Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 9

2 Zielsetzung 11

3 Theoretische Grundlagen 13
3.1 Biologische Grundlagen 13
3.1.1 L-Cystein 13
3.1.2 Industrielle Bedeutung von Cystein 14
3.1.3 Industrielle Herstellung von Cystein 14
3.1.4 *Escherichia coli* 15
3.1.5 Glucosestoffwechsel in *E. coli* 16
3.1.6 Biosynthese von Cystein in *E. coli* 19
3.2 Bioverfahrenstechnische Grundlagen 22
3.2.1 Prozessführung in Bioreaktoren 22
3.2.2 Abgeleitete Einflussgrößen 24
3.2.3 Bilanzierungen 27
3.3 Metabolomanalyse 28
3.4 Analytische Grundlagen 30
3.4.1 Quantifizierung von Cystein mittels Ninhydrintest 30
3.4.2 LC-MS/MS-Analytik 31
3.4.3 Auswertung und Quantifizierung der LC-MS/MS-Messungen 33
3.5 Grundlagen der ^{13}C-Stoffflussanalyse 37

4 Material und Methoden 41
4.1 Kultivierung 41
4.1.1 Kulturmedien und Lösungen 41
4.1.2 Verwendete Stämme 43
4.1.3 Kultivierung 44
4.2 Analytik 52

4.2.1 Messung der Cysteinkonzentration (Ninhydrintest) 52
4.2.2 Bestimmung der Biotrockenmasse 54
4.2.3 Messung der Glucose-Konzentration 54
4.2.4 Bestimmung der optischen Dichte 54
4.2.5 Methanolisches Quenching und Zellaufschluss 54
4.2.6 LC-MS/MS-Analytik 56
4.2.7 Interner markierter Standard IDMS 57
4.2.8 Auswertung ^{13}C-markierter intrazellulärer Metabolite 57
4.2.9 GC-MS Analytik 58
4.3 ^{13}C-Stoffflussanalyse 61
4.3.1 Modellbildung 61
4.3.2 Modellvalidierung 62

5 Ergebnisse und Diskussion 65
5.1 Etablierung des WACKER-Prozesses 65
5.1.1 Etablierung der Vorkultur 2 im Bioreaktor 65
5.1.2 Etablierung der Hauptkultur im Bioreaktor 67
5.1.3 Fazit der Etablierung des WACKER-Prozesses 68
5.2 Etablierung der Analytik 70
5.2.1 Etablierung des Ninhydrintests 70
5.2.2 Etablierung der LC-MS/MS-Analytik 72
5.2.3 Interner markierter Standard 74
5.2.4 Fazit der Etablierung der Analytik 76
5.3 Metabolomanalyse 77
5.3.1 Metabolomdaten des Wildtyps 77
5.3.2 Metabolomdaten des Stammes CYS1 83
5.3.3 Metabolomdaten des Stammes CYS2 91
5.3.4 Metabolomdaten des Stammes CYS2 *ΔpckA ΔpoxB ppsA+* ... 97
5.3.5 Fazit aus den Metabolomdaten 103
5.3.6 Markierungsexperiment 106
5.3.7 Fazit der Metabolomanalyse 114
5.4 ^{13}C-Stoffflussanalyse 117
5.4.1 Prozess Etablierung in der Kleinkulturanlage 117
5.4.2 Untersuchung der Medienkomponente CSL 118
5.4.3 Vorarbeiten zur ^{13}C-Stoffflussanalyse 122
5.4.4 Simulationsergebnis ^{13}C-Stoffflussanalyse Stamm CYS1 128
5.4.5 ^{13}C-Stoffflussanalyse mit Stamm CYS2 ΔsthA 135
5.4.6 Substratoptimierung 142
5.4.7 Fazit der ^{13}C-Stoffflussanalyse 145

6 Zusammenfassung 149

7 Ausblick 153

Literaturverzeichnis 155

Anhang 163

Abbildungsverzeichnis 171

Tabellenverzeichnis 177

Abkürzungsverzeichnis 179

Danksagung 183