</i>	1,3	1,7	2,4	3,7	-1,1	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	2,3	1
<i>paaG</i>					1,2	1,6	1,7	1,8	1,8	1,7	1,8	2,2	3,0	
<i>paaH</i>					1,0	1,3	1,3	1,2	1,4	1,5	1,8	2,0	2,8	
<i>paaK</i>	2,1	2,9	4,2	2,7										
<i>paaX</i>	0,1	0,8	1,8	4,8										
<i>paaY</i>	0,0	0,8	1,5	4,3										
<i>paaZ</i>	0,2	-0,6	3,5	11,2	1,8	1,2	1,8	1,2	1,8	2,2	3,4	3,4	5,2	8
<i>pagP</i>	2,3	2,0	3,3	10,0	1,1	1,8	2,0	1,8	1,3	1,2	1,2	1,3	1,2	6
<i>panD</i>	-0,7	0,5	-2,0	-7,7	-1,1	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,3	-2,8	7
<i>panF</i>	-2,0	-2,7	-2,7	-1,0										
<i>parC</i>	-1,4	-1,7	-2,3	-3,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,3	-1,5	-1,6	-1,6	-1,8	-2,3	7
<i>parE</i>	-1,3	-1,8	-2,4	-2,6	-1,3	-1,4	-1,6	-1,6	-1,7	-1,8	-2,1	-2,2	-2,8	4
<i>pbl</i>	1,9	1,5	11,6	25,3	5,3	2,1	3,9	3,1	3,2	5,8	7,4	9,2	22,8	8
<i>pckA</i>	-0,5	-1,8	-2,5	-3,4	1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-1,8	-2,0	-2,6	-1,9	4
<i>pcm</i>	-1,0	-1,6	-3,4	-3,9	-1,1	-1,0	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,7	-2,1	-3,2	7
<i>pcnB</i>	-1,8	-2,1	-7,0	-15,4	-1,1	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-1,9	-5,4	7
<i>pdhR</i>	-2,0	-2,2	1,2	-2,5	1,1	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,2	-1,1	1,1	1,6	
<i>pdxA</i>	0,5	-1,3	-3,1	-8,4	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,5	-1,8	-3,6	7
<i>pdxA</i>	-0,1	-1,3	-3,1	-6,8	-1,2	-1,1	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,7	-4,1	7
<i>pdxB</i>					-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,7	-3,1	
<i>pdxJ</i>	-1,1	-1,2	-2,4	-2,6	-1,3	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,8	-2,2	-4,7	7
<i>pdxK</i>					1,1	1,1	1,1	1,1	-1,1	-1,3	-1,5	-1,7	-2,4	
<i>pdxY</i>	0,8	-1,5	-2,9	-3,5	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,7	-1,8	-2,1	4
<i>pepA</i>	-1,2	-1,9	-3,6	-5,2	-1,0	-1,1	-1,4	-1,4	-1,8	-1,9	-2,5	-2,3	-3,7	4
<i>pepB</i>	-0,7	-1,4	-2,2	-7,9	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,7	-2,4	7
<i>pepD</i>	0,2	0,0	-3,6	-7,3										7
<i>pepE</i>	2,0	1,9	4,2	3,1										
<i>pepN</i>	0,7	1,3	-1,6	-15,9	-1,1	-1,1	-1,4	1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,6	-3,1	
<i>pepP</i>					-1,5	-1,3	-1,6	-1,0	-1,5	-1,9	-1,7	-2,2	-2,2	
<i>pepQ</i>	1,3	1,1	-1,4	-3,1										
<i>perR</i>	-0,1	0,0	1,9	6,6										
<i>pfkA</i>	0,0	-1,4	-2,0	-4,3	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,6	-1,8	-3,9	7
<i>pfkB</i>	2,4	3,2	0,0	-6,7	-1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2	-1,5	
<i>pfIA</i>					1,0	1,3	1,3	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	-2,2	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>prpD</i>					1,4	1,1	1,4	1,1	1,4	1,5	1,8	2,4	4,0	
<i>prpE</i>					1,9	1,2	1,4	-1,3	1,6	2,0	2,4	2,6	3,8	
<i>prpR</i>	1,5	0,6	2,7	6,1	1,1	-1,3	-1,0	-1,2	1,2	1,3	1,5	1,7	2,9	8
<i>prp</i>	3,1	3,4	2,0	1,4										
<i>prs</i>	-1,4	-1,7	-3,0	-27,0	-1,1	-1,0	-1,1	-1,0	-1,0	-1,1	-1,1	-1,3	-3,6	7
<i>psd</i>	0,0	-1,7	-4,2	-9,5										
<i>psiF</i>	22,0	53,0	72,8	3,2	-1,3	6,0	7,3	8,7	9,2	9,9	9,0	7,9	1,8	6
<i>psiE</i>	13,2	13,9	18,8	4,6	2,9	4,4	4,5	4,6	4,5	4,3	4,1	4,1	1,9	6
<i>pspA</i>	-1,3	1,6	3,9	1,6	-1,1	1,1	1,2	1,4	1,5	2,3	2,7	2,8	2,4	8
<i>pspB</i>	0,1	1,4	4,2	1,6	-1,1	1,1	1,2	1,3	1,3	1,8	2,2	2,3	2,2	8
<i>pspC</i>	0,1	2,2	4,5	0,6										
<i>pspD</i>	0,2	2,4	4,8	0,0	-1,1	1,1	1,2	1,5	1,5	2,0	2,2	2,4	1,4	8
<i>pspE</i>	2,4	1,6	3,4	1,8										
<i>pspF</i>					1,1	-1,0	-1,3	-1,1	-1,3	-1,4	-1,7	-1,7	-3,6	
<i>pssA</i>	-1,4	-1,6	-2,6	-3,7	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,6	-2,7	7
<i>pstA</i>	11,4	9,5	15,0	1,3	2,5	2,6	2,6	2,5	2,6	2,6	2,5	2,5	-1,1	6
<i>pstB</i>	5,7	5,8	7,5	-0,5	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,7	1,2	6
<i>pstC</i>	17,3	14,6	18,8	2,1	2,6	2,8	2,9	2,9	2,9	2,8	2,7	2,5	-1,2	6
<i>pstS</i>	14,6	14,1	16,6	0,8	2,0	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2	1,3	6
<i>psuK</i>	-0,6	-1,3	3,3	10,5										
<i>psuT</i>	0,0	1,4	3,5	7,5	1,1	1,0	1,1	1,0	1,2	1,4	2,0	2,5	3,4	3
<i>pta</i>	-1,3	-1,2	-3,9	-15,9	-1,1	1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,1	-1,0	-1,1	-2,1	7
<i>pth</i>	1,3	0,6	-1,7	-4,2	-1,3	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,5	-1,7	-1,7	-2,7	7
<i>ptrB</i>	0,5	1,2	1,5	2,6										
<i>ptsA</i>					1,5	-1,1	1,8	1,4	2,0	1,8	2,3	3,1	4,4	
<i>ptsG</i>	-3,4	-4,3	-2,9	-7,6	-1,2	-2,1	-2,4	-2,1	-2,2	-2,4	-2,6	-3,2	-5,9	4
<i>ptsH</i>	-1,5	-1,7	-2,3	-15,9										
<i>ptsI</i>	-1,3	-1,5	-2,7	-28,6	-1,0	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-2,2	7
<i>ptsN</i>	1,4	0,6	-1,6	-7,9	1,1	1,3	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0	-1,1	-2,1	6
<i>ptsP</i>	0,6	-1,2	-2,1	-4,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-3,0	7
<i>ptxA</i>	2,8	2,1	0,9	0,1										
<i>purA</i>	1,4	-0,5	2,0	-4,7	-1,2	-1,0	-1,0	1,0	1,2	1,2	1,1	1,1	-2,6	7
<i>purB</i>	-3,0	-3,8	-5,9	-7,1										
<i>purC</i>	-3,2	-5,9	-7,6	-7,5	1,1	-1,0	1,0	-1,0	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-2,1	7
<i>purD</i>	-13,6	-28,0	-36,4	-57,6	-1,1	-1,4	-1,4	-1,3	-1,7	-2,6	-3,2	-3,7	-9,9	7
<i>purE</i>	-19,0	-36,1	-26,8	-20,3	-1,1	-1,6	-1,6	-1,5	-1,7	-2,4	-2,6	-2,3	-3,6	4
<i>purF</i>	-6,1	-7,5	-12,9	-16,4	-1,1	-1,5	-1,4	-1,3	-1,4	-1,6	-1,7	-1,6	-2,0	4
<i>purH</i>	-10,8	-13,3	-22,5	-25,0	-1,1	-1,4	-1,3	-1,3	-1,4	-1,9	-2,1	-2,3	-4,9	7
<i>purK</i>	-14,6	-16,8	-16,3	-10,0	-1,2	-1,6	-1,5	-1,5	-1,7	-2,4	-2,6	-2,8	-4,5	4
<i>purL</i>	-4,5	-12,9	-11,2	-11,6	-1,2	-1,3	-1,6	-1,1	-1,6	-2,3	-2,4	-2,7	-3,3	4
<i>purI</i>	-7,6	-16,3	-9,1	-7,3	-1,1	-1,5	-1,4	-1,4	-1,6	-2,3	-2,7	-2,9	-3,3	4
<i>purM</i>	-10,1	-19,4	-14,3	-5,8	-1,2	-1,5	-1,4	-1,4	-1,7	-2,3	-2,6	-2,5	-3,5	4
<i>purN</i>	-3,1	-5,3	-7,7	-8,4	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,9	-2,0	-2,3	-4,4	7
<i>purP</i>	-2,2	-4,7	-3,5	-2,4	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-1,4	-1,7	-2,5	-1,9	4
<i>purR</i>	-8,7	-11,1	-10,6	-5,8	-1,1	-1,6	-1,6	-1,5	-1,6	-2,1	-2,2	-2,6	-4,5	4
<i>purT</i>	-10,7	-14,7	-10,5	-5,5	-1,4	-1,7	-1,8	-1,7	-2,2	-3,1	-3,1	-3,3	-3,9	4
<i>purU</i>	-1,3	-2,0	-4,4	-12,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,7	-2,2	-3,6	7
<i>putA</i>					-1,1	-1,3	-1,4	-1,3	-1,5	-1,5	-1,6	-1,7	-2,1	
<i>putP</i>	-1,6	-1,8	-3,1	-4,6	-1,1	-1,5	-1,4	-1,5	-1,7	-2,0	-2,5	-2,5	-3,8	4
<i>puuA</i>					1,0	1,3	1,5	1,4	1,1	-1,3	-2,0	-2,1	-1,7	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>puuB</i>					1,0	2,1	2,3	2,1	1,2	-1,3	-1,7	-2,0	-2,2	
<i>puuD</i>					1,1	1,4	1,6	1,4	1,1	-1,3	-1,8	-2,2	-1,4	
<i>puuR</i>	2,2	2,9	5,2	1,8	1,1	2,2	2,3	2,2	2,0	2,0	1,7	1,3	-1,5	6
<i>pykA</i>	1,5	1,5	-2,0	-4,8										
<i>pykF</i>	1,2	1,4	-2,7	-5,1	-1,1	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	-1,1	-2,6	7
<i>pyrB</i>	-0,5	-1,5	-4,1	-5,2										
<i>pyrC</i>	-1,2	-2,5	-4,2	-4,7	-1,1	1,0	1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-1,7	-5,4	7
<i>pyrD</i>	-4,3	-7,2	-6,8	-3,5	-1,7	-2,5	-3,1	-2,8	-5,7	-7,0	-9,3	-8,6	-7,2	4
<i>pyrF</i>	-1,9	-1,5	-2,8	-4,2	-1,1	-1,7	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-1,6	-1,7	-3,1	7
<i>pyrG</i>	-1,3	-1,7	-1,3	-4,3	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,4	-1,5	-1,8	-2,1	4
<i>pyrI</i>	-0,7	-1,3	-2,5	-3,9										
<i>pyrL</i>	-6,1	-5,8	-4,9	-2,0										
<i>qorA</i>	2,1	3,8	0,5	-3,3										
<i>qorB</i>	-0,5	1,8	4,6	2,4										
<i>queA</i>	-2,7	-2,1	-5,5	-10,6	1,1	-1,7	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-3,1	7
<i>queD</i>	-1,6	-0,8	1,6	3,0										
<i>quuD</i>	1,3	0,1	3,3	7,7										
<i>quuQ</i>	0,7	-1,2	3,9	16,2										
<i>radA</i>	-2,1	-2,6	-3,1	-2,2	-1,1	-1,3	-1,6	-1,6	-1,8	-2,0	-1,9	-1,9	-1,9	5
<i>radC</i>	-0,5	0,7	2,1	6,1										
<i>raiA</i>	3,4	4,7	7,4	4,4	-1,1	1,4	1,6	1,8	2,1	2,0	2,0	2,1	2,2	8
<i>rarA</i>	-0,8	-1,8	-2,9	-4,3	-1,2	-1,4	-1,5	-1,4	-1,5	-1,8	-2,1	-2,8	-3,9	4
<i>ravA</i>	0,9	1,4	1,3	2,7										
<i>rbbA</i>	1,4	-1,2	-2,9	-4,6										
<i>rbfA</i>	-1,9	-2,2	-2,2	-3,3	1,0	-1,5	-1,6	-1,6	-1,6	-1,7	-1,9	-1,9	-2,6	4
<i>rbn</i>	1,5	0,6	-2,7	-4,1	-1,1	1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,5	-1,8	-2,8	7
<i>rbsA</i>	-2,8	-6,4	-2,3	1,2	-1,3	-2,6	-3,4	-3,6	-3,2	-3,3	-3,1	-2,7	-1,7	2
<i>rbsB</i>	-1,6	-1,7	-3,1	-1,4	-1,1	-1,2	-1,5	-1,7	-2,1	-2,3	-2,5	-2,1	-2,2	4
<i>rbsC</i>	-2,1	-3,3	-2,5	1,3	-1,1	-2,3	-3,0	-3,5	-2,7	-2,6	-2,3	-2,1	-1,6	2
<i>rbsD</i>	-3,7	-10,0	-6,2	-0,5	-1,2	-2,7	-4,1	-3,9	-5,2	-5,6	-4,3	-5,1	-3,4	5
<i>rbsR</i>	0,7	0,1	2,9	3,1										
<i>rcnA</i>	-1,9	-1,8	-1,7	-4,3	-1,5	-2,1	-2,1	-1,9	-1,7	-1,6	-1,7	-1,8	-2,9	7
<i>rcaA</i>	1,3	1,4	2,7	5,7										
<i>rcaB</i>	1,3	-1,4	-1,8	-6,6	1,1	-1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-2,2	7
<i>rcaC</i>	0,6	0,5	0,2	3,2										
<i>rcaF</i>	1,1	1,3	-0,6	-2,3										
<i>rdgB</i>	-1,3	-2,5	-3,5	-3,0	-1,3	-1,5	-1,8	-2,0	-2,4	-2,7	-3,4	-3,6	-4,3	4
<i>rdlA</i>					-1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	-1,2	-1,5	-1,8	-3,0	
<i>rdlB</i>	-1,6	0,4	1,6	7,1	1,6	2,7	3,3	3,6	3,6	2,9	2,8	3,5	3,6	1
<i>rdlC</i>	-1,2	-0,5	0,3	5,1	2,6	3,3	3,8	3,7	4,8	3,9	3,7	5,7	5,8	1
<i>rdlD</i>					1,0	-1,2	-1,0	-1,2	-1,2	-1,1	-1,0	1,5	2,3	
<i>recA</i>					-1,1	-1,0	1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-2,8	
<i>recD</i>	-1,3	-1,3	-2,7	-2,7										
<i>recF</i>	-1,2	-1,9	-3,9	-4,8	-1,1	-1,4	-1,6	-1,7	-2,0	-2,4	-2,8	-4,3	-5,8	4
<i>recG</i>					-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,5	-1,6	-1,6	-2,2	-2,1	
<i>recJ</i>					1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-1,9	-2,6	
<i>recO</i>	-1,5	-1,6	-2,6	-4,7	-1,3	-1,6	-1,7	-1,5	-1,7	-2,1	-2,4	-3,3	-5,2	4
<i>recQ</i>					-1,4	-1,7	-1,7	-1,6	-1,9	-1,9	-1,9	-2,3	-2,2	
<i>recR</i>	-1,5	-2,1	-1,9	-4,9	1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-3,1	7
<i>relA</i>	-1,2	-0,7	-1,4	-0,5	-1,1	-1,1	-1,2	-1,0	-1,1	-1,2	-1,1	-1,3	-1,2	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>ribF</i>	1,1	-1,2	-1,4	-12,7	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,3	-1,5	-1,4	-2,1	4
<i>rihA</i>					-1,2	-1,6	-1,6	-1,6	-2,0	-2,0	-2,1	-2,1	-1,8	
<i>rihB</i>	-0,6	0,5	3,1	11,4	2,6	5,1	5,9	6,9	7,3	7,4	6,2	5,2	8,2	1
<i>rihC</i>					-1,5	-1,7	-1,8	-1,8	-1,9	-2,1	-1,8	-1,7	-1,3	
<i>rimI</i>	-1,4	-0,1	-3,0	-3,7	-1,2	-1,4	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,6	-1,7	-2,4	7
<i>rimJ</i>	1,3	0,0	-1,7	-4,0										
<i>rimM</i>	-1,8	-1,7	-1,9	-19,5										
<i>rimN</i>	-0,7	-1,4	-3,5	-6,4										
<i>rimO</i>	-3,7	-2,3	-4,7	-2,2	-1,2	-2,0	-1,7	-1,4	-1,5	-1,6	-1,6	-1,8	-2,2	5
<i>rimP</i>	-1,4	-1,6	-1,5	-5,7										
<i>rlmE</i>	-0,7	-1,4	-1,5	-3,3										
<i>rlmG</i>	-2,2	-2,2	-4,2	-3,2										
<i>rlmH</i>	-1,6	-1,8	-3,0	-6,1	-1,1	-1,6	-1,5	-1,6	-1,5	-1,5	-1,5	-1,6	-2,2	7
<i>rlmL</i>	-1,4	-1,6	-2,6	-9,2	-1,3	-1,6	-1,7	-1,0	-1,6	-2,0	-2,1	-2,5	-3,2	7
<i>rlmN</i>	-2,7	-2,5	-2,8	-11,5	-1,0	-1,6	-1,4	-1,4	-1,3	-1,4	-1,6	-1,9	-3,2	7
<i>rlpA</i>	1,2	0,6	-2,1	-8,0										
<i>rluA</i>					-1,2	-1,7	-1,8	-1,7	-1,7	-2,0	-2,2	-2,1	-2,2	
<i>rluB</i>	-2,4	-2,1	-2,5	-3,4										
<i>rluC</i>					-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-2,3	
<i>rluD</i>					-1,1	-1,3	-1,4	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-1,7	-3,0	
<i>rluE</i>	1,7	2,0	1,5	-4,8										
<i>rmf</i>	-1,0	3,7	8,5	3,2	-1,2	1,3	2,1	2,6	3,4	3,3	3,2	3,6	2,8	8
<i>rmuC</i>	-1,7	-2,2	1,5	-4,1										
<i>rna</i>					-1,1	-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-2,2	
<i>rnb</i>	-2,3	-2,1	-2,8	-4,4										
<i>rnc</i>	-1,2	-1,2	-1,4	-9,7										
<i>rnd</i>					-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-2,0	-2,4	
<i>rne</i>	-1,8	-2,4	-5,2	-17,0	1,0	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,6	-1,7	-1,9	-3,1	7
<i>rnfD</i>	-2,3	-2,3	-3,2	-2,3	-1,3	-1,9	-2,0	-2,0	-2,1	-2,4	-2,5	-2,8	-3,3	5
<i>rnhA</i>					-1,1	-1,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,5	-2,2	
<i>rnhB</i>	-1,5	-1,7	-2,4	-6,7	-1,0	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,8	-2,2	-3,3	-5,0	4
<i>rnk</i>	-1,5	-2,4	-3,3	-4,8	-1,2	-1,8	-2,0	-2,1	-2,3	-2,6	-3,1	-3,8	-5,5	4
<i>rnpA</i>	-2,1	-1,8	-6,0	-44,9	-1,1	-1,5	-1,5	-1,5	-1,4	-1,5	-1,4	-1,4	-2,8	7
<i>rnpB</i>	-2,8	0,0	2,9	4,9	-1,1	-1,2	1,0	1,3	1,7	1,8	2,0	2,2	2,6	8
<i>rnr</i>	3,0	2,5	1,8	-3,2	-1,1	2,0	1,9	1,8	1,6	1,6	1,4	1,1	-2,4	6
<i>rnt</i>					-1,2	-1,4	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,7	-2,7	
<i>rodZ</i>	-0,5	0,0	-1,0	-6,6										
<i>rpe</i>	0,0	-1,1	-2,8	-4,9	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0	-1,1	-1,2	-1,4	-2,5	7
<i>rph</i>					-1,3	-1,8	-1,8	-1,6	-1,8	-1,8	-2,0	-2,3	-3,2	
<i>rpiA</i>	0,7	1,5	2,0	3,2	-1,0	1,1	1,2	1,3	1,3	1,5	1,7	1,8	2,2	8
<i>rpiB</i>	-0,7	0,0	2,2	7,4	1,2	-1,3	-1,0	-1,2	1,2	1,4	1,9	2,4	3,8	3
<i>rpiR</i>					-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,3	
<i>rplA</i>	-3,2	-3,3	-3,7	-36,6	1,0	-1,8	-1,9	-1,6	-1,6	-1,5	-1,4	-1,4	-2,0	5
<i>rplB</i>	-6,5	-16,8	-19,5	-55,2	-1,0	-1,7	-1,9	-1,8	-1,8	-1,9	-1,9	-1,8	-4,7	7
<i>rplC</i>	-2,7	-5,2	-4,5	-6,9	1,0	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,2	-1,5	
<i>rplD</i>	-2,9	-4,9	-5,0	-33,6	1,1	-1,3	-1,4	-1,3	-1,4	-1,4	-1,3	-1,3	-1,9	
<i>rplE</i>	-2,0	-1,9	-1,8	-26,5	1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,4	
<i>rplF</i>	-2,7	-2,9	-4,4	-16,5	1,0	-1,6	-1,5	-1,5	-1,5	-1,5	-1,5	-1,4	-2,1	5
<i>rplI</i>	-4,6	-7,2	-7,2	-28,5	-1,0	-1,9	-1,8	-1,7	-1,7	-1,8	-1,7	-1,8	-4,3	7
<i>rplJ</i>	-1,5	-1,6	-1,8	-33,7	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>rplK</i>	-2,7	-2,5	-3,4	-24,6	1,0	-1,8	-1,8	-1,6	-1,5	-1,4	-1,4	-1,3	-1,9	
<i>rplL</i>	-2,4	-2,5	-4,1	-50,4	-1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,3	
<i>rplM</i>	-2,1	-1,6	-2,7	-18,8	-1,1	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	
<i>rplN</i>	-1,5	-1,3	-1,3	-4,7	1,0	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,3	
<i>rplO</i>	-2,6	-2,4	-2,9	-14,9	1,1	-1,7	-1,6	-1,5	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-2,1	5
<i>rplP</i>	-3,0	-5,7	-5,6	-11,5	1,0	-1,5	-1,6	-1,6	-1,6	-1,7	-1,6	-1,6	-3,3	7
<i>rplQ</i>	-3,9	-3,2	-5,7	-18,4	-1,0	-1,9	-1,7	-1,5	-1,5	-1,5	-1,6	-2,1	-5,6	7
<i>rplR</i>	-2,2	-2,6	-3,6	-17,5	1,0	-1,4	-1,4	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,8	
<i>rplS</i>	-3,2	-2,7	-2,8	-11,9	-1,1	-1,7	-1,6	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-1,5	7
<i>rplT</i>	-1,5	-2,0	-1,3	-19,7	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-2,9	7
<i>rplU</i>	-1,9	-1,8	-3,2	-5,5	-1,0	-1,4	-1,3	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,8	
<i>rplV</i>	-3,6	-7,6	-8,0	-14,0	1,1	-1,6	-1,7	-1,6	-1,6	-1,7	-1,6	-1,5	-2,7	5
<i>rplW</i>	-3,0	-7,1	-7,0	-37,9	-1,0	-1,4	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-2,2	5
<i>rplX</i>	-1,5	-1,5	-1,4	-16,0	-1,0	-1,3	-1,2	-1,1	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	
<i>rplY</i>	-1,6	-1,5	-2,5	-18,2										
<i>rpmA</i>	-2,2	-2,1	-4,8	-13,7	-1,1	-1,6	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-3,0	7
<i>rpmB</i>	-1,6	-1,5	-2,1	-15,4	1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	
<i>rpmC</i>	-2,9	-4,9	-7,0	-28,1	1,0	-1,4	-1,5	-1,4	-1,5	-1,6	-1,5	-1,5	-2,8	7
<i>rpmD</i>	-3,6	-3,5	-6,4	-23,1	-1,0	-1,7	-1,6	-1,5	-1,6	-1,5	-1,5	-1,4	-2,3	5
<i>rpmE</i>	-3,6	-3,2	-4,7	-7,3	1,1	-1,9	-1,9	-1,6	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,5	
<i>rpmE2</i>	1,6	4,1	33,4	14,5	1,9	-1,0	2,2	2,7	5,8	11,2	17,2	27,1	26,0	8
<i>rpmF</i>	-1,6	-1,9	-4,0	-51,2	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-2,3	7
<i>rpmG</i>	-2,3	-1,9	-3,0	-2,6	-1,1	-1,5	-1,3	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,4	
<i>rpmH</i>	-1,8	-1,4	-2,9	-21,7	-1,1	-1,5	-1,4	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,8	
<i>rpmI</i>	-1,7	-1,3	1,2	-9,6	-1,1	-1,1	-1,1	-1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	-1,0	
<i>rpmJ</i>	-1,6	-1,6	-1,7	-8,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,4	
<i>rpmJ</i>	1,7	3,7	28,6	18,7	1,1	1,7	2,0	1,8	3,5	6,4	9,8	16,3	16,6	8
<i>rpoA</i>	-2,2	-2,3	-4,6	-58,2	1,0	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-4,7	7
<i>rpoB</i>	-1,3	-1,6	-4,1	-27,6	1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,8	
<i>rpoC</i>	-1,4	-1,7	-5,3	-16,8	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-3,6	7
<i>rpoD</i>	0,0	-1,5	-3,8	-12,3	1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	1,2	
<i>rpoE</i>	1,8	1,7	2,0	-1,7										
<i>rpoH</i>	5,0	5,2	14,7	6,5	-1,1	2,2	2,2	2,2	2,2	2,3	2,3	2,2	2,6	1
<i>rpoN</i>	0,0	-1,2	-1,5	-4,4										
<i>rpoS</i>	1,3	1,1	1,3	-4,7										
<i>rpoZ</i>	-0,7	-0,6	-0,8	-7,4	1,0	1,0	-1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,2	
<i>rprA</i>	1,3	0,6	2,0	5,1	1,5	1,0	1,3	1,1	1,8	2,4	3,5	3,8	6,7	8
<i>rpsA</i>	-2,2	-2,4	-3,2	-16,5	-1,1	-1,4	-1,4	-1,3	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,7	
<i>rpsB</i>	-2,5	-2,0	-1,8	-23,1	-1,1	-1,5	-1,5	-1,4	-1,4	-1,3	-1,4	-1,3	-2,4	7
<i>rpsC</i>	-2,8	-7,0	-9,4	-60,0	-1,0	-1,6	-1,7	-1,5	-1,6	-1,6	-1,5	-1,5	-3,5	7
<i>rpsD</i>	-1,5	-1,6	-1,9	-26,6	1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,8	
<i>rpsE</i>	-2,3	-2,2	-3,3	-21,4	1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,5	
<i>rpsF</i>	-4,0	-3,2	-2,5	-17,3	-1,0	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,4	
<i>rpsG</i>	-1,3	-1,2	1,1	-13,7										
<i>rpsH</i>	-2,7	-3,6	-3,9	-40,5	1,0	-1,6	-1,5	-1,6	-1,5	-1,5	-1,5	-1,5	-2,0	5
<i>rpsI</i>	-4,4	-4,2	-9,7	-11,8	-1,1	-1,9	-1,8	-1,7	-1,8	-1,8	-2,0	-2,3	-4,1	7
<i>rpsJ</i>	-6,8	-14,1	-12,2	-29,1	-1,1	-2,0	-2,0	-1,7	-1,7	-1,8	-1,8	-1,6	-4,1	7
<i>rpsK</i>	-1,8	-1,9	-2,3	-24,2										
<i>rpsL</i>	-2,0	-1,8	-1,7	-37,6	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,5	
<i>rpsM</i>	-1,8	-1,8	-1,9	-11,2	1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,3	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>rpsN</i>	-2,2	-2,8	-3,0	-75,5	-1,0	-1,7	-1,6	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-2,2	7
<i>rpsO</i>	-2,7	-2,5	-2,4	-18,8	-1,2	-1,8	-1,7	-1,6	-1,5	-1,5	-1,5	-1,5	-2,6	5
<i>rpsP</i>	-2,0	-1,5	-1,9	-11,4	1,1	-1,4	-1,3	-1,3	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-2,0	
<i>rpsQ</i>	-3,4	-7,4	-8,8	-14,6	1,0	-1,5	-1,6	-1,5	-1,5	-1,5	-1,6	-1,5	-1,9	
<i>rpsR</i>	-3,4	-5,0	-4,3	-10,9	-1,0	-1,7	-1,6	-1,6	-1,6	-1,6	-1,6	-1,7	-3,6	7
<i>rpsS</i>	-2,9	-6,2	-7,3	-22,3	1,0	-1,6	-1,7	-1,6	-1,6	-1,7	-1,7	-1,6	-2,8	5
<i>rpsT</i>	-1,6	-1,6	-3,7	-32,5	-1,1	-1,4	-1,3	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-1,3	-2,8	7
<i>rpsU</i>	-1,1	-0,7	-1,8	-36,6	-1,1	-1,4	-1,3	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,8	
<i>rpsV</i>	1,6	2,5	1,9	1,8	1,2	2,0	2,1	2,3	2,3	2,2	2,1	2,3	2,0	1
<i>rraB</i>	0,0	0,0	-1,6	-3,5										
<i>rsd</i>	2,2	2,0	1,6	-5,6										
<i>rseB</i>	1,9	1,3	-1,6	-5,9	-1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,1	-1,0	-2,4	7
<i>rseC</i>	1,8	1,6	-0,6	-5,4	1,0	1,2	1,1	1,2	1,1	1,0	-1,1	-1,3	-3,2	7
<i>rseP</i>					1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,5	-1,6	-1,9	-2,8	
<i>rsgA</i>	-0,7	-1,9	-2,6	-19,7	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-2,4	7
<i>rsmB</i>	-1,2	-1,8	-3,7	-2,7	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,6	-2,1	-2,3	-2,6	4
<i>rsmC</i>					-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,7	-1,9	-2,5	
<i>rsmD</i>					-1,3	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,4	-2,0	
<i>rsmE</i>	-1,4	-1,7	-2,9	-5,7	-1,1	-1,4	-1,5	-1,5	-1,5	-1,5	-1,6	-1,6	-2,6	7
<i>rsmI</i>	-0,7	-0,8	-1,6	-3,7										
<i>rspA</i>	0,4	-1,6	2,5	13,2	-1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,0	1,0	1,1	1,0	2,0	3
<i>rspB</i>	-0,2	-1,2	1,9	6,5										
<i>rstB</i>	1,7	3,0	3,5	2,4										
<i>rsuA</i>	-1,1	1,1	-1,3	-4,0										
<i>rsxA</i>	-1,3	-1,5	-2,5	-3,4										
<i>rsxB</i>	-1,6	-2,1	-3,1	-3,0										
<i>rsxC</i>	-2,0	-3,1	-5,7	-3,1										
<i>rsxE</i>					-1,4	-1,6	-1,9	-2,0	-2,1	-2,6	-3,4	-3,9	-4,5	
<i>rtcA</i>					1,1	-1,1	1,1	1,0	1,4	1,5	1,9	2,1	3,0	
<i>rtcR</i>					-1,2	-1,1	-1,5	-1,5	-1,7	-1,9	-2,0	-2,1	-2,2	
<i>rttR</i>	-1,7	-1,5	1,8	7,0	1,2	-1,7	-1,1	-1,5	1,3	1,8	2,7	3,9	5,5	3
<i>ruvA</i>					-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,5	-1,5	-1,6	-1,8	-2,3	
<i>rumB</i>	-4,4	-3,4	-2,9	-2,1	-1,1	-4,4	-3,0	-2,7	-2,9	-3,6	-2,7	-4,4	-3,5	5
<i>rus</i>	0,7	-0,2	2,5	11,6	1,2	1,1	1,3	1,1	1,4	1,8	2,0	2,8	5,2	8
<i>rutA</i>	0,0	0,1	2,5	3,5										
<i>rutG</i>	-0,5	-0,1	2,9	6,7										
<i>rutR</i>	1,8	2,3	2,3	0,0										
<i>ruvA</i>					-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,4	-1,5	-1,5	-2,1	
<i>ruvC</i>	-2,2	-1,5	-2,1	-4,1										
<i>rybA</i>	-0,1	2,3	8,6	4,1	-1,1	-2,0	-2,5	-1,8	1,1	1,2	1,4	2,0	2,3	3
<i>rybB</i>	1,2	1,4	2,5	5,7	1,2	1,1	1,3	1,2	1,5	1,8	2,0	2,4	3,5	8
<i>rydB</i>	2,0	4,7	12,8	13,3	1,2	1,3	2,1	2,7	3,0	3,0	3,1	5,1	5,4	8
<i>ryeA</i>	0,6	1,8	8,4	2,8	1,2	1,5	1,7	1,8	2,3	2,3	2,6	2,7	2,7	8
<i>ryeB</i>	-2,1	0,2	7,3	3,9										
<i>ryfA</i>					-1,5	-1,8	-1,9	-1,8	-2,1	-2,2	-2,2	-2,2	-2,6	
<i>ryhB</i>	-0,6	-0,8	1,2	10,8	1,3	1,2	1,2	1,2	1,3	1,4	1,5	1,8	2,5	3
<i>ryjA</i>	-1,3	1,4	2,8	2,3	1,1	1,3	1,6	1,8	1,9	1,8	1,9	1,9	2,7	8
<i>lzpQ</i>	1,5	1,9	5,5	16,5	1,4	1,6	1,8	1,7	1,9	1,7	2,0	2,4	2,7	8
<i>sapA</i>	-1,3	-1,4	-2,0	-3,2	1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,4	-1,6	-1,6	-2,1	4
<i>sbcD</i>					-1,0	-1,2	-1,4	-1,3	-1,6	-1,9	-2,0	-1,9	-2,5	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>sbmC</i>	1,7	3,7	3,2	5,5	1,2	2,2	2,4	2,7	2,9	2,9	3,1	3,1	2,8	1
<i>sbp</i>	-5,6	-5,5	-1,8	-0,4	-1,1	-2,6	-2,3	-2,5	-2,7	-1,3	1,1	1,9	3,4	3
<i>sdaA</i>	-0,1	2,9	4,9	3,6	-1,1	-1,1	-1,0	1,2	1,7	2,3	2,9	3,2	5,4	8
<i>sdhA</i>	-2,6	-3,6	-3,1	-7,0	1,1	-2,0	-2,1	-1,9	-2,2	-2,7	-2,9	-3,0	-5,0	4
<i>sdhB</i>	-2,8	-3,1	-2,4	-12,7	1,1	-1,9	-1,8	-1,7	-1,7	-1,9	-2,1	-2,0	-2,4	5
<i>sdhC</i>	-3,4	-3,6	-2,6	-9,3	-1,0	-2,5	-2,5	-2,2	-2,5	-2,7	-3,0	-2,8	-3,4	5
<i>sdhD</i>	-2,9	-3,0	-3,0	-10,0	1,0	-2,2	-2,2	-1,9	-2,2	-2,5	-3,0	-3,2	-4,8	4
<i>sdiA</i>					-1,2	-1,8	-1,8	-2,0	-2,3	-2,2	-1,8	-1,8	-1,5	
<i>secA</i>	-0,1	-2,2	-1,5	-5,8										
<i>secB</i>	0,6	-2,1	-9,2	-30,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,4	-1,6	-1,9	-2,1	-2,8	-7,8	7
<i>secD</i>	-2,1	-2,4	-4,8	-12,0	-1,1	-1,4	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,5	-3,1	7
<i>secE</i>	-1,5	-1,6	-3,8	-9,7	1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-2,3	7
<i>secF</i>	-2,0	-1,7	-2,2	-3,0										
<i>secY</i>	-2,7	-3,8	-3,9	-10,6	1,0	-1,8	-1,8	-1,8	-1,7	-1,7	-1,8	-1,7	-2,7	5
<i>selA</i>	0,7	-1,3	-2,1	-4,7	-1,1	-1,1	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,7	-1,9	-4,0	7
<i>selB</i>					-1,4	-1,3	-1,5	-1,3	-1,5	-1,9	-2,1	-2,4	-3,7	
<i>selD</i>	1,1	-1,1	-1,7	-8,5	-1,0	1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,4	-2,0	7
<i>seqA</i>	0,6	-1,3	-1,9	-11,0	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-2,8	7
<i>serB</i>	-1,7	-2,6	-5,2	-6,5	-1,2	-1,6	-1,6	-1,8	-2,1	-2,3	-2,6	-3,2	-4,5	7
<i>serC</i>	-0,7	-2,1	-6,6	-6,3	-1,1	1,1	1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-2,7	7
<i>serS</i>	0,6	-0,6	-2,1	-8,5	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-2,3	7
<i>setA</i>					1,2	1,1	1,3	1,1	1,3	1,4	1,7	1,9	2,9	
<i>setB</i>	-1,7	-1,5	2,6	8,9	1,0	-1,8	-1,2	-1,6	1,1	1,3	1,5	1,9	2,9	3
<i>setC</i>					2,3	2,0	2,5	2,3	2,8	3,0	3,5	3,8	6,3	
<i>sfmA</i>	1,8	2,0	2,8	6,9										
<i>sfmC</i>	-0,7	-0,1	3,5	5,9	2,0	1,5	2,3	2,2	3,5	3,7	4,4	5,9	11,0	8
<i>sfmD</i>	1,4	0,5	2,2	5,3	1,1	1,2	1,3	1,2	1,3	1,4	1,4	2,0	3,4	3
<i>sfmF</i>					1,0	1,4	1,2	1,3	1,3	1,6	1,9	2,4	3,4	
<i>sfmH</i>	0,6	-0,1	4,3	18,3	2,3	1,1	2,6	1,0	3,4	4,4	5,8	7,3	11,8	8
<i>sfsA</i>					-1,3	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,9	-3,1	
<i>sgaB</i>	2,5	2,1	2,5	2,7										
<i>sgaU</i>					-1,3	1,5	1,2	1,1	1,2	1,2	1,2	1,3	2,1	
<i>sgcC</i>	0,0	-1,4	2,2	8,0	1,4	-1,1	1,2	1,2	1,5	1,7	1,8	2,3	4,9	8
<i>sgcQ</i>	0,0	1,7	2,5	7,2	1,2	1,1	1,2	1,3	1,3	1,5	1,7	1,5	3,1	8
<i>sgcR</i>	1,3	1,8	2,5	4,7	1,2	1,3	1,5	1,4	1,5	1,7	1,8	2,2	3,7	8
<i>sgrS</i>	-0,1	-0,4	2,1	4,9	1,0	1,3	1,2	1,1	1,2	1,3	1,7	1,5	2,8	8
<i>shiA</i>					-1,4	-1,4	-1,5	-1,5	-1,7	-1,9	-2,2	-2,5	-2,3	
<i>sibA</i>					2,0	1,5	4,6	4,2	5,7	10,7	10,4	14,4	17,9	
<i>sibB</i>	0,8	1,4	5,9	8,2	2,1	2,0	2,8	1,9	3,1	2,8	3,4	6,7	5,5	8
<i>sibC</i>	0,1	0,4	2,8	4,3	1,5	1,4	1,7	2,0	2,2	2,1	2,4	2,6	2,8	8
<i>sirA</i>	1,7	3,4	3,6	-0,8										
<i>slmA</i>	1,3	-1,1	-1,3	-5,5	-1,1	1,1	1,1	-1,0	-1,2	-1,4	-1,9	-2,4	-3,4	7
<i>slp</i>	5,0	13,3	0,7	3,7	1,1	3,9	4,4	4,0	2,9	2,3	1,9	1,6	1,3	6
<i>slyA</i>	1,5	0,6	-1,6	-4,7	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,9	-2,1	-3,1	4
<i>slyB</i>	1,8	2,6	3,5	1,4										
<i>slyD</i>	0,6	0,0	-1,4	-4,7	-1,0	1,0	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-2,3	7
<i>smf</i>	1,2	0,5	0,3	3,3										
<i>smg</i>	1,3	1,3	0,6	-3,5										
<i>smpB</i>					-1,7	-2,0	-2,7	-2,3	-2,7	-3,1	-3,4	-4,0	-5,0	
<i>sms</i>					-1,0	-1,4	-1,7	-1,6	-2,0	-2,2	-2,6	-2,9	-2,3	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>sodA</i>	-2,8	-3,4	2,5	0,1	-1,9	-5,6	-7,2	-6,3	-2,7	-1,9	-1,6	-1,2	1,1	2
<i>sodB</i>	1,4	1,6	-0,1	-8,3										
<i>sodC</i>	1,3	3,3	2,2	-1,3										
<i>sohB</i>	1,2	-0,5	-2,0	-7,5										
<i>sokB</i>	10,3	13,6	20,9	11,0	1,3	2,4	2,7	2,7	3,1	3,4	3,5	3,6	3,7	1
<i>sokC</i>	2,8	2,6	5,5	10,4	1,3	1,1	1,2	1,5	1,5	1,9	2,1	2,3	3,3	8
<i>solA</i>	0,1	-1,3	-3,9	-2,8										
<i>sotB</i>	1,6	1,4	1,2	6,3										
<i>soxR</i>	1,2	1,7	4,3	4,6	1,0	-1,1	-1,1	-1,1	1,1	1,1	1,2	1,3	1,5	
<i>soxS</i>	1,7	4,4	14,5	1,7	-1,1	-1,3	-1,1	1,3	2,4	3,1	3,2	3,3	3,2	8
<i>speA</i>	-1,2	-1,9	-8,9	-10,7	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-1,8	-2,2	-2,8	-4,4	4
<i>speB</i>	0,6	-0,6	-3,8	-6,4	1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,7	-1,9	-2,6	-3,6	-7,9	7
<i>speC</i>					-1,4	-1,2	-1,3	-1,5	-2,0	-2,4	-3,0	-3,7	-3,2	
<i>speD</i>	-1,7	-3,6	-6,3	-7,2	-1,0	-1,2	-1,3	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-2,9	7
<i>speE</i>	-2,4	-2,9	-4,9	-4,0	-1,0	-1,3	-1,4	-1,3	-1,4	-1,2	-1,2	-1,4	-2,2	7
<i>speF</i>					1,7	2,1	2,2	1,1	2,8	3,6	5,1	6,4	11,1	
<i>speG</i>	0,0	-1,3	-2,3	-5,2										
<i>spf</i>	0,0	-0,1	2,7	4,4										
<i>spoT</i>	-1,6	-2,7	-10,6	-23,5	-1,1	-1,2	-1,5	-1,5	-2,0	-2,3	-2,9	-4,1	-12,3	7
<i>spoU</i>	-1,2	-1,7	-4,7	-4,5	-1,2	-1,2	-1,1	-1,3	-1,5	-1,7	-2,1	-2,5	-3,5	4
<i>spr</i>	-1,6	-2,4	-2,4	-3,2	-1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-2,8	7
<i>sprT</i>					-1,3	1,2	1,1	1,1	-1,0	-1,4	-1,7	-1,9	-2,0	
<i>spy</i>	5,6	7,0	12,3	14,5	1,0	2,8	2,9	3,1	3,9	5,3	5,8	6,4	7,4	8
<i>srlA</i>	0,1	0,6	4,7	13,6	1,6	-1,3	1,7	1,1	3,0	3,0	4,7	6,8	11,5	3
<i>srlA</i>					-1,0	-2,4	-1,7	-3,0	1,3	1,2	1,7	2,3	4,0	
<i>srlE</i>					1,5	1,1	1,2	1,4	1,7	2,2	2,2	2,4	3,9	
<i>srlE</i>					1,0	-1,6	1,0	-1,1	1,1	1,1	1,4	2,0	2,7	
<i>srlR</i>					-1,3	-1,1	-1,4	-1,3	-1,7	-1,8	-2,1	-2,6	-2,1	
<i>srmB</i>	-1,2	-1,2	-3,7	-15,9										
<i>srmB</i>	-2,0	-2,8	-3,1	-2,7										
<i>srmB</i>	-0,6	-1,4	-4,6	-6,3										
<i>sseB</i>	-1,4	-1,8	-2,9	-15,8	-1,2	-1,4	-1,4	-1,6	-1,4	-1,5	-1,5	-1,6	-2,8	7
<i>ssnA</i>	0,1	-0,1	2,2	5,1	1,9	1,3	2,0	1,2	2,0	2,9	3,2	4,2	8,5	8
<i>sspA</i>	-1,3	-1,4	-2,0	-8,1										
<i>sspB</i>	1,2	0,0	-1,2	-4,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-2,4	7
<i>ssrS</i>	1,8	2,5	4,3	8,0										
<i>sstT</i>	-0,5	-1,3	-3,6	-6,8	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,5	-2,0	-2,6	-2,7	-3,4	4
<i>ssuB</i>	1,2	0,7	1,1	3,5	-1,1	-1,1	-1,0	-1,1	1,1	1,1	1,4	2,1	2,6	3
<i>ssuC</i>					-1,1	1,1	-1,0	-1,2	1,0	1,1	1,3	2,2	2,5	
<i>ssuE</i>					-1,1	-1,5	-1,4	-1,4	-1,6	-1,3	-1,3	1,3	3,3	
<i>stfE</i>	0,5	0,0	2,9	10,3	1,4	-1,1	1,7	1,3	2,3	2,3	3,7	5,0	8,4	8
<i>stfP</i>	-0,5	-0,6	4,2	11,8	1,2	-1,1	1,4	1,0	1,5	2,1	1,8	2,6	3,8	8
<i>stfQ</i>	1,6	2,2	5,5	15,7	-1,3	-1,4	-1,1	-1,2	1,0	1,2	1,4	1,7	2,8	3
<i>sthA</i>	-0,6	1,3	0,1	-5,8										
<i>stpA</i>	0,6	-2,6	-7,4	-5,0										
<i>sucA</i>	-0,7	-1,8	-2,8	-26,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,6	-1,6	-2,8	7
<i>sucB</i>	-1,3	-1,9	-3,6	-31,7	1,1	-1,1	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,7	-1,8	-5,4	7
<i>sucC</i>	-0,8	-1,7	-2,6	-20,7	1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,4	-1,6	-2,5	7
<i>sucD</i>	-1,4	-2,2	-3,9	-20,1	-1,0	-1,3	-1,4	-1,3	-1,5	-1,7	-1,8	-2,0	-4,4	7
<i>sufA</i>					-3,0	-1,3	-1,4	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,5	-2,0	

A.3 Transkriptomanalyse

<i>sufB</i>					-3,0	-2,2	-2,3	-2,1	-2,0	-2,3	-2,1	-1,9	-1,4	
<i>sufC</i>					-3,0	-2,1	-2,3	-2,0	-2,1	-2,5	-2,6	-2,8	-2,5	
<i>sufD</i>					-3,5	-2,0	-2,0	-1,9	-2,0	-2,2	-2,1	-2,3	-2,1	
<i>sufE</i>					-2,3	-1,7	-1,7	-1,4	-1,7	-2,0	-2,1	-2,6	-2,4	
<i>sufS</i>					-2,4	-1,5	-1,5	-1,4	-1,6	-1,7	-2,0	-2,3	-2,6	
<i>sugE</i>	1,8	2,9	2,5	1,7										
<i>sulA</i>	1,5	2,1	2,9	2,1										
<i>sun</i>					1,2	-1,3	-1,6	-1,1	-1,4	-1,8	-1,7	-1,8	-2,0	
<i>surA</i>					1,0	-1,1	-1,0	1,1	1,0	-1,0	-1,0	-1,2	-2,5	
<i>surE</i>	-0,6	-1,8	-5,1	-9,3	-1,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,6	-1,9	-2,4	-3,5	-6,1	7
<i>sxy</i>	1,2	1,2	2,1	5,1										
<i>symE</i>	-0,1	-1,6	2,1	8,2	1,4	1,3	1,0	1,2	1,1	1,2	1,1	1,7	2,2	3
<i>tabA</i>	-0,6	-1,3	-0,8	2,6										
<i>tag</i>	2,1	1,3	2,0	6,0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,6	1,9	2,5	3
<i>talA</i>	2,5	6,0	1,0	-3,2	-1,2	2,5	2,3	2,3	2,3	2,2	2,1	2,0	1,0	6
<i>talB</i>	1,4	1,2	-0,1	-11,0										
<i>talC</i>					1,0	-1,3	-1,4	-1,2	-1,6	-1,8	-1,9	-2,2	-2,2	
<i>tam</i>	1,9	6,0	2,1	2,4	-1,4	1,7	1,9	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8	1,9	
<i>tap</i>	-2,0	-23,2	-11,2	-9,5	3,2	2,3	-2,0	-2,7	-2,5	-2,3	-2,0	-1,7	-1,1	5
<i>tar</i>	-1,4	-25,9	-12,0	-8,4	2,5	1,9	-3,3	-7,0	-4,7	-4,3	-3,8	-2,6	-2,0	5
<i>tas</i>	1,3	-1,2	-3,9	-7,4	-1,0	1,3	1,1	1,0	1,0	-1,0	-1,1	-1,3	-3,6	7
<i>tatA</i>	-1,4	-1,4	-1,8	-5,8										
<i>tatC</i>	-1,6	-2,9	-4,6	-7,7	1,0	-1,3	-1,4	-1,5	-1,7	-2,0	-2,2	-3,1	-5,4	7
<i>tatE</i>	1,7	3,2	4,3	2,2	1,1	1,4	1,6	2,0	2,5	2,9	2,9	3,0	1,9	8
<i>tauA</i>					1,1	-2,1	-1,5	-1,9	-1,3	1,1	1,6	3,4	8,0	
<i>tauB</i>					1,1	-1,8	-1,1	-1,7	-1,0	1,3	1,7	3,7	8,3	
<i>tauC</i>					-1,3	-1,6	-1,3	-2,0	-1,1	1,1	1,5	2,3	3,5	
<i>tauD</i>					-1,1	-1,4	-1,3	-1,4	-1,3	-1,1	1,1	1,7	3,1	
<i>tbpA / thiB</i>					1,0	1,2	1,1	1,3	1,9	2,0	2,1	2,1	1,3	
<i>tdcA</i>	1,4	0,5	4,8	15,4	2,0	1,1	1,7	1,1	2,1	3,3	4,2	5,2	11,4	8
<i>tdcB</i>					1,6	1,2	1,5	1,4	1,9	2,0	2,5	3,7	6,5	
<i>tdcD</i>	-0,7	-1,4	1,5	6,6	1,6	1,1	1,5	-1,1	1,6	1,8	2,6	3,2	6,2	8
<i>tdcR</i>	1,8	1,5	6,8	20,4	1,9	2,2	2,8	2,5	3,8	3,9	5,1	4,7	12,2	8
<i>tdh</i>	1,9	2,7	1,6	-0,6										
<i>tehB</i>	0,6	-1,2	-2,8	-5,0										
<i>tesA</i>	-0,1	-0,1	-1,6	-5,0										
<i>tesB</i>	2,6	3,1	2,3	-0,7										
<i>tfaE</i>	1,6	1,3	2,5	8,7	1,0	1,3	1,4	1,3	1,3	1,7	1,8	1,8	3,4	8
<i>tfaP</i>	0,8	0,7	3,2	11,3	2,1	1,8	2,6	2,2	2,2	4,1	3,7	5,2	7,7	8
<i>tfaQ</i>	1,4	1,5	3,4	10,0	-1,1	1,4	1,4	1,4	1,2	1,2	1,2	1,2	2,0	3
<i>tgt</i>	-2,2	-2,0	-2,6	-2,5										
<i>thiC</i>					-1,4	-1,5	-1,3	-1,3	1,4	4,2	7,2	9,3	8,4	
<i>thiD</i>	0,1	2,6	4,0	4,4	-1,0	-1,0	1,2	1,1	2,0	3,5	4,7	5,0	4,1	8
<i>thiE</i>					1,2	1,1	-1,1	-1,1	1,9	5,3	8,9	12,1	8,5	
<i>thiF</i>	-0,7	2,5	8,5	1,4	1,1	-1,0	-1,1	-1,1	1,8	5,8	8,9	11,7	8,2	8
<i>thiG</i>					-1,0	1,2	1,1	1,2	1,8	3,8	5,9	7,3	3,2	
<i>thiH</i>					1,1	-1,0	1,2	1,3	2,2	5,2	8,4	11,4	4,0	
<i>thiK</i>					-1,2	-1,2	-1,3	-1,2	-1,4	-1,3	-1,5	-1,8	-2,3	
<i>thiL</i>	0,1	-0,8	-4,3	-5,9	-1,1	-1,4	-1,5	-1,5	-1,8	-1,9	-2,4	-2,8	-4,3	4
<i>thiM</i>	-0,7	1,6	3,3	10,2	-1,2	1,0	-1,2	1,1	1,8	3,6	4,6	4,5	2,3	8

A.3 Transkriptomanalyse

<i>thiP</i>					1,2	1,1	1,1	1,3	1,8	2,1	2,3	2,3	1,8	
<i>thiQ</i>	2,2	4,2	2,9	2,1	1,1	1,2	1,2	1,3	1,7	2,0	2,1	1,8	2,1	8
<i>thiS</i>					-1,0	-1,2	-1,2	-1,1	1,3	3,6	6,3	8,1	4,5	
<i>thrA</i>	-3,0	-6,7	-9,9	-21,0	1,0	-1,9	-2,2	-2,3	-3,0	-3,5	-3,9	-5,0	-4,0	4
<i>thrB</i>	-2,3	-5,2	-7,1	-11,1	1,0	-1,6	-1,9	-2,1	-2,5	-2,8	-3,0	-2,8	-2,1	5
<i>thrC</i>	-3,6	-11,5	-17,2	-21,2	1,0	-2,2	-2,7	-2,9	-3,8	-4,6	-5,6	-5,5	-5,3	5
<i>thrS</i>	-0,6	-1,1	-0,8	-19,8										
<i>thyA</i>	-1,3	-1,9	-4,6	-8,5	-1,3	-1,2	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,7	-2,0	-6,5	7
<i>tig</i>	-1,3	-2,1	-3,8	-19,3	1,0	-1,2	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,6	-2,8	7
<i>tilS</i>					-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-3,1	
<i>tktA</i>	1,0	-1,2	-3,3	-15,6	-1,2	1,0	1,0	1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-4,9	7
<i>tktB</i>	3,7	7,8	0,7	-1,5	-1,3	2,8	2,8	2,8	2,9	2,4	2,1	2,0	1,3	6
<i>tldD</i>					-1,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,6	-2,0	
<i>tmcA</i>	-1,5	-2,0	-2,9	-3,6										
<i>tnaA</i>	-6,9	-12,0	-6,2	-3,4	-1,4	-3,1	-4,6	-6,4	-6,0	-5,1	-4,3	-4,1	-2,3	2
<i>tnaB</i>	1,4	0,7	2,0	5,3	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,7	1,9	2,1	2,7	8
<i>tnaC</i>	-3,2	-8,5	-3,0	-8,0	1,4	-2,2	-2,5	-2,4	-2,2	-2,1	-1,7	-1,8	1,2	2
<i>tolB</i>	1,3	-1,1	-2,5	-9,2										
<i>tolC</i>	1,4	1,4	1,4	-8,0										
<i>tolQ</i>	-1,2	-1,7	-2,0	-5,2	-1,1	-1,3	-1,4	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-1,6	-2,4	7
<i>tolR</i>	-1,4	-1,4	-1,7	-13,9	-1,0	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,1	-1,2	-1,4	-2,7	7
<i>tonB</i>	0,6	2,1	4,1	0,0										
<i>topA</i>	-1,5	-1,8	-3,0	-3,5										
<i>topB</i>					-1,2	-1,5	-1,5	-1,5	-1,5	-1,7	-1,8	-1,8	-2,0	
<i>torC</i>	0,6	0,5	2,4	4,5										
<i>torD</i>	0,1	0,0	2,8	7,4										
<i>torY</i>	0,6	-0,8	3,8	14,6										
<i>tpx</i>	1,1	1,2	-0,3	-11,0										
<i>treA</i>	2,4	6,3	0,6	1,7	-1,2	2,3	2,4	2,4	2,3	2,1	2,0	2,0	1,7	
<i>treB</i>	-1,5	-2,7	-0,6	4,3										
<i>treC</i>					1,1	-1,9	-1,6	-2,1	-1,4	-1,3	-1,2	1,0	1,6	
<i>treF</i>	1,5	2,6	1,1	2,4										
<i>treR</i>					-1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	-1,1	-1,2	-1,6	-2,7	
<i>trkA</i>	-1,4	-1,5	-2,7	-2,1	-1,2	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,5	-1,7	-2,0	-3,1	7
<i>trmA</i>	-1,6	-0,1	-1,3	-2,7										
<i>trmB</i>	-2,8	-2,2	-3,4	-6,5	-1,4	-1,8	-1,8	-1,7	-1,8	-2,0	-2,2	-2,3	-4,8	7
<i>trmD</i>	-1,7	-1,7	-1,6	-20,8										
<i>trpB</i>	-0,6	-1,2	-1,3	-3,8	1,2	-1,0	-1,2	1,2	-1,2	-1,5	-1,8	-1,9	-2,8	4
<i>trpD</i>	-0,2	-1,7	-1,6	-3,8	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,2	-1,1	
<i>trpE</i>	-0,5	-1,4	0,5	-1,2	-1,1	-1,3	-1,3	-1,2	-1,2	-1,4	-1,4	-1,6	-1,8	
<i>trpF</i>	0,6	-1,3	1,1	0,1	1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,0	-1,1	-1,0	-1,1	1,0	
<i>trpL</i>	0,1	0,0	1,7	1,8	1,1	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	1,1	1,2	1,4	
<i>trpS</i>	0,0	-1,4	-4,3	-11,8	-1,2	-1,0	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,5	-1,5	-3,5	7
<i>truA</i>					-1,1	1,5	1,4	1,2	1,0	1,1	1,0	-1,2	-2,8	
<i>truB</i>	-2,5	-2,8	-3,3	-6,2	-1,2	-2,0	-2,1	-2,2	-2,5	-3,0	-3,4	-3,7	-6,4	
<i>truD</i>	0,7	-1,6	-4,0	-7,4	-1,0	-1,0	-1,2	-1,3	-1,6	-1,9	-2,2	-2,7	-4,4	
<i>trxB</i>	-1,6	-3,3	-7,2	-11,9	-1,2	-1,7	-2,1	-2,3	-2,6	-2,7	-3,1	-2,8	-4,1	5
<i>trxC</i>	-0,7	-1,2	-2,6	-4,0										
<i>tsf</i>	-2,5	-2,6	-2,9	-10,3	-1,1	-1,6	-1,6	-1,5	-1,5	-1,4	-1,4	-1,5	-2,8	7
<i>tsqA</i>	-5,5	-4,4	-9,0	-3,6										

A.3 Transkriptomanalyse

<i>tsr</i>	-2,1	-5,5	-2,9	-2,8	2,2	1,3	-1,6	-1,7	-1,5	-1,4	-1,5	-1,3	1,2	5
<i>tsx</i>					-1,2	-1,1	-1,1	-1,0	-1,1	-1,2	-1,3	-1,6	-2,3	
<i>ttcA</i>	-1,0	-1,5	-3,4	-3,6	-1,2	-1,5	-1,6	-1,4	-1,6	-1,8	-1,9	-2,7	-3,8	4
<i>ttdA</i>					1,1	1,2	1,3	1,5	1,3	1,5	1,6	2,0	2,8	
<i>ttdB</i>	-0,6	-1,2	1,7	4,9	1,5	1,5	2,1	1,8	2,1	2,3	2,7	3,3	5,7	8
<i>ttdR</i>	0,7	-0,5	1,7	2,7										
<i>ttdT</i>					1,8	1,3	1,6	1,6	2,0	2,4	2,9	3,5	6,1	
<i>tuf</i>	-0,7	-1,2	-0,6	-8,8										
<i>tus</i>	1,2	1,4	3,6	2,7										
<i>tynA</i>	1,2	0,6	1,8	6,8	-1,1	-1,1	1,0	-1,2	1,2	1,2	1,4	1,7	2,3	3
<i>typA</i>	-1,8	-2,3	-6,4	-19,6	-1,1	-1,3	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,7	-4,2	7
<i>tyrA</i>	-3,3	-8,3	-6,8	-6,7	1,0	-1,9	-3,5	-4,4	-4,3	-4,4	-4,5	-4,4	-4,6	5
<i>tyrB</i>	1,2	-2,7	-7,0	-8,7	-1,2	1,1	-1,1	-1,4	-1,9	-2,4	-2,7	-3,2	-5,5	4
<i>tyrP</i>	-0,1	-4,1	-2,4	-1,2	-1,1	-1,6	-2,2	-3,9	-4,8	-4,4	-3,7	-3,3	-2,5	5
<i>tyrS</i>	-0,6	-1,4	-2,2	-8,0	-1,1	-1,0	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-2,1	7
<i>ubiB</i>	-1,4	-1,7	-2,7	-3,2	-1,3	-1,4	-1,7	-1,6	-2,0	-2,0	-2,3	-2,6	-2,6	4
<i>ubiD</i>	1,1	-1,4	-1,6	-3,9	-1,1	-1,3	-1,4	-1,4	-1,5	-1,8	-1,9	-2,1	-2,7	4
<i>ubiE</i>	-0,6	-1,4	-1,8	-4,8										
<i>udp</i>	-0,7	-1,3	0,6	-5,8	-1,1	-1,2	-1,3	-1,2	-1,4	-1,5	-1,7	-1,8	-2,7	7
<i>udk</i>					-1,4	-1,5	-1,4	-1,3	-1,3	-1,5	-1,8	-1,9	-2,7	
<i>udp</i>					-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,4	-1,6	-1,9	-3,5	
<i>ugd</i>	6,5	6,2	4,4	2,0	1,6	2,6	2,7	2,6	2,0	1,7	1,5	1,3	1,0	6
<i>ugpA</i>	74,6	89,8	93,8	4,8	4,1	9,7	10,5	11,2	11,5	11,1	10,4	8,7	-1,1	6
<i>ugpB</i>	112,5	136,2	158,3	29,1	3,7	9,6	10,3	10,5	10,6	10,3	10,0	9,3	1,2	6
<i>ugpC</i>	51,1	57,5	72,3	1,9	3,5	10,0	10,7	10,5	10,7	10,6	9,8	8,0	1,2	6
<i>ugpE</i>	35,5	41,0	43,5	2,6	3,8	9,0	9,7	10,0	10,8	10,5	9,4	7,7	1,6	6
<i>ugpQ</i>	19,4	21,4	23,3	-1,1	2,3	5,5	5,6	6,1	6,2	5,9	5,4	4,7	-1,7	6
<i>uhpB</i>					-1,3	-1,5	-1,5	-1,4	-1,7	-1,5	-2,0	-2,1	-2,3	
<i>uhpC</i>					-1,3	-1,7	-1,6	-1,7	-1,9	-1,9	-2,2	-2,0	-1,5	
<i>uhpT</i>	-2,1	-2,2	0,7	4,2	-1,1	-3,4	-1,3	-3,6	-1,0	1,2	1,5	2,2	3,6	3
<i>uidA</i>	-1,3	0,1	2,7	4,9	-1,0	-1,2	-1,0	-1,0	1,1	1,2	1,4	1,7	3,3	3
<i>uidC</i>	-0,8	-1,6	5,2	19,4	-1,2	-1,4	1,7	1,1	2,0	1,9	2,5	4,7	7,0	3
<i>uidC</i>	-1,0	-2,0	4,0	14,3	1,5	-1,4	1,6	-1,0	2,0	3,5	5,0	5,5	11,8	3
<i>ulaG</i>	3,9	2,4	3,1	7,9										
<i>ulaR</i>	-0,5	-1,2	-0,7	2,9										
<i>umuC</i>	-0,5	1,3	2,1	3,9										
<i>umuD</i>	1,5	1,8	5,3	14,5										
<i>ung</i>					-1,1	-1,0	1,0	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	-2,0	
<i>upp</i>	-2,0	-2,0	-4,8	-8,7	-1,1	-1,5	-1,3	-1,3	-1,5	-1,7	-2,0	-2,5	-5,6	7
<i>uraA</i>	-4,6	-5,9	-6,1	-2,7	-1,3	-2,7	-2,3	-2,6	-3,2	-4,0	-4,3	-3,3	-2,6	5
<i>uspA</i>	1,4	1,2	-0,6	-6,2	-1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1	-1,0	6
<i>uspB</i>	3,1	5,7	1,2	-1,8	-1,0	2,1	2,1	2,0	2,2	2,0	1,8	1,8	1,2	6
<i>uspC</i>	2,5	4,5	3,6	3,3	-1,2	1,7	1,7	2,0	2,0	1,8	1,6	1,8	1,5	
<i>uspD</i>					-1,0	1,4	1,4	1,5	1,7	1,7	1,7	1,7	1,4	
<i>uspE</i>	2,3	2,1	0,8	-3,0										
<i>uspF</i>	1,8	1,6	0,2	2,5										
<i>uspG</i>	3,6	4,1	3,9	1,8	1,1	2,6	2,5	2,9	2,6	2,7	2,8	2,8	2,2	1
<i>uup</i>	-1,6	-2,0	-3,8	-6,0										
<i>uvrD</i>	-1,7	-1,5	-1,0	-8,8										
<i>uvrY</i>	0,6	-1,4	-1,5	-2,9										

A.3 Transkriptomanalyse

<i>uxaB</i>	1,2	0,6	2,6	5,1	1,1	1,1	1,2	1,0	1,2	1,4	1,4	1,6	2,7	3
<i>valS</i>	-1,5	-2,3	-4,3	-9,9	-1,1	-1,2	-1,3	-1,4	-1,6	-1,8	-1,9	-2,2	-3,6	7
<i>ves</i>	-1,4	-5,0	-1,2	0,1										
<i>visC</i>	0,0	-1,4	-2,1	-4,5										
<i>vsr</i>					-1,4	-1,1	-1,0	1,1	1,1	1,0	-1,1	-1,3	-2,1	
<i>waaU</i>					1,0	-1,1	-1,2	-1,1	-1,3	-1,4	-1,6	-2,0	-2,5	
<i>wbbI</i>	-1,3	-1,8	-3,2	-3,3										
<i>wbbK</i>	-1,2	-2,2	-2,2	-1,3										
<i>wbbL</i>	-1,4	-1,6	-2,4	-2,2	1,0	-1,1	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,2	-1,5	-3,3	7
<i>wcaB</i>	-0,7	-0,3	2,8	9,3										
<i>wcaC</i>	-1,3	-0,7	2,3	7,8										
<i>wcaD</i>	1,5	1,7	5,7	17,6	2,1	1,8	2,7	1,5	2,7	4,7	6,4	8,0	19,7	8
<i>wcaJ</i>	1,9	1,9	7,3	7,9										
<i>wcaK</i>	4,2	4,3	8,5	3,3	-1,1	3,4	3,4	3,4	2,8	2,4	2,1	1,4	1,2	6
<i>wcaL</i>	3,2	3,9	8,0	4,6										
<i>wcaM</i>	2,3	2,2	4,2	4,7	1,0	3,3	3,1	2,8	2,1	1,9	1,6	1,5	2,5	
<i>wecD</i>					-1,1	-1,2	-1,6	-1,7	-2,1	-2,3	-2,3	-2,6	-1,9	
<i>wecH</i>	1,1	-1,4	1,5	7,0										
<i>wrbA</i>	3,2	5,1	-0,3	-3,9	-1,1	2,5	2,4	2,3	2,2	2,0	1,9	1,6	-1,2	6
<i>wrbA</i>	4,0	5,1	0,6	-4,6	-1,1	2,0	1,9	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6	-1,1	6
<i>wzb</i>	0,1	1,5	4,1	14,0										
<i>wzc</i>					1,8	1,1	1,7	1,3	2,4	2,7	3,4	3,9	7,6	
<i>wzxC</i>	1,8	2,5	4,5	3,8	-1,1	1,4	1,7	1,5	1,7	1,7	2,0	2,3	3,2	8
<i>wzxE</i>	-1,6	-2,7	2,1	7,1	-1,1	-1,4	-1,3	-1,7	-1,2	-1,2	1,0	1,3	2,2	3
<i>wzzE</i>	-1,6	-2,3	-2,9	-4,1	-1,1	-1,2	-1,4	-1,6	-1,8	-1,9	-2,1	-2,4	-2,9	4
<i>xanP</i>	-9,3	-22,9	-10,6	-5,0	-1,2	-2,7	-2,5	-2,4	-2,6	-3,4	-3,5	-3,4	-5,0	5
<i>xanQ</i>	1,5	1,4	2,1	6,2										
<i>xapA</i>	0,0	0,2	2,3	7,9	-1,3	-1,1	1,2	1,1	1,5	1,3	1,5	2,5	3,3	8
<i>xapB</i>	-0,7	-0,7	2,7	7,6	-1,3	-1,2	1,1	-1,1	1,1	1,7	1,9	2,0	3,3	3
<i>xapR</i>	-1,2	-0,8	1,8	5,0	1,0	-1,1	-1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,3	2,4	3
<i>xdhB</i>	2,0	1,4	2,0	5,7										
<i>xdhC</i>	1,3	1,7	1,6	5,6	1,2	1,3	1,6	1,2	1,4	1,5	1,8	2,0	3,1	8
<i>xerC</i>	0,0	-1,5	-5,0	-10,2	1,1	1,1	-1,3	1,1	-1,2	-1,5	-1,6	-2,1	-2,8	7
<i>xisE</i>	1,2	1,9	2,8	3,6										
<i>xseA</i>	-1,1	0,6	0,0	-4,1										
<i>xseB</i>	-1,5	-0,5	-1,5	-6,1										
<i>xylA</i>	-0,6	-1,3	2,2	6,7	1,1	1,0	1,0	-1,1	1,1	1,2	1,5	2,0	3,6	3
<i>xylB</i>					1,0	1,0	1,0	-1,0	-1,1	-1,0	1,1	1,4	2,7	
<i>xylE</i>	2,0	5,3	10,2	8,1	1,4	4,0	5,5	6,0	6,4	6,6	6,5	6,0	6,8	
<i>xylF</i>	-1,1	-0,6	2,9	9,9	1,2	1,1	1,3	1,3	1,3	1,5	1,9	2,0	3,0	8
<i>xylG</i>	0,7	-0,6	2,3	7,8	1,3	1,0	1,2	-1,1	-1,0	1,1	1,1	1,4	2,3	3
<i>yacG</i>					-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,4	-1,6	-2,0	-3,0	
<i>yadB</i>					-1,3	-1,5	-1,4	-1,4	-1,4	-1,5	-1,5	-2,0	-3,3	
<i>yaiV</i>					1,8	1,5	2,1	2,2	2,2	2,9	4,0	4,0	6,4	
<i>ybaS</i>					1,1	4,9	5,1	4,8	3,7	2,9	2,9	3,1	3,9	
<i>ybbB</i>					-1,2	-1,1	-1,5	-1,1	-1,4	-1,7	-1,8	-2,2	-2,1	
<i>ybbW</i>					2,4	-1,3	1,9	1,1	2,2	3,3	3,8	5,9	10,0	
<i>ybcZ</i>					-1,9	-1,8	-1,9	-1,6	-2,1	-2,0	-2,1	-2,5	-2,7	
<i>ybdK</i>					-1,5	2,1	1,8	1,9	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	
<i>ybfE</i>					-1,0	-1,4	-1,7	-1,6	-1,7	-2,0	-2,1	-2,6	-2,4	

A.3 Transkriptomanalyse

ybgC					-1,0	-1,2	-1,2	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-2,6
ybhO					-1,1	2,3	1,9	1,9	1,5	1,4	1,2	1,5	1,5
ybjG					1,4	2,5	2,3	1,9	1,1	-1,1	-1,1	-1,4	-2,3
ycdY					-1,2	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,6	-1,8	-2,0	-2,5
ychF					-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,5	-1,6	-1,7	-1,9	-2,4
yciA					1,1	-1,4	-1,4	-1,3	-1,3	-1,2	-1,4	-1,6	-4,3
yciH					-1,0	-1,5	-1,4	-1,3	-1,4	-1,5	-1,5	-1,7	-3,2
yddK	0,7	0,8	4,2	7,4	5,5	-1,3	4,3	1,2	9,6	17,9	22,7	23,6	44,0
yedP					-1,2	1,8	1,8	2,1	2,2	2,1	1,9	1,8	1,1
yeeF					-1,1	-2,6	-2,5	-2,8	-3,1	-3,2	-3,7	-4,0	-3,1
yegS					1,1	3,8	3,6	3,3	3,0	2,7	2,5	2,3	3,7
yehB	1,2	0,7	7,4	14,7	2,5	1,2	2,6	1,2	3,7	5,0	7,3	9,3	17,2
yehC					3,0	1,5	3,8	2,2	5,4	9,2	14,0	16,0	29,8
yehD	1,1	0,9	6,5	20,4	5,0	1,3	4,0	1,4	5,0	12,4	17,0	18,7	67,9
yeiA					1,1	2,1	1,9	1,8	1,7	1,4	1,7	2,2	2,7
yeiP					-1,0	-1,1	-1,0	-1,0	-1,0	-1,1	-1,2	-1,5	-2,1
yejK					1,2	1,2	-1,5	1,1	-1,4	-1,6	-1,8	-1,9	-2,3
yfaE					-1,3	-1,3	-1,5	-1,3	-1,5	-1,4	-2,0	-2,2	-2,7
yfaL					1,0	-1,0	-1,3	-1,1	-1,6	-1,4	-1,5	-1,7	-2,1
yfcB					-1,4	-1,5	-1,8	-1,6	-2,0	-2,3	-2,6	-3,5	-5,2
yfcG					-1,2	2,4	2,4	2,8	2,3	2,0	1,7	1,6	1,6
yfeG/eutR					1,1	-1,2	-1,3	1,1	-1,3	-1,5	-1,9	-2,0	-2,7
yfiD					1,7	2,1	2,2	2,4	2,3	2,4	2,4	2,5	2,1
ygaD					-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,1	-1,2	-1,2	-1,4	-2,5
ygaU					1,1	1,9	2,0	2,1	2,4	2,4	2,4	2,5	2,3
ygeW					1,6	1,9	2,5	2,3	2,6	3,0	3,2	3,8	4,6
ygeX					-1,0	1,0	1,2	-1,1	1,1	1,2	1,3	1,6	2,3
yggA					-1,2	-1,1	-1,8	-1,3	-1,7	-1,9	-2,1	-2,3	-2,1
yggF					1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,4	1,8	2,7
yghA					-1,2	3,0	3,0	3,1	3,2	3,0	2,9	3,5	2,8
ygiZ					2,8	1,7	3,4	2,2	4,6	6,6	8,3	10,0	13,7
yheM					-1,2	-1,1	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,5	-1,8	-3,8
yhhZ					3,0	3,9	4,6	3,4	4,1	6,4	6,9	8,2	12,7
yhiL					2,9	1,9	3,1	1,9	3,1	3,5	3,7	5,8	10,3
yhiS					4,3	1,6	3,4	2,1	3,9	5,9	8,1	10,2	15,4
yhjH					2,3	1,3	-4,0	-7,0	-3,7	-3,4	-2,7	-2,2	-1,4
yiaK					1,1	-1,3	1,1	-1,1	1,2	1,2	1,6	2,3	2,5
yiaL					3,6	2,1	3,6	2,0	5,1	6,6	9,1	10,4	22,4
yiaM					3,2	1,3	2,2	1,1	2,6	3,6	4,2	5,7	8,9
yiaN					1,2	-1,1	1,2	1,0	1,3	1,4	1,6	2,3	3,1
yiaO					2,3	2,1	2,2	1,3	2,7	2,8	4,0	5,7	8,4
yibD	80,9	88,2	111,3	1,2	3,1	9,8	9,9	10,4	10,7	11,1	10,6	9,5	1,5
yibJ					-1,3	1,2	1,2	1,1	-1,1	1,1	1,2	1,2	2,0
yibO					-1,1	-1,0	-1,1	1,0	-1,3	-1,5	-1,5	-1,6	-2,3
yibO					-1,1	-1,4	-1,5	-1,0	-1,5	-1,7	-1,4	-2,1	-2,4
yicO					5,1	1,4	4,3	1,8	6,1	9,1	10,3	13,9	23,1
yigB					-1,0	-1,1	-1,2	1,2	-1,2	-1,3	-1,6	-1,5	-2,1
yigB					-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2	-1,3	-1,4	-1,8	-2,4
yigC					-1,2	-1,1	-1,2	1,0	-1,2	-1,3	-1,4	-1,2	-2,3
yigG					1,4	-1,0	-1,0	-1,2	-1,2	1,5	1,6	2,0	3,6

A.3 Transkriptomanalyse

<i>yihP</i>					-1,0	1,6	1,7	1,7	1,9	2,4	2,6	2,6	1,8
<i>yihQ</i>					1,8	3,3	4,1	4,7	5,4	6,8	8,4	7,7	4,4
<i>yjbl</i>					3,6	1,4	3,3	1,2	3,6	5,3	7,2	9,5	17,8
<i>yjcQ</i>					-1,4	-1,7	-1,7	-1,7	-1,8	-2,2	-2,0	-1,7	-2,1
<i>yjff</i>					1,4	1,3	1,4	1,2	1,4	1,6	1,9	2,0	3,7
<i>yjff</i>					-1,3	-1,1	-1,1	-1,0	-1,0	-1,0	1,2	1,6	2,7
<i>ykgC</i>					1,2	2,0	2,2	2,3	1,8	1,7	1,6	2,0	3,1
<i>yohG</i>					1,5	1,4	1,7	1,4	2,1	2,3	2,9	3,6	6,2
<i>yohM</i>					-1,4	-1,3	-1,9	-1,3	-1,5	-1,6	-1,7	-1,9	-2,1
<i>yojI</i>					-2,7	-6,2	-5,5	-5,3	-5,0	-4,4	-4,2	-3,9	-3,4
<i>yqaB</i>					1,1	-1,4	-1,5	-1,5	-1,7	-1,6	-1,7	-1,9	-2,7
<i>yqiA</i>					-1,1	-1,1	-1,3	-1,4	-1,5	-1,6	-1,8	-2,1	-3,3
<i>ysgA</i>					-1,2	-3,1	-2,4	-2,4	-4,0	-8,2	-8,9	-7,0	-5,5
Z3624					-1,2	-4,6	-5,4	-6,5	-6,2	-5,9	-4,8	-3,7	-2,9
Z3625					-1,2	-2,1	-2,5	-2,1	-2,3	-2,4	-2,8	-3,4	-5,6
Z3719					-1,4	-1,2	-1,5	-1,3	-1,4	-1,4	-1,7	-1,8	-2,1
Z4405					-1,1	-1,1	-1,3	1,0	-1,4	-1,7	-1,9	-2,0	-2,3
<i>zipA</i>	1,1	-1,4	-4,0	-32,9	-1,1	-1,1	-1,2	-1,3	-1,3	-1,3	-1,5	-1,8	-2,8
<i>znuA</i>	2,7	8,0	8,3	-0,3	-1,3	-1,3	1,5	2,4	3,4	3,7	3,8	3,8	3,5
<i>znuB</i>	0,6	2,0	4,4	4,9	1,1	-1,3	-1,0	1,2	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8
<i>znuC</i>	1,4	3,3	6,3	1,2	-1,1	-1,2	1,1	1,6	2,4	2,7	2,6	2,7	2,8
<i>zraP</i>					1,1	1,2	1,3	1,0	1,3	1,3	1,5	1,7	3,0
<i>zraS</i>	-0,6	-1,6	1,8	4,8	1,2	-1,4	1,0	-1,7	-1,1	1,1	1,7	2,4	3,5
<i>zwf</i>	1,3	1,2	-0,1	-8,5									

7

8

8

3

A.4 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name:	Tom Schuhmacher
Geburtsdatum	22.6.1980
Geburtsort	Karlsruhe
Schulische Ausbildung	
1991-2000	Ellentalgymnasium in Bietigheim-Bissingen Abschluss: Abitur
Zivildienst	
2000-2001	Schule für Geistigbehinderte Kinder Gröninger Weg Bietigheim-Bissingen
ab Juli 2001	Lehrbeauftragter, Schule Gröninger Weg
Studium	
Oktober 2002 bis 2009	Universität Stuttgart Technische Biologie
Hauptfach: Prof. Dr. Rolf Schmid Prof. Dr. Andreas Stolz	Technische Biochemie, Biotechnologie mit Pilzen
Nebenfächer: Prof. Dr.-Ing Dr h.c. Matthias Reuss	Bioverfahrenstechnik Bioinformatik
Prof. Dr. Jürgen Pleiss	
Wahlpflichtfach: Prof. Dr. Dieter H. Wolf	Biochemie

Wissenschaftliche Arbeiten

Studienarbeit: Sept. 2007 bis Juni 2008	“Absolute Quantifizierung von <i>Escherichia coli</i> K12 W3110 mRNA unter Glukoselimitierung im Fed-Batch Prozess mit quantitativer Real-Time PCR“ Institut für Bioverfahrenstechnik Universität Stuttgart
Prof.Dr-Ing. M. Reuss	
Diplomarbeit: Feb. 2009 bis Sept. 2009	“Herstellung ¹³ c markierter Standards für die Metabolitanalytik mit Gaschromatographie- Massenspektrometrie“ Institut für Bioverfahrenstechnik Universität Stuttgart
Prof. Dr.-Ing. R. Takors	
Dissertation: Okt. 2009 bis Dez. 2013	Prozessdynamiken bei der Tryptophansynthese mit <i>Escherichia coli</i>
Prof. Dr.-Ing. R. Takors	Institut für Bioverfahrenstechnik Universität Stuttgart
