

Stöchiometrische Modellierung von mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktoringenieurin
(Dr.-Ing.)**

von M. Sc. Sabine Koch
geb. am 30.12.1988 in Magdeburg

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens-und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskommission: Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl (Vorsitz)

Dr.-Ing. Steffen Klamt (Gutachter)

Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann (Gutachter)

Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling (Gutachter)

Dr. rer. nat. Dirk Benndorf (Mitglied)

eingereicht am: 26.11.2019

Promotionskolloquium am: 23.04.2020

Zusammenfassung

Mikrobielle Gemeinschaften sind von zentraler Bedeutung in geochemischen Kreisläufen, verschiedenen industriellen Prozessen und für die Gesundheit des Menschen. Für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse werden neben experimentellen Analysemethoden auch vermehrt Modelle und Simulationen eingesetzt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Modellierung mikrobieller Gemeinschaften mit Hilfe von stöchiometrischen Netzwerkmodellen. Eine Herausforderung hierbei ist die Vielzahl der beteiligten Organismen und die daraus resultierende Größe der Modelle, die zudem in der Regel bilinear sind und somit eine kompliziertere Struktur als lineare Einzelmodelle aufweisen. Als Beispiel diente der Biogasprozess, bei dem Biomasse in konsekutiven Schritten abgebaut wird. Für eine vereinfachte definierte mikrobielle Gemeinschaft wurden typische Vertreter verschiedener Abbauschritte (metabolischer Funktionen) im Prozess ausgewählt. Für diese Organismen wurden zunächst spezifische stöchiometrische metabolische Modelle erstellt und validiert.

Ausgehend von den Einzelmodellen wurden kompartimentierte Gemeinschaftsmodelle erstellt. Dabei wurde ein ausbalanciertes Wachstum, bei dem alle Organismen gleich schnell wachsen, angenommen. Das resultierende bilineare Modell wurde mit nichtlinearer Optimierung untersucht und dann durch Festsetzen der Gemeinschaftswachstumsrate linearisiert, wodurch sich Standardmethoden aus dem constraint-based Modelling (z.B. Flussoptimierung) anwenden lassen. Mit den Modellen wurden Bereiche für die Komposition, für metabolische Flüsse, sowie für Methanausbeuten in der Biogasegemeinschaft vorhergesagt. Die prädizierten Bereiche waren dabei z. T. sehr groß und wenig aussagekräftig. Zudem ließen sich einige Analysemethoden, wie die Berechnung und Untersuchung von elementaren Flussvektoren (EFVs), nur für Modelle mit bis zu vier Organismen anwenden.

Um diese Probleme zu lösen, wurde ein neuer Ansatz für reduzierte Gemeinschaftsmodelle entwickelt. Die Grundidee des RedCom-Ansatzes besteht in der Komprimierung der Einzelmodelle auf ausgewählte Nettoumsätze basierend auf den elementare Flussvektoren (EFVs) dieser Modelle. Als Selektionskriterium für die EFVs wurde minimaler Substratumsatz verwendet, um realistische Verhaltensweisen der einzelnen Organismen abzubilden. Die ausgewählten Lösungen dienen als Reaktionen im reduzierten Gemeinschaftsmodell. Letztere sind deutlich kleiner, prädizieren schmalerer Bereiche für Gemeinschaftskompositionen und ermöglichen eine Berechnung von EFVs auch bei Gemeinschaftsmodellen mit einer Größe von neun Organismen.

Anhand eines linearisierten Drei-Organismen-Modells bestehend aus *Desulfovibrio vulgaris*, *Methanospirillum hungatei* und *Methanosarcina barkeri* wurden drei verschiedene Zielfunktionen für die Vorhersage relevanter Lösungen aus dem Lösungsraum getestet: Maximierung der Gemeinschaftswachstumsrate, Maximierung der Gesamtbiomasseausbeute sowie Maximierung der Biomasseausbeuten der einzelnen Organismen. Die Maximierung der Biomasseausbeuten aller Organismen schien dabei die realistischsten Lösungen vorherzusagen. Desweiteren konnten sowohl im reduzierten als auch im linearisierten vollständigen Drei-Organismen-Modell Interventionsstrategien (z.B. Minimal Cut Sets) für erhöhte Methanausbeuten und Methanbildungsraten berechnet werden.

Mit einem Sechs-Organismen-Modell, das zusätzlich *Acetobacterium woodii*, *Syntrophobacter fumaroxidans* und *Propionibacterium freudenreichii* enthielt und das Drei-Organismen-Modell um die Homoacetogene und die Ethanoloxidation über Propionat erweiterte, wurde der Einfluss

verschiedener Ethanoloxidierer und des Erhaltungskoeffizienten untersucht. Ein Erhaltungskoeffizient von $1 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$ für alle Spezies spiegelte die experimentellen Daten am besten wider. Verschiedene Ethanoloxidierer resultierten bei gleichen Erhaltungskoeffizienten in ähnlichen Austauschraten und Ausbeuten. Experimentelle Daten einer Ethanolanreicherungskultur wurden sowohl vom bilinearen und linearisierten vollständigen als auch im reduzierten Modell gut wiedergegeben. In den vollständigen Modellen waren die vorhergesagten Bereiche für die spezifischen Raten jedoch sehr breit, wodurch diese Ergebnisse eine geringe Aussagekraft haben. Die in Metaproteomdaten gefundenen Taxonomien und Proteine ließen sich auf drei der sechs Organismen übertragen: *D. vulgaris*, *M. hungatei* und *M. barkeri*. Mit Hilfe dieser Informationen konnten die Modelle weiter reduziert und dadurch die Modellprädiktionen deutlich eingegrenzt werden.

In einem letzten Schritt wurden die Gemeinschaftsmodelle um die Organismen *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum* und *Syntrophomonas wolfei* erweitert. Für dieses Modell wurde Glukose als Substrat vorgegeben und Simulationsergebnisse mit experimentellen Daten einer Glukose-/Celluloseanreicherungskultur verglichen.

Durch den neu entwickelten RedCom-Ansatz konnten Modelle von geringerer Größe erstellt werden, mit denen detaillierte Untersuchungen (z.B. EFV-Analyse) auch für größere Gemeinschaften möglich sind. Durch die Einbeziehung eines Optimalitätskriteriums ist der Lösungsraum dabei deutlich kleiner und schließt unrealistisches Verhalten (z.B. Substratverschwendung aus), wodurch die Ergebnisse eine höhere Aussagekraft haben. Die Modellierung von Biogasgemeinschaften unterschiedlicher Komplexität auf Basis des entwickelten Ansatzes lieferte Einsichten in die Interaktionen der verschiedenen Organismen und deren Produktionsverhalten bei der Biogasproduktion.

Summary

Microbial communities play an important role in geochemical cycles, human health and industrial applications. Different experimental and analytical methods including computer models have been employed to gain insights and a better understanding of the metabolic interactions between the species of the community and into the underlying principles.

The focus of this thesis was on modeling of microbial consortia with stoichiometric metabolic models. One challenge here is the large number of microorganisms typically involved. As a result, community models are large in size and have a more complicated bilinear structure compared to linear single-species models. Anaerobic digestion, a stepwise degradation of organic polymers to biogas, served as an example of a complex microbial community in this thesis. In a first step, metabolic models of nine organisms representing key metabolic degradation steps (functions) in the biogas process were generated and validated.

The single-species models were used to build a compartmented community model where each organism represents one compartment. It was assumed that all members of a stable community grow equally fast (balanced growth). The resulting full bilinear model was analyzed with nonlinear optimization and then linearized by fixing the community growth rate. Both models were used to predict community compositions, metabolic fluxes and yields. The simulations had a low predictive power and application of methods for detailed analysis (e.g. elementary flux vector analysis) was only feasible for small models of up to four organisms.

In order to tackle these problems, a new approach called RedCom was developed. The main idea is to describe the single-species models with selected net conversions computed with the concept of elementary flux vectors (EFVs). EFVs were chosen for minimal substrate turnover and respective net conversions served as reactions to build a reduced community model. The reduced models were smaller in size and EFVs computation was possible for larger communities of nine organisms. Additionally, the predicted ranges of the simulations were greatly reduced and thus more concise.

In order to find the most relevant solutions, three different objective functions were tested with a (linearized full) three-species community model consisting of *D. vulgaris*, *M. hungatei* and *M. barkeri*: Maximization of the community growth rate, maximization of the total biomass yield and maximization of the biomass yield of each organism. Maximization of the biomass yield of each organism appeared to be the most reasonable. Furthermore, the concept of minimal cut sets to find intervention strategies for improved production was applied to the linearized full and the reduced three-species model. Reasonable and interesting solutions were found in both models.

Next, full and reduced models of a six-species community, additionally containing the organisms *A. woodii*, *P. freudenreichii* and *S. fumaroxidans*, were generated. These organisms extended the model for homoacetogenesis and propionate fermentation. The simulation results were compared with experimental data from an enrichment culture grown on ethanol. While both models reflected the experimental data well, the ranges for the specific exchange rates were significantly narrower in the reduced model leading to a higher predictive power. The reduced six-species model was used to investigate the influence of different ethanol oxidizers and the maintenance coefficients of the organisms. An equal maintenance coefficient of $1 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$ for all organisms reflected the experimental data best. Results were similar for different ethanol degraders (regarding exchange rates and methane yields) for equal maintenance coefficients. In addition to the abiotic data, metaproteomic data from the ethanol enrichment culture was used to further confine the

model. The taxonomies from the culture could basically be mapped to three out of the six model organisms: *D. vulgaris*, *M. hungatei* and *M. barkeri*. Additional constraints for these findings led to a strongly confined solution space in the full and reduced model while still being close to the experimental data.

Lastly, the model was extended for the organisms *E. coli*, *C. acetobutylicum* and *S. wolfei* allowing for an extended range of substrates for the community. Glucose was used as a substrate for this community and simulation results were compared with data of an enrichment culture grown on glucose/cellulose medium.

In conclusion, the newly developed RedCom approach enables the construction of reduced community models with higher predictive power. The reduced models allow for the application of computationally more expensive methods such as EFV computation enabling in turn a more detailed investigation of model properties. Modeling of biogas producing communities of different complexity with the newly developed approach led to new insights in the process. In particular the interactions of the different functional groups and their influence on the biogas production could be investigated in detail.

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Symbole	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
2. Biologische und theoretische Grundlagen	5
2.1. Mikrobielle Gemeinschaften	5
2.2. Biogasprozess	6
2.3. Modellierungsansätze für den Biogasprozess und für mikrobielle Gemeinschaften	8
2.4. Stöchiometrische Analyse von metabolischen Netzen	11
2.4.1. Flussanalyse und Flussvariabilitätsanalyse	12
2.4.2. Ausbeutenoptimierung	12
2.4.3. Elementarmoden und Elementarvektoren	13
2.4.4. Minimal Cut Sets	14
2.4.5. Konstruktion und Struktur stöchiometrischer Modelle von mikrobiellen Gemeinschaften	15
3. Material und Methoden	24
3.1. Anreicherungskulturen	24
3.2. Metaproteomik	28
3.3. Verwendete Datenbanken und Software zur Konstruktion und Analyse der meta- bolischen Modelle	31
4. Ergebnisse und Diskussion	32
4.1. Modellorganismen und deren Stoffwechselmodelle	32
4.2. RedCom-Ansatz	60
4.3. Gemeinschaftsmodelle	72
4.3.1. Drei-Organismen-Modell	73
4.3.2. Sechs-Organismen-Modell und Auswertung von Daten einer Ethanolan- reicherungskultur	87
4.3.3. Neun-Organismen-Modell und Glukoseanreicherungskultur	101
5. Schlussfolgerungen und Ausblick	105
Anhang	111
A. Einzelmodelle	111
B. Reduziertes Drei-Organismen-Modell	124
Literatur	126

Liste der verwendeten Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
$\mathbf{0}$	Nullvektor	
\mathbf{A}	Matrix der Ungleichheitsbedingungen	
c	Stoffmengenkonzentration	$\frac{\text{mol}}{\text{L}}$
D	Verdünnungsrate	h^{-1}
\mathbf{E}	Matrix mit auf Austauschreaktionen projizierten Elementarvektoren	
\mathbf{e}	Auf Austauschreaktionen projizierter Elementarvektor/Elementarmodus	
\mathbf{F}	Gemeinschaftszusammensetzung	
\mathbf{F}	Flusskegel	
F_i	Biomasseanteil von Organismus i an der Gesamtbiomasse	$\frac{g_i}{g_c}$
Fr	Anteil (Fraktion) eines Gases im produzierten Gas	$\frac{\text{L}}{\text{L}}$
m_{ATP}	Erhaltungskoeffizient als spezifische ATP-Verbrauchsrate	$\frac{\text{mmol}_{ATP}}{\text{g}_{TM} \cdot \text{h}}$
m_{DW}	Biotrockenmasse	g_{TM}
m	Anzahl der Metabolite im Netzwerk	
M	Molare Masse	$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$
n	Stoffmenge	mol
\mathbf{N}	Stöchiometrische Matrix	
\mathbf{N}^c	Stöchiometrische Matrix im Gemeinschaftsmodell	
\mathbf{N}^{EX}	Stöchiometrische Matrix, die nur Spalten der Austauschreaktionen und Zeilen der externen Metabolite enthält	
\mathbf{p}	Beschränkte Elementarvektoren	
\mathbf{P}	Flusspolyeder	
q	Anzahl der Reaktionen im Netzwerk	
\mathbf{r}	Reaktionsratenvektor	
\mathbf{r}^c	Reaktionsratenvektor im Gemeinschaftsmodell	
r_s	Spezifische Substrataufnahmerate	$\frac{\text{mmol}_s}{\text{g}_{TM} \cdot \text{h}}$
r_p	Spezifische Produktabgaberrate	$\frac{\text{mmol}_p}{\text{g}_{TM} \cdot \text{h}}$
V_k	Arbeitsvolumen	L
\mathbf{x}	Irreversible unbeschränkte Elementarvektoren	
\mathbf{y}	Reversible unbeschränkte Elementarvektoren	

$Y_{P/S}$	Molare Produktausbeute	$\frac{\text{mmol}_P}{\text{mmol}_S}$
$Y_{X/S}$	Biomasseausbeute	$\frac{\text{g}_{TM}}{\text{mmol}_S}$
α	Untere Ratengrenze	$\frac{\text{mmol}}{\text{g}_{TM} \cdot \text{h}}$
β	Obere Ratengrenze	$\frac{\text{mmol}}{\text{g}_{TM} \cdot \text{h}}$
μ	Spezifische Wachstumsrate	h^{-1}
$\tilde{\mu}_i$	Spez. Biomassesyntheserate von Organismus i im Gemeinschaftsmodell	$\frac{\text{g}_{TMi}}{\text{g}_{TMc} \cdot \text{h}}$
μ_c	Gemeinschaftswachstumsrate	h^{-1}
μ_i	Spezifische Wachstumsrate von Organismus i	h^{-1}

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AW	<i>Acetobacterium woodii</i>
bvM	bilineares vollständiges Modell
CA	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
CH₄	Methan
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoA	Coenzym A (die ungebundene Form wird in Formeln mit HS-CoA abgekürzt)
CBM	constraint-based Modelling
DV	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
EFV	Elementare Flussvektoren
EM	Elementarmoden
ETF	Elektronentransferflavoprotein
FVA	Flussvariabilitätsanalyse
H₂	Wasserstoff
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
lrM	lineares reduziertes Modell
lvM	linearisiertes vollständiges Modell
MB	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MCS	Minimal Cut Sets
MH	<i>Methanospirillum hungatei</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleodid
PEP	Phosphoenolpyruvat
PF	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
PPW	Pentose-Phosphatweg
SDS-PAGE	Sodiumsodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>
SpeC	Anzahl der Spektren vom Massenspektrometer, aus dem Englischen: spectral counts
SW	<i>Syntrophomonas wolfei</i>
TM	Trockenmasse

1. Einleitung

Mikrobielle Gemeinschaften sind allgegenwärtig und von großer Bedeutung für die Natur und die menschliche Gesellschaft. Sie sind in zahlreichen Umwandlungsprozessen, wie z.B. geochemischen Kreisläufen, involviert [1, 2, 3], spielen eine wichtige Rolle für die Gesundheit des Menschen [4, 5, 6] und sind essentiell für viele technische Anwendungen [7, 8, 9]. Aus diesem Grund werden mikrobielle Gemeinschaften hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Funktionsweise und Bedeutung in verschiedenen Prozessen untersucht. Experimentelle Methoden wie Genomics, Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics sind geeignet, um die anwesenden Mikroorganismen und ihre Funktion in der Gemeinschaft zu untersuchen [10, 11, 12]. Desweiteren werden systembiologische und bioinformatische Methoden [13] für die Modellierung, Analyse und das Design [14] mikrobieller Gemeinschaften genutzt. Eine Herausforderung sowohl bei der experimentellen als auch der bioinformatischen Analyse ist die Vielzahl an involvierten Organismen und die daraus resultierende Komplexität mikrobieller Gemeinschaften. Durch bessere Messtechnik und Fortschritte in der Methodenentwicklung (z.B. sensitivere Massenspektrometer, Hochdurchsatzgenomsequenzierung [15]) hat sich die Auflösung bei experimentellen Untersuchungen erhöht. Im bioinformatischen Bereich lassen sich durch neue Methoden, detailliertere Daten aus Experimenten, schnellere Algorithmen und leistungsstärkere Computer mit höherer Rechenleistung komplexere Gemeinschaften untersuchen. Je nach Anwendungsgebiet liegt der Fokus der Modelle oft auf einem speziellen Aspekt der Gemeinschaft. Einige Modelle dienen der Vorhersage der Produktivität der Gemeinschaft für verschiedene Umgebungsbedingungen, was beispielsweise durch maschinelles Lernen mit neuronalen Netzwerken erfolgt [16]. Dynamische Modelle mit Differenzialgleichungen legen den Fokus auf die zeitliche Veränderung und/oder örtliche Verteilung im Prozess. In metabolischen Modellen werden dagegen die Interaktionen und metabolische Aktivitäten in der Gemeinschaft untersucht.

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Vernetzung des Stoffwechsels der Organismen durch den Austausch von Metaboliten zwischen den Organismen und der daraus resultierenden metabolischen Aktivität und der Komposition der Gemeinschaft. Eine grafische Übersicht über die behandelten Themen und die einzelnen Arbeitsschritte ist in Abbildung 1 dargestellt. Als wesentliche Modellierungstechnik für die Abbildung des mikrobiellen Stoffwechsels wurde das constraint-based Modelling (CBM) [17] verwendet. Als Basis für das CBM dienen metabolische Netzwerke, die Informationen zu Reaktionen und Metaboliten, die am Stoffwechsel beteiligt sind, enthalten. Zusätzlich werden Nebenbedingungen (Englisch: constraints), wie zum Beispiel eine Fließgleichgewichtsbedingung, Ratengrenzen oder gemessene Raten für metabolische Flüsse vorgegeben. Mit den Modellen können Stoffwechselwege untersucht, Phänotypen für verschiedene Wachstumsbedingungen vorhergesagt und Interventionsstrategien für ein verändertes Wachstums- und Produktionsverhalten berechnet werden. Ursprünglich wurde CBM für die Untersuchung einzelner Organismen entwickelt und etabliert, in den letzten Jahren jedoch auf mikrobielle Gemeinschaften ausgeweitet [18, 19, 20].

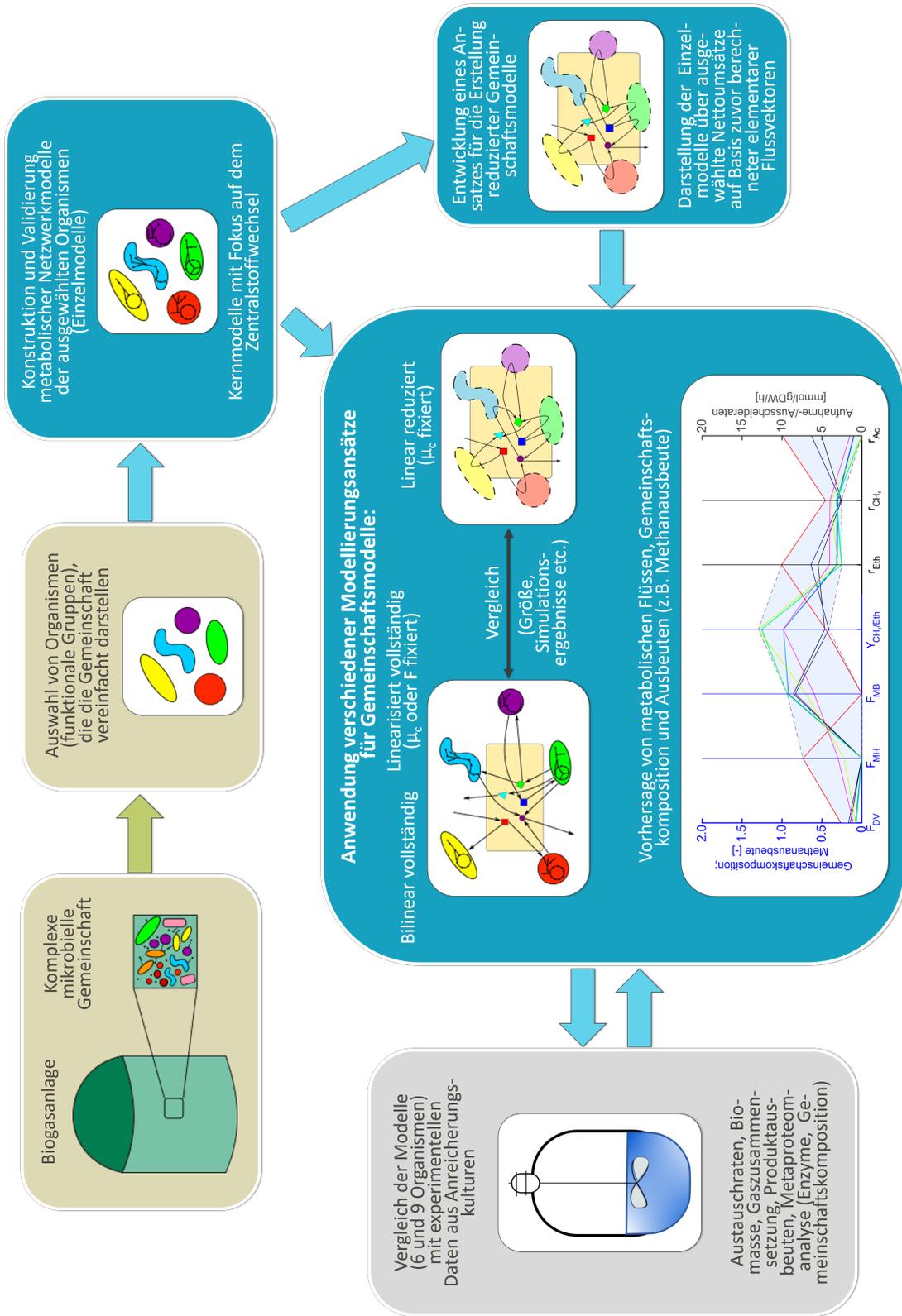


Abbildung 1: Übersicht über zentrale Themen und Arbeitspakete der vorliegenden Arbeit. Dargestellt ist der Kontext der Arbeit (beige), die einzelnen Arbeitsschritte der Modellierung (blau), sowie der experimentelle Teil und die Auswertung der experimentellen Daten (grau). Die Durchführung der Experimente war kein Bestandteil dieser Arbeit.

Da Gemeinschaftsmodelle im Vergleich zu Einzelmodellen eine komplexere Struktur aufweisen, sind bestehende Konzepte hauptsächlich für die detaillierte Analyse kleiner Gemeinschaften geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konzept für das Erstellen reduzierter Gemeinschaftsmodelle entwickelt, um auch eine detaillierte Analyse größerer Gemeinschaften zu ermöglichen. Als Beispielprozess diente hierbei die Biogasbildung ausgehend von Zuckern. Modelle verschiedener Größen wurden erstellt um vollständige Modelle (bilinear und linearisiert) mit reduzierten Modellen bezüglich ihrer Größe und Modellvorhersagen zu vergleichen. Weiterhin wurde untersucht, wie sich verschiedene Methoden des CBM für einzelne Organismen auf Gemeinschaftsmodelle übertragen lassen.

Im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 2) werden biologische und theoretische Grundlagen erörtert. Es wird auf Eigenschaften und Bedeutung von mikrobiellen Gemeinschaften eingegangen und der Biogasprozess als konkretes Anwendungsbeispiel genauer beschrieben. Nachfolgend werden bereits bestehende Konzepte für die Modellierung mikrobieller Gemeinschaften vorgestellt. Es folgt eine Beschreibung der stöchiometrischen Netzwerkanalyse und deren Anwendung auf mikrobielle Gemeinschaften. Im Material und Methodenteil (Kapitel 3) werden die Experimente, die zur Datengewinnung für den Vergleich mit Simulationen genutzt wurden, sowie die verwendeten Ressourcen zur Erstellung der Modelle beschrieben.

Im Ergebnis- und Diskussionsteil (Kapitel 4) werden zunächst die Einzelmodelle vorgestellt und validiert (Abschnitt 4.1). Abschnitt 4.2 stellt den entwickelten RedCom-Ansatz für die Erstellung reduzierter Gemeinschaftsmodelle im Detail vor. Am Beispiel von Gemeinschaftsmodellen mit drei, sechs und neun Organismen werden die verschiedenen Ansätze (bilinare und linearisierte vollständige sowie reduzierte Modelle) bezüglich ihrer Größe und der Modellvorhersagen verglichen (Abschnitt 4.3).

Mithilfe des kleineren Modells mit drei Spezies (Abschnitt 4.3.1) wird dabei zunächst untersucht, wie sich verschiedene Wachstumsraten und Zielfunktionen auf die Ergebnisse der Gemeinschaftsmodelle auswirken. Zudem wird die Berechnung von Minimal Cut Sets zur Identifizierung von Interventionsstrategien auf das linearisierte vollständige und reduzierte Modell angewendet und die Unterschiede zwischen beiden Modellansätzen herausgestellt.

Anhand eines Sechs-Organismen-Modells (Abschnitt 4.3.2) wird der Einfluss alternativer Organismen und des Erhaltungskoeffizienten der einzelnen Organismen analysiert. Desweiteren werden die Modellvorhersagen hinsichtlich Gemeinschaftszusammensetzung, spezifischer Austauschraten und Produktausbeuten mit experimentellen Daten einer Anreicherungskultur verglichen. Metaproteomdaten werden genutzt, um tatsächlich anwesende Organismengruppen und aktive Stoffwechselwege zu identifizieren und die Modellvorhersagen durch Einbinden der gewonnenen Erkenntnisse in die Modelle weiter zu verbessern.

Im letzten Abschnitt des Ergebnisteils (4.3.3) wird ein Neun-Organismen-Modell erstellt und mit experimentellen Daten einer Anreicherungskultur auf Glukose-/Cellulosemedium verglichen.

Dieses Modell deckt einen größeren Teil des Biogasprozesses ab, als die vorhergehenden Modelle, bei denen Ethanol das Ausgangssubstrat bildete.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit (Kapitel 5) werden Schlussfolgerungen zu den beschriebenen Simulationen dargelegt und ein Ausblick für weitere mögliche Ergänzungen und Untersuchungen gegeben.

Wesentliche Resultate dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Koch, S; Benndorf, D; Fronk, K; Reichl, U; Klamt, S (2016): Predicting compositions of microbial communities from stoichiometric models with applications for the biogas process. In: *Biotechnology for biofuels* 9, S. 17.

Koch S, Kohrs F, Lahmann P, Bissinger T, Wendschuh S, Benndorf D, Reichl U, Klamt S (2019) RedCom: A strategy for reduced metabolic modeling of complex microbial communities and its application for analyzing experimental datasets from anaerobic digestion. *PLoS Computational Biology* 15(2): e1006759.

Weinrich, S; Koch, S; Bonk, F; Popp, D; Benndorf, D; Klamt, S; Centler, F (2019): Augmenting Biogas Process Modeling by Resolving Intracellular Metabolic Activity. In: *Front. Microbiol.* 10, S. 973.

Auf eine Zitierung dieser Artikel wird im Folgenden verzichtet.

2. Biologische und theoretische Grundlagen

2.1. Mikrobielle Gemeinschaften

Mikroorganismen kommen natürlicherweise fast ausschließlich in mikrobiellen Gemeinschaften vor. Dabei kommt es häufig zu einer Verteilung metabolischer Funktionen auf verschiedene Mikroorganismen, was zu gegenseitigen Abhängigkeiten führt. Der anaerobe Abbau von Biomasse oder Cellulose ist für einen einzelnen Organismus im Gegensatz zu einer mikrobiellen Gemeinschaft unmöglich, da er für die gleiche metabolische Funktionalität deutlich mehr Enzyme produzieren müsste, was die Kapazität der Zelle übersteigt.

Zwischen den verschiedenen Mikroorganismen gibt es unterschiedliche Arten von Interaktionen, die sich jeweils positiv, negativ oder neutral auf die einzelnen Organismen auswirken können [21, 22]. Beispiele sind Konkurrenz (negativ für beide Partner), Mutualismus (positiv für beide Partner) Kommensalismus (positiv für einen, neutral für den anderen Organismus) und Parasitismus (positiv für einen, negativ für den anderen Organismus). Interaktionen können durch den Austausch von Metaboliten, Konkurrenz um Substrate oder durch die Ausscheidung von antibiotischen Substanzen erfolgen. Oft kommt es auch zu gegenseitigen Abhängigkeiten einzelner Gruppen von Organismen, die dazu führen, dass die Organismen nicht allein, sondern nur in einer Gemeinschaft mit anderen Organismen wachsen können. Ein spezielles Beispiel einer besonders engen gegenseitigen Abhängigkeit ist die Syntrophie [23, 24, 25]. Bei Syntrophie ist der Abbau eines bestimmten Substrates unter Standardbedingungen energetisch ungünstig und kann nur erfolgen, wenn das entstehende Produkt, z.B. Wasserstoff, von einem zweiten Organismus als Substrat genutzt wird. Durch die Verwertung des entstehenden Produktes wird dessen Konzentration gering gehalten, wodurch der Abbau des ersten Substrats mit Energiegewinn thermodynamisch ermöglicht wird [24]. Der zweite Organismus ist auf das Produkt des ersten Organismus angewiesen, da er dessen Substrat nicht selbst verwerten kann.

Mikrobielle Gemeinschaften sind in zahlreichen Prozessen wie zum Beispiel in geochemischen Kreisläufen involviert [1, 2, 3] und spielen eine wichtige Rolle in der Medizin und in technischen Anwendungen. In der Medizin wird insbesondere das menschliche Mikrobiom ausgiebig untersucht und mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht [4, 5, 6, 26]. Mikrobielle Gemeinschaften werden zudem in der Lebensmittelindustrie, bei der mikrobiologischen Sanierung [8], bei der Abwasseraufbereitung in Kläranlagen [9] und bei der Produktion von Biogas [27] genutzt. Häufig bilden sie Biofilme, die oft eine Antibiotikaresistenz aufweisen und durch die resultierende hohe Persistenz zu Problemen in der Hygiene beispielsweise bei der Lebensmittelproduktion [7] und zu Biofouling [28] führen können. Aus diesen Gründen sind mikrobielle Gemeinschaften von zentraler Bedeutung für den Menschen und verschiedene experimentelle und theoretische Methoden wurden für die Untersuchung etabliert. Zentrale Fragestellungen liegen in der Zusammensetzung der Gemeinschaft (Welche Organismen sind vorhanden?), der Funktion der Organismen (Was tun sie?), sowie den Interaktionen zwischen den Organismen.

Unter den experimentellen Methoden gibt es Ansätze, die auf den Genomen [29], Transkriptomen oder Proteomen [12] der mikrobiellen Gemeinschaften beruhen. Bei genombasierten Ansätzen werden die vorhandenen Gene untersucht und verschiedenen Organismen oder Organismengruppen zugeordnet. Zu den genombasierten Ansätzen zählen beispielsweise die Analyse terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen der für die 16s-RNA codierenden DNA oder Fluorescence in situ Hybridisierung [30, 10]. Da das Genom jedoch keine Auskunft darüber gibt, welche Gene exprimiert werden, können nur indirekt Rückschlüsse zur Funktion gezogen werden. Die Analyse von Transkriptom- und Proteomdaten [31, 32, 33] ist dagegen auf die Funktionalität der Gemeinschaft ausgelegt, da hier die exprimierten Gene analysiert werden. Desweiteren werden Metabolomics [34] Methoden eingesetzt, um die verschiedenen Metabolite, die Aufschluss über den Stoffaustausch zwischen den Organismen geben können, in der Kultur zu untersuchen [35, 11]. Isotopenanalysen ermöglichen die Verfolgung verschiedener Stoffflüsse in der Gemeinschaft [36]. Da mikrobielle Gemeinschaften in der Regel eine hohe Komplexität aufweisen, werden teilweise auch gezielt definierte Mischkulturen untersucht, die eine geringere Anzahl an verschiedenen Organismen beinhalten [37].

Neben experimentellen Methoden werden vermehrt auch Methoden aus der mathematischen Modellierung angewendet. Die entsprechenden Ansätze werden in Abschnitt 2.3 beschrieben.

2.2. Biogasprozess

Biogas ist ein Gasgemisch, das hauptsächlich aus Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Methan (CH_4) besteht. Weitere Bestandteile sind Wasserdampf und kleine Mengen an Schwefelwasserstoff, Ammoniak, Siloxanen und Stickstoff. Biogas wird als erneuerbare Energiequelle genutzt und entsteht durch den anaeroben Abbau von organischen Substraten, wie beispielsweise Maissilage oder Abfälle [38]. In den vergangenen Jahren haben erneuerbare Energiequellen wie Wind- und Solarenergie und Energien aus Biomasse zunehmend an Bedeutung gewonnen [39]. Biogas wird auch in natürlichen Abbauprozessen z.B. in Süßwassersedimenten, Sumpfbereichen, Reisfeldern sowie in den Mägen von Wiederkäuern produziert [40].

Im mehrstufigen Prozess der Biogasbildung werden organische Polymere unter Ausschluss von Sauerstoff schrittweise abgebaut und zu Biogas umgesetzt [41, 24]. Eine Übersicht des Prozesses ist in Abbildung 2 dargestellt. In der ersten Stufe des Biogasprozesses, der Hydrolyse, werden große organische Moleküle wie Fette, Nukleinsäuren, Proteine und Kohlenhydrate durch hydrolytische Enzyme in kleinere Bestandteile wie Zucker, Fettsäuren und Aminosäuren gespalten. In der darauffolgenden säurebildenden Phase, der Acidogenese, auch primäre Gärung genannt, werden diese weiter zu kurzkettigen organischen Säuren und Alkoholen abgebaut. Längerkettige organische Säuren wie Buttersäure und Propionsäure, sowie Alkohole werden in der Acetogenese, auch sekundäre Gärung genannt, weiter zu Essigsäure (Acetat) abgebaut. Während der Acidogenese und der Acetogenese entstehen neben den genannten Produkten

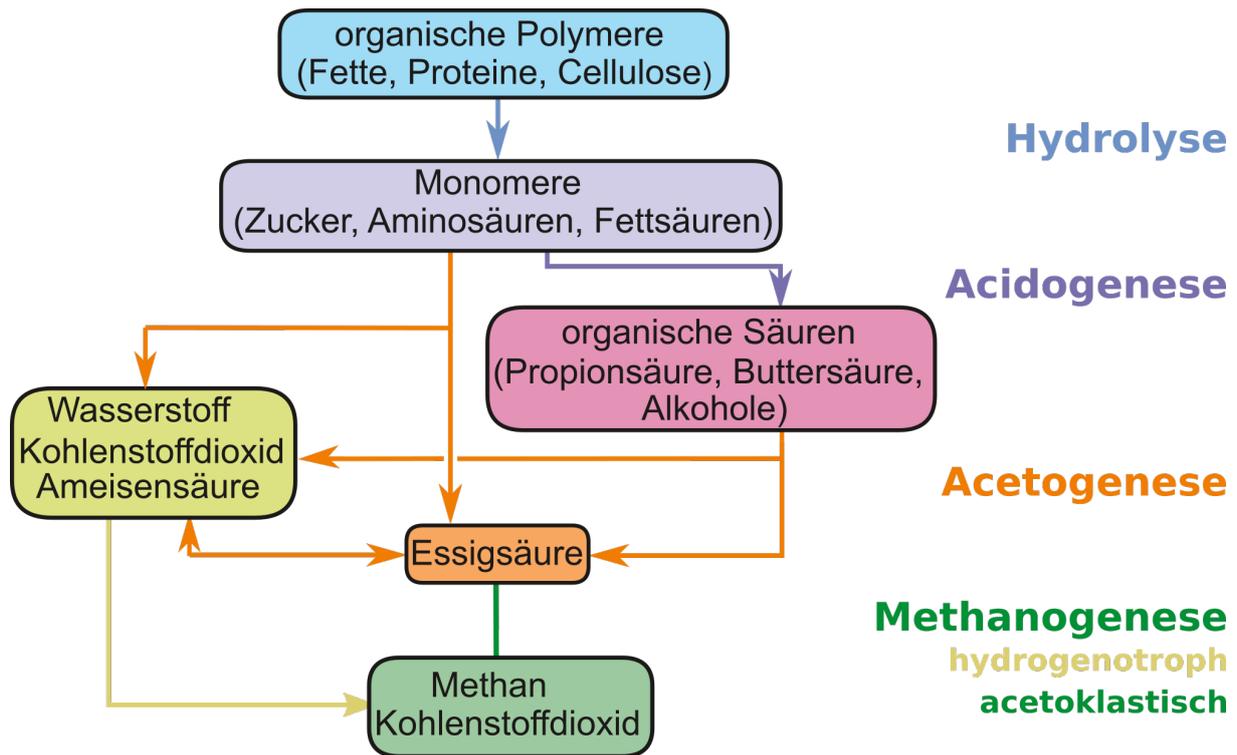


Abbildung 2: Übersichtsschema des Biogasprozesses mit Zuordnung der verschiedenen Stufen. Die verschiedenen Substrate und Produkte der einzelnen Stufen sind in Boxen abgebildet und die Farben der Pfeile entsprechen jeweils einer Stufe im Prozess.

auch Wasserstoff (H_2) und CO_2 . Im letzten Schritt, der Methanogenese werden CH_4 und CO_2 gebildet. Als Substrate dienen dabei hauptsächlich Essigsäure (acetoklastische Methanogenese) und Ameisensäure (Formiat) oder H_2 und CO_2 (hydrogenotrophe Methanogenese). Je nach Prozessbedingungen gibt es weiterhin Abbauewege, bei denen Essigsäure zu Wasserstoff und CO_2 umgesetzt (syntrophe Acetatoxidation) oder Wasserstoff und CO_2 zu Essigsäure umgewandelt werden (Homoacetogenese). Eine Zusammenfassung des Prozesses mit den verschiedenen Abbaustufen, sowie über einzelne Organismengruppen und deren Abbauewege sind unter anderen in den Reviews [41] und [40] zu finden.

Am Prozess der Biogasbildung sind verschiedene Gruppen von Mikroorganismen beteiligt. In der Hydrolyse sind Organismen, die hydrolytische Enzyme produzieren, aktiv. Hierzu zählen unter anderem Clostridien. Diese Organismen sind in der Regel gleichzeitig primäre Gärer, die die entstandenen Monomere weiter verwerten. Organismen der Acidogenese sind vorrangig primäre Gärer. Diese Gruppe an Mikroorganismen beinhaltet auch Organismen, die keine hydrolytischen Enzyme produzieren und somit von den hydrolytischen Mikroorganismen profitieren. Zu den primären Gärern zählen beispielsweise Propionsäuregärer (z.B. *Propionibacterium* oder *Pelobacter*) und Buttersäuregärer (z.B. *Clostridium*). Sekundäre Gärer der Gattungen *Syntrophomonas* und *Syntrophobacter* verwerten die organischen Säuren zu Essigsäure, H_2 und CO_2 weiter. An der Acetogenese sind zudem homoacetogene Organismen (z.B. *Acetobacterium*), die

weitere organische Substrate sowie CO_2 mit H_2 zu Acetat reduzieren können, beteiligt. Bei den methanogenen Organismen handelt es sich ausschließlich um Archaeen. Es gibt Archaeen, die ausschließlich Ameisensäure oder H_2 und CO_2 (hydrogenotroph) verwerten können (z.B. *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum*) und solche, die Essigsäure (acetoklastisch) als Substrat nutzen (z.B. *Methanosaeta*). Organismen der Gattung *Methanosarcina* haben ein breites Substratspektrum und können sowohl den hydrogenotrophen (aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$) als auch den acetoklastischen (aus Acetat) Weg der Methanogenese nutzen.

Durch die Beteiligung mehrerer Organismen am Prozess besteht das Problem, dass die Organismen unterschiedliche optimale Wachstumsbedingungen und Ansprüche haben. Deshalb sind die gewählten Bedingungen im Prozess ein Kompromiss, bei dem schon kleine Abweichungen zur Hemmung oder zum Absterben einzelner Organismengruppen führen können. In Biogasanlagen kann dies zu Prozessstörungen führen, beispielsweise wenn die Prozessbedingungen geändert werden. Eine mögliche Ursache liegt in einer zu langsamen Anpassung der Organismen an die neuen Bedingungen (z.B. ein anderes Substrat). Wenn z.B. die ersten Phasen des Prozesses zu schnell ablaufen, sinkt der pH-Wert im Reaktor durch die Anreicherung organischer Säuren. Die methanogenen Organismen können die Säuren nicht schnell genug abbauen und werden zusätzlich durch den niedrigeren pH-Wert gehemmt, sodass es zum Erliegen der Methanogenese und schließlich des gesamten Prozesses kommen kann [41].

2.3. Modellierungsansätze für den Biogasprozess und für mikrobielle Gemeinschaften

Ein häufig für die Simulation des Biogasprozesses genutztes Modell ist das anaerobic digestion model 1 (ADM1) [42]. Es handelt sich hierbei um ein dynamisches Modell, das verschiedene Prozessparameter wie pH-Wert, Substrat- und Produktkonzentrationen berücksichtigt. Die Mikroorganismen werden dabei in Gruppen zusammengefasst und jeweils durch eine Differenzialgleichung abgebildet. Es erfolgt hierbei keine hohe Auflösung im Stoffwechsel, da die einzelnen Organismengruppen nur über Ausbeutefaktoren dargestellt werden und keinerlei Flexibilität im Stoffwechsel berücksichtigt wird.

Zudem wurden neuronale Netze für die Vorhersage des Methangehalt in Biogas genutzt [16]. Dabei werden verschiedene Einflussparameter wie die Substratzusammensetzung, pH-Wert und Temperatur als Eingang genutzt. Dem Modell werden Daten für die Eingangsparameter und das zugehörige Ergebnis (z.B. Biogaszusammensetzung und Produktionsrate) übergeben. Anhand dieser Daten „lernt“ das Modell, sodass später für andere Eingangsdaten die Ausgangsergebnisse vorhergesagt werden können. Bei dieser Art von Modell ist der Erfolg stark von den gegebenen Daten abhängig. Um beispielsweise auch Prozessstörungen vorherzusagen, sind auch Daten für solche Prozessstörungen notwendig. Die zugrundeliegenden Prozesse werden in diesen Modellen nicht betrachtet und analysiert. Für Vorhersagen im Betrieb von Biogasanlagen können sie dennoch sinnvoll sein.

Bei den oben genannten Ansätzen liegt der Fokus auf dem Gesamtprozess der Biogasbildung. Die zugrundeliegende mikrobielle Gemeinschaft wird dabei nicht im Detail untersucht. Um den Stoffwechsel einzelner Organismen zu betrachten und die Interaktionen der Organismen einer Gemeinschaft zu Modellieren werden häufig stöchiometrische metabolische Netzwerke verwendet. Der Fokus liegt hierbei auf metabolischen Interaktionen, aktiven Stoffwechselwegen, gegenseitigen Abhängigkeiten, der Struktur und Zusammensetzung der Gemeinschaft.

Stolyar et al. [43] nutzten als erste stöchiometrische metabolische Netzwerke, um eine syntrophe mikrobielle Gemeinschaft zu modellieren. Hierbei wurde ein Ansatz gewählt, bei dem jeder Organismus ein Kompartiment im Modell bildet. Mithilfe des Modells wurden die metabolischen Flüsse, insbesondere der Austausch von Wasserstoff und Formiat, zwischen den Organismen untersucht. Als Zielfunktion wurde eine Maximierung der Biomasseproduktion angenommen. In einer Studie von Taffs et al. [44] wurde neben dem kompartimentierten Ansatz wie bei Stolyar et al. zwei weitere Ansätze untersucht. Beim Ansatz des Superorganismus wurden alle Reaktionen aller Organismen in einem einzelnen Modell vereint [44]. Die Modelle wiesen eine geringere Komplexität auf, überschätzten im Vergleich zum Kompartimentmodell jedoch die Fähigkeit der Biomasseproduktion der Organismen. Zudem lassen sich Interaktionen zwischen den Organismen sowie die Zusammensetzung der Gemeinschaft nicht vorhersagen [44]. In einem dritten Ansatz wurden aus den Einzelmodellen Lösungen von Elementarmoden ausgewählt, die einem Optimalitätskriterium wie der optimalen ATP- oder Biomasseausbeute entsprachen, und anschließend deren Nettoumsätze als Reaktionen für eine zweite Runde von Elementarmodenberechnung genutzt. Ein Vorteil hierbei ist, dass nur Lösungen von Interesse für die Elementarmodenberechnung des Gemeinschaftsmodells verwendet werden. Auf der anderen Seite ist Vorwissen wichtig und die Ergebnisse unterscheiden sich je nach Auswahl der Elementarmoden. Da Elementarmoden inhomogene Flussgrenzen nicht berücksichtigen gehen diese Informationen bei diesem Modelltyp verloren. Metabolische stöchiometrische Netzwerke, die auf einem kompartimentierten Ansatz beruhen wurden in verschiedenen Studien verwendet, um beispielsweise syntrophe Gemeinschaften für die Produktion von 1,-3-Propandiol [45], mikrobielle Darmgemeinschaften [46] und deren Interaktionen mit dem Wirt [47] zu simulieren.

Generell besteht eine grundlegende Frage in der Modellierung von mikrobiellen Gemeinschaften darin, welche Zielfunktion zur Beschreibung der Gemeinschaft geeignet ist. Zomorodi et al. [48] entwickelten die OptCom-Methode, bei der mithilfe eines inneren (z.B. Maximierung der Biomasseproduktion der einzelnen Organismen) und äußeren (z.B. Gesamtbiomasseproduktion) Optimierungsproblem untersucht wird, wie sich das Wachstum eines einzelnen Organismus auf die Biomasseproduktion der Gemeinschaft auswirkt. Später wurde die Methode auf einen dynamischen Ansatz, d-OptCom [49], bei dem auch zeitliche Entwicklungen betrachtet werden können, erweitert. Budinich et al. [50] nutzten eine Multi-Flussoptimierung („mult-objective flux balance analysis“), um Pareto-optimale Lösungen, die einen Kompromiss der optimalen Lösungen zweier Optimierungsfunktionen darstellen (da in der Regel nicht alle Optima gleichzeitig realisiert werden können), zu finden.

Eine Grundannahme in stöchiometrischen metabolischen Netzwerken ist häufig ein internes Fließgleichgewicht [51]. Die oben genannten Studien gingen nicht explizit davon aus, dass sich die Gemeinschaft in einem Gleichgewicht befindet, in dem notwendigerweise alle Organismen mit gleicher Wachstumsrate wachsen. Das Konzept des ausbalancierten Wachstums („balanced growth“) wurde von Khandelwal et al. [52] eingeführt und von anderen Studien aufgegriffen [53]. Die Grundannahme des ausbalancierten Wachstums mit gleichschnellem Wachstum aller Organismen ist Voraussetzung für eine stabile Gemeinschaft, in der die Anteile der einzelnen Organismen konstant bleiben. Wenn ein Organismus dauerhaft schneller als alle anderen wächst, wird er die übrigen Organismen verdrängen, was zu einer Veränderung der Zusammensetzung führt. Zudem ist es für eine korrekte Abbildung der spezifischen Flussgrenzen notwendig, die Biomasseanteile der einzelnen Organismen zu kennen [52]. Die formale Beschreibung des balanced growth in stöchiometrischen Modellen wird in Abschnitt 2.4.5 detailliert beschrieben.

Ein erweiterter Ansatz zur stöchiometrischen Netzwerkanalyse basiert auf dynamischen Flussanalysen. Zhuang et al. [54] kombinierten beispielsweise Modelle mikrobieller Gemeinschaften mit Methoden aus der dynamischen Flussanalyse um das Konkurrenzverhalten verschiedener Organismen in Abhängigkeit von Substratkonzentrationen abzubilden. Hierbei wird mithilfe einer Aufnahmekinetik (z.B. Michaelis-Menten) eine obere Grenze für die Substrataufnahmeraten ermittelt, die von den Metabolitkonzentrationen abhängig sind. Anschließend folgt eine Flussoptimierung, bei der die Wachstumsraten maximiert werden. Anhand zugehöriger Substrataufnahme- und Produktbildungsraten werden daraus neue Konzentrationen an Biomasse und Metaboliten für den nächsten Zeitschritt berechnet. Ein Vorteil der Methode ist, dass sich der zeitliche Verlauf abbilden lässt. Allerdings besteht häufig die Problematik, dass es verschiedene Lösungen bei der Flussoptimierung gibt, die das Optimalitätskriterium erfüllen und die Lösungen deshalb in der Regel nicht eindeutig sind. Zusätzlich zur dynamischen Flussanalyse, bezogen Harcombe et al. [55] Diffusion in die Modelle ein, um neben dem zeitlichen Verlauf auch die örtliche Verteilung in mikrobiellen Ökosystemen abzubilden. Eine weitere Studie, in der Informationen zu örtlichen und zeitlichen Verteilungen abgebildet werden, ist die Studie von Bauer et al. [56]. In dem als BacArena bezeichneten multiskalen Ansatz werden stöchiometrische Modelle mit indiviuenbasierten Modellen kombiniert.

Stöchiometrische metabolische Modelle enthalten in der Regel keine thermodynamischen Informationen über die biochemischen Reaktionen. Eine Ausnahme bildet die Reversibilität von Reaktionen, die in den Modellen berücksichtigt wird. Konzentrationen von Metaboliten sind jedoch ausschlaggebend dafür, ob eine Reaktion oder Reaktionsabfolge tatsächlich ablaufen kann. Hamilton et al. erstellten ein Zwei-Spezies-Modell, welches um thermodynamische Informationen für die bessere Abbildung der syntrophen Gemeinschaft erweitert wurde [57].

Neben Methoden, mit denen verschiedene bestehende mikrobielle Gemeinschaften abgebildet und analysiert werden können, gibt es weitere stöchiometrische Ansätze, die gezielt dem Design von mikrobiellen Gemeinschaften oder deren Interaktionen dienen. Chiu et al. [58] entwickel-

ten beispielsweise einen Ansatz, mit dem Gemeinschaften gefunden werden, die zusätzliche metabolische Funktionen (z.B. Bildung eines bestimmten Produktes) aufweisen, die keiner der involvierten Organismen allein aufweist. Zampieri et al. [59] entwickelten einen Algorithmus zur optimalen Auswahl eines Mediums, welches die Kosten für Crossfeeding minimiert und gleichzeitig die Abhängigkeit der Organismen voneinander erhält. Ein weiterer Ansatz beinhaltet einen Algorithmus um entweder neue Gemeinschaften für die Produktion eines bestimmten Produktes zu finden oder zu verbessern [60]. Im OptAux Ansatz [61] werden knock-out-Strategien berechnet, die zu einer Auxotrophie in den Organismen führen. Bei Auxotrophie kann der Organismus nur durch Zuführen eines bestimmten Metabolits (z.B. eine Aminosäure) wachsen, da die Bildung des entsprechenden Metabolits ausgeschaltet ist. Eine Mischkultur aus verschiedenen auxotrophen Stämmen wird durch passagenweise Kultivierung adaptiert. Hierbei bilden sich Interaktionen zwischen den Organismen aus, die das Wachstum fördern [61]. Die adaptierte Gemeinschaft kann anschließend analysiert werden, um die Mechanismen der Kooperation zwischen den Organismen besser zu verstehen.

2.4. Stöchiometrische Analyse von metabolischen Netzen

Metabolische Netzwerke bestehen aus (m) Metaboliten und (q) biochemischen Reaktionen, die verschiedene Metabolite ineinander umwandeln können. Die Struktur des Netzwerkes wird in der stöchiometrischen Matrix \mathbf{N} gespeichert. \mathbf{N} ist eine $m \times q$ Matrix, die spaltenweise die Reaktionen und zeilenweise die verschiedenen Metabolite enthält. Stöchiometrische Koeffizienten geben dabei den Verbrauch (negatives Vorzeichen) und die Produktion (positives Vorzeichen) der einzelnen Metabolite in den verschiedenen Reaktionen wieder. Eine Grundannahme der stöchiometrischen Netzwerkanalyse ist das Fließgleichgewicht, bei dem interne Metabolite weder akkumulieren noch verbraucht werden können [51, 62]:

$$\mathbf{N}\mathbf{r} = \mathbf{0}. \quad (1)$$

Der Vektor \mathbf{r} ist der Reaktionsratenvektor. Weiterhin können Informationen zur Reversibilität der Reaktionen (2), sowie bekannte obere und untere Grenzen (z.B. Grenzen für die Substrataufnahmerate oder den Erhaltungskoeffizienten) (3) berücksichtigt werden:

$$r_i \geq 0 \quad \forall i \in Irrev \quad (2)$$

$$\alpha_i \leq r_i \leq \beta_i. \quad (3)$$

Zusätzlich können optional weitere inhomogene Nebenbedingungen einbezogen werden:

$$\mathbf{A}\mathbf{r} \leq \mathbf{b}. \quad (4)$$

Diese Art der Modellierung wird auch als constraint-based Modelling (CBM) bezeichnet, da die Gleichungen (1) und Ungleichungen (2)-(4) als Nebenbedingungen (englisch: constraints) für den Raum der möglichen Flussverteilungen im Netzwerk aufgefasst werden.

2.4.1. Flussanalyse und Flussvariabilitätsanalyse

Als Flussanalyse (Flux Balance Analysis) verstehen wir hier die Optimierung einer linearen Zielfunktion über die metabolischen Flüsse unter Beachtung der Bedingungen (1)-(4):

$$\begin{array}{ll} \max & \mathbf{c}^T \mathbf{r}. \\ \text{u.d.N.} & (1), (2), (3), (4) \end{array} \quad (5)$$

Hierbei ist \mathbf{c} der Vektor, der die Koeffizienten der Zielfunktion enthält. Häufig verwendete Zielfunktionen sind die Maximierung von Wachstumsraten (biologisch relevant) oder Produktionsraten. Damit lassen sich aus allen möglichen Flussverteilungen biologisch und technisch besonders relevante Flussverteilungen ermitteln.

Ein Sonderfall der Flussoptimierung ist die Flussvariabilitätsanalyse bei der nacheinander alle Reaktionsraten mit Hilfe der Flussoptimierung minimiert und maximiert werden. Dadurch kann die Variabilität der Raten unter den vorgegebenen Bedingungen ermittelt werden.

2.4.2. Ausbeutenoptimierung

Mit der Flussanalyse werden Raten optimiert. Häufig sind in Prozessen jedoch auch verschiedene Ausbeuten (z.B. Produktausbeute) von Interesse. Zudem wird davon ausgegangen, dass es auch bei Mikroorganismen unterschiedliche Wachstumsstrategien gibt. Einige Organismen wachsen sehr schnell (Optimierung der Wachstumsrate), haben aber geringere Biomasseausbeuten. Andere Organismen wachsen mit hoher Biomasseausbeute (Ausbeuteoptimierung) und langsamerer Wachstumsrate. Die unterschiedlichen Strategien können bei verschiedenen Umgebungsbedingungen Vor- und Nachteile haben [63]. Ein schnelles Wachstum der Organismen ist bei einem Substratüberschuss von Vorteil. Die Organismen wachsen schneller als ihre Konkurrenten und können dadurch einen Vorteil erlangen. Unter Bedingungen, bei denen ein Substratmangel herrscht haben dagegen Organismen, die ihr Substrat mit hoher Biomasseausbeute nutzen, einen Vorteil, da sie aus den geringen Mengen an Substrat, das verfügbar ist, viel Biomasse produzieren können.

Aus diesem Grund ist bei der Flussanalyse grundsätzlich nicht nur die Flussoptimierung sondern auch die Ausbeuteoptimierung relevant. In Fällen, in denen die Substrataufnahmerate festgelegt wird (z.B. durch experimentell gemessene Raten), stimmen Wachstumsratenoptimierung und Biomasseausbeuteoptimierung in vielen Fällen überein. Wenn die Substrataufnahmerate nicht festgelegt ist, oder zusätzlich weitere Raten im Netzwerk beschränkt sind, stimmen die Ergebnisse im Allgemeinen nicht überein [64].

Die Ausbeuten in einem stöchiometrischen Netzwerk können mit Hilfe von linear-fractionaler Optimierung berechnet werden [64]. Hierbei ist die Zielfunktion der Quotient aus zwei linearen Funktionen:

$$\begin{aligned} & \max && \frac{\mathbf{c}^T \mathbf{r}}{\mathbf{d}^T \mathbf{r}}. \\ & \text{u.d.N.} && \\ & && (1), (2), (3), (4) \end{aligned} \tag{6}$$

Im Zähler stehen dabei im Normalfall einzelne oder Linearkombinationen von Raten gebil-
deter Produkte ($\mathbf{c}^T \mathbf{r}$) während im Nenner einzelne oder Linearkombinationen von Substratraten
($\mathbf{d}^T \mathbf{r}$) stehen. Durch eine Transformation kann das Optimierungsproblem (6) in ein lineares
Optimierungsproblem umgewandelt und dann mit Standardalgorithmen gelöst werden [64].

2.4.3. Elementarmoden und Elementarvektoren

Elementarmoden (EM) sind Flussvektoren, die das Fließgleichgewicht (1) erfüllen und die
Reversibilität der Reaktionen (2) beachten. Zudem sind EM nicht zerlegbar, d. h. sie sind
supportminimal (7) [65]. Für jeden EM \mathbf{e} gilt damit, dass kein Reaktionsratenvektor $\mathbf{r} \neq \mathbf{0}$
existiert, der (1) und (2) erfüllt und für den gilt:

$$\mathbf{S}(\mathbf{r}) \subset \mathbf{S}(\mathbf{e}). \tag{7}$$

Hierbei ist \mathbf{S} der Support eines Vektors und entspricht den Indizes der Einträge ungleich Null:
 $\mathbf{S}(\mathbf{r}) = \{i : r_i \neq 0\}$.

Alle Flussverteilungen, die (1) und (4) genügen, sind im Lösungsraum des Netzwerkes, welcher
einen sogenannten Flusskegel bildet, enthalten. Der Flusskegel kann zudem aus Linearkombina-
tionen der EM generiert werden:

$$F = \left\{ \mathbf{r} \in \mathfrak{R}^q \mid \mathbf{r} = \sum_{i \in I} \alpha_i \mathbf{x}^i + \sum_{j \in J} \beta_j \mathbf{y}^j, \alpha_i \geq 0 \right\}. \tag{8}$$

Hierbei sind \mathbf{x} die irreversiblen EM und \mathbf{y} die reversiblen EM. Ein EM ist reversibel, wenn alle
beteiligten Reaktionen ($r_i \neq 0$) reversibel sind und irreversibel, wenn mindestens eine beteiligte
Reaktion irreversibel ist. EM können für die Analyse des Lösungsraumes genutzt werden [66].
Es lassen sich damit beispielsweise die Ausbeuten für verschiedene Stoffwechselwege bestim-
men, die Wichtigkeit von Reaktionen ableiten, da schnell erkennbar wird, welche Reaktionen
in besonders vielen EM auftreten und welche Reaktionen für eine bestimmte Eigenschaft (z.B.
Wachstum) essentiell sind. Die EM enthalten mehr Informationen und geben ein vollständige-
res Bild über das Stoffwechselnetzwerk als es in der Regel durch Flussanalysen der Fall ist.
Ein Nachteil von EM ist allerdings, dass sie für genomskalige Netzwerke in der Regel nicht
berechenbar sind, da es mit steigender Netzwerkgröße zu einer kombinatorischen Explosion

kommt. Zudem können im Konzept der EM keine inhomogenen Bedingungen wie in (3) und (4) berücksichtigt werden.

Unter Einbeziehung von Nebenbedingungen vom Typ (3) und (4) ergibt der Lösungsraum anstelle eines Flusskegels ein Flusspolyeder P . Das Flusspolyeder kann mit Hilfe von elementaren Flussvektoren (EFV) erzeugt werden [64]:

$$P = \left\{ \mathbf{r} \in \mathfrak{R}^q \mid \mathbf{r} = \sum_{k \in K} \gamma_k \mathbf{p}^k + \sum_{i \in I} \alpha_i \mathbf{x}^i + \sum_{j \in J} \beta_j \mathbf{y}^j, \gamma_k \geq 0, \sum_{k \in K} \gamma_k = 1, \alpha_i \geq 0 \right\}. \quad (9)$$

Dabei sind \mathbf{p} die beschränkten EFVs, die das Flusspolyeder aufspannen. Die reversiblen und irreversiblen unbeschränkten EFVs \mathbf{x} und \mathbf{y} spannen den Rezessionskegel auf der zum Flusspolyeder dazuaddiert wird. Während sich mit dem Konzept der EM der Lösungsraum bezüglich der Ausbeuten untersuchen lässt, kann man mit dem Konzept der EFVs auch Lösungen entsprechend ihrer absoluten Reaktionsraten untersuchen (EM sind im Gegensatz zu EFVs unbeschränkt). EFVs enthalten zudem zusätzliche Informationen, da sich hier beispielsweise der Erhaltungskoeffizient und andere Raten festlegen lassen. Beide Konzepte eignen sich, um den gesamten Lösungsraum und die (relativen) Abhängigkeiten der Raten zueinander zu untersuchen.

2.4.4. Minimal Cut Sets

Ein Cut Set ist eine Menge an Reaktionen, deren (simultane) Deletion eine bestimmte metabolische Funktion unterdrückt [67]. Ein Minimal Cut Sets (MCS) ist ein Cut Set, bei dem jede enthaltene Reaktion entfernt werden muss, um die Unterdrückung der metabolischen Funktion zu garantieren [67, 68].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, MCS zu berechnen. Eine Möglichkeit ist die Berechnung über EM. Hierbei werden in einem ersten Schritt die EM eines Netzwerkes bestimmt. Daraus wird dann ein Set mit sogenannten Targetmoden (Target: engl. Ziel) ausgewählt, die die zu unterdrückende Funktion, beispielsweise Produktion eines bestimmten unerwünschten Produktes, enthalten. Durch die Unzerlegbarkeit von EM ist garantiert, dass bei entfernen einer Reaktion aus einem EM dieser nicht mehr ablaufen kann. Die MCS lassen sich dann mittels des Berge-Algorithmus als Minimal Hitting Sets der EM berechnen [68, 69].

Das Konzept der MCS wurde auf sogenannte constrained Minimal Cut Sets (constrained: engl. für eingeschränkt oder beschränkt) erweitert [70]. Bei MCS werden mitunter Mengen an Reaktionsdeletionen gefunden, die nicht nur das unerwünschte Verhalten unterbinden, sondern dabei zusätzlich gewünschte Funktionen blockieren. Dieses Problem wird mit Hilfe der constrained MCS gelöst [70]. Hier wird neben den Targetmoden eine weitere Menge von geschützten EM definiert, die eine gewünschte Funktion beschreibt. Dann wird festgelegt, wie viele der zu schützenden EM mindestens intakt bleiben sollen. Auf diese Weise können MCS bestimmt werden,

die beispielsweise Lösungen mit kleinen Produktausbeuten entfernen, gleichzeitig aber eine Mindestmenge an Biomasseproduktion ermöglichen.

Ähnlich wie bei EM steigt auch die Anzahl der MCS mit zunehmender Komplexität der Netzwerke. Zusätzlich war die Berechnung der MCS ursprünglich nur für Netzwerke möglich, in denen auch die EM berechnet werden konnten. Ballerstein et al. [71] entwickelten einen Ansatz für die direkte Berechnung von MCS ohne die vorherige EM-Berechnung. Dabei machten sie sich die Dualität zwischen EM und MCS zunutze [68, 71]. MCS sind EM eines dualen Netzwerkes und können als solche berechnet werden.

Insgesamt liefert die MCS-Berechnung häufig eine Vielzahl möglicher Interventionen um eine bestimmte Funktionalität im Netzwerk zu unterdrücken. Für die Auswahl geeigneter MCS werden verschiedene Aspekte betrachtet. Zum einen ist es in der Regel günstig, wenn das MCS klein ist, d.h. eine geringe Anzahl an Veränderungen notwendig ist. Desweiteren sind nicht alle Ziele geeignet, da sich nicht jede Reaktion ausschalten lässt. Weiterhin ist es vorteilhaft, wenn die Interventionen einen geringen Einfluss auf andere Funktionen haben.

2.4.5. Konstruktion und Struktur stöchiometrischer Modelle von mikrobiellen Gemeinschaften

Die Methoden der stöchiometrischen Netzwerkanalyse wurden, wie in Abschnitt 2.3 erwähnt, in den letzten Jahren von Einzelorganismen auf mikrobielle Gemeinschaften erweitert. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf kompartimentierten Modellen mit ausbalanciertem Wachstum (siehe Abschnitt 2.3).

In einem kompartimentierten Gemeinschaftsmodell werden alle Reaktionsgleichungen und Metabolite der Einzelmodelle im Gemeinschaftsmodell zusammengefügt (Abbildung 3). Da die Reaktionen und Metabolite der Einzelmodelle vollständig übernommen werden, wird diese Art von Gemeinschaftsmodellen im Folgenden auch als vollständige Modelle bezeichnet. Während die spezifischen Raten der Einzelmodelle auf die Biomasse des jeweiligen Organismus bezogen sind (Einheit: [mmol/g_{TM_i}/h]), ist die Bezugsgröße im Gemeinschaftsmodell die Gesamtbiomasse der Gemeinschaft (Einheit: [mmol/g_{TM_c}/h]). Die Metabolite haben eine für das jeweilige Kompartiment spezifische Endung, sodass sie nicht direkt zwischen den einzelnen Organismen und mit der Umgebung ausgetauscht werden können und die Kompartimentierung erhalten bleibt. Ein weiteres Kompartiment, das sogenannte Austauschkompartiment, dient dem Austausch von Metaboliten (Substrate und Produkte) zwischen den Organismen. Wie in den Einzelmodellen wird auch im Gemeinschaftsmodell von einem Fließgleichgewicht ausgegangen:

$$\mathbf{N}^c \mathbf{r}^c = \mathbf{0}. \quad (10)$$

\mathbf{N}^c ist die stöchiometrische Matrix des Gemeinschaftsmodells und \mathbf{r}^c der Reaktionsratenvektor im Gemeinschaftsmodell. Wenn sich die Gemeinschaft in einem Gleichgewicht befindet, sind

auch die Wachstumsraten aller Organismen gleich:

$$\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n = \mu_c. \quad (11)$$

Die Wachstumsrate, mit der alle n Organismen wachsen, wird als Gemeinschaftswachstumsrate μ_c bezeichnet. Während die Organismen gleich schnell wachsen, können sie unterschiedliche Anteile an der Gesamtbiomasse ausmachen. Der Anteil F_i eines Organismus i an der Gesamtbio- masse ist definiert als das Verhältnis der Biomasse des Organismus und der Gesamtbio- masse:

$$F_i = \frac{BM_i}{BM_c}. \quad (12)$$

Alle F_i ergeben zusammen die Komposition $\mathbf{F} = (F_1, \dots, F_n)$ der mikrobiellen Gemeinschaft. Die Summe aller F_i ergibt immer Eins:

$$\sum_{i=1}^n F_i = 1. \quad (13)$$

Im Fließgleichgewicht kann (für $\mu_c > 0$) F_i auch als Verhältnis der Biomasseproduktion r_{BMi} von Organismus i und der Gesamtbio- masseproduktion dargestellt werden (siehe auch Abbildung 3):

$$F_i = \frac{r_{BMi}}{\mu_c}. \quad (14)$$

Daraus ergibt sich für jeden Organismus die Bedingung:

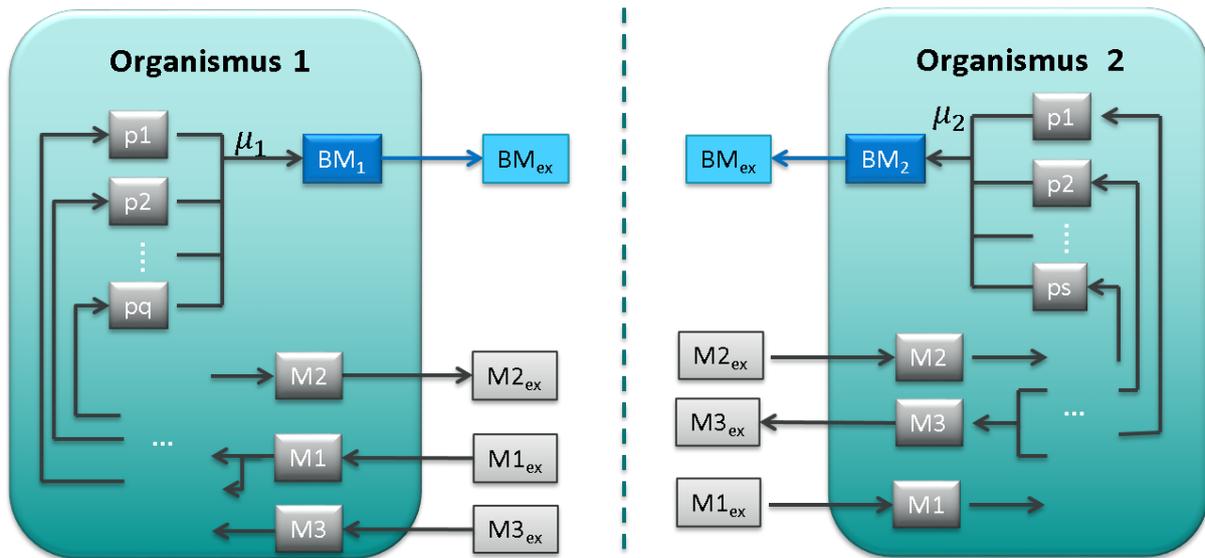
$$r_{BMi} = F_i \mu_c = \tilde{\mu}_i. \quad (15)$$

Im Einzelmodell ist die Biomasseproduktionsrate gleichbedeutend mit der spezifischen Wachs- tumsrate μ . Durch die unterschiedlichen Bezugsbiomassen zwischen Einzelmodell und Gemein- schaftmodell entspricht die spezifische Biomasseproduktionsrate im Gemeinschaftsmodell nicht mehr der Wachstumsrate des Einzelmodells. Deshalb wird die Rate (die identisch zu r_{BMi} ist) auch als $\tilde{\mu}_i$ bezeichnet (Abbildung 3).

Wie oben erwähnt, haben die Reaktionsraten in den Einzelmodellen die Einheit $mmol/g_{TMi}/h$ und sind somit auf die Biomasse des jeweiligen Organismus bezogen. Im Gemeinschaftsmodell ändert sich die Bezugsbiomasse auf die Biomasse der Gemeinschaft (TMc) und die Einheit der Reaktionsraten ist $mmol/g_{DWc}/h$. Damit die inhomogenen Nebenbedingungen (z.B. Substratauf- nahmegrenze, Erhaltungskoeffizient) der einzelnen Organismen auch im Gemeinschaftsmodell erfüllt sind, muss der Biomasseanteil der Organismen mit einbezogen und die Ratengrenzen entsprechend angepasst werden:

$$F_i \alpha_{ij} \leq r_{ij}^c \leq F_i \beta_{ij}. \quad (16)$$

Einzelmodell



Gemeinschaftsmodell

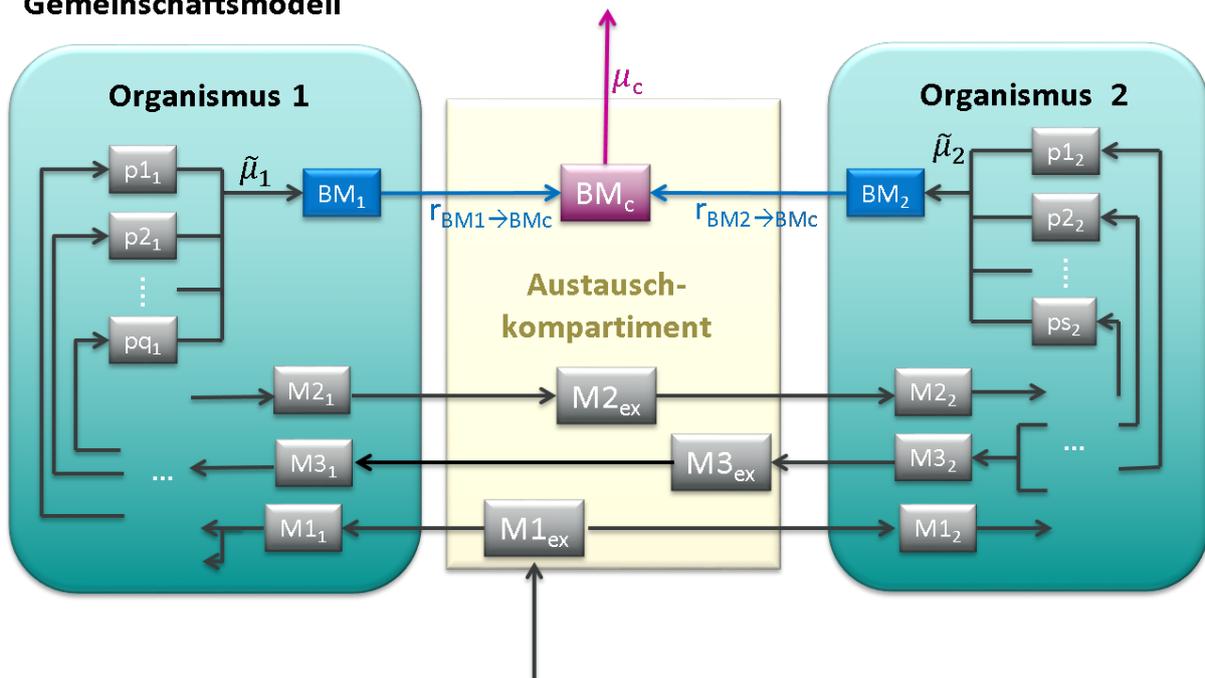


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus von Einzel- und Gemeinschaftsmodell in einem kompartimentierten Ansatz mit ausbalanciertem Wachstum. Jeder Organismus bildet ein Kompartiment des Gemeinschaftsmodells, das eingeführte Austauschkompartiment erlaubt den Metabolitaustausch zwischen den Organismen und verknüpft die Einzelmodelle. Es wird angenommen, dass die Organismen gleichschnell mit der Gemeinschaftswachstumsrate μ_c wachsen. Zu beachten sind zudem unterschiedliche Einheiten der Raten (z.B. μ_1 vs. $\tilde{\mu}_1$), siehe Text.

Hierbei sind α_{ij} und β_{ij} die untere bzw. obere Grenze von Reaktion j in Organismus i im Einzelmodell und r_{ij}^c die Reaktionsrate dieser Reaktion im Gemeinschaftsmodell. Die Reversibilitäten werden aus den Einzelmodellen übernommen und die Ungleichheitsbedingungen werden analog zu den Einzelmodellen unter Einbeziehung der Biomasseanteile berücksichtigt:

$$r_{ij}^c \geq 0 \quad \forall j \in Irrev_i \quad (17)$$

$$\mathbf{A}_i \mathbf{r}_i^c \leq F_i \mathbf{b}_i. \quad (18)$$

Analog zur Flussoptimierung im Einzelmodell kann ein Optimierungsproblem mit linearer Zielfunktion auch im Gemeinschaftsmodell formuliert werden:

$$\begin{aligned} & \max \quad \mathbf{c}^T \mathbf{r}^c. \\ & \text{u.d.N.} \quad (10), (13), (15) - (18) \end{aligned} \quad (19)$$

Durch die Multiplikation der beiden unabhängigen Variablen μ_c und F_i in Gleichung (15) ist das Optimierungsproblem, im Gegensatz zu Einzelmodellen, bilinear. Es kann entweder durch die Anwendung von Lösungsalgorithmen für nichtlineare Optimierung gelöst oder durch Festlegen von \mathbf{F} oder μ_c linearisiert werden.

Eine Herausforderung bei der Analyse mikrobieller Gemeinschaften mittels Flussanalyse stellt die Wahl einer geeigneten Zielfunktion dar. In Einzelmodellen wird häufig die Wachstumsrate oder die Biomasseausbeute des Organismus maximiert, da diese Zielfunktion allgemein als biologisch relevant angesehen wird [72]. Im Gemeinschaftsmodell kann analog dazu die Gemeinschaftswachstumsrate oder die Gesamtbiomasseausbeute maximiert werden. In Abschnitt 4.3.1 werden verschiedene Zielfunktionen für Gemeinschaftsmodelle hinsichtlich ihrer Unterschiede und Ergebnisse untersucht. Wie dort gezeigt wird, liefert die Maximierung der Gesamtbiomasse nicht immer eine biologisch sinnvolle Lösung für ein Konsortium.

Eine weitere Herausforderung ist die Größe und Komplexität der Modelle. Da in der Regel mehrerer Einzelmodelle verknüpft werden, wird die Dimension des Gemeinschaftsmodells stark erhöht und seine Analyse erschwert.

Aufbau eines stöchiometrischen Gemeinschaftsmodells anhand eines Beispiels

Anhand eines Minibeispiels werden im folgenden die Schritte zum Erstellen eines stöchiometrischen Gemeinschaftsmodells mit ausbalanciertem Wachstum und Kompartimentstruktur gezeigt. Als Beispiel dienen drei Netzwerke (N1, N2 und N3; Abbildung 4), die drei verschiedene Organismen in einer mikrobiellen Gemeinschaften symbolisieren. Die angenommenen Flussgrenzen sind in Tabelle 1 und die Interaktionen der Organismen untereinander und mit dem Medium in Abbildung 5 zusammengefasst.

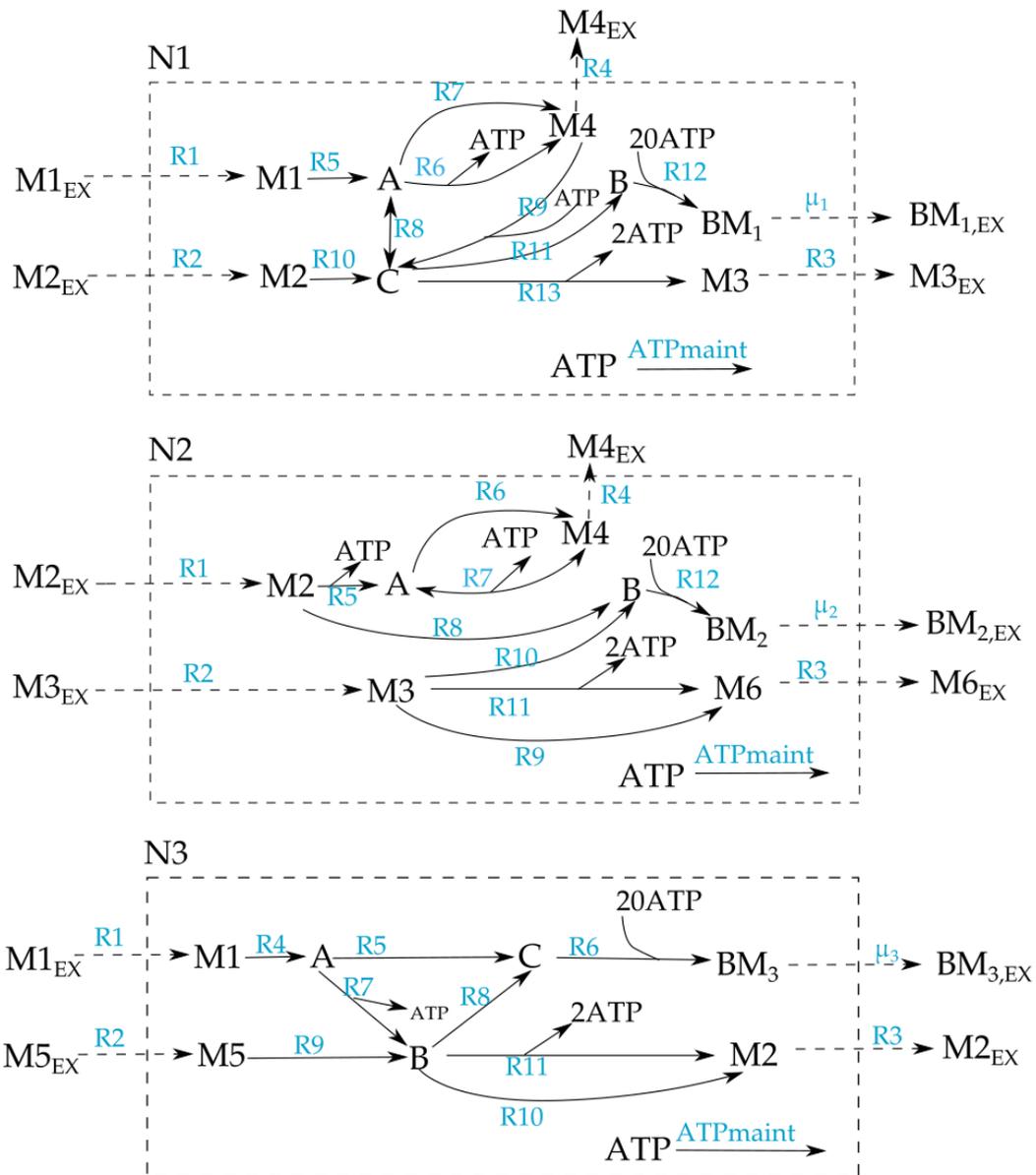


Abbildung 4: Beispielnetzwerke für das Erstellen eines Gemeinschaftsmodells. Die Reaktionen sind als Pfeile und die Zellgrenze als gestrichelte Linie dargestellt. Die Reaktionsnamen sind blau und Metabolitnamen schwarz dargestellt.

Tabelle 1: Flussgrenzen für die Beispielnetzwerke.

N1	N2	N3
$R1 \leq 40 \text{ mmol/g}_{TM}/h$	$R1 \leq 40 \text{ mmol/g}_{TM}/h$	$R3 \leq 50 \text{ mmol/g}_{TM}/h$
$R2 \leq 30 \text{ mmol/g}_{TM}/h$	$R2 \leq 30 \text{ mmol/g}_{TM}/h$	
$R3 \leq 50 \text{ mmol/g}_{TM}/h$		
$ATP_{\text{maint}} \geq 5 \text{ mmol/g}_{TM}/h$	$ATP_{\text{maint}} \geq 2 \text{ mmol/g}_{TM}/h$	$ATP_{\text{maint}} \geq 3 \text{ mmol/g}_{TM}/h$

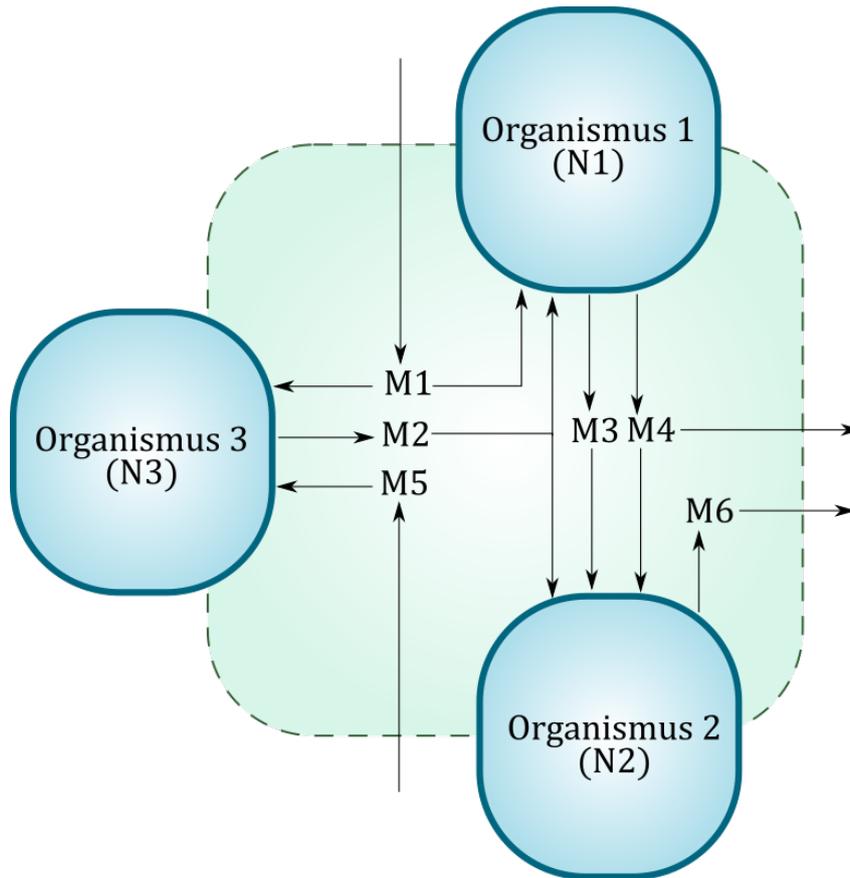


Abbildung 5: Übersichtsschema der Beispielgemeinschaft. Dargestellt ist der Austausch verschiedener Metabolite zwischen den Organismen und mit dem Medium. Das Austauschkompartiment ist grün hinterlegt.

Im ersten Schritt für die Erstellung des bilinearen vollständigen Gemeinschaftsmodells (bvM) werden alle Reaktionsgleichungen und Metabolite der Einzelmodelle in das bvM übernommen. Interne Metabolite werden dabei um organismenspezifische Endungen erweitert, sodass nur ein Austausch bestimmter Metabolite über das Austauschkompartiment ermöglicht wird. Die Reversibilitäten der Reaktionen werden aus den Einzelmodellen übernommen. Alle Metabolite, die als Substrate oder Produkte für die einzelnen Organismen dienen können, sowie die Biomasse selbst, werden in den Einzelmodellen als externe Metabolite definiert. Die stöchiometrischen Matrizen der Einzelmodelle sehen wie folgt aus (der Reaktionsname ATPmaint wird aus Platzgründen als ATPm abgekürzt):

	R1 _{N1}	R2 _{N1}	R3 _{N1}	R4 _{N1}	R5 _{N1}	R6 _{N1}	R7 _{N1}	R8 _{N1}	R9 _{N1}	R10 _{N1}	R11 _{N1}	R12 _{N1}	R13 _{N1}	BMex _{N1}	ATPm _{N1}
A _{N1}	0	0	0	0	1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
B _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0
C _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-1	0	-1	0	0
M1 _{N1}	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M2 _{N1}	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
M3 _{N1}	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
M4 _{N1}	0	0	0	-1	0	1	1	0	-1	0	0	0	0	0	0
ATP _{N1}	0	0	0	0	0	1	0	0	-1	0	0	-20	2	0	-1
BM _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1	0
BM _{N1,EX}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M1 _{EX}	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M2 _{EX}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M3 _{EX}	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M4 _{EX}	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

		R1 _{N2}	R2 _{N2}	R3 _{N2}	R4 _{N2}	R5 _{N2}	R6 _{N2}	R7 _{N2}	R8 _{N2}	R9 _{N2}	R10 _{N2}	R11 _{N2}	R12 _{N2}	BM _{EXN2}	ATP _{mN2}	
N ^{N2} =	A _{N2}	0	0	0	0	1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	
	B _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	-1	0	0	
	M2 _{N2}	1	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	
	M3 _{N2}	0	1	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	0	0	0	
	M4 _{N2}	0	0	0	-1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	M6 _{N2}	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
	ATP _{N2}	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	-20	0	-1
	BM _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0
	BM _{N2,EX}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	M2 _{EX}	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M3 _{EX}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
M4 _{EX}	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
M6 _{EX}	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

		R1 _{N3}	R2 _{N3}	R3 _{N3}	R4 _{N3}	R5 _{N3}	R6 _{N3}	R7 _{N3}	R8 _{N3}	R9 _{N3}	R10 _{N3}	R11 _{N3}	BM _{EXN3}	ATP _{mN3}
N ^{N3} =	A _{N3}	0	0	0	1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
	B _{N3}	0	0	0	0	0	0	1	-1	1	-1	-1	0	0
	C _{N3}	0	0	0	0	1	-1	0	1	0	0	0	0	0
	M1 _{N3}	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M2 _{N3}	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	M5 _{N3}	0	1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
	ATP _{N3}	0	0	0	0	0	-20	1	0	0	0	2	0	-1
	BM _{N3}	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	0
	BM _{N3,EX}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	M1 _{EX}	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M5 _{EX}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
M2 _{EX}	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Hierbei wurden die Bereiche der externen Metabolite grün hinterlegt, da sie später zum Austauschkompartiment gehören, während interne Metabolite mit einer für das Netzwerk spezifischen Farbe (N1: orange, N2: blau, N3: gelb) markiert wurden. Sie bilden im Gemeinschaftsmodell die Kompartimente für die jeweiligen Einzelmodelle ab. Für eine bessere Übersichtlichkeit sind diese Submatrizen im Folgenden als ein farbiges Feld mit der Bezeichnung des jeweiligen Netzwerks dargestellt. Durch das Zusammenfügen der Reaktionsgleichungen und Metabolite ergibt sich folgende stöchiometrische Matrix (zur besseren Darstellbarkeit hier transponiert dargestellt) für das Beispiel:

	BM _{N1EX}	M1 _{EX}	M2 _{EX}	M3 _{EX}	M4 _{EX}	BM _{N2EX}	M2 _{EX}	M3 _{EX}	M4 _{EX}	M6 _{EX}	BM _{N3EX}	M1 _{EX}	M5 _{EX}	M2 _{EX}			
R1 _{N1}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N1 ^T	0	0
R2 _{N1}	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R3 _{N1}	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R4 _{N1}	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R5 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R6 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R7 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R8 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R9 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R10 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R11 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R12 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R13 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM _{EXN1}	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ATP _{mN1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R1 _{N2}	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R2 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	
R3 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
R4 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
R5 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R6 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R7 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R8 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R9 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R10 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R11 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R12 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM _{EXN2}	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ATP _{mN2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R1 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	
R2 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	
R3 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
R4 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R5 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R6 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R7 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R8 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

R9 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R10 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R11 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BMex _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ATPm _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Alle ehemals externen Metabolite werden als interne Metabolite im bvM definiert. Um die Einzelmodelle zu verknüpfen, werden im Folgenden identische Metabolite (aus den ehemals externen Metaboliten) durch Aufsummieren der entsprechenden Zeilen im bvM vereint. Daraus ergibt sich folgende (transponierte) stöchiometrische Matrix:

	M1 _{EX}	M2 _{EX}	M3 _{EX}	M4 _{EX}	M5 _{EX}	M6 _{EX}	BM _{N1EX}	BM _{N2EX}	BM _{N3EX}									
R1 _{N1}	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	N1 ^T	0	0	0	0	0	0	0	
R2 _{N1}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R3 _{N1}	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R4 _{N1}	0	0	0	1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R5 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R6 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R7 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R8 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R9 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R10 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
R11 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R12 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R13 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BMex _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ATPm _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R1 _{N2}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	N2 ^T	0	0	0	0	0	0	
R2 _{N2}	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R3 _{N2}	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R4 _{N2}	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R5 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R6 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R7 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R8 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R9 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R10 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R11 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R12 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BMex _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ATPm _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R1 _{N3}	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N3 ^T	0	0	0	0	0	0	
R2 _{N3}	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R3 _{N3}	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R4 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R5 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R6 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R7 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R8 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R9 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R10 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0
R11 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BMex _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
ATPm _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Anschließend werden drei Reaktionen, die die Biomassen der einzelnen Organismen zu einer Gesamtbio­masse vereinen, sowie eine Reaktion zur Abgabe der Gesamtbio­masse an die Umge­bung, hinzugefügt. Im letzten Schritt werden Quellen und Senken für Metabolite, die als Substrate bzw. Produkte für die Gemeinschaft dienen können eingefügt. Im Beispiel wurden M1 und M5 als potenzielle Substrate und M4 sowie M6 als Produkte, die im Medium akkumulieren können, angenommen (Abbildung 5). Für M1, M2 und M3 wurde eine Akkumulation im Medium ausgeschlossen, wodurch sie bei der metabolischen Aktivität der Organismen wieder abgebaut werden müssen, wenn sie gebildet werden.

Die resultierende transponierte stöchiometrische Matrix sieht wie folgt aus:

	M1 _{EX}	M2 _{EX}	M3 _{EX}	M4 _{EX}	M5 _{EX}	M6 _{EX}	BM _{N1EX}	BM _{N2EX}	BM _{N3EX}	BM _c	N1	N2	N3
R1 _{N1}	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N1 ^T	0	0
R2 _{N1}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R3 _{N1}	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R4 _{N1}	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0
R5 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R6 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R7 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R8 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R9 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R10 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R11 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R12 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R13 _{N1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM _{exN1}	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
ATP _{mN1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R1 _{N2}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	N2 ^T	0	0
R2 _{N2}	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R3 _{N2}	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		0	0
R4 _{N2}	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0
R5 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R6 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R7 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R8 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R9 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R10 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R11 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R12 _{N2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM _{exN2}	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
ATP _{mN2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R1 _{N3}	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N3 ^T	0	0
R2 _{N3}	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0		0	0
R3 _{N3}	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R4 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R5 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R6 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R7 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R8 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R9 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R10 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
R11 _{N3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM _{exN3}	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
ATP _{mN3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM1 _{BMc}	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0
BM2 _{BMc}	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	0
BM3 _{BMc}	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0
BM _{c,ex}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
M1 _{in}	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M4 _{ex}	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M5 _{in}	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M6 _{ex}	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0

Hierbei sind die neu hinzugefügten Bereiche in der stöchiometrischen Matrix violett hinterlegt. Damit ist die Grundstruktur des vollständigen Gemeinschaftsmodells fertiggestellt. Zusätzlich müssen nun noch die Nebenbedingungen der Einzelmodelle entsprechend angepasst werden ((16),(17),(18)), um die inhomogenen Schranken korrekt abzubilden.

3. Material und Methoden

3.1. Anreicherungskulturen

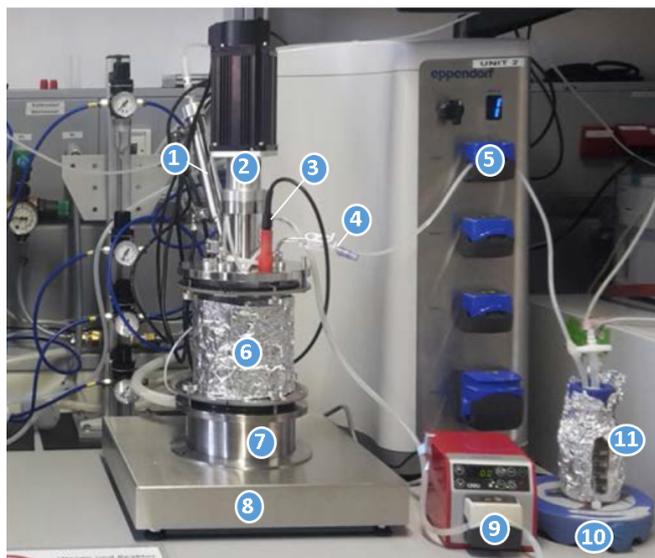
Um Daten zum Vergleich mit den Modellen zu erheben, wurden Experimente mit Anreicherungskulturen von Fabian Kohrs und Patrick Lahmann aus der Gruppe Bioprozesstechnik an der Otto-von-Guericke Universität durchgeführt. Die Grundidee der Anreicherungskulturen im Labormaßstab ist, eine im Vergleich zu den Prozessen einer realen Biogasanlage mikrobielle Gemeinschaft von geringerer Komplexität zu betrachten. Im Gegensatz zu einer Biogasanlage sind die Versuchsbedingungen im Laborexperiment konstant und genau definiert. Insbesondere die Substratzusammensetzung ist in einer Biogasanlage in der Regel sehr komplex und nicht genau bestimmt. Im Laborexperiment wurde Ethanol als Substrat verwendet. Mit diesem Substrat wird ein Teilprozess der Biogasproduktion beginnend mit der Ethanoloxidation (Acidogenese und Acetogenese) betrachtet. Um die Aussagekraft der Modelle zu untersuchen, ist es sinnvoll Kulturen mit einer geringen Anzahl an verschiedenen Spezies zu verwenden, da die Ergebnisse leichter nachvollziehbar sind und Fehler und Probleme leichter aufgedeckt werden können. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass die experimentelle Analyse und die folgende Datenauswertung des Metaproteoms mit zunehmender Komplexität der Proben schwieriger wird und die Auflösung abnimmt. Proteine mit geringer Abundanz können dann nicht mehr nachgewiesen werden und wichtige Informationen gehen dadurch verloren.

Versuchsaufbau und Prozessparameter

Die verwendete Biomasse stammte ursprünglich aus einer Biogasanlage und wurde zunächst für Experimente mit Glukose-/Cellulosemedium verwendet. Anschließend folgte der Substratwechsel zu einem Ethanolmedium.

Es handelte sich um kontinuierliche Versuche bei konstanter Temperatur (mesophile Bedingungen). Ein wichtiger Versuchsparameter bei kontinuierlichen Versuchen ist die hydraulische Verweilzeit, die die Zeit angibt, in der ein vollständiger Austausch des Kulturvolumens stattfindet. Das Reziproke der Verweilzeit ist die Verdünnungsrate, die in einem stabilen Prozess auch der Wachstumsrate der Organismen in der Kultur entspricht, wenn keine Biomasserückhaltung stattfindet und Sterberaten vernachlässigt werden. Die Verdünnungsrate wurde ausgehend von $0,00053 \text{ h}^{-1}$ schrittweise bis zu einer Versäuerung der Kultur erhöht und für jede Verdünnungsrate Proben untersucht. Für die exakte Bestimmung der Verdünnungsrate wurden die Mediumsflaschen regelmäßig gewogen, um die tatsächliche Menge zugefütterten Mediums zu bestimmen.

Die Kultivierungen erfolgten in zwei BioFlo 320 Reaktorsystemen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 2 Litern. Das Volumen der Kultur betrug 1,5 L. Es erfolgte eine kontinuierliche Durchmischung durch einen Rührer sowie die



- 1: Abluftkühler
- 2: Rührer
- 3: pH-Sonde
- 4: Probenahmeventil
- 5: Pumpe Zulauf
- 6: Kultivierungsgefäß
- 7: Heizelement
- 8: Waage
- 9: Pumpe Ablauf
- 10: Magnetrührer
- 11: Medium

Abbildung 6: Ausschnitt des Versuchsaufbaus der Ethanolanreicherungskultur mit Beschriftung der einzelnen Komponenten. (Foto: Patrick Lahmann)

Aufzeichnung der Temperatur über einen Messfühler und die pH-Messung durch eine pH-Sonde. Die Temperatur wurde mit Hilfe des Messfühlers geregelt und durch Wärmeübertragung über den Reaktorboden konstant auf 40°C gehalten. Die Zufütterung des Mediums und der Ablauf erfolgten mit Hilfe von peristaltischen Pumpen und über gasdichte Schläuche. Dabei wurde die Pumpraten des Ablaufs über das Gewicht des Reaktors geregelt, sodass annähernd ein gleichbleibender Füllstand realisiert wurde. Das Medium wurde kontinuierlich mit einem Magnetrührer gerührt, um ein Absetzen einzelner Bestandteile zu verhindern. Die Prozesskontrolle (Temperatur, Rührerdrehzahl, Pumpraten) erfolgte über das Reaktorsystem und die mitgelieferte Software. An die Reaktoren wurde ein Abluftkühler und das Gärona-System (Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologie e.V. und ECH Elektrochemie Halle GmbH, Halle, Deutschland) angeschlossen. Das Gärona-System ermittelt über den Druckanstieg im Kopfraum die gebildete Menge an Gas. Bei Erreichen eines bestimmten Schwellendrucks wird das System über den Abluftkühler entlüftet und das Gas in einen Gaschromatographen, der Teil des Gärona-Systems ist, weitergeleitet und bezüglich der Zusammensetzung analysiert. Mit dem Gaschromatographen konnten die Konzentrationen der Gase H₂, CO₂, CH₄ und Stickstoff nach vorheriger Kalibrierung bestimmt werden. Abbildung 6 zeigt den Versuchsaufbau für einen der beiden Reaktoren, wobei der Gaschromatograph nicht gezeigt ist.

Methoden für die Messung von Prozessgrößen

Die Gesamtbiomasse der mikrobiellen Gemeinschaft diente als Bezugsgröße für die spezifischen Raten im Modell und ist somit für den Vergleich von Experiment und Simulation essentiell. Die Biomassebestimmung erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Zum einen wurde die Biotrockenmasse durch Trocknung von 7 mL Probe bei 105 °C über Nacht bestimmt. Als zweite

Methode wurde eine Proteinbestimmung mittels Lowry-Assay [73] durchgeführt. Die ermittelten Proteinkonzentrationen wurden unter der Annahme, dass die Biotrockenmasse zu 64% aus Protein besteht, in eine Biomassekonzentration umgerechnet. Diese Annahme stammt aus den Modellen, in denen die Proteine 64% der Biomasse ausmachen.

Die Konzentrationen von organischen Säuren wurden am Max-Planck-Institut Magdeburg (BPT-Gruppe) gemessen. Die Quantifizierung der Konzentrationen von Formiat, Acetat, Laktat, Propionat und Butyrat erfolgte mittels Anionenaustauschchromatografie (Dionex ICS-5000 Reagent-Free HPIC System, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Die Restethanolkonzentration in der Kulturbrühe erfolgte enzymatisch durch einen Enzymassay, bei dem das Ethanol indirekt über die Menge an gebildetem NADH (photometrische Bestimmung) durch zwei gekoppelte Reaktionen gemessen wird. Durch die Reaktionen von Alkohol-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase werden pro mol Ethanol zwei mol NADH gebildet. Die photometrisch ermittelte Menge an NADH erlaubt dann Rückschlüsse auf die vorhandene Menge an Ethanol.

Kontinuierliche Kultivierung und Transient-state-Kultivierung

Bei einem kontinuierlichen Prozess wird kontinuierlich Medium zugeführt und die gleiche Menge der Kulturbrühe abgeführt, sodass das Volumen konstant bleibt. Kultivierungsbedingungen wie die Temperatur und die Mediumszusammensetzung werden dabei konstant gehalten. Es wird bei kontinuierlichen Prozessen in der Regel davon ausgegangen, dass es drei Verweilzeiten benötigt, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, bei dem sich die Konzentration an Metaboliten und Biomasse in der Kulturflüssigkeit nicht mehr verändert. Die Verweilzeit ist die Zeit die benötigt wird, bis Medium für einen kompletten Austausch der Kulturbrühe zugeführt wurde. Bei Kultivierungen mit Mikroorganismen entspricht im Gleichgewichtszustand die Wachstumsrate μ der Verdünnungsrate (die Verdünnungsrate ist das Reziproke der Verweilzeit, siehe oben) bei einem kontinuierlichen Prozess. Bei einer Verdünnungsrate, die die maximale Wachstumsrate für die gegebenen Prozessbedingungen übersteigt, kommt es zu einer Auswaschung der Mikroorganismen, da nicht genug Biomasse gebildet werden kann, um die ausgeleitete Biomasse zu ersetzen.

Für die hier untersuchte Kultur waren Verweilzeiten von 10 bis 100 Tagen (beginnend mit der längsten Verweilzeit) in Schritten von 10 bis 20 Tagen vorgesehen. Damit würde sich eine Prozesszeit von mehr als vier Jahren ergeben, wenn bei jeder Verweilzeit eine Wartezeit die der dreifachen Verweilzeit entspricht eingehalten wird. Aus diesem Grund wurde für die Versuche das Konzept des Transient-state (Englisch für Übergangszustand) angewendet. Hierbei wird davon ausgegangen, dass bei relativ kleinen Veränderungen der Verdünnungsraten die Adaption der Gemeinschaft bereits nach kürzerer Zeit erfolgt. Das Inokulum für den Versuch stammte aus einer Anreicherungskultur auf Glukose-/Cellulosemedium, die bei ähnlichen Verweilzeiten insgesamt

520 Tage lang kultiviert wurde. Anschließend folgte ein Wechsel des Mediums, bei dem die Kohlenstoffquelle gegen Ethanol ausgetauscht wurde. Die transient-state-Kultivierung erfolgte nach einer anschließenden Adaptionsphase von 80 Tagen. Für die Transient-state-Methode ist es wichtig, die Veränderungen der Verdünnungsrate klein zu halten. Um zu überprüfen, ob sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, wurden verschiedene Messdaten als Indikatoren zu Hilfe genommen. Dazu gehörte der pH-Wert, die Gasbildungsrate, Gaszusammensetzung und die Biomassekonzentration im Reaktor. Ein Fließgleichgewicht wurde angenommen, wenn über drei aufeinanderfolgende Tage keine signifikante Veränderung festzustellen war.

Berechnung der relevanten Raten und Ausbeuten

Für die Berechnung der spezifischen Ethanolaufratmeraten wurde von einer vollständigen Ethanolverwertung, die durch die enzymatische Bestimmung der Restethanolkonzentration bestätigt wurde, ausgegangen. Die Ethanolkonzentration c_{Eth} im Medium lag bei 2,5 mol/L. Mithilfe der Verdünnungsrate D (in 1/h) und des Arbeitsvolumens V_k (in L) kann zunächst die Ethanolfütterungsrate r_{feed} (in mol/h) bestimmt werden:

$$r_{feed} = c_{Eth} \cdot D \cdot V_k \text{ [mol/h]}. \quad (20)$$

Um diese Fütterungsrate in eine spezifische Aufnahmerate umzuwandeln, muss die Gesamtbio-trockenmasse der Mikroorganismen im Reaktor ermittelt werden. Hierfür wurde aus der mittels Lowry-Assay bestimmten Proteinkonzentration c_{Prot} (in g/L) eine Biotrockenmassekonzentration geschätzt. Hierfür wurde ein Proteinanteil von 64% an der Trockenmasse angenommen. Um die Gesamtbio-masse in einem Reaktor zu ermitteln, fließt zudem das Arbeitsvolumen mit ein:

$$m_{DW} = \frac{c_{Prot} \cdot V_k}{0,64} \text{ [gTM]}. \quad (21)$$

Die spezifische Ethanolaufratmerate ist dann:

$$r_{spez} = 1000 \cdot \frac{r_{feed}}{m_{DW}} \text{ [mmol/gTM/h]}. \quad (22)$$

Für Produkte, die hauptsächlich in der flüssigen Phase vorliegen (organische Säuren) erfolgt die Berechnung der spezifischen Produktionsraten analog dazu. Hierbei wird in Gleichung 20 anstelle der Ethanolkonzentration im Medium die Konzentration des entsprechenden Produkts in der Kultur verwendet um die Produktionsrate zu berechnen. Die übrigen Schritte sind identisch.

Die Berechnung der spezifischen Produktionsraten für die gasförmigen Produkte (Methan und CO₂) unterscheidet sich von der Berechnung für die flüssigen Produkte. Durch das Gärana sind die Gesamtgasproduktionsraten r_{Gas} als Normvolumen V_N pro Stunde (NL/h) sowie die Gaszusammensetzung verfügbar. Daraus kann die molare Gasproduktionsrate $r_{m,Gas}$ mit Hilfe

des molaren Gasvolumens V_m berechnet werden:

$$r_{m, Gas} = \frac{r_{Gas}}{V_m} [mol/h]. \quad (23)$$

Die spezifischen Gasproduktionsraten werden aus der molaren Gasproduktionsrate, der Gesamtbiotrockenmasse und des Anteils Fr , den die entsprechende Komponente am gebildeten Gas hat, berechnet:

$$r_{spez, Gas} = 1000 \cdot \frac{r_{m, Gas} \cdot Fr}{m_{DW}} [mmol/g_{TM}/h]. \quad (24)$$

Hierbei ist zu beachten, dass die Gasanteile so normiert wurden, dass sie in der Summe immer 100% ergeben. Für die Methanausbeute wurde das Verhältnis der molaren Methanproduktionsrate und der molaren Ethanolaufrate gebildet. Die Verhältnisse von Methan zu CO_2 wurden direkt aus der Messung der Gaszusammensetzung vom Gaschromatographen bestimmt. Hierbei wurde ein Mittelwert über mehrere Tage berechnet.

3.2. Metaproteomik

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, mikrobielle Gemeinschaften zu untersuchen. Hierzu gehören Techniken wie Metagenomics, Metatranscriptomics oder Metaproteomics. Für die Analyse der oben beschriebenen Anreicherungskulturen wurde eine Metaproteomanalyse mithilfe einer Tandem-MS-Methode und anschließender Auswertung mit der Software MetaproteomeAnalyzer [74] durchgeführt, um vorhandene Mikroorganismen und deren Funktionen zu bestimmen. Proteine sind allen biologischen Prozessen beteiligt, insbesondere als Enzyme im Stoffwechsel. Die Gesamtheit aller Proteine eines biologischen Systems wird als Proteom und die Gesamtheit aller Proteine einer mikrobiellen Gemeinschaft als Metaproteom bezeichnet. Das (Meta)proteom charakterisiert den Phänotyp des biologischen Systems und lässt Rückschlüsse auf die biologische Funktionalität und in gewissem Maße auch auf die taxonomische Zusammensetzung zu.

Die experimentellen Schritte, sowie die anschließende Proteinidentifikation wurden an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg am Lehrstuhl Bioprozesstechnik (F. Kohrs, P. Lahmann) durchgeführt und sind im folgenden Abschnitt kurz zusammengefasst. Anschließend erfolgte eine Analyse der Ergebnisse mittels dafür geschriebener Matlab-Skripte.

In einem ersten Schritt erfolgte der Probenaufschluss und die Proteinextraktion mithilfe einer Kugelmühle und Phenolextraktion [12]. Mittels Proteinquantifizierung mit Amidoschwarz wurde die für die Folgeschritte geeignete Menge an Probe bestimmt. Mit den Proben wurde anschließend eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt [75]. Diese Methode dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts. Im Gel bilden sich dabei Banden aus, die die verschiedenen Proteine enthalten. Die Probenspur wurde vertikal in zehn gleichgroße Fraktionen zerteilt, die anschließend für einen in-Gel-Verdau mit Trypsin weiterverwendet wurden [76]. Die Fraktionierung dient einer besseren Auflösung

bei den Proteinidentifikationen und wird bei komplexen Proben angewendet. Trypsin ist ein Enzym, welches die Proteine an spezifischen Stellen entsprechend ihrer Aminosäuresequenz schneidet. Als Resultat werden die Proteine zu Peptiden verdaut, die vor der eigentlichen Massenspektrometeranalyse chromatographisch aufkonzentriert und entsalzt werden.

Wesentliche Komponenten eines Massenspektrometers sind eine Ionenquelle, ein Massenanalysator und ein Detektor. Die Ionenquelle dient der Ionenerzeugung aus den zu messenden Molekülen und der Beschleunigung der Ionen. Beispiele für Ionenquellen ist die Elektrospray-Ionisierung (ESI) und die Matrix-assoziierte Laser-Desorptions-Ionisierung (MALDI) [77]. Durch den Massenanalysator werden die Ionen entsprechend ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) aufgetrennt. Dabei werden je nach Massenanalysator unterschiedliche physikalische Prinzipien genutzt. Beispielsweise werden die Ionen mittels elektrischer oder magnetischer Felder abgelenkt, durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit elektrischen Feldern gefiltert oder aufgrund unterschiedlicher Flugzeiten im feldfreien Raum getrennt. Typische Masseanalysatoren sind Quadrupol-, Ionenfallen- und Flugzeitanalysatoren. Bei Ionenfallen, die auch in den beschriebenen Versuchen verwendet wurden (s. unten), kann zwischen linearer und orbitaler Ionenfalle unterschieden werden. In einer linearen Ionenfalle werden die Ionen durch ein zweidimensionales elektrostatisches Feld festgehalten und können gezielt für den zweiten MS-Schritt entlassen werden. In der orbitalen Ionenfalle bewegen sich die eingeschossenen Ionen aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen auf Kreisbahnen (Orbits) um eine Elektrode in der Ionenfalle. Zusätzlich wird durch Schwingungen der Ionen ein Signal im Detektor erzeugt und auch das m/z -Verhältnis (die Frequenz ist charakteristisch für das m/z -Verhältnis) bestimmt [78]. Die Intensität des Ionenstroms der aufgetrennten Ionen wird vom Detektor ermittelt. Im Massenspektrum sind alle in dem jeweiligen Zeitintervall gemessenen Ionen aufgetragen. Auf der x-Achse wird das m/z -Verhältnis und auf der y-Achse die Intensität (ergibt sich aus der Anzahl der detektierten Ionen) dargestellt. Eine Übersicht über verschiedene Ionenquellen und Analysatoren sowie eine Beschreibung ihrer Wirkungsweise ist u. a. im Review von El-Aneed et al. [79] zusammengetragen.

Eine häufig für die Peptididentifikation angewendete massenspektrometrische Analyse ist das Tandem-MS (auch MS/MS), bei der zwei aufeinanderfolgende Massenspektrometeranalysen durchgeführt werden [79]. Eine solche Methode wurde auch bei den hier beschriebenen Kultivierungen angewendet. Zunächst werden Peptidionen aus den Peptiden vom tryptischen Verdau erzeugt und gemessen. Die abundantesten Peptidionen in einem Zeitintervall werden fragmentiert, ionisiert und die entstandenen Peptidfragmentionen anschließend detektiert. In jedem Peptidion gibt es verschiedene mögliche Bruchstellen und somit verschiedene Fragmentionen, die erzeugt werden können. Pro Zeitintervall erfolgt eine Vielzahl von Fragmentierungen für jedes ausgewählte Peptid aus dem ersten MS. Da die Peptidionen nicht jedes Mal an der gleichen Stelle brechen, ergibt sich ein charakteristisches Muster im Massenspektrum des zweiten MS, woraus sich die Aminosäuresequenz der Peptide ableiten lässt. Nur durch die zweite MS-Analyse ist eine strukturelle Aufklärung der Peptide und folglich auch die Proteinidentifikation möglich.

Für die Analyse der Peptide aus der Ethanolanreicherungskultur wurde ein LC-MS/MS (Ultimate 3000 nano splitted LC system und Orbitrap Elite™Hybrid Ion Trap-Orbitrap MS system, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet. Als Elektronenquelle wird hierbei die Elektrospray-Ionisierung [80] genutzt. Im ersten MS wird eine lineare Ionenfalle und im zweiten MS eine orbitale Ionenfalle (Orbitrap) als Analysator verwendet [78].

Die Anzahl der Spektren des zweiten MS wurde, wie auch in anderen Studien [81, 82], im Rahmen dieser Arbeit als grobes Maß für die Abundanz der zugehörigen Proteine genutzt. Da sich jeweils ein Spektrum für ein kurzes Messfenster ergibt, bedeuten viele gemessene Spektren, dass das jeweilige Peptid über einen längeren Zeitraum in der Probe präsent und messbar war.

Nach der Messung folgt die Auswertung mittels geeigneter Proteindatenbanken und Analysealgorithmen. Beispielsweise können die zu erwartenden Peptide eines Proteins mit Hilfe eines *in silico* Verdau vorhergesagt werden. Über weitere Algorithmen können die zugehörigen möglichen Fragmentationen bestimmt werden. Für die Peptidanalyse wurde die SwissProt-Datenbank [83] sowie Sequenzen von sieben Metagenomen verwendet. Die Auswertung der MS-Daten im Rahmen der durchgeführten Versuche erfolgte automatisiert mit Hilfe der Software Meta-ProteomeAnalyzer [74].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die identifizierten Proteine hinsichtlich der zugehörigen Taxonomien und metabolischen Funktionalität untersucht. Wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben, wurden insgesamt neun Modellorganismen, die jeweils repräsentativ für verschiedene Gruppen von Mikroorganismen (funktionelle Gilden) stehen, ausgewählt. In Abbildung 7 ist ein phylogenetischer Stammbaum, der die taxonomische Einordnung der Modellorganismen wiedergibt, gezeigt. Die Darstellung beschränkt sich auf jene Knotenpunkte, an denen die Organismen voneinander unterschieden werden können. Beispielsweise lassen sich die methanogenen Organismen (*M. barkeri*, *M. hungatei*: Archaea) bereits auf dem Rang der Domäne von primären und sekundären Gärern (Bacteria) abgrenzen. Cytochromfreie hydrogenotrophe Methanogene (*M. hungatei*: Methanomicrobiales) lassen sich dagegen erst auf dem Rang der Ordnung von cytochromhaltigen acetoklastischen Methanogenen (*M. barkeri*: Methanosarcinales) differenzieren. Die dazwischenliegenden Ränge sind bei beiden Organismen gleich. Für die Untersuchung der Metaproteomdaten ist es deshalb wichtig, die taxonomische Einordnung der Organismen zu kennen und die Daten in der jeweils passenden taxonomischen Ebene zu untersuchen. Bei den übergeordneten Rängen (z.B. Domäne) gibt es in der Regel weniger Proteine, die keiner Taxonomie zugeordnet werden können. Dafür kann hier nicht zwischen allen wichtigen Gruppen unterschieden werden. In den tieferliegenden Ebenen (z.B. Familie, Gattung, Art) kann zwischen mehr taxonomischen Gruppen unterschieden werden. Im Gegenzug gibt es mehr Proteine, die nicht eindeutig einer Gruppe zugeordnet werden können. Neben der Untersuchung der Taxonomien beinhaltet diese Arbeit auch die Analyse bezüglich bestimmter metabolischer Funktionen (z.B. Ethanoloxidation, Propionsäuregärung, Methanogenese). Eine solche Analyse ist sinnvoll, da eine metabolische Funktion nicht immer eindeutig einer taxonomischen Gruppe zugeordnet

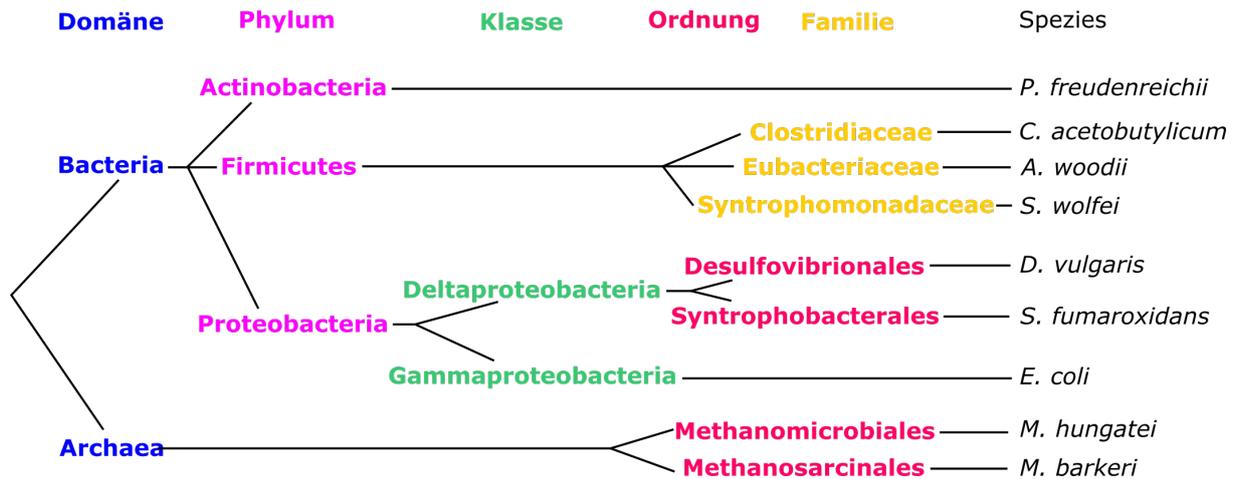


Abbildung 7: Taxonomische Einordnung der Modellorganismen. Gezeigt sind jeweils nur jene taxonomische Ebenen, auf denen eine Unterscheidung der Organismen möglich ist. Die Farben entsprechen der jeweiligen taxonomischen Ebene (oberer Teil der Abbildung).

werden kann. Einige Stoffwechselwege treten in vielen verschiedenen Organismengruppen auf und einige Organismengruppen (z.B. Clostridien) sind sehr divers in Bezug auf ihre Stoffwechselwege. Für die Analyse aktiver Stoffwechselwege wurden mögliche Schlüsselenzyme für die verschiedenen Wege ausgewählt (siehe Abschnitt 4.3.2). Schlüsselenzyme sind im Optimalfall spezifisch für einen Stoffwechselweg, d.h. sie treten in den übrigen Stoffwechselwegen nicht auf. In einigen Fällen gibt eine Kombination aus den Enzymdaten und den Taxonomiedaten Aufschlüsse auf den Stoffwechselweg. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, die unterschiedlich gute Detektierbarkeit von Peptiden. Die Peptide einiger Proteine sind schwer ionisierbar und werden in den massenspektrometrischen Analysen dadurch nicht gefunden.

3.3. Verwendete Datenbanken und Software zur Konstruktion und Analyse der metabolischen Modelle

Für die Konstruktion der metabolischen Modelle wurde neben verschiedenen Publikationen die Datenbanken Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [84, 85], UniProt [86], Metacyc [87], BRENDA [88, 89, 90] und das SIB Bioinformatics Resource Portal ExPASy [91] genutzt. Die Modelle wurden im *CellNetAnalyzer* [92, 93], einer Matlab-Toolbox für die Netzwerkanalyse, implementiert und analysiert. Für die Flussanalysen wurde dabei CPLEX als Löser für die linearen Optimierungsprobleme und der in Matlab integrierte Löser *fmincon* für nichtlineare Optimierungsprobleme eingesetzt. Die Simulationen wurden auf einem Computer mit Intel® Core™i7-6700 Prozessor (3.40GHz, 8 Kerne) und Ubuntu 16.04 durchgeführt. Um zu testen, bis zu welcher Modellgröße EFVs berechenbar sind, wurde zudem ein Knoten auf einem Rechencluster bestehend aus 2 Intel Xeon X5650 (je 6 Kerne, 2.67 GHz) verwendet. Die Analyse der Metaproteomdaten erfolgte mit dem MetaProteomAnalyzer [74] (durchgeführt von Fabian Kohrs, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) und mithilfe eines Matlabskripts.

4. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst und diskutiert. Zunächst werden die Einzelmodelle der ausgewählten Organismen im Detail beschrieben (Abschnitt 4.1). Im darauffolgenden Abschnitt wird der RedCom-Ansatz für das Erstellen reduzierter Gemeinschaftsmodelle eingeführt und anhand eines Beispiels veranschaulicht (Abschnitt 4.2). Im letzten Abschnitt werden Modelle von Biogasgemeinschaften mit drei, sechs und neun Organismen mit den verschiedenen Modellierungsansätzen (bilinear vollständig, linearisiert vollständig, linear reduziert) erstellt, sowie miteinander und unter Einbezug von experimentellen Daten verglichen (Abschnitt 4.3).

4.1. Modellorganismen und deren Stoffwechselmodelle

Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, sind zahlreiche Mikroorganismen am Biogasprozess beteiligt. Um den Prozess mithilfe von stöchiometrischen Stoffwechselnetzwerken abzubilden, wurden Organismen ausgewählt, die repräsentativ für bestimmte Abbauege und Gruppen von Mikroorganismen stehen (funktionelle Gilden). Die Gesamtheit dieser Modellorganismen ergibt eine vereinfachte definierte Gemeinschaft, die die verschiedenen Abbauprozesse abbildet (vgl. Abbildung 2). Die Modellorganismen sind mit ihren typischen Abbauegen in Tabelle 2 aufgelistet. Als Vertreter der Acidogenese wurden die Organismen *E. coli*, *C. acetobutylicum*, *P. freudenreichii* und *A. woodii* ausgewählt. *E. coli* ist dabei ein fakultativ anaerobes Bakterium, das unter Sauerstoffausschluss Zucker in der gemischten Säuregärung zu verschiedenen organischen Säuren (Formiat, Acetat, Laktat) und Alkohol umwandeln kann [94]. *C. acetobutylicum* wandelt Zucker in verschiedene Säuren (Acetat, Butyrat, Laktat, Formiat) und Lösungsmittel (Aceton, Butanol, Ethanol) [95, 96]. Der Organismus ist dafür bekannt, in zwei Phasen, der Lösungsmittelphase und der Säurephase, zu wachsen [95]. Für den Biogasprozess wird hier nur die Säurephase, betrachtet, da die Acidogenese abgebildet werden soll. Im Vergleich zu den übrigen Vertretern der Acidogenese ist *C. acetobutylicum* der einzige Modellorganismus, der Butyrat produzieren kann. Neben der Acidogenese kann *C. acetobutylicum* auch an der Hydrolyse beteiligt sein, da der Organismus in der Lage ist, Stärke zu spalten. Die Hydrolyse als erste Abbauphase wird hier in den Modellen nicht berücksichtigt. *P. freudenreichii* gewinnt seine Energie aus dem Abbau von Zucker oder Laktat zu Propionat und Acetat [97, 98] und ist der einzige Organismus im Modell, der Propionat produzieren kann. *A. woodii* wandelt Zucker und verschiedene andere Substrate, darunter Ethanol, CO₂ und H₂, in Acetat um [99]. Da Acetat in der Regel das einzige Produkt von *A. woodii* ist, gehört er zu den homoacetogenen Organismen der Acetogenese. *D. vulgaris* wird ebenfalls der Acetogenese zugeordnet und kann Laktat, Pyruvat und Ethanol zu Acetat umwandelt [100]. Der Organismus gehört zu den sulfatreduzierenden Bakterien, kann in Abwesenheit von Elektronenakzeptoren wie Sulfat aber auch in syntrophen Gemeinschaften wachsen [101, 102].

Tabelle 2: Einordnung der Modellorganismen in die verschiedenen Phasen der Biogasproduktion (vgl. Abbildung 2). Zusätzlich sind die typischen Stoffwechselwege, die mit dem Modell abgebildet werden sollen, aufgeführt. Nur die für den Biogasprozess als relevant erachteten Wege sind hier aufgelistet.

Organismus	Phase	Stoffwechselwege
<i>E. coli</i>	Acidogenese	Gemischte Säuregärung
<i>C. acetobutylicum</i>	Hydrolyse, Acidogenese	Buttersäuregärung (Produktion von Butyrat, Acetat, Formiat, Ethanol, H ₂ und CO ₂)
<i>P. freudenreichii</i>	Acidogenese	Propionsäuregärung (Methyl-Malonyl-CoA-Weg)
<i>A. woodii</i>	Acetogenese	Homoacetogenese aus Glukose, Fruktose, Laktat, Ethanol, Formiat, H ₂ und CO ₂ , Produktion von Acetat
<i>D. vulgaris</i>	Acetogenese	syntrophe Verwertung von Laktat, Pyruvat, Ethanol, Produktion von Acetat sowie Formiat oder H ₂ und CO ₂
<i>S. wolfei</i>	Acetogenese	Buttersäureabbau, Produktion von Acetat sowie Formiat oder H ₂ und CO ₂
<i>S. fumaroxidans</i>	Acetogenese	Propionsäureabbau, Produktion von Acetat sowie Formiat oder H ₂ und CO ₂
<i>M. hungatei</i>	Methanogenese	Methanogenese (ohne Cytochrome) aus Formiat oder H ₂ und CO ₂
<i>M. barkeri</i>	Methanogenese	Methanogenese (mit Cytochromen) aus Acetat, H ₂ und CO ₂

Zwei weitere Vertreter der Acetogenese sind *S. wolfei* und *S. fumaroxidans*. Diese beiden Organismen können die kurzkettigen organischen Fettsäuren Butyrat (*S. wolfei*) [103] und Propionat (*S. fumaroxidans*) [104] verwerten. Als Produkte entstehen Acetat, sowie Formiat oder CO₂ und H₂. Als Vertreter der Methanogenese wurden die Organismen *M. barkeri* und *M. hungatei* ausgewählt. Während *M. hungatei* nur Formiat oder CO₂ mit H₂ als Substrate für die Methanogenese nutzen kann (hydrogenotrophe Methanogenese) [105, 106], kann *M. barkeri* zusätzlich zu H₂ und CO₂ auch Acetat, Methanol und Methylamine verwerten [107, 108]. Dafür ist *M. barkeri* nicht in der Lage Formiat als Substrat zu nutzen. Neben den verwendeten Substraten unterscheiden sich die beiden Organismen auch darin, dass *M. barkeri* im Gegensatz zu *M. hungatei* Cytochrome exprimiert, was zu unterschiedlichen Effizienzen der Stoffwechselwege führt.

Mit den hier ausgewählten Organismen (Tabelle 2) lässt sich der Biogasprozess ausgehend von Glukose darstellen. Für eine vollständigere Repräsentation müssten weitere Organismen der Hydrolyse-Stufe für den Abbau von organischen Polymeren (Proteine, Fette, Stärke, Cellulose) und Aminosäuren mit in das Modell eingebracht werden. Auf diese wird hier aber verzichtet, da zunächst für die Anwendung und Vergleiche der verschiedenen Modellierungsansätze Gemeinschaften von geringer Komplexität betrachtet und in den Experimenten definierte Substrate

(Cellulose, Glukose, Ethanol) verwendet wurden.

Bei den hier erstellten Modellen handelt es sich nicht um (automatisiert generierte) genomskalige Netzwerke, sondern um manuell erstellte Netzwerke mit dem Fokus auf dem Zentralstoffwechsel („Kernmodelle“). Sie sind daher deutlich kleiner (zwischen 100 und 200 Reaktionen und Metabolite) als genomskalige Netzwerke. Dennoch sind diese Modelle des Zentralstoffwechsels ausreichend, da die wesentlichen Abbauprozesse, die im Kontext der Biogasproduktion relevant sind, abgebildet werden. Zur Vereinfachung wurde davon ausgegangen, dass alle Organismen die gleiche Biomassezusammensetzung haben. Gestützt wird dieser Ansatz dadurch, dass in einer vorhergehenden Masterarbeit [109] nur geringe Unterschiede zwischen Modellen gefunden wurden, die die konkrete Biomassezusammensetzung der einzelnen Organismen berücksichtigten und solchen, bei denen identische Zusammensetzungen angenommen wurden.

Wasser wird, unter der Annahme, dass es im Überfluss vorhanden ist und durch die Zellmembran diffundieren kann, nicht als Metabolit berücksichtigt, da es die Gleichgewichtsbedingung nicht erfüllen muss. Für Reduktionsäquivalente ist zur Vereinfachung der Modelle jeweils nur die reduzierte Form im Modell aufgeführt. Dies ist legitim, da die Summe von reduzierten und oxidierten Reduktionsäquivalenten eine Erhaltungsrelation [110] bilden. Desweiteren sind bei Coenzymen (Coenzym A, Coenzym B, Coenzym M) jeweils nur die gebundenen Formen aufgeführt. Für den energiespeichernden Metaboliten ATP wird davon ausgegangen, dass folgende Umwandlungsprozesse (teilweise gekoppelt an andere Umwandlungsprozesse) stattfinden können:



In den Modellen wurde jeweils nur ATP aufgeführt. In Reaktionen bei denen ursprünglich ein ATP zu einem AMP und Diphosphat umgewandelt wird, werden in den Modellen stattdessen 2 ATP aufgewendet (Kombination der Gl. (26) und (27)). Ferredoxine sind Eisen-Schwefel-Proteine, die als Elektronenüberträger in Zellen fungieren. Je nach Anzahl der enthaltenen Eisen-Schwefel-Cluster können unterschiedlich viele Elektronen pro Ferredoxin übertragen werden [111]. Zur Vereinheitlichung und Vereinfachung wurde in den Modellen davon ausgegangen, dass Ferredoxine immer zwei Elektronen übertragen (analog zu NADH).

Metabolite, die an den Reaktionen beteiligt sind, aufgrund von Erhaltungsrelationen oder anderen Annahmen (z.B. Wasserüberschuss) nicht im Modell aufgeführt werden, sind in den gezeigten Reaktionen in den folgenden Abschnitten jeweils grau dargestellt. Um den Erhaltungsstoffwechsel darzustellen, enthält jedes Modell eine ATP-verbrauchende Pseudoreaktion („ATPmaint“). Der Erhaltungskoeffizient gibt den Teil an Substrat oder Energie in Form von ATP an, der nicht für Wachstumsprozesse, sondern für die Aufrechterhaltung grundlegender Prozesse benötigt

wird [112].

Für einen Teil der Organismen wurden bereits Modelle im Rahmen von Bachelor- und Masterarbeiten erstellt (*M. hungatei*, *M. barkeri*, *A. woodii*: [113, 109]; *C. acetobutylicum*, *S. wolfei*, *D. vulgaris*: [109]; *S. fumaroxidans*: [114]) und im Rahmen dieser Doktorarbeit weiter angepasst.

Im Folgenden werden die für die Organismen typischen zentralen Abbauwege und Modellannahmen beschrieben. Eine Zusammenfassung aller Reaktionen und Metabolite in den Modellen ist in Anhang A aufgelistet.

E. coli

E. coli repräsentiert einen primären Gärer in der mikrobiellen Gemeinschaft. Der Organismus kann Glukose unter Sauerstoffausschluss bei der gemischten Säuregärung in Ethanol, Essigsäure, Milchsäure und Ameisensäure umsetzen [94]. Das Netzwerkmodell wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit erstellt, sondern aus dem *CellNetAnalyzer* übernommen („*Escherichia coli* (small)“). Es diente als Basis für die übrigen Modelle. Insbesondere der Anabolismus wurde komplett in alle anderen Modelle übernommen.

In *E. coli* sind Glykolyse, Glukoneogenese, Citratzyklus, oxidativer und nicht-oxidativer Pentose-Phosphatweg (PPW) vollständig vorhanden. Diese Stoffwechselwege sind in den Tabellen 3, 4 und 5 zusammengefasst. Zusätzlich besitzt *E. coli* den Entner-Doudoroff-Weg, den Glyoxylat-Weg sowie verschiedene anaerobische Reaktionen. Modellgröße und Ratengrenzen des Modells sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht über die biochemischen Reaktionen des Pentose-Phosphat-Wegs und die zugehörigen Enzyme. Der Pentose-Phosphat-Weg hat einen oxidativen (oberer Abschnitt der Tabelle) und einen nicht-oxidativen Teil (unterer Abschnitt der Tabelle). P=Phosphat

Reaktion		Enzym
Glukose-6-P + NADP ⁺	↔	6-Phosphogluconolacton + NADPH Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
6-Phosphogluconolacton + H ₂ O	↔	6-Phosphogluconat Glucono-Lactonase
6-Phosphogluconat + NADP ⁺	↔	Ribulose-5-P + NADPH + CO ₂ 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
Ribose-5-P	↔	Xylose-5-P Ribulose-5-Phosphat-Epimerase
Ribose-5-P + Xylose-5-P	↔	S7-P + Glycerinaldehyd-3-P Transketolase
S7P + Glycerinaldehyd-3-P	↔	E4P + Fruktose-6-P Transaldolase
E4P + Xylose-5-P	↔	Glycerinaldehyd-3-P + Fruktose-6-P Transketolase

Tabelle 4: Übersicht über die biochemischen Reaktionen der Glykolyse und die zugehörigen Enzyme. In der letzten Zeile ist zudem die Nettobilanz der Glykolyse angegeben. P=Phosphat

Reaktion	Enzym
Glukose + PEP → Glukose-6-P + Pyruvat	Phospho-Transferase-System
Glukose + ATP → Glukose-6-P + ADP	Hexokinase
Glukose-6-P ↔ Fuktose-6-P	Glukose-6-phosphat-Isomerase
Fuktose-6-P + ATP → Fruktose-1,6-bisphosphat + ADP	Phosphofructo-Kinase
Fruktose-1,6-bisphosphat ↔ Dihydroxyaceton-P + Glycerinaldehyd-3-P	Aldolase
Dihydroxyaceton-P ↔ + Glycerinaldehyd-3-P	Isomerase
Glycerinaldehyd-3-P + NAD ⁺ + P ↔ 1,3-Bisphosphoglycerat + NADH + H ⁺	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
1,3-Bisphosphoglycerat + 1 ADP ↔ 3-Phosphoglycerat + ATP	Phosphoglycerat-Kinase
3-Phosphoglycerat ↔ 2-Phosphoglycerat	Phosphoglycerat-Mutase
2-Phosphoglycerat ↔ Phosphoenolpyruvat	Enolase
Phosphoenolpyruvat + ADP → Pyruvat + ATP	Pyruvat-Kinase
<hr/>	
Glukose + 2 ADP + 2 P + 2 NAD ⁺ → 2 Pyruvat + 2 ATP + 2 NADH	

Tabelle 5: Übersicht über die biochemischen Reaktionen des Citratzyklus und die zugehörigen Enzyme. In der letzten Zeile ist zudem die Nettobilanz für einen Durchlauf des Citronensäurezyklus angegeben

Reaktion	Enzym
Oxalacetat + Acetyl-CoA + H ₂ O → Citrat + HS-CoA	Citrat-Synthase
Citrat ↔ cis-Aconitat + H ₂ O	Aconitat-Hydratase
cis-Aconitat + H ₂ O ↔ Isocitrat	Aconitat-Hydratase
Isocitrat + NAD(P) ⁺ ↔ Oxalsuccinat + NAD(P)H	Isocitrat-Dehydrogenase
Oxalsuccinat ↔ 2-Oxoglutarat + CO ₂	Isocitrat-Dehydrogenase
2-Oxoglutarat + NAD ⁺ + HS-CoA → Succinyl-CoA + CO ₂ + NADH	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
Succinyl-CoA + ADP ↔ Succinat + ATP + HS-CoA	Succinat-Thiokinase
Succinat + Ubiquinon ↔ Fumarat + Ubiquinol	Succinat-Dehydrogenase
Fumarat + H ₂ O ↔ Malat	Fumarase
Malat + NAD ⁺ ↔ Oxalacetat + NADH	Malat-Dehydrogenase
<hr/>	
3 NAD ⁺ + Ubiquinon + Acetyl-CoA + ADP + P → 2 CO ₂ + 3 NADH + Ubiquinol + ATP + HS-CoA	

P. freudenreichii

Auch *P. freudenreichii* gehört zu den primären Gärern. Der Organismus wird den Actinobacteria zugeordnet [97] und kann sowohl Kohlenhydrate (Glukose, Laktose) als auch Laktat oder Glycerol verwerten [97, 98, 115, 116]. Als Produkte entstehen dabei je nach Substrat unterschiedliche Verhältnisse von Propionat zu Acetat und CO₂. Die Gene für die Enzyme der Glykolyse, Glukoneogenese, des oxidativen und nicht-oxidativen PPW, sowie des Citratzyklus sind in *P. freudenreichii* vollständig vorhanden. Der Glyoxylatweg und der Entner-Doudorouff-Weg fehlen dagegen [84, 117].

P. freudenreichii nutzt bei der Propionsäuregärung den Methylmalonyl-CoA-Weg (Wood-Werkman-Zyklus, Abbildung 8) [97, 117]. Ausgangspunkt des Wood-Werkman-Zyklus ist Pyruvat. Das Pyruvat wird durch eine biotinabhängige Transcarboxylase zu Oxalacetat carboxyliert. Die Carboxylgruppe wird von Methylmalonyl-CoA übertragen, welches dabei zu Propionyl-CoA decarboxyliert wird. Das Oxalacetat durchläuft die Reaktionen der Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37), Fumarat-Hydratase (EC 4.2.1.2) und Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.99.1) aus dem Citratzyklus bis zum Succinat. Eine CoA-Transferase überträgt das Coenzym A vom Propionyl-CoA auf Succinat. Dabei entstehen zum einen Propionat als ein Produkt des Methylmalonyl-CoA-Weges und zum anderen Succinyl-CoA. Das Succinyl-CoA wird durch eine B12-abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase (EC 5.4.99.2) zunächst zu R-Methylmalonyl-CoA und dann durch eine Methylmalonyl-CoA-Epimerase (EC 5.1.99.1) zu S-Methylmalonyl-CoA umgelagert. Der Kreislauf ist damit vollständig. Insgesamt werden hierbei jedoch zwei Reduktionsäquivalente in Form von NADH verbraucht. Bei Laktat als Substrat wird bei der Laktatoxidation durch die Laktat-Dehydrogenase zu Pyruvat ein NADH gebildet.

Weiterhin kann bei der Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ ein NADH gebildet werden. Durch die anschließende Phospho-Transacetylase- und Acetat-Kinase-Reaktion werden Acetat sowie ATP gebildet. Für eine ausgeglichene Redoxbilanz werden bei Laktat als Substrat je zwei Pyruvat über den Methylmalonyl-CoA-Weg zu Propionat vergärt und ein Pyruvat zu Acetat abgebaut (Disproportionierung):



Neben dem Methylmalonyl-CoA-Weg wird von einigen Organismen (z.B. *Clostridium propionicum*) auch der Acrylyl-CoA-Weg für die Propionsäuregärung genutzt [98], dieser wurde jedoch nicht mit ins Modell aufgenommen. Eine Zusammenfassung des Methylmalonyl-CoA-Weges mit Laktat als Ausgangspunkt ist in Abbildung 8 dargestellt.

Ein weiterer Propionsäuregärer ist *Pelobacter propionicus*. Dieser Organismus kann Ethanol zu Propionsäure vergären [118]. Da die verwendeten Modelle eine funktionelle Gruppe und keinen konkreten Organismus widerspiegeln sollen, wurde das Modell von *P. freudenreichii* um die Verwertung von Ethanol erweitert. Die Modelldimensionen und Ratengrenzen des Modells sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

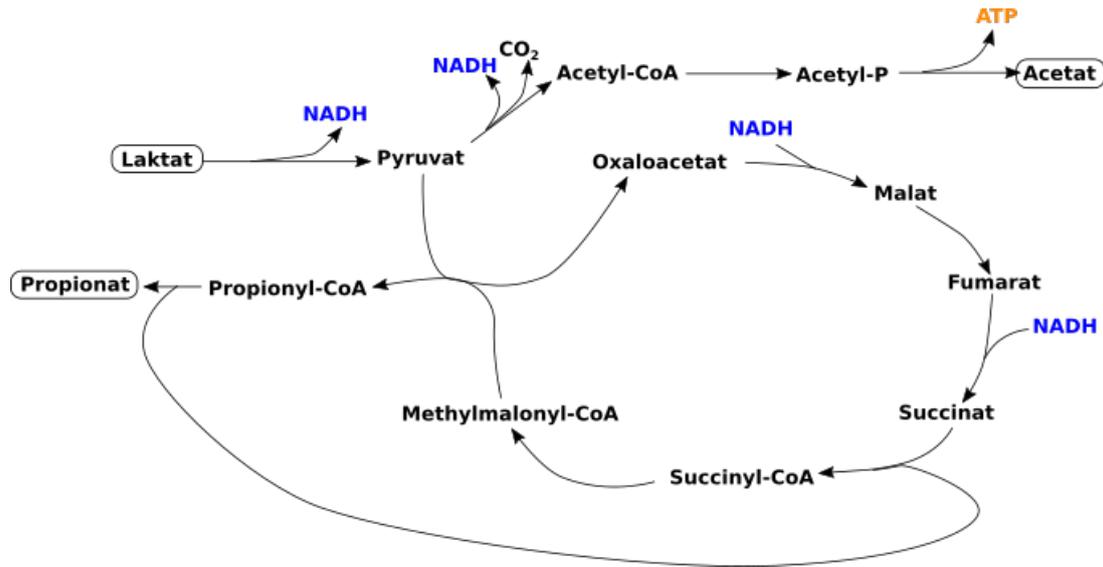


Abbildung 8: Methylmalonyl-CoA-Weg (Wood-Werkman-Zyklus) in *P. freudenreichii* ausgehend von Laktat. Zucker wie Glucose werden über die Glycolyse zu Pyruvat umgewandelt und dann weiter im Methylmalonyl-CoA-Weg verwertet. Reduzierte Reduktionsäquivalente sind blau und energiespeichernde Metabolite orange hervorgehoben.

C. acetobutylicum

C. acetobutylicum hat einen unvollständigen Citratzyklus, bei dem kein Kohlenstoffaustausch zwischen 2-Oxoglutarate und Fumarat stattfindet, wie durch eine Isotopomeranalyse und Expressionsanalyse von Crown et al. [119] gezeigt wurde. Die Succinat-Dehydrogenase fehlt. Desweiteren ist der oxidative PPW nicht aktiv, die Gene für den nicht-oxidativen PPW, die Glycolyse und die Glukoneogenese sind jedoch vorhanden [120].

Ausgehend von Pyruvat, welches bei der Glykolyse gebildet wird, kann *C. acetobutylicum* eine Vielzahl von Produkten bilden (Abbildung 9). Hierzu gehören organische Säuren wie Formiat, Laktat, Acetat und Butyrat, sowie die Lösungsmittel Ethanol, Butanol und Aceton [121, 95, 96]. Je nach gebildetem Produkt unterscheidet sich hierbei die Ausbeute an ATP und die Menge benötigter Reduktionsäquivalente.

Für die Bildung von Laktat wird Pyruvat durch eine Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) unter Oxidation eines NADH zu Laktat oxidiert [84, 96]:



Für die übrigen Produkte wird Pyruvat durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA und CO₂ oxidiert:



Die Elektronen werden dabei von Ferredoxin aufgenommen. Die Elektronen des reduzierten

Ferredoxins können ohne zusätzlichen Energieaufwand von einer Hydrogenase für die Bildung von H_2 genutzt werden:



An der Bildung von Buttersäure sind folgende Reaktionen beteiligt:

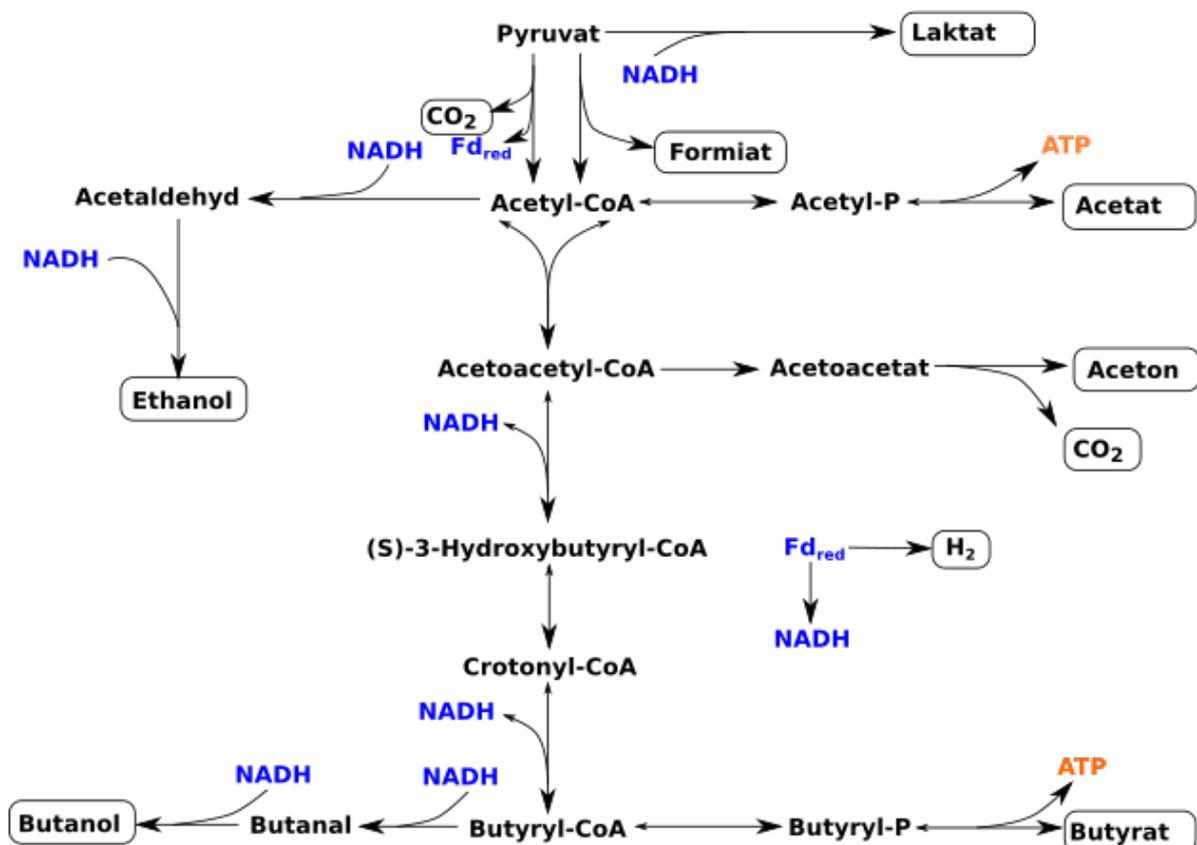
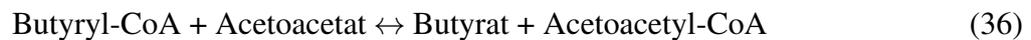
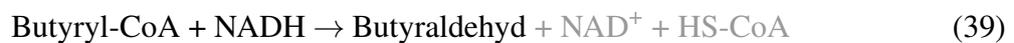


Abbildung 9: Stoffwechselwege der Buttersäuregärung in *C. acetobutylicum* ausgehend von Pyruvat. Reduzierte Reduktionsäquivalente sind blau und energiespeichernde Metabolite orange hervorgehoben.

Im ersten Schritt werden zwei Moleküle Acetyl-CoA durch eine Thiolase zu Acetoacetyl-CoA kondensiert (32). Es folgt eine Reduktion zu 3-Hydroxybutyryl-CoA (33), eine Wasserabspaltung

zu Crotonyl-CoA (34) und ein weiterer Reduktionsschritt zu Butyryl-CoA (35). Diese Schritte sind analog der β -Oxidation der Fettsäuren, jedoch in umgekehrter Richtung. Ausgehend von Butyryl-CoA erfolgt die Bildung von Butyrat entweder durch die Übertragung von Coenzym A auf Acetoacetat (durch eine CoA-Transferase, (36)) [122] oder durch die Bildung von Butyrylphosphat [123] mittels einer Phosphotransbutyrylase (EC 2.3.1.19) und die anschließende Kinase-Reaktion, bei der Butyrat und ATP gebildet werden (37),(38).

Die Produktion von Butanol als Gärprodukt findet hauptsächlich dann statt, wenn der pH-Wert durch die Säurebildung zu stark abfällt. In diesem Fall wird ein Teil der gebildeten Buttersäure wieder aufgenommen und die Reaktion (36) läuft in umgekehrter Richtung ab. Butyryl-CoA wird mit NADH zu Butyraldehyd und in einem zweiten Reduktionsschritt zu Butanol reduziert:



Ein weiteres Produkt der Lösungsmittelgärung ist Aceton. Für die Bildung von Aceton wird das Coenzym A von Acetoactyl-CoA entweder auf Butyrat (36) oder auf Acetat übertragen:



Aceton entsteht durch die Decarboxylierung des Acetoacetats:



Neben Butyrat, Laktat und Formiat wird in der Säurephase auch Acetat, welches wie in *E. coli* durch eine Phospho-Transacetylase- und eine Acetat-Kinase-Reaktion entsteht, produziert. Hierbei wird ein ATP gebildet. Wie in *E. coli* kann in *C. acetobutylicum* Ethanol durch zwei Reduktionsschritte aus Acetyl-CoA gebildet werden. Die Modelldimensionen und Ratengrenzen des Modells sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

A. woodii

A. woodii kann CO_2 mit H_2 zu Acetat reduzieren und als organische Substrate Fruktose, Glukose, Laktat, Glycerol, Formiat, Ethanol und Methanol abbauen [99, 124, 125]. Als Produkt entsteht dabei Acetat, weshalb der Organismus den homoacetogenen Organismen zugeordnet wird.

Ein typischer Stoffwechselweg in *A. woodii* ist der Wood-Ljungdahl-Weg oder reduktive Acetyl-CoA-Weg [126, 127, 128]. Im Wood-Ljungdahl-Weg werden zwei Moleküle CO_2 fixiert und ein Molekül Acetyl-CoA gebildet [129]. Hierbei wird ein Molekül CO_2 über mehrere Zwischenschritte zu einer Methylgruppe reduziert (gebunden an Tetra-Hydrofolat (THF)) (siehe

Abbildung 10). Das zweite Molekül wird zu Kohlenstoffmonoxid reduziert. Über das Schlüsselenzym CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase werden aus dem Methyl-Tetrahydrofolat und dem Kohlenstoffmonoxid Acetyl-CoA gebildet.

Im ersten Schritt wird CO_2 durch die Formiat-Dehydrogenase mit Wasserstoff zu Formiat reduziert [130]:



In einem zweiten Schritt wird unter Verbrauch von einem ATP Formyl-THF gebildet, welches in der folgenden Kondensationsreaktion zu Methenyl-THF umgewandelt wird:

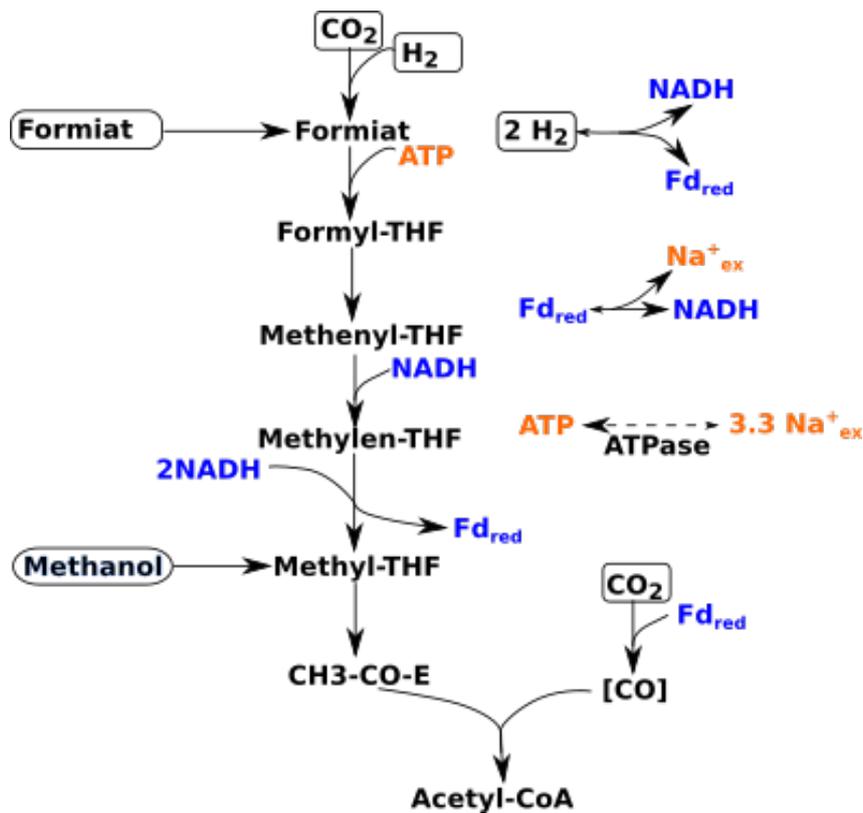


Abbildung 10: Wood-Ljungdahl-Weg in *A. woodii*. Reduzierte Reduktionsäquivalente sind blau und energiespeichernde Metabolite orange dargestellt. THF: Tetrahydrofolat.

Durch zwei Reduktionsschritte wird erst Methylen-THF und anschließend Methyl-THF gebildet:



Die Methylgruppe wird nachfolgend auf die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA übertragen:



Ein zweites CO₂ wird mit Ferredoxin zu CO reduziert und ebenfalls an die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase gebunden:

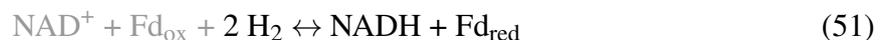


Mithilfe von Coenzym A wird aus der Methylgruppe und dem CO Acetyl-CoA gebildet:



Der Stoffwechselweg ist im Review [131] zusammengefasst.

Insgesamt werden acht Elektronen (vier Reduktionsäquivalente), sowie ATP benötigt, da im zweiten Schritt ein Molekül ATP aufgewendet wird. Durch die Reaktion der Acetat-Kinase wird ein ATP gewonnen, sodass die Netto-ATP-Bilanz ausgeglichen ist. Beim autotrophen Wachstum über den Wood-Ljungdahl-Weg muss zusätzlich neben der Fixierung von CO₂ Energie gewonnen werden. Die Energiegewinnung erfolgt durch den Aufbau eines Natriumionengradienten [127, 128]. Schritte, bei denen genug Energie für die Translokation der Natriumionen zur Verfügung steht, sind die Reduktion von Methylen-THF oder die Reduktion von Methyl-THF [126, 132]. Die Translokation erfolgt dabei wahrscheinlich indirekt über den Rnf-Komplex [130]. Der Rnf-Komplex in *A. woodii* ist natriumionenabhängig und reversibel [133]. Er koppelt die Reduktion von NAD⁺ durch Ferredoxin an den Aufbau eines Natriumionengradienten. Die Elektronenübertragungsprozesse wurden, wie in Poehlein et al. [130] vorgeschlagen, in das Modell implementiert. Demnach exprimiert *A. woodii* eine Hydrogenase, welche mithilfe von Wasserstoff je ein NAD⁺ und ein Ferredoxin reduziert:



Weiterhin wird die Reduktion von Methylen-Tetrahydrofolat durch NADH für die Reduktion von Ferredoxin genutzt (47). Damit kann anschließend durch den Rnf-Komplex Energie in Form eines Natriumionengradienten gewonnen werden:



Als Stöchiometrie wurde ein transloziertes Natriumion pro reduziertem NADH angenommen. Eine natriumionenabhängige ATP-Synthase erzeugt mithilfe des Ionengradienten ATP mit einer Stöchiometrie von 3,3 Natriumionen pro gebildetem ATP [134]:



Die Substrate Methanol und Formiat werden ebenfalls über den Wood-Ljungdahl-Weg verwertet [124]. Formiat kann direkt als Substrat für den Wood-Ljungdahl-Weg genutzt werden. Methanol könnte entweder zu Methyl-Tetrahydrofolat oder zum enzymgebundenen Methyl-Corrinoid reagieren [124]. Für das Modell wurde die Reaktion zum enzymgebundenen Methyl-Corrinoid angenommen. Fruktose und Glukose werden über die Glykolyse verwertet. Die Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse gehen in den Wood-Ljungdahl-Weg ein.

Ein weiteres Substrat, welches von *A. woodii* abgebaut werden kann ist Ethanol [125]. Die Ethanoloxidation erfolgt mit Hilfe einer bifunktionalen acetylierenden Alkohol-/Aldehyd-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA [125]. Dabei entstehen zwei Moleküle NADH pro Molekül Ethanol [125]:



Aus dem Acetyl-CoA wird zunächst Acetylphosphat und anschließend unter Bildung von ATP Acetat hergestellt [125]. Die Elektronen vom NADH werden teilweise durch den Rnf-Komplex [135, 133, 136] auf Ferredoxin übertragen und gehen in den Wood-Ljungdahl-Weg ein. Die Modellgröße, sowie inhomogene Flussgrenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

S. fumaroxidans

Das Modell von *S. fumaroxidans* wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit erstellt und validiert [114] und später weiter überarbeitet. *S. fumaroxidans* kann Propionat abbauen und gehört zu den sekundären Gärern und kann der Acetogenese zugeordnet werden. *S. fumaroxidans* ist ein strikt anaerober, gram-negativer Organismus mit einem Temperaturoptimum von 37°C und einem pH-Optimum von sieben [104]. Der Organismus bildet unbewegliche stäbchenförmige Zellen und enthält Cytochrome und Quinone. Als Substrat wird in einer syntrophen Gemeinschaft Propionat verwertet. Als Produkte entstehen Acetat und Formiat oder Acetat, H₂ und CO₂ [104]. In Einzelkultur kann der Organismus Fumarat, Succinat, Pyruvat und Sulfat als Elektronenakzeptoren nutzen [137, 104]. Eine Verwertung von Zuckern und Alkoholen erfolgt nicht [104].

Der Citratzyklus ist vollständig vorhanden. Während der oxidative PPW in *S. fumaroxidans* fehlt, wird der nichtoxidative PPW exprimiert. Desweiteren besitzt *S. fumaroxidans* eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, eine Succinat-Dehydrogenase und eine Menaquinolabhängige Fumarat-Reduktase. Die Fumarat-Dehydrogenase ist dabei an einen Protonentransport nach außen gekoppelt (reverser Elektronentransport/Menaquinon-Loop) [138].

Propionat wird auf dem Methylmalonyl-CoA-Weg verwertet (Abbildung 11). Die Gene für die benötigten Proteine wurden von Plugge et al. [138] nachgewiesen. Folgende Reaktionen sind am Methylmalonyl-CoA-Weg beteiligt:



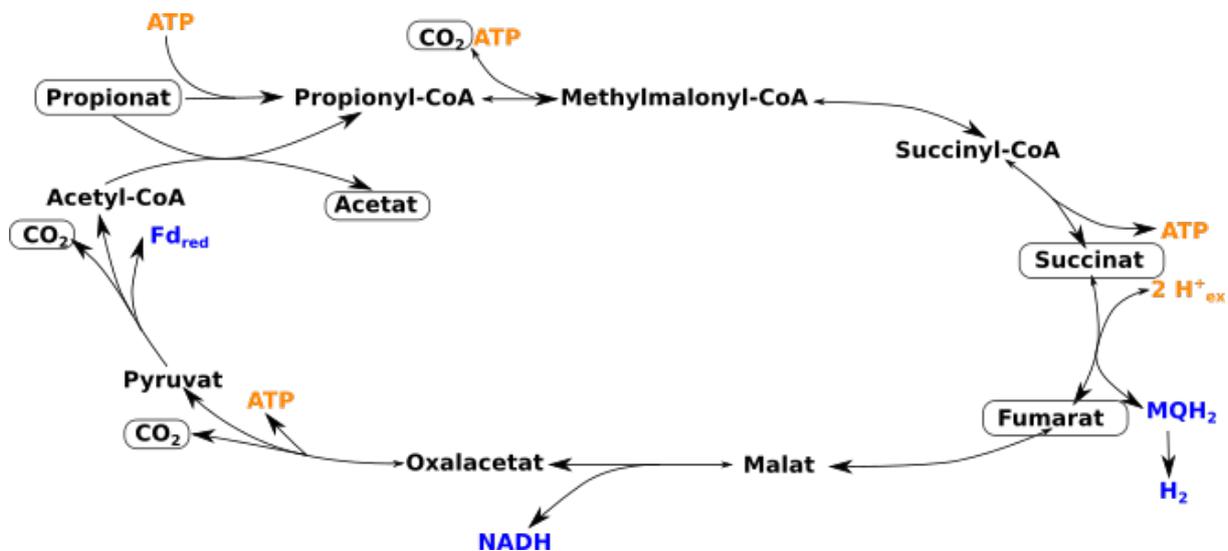
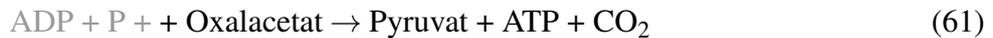
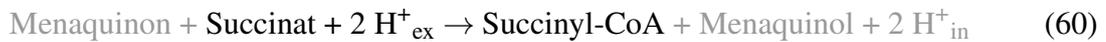
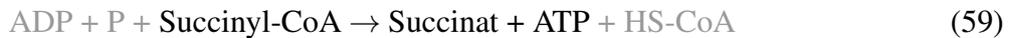


Abbildung 11: Stoffwechselweg der Propionatverwertung in *S. fumaroxidans*. Reduzierte Reduktionsäquivalente sind blau und energiespeichernde Metabolite orange dargestellt. Substrate und Produkte sind eingerahmt. Propionat und Fumarat sind potenzielle Substrate, Succinat und Acetat Produkte. MQ: Menaquinon.

Im ersten Schritt wird Coenzym A von Acetyl-CoA durch eine CoA-Transferase auf Propionat übertragen (55). Es entsteht Propionyl-CoA, welches weiter zu Methylmalonyl-CoA umgewandelt wird (57). Durch eine Methylmalonyl-CoA-Mutase wird daraus Succinyl-CoA gebildet (58). Die folgende Abspaltung von Coenzym A ist an die Produktion von ATP gekoppelt (58). Die folgende Oxidation zu Fumarat über Menaquinol benötigt zusätzliche Energie, die mithilfe eines Protonengradienten aufgewendet wird (60). Das Menaquinol kann für die Bildung von H_2 durch eine Hydrogenase genutzt werden. Fumarat wird über die Reaktionen des Citratzyklus erst zu Malat und anschließend zu Oxalacetat umgewandelt. Bei der folgenden Decarboxylierung von Oxalacetat zu Pyruvat wird ATP gebildet (60). Durch die Pyruvat-Oxidoreduktase wird Acetyl-CoA gebildet, welches wiederum für die Aktivierung von Propionat genutzt wird. Da das Acetyl-CoA teilweise auch für den Aufbau von Biomasse verwendet wird, wurde als Alternative für den ersten Schritt des Methylmalonyl-CoA-Weges, die CoA-Übertragung auf Propionat, eine Reaktion, die die Herstellung von Propionyl-CoA mittels ATP ermöglicht (56), zugefügt.

Insgesamt wird beim Propionatabbau ein ATP durch Substratkettenphosphorylierung gewonnen,

wovon jedoch ein Teil in Form eines Protonengradienten bei der Succinatoxidation zu Fumarat verbraucht wird.

Neben den Genen für den Propionatabbau wurden auch die Gene für den Wood-Ljungdahl-Weg (siehe Abschnitt A. *woodii*) sowie verschiedene Hydrogenasen, eine Formiat-Dehydrogenase sowie ein Rnf-Komplex nachgewiesen [139, 138]. Entsprechend wurden die folgenden Reaktionen eingefügt:



Bei der Verwertung von Fumarat kommt es zu einer Disproportionierung. Ein Teil des Fumarats wird zu Succinat und ein Teil zu Acetyl-CoA, woraus über den Acetyl-CoA-Weg CO_2 gebildet wird, umgewandelt [138, 57]. Die Modellgröße, sowie inhomogene Flussgrenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

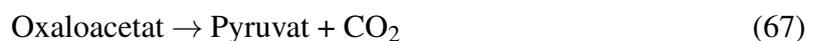
S. wolfei

S. wolfei kann kurzkettige gesättigte Fettsäuren von einer Länge von bis zu acht Kohlenstoffatomen abbauen. Dabei entsteht entweder Acetat und H_2 (gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen) oder Propionat, Acetate und H_2 [103]. Der Abbau der gesättigten Fettsäuren erfolgt ausschließlich in syntrophen Gemeinschaften mit einem wasserstoffkonsumierenden Organismus. Weiterhin kann *S. wolfei* auch in Einzelkulturen auf Crotonsäure wachsen [140, 141].

Der oxidative PPW und der Entner-Doudoroff-Weg sowie Teile des Citratzyklus sind in *S. wolfei* nicht vorhanden, während die Enzyme des nicht-oxidativen PPW und der Glukoneogenese vollständig exprimiert werden. Im Citratzyklus fehlen sowohl die Succinat-Dehydrogenase als auch die Malat-Dehydrogenase, eine Re-Citrat-Synthase wird dagegen exprimiert [142]. Folgende Reaktion wurde eingefügt [84]:



Zudem wurden zwei Reaktionen von Oxaloacetat zu Pyruvat und von Pyruvat zu Oxaloacetat (66,67) ergänzt [84]:



S. wolfei kann zwar verschiedene Fettsäuren verwerten, hier wurde jedoch nur die Verwertung von Butyrat und Crotonat in das Modell übernommen (Abbildung 12). Bei Betrachtung anderer

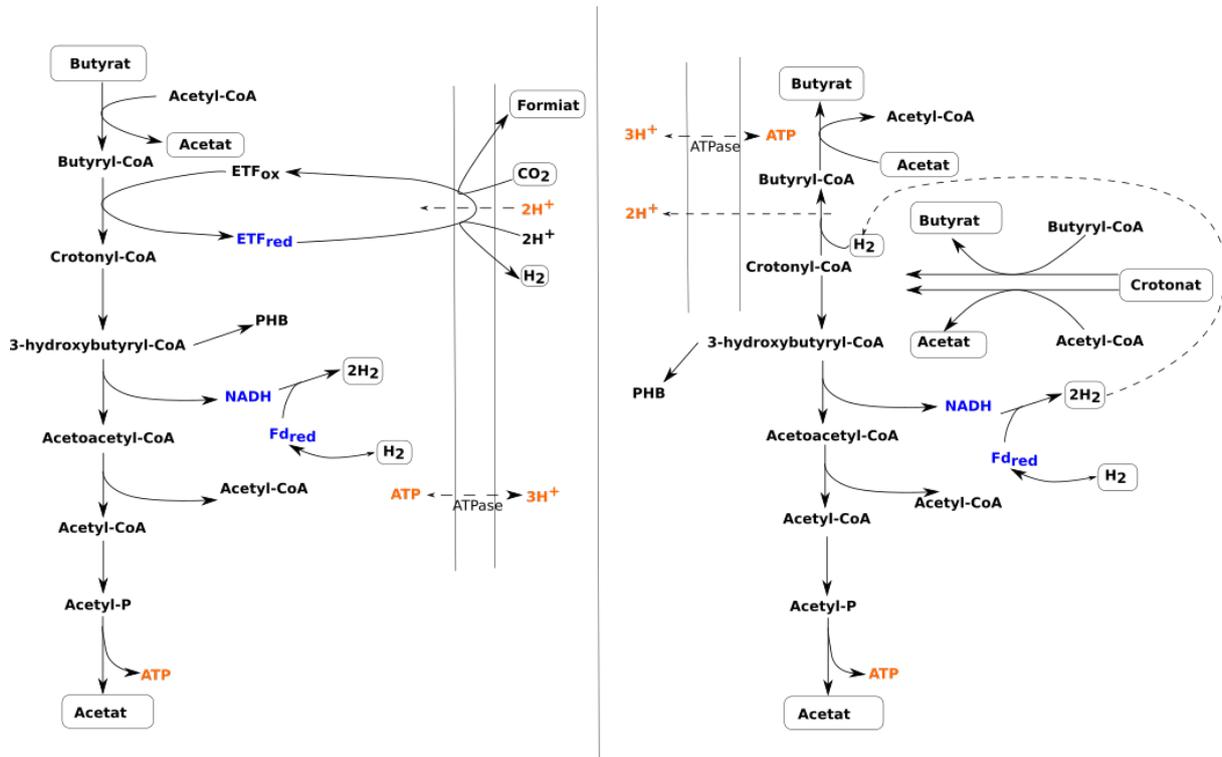
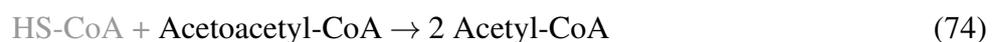
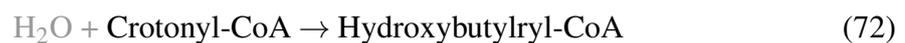
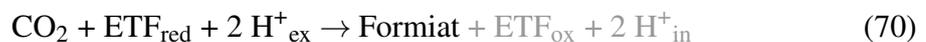
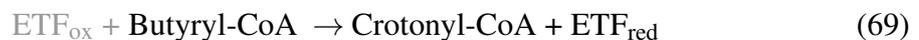
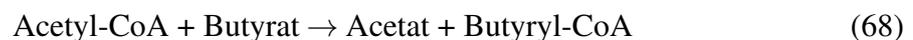


Abbildung 12: Butyrat- und Crotonatstoffwechsels in *S. wolfei*. Reduzierte Reduktionsäquivalente sind blau und energiespeichernde Metabolite orange hervorgehoben. Im Falle von H^+ kann der Protonengradient (außen höhere Protonenkonzentration als innen) beim Einströmen von Protonen nach innen mittels ATPase für die Energiegewinnung genutzt werden, weshalb die extrazellulären Protonen ebenfalls orange dargestellt sind. ETF: Elektronentransferflavoprotein.

Substrate für die Biogasgemeinschaften, die beispielsweise Fette enthalten, müssten die Substrate für *S. wolfei* erweitert werden.

An dem Abbau von Butyrat sind folgende Reaktionen beteiligt:

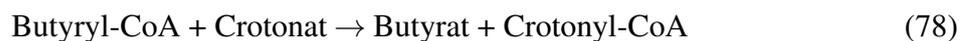


Im ersten Schritt erfolgt eine Aktivierung des Butyrats durch eine CoA-Transferase, die Coenzym A von Acetyl-CoA auf Butyrat überträgt (68). Es folgt die Oxidation zu Crotonyl-CoA, wobei

die Elektronen auf ein Elektronentransferflavoprotein (ETF) übertragen werden (69). Die Wasserstoffbildung aus dieser Reaktion ist energetisch ungünstig und deshalb an einen rückläufigen Elektronentransport gekoppelt [143]. Die Elektronen werden von ETF über Menaquinon in der Membran auf Cytochrom und von dort auf eine nach außen gerichtete Formiat-Dehydrogenase übertragen und mit zwei Protonen und CO_2 zu Formiat umgewandelt [144, 142]. Dabei wird Energie benötigt, die durch eine ATPase in Form eines Protonengradienten zur Verfügung gestellt wird [144, 142]. Insgesamt werden pro gebildetem Formiat zwei Protonen transloziert. Als zusammengefasste Gleichung wurde Gleichung (70) in das Modell eingeführt. Als alternativer Übertragungsweg wurde die Übertragung auf zwei Protonen unter Bildung von Wasserstoff angenommen (71).

Das zuvor gebildete Crotonyl-CoA wird in einer Kondensationsreaktion zu Hydroxybutyryl-CoA umgewandelt (72), welches anschließend zu Acetoacetyl-CoA oxidiert wird (73). Die Elektronen werden auf NAD^+ übertragen. Das Acetoacetyl-CoA wird unter Anlagerung von CoA in zwei Acetyl-CoA gespalten (74). Dabei wird ein Acetyl-CoA für die Aktivierung von Butyrat (68) und das zweite bei der Substratkettenphosphorylierung (75,76) für die Energiegewinnung genutzt. Insgesamt wird durch Substratkettenphosphorylierung ein Energiegewinn von einem ATP pro mol Butyrat erzielt. Durch den rückläufigen Elektronentransport gehen hiervon jedoch zwei Drittel in Form eines Protonengradienten verloren.

Ein weiteres Substrat, welches in das Modell von *S. wolfei* eingefügt wurde, ist Crotonat, worauf der Organismus auch in Einzelkultur wachsen kann [140, 141, 145]. Folgende Reaktionen wurden hierfür in das Modell eingefügt:



Bei der Verwertung von Crotonat kommt es zu einer Disproportionierung, bei der ein Teil des Crotonats zu Butyrat und ein Teil zu Acetat umgewandelt wird [145]. Zunächst erfolgt auch bei Crotonat eine Aktivierung durch eine CoA-Transferase, die CoA von Acetyl-CoA auf Crotonat überträgt (77). Da von Schmidt et al. [144] verschiedene Isoenzyme der an der β -Oxidation der beteiligten Enzyme gefunden wurden, wird das CoA möglicherweise auch von Butyryl-CoA übertragen, weshalb diese Alternative in das Modell eingeführt wurde (78).

Extraplasmatische Formiat-Dehydrogenasen wurden in Crotonatkulturen nicht nachgewiesen [144] und der genaue Weg der Elektronenübertragung ist hier nicht beschrieben. Für das Modell wurde angenommen, dass bei der Bildung von Butyryl-CoA aus Crotonyl-CoA über Elektronentransportprozesse Energie gewonnen wird. Die Bildung von Wasserstoff aus NADH ist energetisch ungünstig. Hier erfolgt möglicherweise eine Kopplung an die energetisch günstige Oxidation von Ferredoxin. Die Enzyme hierfür wurden teilweise isoliert [142, 23] und ähnliche Mechanismen für andere Organismen beschrieben.

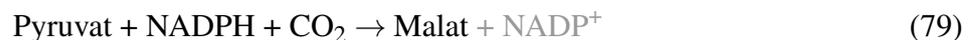
Da bei *S. wolfei* die Einlagerung von Poly- β -Hydroxybuttersäure beschrieben ist [146], berücksichtigte das ursprüngliche Modell [109] diese Einlagerung in die Biomasse. Diese Einlagerung wurde entfernt, da schwer abzuschätzen, wie viel Poly- β -Hydroxybuttersäure in einer methanogenen Anreicherungskultur unter Konkurrenzbedingungen eingelagert werden kann.

In einer ersten Version des Stoffwechselmodells für *S. wolfei* war mit dem oben beschriebenen Modell kein Wachstum möglich. Als Ursache hierfür wurde der unterbrochene Citratzyklus identifiziert. Bei der Biomassebildung wird in kleinen Mengen auch Malat produziert, das normalerweise im Citratzyklus weiterverwertet wird. Durch die fehlende Malat-Dehydrogenase ist eine Weiterverwertung nicht möglich und durch die Fließgleichgewichtsbedingung ist das Wachstum folglich blockiert. Da keine Information über Stoffwechselwege in *S. wolfei*, die Malat weiterverwerten gefunden wurden, wurde die im Vergleich zu anderen Produkten geringe Menge an gebildetem Malat im Modell vernachlässigt. Die Modellgröße, sowie inhomogene Flussgrenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

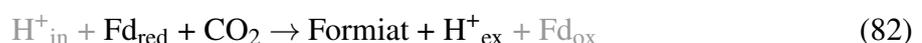
D. vulgaris

D. vulgaris ist ein sulfatreduzierendes Bakterium welches bei der Verwertung von organischen Substraten wie Laktat, Pyruvat und Ethanol Acetat bildet [100]. In Abwesenheit von Sulfat und anderen externen Elektronenakzeptoren kann *D. vulgaris* in syntrophen Gemeinschaften wachsen und produziert dabei H_2 oder Formiat [101, 102].

In *D. vulgaris* ist der Citratzyklus unvollständig und der oxidative PPW sowie der Glyoxylatweg fehlen [147, 148]. Im Citratzyklus fehlen die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und die Malat-Dehydrogenase [148]. Entsprechend der Flussanalyse von Tang et al. [148] wurden die Reaktionen von Pyruvat zu Malat und von Pyruvat zu Oxaloacetat (Pyruvatcarboxylase) eingefügt:



Bei der Energiegewinnung in *D. vulgaris* sind verschiedene Elektronenübertragungsprozesse beteiligt. In verschiedenen Stämmen von *Desulfovibrio* wurden Coo/-Ech-Hydrogenasen oder Rnf-Komplexe nachgewiesen [149, 150, 151, 152]. Die Coo/Ech-Hydrogenasen koppeln die Oxidation von Ferredoxin (81,82) und der Rnf-Komplex die Reduktion von NAD^+ durch Ferredoxin an den Aufbau eines Protonengradienten [111, 152]:



Für die Oxidation von NADH existiert zudem ein Elektronenbifurkationsmechanismus durch den Flox/Hdr-Komplex [149, 150, 151]. Hierbei wird bei der Oxidation des NADH ein Heterodisulfid

reduziert:



Die Oxidation des Heterodisulfids ist wahrscheinlich energetisch ungünstig und wurde deshalb im Modell an den Verbrauch eines Elektronengradienten gekoppelt:



Als Stöchiometrien wurde hierbei ein Protonentransfer von einem Proton pro oxidierten Ferredoxin durch die Coo/Ech-Hydrogenasen und den Rnf-Komplex und eine Stöchiometrie von zwei Protonen pro Oxidation eines Heterodisulfids angenommen.

Bei der Laktatoxidation zu Pyruvat durch eine Laktat-Dehydrogenase werden die Elektronen auf das Heterodisulfid übertragen [153, 154]. Für die Ethanoloxidation wurde NAD^+ als Elektronenakzeptor für die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd angenommen. Da das Potenzial für die Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat niedrig genug ist [155, 111], wurde für diese Reaktion Ferredoxin als Elektronenakzeptor im Modell verwendet. Der Energiegewinn erfolgt über die oben genannten Elektronenübertragungsprozesse.

Aufgrund der verschiedenen involvierten Elektronenakzeptoren bei der Verwertung von Laktat, Pyruvat und Ethanol ergeben sich Unterschiede im Energiegewinn. Mit den oben getroffenen Annahmen ist der Energiegewinn für Pyruvat am höchsten, Laktat am zweithöchsten und für Ethanol am geringsten. Die Modellgröße, sowie inhomogene Flussgrenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

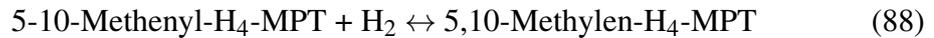
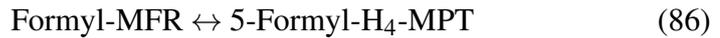
M. barkeri

M. barkeri gehört zu den Archaeen und ist ein methanogener Organismus, der Cytochrome exprimiert [156, 157]. Er hat ein breites Substratspektrum für die Methanogenese und kann sowohl Acetat als auch Wasserstoff und CO_2 , Methanol und Methylamine verwerten [107, 108]. Formiat wird dagegen nicht als Substrat genutzt. Im Biogasprozess repräsentiert er die acetoklastische und hydrogenotrophe Methanogenese in cytochromhaltigen Methanogenen.

Im Citratzyklus exprimiert *M. barkeri* nur die Citrat-Synthase, die Aconitat-Hydratase und die Isocitrat-Dehydrogenase. Alle Gene der Glukoneogenese und des oxidativen PPW sind vorhanden [84].

Nachfolgend ist die Methanogenese ausgehend von CO_2 und Wasserstoff beschrieben, die folgende Reaktionen beinhaltet [157]:





Im ersten Schritt wird CO_2 mit Methanofuran (MFR) verknüpft und reduziert. Es entsteht Formyl-MFR. Die Elektronen stammen dabei von Ferredoxin. Da die Reduktion von Ferredoxin durch Wasserstoff energetisch ungünstig ist, ist sie an eine Protonentranslokation durch eine Ech-Hydrogenase gekoppelt. Diese Schritte wurden im Modell zusammengefasst (85). Es folgen zwei Reduktionsschritte zunächst zu Methylen-tetrahydro-MPT und anschließend zu Methyl-tetrahydro-MPT. Die Elektronen werden dabei jeweils von F_{420} übertragen, welches wiederum mit Wasserstoff ohne Energieverlust reduziert werden kann. Zur Vereinfachung wurden im Modell die zusammengefassten Reaktionsgleichungen mit Wasserstoff als Elektronendonator verwendet (88,89).

Anschließend wird die Methylgruppe von Methyl-tetrahydro-MPT auf Coenzym M übertragen. Diese Reaktion ist exergon und mit der Translokation von zwei Natriumionen aus der Zelle gekoppelt (90). Im nächsten Schritt wird die Methylgruppe weiter zu CH_4 reduziert. Elektronendonator ist hierbei Coenzym B, welches das Coenzym M bindet, sodass ein Coenzym-M-Coenzym-B-Komplex entsteht. Die Reduktion dieses Komplexes mit Wasserstoff ist in *M. barkeri* an die Translokation von vier Protonen aus der Zelle gekoppelt. Bei dieser Reduktion entstehen wieder Coenzym M und Coenzym B, welche erneut in die Methanogenese eingehen. Die Reduktion von Methyl-Coenzym M sowie die anschließende Reduktion des Coenzym-M-Coenzym-B-Komplex wurde in Gleichung (91) zusammengefasst. In der Gesamtbilanz werden netto zwei Protonen und zwei Natriumionen aus der Zelle transportiert. Unter der Annahme, dass *M. barkeri* einen Protonen-/Natriumionenantiporter mit einer Stöchiometrie von zwei Protonen pro Natriumion besitzt und die ATPase vier Protonen für die Bildung eines ATP benötigt, ergibt sich ein Energiegewinn, der 1,5 ATP pro gebildetem CH_4 entspricht.

Ein weiteres Substrat, das von *M. barkeri* für die Methanogenese genutzt werden kann, ist Methanol. Die Verwertung erfolgt über das sogenannte MT1-/MT2-System, welches aus Methyl-Transferasen besteht [158, 159]. Die Methylgruppe des Methanol wird unter Abspaltung von Wasser auf ein Eisenschwefelprotein und anschließend auf Coenzym M übertragen. In das Modell wurde die folgende zusammengefasste Gleichung für die Methanogenese aus Methanol eingefügt:



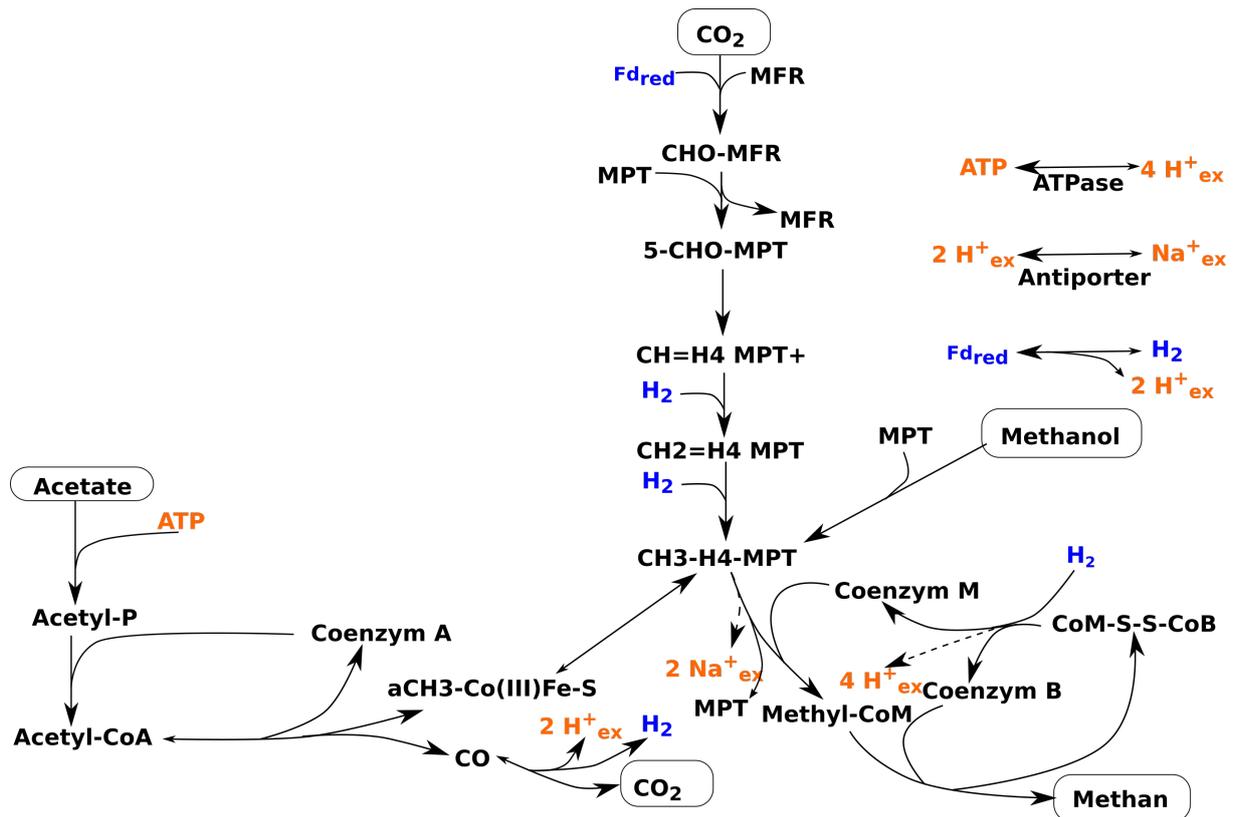


Abbildung 13: Methanogenese in *M. barkeri*. Reduzierte Reduktionsäquivalente sind blau und energiespeichernde Metabolite orange hervorgehoben. Im Falle von H^+ und Na^+ kann der Protonen- bzw. Natriumgradient an der Membran (außen höhere Konzentration als innen) für die Energiegewinnung mittels ATPase genutzt werden, weshalb die extrazellulären Protonen und Natriumionen ebenfalls orange dargestellt sind. In einigen Fällen wurde im Modell vereinfacht H_2 als Elektronendonator verwendet, auch wenn im Organismus teilweise andere Reduktionsäquivalente (F420) verwendet werden. Diese werden über Hydrogenasen (energieneutral) mit Wasserstoff reduziert. Intrazelluläre Ionen sind nicht mit aufgeführt. MFR: Methanofuran, MPT: Sarcinapterin.

Da in den folgenden Schritten (91) für die Reduktion des Coenzym-M-Coenzym-B-Komplex Wasserstoff (Reduktionsäquivalente) benötigt wird, muss ein Teil des aufgenommenen Methanol den umgekehrten Weg der hydrogenotrophen Methanogenese durchlaufen um auf diesem Wege Wasserstoff zu bilden. Dementsprechend sind die Reaktionen (85) bis (90) reversibel.

Bei der Verwertung von Acetat wird Acetat zunächst durch eine Acetat-Kinase aktiviert und anschließend Acetyl-CoA gebildet [160, 161]. Für die Aktivierung wird ein ATP benötigt. Bei der acetoklastischen Methanogenese kommt es zu einer Disproportionierung: Die Methylgruppe des Acetyl-CoA wird zu CH_4 reduziert, während die Carboxgruppe zu CO_2 oxidiert wird [160]. Das Schlüsselenzym für diese Disproportionierung ist die bifunktionale CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase. Unter Abspaltung von Coenzym A kommt es zur Bildung von enzymgebundenem Kohlenstoffmonoxid (CO) und Methylgruppe. Das CO wird mithilfe von Wasser und oxidiertem Ferredoxin zu CO_2 oxidiert. Die Methylgruppe wird dagegen zunächst auf Tetrahydromethanopterin und anschließend auf Coenzym M übertragen (91). Die Elektronen des Ferredoxin

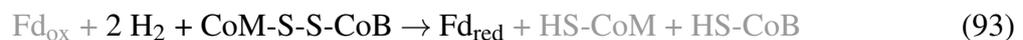
werden auf Methanophenazin in der Membran übertragen und für die Reduktion des Coenzym-M-Coenzym-B-Komplex genutzt. Hierbei wird wie auch bei der hydrogenotrophen Methanogenese ein Protonengradient für die Energiegewinnung erzeugt. Insgesamt werden zwei Natriumionen und vier Protonen aus der Zelle transportiert. Zusammen mit dem ATP, welches für die Aktivierung von Acetat aufgewendet wird, ergibt sich eine Energiegewinn von einem ATP. Die Methanogenese in *M. barkeri* ist in Abbildung 13 zusammengefasst dargestellt. Die Modellgröße, sowie inhomogene Flussgrenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

M. hungatei

M. hungatei ist ein cytochromfreier methanogener Organismus, der zu den Archaeen gehört [157]. Er kann Formiat sowie Wasserstoff und CO₂ für die Methanogenese nutzen [105]. Im Rahmen dieser Arbeit repräsentiert er als Modellorganismus die hydrogenotrophe Methanogenese in cytochromfreien Organismen. *M. hungatei* besitzt keinen oxidativen PPW, keinen Glyoxylatweg und der Citratzyklus ist unvollständig. Die Reaktionen von Oxalacetat bis 2-Oxoglutarat (s. Tabelle 5) fehlen, die übrigen Reaktionen sind vorhanden. Alle Gene für die Glukoneogenese sind vorhanden. [84]

Die ersten Reaktionen (85)-(89) der Methanogenese aus Wasserstoff und CO₂ bei cytochromfreien Methanogenen laufen auf demselben Wege wie bei Methanogenen mit Cytochromen ab. Da die cytochromfreien Methanogenen kein Methanophenazin besitzen [157], kann die Reduktion des Coenzym-M-Coenzym-B-Komplex nicht auf die gleiche Weise wie bei *M. barkeri* erfolgen. Es wurden auch keine Hinweise darauf gefunden, dass membranständige Proteine in der Reduktion des Coenzym-M-Coenzym-B-Komplex involviert sind. Aus diesem Grund gewinnt der Organismus hier auch keine Energie in Form eines Protonengradienten, wie es bei *M. barkeri* der Fall ist. Thauer et al. [157] schlugen einen Mechanismus vor, der erklärt, wie der Organismus dennoch Energie gewinnen und somit wachsen kann.

Bei dem vorgeschlagenen Mechanismus ist die Reduktion des Coenzym-M-Coenzym-B-Komplex an die Reduktion von Ferredoxin gekoppelt:



Katalysiert werden die Reaktionen von einem Hydrogenase-Heterodisulfid-Reduktase-Komplex. Das reduzierte Ferredoxin kann im ersten Schritt der Methanogenese eingesetzt werden. Dadurch wird der Energieverbrauch durch die Ech-Hydrogenase gespart.

Insgesamt ergibt sich somit ein Nettoenergiegewinn von zwei translozierten Natriumionen. Unter der Annahme, dass der Organismus eine ATPase besitzt, die durch den Transport von vier Natriumionen in die Zelle, die Bildung von einem ATP katalysiert, entspricht das einem halben ATP pro gebildetem Molekül CH₄ in der hydrogenotrophen Methanogenese. Die Methanogenese

in *M. hungatei* ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Modellgröße, sowie inhomogene Flussgrenzen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

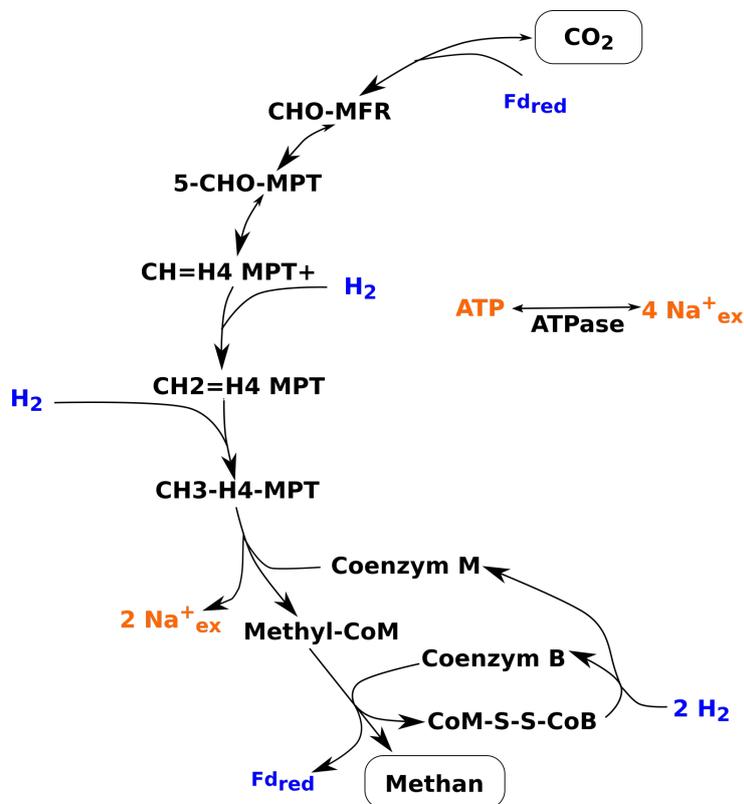


Abbildung 14: Methanogenese in *M. hungatei*. Reduzierte Reduktionsäquivalente sind blau und energiespeichernde Metabolite orange hervorgehoben. Im Falle von Na^+ kann der Natriumgradient an der Membran (außen höhere Konzentration als innen) für die Energiegewinnung mittels ATPase genutzt werden, weshalb die extrazellulären Natriumionen ebenfalls orange dargestellt sind. In einigen Fällen wurde im Modell vereinfacht H_2 als Elektronendonator verwendet, auch wenn im Organismus teilweise andere Reduktionsäquivalente (F420) verwendet werden. Diese werden über Hydrogenasen (energieneutral) mit Wasserstoff reduziert. MFR: Methanofuran, MPT: Sarcinapterin.

Modellvalidierung und Flussgrenzen

Die erstellten Einzelmodelle der neun Modellorganismen dienen als Bausteine für die Gemeinschaftsmodelle und wurden zur Überprüfung mit Daten aus der Literatur verglichen. Als Vergleichsdaten eignen sich Ausbeuten von ATP oder Produkt, sowie theoretische maximale Biomasseausbeuten. Die theoretische maximale Biomasseausbeute, ist die Biomasseausbeute, die erreicht werden kann, wenn keine Energie für den Erhaltungsstoffwechsel aufgewendet werden muss. Die tatsächlich beobachtete Biomasseausbeute (mit Erhaltungsstoffwechsel) ist im Normalfall abhängig von der Wachstumsrate und ist bei unbekanntem Erhaltungskoeffizienten deshalb ungeeignet für den Vergleich mit dem Modell. Experimentell kann die theoretisch maximale Biomasseausbeute mit Hilfe von kontinuierlichen Versuchen mit verschiedenen Verdünnungsraten ermittelt werden [112]. Im Modell wird sie berechnet, indem der Erhaltungskoeffizient auf null gesetzt und die Biomassebildung für eine feste Substrataufnahmerate maximiert wird. Das

Verhältnis der Biomassebildungsrate und Substrataufnahmerate ergibt die maximale theoretische Biomasseausbeute. Tabelle 6 zeigt den Vergleich der maximalen Biomasse- und ATP-Ausbeuten zwischen experimentellen Daten und Modell der jeweiligen Organismen beim Wachstum auf verschiedenen Substraten. In einigen Fällen waren keine experimentellen Daten verfügbar, insbesondere für Organismen, die hauptsächlich syntroph wachsen und für die eine Kultivierung in Einzelkultur schwierig oder unmöglich ist. Die Simulationsergebnisse sind dennoch aufgeführt. Da für *E. coli* ein zuvor veröffentlichtes Modell unverändert übernommen wurde, wurde hierfür keine Modellvalidierung durchgeführt.

Tabelle 6: Modellvalidierung der Einzelmodelle. Aufgezeigt sind die Simulationsergebnisse der Modelle für die maximale Biomasseausbeute $Y_{X/S}$ (ohne Erhaltungskoeffizient) und die maximale ATP-Ausbeute $Y_{ATP/S}$ für die einzelnen Organismen und verschiedenen Substrate, sowie die theoretischen maximalen Biomasseausbeuten aus der Literatur (falls vorhanden). Literaturdaten wurden auch für nah verwandte Organismen herangezogen. Bei mehreren Substraten ist das unterstrichene die Bezugsgröße für die Ausbeuten.

Organismus	Substrat	$Y_{X/S}$ Modell [g _{TM} /mol]	$Y_{ATP/S}$ Modell [mol/mol]	$Y_{X/S}$ Literatur [g _{TM} /mol]	Kommentar
<i>P. freudenreichii</i>	Glukose	42,90	2,89	21,60-27,00 [162] 43,20 [163]	nicht max. Ausbeute
	Laktat	10,00	0,78	9,00 [163]	
	Ethanol	10,00	0,78		
<i>S. wolfei</i>	Butyrat	3,90	0,33		
	Crotonat	12,90	0,83	14,60 [140]	nicht max. Ausbeute
<i>A. woodii</i>	Glukose	62,40	4,45		
	Fruktose	62,40	4,45	61,00 [164]	
	Laktat	13,40	1,08	14,40 [165]	
	<u>H₂</u> + CO ₂	1,40	0,11	1,70 [165]	
	Ethanol	8,70	0,70	5,60 [166]	nicht max. Ausbeute
	<u>Ethanol</u> + CO ₂	11,50	0,92		
	<u>Methanol</u> + CO ₂	9,20	0,73	8,10 [167]	
	<u>Methanol</u> + Formiat	10,60	0,85	16,50 [124]	Methanol: Formiat 1:1
<i>S. fumaroxidans</i>	Fumarat	12,30	0,70		keine H ₂ - oder Formiat- akkumulation
	Propionat	6,60	0,50		syntroph
	<u>Propionat</u> + Sulfat	10,20	0,81	1,24 [168]	nicht max. Ausbeute

Tabelle 6: Modellvalidierung der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Organismus	Substrat	$Y_{X/S}$ Modell [g _{TM} /mol]	$Y_{ATP/S}$ Modell [mol/mol]	$Y_{X/S}$ Literatur [g _{TM} /mol]	Kommentar
<i>D. vulgaris</i>	Laktat	4,17	0,33		
	Pyruvat	12,52	1,00	10,00 [169]	
	Ethanol	2,09	0,17		
	Sulfat+H ₂	12,10	1,00	12,20 [170]; 12,70, 12,50 [169]	
<i>M. hungatei</i>	H ₂ +CO ₂	4,78	0,50	1,60 [171]	unabhängig von μ
	Formiat	1,32	0,13	1,40 [172]	
<i>M. barkeri</i>	Acetat	11,71	1,25	9,15 [173, 174, 175]	
	H ₂ +CO ₂	9,73	1,50		
	Methanol	5,14	0,63	5,95 [173, 174, 175, 176]	
<i>E. coli</i>	Glukose	46,60	3,00		anaerob

Für das Modell von *C. acetobutylicum* ist aufgrund des stark verzweigten Stoffwechsels, der mit einer Vielzahl unterschiedlicher Produkte mit verschiedenen Ausbeuten an ATP und Biomasse einhergeht, keine Modellvalidierung wie bei den übrigen Organismen möglich. Es ergibt sich eine Vielzahl möglicher Zusammensetzungen an Produkten und dadurch ein breiter Bereich an Biomasseausbeuten. In Tabelle 7 sind stattdessen die Nettobilanzen ausgehend von Pyruvat für die verschiedenen Produkte angegeben. Dabei ist zu beachten, dass in der Glykolyse bei der Verwertung von Glukose ein ATP und ein NADH pro gebildetem Molekül Pyruvat entstehen.

Tabelle 7: Nettobilanzen von *C. acetobutylicum* ausgehend von Pyruvat für verschiedene Produkte. Das reduzierte Ferredoxin wird für die Bildung von Wasserstoff oder Formiat (hier wird zusätzlich CO₂ verwendet) genutzt.

Produkt	Bilanz
Laktat	Pyruvat + NADH → Laktat + NAD ⁺
Acetat	Pyruvat + Fd _{ox} + ADP + P → Acetat + CO ₂ + ATP + Fd _{red}
Ethanol	Pyruvat + 2 NADH + Fd _{ox} → Ethanol + CO ₂ + Fd _{red} + 2 NAD ⁺
Butyrat	2 Pyruvat + 2 NADH + 2 Fd _{ox} + ADP + P → Butyrat + ATP + 2 CO ₂ + 2 Fd _{red} + 2 NAD ⁺
Butanol	2 Pyruvat + 4 NADH + 2 Fd _{ox} → Butanol + 2 CO ₂ + 2 Fd _{red} + 4 NAD ⁺
Aceton	2 Pyruvat + 2 Fd _{ox} → Aceton + 3 CO ₂ + 2 Fd _{red}

C. acetobutylicum repräsentiert für die modellierten Gemeinschaften einen acidogenen Organismus. Aus diesem Grund wird angenommen, dass hauptsächlich die Bildung der organischen Säuren (Formiat, Acetat, Butyrat, Laktat), sowie Ethanol, H₂ und CO₂ relevant ist.

Für die Modellierung mit stöchiometrischen Modellen ist es wichtig, die oberen (und ggf. unteren) Schranken für die Reaktionsraten abzuschätzen, um unrealistische Lösungen zu vermeiden. Insbesondere obere Grenzen für die Substrataufnahmeraten (verhindern unbegrenztes Wachstum) und der Erhaltungskoeffizient (siehe oben) sind von Bedeutung. Für die Abschätzung dieser Schranken wurden experimentelle Daten aus der Literatur herangezogen (Tabelle 8). Für die Erhaltungskoeffizienten wurden experimentell ermittelte Werte oder Werte aus bestehenden veröffentlichten Modellen der jeweiligen Organismen oder nah verwandter Organismen verwendet. In einigen Fällen unterschieden sich die angegebenen Erhaltungskoeffizienten für verschiedene Kultivierungsbedingungen zum Teil erheblich. Hier wurde ein Mittelwert aus den Daten der Veröffentlichungen gebildet.

Für die Abschätzung der oberen Grenzen für die Substrataufnahmerate wurde der Erhaltungskoeffizient im Modell auf den zuvor geschätzten Wert festgelegt. Anschließend wurden Daten für maximale Wachstumsraten aus der Literatur herangezogen und die Wachstumsrate im Modell auf diesen Wert festgelegt. Es erfolgte eine Minimierung der entsprechenden Substrataufnahme oder Produktbildungsrate. Alle Substrate, die in den zugehörigen Kultivierungsbedingungen nicht verfügbar waren, wurden auf null gesetzt, ebenso nicht gemessene oder erwartete Produkte. Die minimale Substrataufnahmerate aus dieser Flussoptimierung wurde als Ratengrenze für die jeweilige Rate festgelegt. Bei mehreren verfügbaren Werten wurde die höhere Grenze (entspricht der höheren Wachstumsrate) festgelegt. Die verwendeten Literaturdaten und dazu ermittelten Ratengrenzen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Abschätzung der Ratengrenzen für die Einzelmodelle. Aufgeführt sind Literaturdaten für Erhaltungskoeffizienten m_{ATP} und maximale Wachstumsraten μ_{max} , sowie die daraus bestimmten Grenzen für maximale Aufnahmeraten oder Produktionsraten r_{max} . Die unterstrichenen Raten wurden jeweils in das Modell als Grenze übernommen, bei mehreren verfügbaren Erhaltungskoeffizienten wurde der Mittelwert gebildet (vgl. auch Tabelle 9).

Organismus	Substrat	μ_{max} Literatur [h ⁻¹]	r_{max} Modell [mmol/g _{TM} /h]	m_{ATP} Literatur [mmol/g _{TM} /h]
<i>P. freudenreichii</i>	Glukose (+ CO ₂)	0,13 [162]	3,30	0,76 [162]
	Glukose	0,11 [162]	2,80	
		<u>0,16</u> [115]	<u>4,00</u>	-
	Laktat	0,10 [115]	<u>11,00</u>	-
	Ethanol	0,10 [98]	<u>11,00</u>	-
<i>S. wolfei</i>	Butyrat	0,01 [140]	2,07	-
		0,02 [177]	<u>4,25</u>	-
	Crotonat	0,04 [141]	<u>2,85</u>	-
		0,23 [141]	1,72	-
		0,03 [140]	2,14	-
-	-	-	<u>0,14</u> [57]	

Tabelle 8: Abschätzung der Ratengrenzen für die Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Organismus	Substrat	μ_{max} Literatur [h ⁻¹]	r_{max} Modell [mmol/g _{TM} /h]	m_{ATP} Literatur [mmol/g _{TM} /h]
<i>A. woodii</i>	Glukose	0,17 [166]	<u>2,75</u>	-
	Ethanol + Bicarbonat	0,10 [166]	<u>9,00</u>	-
	Laktat	0,036 [165]	<u>3,00</u>	0,01 [165]
	H ₂	0,024 [165]	<u>19,50</u>	0,04 [165]
	Laktat + H ₂	0,04 [165]	-	0,17 [165]
	Methanol + Formiat	0,05 [124]	-	0,57 [124]
	Methanol + CO ₂	<u>0,16</u> [124]	<u>18,10</u>	0,35 [124]
	Fruktose + CO ₂	0,15 [164]	2,42	-
<i>S. fumar-oxidans</i>	Fumarat	0,01 [57]	<u>1,32</u>	-
	Propionat (syntroph)	0,01 [168]	1,60	-
		0,01 [57]	<u>1,68</u>	-
	Propionat + Sulfat	0,004 [168]	0,25	-
	Propionat + Fumarat	<u>0,03</u> [57]	-	-
-	-	-	<u>0,14</u> [57]	
<i>D. vulgaris</i>	Laktat + SO ₄ ²⁻	0,08-0,12 [178]		-
		0,34-0,35 [179]		
	Pyruvat + SO ₄ ²⁻	0,06-0,15 [178]		
	Ethanol + SO ₄ ²⁻	0,04-0,09 [178]		
	Ethanol	0,012-0,013 [180]		
Sulfat+H ₂	0,15-0,23 [169, 170]		5,50 [170]; 1,80; 5,60 [169]	
<i>M. hungatei</i>	H ₂ +CO ₂	0,69 [171]		
	Formiat	0,08 [172]		<u>0,90</u> [172]
<i>M. barkeri</i>	Acetat	0,014 [173]		3,60 [173]
	H ₂ +CO ₂			
	Methanol	0,04 [173]		1,40 [173]

Es gibt viele Fälle, in denen Organismen mehr als ein Substrat verwerten können. Wenn hier nur die Substrataufnahmeraten wie oben beschrieben für alle Substrate festgelegt werden, kann es bei gleichzeitiger Verfügbarkeit mehrerer Substrate dazu kommen, dass eine unrealistisch hohe Wachstumsrate erreicht wird. Im Modell kann hier die Summe der einzelnen maximalen Wachstumsraten erreicht werden. Es gibt zwar Fälle, bei denen bei paralleler Substrataufnahme höhere Wachstumsraten als mit einem Substrat erreicht werden, dieser Effekt ist im Normalfall jedoch nicht so stark ausgeprägt, da es in der Regel weitere Faktoren gibt (z.B. Enzymkapazitäten, Regulation), die dazu führen, dass die Wachstumsrate begrenzt ist [181]. In vielen Fällen werden

mehrere Substrate, insbesondere bei hohen Substratkonzentrationen, nacheinander (sequenziell) verwertet [181]. Für genauere Untersuchungen müssten Experimente mit Substratgemischen für die jeweiligen Organismen durchgeführt werden. Da solche Daten in der Literatur kaum verfügbar sind, wurde im Modell zusätzlich zu den Substrataufnahmeraten die Wachstumsrate begrenzt, wenn mehr als ein Substrat im Modell vorhanden war. Hierbei wurde die jeweils höchste beobachtete Wachstumsrate aus der Literatur gewählt.

Ein mögliches Argument gegen diesen Ansatz ist, dass die Modellorganismen jeweils eine funktionelle Gruppe im Modell repräsentieren. Damit ist es möglich, dass Organismen einer Gruppe in der Realität verschiedene ökologische Nischen besetzen und dabei auch unterschiedliche Substrate verwerten. Der einzelne Organismus erreicht dann zwar auch nicht die unrealistisch hohe Wachstumsrate aus der Summe zweier Substrate, aber die entsprechende Gruppe kann potentiell einen größeren Anteil an der Gemeinschaft annehmen. Im Modell würde dies jedoch verhindert werden, da die hohe Biomasseproduktion den vorgegebenen Ratengrenzen übersteigen würde. In diesem Fall könnte die Begrenzung der Wachstumsrate aufgehoben werden.

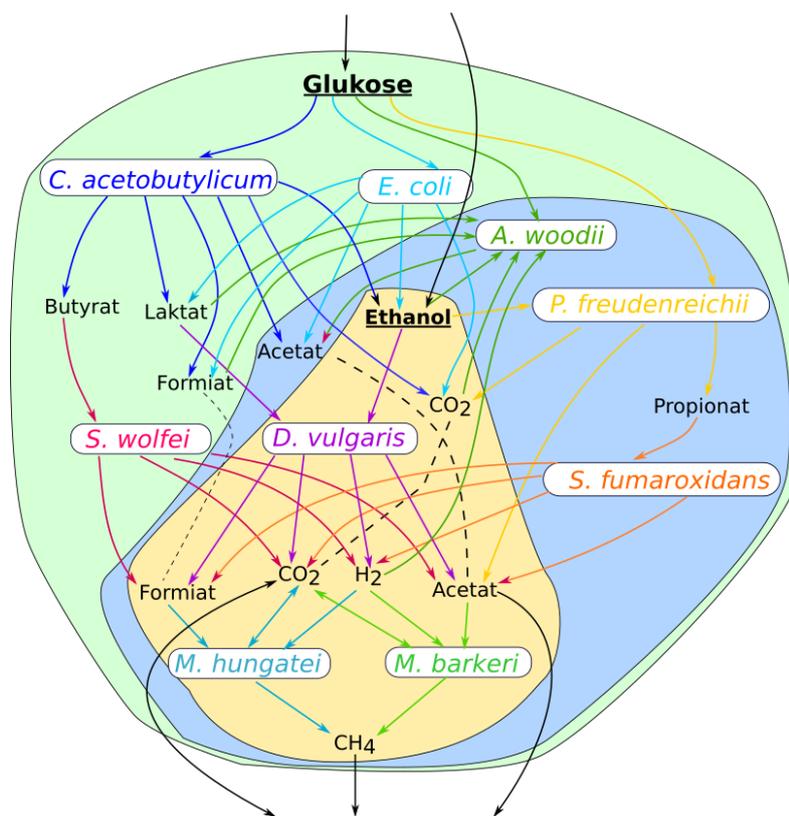


Abbildung 15: Übersicht über die Modellorganismen. Dargestellt sind die neun Modellorganismen mit ihren jeweiligen Substraten und Produkten, die in den Gemeinschaftsmodellen relevant sind. Zudem sind die verschiedenen Gemeinschaften farblich angedeutet: Drei-Organismenmodell (gelb), Sechs-Organismen-Modell (blau), Neun-Organismen-Modell (grün). Die Farbe der Pfeile wurde entsprechend der zugehörigen Organismen gewählt, die Austauschreaktionen sind schwarz dargestellt. Für die Neun-Organismen-Gemeinschaft ist Glukose und für die Sechs- und Drei-Organismen-Gemeinschaft Ethanol das Substrat.

Die Größe der erstellten Einzelmodelle, die festgelegten Ratengrenzen, die Anzahl der elementaren Flussvektoren (werden in späteren Abschnitten diskutiert) sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Einige Substrate sind hier auf null festgelegt. Hierbei handelt es sich um Substrate, die für die betrachteten Gemeinschaften nicht relevant sind. Durch ein Ausschalten der entsprechenden Reaktionen kann Rechenzeit bei der Analyse der Modelle eingespart werden. Ein Übersichtsschema der Modellorganismen mit ihren jeweiligen Substraten und Produkten ist in Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 9: Modelldimensionen, Ratengrenzen und Anzahl der elementaren Flussvektoren in den Einzelmodellen. Die Modelldimension ist angegeben als Anzahl der Metabolite mal die Anzahl der Reaktionen. Die Anzahl der berechneten EFVs bezieht sich auf die aufgeführten Ratengrenzen und zusätzlich auf eine Wachstumsrate von $0,008 \text{ h}^{-1}$. Die letzten drei Spalten geben zudem an, in welchen Gemeinschaftsmodellen die jeweiligen Einzelmodelle verwendet wurden.

Organismus	Modelldimension	Ratengrenzen	# EFVs	Modell		
				3er	6er	9er
<i>E. coli</i> (EC)	99×117	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 3,15$; $r_{\text{Glcup}} \leq 18,5$; $r_{\text{Glycup}} = 0$; $r_{\text{Glucup}} = 0$; $r_{\text{O2up}} = 0$	60653			X
<i>A. woodii</i> (AW)	107×116	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 0,29$; $r_{\text{Glcup}} \leq 2,75$; $r_{\text{Lacup}} \leq 3,00$; $r_{\text{Ethup}} \leq 9,00$; $r_{\text{H2up}} \leq 19,50$; $r_{\text{Formup}} \leq 19,50$; $r_{\text{Frucup}} = 0$; $r_{\text{MeOHup}} = 0$; $\mu \leq 0,16$	4582		X	X
<i>P. freudenreichii</i> (PF)	105×111	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 0,76$; $r_{\text{Glcup}} \leq 4,00$; $r_{\text{Lacup}} \leq 4,00$; $r_{\text{Ethup}} \leq 11,00$; $\mu \leq 0,16$	23878		X	X
<i>C. acetobutylicum</i> (CA)	111×123	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 1,00$; $r_{\text{Glcup}} \leq 12,75$; $r_{\text{Glyc}} = 0$; $r_{\text{Acon}} = 0$; $r_{\text{Butol}} = 0$	1596			X
<i>S. fumaroxidans</i> (SF)	104×114	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 0,14$; $r_{\text{Propup}} \leq 1,60$; $r_{\text{Fumup}} \leq 0,50$; $r_{\text{SO4up}} = 0$	39932		X	X
<i>S. wolfei</i> (SW)	110×114	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 0,14$; $r_{\text{Butpup}} \leq 4,25$; $r_{\text{Crotup}} \leq 2,85$	443			X
<i>D. vulgaris</i> (DV)	99×115	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 4,30$; $r_{\text{Acex}} \leq 50,00$; $r_{\text{SO4up}} = 0$	840	X	X	X
<i>M. barkeri</i> (MB)	96×103	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 2,50$; $r_{\text{CH4ex}} \leq 15,00$	35	X	X	X
<i>M. hungatei</i> (MH)	95×102	$r_{\text{ATPmaint}} \geq 0,90$; $r_{\text{CH4ex}} \leq 15,00$	23	X	X	X

4.2. RedCom-Ansatz

Stöchiometrische Modelle mikrobieller Gemeinschaften sind in der Regel sehr groß und komplex und deshalb schwer zu analysieren. Weiterhin ist die Frage einer geeigneten Zielfunktion nicht trivial [182, 183], sodass im Normalfall auch biologisch irrelevante Lösungen im Lösungsraum enthalten sind. In diesem Abschnitt wird der RedCom-Ansatz für das Erstellen reduzierter Gemeinschaftsmodelle auf Basis ausgewählter elementarer Flussvektoren der Einzelmodelle beschrieben.

Die Grundidee des Ansatzes besteht darin, den Stoffwechsel der einzelnen Organismen durch ausgewählte Nettoumsätze zu beschreiben, statt die kompletten Stoffwechselnetzwerke in das Gemeinschaftsmodell zu übernehmen. Bei Gemeinschaftsmodellen ist häufig der Austausch von Metaboliten zwischen den Organismen (metabolische Abhängigkeiten), die Gesamtproduktion der Gemeinschaft, sowie die Zusammensetzung der Gemeinschaft von Interesse. Für diese Aspekte ist es ausreichend zu betrachten, welche Substrate jeder Organismus in welche Produkte (einschließlich Biomasse) in welcher Menge umsetzen kann. Durch Verknüpfen dieser Informationen von allen Organismen können die oben genannten Aspekte abgedeckt werden. Eine Möglichkeit die Nettoumsätze für die einzelnen Organismenmodelle zu ermitteln besteht darin, die elementare Flussvektoren (EFVs) (s. Abschnitt 2.4.3) zu berechnen. EFVs bilden den kompletten Lösungsraum ab und alle möglichen Nettoumsätze eines Modells lassen sich daraus ableiten. In einer Veröffentlichung von Taffs et al. [44] wurde ein ähnliches Konzept für die Analyse mikrobieller Gemeinschaften beschrieben, in dem anstelle von EFVs jedoch Elementarmoden (EM), die aber keine Ratengrenzen (Substrataufnahmerate, Erhaltungskoeffizient) berücksichtigen und die Organismen somit unzureichend beschreiben, verwendet werden. Weiterhin wurde im Gegensatz zum hier enzuführenden RedCom-Ansatz nicht von ausbalanciertem Wachstum ausgegangen [44]. Eine vereinfachte Darstellung des RedCom-Ansatzes ist in Abbildung 16 gezeigt. Der Beschreibung der einzelnen Schritte folgt ein Beispiel, welches das Vorgehen beim Erstellen eines reduzierten Gemeinschaftsmodells veranschaulicht.

Berechnung der elementaren Flussvektoren

Wie oben beschrieben, wird im RedCom-Ansatz von ausbalanciertem Wachstum ausgegangen (s. Abschnitt 2.4.5). In allen Einzelmodellen wird im ersten Schritt die Wachstumsrate μ_i auf den Wert der zu betrachtenden Gemeinschaftswachstumsrate $\mu_{c,fix}$ festgesetzt. Andere Ratengrenzen wie maximale Substrataufnahmeraten oder Erhaltungskoeffizienten werden ebenfalls berücksichtigt. Es wird davon ausgegangen, dass alle thermodynamisch sinnvollen Lösungen eine nach oben begrenzte Aufnahme von Substrat implizieren. Alle Substrate und Produkte, sowie die Biomasse werden als externe Metabolite definiert. Mit den festgelegten Grenzen werden nun für jedes Einzelmodell die elementaren Flussvektoren (EFVs) berechnet. Entsprechend der hier beschriebenen Annahme werden von den berechneten EFVs alle internen Zyklen entfernt, da sie thermodynamisch nicht sinnvoll sind [184, 185]. Da die Substrataufnahme nach oben

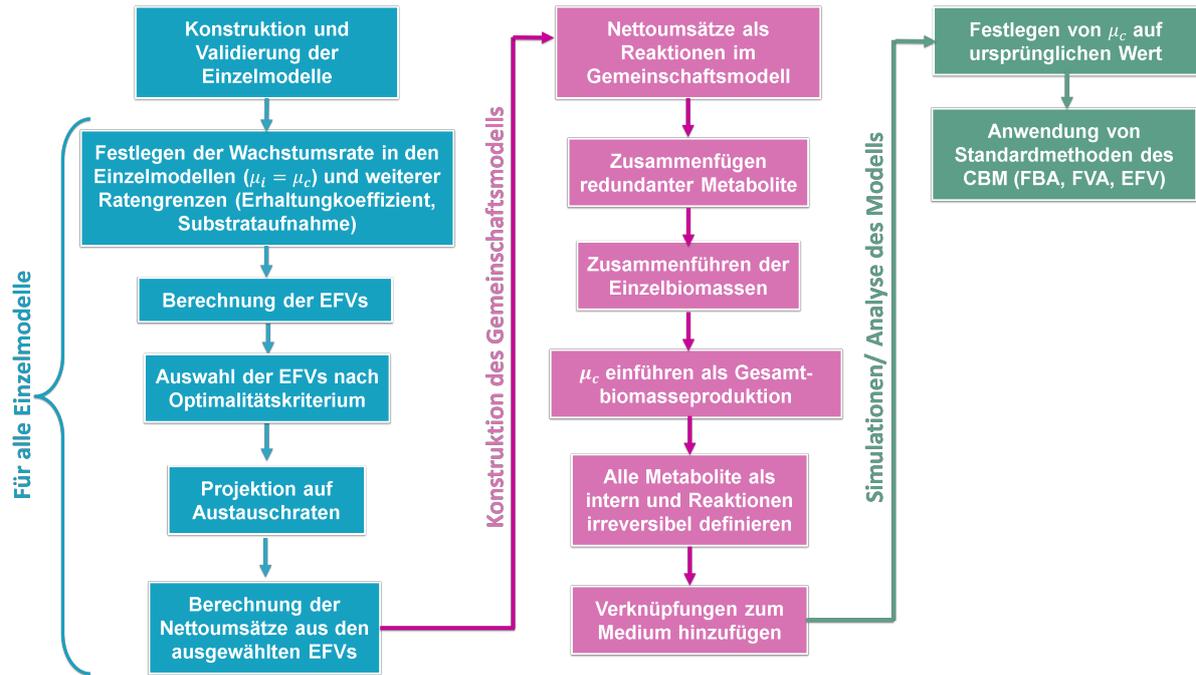


Abbildung 16: Schematische Darstellung des RedCom-Ansatzes. Dargestellt sind die einzelnen Schritte, die mit den Einzelmodellen durchgeführt werden (blau), der anschließende Aufbau des reduzierten Gemeinschaftsmodells (magenta) und die Analyse des Gemeinschaftsmodells (grün).

begrenzt wurde, bleiben nur beschränkte EFVs übrig und der Lösungsraum bildet einen Flusspolyeder. Ein Rezessionskegel ist nicht vorhanden. Der Flusspolyeder des Lösungsraums lässt sich folgendermaßen durch konvexe Kombinationen der beschränkten EFVs aufspannen:

$$\mathbf{P} = \left\{ r \in \mathfrak{R}^n \mid r = \sum_{k \in K} \gamma_k \mathbf{p}^k, \gamma_k \geq 0, \sum_{k \in K} \gamma_k = 1 \right\}. \quad (94)$$

Um nur den Teil des Lösungsraumes abzubilden, der von Interesse ist und um biologisch unrealistische Lösungen auszuschließen, werden die EFVs nach einem Optimalitätskriterium ausgewählt. Die ausgewählten EFVs beschreiben den relevanten Lösungsraum und werden für die Erstellung des reduzierten Modells verwendet.

Auswahl der EFVs

Als Auswahlkriterium wurde hier minimaler Substratumsatz verwendet, das Kriterium kann jedoch angepasst werden. Je nach Kriterium werden die EFVs vollständig betrachtet oder es erfolgt wie hier nur die Projektion auf (u) Austauschreaktionen inklusive der Wachstumsrate:

$$\mathbf{e} = \begin{pmatrix} e_1 \\ \vdots \\ e_{u-1} \\ e_\mu \end{pmatrix}. \text{ Austauschreaktionen enthalten mindestens einen externen Metabolit.}$$

Nach Projektion auf die Austauschreaktionen werden alle redundanten EFVs mit identischem Nettoumsatz der externen Metabolite entfernt. Wie oben erwähnt, werden Lösungen mit minimalem Substratumsatz ausgewählt, was dazu führt, dass Lösungen mit geringer Effizienz (z.B. niedrige Biomasse-/ATP-Ausbeute) entfernt werden. Die projizierten EFVs werden in der Matrix $\mathbf{E} = [\mathbf{e}^1 \dots \mathbf{e}^s]$ gespeichert. Ein projizierter EFV \mathbf{e}^k wird entfernt, wenn es eine Konvexkombination \mathbf{w} aus anderen projizierten EFVs gibt, in denen alle Austauschraten kleiner oder gleich zu denen in \mathbf{e}^k sind.

Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn eine Lösung \mathbf{w} für das folgende System existiert:

$$\begin{aligned} \mathbf{E}^* \mathbf{w} &\leq \mathbf{e}^k \\ (1 \dots 1) \mathbf{w} &= 1 \\ \mathbf{w} &\geq \mathbf{0}. \end{aligned} \tag{95}$$

Dabei ist $\mathbf{E}^* = [\mathbf{e}^1 \dots \mathbf{e}^{k-1} \mathbf{e}^{k+1} \dots \mathbf{e}^s]$ die Matrix \mathbf{E} , aus der die Spalte des ausgewählten EFV gelöscht wurde. Die Lösungen von (95) müssen Konvexkombinationen sein (zweite Zeile), damit die vordefinierte Wachstumsrate und weitere inhomogene Schranken erfüllt sind. Bei jedem ausgewählten EFV ist der Umsatz von mindestens einem externen Metabolit kleiner als in den Konvexkombinationen der anderen EFVs. Für eine gegebene Substrat-Produkt-Kombination sind dies die EFVs mit maximaler Biomasseausbeute. Bei verschiedenen potenziellen Produkten wird mindestens ein EFV für jedes Produkt behalten, auch wenn der EFV (bezogen auf das Substrat) im Vergleich zu einem anderen EFV mit einem anderen Produkt eine geringere Biomasseausbeute aufweist. Dies ist sinnvoll, da die Anreicherung eines Produktes das Wachstum hemmen und zum Wechsel eines anderen Stoffwechselweges führen kann. Mit dem oben beschriebenen Optimalitätskriterium bleiben diese Optionen und die Flexibilität des Stoffwechsels im reduzierten Modell erhalten.

Berechnung der Nettoumsätze

Aus den selektierten EFVs werden die Nettoumsätze mit Hilfe der stöchiometrischen Matrix aus dem Einzelmodell wie folgt berechnet:

$$\mathbf{N}^{red} = \mathbf{N}^{EX} \mathbf{E}. \tag{96}$$

Hierbei ist \mathbf{N}^{EX} eine Submatrix aus der stöchiometrischen Matrix des Einzelmodells, die nur die Zeilen der externen Metabolite und die Spalten der Austauschreaktionen enthält. \mathbf{E} enthält die auf die Austauschreaktionen projizierten ausgewählten EFVs und \mathbf{N}^{red} ist die neue stöchiometrische Matrix, die die selektierten Nettoumsätze aus dem Einzelmodell als Reaktionen enthält.

Aufbau des reduzierten Gemeinschaftsmodells

Die oben beschriebenen Schritte werden für alle Einzelmodelle ausgeführt. Die berechneten Nettoumsätze aus den Einzelorganismenmodellen dienen als Reaktionsgleichungen im Gemeinschaftsmodell.

Dementsprechend bilden sie zusammen die neue stöchiometrische Matrix des Gemeinschaftsmodells:

$$\mathbf{N}^{c,red} = \begin{pmatrix} \mathbf{N}^{red,1} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \ddots & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{N}^{red,i} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \ddots & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{N}^{red,n} \end{pmatrix}. \quad (97)$$

Der stöchiometrischen Matrix $\mathbf{N}^{c,red}$ wird die Gesamtbiomasse BM_c als zusätzliche Zeile angehängt. Weiterhin wird für jeden Organismus eine Reaktion, die die Biomasse des Organismus der Gesamtbiomasse hinzufügt, ergänzt (98) und eine Senke für die Gesamtbiomasse hinzugefügt (99). Die Senke der Gesamtbiomasse (rBMc) ist gleichzeitig die Gesamtbiomasseproduktion und deren Rate entspricht damit der Gemeinschaftswachstumsrate μ_c im reduzierten Gemeinschaftsmodell.



Die Reversibilität der Reaktionen entspricht der Reversibilität der zugrundeliegenden EFVs. Da alle EFVs die Produktion von Biomasse und/oder einen Erhaltungskoeffizienten größer null enthalten, sind in der Regel alle EFVs und damit alle Reaktionen des reduzierten Gemeinschaftsmodells irreversibel:

$$r_{ij}^c \geq 0 \text{ for } j \text{ Irrev}_i. \quad (100)$$

Alle Metabolite werden im Gemeinschaftsmodell als interne Metabolite definiert. Da die Organismen typischerweise interagieren, gibt es Metabolite, die für mehrere Organismen relevante Substrate oder Produkte darstellen. Die entsprechenden Metabolite tauchen in der stöchiometrischen Matrix mehrfach auf und müssen zu einer einzelnen Zeile im Modell vereint werden (durch Aufsummieren aller Zeilen, die dasselbe Metabolit repräsentieren und entfernen der ursprünglichen Zeilen). Wichtig ist hierbei, dass die Biomassen nicht miteinander vereint werden.

Vorgehen beim Erstellen von Gemeinschaftsmodellen anhand eines Beispiels

Im Folgenden ist das schrittweise Vorgehen beim Aufbau eines reduzierten Gemeinschaftsmodell anhand des Minibeispiels aus Abschnitt 2.4.5 (Abbildungen 4 und 5) dargestellt.

Da es sich bei den reduzierten Modellen um lineare Modelle mit festgelegter Gemeinschaftswachstumsrate handelt, werden die Wachstumsraten in den Einzelnetzwerken (N1, N2, N3) auf diese Rate, hier exemplarisch $0,8 \text{ h}^{-1}$, festgelegt. Im ersten Schritt werden die EFVs von N1 unter zusätzlicher Beachtung der gegebenen Nebenbedingungen (Tabelle 1) berechnet. Insgesamt gibt es 44 beschränkte sowie einen unbeschränkten EFV. Letzterer ist ein interner Zyklus bestehend aus den Reaktionen R6, R8 und R9. Wie bereits beschrieben, werden interne Zyklen als thermodynamisch nicht möglich angesehen und deshalb nicht für den Aufbau des reduzierten Gemeinschaftsmodells verwendet. Anschließend werden die EFVs auf die Austauschreaktionen (Reaktionen, die mindestens einen externen Metaboliten enthalten) projiziert:

R1	R2	R3	R4	μ_1	
21,8	0,0	0,0	21,0	0,8	EFV1
11,3	0,0	10,5	0,0	0,8	EFV2
21,0	0,8	0,0	21,0	0,8	EFV3
0,0	21,8	0,0	21,0	0,8	EFV4
40,0	0,0	39,2	0,0	0,8	EFV5
40,0	0,0	0,0	39,2	0,8	EFV6
40,0	0,8	0,0	40,0	0,8	EFV7
40,0	0,0	0,0	39,2	0,8	EFV8
0,0	30,0	0,0	29,2	0,8	EFV9
20,8	30,0	50,0	0,0	0,8	EFV10
21,8	0,0	0,0	21,0	0,8	EFV11
40,0	30,0	29,2	40,0	0,8	EFV12
40,0	30,0	0,0	69,2	0,8	EFV13
40,0	30,0	50,0	19,2	0,8	EFV14
40,0	30,0	50,0	19,2	0,8	EFV15
40,0	0,0	0,0	39,2	0,8	EFV16
40,0	0,0	0,0	39,2	0,8	EFV17
40,0	0,8	0,0	40,0	0,8	EFV18
0,0	30,0	0,0	29,2	0,8	EFV19
40,0	30,0	0,0	69,2	0,8	EFV20
22,6	0,0	21,8	0,0	0,8	EFV21
40,0	0,0	21,8	17,4	0,8	EFV22
40,0	0,0	10,5	28,7	0,8	EFV23
40,0	0,0	39,2	0,0	0,8	EFV24
40,0	10,8	50,0	0,0	0,8	EFV25
40,0	10,8	50,0	0,0	0,8	EFV26
40,0	11,3	10,5	40,0	0,8	EFV27
40,0	30,0	10,5	58,7	0,8	EFV28
40,0	0,0	39,2	0,0	0,8	EFV29
20,8	30,0	50,0	0,0	0,8	EFV30
20,8	30,0	50,0	0,0	0,8	EFV31
40,0	30,0	50,0	19,2	0,8	EFV32
40,0	30,0	50,0	19,2	0,8	EFV33
40,0	30,0	50,0	19,2	0,8	EFV34
0,0	30,0	10,5	18,7	0,8	EFV35
0,0	30,0	29,2	0,0	0,8	EFV36
11,3	0,0	10,5	0,0	0,8	EFV37
40,0	0,0	39,2	0,0	0,8	EFV38
40,0	10,8	50,0	0,0	0,8	EFV39
20,8	30,0	50,0	0,0	0,8	EFV40
0,0	30,0	29,2	0,0	0,8	EFV41
40,0	10,8	50,0	0,0	0,8	EFV42
0,0	11,3	10,5	0,0	0,8	EFV43
40,0	30,0	29,2	40,0	0,8	EFV44

Redundante projizierte EFVs (beispielsweise sind EFV1 und EFV11 in ihren Austauschreaktionen identisch) und entsprechend des oben beschriebenen Optimalitätskriteriums (minimale Umsätze) nicht optimale EFVs werden entfernt. Beispielsweise wird EFV6 entfernt, da alle Austauschraten größer oder gleich denen in EFV11 sind.

Die verbliebenen EFVs sind in Matrix **E** aufgeführt:

$$\mathbf{E} = \begin{array}{cc} & \begin{array}{cccc} \text{EFV43} & \text{EFV4} & \text{EFV37} & \text{EFV11} \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{R1} \\ \text{R2} \\ \text{R3} \\ \text{R4} \\ \mu_1 \end{array} & \begin{array}{cccc} 0,0 & 0,0 & 11,3 & 21,8 \\ 11,3 & 21,8 & 0,0 & 0,0 \\ 10,5 & 0,0 & 10,5 & 0,0 \\ 0,0 & 21,0 & 0,0 & 21,0 \\ 0,8 & 0,8 & 0,8 & 0,8 \end{array} \end{array}$$

Anschließend wird eine Submatrix der stöchiometrischen Matrix, die nur die externen Metabolite und Austauschreaktionen enthält für die Berechnung der Nettoumsätze verwendet. Für das Beispielnetzwerk N1 ist $\mathbf{N}^{EX,1}$:

$$\mathbf{N}^{EX,1} = \begin{array}{cc} & \begin{array}{cccccccccccccccc} \text{R1} & \text{R2} & \text{R3} & \text{R4} & \text{R5} & \text{R6} & \text{R7} & \text{R8} & \text{R9} & \text{R10} & \text{R11} & \text{R12} & \text{R13} & \text{ATPm} & \mu \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{M1}_{EX} \\ \text{M2}_{EX} \\ \text{M3}_{EX} \\ \text{M4}_{EX} \\ \text{BM1}_{EX} \\ \text{M1} \\ \text{M2} \\ \text{M3} \\ \text{M4} \\ \text{A} \\ \text{B} \\ \text{C} \\ \text{ATP} \\ \text{BM1} \end{array} & \begin{array}{cccccccccccccccc} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & -20 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 \end{array} \end{array}$$

$$\mathbf{N}^{EX,1} = \begin{array}{cc} & \begin{array}{cccc} \text{R1} & \text{R2} & \text{R3} & \text{R4} \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{M1}_{EX} \\ \text{M2}_{EX} \\ \text{M3}_{EX} \\ \text{M4}_{EX} \\ \text{BM1}_{EX} \end{array} & \begin{array}{cccc} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{array} \end{array}$$

Die Nettoumsätze werden durch Multiplikation dieser Matrix mit **E** berechnet und ergeben die stöchiometrische Matrix des reduzierten Einzelmodells $\mathbf{N}^{red,1}$:

$$\mathbf{N}^{red,1} = \mathbf{N}^{EX,1} \mathbf{E} = \begin{array}{cc} & \begin{array}{cccc} \text{R}^{1,1} & \text{R}^{1,2} & \text{R}^{1,3} & \text{R}^{1,4} \end{array} \\ \begin{array}{c} \text{M1}_{EX} \\ \text{M2}_{EX} \\ \text{M3}_{EX} \\ \text{M4}_{EX} \\ \text{BM1} \end{array} & \begin{array}{cccc} 0,0 & 0,0 & -11,3 & -21,8 \\ -11,3 & -21,8 & 0,0 & 0,0 \\ 10,5 & 0,0 & 10,5 & 0,0 \\ 0,0 & 21,0 & 0,0 & 21,0 \\ 0,8 & 0,8 & 0,8 & 0,8 \end{array} \end{array}$$

Die oben beschriebenen Schritte werden für die Netzwerke N2 und N3 wiederholt.

Anschließend werden die reduzierten stöchiometrischen Matrizen der Einzelmodelle $\mathbf{N}^{red,i}$ zu einer stöchiometrischen Matrix $\mathbf{N}^{c,red}$ für das Gemeinschaftsmodell vereint:

	$R^{1,1}$	$R^{1,2}$	$R^{1,3}$	$R^{1,4}$	$R^{2,1}$	$R^{2,2}$	$R^{2,3}$	$R^{2,4}$	$R^{3,1}$	$R^{3,2}$
$\mathbf{N}^{c,red} =$										
M1 _{EX}	0	0	-11,3	-21,8	0	0	0	0	0	0
M2 _{EX}	-11,3	-21,8	0	0	0	0	0	0	0	0
M3 _{EX}	10,5	0	10,5	0	0	0	0	0	0	0
M4 _{EX}	0	21	0	21	0	0	0	0	0	0
BM1	0,8	0,8	0,8	0,8	0	0	0	0	0	0
M2 _{EX}	0	0	0	0	0	-9,8	-0,8	-9	0	0
M3 _{EX}	0	0	0	0	-9,8	0	-9	-0,8	0	0
M4 _{EX}	0	0	0	0	0	9	0	9	0	0
M6 _{EX}	0	0	0	0	9	0	9	0	0	0
BM2	0	0	0	0	0,8	0,8	0,8	0,8	0	0
M1 _{EX}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-6,9
M2 _{EX}	0	0	0	0	0	0	0	0	9,5	6,1
M5 _{EX}	0	0	0	0	0	0	0	0	-10,3	0
BM3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0,8

Die Metabolite M1_{EX}, M2_{EX}, M3_{EX} und M4_{EX} tauchen mehrfach in $\mathbf{N}^{c,red}$. Sie werden durch Aufsummieren der Zeilen, die denselben Metaboliten repräsentieren, zusammengefasst:

	$R^{1,1}$	$R^{1,2}$	$R^{1,3}$	$R^{1,4}$	$R^{2,1}$	$R^{2,2}$	$R^{2,3}$	$R^{2,4}$	$R^{3,1}$	$R^{3,2}$
$\mathbf{N}^{c,red} =$										
M1 _{EX}	0	0	-11,3	-21,8	0	0	0	0	0	-6,9
M2 _{EX}	-11,3	-21,8	0	0	0	-9,8	-0,8	-9	9,5	6,1
M3 _{EX}	10,5	0	10,5	0	-9,8	0	-9	-0,8	0	0
M4 _{EX}	0	21	0	21	0	9	0	9	0	0
M5 _{EX}	0	0	0	0	0	0	0	0	-10,3	0
M6 _{EX}	0	0	0	0	9	0	9	0	0	0
BM1	0,8	0,8	0,8	0,8	0	0	0	0	0	0
BM2	0	0	0	0	0,8	0,8	0,8	0,8	0	0
BM3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0,8

Als nächstes werden Reaktionen, die die Einzelbiomassen zur Gemeinschaftsbiomasse vereinen (hier abgekürzt mit BMiBMc), sowie eine Biomassesenke (rBMc), deren Rate die Gemeinschaftswachstumsrate μ_c repräsentiert, eingefügt. Im letzten Schritt werden wie im vollständigen Modell Quellen und Senken für Metabolite, die als Substrate bzw. Produkte für die Gemeinschaft dienen können eingefügt (Abbildung 5).

Die finale (transponierte) stöchiometrische Matrix des reduzierten Gemeinschaftsmodells sieht wie folgt aus:

	M1 _{EX}	M2 _{EX}	M3 _{EX}	M4 _{EX}	M5 _{EX}	M6 _{EX}	BM1	BM2	BM3	BMc
R ^{1,1}	0	-11,3	10,5	0	0	0	0,8	0	0	0
R ^{1,2}	0	-21,8	0	21	0	0	0,8	0	0	0
R ^{1,3}	-11,3	0	10,5	0	0	0	0,8	0	0	0
R ^{1,4}	-21,8	0	0	21	0	0	0,8	0	0	0
BM1BMc	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1
R ^{2,1}	0	0	-9,8	0	0	9	0	0,8	0	0
R ^{2,2}	0	-9,8	0	9	0	0	0	0,8	0	0
R ^{2,3}	0	-0,8	-9	0	0	9	0	0,8	0	0
R ^{2,4}	0	-9	-0,8	9	0	0	0	0,8	0	0
BM2BMc	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1
R ^{3,1}	0	9,5	0	0	-10,3	0	0	0	0,8	0
R ^{3,2}	-6,9	6,1	0	0	0	0	0	0	0,8	0
BM3BMc	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1
rBMc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
rM _{1in}	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM _{2in}	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
rM _{2ex}	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
rM _{3in}	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
rM _{3ex}	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0
rM _{4ex}	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
rM _{6ex}	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
rM _{5in}	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Dabei sind alle Metabolite intern und die Reversibilitäten der Reaktionen entsprechen den Reversibilitäten der EFVs, denen sie zugrunde liegen. Da alle EFVs Erhaltungsstoffwechsel und Biomassproduktion enthalten, sind sie irreversibel und damit auch alle Reaktionen im reduzierten Modell.

Für Simulationen im linearen reduzierten Modell muss die μ_c auf den zuvor gewählten Wert von $0,8 \text{ h}^{-1}$ festgesetzt werden. Für andere Wachstumsraten müssen die EFVs in den Einzelmodellen und dann das Gemeinschaftsmodell neu erstellt werden.

Eine Übersicht über die verschiedenen Modellierungsansätze (bilineares vollständiges, lineariertes vollständiges und reduziertes Modell) ist in Abbildung 17 dargestellt.

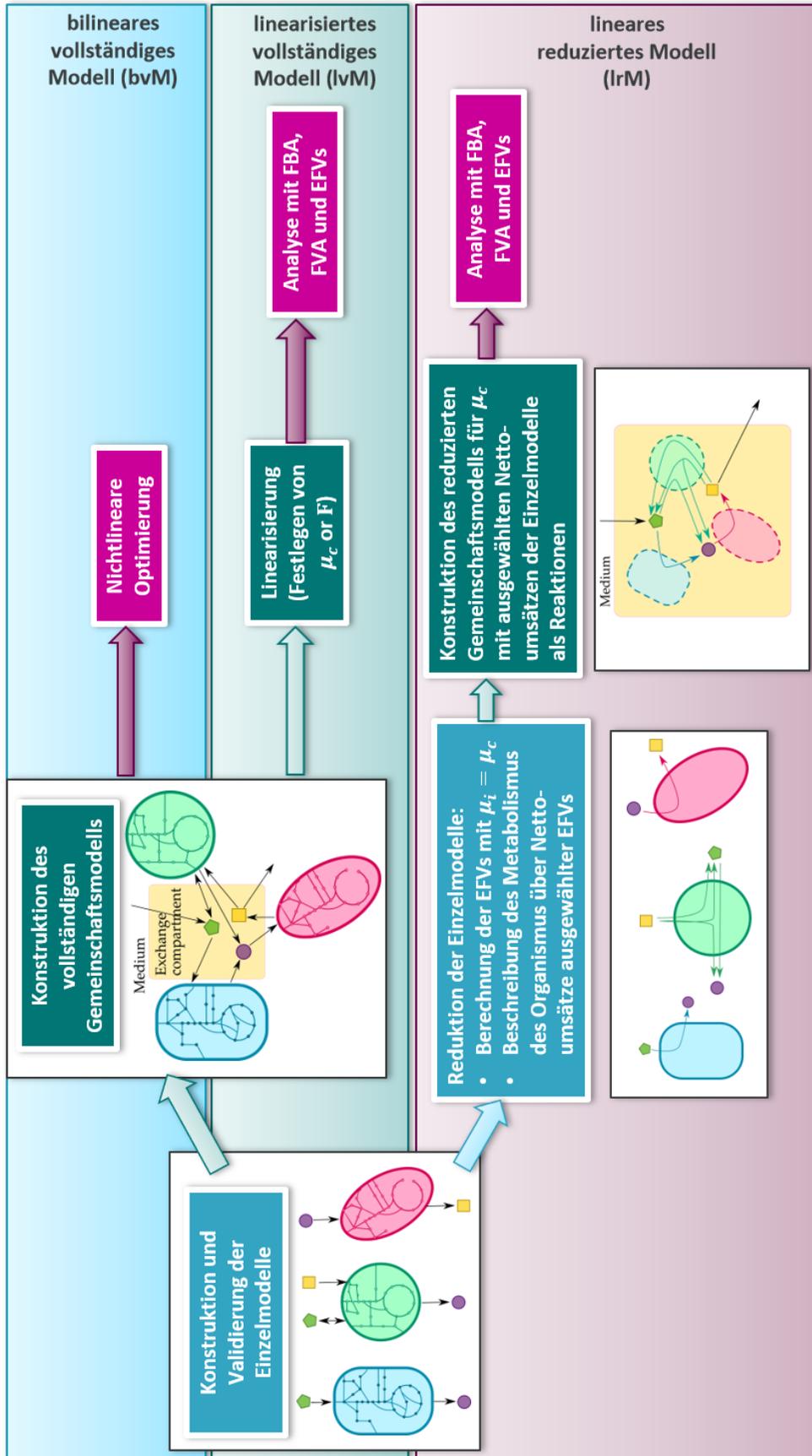


Abbildung 17: Schematische Übersicht über die verschiedenen Modellierungsansätze: bilineares vollständiges (oben), linearisiertes vollständiges (Mitte) und reduziertes Modell (unten). Dargestellt ist das prinzipielle Vorgehen ausgehend von den Einzelmodellen (blau) zum Aufbau der Gemeinschaftsmodelle (grün) bis hin zur Analyse der Gemeinschaftsmodelle (magenta).

Konsistenz der inhomogenen Schranken der Einzelmodelle im Gemeinschaftsmodell

Die Einheiten der Raten unterscheiden sich zwischen den Einzelmodellen und den Gemeinschaftsmodellen (siehe Abschnitt 2.4.5). Während sich die Raten im Einzelmodell auf die Biomasse des entsprechenden Organismus beziehen ($\text{mmol/g}_{\text{TM}_i}/\text{h}$ bzw. h^{-1}), beziehen sie sich im Gemeinschaftsmodell auf die Gesamtbiomasse der Gemeinschaft ($\text{mmol/g}_{\text{TM}_c}/\text{h}$). Damit die Einzelmodelle im Gemeinschaftsmodell korrekt wiedergegeben werden, muss sichergestellt werden, dass die inhomogenen Schranken der Einzelmodelle auch im Gemeinschaftsmodell erfüllt sind.

Wie bereits oben beschrieben, wird davon ausgegangen, dass jeder Flussvektor, der kein Nullvektor ist, die Aufnahme von Substrat voraussetzt. Interne Zyklen werden als thermodynamisch irrelevant angesehen. Die Menge aller möglicher Flussvektoren \mathbf{r} in Organismus i bilden den Flusspolyeder \mathbf{P}_i , der durch Konvexkombinationen der beschränkten EFVs des Organismus i aufgespannt wird:

$$\mathbf{P}_i = \left\{ \mathbf{r} \in \mathfrak{R}^z \mid \mathbf{r} = \sum_{k \in K} \gamma_{ik} \mathbf{e}^{ik}, \gamma_{ik} \geq 0, \sum_{k \in K} \gamma_{ik} = 1 \right\}. \quad (101)$$

Da der Fokus im Gemeinschaftsmodell auf ausgewählten Nettoumsätzen der Einzelmodelle liegt, wird hier davon ausgegangen, dass die EFVs auf die z Austauschreaktionen projiziert sind und auch nur die ausgewählten EFVs für \mathbf{P}_i berücksichtigt werden ($\gamma_{ik} = 0$ für alle aussortierten EFVs). Der Lösungsraum des reduzierten Gemeinschaftsmodell lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$\mathbf{P}^{c,red} = \left\{ \mathbf{r}^{c,red} \mid \mathbf{N}^{c,red} \mathbf{r}^{c,red} = \mathbf{0}, \mathbf{r}^{c,red} \geq \mathbf{0}, \mu_c = \mu_{c,fix} \right\}. \quad (102)$$

Hierbei ist $\mathbf{r}^{c,red}$ der Reaktionsratenvektor des reduzierten Gemeinschaftsmodells. Es muss nun gezeigt werden, dass die Reaktionsraten im reduzierten Gemeinschaftsmodell, die zu den Nettoumsätzen im Einzelmodell gehören, hier bezeichnet mit $\mathbf{r}^{c,red,i}$ (Einheit: $\text{mmol/g}_{\text{TM}_c}/\text{h}$) mit einem spezifischen Ratenvektor \mathbf{r} (Einheit: $\text{mmol/g}_{\text{TM}_i}/\text{h}$), der in \mathbf{P}_i enthalten ist, übereinstimmt. Die Submatrix aus dem reduzierten Gemeinschaftsmodell, die aus den Nettoumsätzen von Organismus i gebildet wurde, kann folgendermaßen berechnet werden:

$$\mathbf{N}^{c,red,i} = \mathbf{N}^{EX,i} \mathbf{E}^i. \quad (103)$$

Hierbei ist \mathbf{E}^i die Matrix, die die ausgewählten EFVs für diesen Organismus enthält. Die organismenspezifischen Raten \mathbf{r}^i können aus den EFVs der Einzelspezies i und den Raten $\mathbf{r}^{c,red,i}$ im Gemeinschaftsmodell berechnet werden:

$$\mathbf{r}^i = \mathbf{E}^i \mathbf{r}^{c,red,i} / F_i. \quad (104)$$

Hier muss durch den Biomassanteil F_i geteilt werden, um die Reaktionsraten bezogen auf das Konsortium in die spezifische Reaktionsrate von Spezies i umzurechnen und damit die Einheiten der Reaktionsraten konsistent zu machen (siehe Gl. (12)). Nach Gleichsetzen der Ausdrücke für \mathbf{r} aus den Gleichungen (101) und (104) ergibt sich, das Folgendes gezeigt werden muss:

$$\mathbf{E}^i \mathbf{r}^{c,red,i} / F_i = \mathbf{E}^i \boldsymbol{\gamma}_i, \quad \boldsymbol{\gamma}_i \geq 0, \quad \sum_{k \in K} \gamma_{ik} = 1. \quad (105)$$

Hierbei ist $\boldsymbol{\gamma}_i$ der Vektor, der die Wichtungsfaktoren γ_{ik} enthält. Der Ausdruck kann zu

$$\mathbf{r}^{c,red,i} = F_i \boldsymbol{\gamma}_i, \quad \boldsymbol{\gamma}_i \geq 0, \quad \sum_{k \in K} \gamma_{ik} = 1 \quad (106)$$

vereinfacht werden. Da die Summe der Wichtungsfaktoren eins ist, folgt:

$$\sum_j \mathbf{r}_j^{c,red,i} = F_i. \quad (107)$$

Dass dies immer erfüllt ist, lässt sich mit Hilfe der Fließgleichgewichtsbedingung (10) zeigen. Hierbei ist der Biomassemetabolit BM_i entscheidend:

$$\mathbf{N}_{BM_i}^{c,red,i} \mathbf{r}^{c,red} = 0. \quad (108)$$

Dabei ist $\mathbf{N}_{BM_i}^{c,red,i}$ die Zeile der stöchiometrischen Matrix des reduzierten Gemeinschaftsmodells, die für das Metabolit BM_i steht. Für die Berechnung der EFVs der Einzelmodelle wurde die Wachstumsrate auf die Wachstumsrate des Gemeinschaftsmodells festgesetzt (siehe oben). Aus diesem Grund haben alle Koeffizienten in $\mathbf{N}_{BM_i}^{c,red,i}$, die zu den Nettoumsätzen gehören, den Wert von μ_c . Der einzige weitere Nicht-Null-Eintrag in $\mathbf{N}_{BM_i}^{c,red,i}$ gehört zu der Reaktion $r_{BM_i \rightarrow BM_c} : BM_i \rightarrow BM_c$ (Gl. (98)). Hier ist der Koeffizient -1 (siehe Beispielnetzwerk). Die übrigen Reaktionen gehören nicht zu Organismus i und die Koeffizienten sind für diese Reaktionen null. Daraus folgt:

$$\mu_c \mathbf{r}^{c,red,i} = r_{BM_i \rightarrow BM_c}, \quad (109)$$

was zu

$$\sum_j \mathbf{r}_j^{c,red,i} = \frac{r_{BM_i \rightarrow BM_c}}{\mu_c} = F_i \quad (110)$$

umgeformt werden kann. Folglich ergibt die Summe der Flüsse in $\mathbf{r}^{c,red,i}$ immer F_i , wie in (107) verlangt und die inhomogenen Schranken der Einzelmodelle sind konsistent mit dem reduzierten

Gemeinschaftsmodell. Hierbei ist zu beachten, dass dies nur für $\mu_c > 0$ gilt, da für $\mu_c = 0$ die Koeffizienten in $N_{BMi}^{c,red,i}$, die zu den Nettoumsätzen der Einzelmodelle gehören, null sind (keine Biomasseproduktion). Der Sonderfall für eine Gemeinschaft ohne Wachstum wird im folgenden Abschnitt betrachtet.

Der Sonderfall $\mu_c = 0$

Mit stöchiometrischen Netzwerkmodellen kann auch der Fall, in dem die Gemeinschaft nicht wächst, betrachtet werden. Die metabolische Aktivität ist dann durch den Erhaltungsstoffwechsel geprägt. Da in diesem Fall jedoch keine Biomasse neu gebildet, sondern lediglich vorhandene Biomasse erhalten wird, kann der Biomasseanteil der Organismen nicht wie zuvor über die Biomasseproduktionsraten bestimmt werden. Die Gemeinschaftszusammensetzung muss deshalb auf andere Weise in das Modell einbezogen werden. Oben wurde die Konsistenz der inhomogenen Schranken über die Biomassemetabolite sichergestellt.

Durch das Einfügen eines zusätzlichen künstlichen Metabolits für jeden Organismus, hier mit W_i bezeichnet, lässt sich auch der Fall, in dem kein Wachstum stattfindet, darstellen. Hierfür wird jeder EFV aus dem Einzelmodell um die Produktion von W_i (Stöchiometrischer Koeffizient: eins) erweitert. Für jeden Organismus wird analog zu $r_{BMi \rightarrow BMc}$ eine Reaktion, die die W_i zu einem W_c zusammenführen (r_{W_i}) und analog zu r_{BMc} eine Senke für W_c :



Die Rate der Reaktion r_{W_c} wird auf eins festgelegt. Die Metabolite W_i und W_c ersetzen die Funktion der Biomassemetabolite und stellen analog dazu sicher, dass (107) erfüllt ist. Die Biomasseanteile F_i können aus dem Verhältnis der Raten von r_{W_i} zu r_{W_c} berechnet werden:

$$F_i = \frac{r_{W_i}}{r_{W_c}}. \quad (113)$$

Für den Sonderfall von $\mu_c = 0 \text{ h}^{-1}$ (siehe oben) sieht die (transponierte) stöchiometrische Matrix des reduzierten Modells folgendermaßen aus:

$N^{c,red(T)=}$	M1 _{EX}	M2 _{EX}	M3 _{EX}	M4 _{EX}	M5 _{EX}	M6 _{EX}	BM1	BM2	BM3	BMc	W1	W2	W3	Wc
R ^{1,1}	0	-2,5	2,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
R ^{1,2}	0	-5	0	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
R ^{1,3}	-2,5	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
R ^{1,4}	-5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
r _{W1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1
BM1BMc	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0
R ^{2,1}	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
R ^{2,2}	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

rW2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1
BM2BMc	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0
R ^{3,1}	0	1,5	0	0	-1,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0
R ^{3,2}	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
rW3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1
BM3BMc	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0
rM1in	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM2in	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM2ex	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM3in	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM3ex	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM4ex	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM5in	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rM6ex	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
rWc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
μ_c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0

Die Koeffizienten für die Biomasseproduktionen aus den Nettoumsätzen sind hier jeweils null, was automatisch zu einer Gemeinschaftswachstumsrate von null führt.

4.3. Gemeinschaftsmodelle

Nach den vorangegangenen Ausführungen können drei Typen von Gemeinschaftsmodellen unterschieden werden (Abbildung 17): a) bilineares vollständiges Modell (bvM), b) linearisiertes vollständiges Modell (lvM) und c) lineares reduziertes Modell (lrM), das mit dem RedCom-Ansatz erstellt wird. Im Folgenden werden verschiedene Gemeinschaftsmodelle, die jeweils mit den drei Ansätzen erstellt wurden, hinsichtlich ihrer Modelldimension und der Berechenbarkeit ihrer EFVs verglichen.

Eine Motivation für die Entwicklung des RedCom-Ansatzes ist die hohe Komplexität und Dimension von Gemeinschaftsmodellen, die auf vollständigen Stoffwechselnetzwerken beruhen. Als Folge sind detaillierte Analysen nur für kleine Modelle möglich. In Tabelle 10 sind die Modelldimensionen für das linearisierte vollständige und reduzierte linearisierte Modelle mit zwei bis neun Organismen aufgelistet. Die reduzierten Modelle sind deutlich kleiner. Weiterhin ist in Tabelle 10 auch die Anzahl der berechneten EFVs in den Gemeinschaftsmodellen angegeben. In den linearisierten vollständigen Modellen war eine Berechnung der EFVs nur bis zu einer Gemeinschaft mit vier Organismen möglich. Im reduzierten Modell konnten dagegen die EFVs problemlos auch in Gemeinschaften von neun Organismen berechnet werden. Im vollständigen Vier-Organismen-Modell gab es mehr EFVs (380 800) als im reduzierten Neun-Organismen-Modell (147 694).

In den nächsten Abschnitten werden drei konkrete Gemeinschaftsmodelle mit drei, sechs und neun Organismen (s. Abbildung 15), die mit den verschiedenen Modellierungsansätzen erstellt wurden, vorgestellt und ihre Eigenschaften miteinander verglichen. Zudem erfolgt eine modellgetriebene Analyse und Integration von experimentellen Daten.

Tabelle 10: Vergleich der Modelldimensionen und Anzahl der EFVs im linearisiertem vollständigen (lvM) und linearen reduzierten (lrM) Gemeinschaftsmodell. Gezeigt sind die Modelldimensionen (Anzahl interne Metabolite \times Reaktionen), die Anzahl der festgelegten Ratengrenzen, sowie die Metabolite, die als Substrat zur Verfügung standen. Zusätzlich sind in der letzten Spalte Produkte in Klammern angegeben, dessen Akkumulation im Medium in der Simulation erlaubt war. $\mu_{c,fix}=0,08 \text{ h}^{-1}$. Abkürzungen für die Organismen: DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*, AW: *A. woodii*, PF: *P. freudenreichii*, SF: *S. fumaroxidans*, CA: *C. acetobutylicum*, SW: *S. wolfei*, EC: *E. coli*.

# Organismen	Modelldimension		# Raten- grenzen	# EFVs		Substrate (Produkte)
	lvM	lrM		lvM	lrM	
2 (DV, MH)	205 \times 233	13 \times 24	6	254	2	Laktat (CH ₄ , CO ₂ , Acetat)
3 (+ MB)	302 \times 337	15 \times 29	8	13,574	13	Ethanol, CO ₂ (CH ₄ , CO ₂ , Acetat)
4 (+ AW)	411 \times 454	18 \times 44	17	380,800	14	Ethanol (CH ₄ , CO ₂ , Acetat)
5 (+ PF)	523 \times 568	25 \times 80	22	-	28	Ethanol (CH ₄ , CO ₂ , Acetat, Propionat)
6 (+ SF)	628 \times 684	27 \times 115	26	-	172	Ethanol (CH ₄ , CO ₂ , Acetat, Propionat)
7 (+ CA)	742 \times 813	31 \times 129	29	-	51,021	Glukose (CH ₄ , CO ₂ , Acetat, Propionat, Butyrat)
8 (+ SW)	854 \times 929	34 \times 137	32	-	70,074	Glukose (CH ₄ , CO ₂ , Acetat, Propionat, Butyrat, Malat)
9 (+ EC)	953 \times 1,048	35 \times 158	37	-	147,694	Glukose (CH ₄ , CO ₂ , Acetat, Propionat, Butyrat, Malat)

4.3.1. Drei-Organismen-Modell

In diesem Abschnitt wurde eine Biogasgemeinschaft bestehend aus den drei Organismen *D. vulgaris*, *M. hungatei* und *M. barkeri* untersucht (s. Tabelle 10, 2. Zeile). Die Gemeinschaft kann auf Ethanol und Laktat wachsen und dabei Biogas produzieren und ist angelehnt an die Gemeinschaft, die von Tatton et al. [37] in kontinuierlichen Versuchen untersucht wurde. Das Konsortium wurde mit dem bilinearen vollständigen (bvM), dem linearisierten vollständigen (lvM), sowie dem linearen reduzierten Modellansatz (lrM) für verschiedene Wachstumsraten und Szenarien untersucht. Desweiteren wurden mit Hilfe des linearisierten vollständigen Modells verschiedene Zielfunktionen für Modelle mikrobieller Gemeinschaften untersucht und die Unterschiede herausgestellt. Im letzten Abschnitt wurde die Anwendbarkeit der Methode der

Minimal-Cut-Sets für das linearisierte vollständige und das reduzierte Modell gezeigt und die jeweiligen Vor- und Nachteile untersucht.

Bilineares Modell

Das bilineare vollständige Modell wurde mit Hilfe nichtlinearer Optimierung analysiert. Weder die Gemeinschaftswachstumsrate noch die Gemeinschaftskomposition wurde festgelegt. Zunächst konnte eine maximale Gemeinschaftswachstumsrate von $0,052 \text{ h}^{-1}$ ermittelt werden. Danach wurden die Bereiche für die Biomasseanteile der einzelnen Organismen an der Gesamtbiomasse, die Ethanolaufnahme-, CO_2 - und Methanproduktionsrate, sowie für die Methanausbeute und das Verhältnis von Methan zu CO_2 bestimmt.

Hierbei wurden zwei verschiedene Szenarien betrachtet. Im ersten Szenario wurde die Akkumulation von Acetat erlaubt, wodurch ein Acetatverwerter nicht zwingend in der Gemeinschaft benötigt wird. In der Studie von Tatton et al. [37] wurde ein Versuch mit einer methanogenen Zweiermischkultur ohne Acetatverwerter durchgeführt. Ermöglicht wurde dies durch eine pH-Regelung, die die Versäuerung der Kultur verhinderte. Zudem wurde in diesem Szenario angenommen, dass CO_2 verfügbar ist und von außen aufgenommen werden kann. Wenn das Acetat nicht weiterverwendet wird, ist ein zusätzlicher CO_2 -Zufluss notwendig, damit der entstehende Wasserstoff vollständig für die Bildung von Methan genutzt werden kann. In den Experimenten von Tatton et al. [37] wurde ebenfalls CO_2 zur Verfügung gestellt. Im zweiten modellierten Szenario wurde die Acetatakkumulation ausgeschaltet. Hierdurch kommt es neben der syntrophen Beziehung zwischen Ethanoloxidierer (hier: *D. vulgaris*) und methanogenen Organismen (hier: *M. barkeri*, *M. hungatei*) zu einer weiteren Abhängigkeit, da produziertes Acetat weiter verwertet werden muss. Wenn keine externe pH-Regelung vorliegt, kann es bei einer Anreicherung von organischen Säuren zu einem Abfall des pH-Wertes und dadurch zu einem Absterben der Organismen führen. Die Simulationsergebnisse für beide Szenarien sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Simulationsergebnisse für das bilineare Drei-Organismen-Modell. Angegeben sind die durch nichtlineare Optimierung bestimmten Bereiche für die Gemeinschaftswachstumsrate μ_c , die Biomasseanteile F_i der verschiedenen Organismen, die spezifischen Raten r_j für Ethanolaufnahme, Methanproduktion und Acetatproduktion, sowie die Methanausbeute $Y_{\text{CH}_4/\text{Eth}}$. Die Ergebnisse sind für zwei verschiedene Szenarien dargestellt: in Szenario 1 wurde die Produktion von Acetat erlaubt, während sie in Szenario 2 ausgeschaltet wurde. DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*

	$\mu_c [\text{h}^{-1}]$	F_{DV}	F_{MH}	F_{MB}	$Y_{\text{CH}_4/\text{Eth}}$	r_{Eth}	r_{CH_4}	r_{Ac}
Szenario 1	0-0,052	0,024- 0,54	0-0,93	0-0,98	0,39- 1,50	1,19- 19,99	1,48- 12,50	offen (0-19,68)
Szenario 2	0-0,052	0,024- 0,28	0-0,76	0,17- 0,98	1,17- 1,50	1,19- 9,04	1,79- 12,50	geschlossen (0)

Die vorhergesagten Bereiche für die Biomasseanteile, Methanausbeuten, Substrataufnahme- und Produktausscheideraten sind sehr groß. Da die Simulationsergebnisse jedoch alle möglichen Gemeinschaftswachstumsraten einschließen, war dieses Ergebnis zu erwarten. In beiden Szenarien ist *D. vulgaris* essentiell ($F_{DV} > 0$). Während *M. barkeri* im ersten Szenario optional ist, ist der Organismus im zweiten Szenario ebenfalls essentiell. Da die obere Grenze für den Biomasseanteil von *D. vulgaris* in beiden Szenarien kleiner als eins ist, wird zudem ersichtlich, dass immer auch ein methanogener Organismus vorhanden sein muss. Die obere Grenze für die Methanausbeute entspricht dem theoretischen Wert einer vollständigen Ethanoloxidation zu Methan und CO_2 . Insgesamt erscheinen die Ergebnisse des bilinearen Modells sinnvoll, die Vorhersagen sind jedoch nicht sehr präzise. Dennoch können sie hier für eine erste Analyse des Lösungsraumes genutzt werden.

Linearisiertes vollständiges und lineares reduziertes Modell

Anschließend wurden das linearisierte vollständige und das reduzierte Modell analysiert. In einem ersten Schritt wurde die maximale Gemeinschaftswachstumsrate mit Hilfe eines iterativen Ansatzes bestimmt. Hierfür wurde eine Flussanalyse bei einer Wachstumsrate von $0,01 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt. Existiert eine Lösung, wird die Rate verdoppelt und eine erneute Flussanalyse durchgeführt. Diese Schritte werden wiederholt, bis keine Lösung existiert. In diesem Fall wird der Mittelwert aus der aktuellen und der letzten Wachstumsrate (falls bereits die erste Flussanalyse keine Lösung lieferte: 0 h^{-1}), die eine Lösung lieferte, gebildet und eine Flussanalyse durchgeführt. Fortführend wird immer der Mittelwert der letzten Wachstumsrate, für die eine Lösung existiert und der Rate, für die keine Lösung existiert, für die folgende Flussanalyse gebildet, bis die gewünschte Genauigkeit erreicht ist (hier: 10^{-4} h^{-1}). In beiden Modellen lag die maximale Gemeinschaftswachstumsrate bei $0,052 \text{ h}^{-1}$ und entsprach damit auch dem Wert, der mit dem bilinearen Modell berechnet wurde. Anschließend wurden die EFVs für beide Modelle für eine Wachstumsrate von $0,026 \text{ h}^{-1}$ (entspricht 50% der maximalen Rate) berechnet. Abbildung 18 zeigt die auf Gemeinschaftskomposition, Methanausbeute und Ethanolaufnahme sowie Produktabgaberaten projizierten EFVs für das linearisierte vollständige und das reduzierte Drei-Organismen-Modell. Wie im bilinearen Modell, sagen auch beide linearisierten Modelle voraus, dass *D. vulgaris* essentiell für die Gemeinschaft ist ($F_{DV} > 0$), während die beiden Methanogenen austauschbar sind. Die vorhergesagten Bereiche sind in beiden Modellen sehr breit. Verglichen miteinander sind die Bereiche für das reduzierte Modell, insbesondere bei den Aufnahme- und Ausscheideraten, deutlich kleiner als beim vollständigen Modell. Zudem ist die Anzahl der EFVs im reduzierten Modell deutlich kleiner (13 im Vergleich zu 13.574, siehe auch Tabelle 10). Anhand der EFVs lassen sich zusätzlich zu den Bereichen für spezifische Raten, Gemeinschaftszusammensetzung und Ausbeuten auch Zusammenhänge erkennen. Beispielsweise gibt es wie zu erwarten eine Antikorrelation zwischen *M. barkeri* und *M. hungatei* (Lösungen mit hohen Anteilen an *M. barkeri* haben kleine Anteile an *M. hungatei* und umgekehrt). Zudem ist erkennbar, dass hohe Methanausbeuten mit niedrigen Acetatausscheideraten korrelieren, was

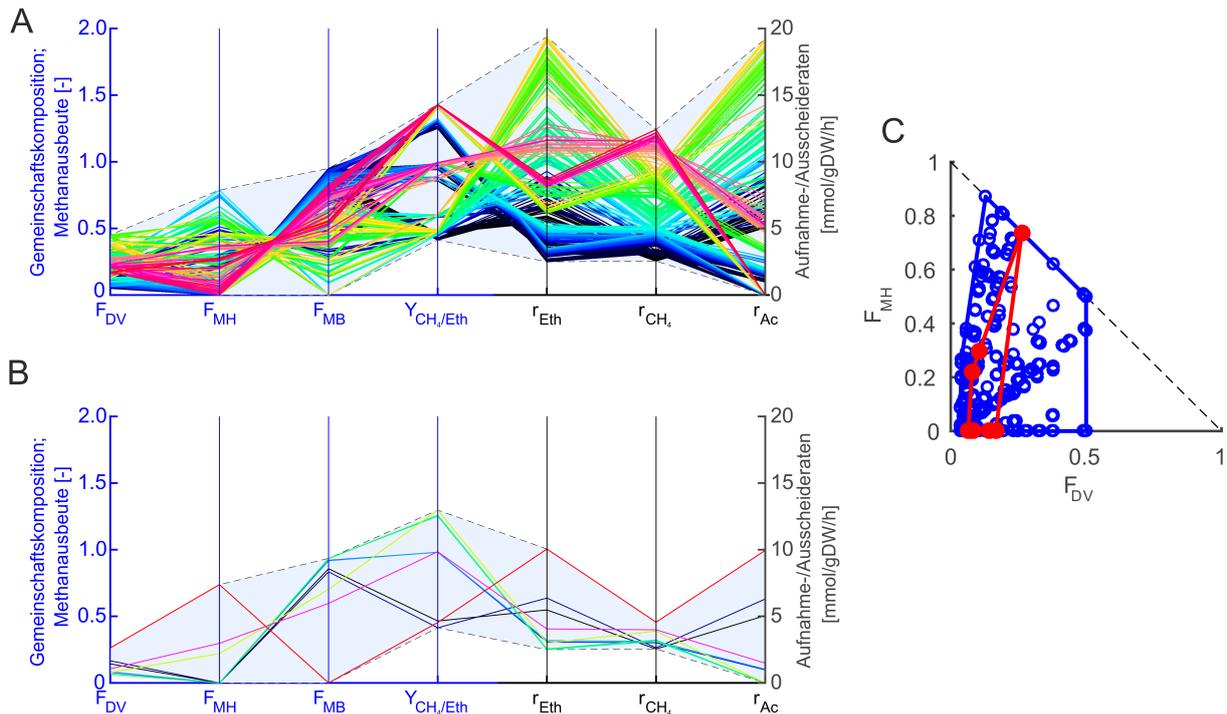


Abbildung 18: Simulationsergebnisse des Drei-Organismen-Modells für das linearisierte vollständige (A) und lineare reduzierte (B) Modell bei festgesetzter Gemeinschaftswachstumsrate von $0,026 \text{ h}^{-1}$ mit Acetatakkumulation (Szenario 1). Die hellblauen Bereiche geben den vom Modell vorhergesagten Lösungsraum an. Die EFVs sind als farbige Linien (sortiert nach der Methanausscheiderate von schwarz (niedrigste Rate) über blau, grün, gelb und orange zu rot) dargestellt. Die EFVs wurden die Biomasseanteile F der Organismen (DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*), die Methanausbeute (blaue Achsen) und die Ethanol- und Methan- und Acetatausscheiderate (schwarze Achsen) projiziert. In (C) sind die auf die Gemeinschaftskomposition projizierten EFVs für das linearisierte vollständige (blau) und das lineare reduzierte (rot) Modell dargestellt. Hierbei ist $F_{MB} = 1 - F_{DV} - F_{MH}$.

damit erklärt werden kann, dass Acetat ein zusätzliches Substrat für die Methanogenese ist. Weiterhin sind die projizierten EFVs ein Subset der Lösungen aus dem linearisierten vollständigen Modell.

Der Einfluss der Wachstumsrate auf die Simulationsergebnisse wurde untersucht, indem Simulationen bei 99%, 50%, 5% und 0% der maximalen Wachstumsrate durchgeführt wurden. Dabei wurden die oben beschriebenen Szenarien, einmal mit und einmal ohne Acetatakkumulation, betrachtet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengefasst. Die vorhergesagten Bereiche sind im linearisierten vollständigen Modell bei kleinen Wachstumsraten deutlich breiter als bei großen Wachstumsraten. Innerhalb des linearisierten vollständigen Modells sind die oberen Ratengrenzen für verschiedene Wachstumsraten sehr ähnlich. Selbst bei niedrigen Wachstumsraten wird annähernd das Maximum erreicht. Im Vergleich zwischen reduziertem und vollständigem Modell stimmen die unteren Grenzen der Vorhersagen für die spezifischen Raten überein, die oberen Grenzen liegen im linearisierten vollständigen Modell insbesondere für niedrige Gemeinschaftswachstumsraten aber deutlich höher. In den Simulationen ohne

Tabelle 12: Simulationsergebnisse für die linearisierten Drei-Organismen-Modelle mit erlaubter Acetatakkumulation und CO₂-Zugabe. Dargestellt sind die Ergebnisse für das linearisierte vollständige (lvM) und das reduzierte (lrM) Modell für verschiedene Gemeinschaftswachstumsraten μ_c . Gezeigt sind die Ergebnisse für die verschiedenen Biomasseanteile der Organismen F_i , die Methanausbeute $Y_{CH_4/Eth}$ und die spezifischen Raten für die Ethanolaufnahme (Eth)-, CO₂- und CH₄-Produktionsraten. Organismen: DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*.

μ_c [h ⁻¹]	Modell	F_{DV}	F_{MH}	F_{MB}	$Y_{CH_4/Eth}$	r_{Eth}	r_{CH_4}	r_{Ac}
0,052 (99%) $\mu_{c,max}$)	lvM	0,074- 0,39	0-0,68	0-0,93	0,39- 1,37	3,76- 19,98	3,58- 12,34	0-19,67
	lrM	0,074- 0,32	0-0,68	0-0,93	0,39- 1,24	3,76- 16,03	3,58- 7,14	0-15,79
0,026 (50%) $\mu_{c,max}$)	lvM	0,050- 0,45	0-0,79	0-0,95	0,41- 1,43	2,49- 19,37	2,54- 12,42	0-19,22
	lrM	0,065- 0,26	0-0,74	0-0,94	0,41- 1,30	2,49- 10,04	2,54- 4,55	0-9,93
0,0026 (5%) $\mu_{c,max}$)	lvM	0,027- 0,53	0-0,92	0-0,97	0,48- 1,49	1,32- 18,81	1,58- 12,49	0-18,80
	lrM	0,049- 0,15	0-0,86	0-0,95	0,48- 1,46	1,32- 3,93	1,58- 2,07	0-3,92
0 (0%) $\mu_{c,max}$)	lvM	0,024- 0,54	0-0,93	0-0,98	0,50- 1,50	1,19- 18,75	1,48- 12,50	0-18,75
	lrM	0,046- 0,12	0-0,88	0-0,95	0,50- 1,50	1,19- 3,16	1,48- 1,84	0-3,16

Wachstum ($\mu_c=0$ h⁻¹) sind die spezifischen Raten mehr als sechsmal größer im Vergleich zum linearen reduzierten Modell (s. Tabellen 12 und 13). Bei höheren Gemeinschaftswachstumsraten nähern sich die Vorhersagen für die oberen Grenzen der spezifischen Raten an und liegen weniger als einen Faktor von zwei auseinander. Grund hierfür ist, dass bei niedrigen Wachstumsraten mehr Potenzial für ineffiziente Substratnutzung besteht als bei hohen Wachstumsraten (da mehr Biomasse produziert werden muss, gibt es einen kleineren Spielraum) und die entsprechenden Lösungen im linearen reduzierten Modell aussortiert wurden. Die Vorhersagen beider Modelle bezüglich der Methanausbeuten sind ähnlich und der vorhergesagte Bereich ist deutlich schmaler als bei den spezifischen Raten.

Tabelle 13: Simulationsergebnisse für die linearisierten Drei-Organismen-Modelle ohne Acetatakkumulation. Dargestellt sind die Ergebnisse für das linearisierte vollständige (lvM) und das reduzierte (lrM) Modell für verschiedene Gemeinschaftswachstumsraten μ_c . Gezeigt sind die Ergebnisse für die verschiedenen Biomasseanteile der Organismen F_i , die Methanausbeute $Y_{CH_4/Eth}$ und die spezifischen Raten für die Ethanolaufnahme (Eth)-, CO_2 - und CH_4 -Produktionsraten. Organismen: DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*.

μ_c [h^{-1}]	Modell	F_{DV}	F_{MH}	F_{MB}	$Y_{CH_4/Eth}$	r_{Eth}	r_{CH_4}	r_{Ac}
0,052 (99% $\mu_{c,max}$)	lvM	0,074- 0,18	0-0,35	0,49- 0,93	1,17- 1,37	3,76- 9,04	4,42- 12,34	0
	lrM	0,074- 0,092	0-0,20	0,71- 0,93	1,17- 1,24	3,76- 4,63	4,41- 5,74	0
0,026 (50% $\mu_{c,max}$)	lvM	0,050- 0,22	0-0,47	0,39- 0,95	1,25- 1,43	2,49- 8,69	3,12- 12,42	0
	lrM	0,065- 0,078	0-0,22	0,70- 0,94	1,25- 1,30	2,49- 2,99	3,12- 3,89	0
0,0026 (5% $\mu_{c,max}$)	lvM	0,027- 0,27	0-0,72	0,21- 0,97	1,45- 1,49	1,32- 8,37	1,92- 12,49	0
	lrM	0,049- 0,053	0-0,31	0,64- 0,95	1,45- 1,46	1,32- 1,42	1,92- 2,07	0
0 (0% $\mu_{c,max}$)	lvM	0,024- 0,28	0-0,76	0,17- 0,98	1,50	1,19- 8,33	1,79- 12,50	0
	lrM	0,046- 0,048	0-0,34	0,61- 0,95	1,50	1,19- 1,22	1,79- 1,84	0

Zielfunktionen für Gemeinschaftsmodelle

Eine wesentliche Problematik in der Analyse von Modellen mikrobieller Gemeinschaften liegt in der Auswahl und Anwendung einer geeigneten Zielfunktion [20, 182]. Lineare Optimierungen (Flussanalysen) werden durchgeführt, um aus dem Lösungsraum, der sich aus einem metabolischen Netzwerkmodell ergibt, die relevantesten Lösungen herauszustellen. Bei Modellen einzelner Organismen sind typische Zielfunktionen die Maximierung der Wachstumsrate oder der Biomasseausbeute [72]. In Gemeinschaftsmodellen ist jedoch mehr als ein Organismus vorhanden und diese Zielfunktionen können nicht ohne Weiteres auf das Gemeinschaftsmodell übertragen werden. Mögliche analoge Zielfunktionen im Gemeinschaftsmodell sind:

1. Maximierung der Gemeinschaftswachstumsrate
2. Maximierung der Gesamtbiomasseausbeute
3. simultane Maximierung der Biomasseausbeuten der einzelnen Organismen

Im Folgenden werden diese drei Zielfunktionen am linearisierten vollständigen Modell hinsichtlich ihrer Unterschiede und Eignung in Modellen mikrobieller Gemeinschaften untersucht. Da im linearen reduzierten Modell bereits ein Optimalitätskriterium beim Erstellen der Modelle eingeflossen ist, wird es im Folgenden nicht berücksichtigt.

Maximierung der Gemeinschaftswachstumsrate

Für das Drei-Spezies-Modell wurden die EFVs für eine Wachstumsrate von 99% des zuvor ermittelten Maximalwerts berechnet. Für jeden der 5940 EFV wurde die spezifische Biomasseausbeute für jeden Organismus bestimmt. Als Bezugsgröße diente für *D. vulgaris* die Acetatproduktionsrate und für die beiden methanogenen Organismen die Methanproduktionsrate (des jeweiligen Organismus), da diese Produkte (Acetat und Methan) bei der Verwertung jedes ihrer Substrate ausgeschieden wird. Um zu untersuchen, wie nah die Organismen mit ihrer jeweiligen Biomasseausbeute jeweils an ihrem spezifischen Maximum liegen, wurden die berechneten spezifischen Biomasseausbeuten durch die maximale spezifische Biomasseausbeute geteilt. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 gezeigt.

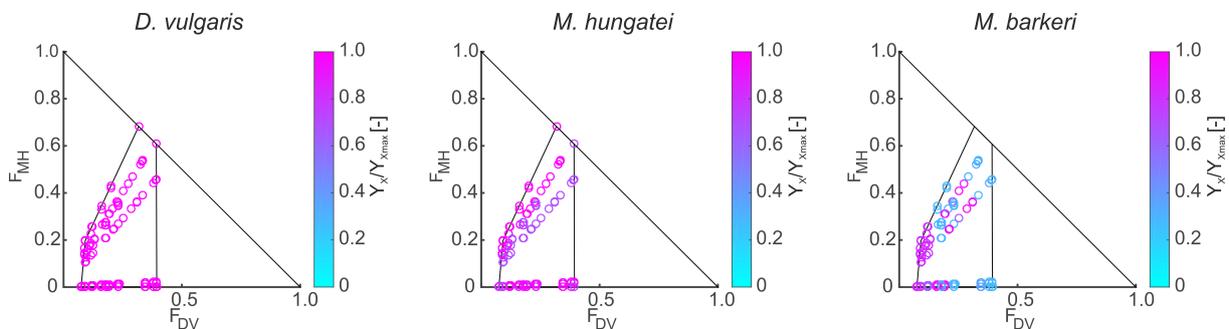


Abbildung 19: Spezifische Biomasseausbeuten der Organismen *D. vulgaris*, *M. hungatei* und *M. barkeri* im Drei-Organismen-Modell bei einer Wachstumsrate von $0,052 \text{ h}^{-1}$ (99% von $\mu_{c,max}$). Jeder Kreis entspricht einem EFV im Modell, die Färbung zeigt, das Verhältnis der spezifischen Biomasseausbeute zu der maximalen spezifischen Biomasseausbeute der jeweiligen Organismen. Die Koordinaten geben die Gemeinschaftszusammensetzung an: F_{DV} : Anteil *D. vulgaris* an der Gesamtbiomasse, F_{MH} : Anteil *M. hungatei* an der Gesamtbiomasse, F_{MB} : Anteil *M. barkeri* an der Gesamtbiomasse ist nicht explizit aufgeführt, ergibt sich aus: $F_{MB}=1-F_{DV}-F_{MH}$

D. vulgaris erreicht in allen EFVs, *M. hungatei* in der Hälfte aller EFVs und *M. barkeri* nur in 136 EFVs seine maximale Biomasseausbeute. Unter der Annahme des ausgeglichenen Wachstums ist immer der langsamste essentielle Organismus limitierend für die Gemeinschaftswachstumsrate. In dieser Drei-Organismen-Gemeinschaft ist das *D. vulgaris*. Aus diesem Grund erreicht *D. vulgaris* auch in allen EFVs seine maximale spezifische Biomasseausbeute. Um seine maximale Wachstumsrate zu erreichen muss das Substrat effizient genutzt werden, was zu einer hohen Biomasseausbeute führt. Anders sieht es für die beiden Methanogenen aus. Sie könnten mit den vorhandenen Substraten schneller wachsen, als durch die Gemeinschaftswachstumsrate festgelegt ist. Folglich müssen sie zum Erreichen der maximalen Gemeinschaftswachstumsrate nicht an ihre Substrataufnahmeratengrenzen gehen. Lösungen bei denen die beiden Organismen mehr Substrat aufnehmen als sie für die entsprechende Wachstumsrate benötigen, sind solche, bei denen die Biomasseausbeute niedrig ist und das Substrat folglich nicht effizient genutzt wird. Ein Teil des Substrates wird zu Produkt konvertiert ohne die dabei produzierte Energie für

das Wachstum zu nutzen. Für Einzelmodelle sind Lösungen mit maximalen Wachstumsraten für gegebene Ratengrenzen auch Lösungen mit hohen Biomasseausbeuten für die gegebenen Bedingungen. Im Gemeinschaftsmodell ist dies jedoch nicht der Fall, da die maximale Gemeinschaftswachstumsrate in der Regel nicht die maximale Wachstumsrate aller Organismen ist und ineffiziente Substratnutzung deshalb nicht ausgeschlossen werden kann [186].

Ein weiterer wesentlicher Nachteil dieser Zielfunktion ist, dass immer nur die maximale Gemeinschaftswachstumsrate betrachtet wird. In mikrobiellen Gemeinschaften kann es in einem kontinuierlichen Prozess zu Stabilitätsproblemen kommen, wenn die Verdünnungsrate, die der Gemeinschaftswachstumsrate entspricht, zu hoch ist (Auswaschpunkt [187]). Deshalb ist ein Zustand, bei dem die Gemeinschaft dem Auswaschpunkt nahe kommt nur selten von Interesse, da normalerweise stabile Prozesse wünschenswert sind. Zudem werden die inhomogenen Schranken (Substrataufnahmeraten) zumeist aus Einzelkultivierungen von Organismen geschätzt. Hierbei sind die Kultivierungsbedingungen für den jeweiligen Organismus optimiert. In Mischkulturen weichen die Bedingungen in der Regel ab, sodass die maximale Wachstumsrate mitunter nicht erreicht wird.

Insgesamt scheint diese Zielfunktion für Gemeinschaftsmodelle aus den oben genannten Gründen ungeeignet zu sein.

Maximierung der Gesamtbiomasseausbeute

Die Maximierung der Gesamtbiomasseausbeute lässt sich für Fälle, in denen es ein konkretes Bezugssubstrat (in diesem Falle Ethanol) gibt, sehr einfach umsetzen. Hierfür wird die Gemeinschaftswachstumsrate auf einen Wert festgelegt und anschließend die Bezugsrate, in diesem Beispiel die Ethanolaufnahme der Gemeinschaft, minimiert. Neben der einfachen Umsetzung dieser Zielfunktion ist die freie Wählbarkeit der spezifischen Gemeinschaftswachstumsrate von Vorteil. Es wurden EFVs für drei verschiedene Gemeinschaftswachstumsraten (5% (13.574 EFV), 50% (13.574 EFV) und 99% (5940 EFV) von $\mu_{c,max}$, siehe oben) berechnet und für jeden EFV die Gesamtbiomasseausbeute bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 gezeigt.

In diesen Simulationen wurde die maximale Gesamtbiomasseausbeute in Bereichen mit geringen Anteilen von *D. vulgaris* und hohen Anteilen von *M. barkeri* in der Gemeinschaft erzielt (grüne Sterne in Abbildung 20). *M. hungatei* ist gar nicht oder nur in sehr geringen Anteilen im optimalen Lösungsbereich vorhanden. Zudem wird in Bereich der maximalen Biomasseausbeute das produzierte Acetat komplett verbraucht (nicht in der Abbildung gezeigt). Die Lösungsbereiche sind insgesamt deutlich kleiner als bei der Wachstumsratenmaximierung und als im reduzierten Modell. Obwohl im Modell zwei methanogene Organismen vorhanden sind, wird bei der Gesamtbiomasseoptimierung *M. barkeri* *M. hungatei* vorgezogen, obwohl beide Organismen den von *D. vulgaris* produzierten H_2 verwerten können. Grund hierfür ist die höhere spezifische Biomasseausbeute von *M. barkeri* im Vergleich zu *M. hungatei* für das gleiche Substrat (H_2),

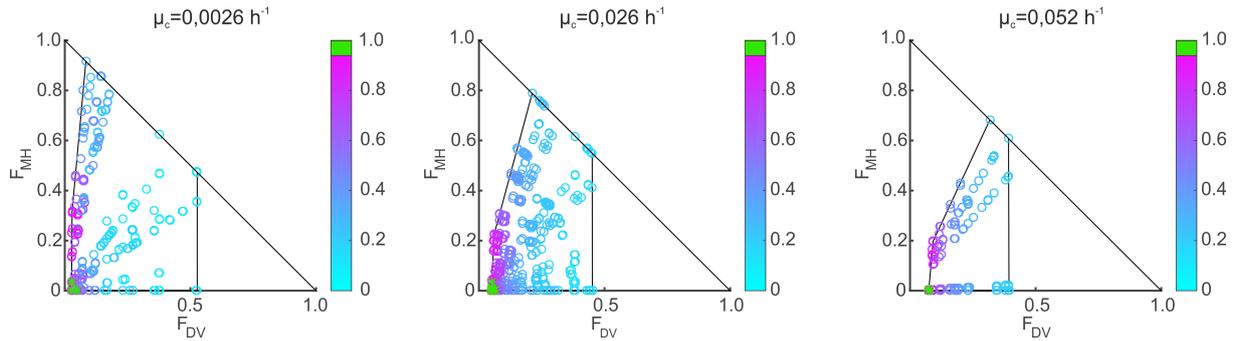


Abbildung 20: Gesamtbiomasseausbeute für drei verschiedene Wachstumsraten. Jeder Kreis entspricht einem EFV im Modell, die Färbung zeigt, das Verhältnis der Gesamtbiomasseausbeute des EFV zu der maximalen Gesamtbiomasseausbeute über alle EFVs. Die Koordinaten geben die Gemeinschaftszusammensetzung an: F_{DV} : Anteil *D. vulgaris* an der Gesamtbiomasse, F_{MH} : Anteil *M. hungatei* an der Gesamtbiomasse, F_{MB} : Anteil *M. barkeri* an der Gesamtbiomasse ist nicht explizit aufgeführt, ergibt sich aus: $F_{MB} = 1 - F_{DV} - F_{MH}$

was zu einer höheren Gesamtbiomasse führt, wenn *M. barkeri* das gesamte H_2 nutzt. Folglich werden bei diesem Optimalitätskriterium in Konkurrenzsituation Organismen aufgrund ihrer spezifischen Biomasseausbeuten bevorzugt. Somit werden bei diesem Kriterium (unrealistische) Lösungen ausgeschlossen, in denen Substrat von den Organismen ineffizient verwertet wird. Andererseits kann die Bevorzugung von Organismen aufgrund ihrer Biomasseausbeute unrealistisch sein. Verschiedene Faktoren wie beispielsweise Substrataffinitäten und die Substratkonzentrationen im Medium können in Konkurrenzsituationen darüber entscheiden, welche Organismen dominieren [188, 189]. Häufig haben Organismen mit geringeren Biomasseausbeuten höhere Substrataffinitäten und dadurch einen Wachstumsvorteil. In einigen Fällen kommt es auch zu Koexistenz mehrerer Organismen mit gleicher metabolischer Funktion. Aus diesem Grund sollten Organismen nicht allein wegen niedriger Biomasseausbeuten ausgeschlossen werden.

Simultane Maximierung der Biomasseausbeuten der einzelnen Organismen

Wie in den obigen Abschnitten beschrieben, sind bei der Maximierung der Gemeinschaftswachstumsrate zahlreiche Lösungen enthalten, bei denen Organismen in unrealistischer Weise ihr Substrat ineffizient nutzen. Bei der Maximierung der Gesamtbiomasse nutzen die Organismen ihr Substrat zwar effizient, einzelne Organismen oder Stoffwechselwege werden aber mitunter aufgrund von Unterschieden in der spezifischen Biomasseausbeute ausgeschlossen.

Um sicherzustellen, dass sowohl alle Organismen ihr Substrat effizient nutzen und gleichzeitig alternative Wege und Organismen berücksichtigt werden, können die Biomasseausbeuten aller Organismen simultan maximiert werden (Abbildung 21). In Fällen, in denen die EFVs berechenbar sind, können zunächst die EFVs und dann für jeden EFV die spezifische Biomasseausbeute der Organismen bestimmt werden. Wie oben gezeigt (Abbildung 19), wird das Verhältnis der spezifischen Biomasseausbeute und der maximalen spezifischen Biomasseausbeute ermittelt.

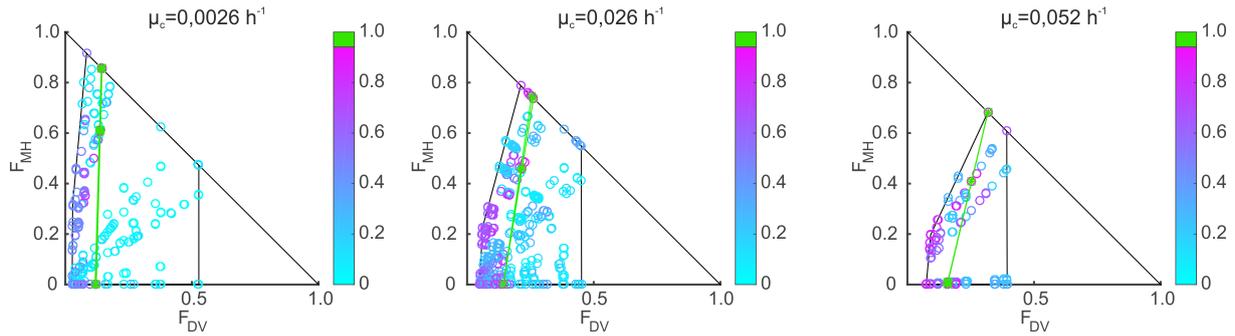


Abbildung 21: Simultane Biomasseausbeuten der einzelnen Organismen für drei verschiedene Wachstumsraten. Jeder Kreis entspricht einem EFV im Modell, die Färbung zeigt, das Verhältnis der spezifischen Biomasseausbeute zu der maximalen spezifischen Biomasseausbeute als Produkt über alle Organismen (siehe Gl. (114)). Die Koordinaten geben die Gemeinschaftszusammensetzung an: F_{DV} : Anteil *D. vulgaris* an der Gesamtbiomasse, F_{MH} : Anteil *M. hungatei* an der Gesamtbiomasse, F_{MB} : Anteil *M. barkeri* an der Gesamtbiomasse ist nicht explizit aufgeführt, ergibt sich aus: $F_{MB}=1-F_{DV}-F_{MH}$

Dabei ergeben sich Werte zwischen null und eins, wobei eins bedeutet, dass der entsprechende Organismus mit seiner maximalen spezifischen Biomasseausbeute wächst. Diese berechneten Ausbeuteverhältnisse für alle Organismen werden für jeden EFV miteinander multipliziert, wodurch sich erneut Werte zwischen null und eins ergeben. Ein Wert von eins bedeutet, dass alle Organismen mit ihrer maximalen spezifischen Biomasseausbeute wachsen. Die simultane Biomasseausbeute vom j -ten EFV $Y_{sim,j}$ wird wie folgt berechnet:

$$Y_{sim,j} = \prod_{i=1}^n \frac{Y_j^i}{Y_{max}^i}. \quad (114)$$

Hierbei ist Y_j^i die Biomasseausbeute vom i -ten Organismus im j -ten EFV und Y_{max}^i die maximale Biomasseausbeute von Organismus i über alle EFVs.

Das Ergebnis für die Beispielmengenschaft ist in Abbildung 21 dargestellt. Der Bereich optimaler Lösungen bildet eine Linie (grüner Bereich in den Abbildungen) und auch bei niedrigen Wachstumsraten ist dieser Bereich sehr schmal. Beide Methanogene sind in dem Lösungsraum vorhanden und gegeneinander austauschbar, während *D. vulgaris* essentiell ist. In der Regel können (ohne Reduktion) die EFVs nur in kleinen Gemeinschaftsmodellen berechnet werden. In allen übrigen Fällen muss der optimale Lösungsbereich mit Hilfe von Flussanalysen bestimmt werden. Hier kann eine gewichtete Summe der Substrataufnahme- oder Produktbildungsrate der Organismen erfolgen.

Als Wichtungsfaktor wird dabei die maximale spezifische Biomasseausbeute verwendet, damit Organismen nicht aufgrund ihrer spezifischen Biomasseausbeuten ausgewählt werden. Eine entsprechende Zielfunktion wäre beispielsweise:

$$\min_{\mathbf{r}} \sum_{i=1}^n Y_{S,\max}^i \cdot r_S^i. \quad (115)$$

Hier ist r_S^i die Substrataufnahmerate von Organismus i für das Referenzsubstrat dieses Organismus und $Y_{S,\max}^i$ die maximale Biomasseausbeute für Organismus i bezogen auf dieses Substrat. Probleme können auftreten, wenn Organismen verschiedene Substrate verwenden, insbesondere, wenn die Kombination aus beiden Substraten eine höherer Biomasseausbeute zur Folge hat. Dieser Ansatz entspricht dem in [186] vorgestellten OptDeg-Ansatz.

Die Biomasseausbeuteoptimierung aller Organismen scheint als Zielfunktion für mikrobielle Gemeinschaften sinnvoll zu sein, die Umsetzung ist jedoch nicht trivial. Wenn Organismen verschiedene Substrate nutzen und verschiedene Produkte bilden können, gibt es keine eindeutige Bezugsrate für die Berechnung der Biomasseausbeute. Auch wenn beispielsweise nur ein Produkt gebildet, dafür jedoch zwei verschiedene Substrate genutzt werden können, bei denen eines zu einer höheren Biomasseausbeute pro Produkt führt, ist dieser Fall schwierig zu behandeln. Hier würden Lösungen, bei denen der Organismus auf dem Substrat, dass zu niedrigerer Biomasseausbeute führt, wächst, automatisch als suboptimal angesehen werden, auch wenn jenes Substrat effizient genutzt wird (die spezifische Biomasseausbeute für dieses Substrat ist maximal). Weiterhin kann es zu Überlagerungen von Stoffwechselwegen kommen, d.h. eine Kombination aus zwei Substraten kann zu höheren Biomasseausbeuten führen, als die Summe der Biomasseausbeuten für die einzelnen Substrate.

Als Kompromiss zu den oben beschriebenen Zielfunktionen und relativ einfach umzusetzende Möglichkeit kann folgendes Vorgehen genutzt werden, um auch im linearisierten vollständigen Modell den Lösungsraum einzuschränken und Lösungen, bei denen die Organismen Substrat verschwenden, zu eliminieren. In einem ersten Schritt wird die Wachstumsrate festgelegt. Dann werden für jedes Einzelmodell die Substrataufnahme- oder Produktbildungsraten minimiert und das Ergebnis als neue Ratengrenze für das Gemeinschaftsmodell festgesetzt. Zwar kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass es bei Nutzung mehrerer Substrate zu ineffizienter Substratnutzung kommt, diese Lösungen sollten jedoch deutlich reduziert sein, da es weniger Möglichkeiten für die Organismen gibt, mehr Substrat aufzunehmen, als für die entsprechende Wachstumsrate notwendig ist.

In einfachen Fällen (z.B. ein Substrat und Produkt pro Organismus) stimmen die optimalen Lösungen der oben beschriebenen Zielfunktion mit den Ergebnissen der mit RedCom erstellten Modelle überein. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, werden im RedCom jedoch nicht alle Lösungen eliminiert, die keiner maximalen Biomasseausbeute entsprechen. Insbesondere, wenn verschiedene Produkte entstehen, wird pro Produkt je mindestens eine Lösung behalten, da die Anreicherung eines Produktes zum Wechsel der verwendeten Stoffwechselwege führen kann. Hier können sich die Ergebnisse unterscheiden. Allerdings sind die Ergebnisse bei einer Biomasseoptimierung auch von der Bezugsgröße (Substrat- oder Produktrate) abhängig.

Minimal Cut Sets

In Modellen von Mikroorganismen wird das Konzept der Minimal Cut Sets (MCS) angewendet, um geeignete Kombinationen von Reaktions- bzw. Gen-Knockouts (Interventionsstrategien) für eine Verbesserung des Stammes in biotechnologischen Anwendungen (z.B. hinsichtlich Produktivität oder Produktausbeute) zu erzielen [67, 190]. Dieses für Einzelmodelle etablierte Konzept wurde hier erstmals exemplarisch auf das linearisierte vollständige und lineare reduzierte Drei-Organismen-Modell angewendet. Als Ausgangspunkt diente das erste Szenario, in dem eine Anreicherung von Acetat zugelassen wurde und zusätzlich CO_2 für die Kultur zur Verfügung steht.

In einem ersten Schritt wurden MCS, die eine hohe Methanausbeute garantieren, gesucht. Es wurde eine Wachstumsrate von $0,026 \text{ h}^{-1}$ aus dem obigen Beispiel (Abbildung 18) angenommen. Die Methanausbeuten lagen im reduzierten Modell zwischen 0,41 und 1,30 mol Methan pro mol Ethanol. Als Schwellenwert für die Zielmethanausbeute wurde ein Wert von 0,95 mol Methan pro mol Ethanol vorgegeben und MCS gesucht, bei denen alle EFVs, die kleinere Methanausbeuten besitzen, blockiert werden. Zusätzlich wurde festgelegt, dass mindestens eine Lösung mit einer Methanausbeute größer als 0,95 mol Methan pro mol Ethanol erhalten bleiben soll.

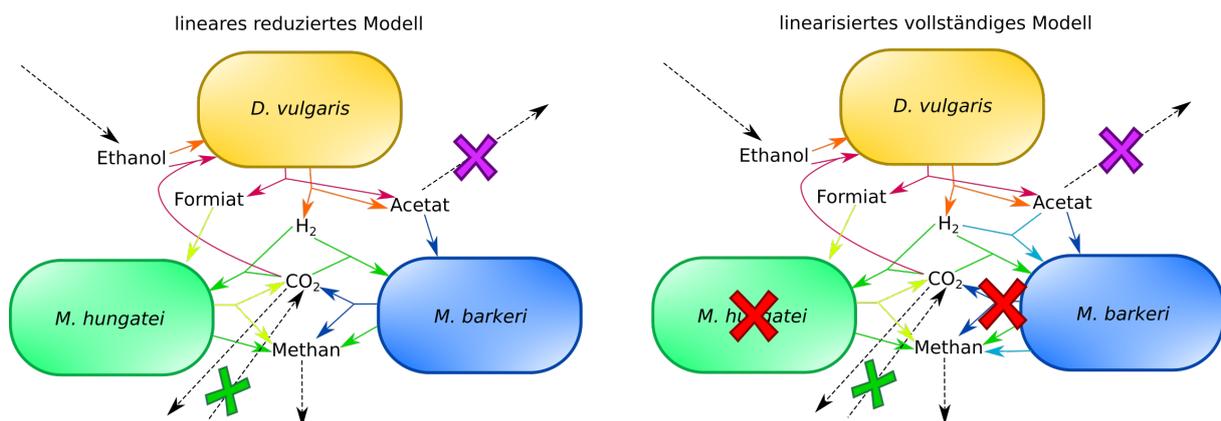


Abbildung 22: Minimal Cut Sets für eine erhöhte Methanausbeute im linearen reduzierten (links) und linearisierten vollständigen (rechts) Drei-Organismen-Modell. Als Schwellenwert wurde eine Methanausbeute von 0,95 mol CH_4 pro mol Ethanol vorgegeben, die mindestens erreicht werden sollte. Verschiedene Cut-Set-Strategien sind durch unterschiedlich farbige Kreuze dargestellt.

Insgesamt wurden zwei MCS im reduzierten Modell gefunden, die in Abbildung 22 dargestellt sind. Die erste Lösung ist die Blockierung der Acetatakkumulation im Medium. Diese Lösung ergibt im Kontext der Drei-Organismen-Gemeinschaft Sinn, da bei der Ethanoloxidation zunächst ein mol Acetat und zwei mol Wasserstoff pro Ethanol (ohne Berücksichtigung der Biomasseproduktion) gebildet werden. Beides kann anschließend für die Methanogenese verwendet werden. Wird hierbei nur der Wasserstoff genutzt, während das Acetat akkumuliert, kann eine maximale Ausbeute von 0,5 mol Methan pro Ethanol gebildet werden. Das Acetat ist ein zusätzliches Substrat aus dem bis zu ein mol Methan pro mol Acetat erreicht werden kann. Obwohl es eine sinnvolle und korrekte Vorhersage liefert, ist dieses Cut Set für die gezielte Verbesserung des Prozesses nicht geeignet, da eine Verwertung von Acetat nicht erzwungen werden kann.

Die zweite MCS-Lösung ist die Ausschaltung der CO_2 -Aufnahme aus dem Medium, die dadurch realisiert werden kann, dass kein CO_2 von außen eingespeist wird. Wenn kein externes CO_2 zur Verfügung steht, kann der bei der Ethanoloxidation freiwerdende Wasserstoff in der Methanogenese nicht verwertet werden. In der syntrophen Gemeinschaft ist die Akkumulation von H_2 jedoch energetisch ungünstig und deshalb im Modell blockiert. Die einzige Möglichkeit, CO_2 für die Methanisierung des H_2 zu gewinnen, ist die Verwertung eines Teils des Acetats. Bei der Methanogenese von Acetat entsteht neben einem mol CO_2 auch zusätzlich ein mol CH_4 , was die Methanausbeute erhöht. Dieses MCS ist ebenfalls sinnvoll und zudem leicht umsetzbar, da lediglich die Begasung mit CO_2 ausgeschaltet werden muss.

In einem zweiten Ansatz wurde nach Lösungen für eine erhöhte spezifische Methanproduktionsrate (statt Ausbeute) gesucht (Abbildung 23). Im reduzierten Modell liegt der Bereich für die spezifische Methanproduktionsrate bei 2,54-4,55 mmol/g/h. Als Schwellenwert wurde daher eine Rate von 4 mmol/g/h gewählt. Hierfür wurden insgesamt drei MCS gefunden. Die ersten beiden (repräsentiert durch ein rotes Kreuz in Abbildung 23) blockieren das Wachstum von *M. barkeri* (einmal durch die Biomasseproduktion des Organismus und einmal durch die Blockierung aller Nettoumsätze des Organismus). In der dritten Lösung wird der Umsatz von Ethanol zu Wasserstoff und Acetat in *D. vulgaris* unterbunden, sodass bei der Ethanoloxidation Formiat gebildet wird, welches nur von *M. hungatei* verwertet werden kann. Zusätzlich wird in dieser Strategie die Acetatverwertung in *M. barkeri* ausgeschaltet. Insgesamt beinhalten damit alle gefundenen Strategien, dass *M. barkeri* inaktiv sein sollte. Grund hierfür ist, dass der Organismus eine höhere Biomasseausbeute im Vergleich zu *M. hungatei* besitzt und deshalb in Anwesenheit von *M. barkeri* (bei gleicher Wachstumsrate) insgesamt weniger Substrat zu Methan umgesetzt wird.

Anschließend wurde auf dieselbe Weise mit den gleichen Schwellenwerten im linearisierten vollständigen Modell vorgegangen. Für eine erhöhte Methanausbeute wurden insgesamt 114 MCS-Lösungen gefunden. Die Lösungen des reduzierten Modells (Ausschalten der Acetatakkumulation oder der CO_2 -Zugabe) waren bei den Lösungen enthalten. Die übrigen Lösungen beruhen darauf, das Wachstum von *M. hungatei* auf verschiedene Weisen auszuschalten, sowie zusätzlich die CO_2 -Aufnahme in *M. barkeri* zu blockieren. In dieser Lösung wird die Acetatverwertung dadurch erzwungen, dass der Wasserstoff nur gemeinsam mit dem Acetat von *M. barkeri* verwertet werden kann. Alle anderen Wege (Methanogenese in *M. hungatei* und hydrogenotrophe Methanogenese in *M. barkeri*) sind blockiert. Um den Wasserstoff abzubauen muss also die acetoklastische Methanogenese genutzt werden.

Während die ersten beiden Lösungen also sowohl im linearisierten vollständigen als auch linearen reduzierten Modell gefunden wurden, gab es die dritte Strategie ausschließlich im vollständigen Modell. Grund hierfür ist ein Weg im Modell von *M. barkeri*, der die Verwertung von Acetat an die Verwertung von Wasserstoff koppelt. Beide werden in einem bestimmten Verhältnis zueinander aufgenommen und zu Methan weiterverwertet.

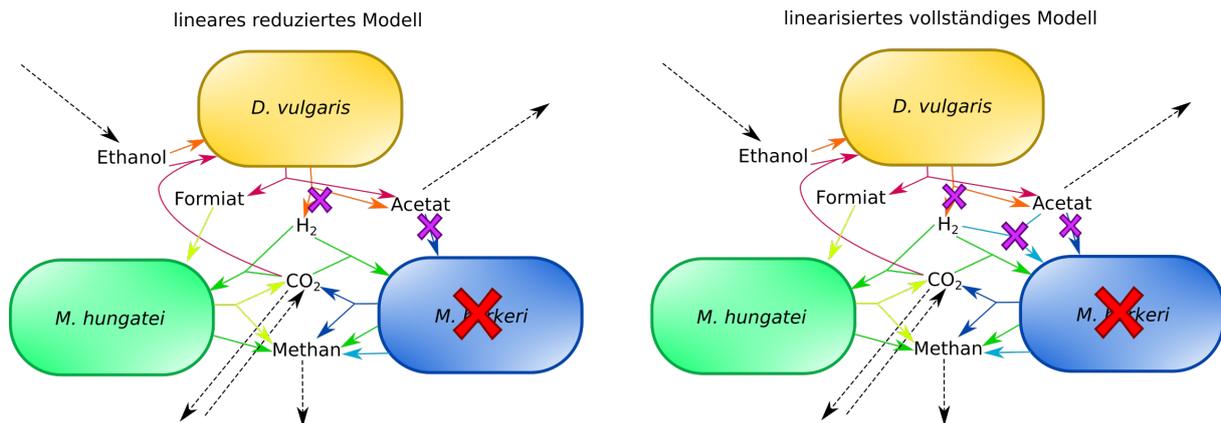


Abbildung 23: Minimal Cut Sets für eine erhöhte spezifische Methanbildungsrate im reduzierten (links) und linearisierten vollständigen (rechts) Drei-Organismen-Modell. Als Schwellenwert wurde eine Methanbildungsrate von 4 mmol/g_{TM}/h vorgegeben, die mindestens erreicht werden sollte. Verschiedene Cut-Set-Strategien sind durch unterschiedlich farbige Kreuze dargestellt. Je Strategie gibt es unter Umständen mehrere Cut Sets.

Da die Wasserstoffakkumulation im Modell aus energetischen Gründen ausgeschaltet wurde, führt diese Kopplung dazu, dass die Verwertung von Acetat erzwungen wird. Im reduzierten Modell wird diese Lösung nicht gefunden, da kein Nettoumsatz im Modell vorhanden ist, bei dem die Acetatverwertung mit der Wasserstoffverwertung gekoppelt ist. Diese Lösung wurde aus dem Modell entfernt, da sie sich als Linearkombination aus der hydrogenotrophen und der acetoklastischen Methanogenese in *M. barkeri* darstellen lässt. Häufig gibt es nicht nur eine Lösung für gekoppelte Produkte, sondern verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen der Produkte. Dies führt zu kombinatorischen Problemen wenn die Lösungen im Modell behalten werden, da Modellgröße und Zahl der EFVs im Gemeinschaftsmodell dann stark ansteigen. Während der Lösungsraum im reduzierten Modell also realistisch wiedergegeben wird, kann dies jedoch, wie in dem hier gezeigten Beispiel, dazu führen, dass relevante Lösungen für Interventionsstrategien nicht gefunden werden.

Für die Erhöhung der Methanproduktionsrate wurden im linearisierten vollständigen Modell insgesamt 1784 und damit deutlich mehr MCS als im reduzierten Modell gefunden. Jede Strategie, bei der ein Organismus oder ein bestimmter Weg eines Organismus ausgeschaltet wird, kann über verschiedene Cut Sets im vollständigen Modell dargestellt werden. Beinhaltet eine Lösung beispielsweise die Blockierung des Wachstums eines Organismus, dann ist neben der Biomasseproduktion dieses Organismus auch jede essentielle Reaktion des Organismus eine Lösung um diese Strategie zu erfüllen. Wenn mehrere Wege gleichzeitig blockiert werden sollen, werden diese Cut Sets miteinander kombiniert was zu vielen Lösungen mit gleicher Grundstrategie führt. Die Vielzahl an Lösungen, die die gleiche Grundstrategie aufweisen (z.B. kein Wachstum von *M. barkeri*), erschwert die Analyse und könnte bei größeren Netzwerken dazu führen, dass die Cut Sets nicht mehr berechnet werden können.

Insgesamt erscheinen die gefundenen Strategien sowohl im linearen reduzierten als auch im linearisierten vollständigen Modell logisch nachvollziehbar, allerdings sind nicht alle Strategien

umsetzbar. Weiterhin ist zu beachten, dass es sich im reduzierten Modell bei den ausgeschalteten Reaktionen nicht um biochemische Reaktionen, sondern um die Nettoumsätze aus den Einzelmodellen handelt. Gefundene Cut Sets können deshalb oft nicht direkt in Interventionsstrategien in Form von Knock-outs übersetzt werden und es ist auch nicht direkt ersichtlich, wie aufwändig eine entsprechende Strategie ist. Allerdings könnte man auf der Basis der in den reduzierten Modellen gefundenen MCS nachträglich in den Einzelmodellen nach Strategien suchen, die die entsprechende metabolische Funktion unterdrücken. Auf der anderen Seite können sich hier auch Vorteile ergeben, da gefundene relevante Cut Sets mitunter kleiner und leichter analysierbar als im vollständigen Modell sind.

4.3.2. Sechs-Organismen-Modell und Auswertung von Daten einer Ethanolanreicherungskultur

Als Erweiterung des Drei-Organismen-Modells wurde ein Sechs-Organismen-Modell erstellt, welches zusätzlich die Spezies *P. freudenreichii*, *S. fumaroxidans* und *A. woodii* enthält. Die Gemeinschaft ist ebenfalls in der Lage, Ethanol zu Biogas abzubauen. Allerdings sind im Vergleich zu der Drei-Organismen-Gemeinschaft zusätzlich die Stoffwechselwege der Homoacetogenese (*A. woodii*) und der Propionatgärung (*P. freudenreichii* und *S. fumaroxidans*) enthalten. Im ersten Abschnitt werden experimentelle Daten einer Ethanolanreicherungskultur gezeigt und mit Simulationsergebnissen des bilinearen und linearisierten vollständigen und reduzierten Sechs-Organismen-Modells verglichen. Mit dem reduzierten Modell wird anschließend der Einfluss des verwendeten Ethanoloxidierers sowie der Erhaltungskoeffizienten der verschiedenen Organismen mit dem reduzierten Modell untersucht. Im letzten Abschnitt folgt die Analyse von Metaproteomdaten aus der Ethanolanreicherungskultur. Hierbei wird zum einen eine taxonomische Analyse sowie eine funktionale Analyse bezüglich typischer Enzyme verschiedener Abbaupfade gezeigt. Diese Informationen werden für eine weitere Anpassung der Modelle verwendet und der Einfluss auf den Lösungsraum vom vollständigen und reduziertem Modell untersucht.

Experimentelle Daten einer Ethanolanreicherungskultur

Für eine Ethanolanreicherungskultur wurden die Substrataufnahmeraten, Produktausscheideraten, Methanausbeuten und das Methan:CO₂-Verhältnis im Biogas für verschiedene Verdünnungsraten bestimmt (Tabelle 14). Der untersuchte Bereich von Verdünnungsraten (0,00053 bis 0,0017 h⁻¹) war sehr klein, da es bei höheren Verdünnungsraten zu einer Versäuerung im Reaktor kam und die Biogasproduktion zum Erliegen kam. Innerhalb dieses untersuchten Bereichs ist nur ein geringer Anstieg der spezifischen Raten erkennbar während die Werte jedoch stark gestreut sind. So ist die Abweichung zweier nebeneinanderliegender Proben teilweise größer als der Anstieg (bei linearer Regression) über den gesamten untersuchten Bereich.

Tabelle 14: Experimentelle Daten einer Ethanolanreicherungskultur für verschiedene Verdünnungsraten.

	D [h ⁻¹]	spezifische Raten [mmol/g _{TM} /h]			Ausbeuten [mol/mol]	
		Ethanol	CO ₂	CH ₄	CH ₄ /CO ₂	CH ₄ /Ethanol
Reaktor 1	0,00054	0,43	0,17	0,59	3,56	1,38
	0,00060	0,49	0,19	0,67	3,50	1,39
	0,00072	0,58	0,22	0,75	3,47	1,29
	0,00085	0,67	0,30	0,99	3,31	1,47
	0,0010	0,42	0,19	0,61	3,25	1,47
	0,0012	0,56	0,25	0,86	3,44	1,52
	0,0017	0,66	0,29	0,93	3,17	1,42
Reaktor 2	0,00053	0,57	0,22	0,76	3,52	1,34
	0,00058	0,50	0,19	0,65	3,46	1,32
	0,00071	0,67	0,26	0,88	3,37	1,32
	0,00083	0,78	0,34	1,12	3,27	1,43
	0,0010	0,75	0,34	1,12	3,25	1,48
	0,0012	0,64	0,27	0,93	3,46	1,45

Eine mögliche Ursache für die hohen Schwankungen ist die ungenaue Bestimmung der Biotrockenmasse, die bei der Berechnung der spezifischen Raten in den Nenner eingeht. Zwar wurden hier Mittelwerte von drei Probenahmen verwendet, allerdings war die jeweils entnommene Probenmenge relativ klein. Da die anaeroben Mikroorganismen sehr langsam wachsen und der Reaktorinhalt nur 1,5 Liter betrug, konnten keine großen Probenmengen entnommen werden, ohne das biologische System zu stören. Da zudem die Kulturbrühe nicht homogen ist und die Biomasse verklumpen kann, kommt es bei der Biomassebestimmung zu einer relativ hohen Ungenauigkeit. Trotz der Schwankungen liegen die Werte jeweils in einem ähnlichen Bereich, sodass ein grober Vergleich mit den Simulationsergebnissen möglich ist. Für den Vergleich der Simulationsergebnisse wurde repräsentativ der Mittelwert der experimentellen Daten für eine Verdünnungsrate von 0,001 h⁻¹ ermittelt. Dieser Mittelwert liegt auch nahe der Trendlinie (Regressionsgeraden) über alle Daten. Die gemessenen Fettsäuren (Acetat, Formiat, Laktat, Propionat, Butyrat) lagen in sehr geringen Konzentrationen vor, die in fast allen Messungen unter der Quantifizierungsgrenze (< 120 μM) lagen. Die daraus resultierenden spezifischen Produktionsraten sind um mehrere Größenordnungen kleiner als die Substrataufnahmerate und die Gasproduktionsraten und können damit als vernachlässigbar erachtet werden. Die im Modell ermittelte maximale Wachstumsrate lag bei 0,0087 h⁻¹ und damit unter der maximalen Wachstumsrate im Drei-Organismen-Modell.

Bilineares Modell

Das bilineare Modell wurde mittels nichtlinearer Optimierung untersucht, um einen ersten Eindruck des Lösungsraums zu bekommen. Die Akkumulation von organischen Säuren wurde ausgeschaltet, da deren Konzentrationen im Experiment wie oben erwähnt unter den Quantifizierungsgrenzen lagen und damit sehr gering waren. Die Simulationsergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Experimentelle Daten und Simulationsergebnisse des Sechs-Organismen-Modells bei Wachstum auf Ethanol. Dargestellt sind die Bereiche für die spezifischen Austauschraten, die Methanausbeute und das Methan zu CO₂-Verhältnis für das bilineare vollständige (bvM), linearisierte vollständige (lvM) und das reduzierte Modell (lrM) einer Gemeinschaft aus *A. woodii*, *P. freudenreichii*, *S. fumaroxidans*, *D. vulgaris*, *M. barkeri* und *M. hungatei*. Die experimentellen Daten sind Mittelwerte aus zwei parallelen Experimenten.

Experiment/ Simulation	Spezifische Austauschraten [mmol/(g _{TM} h)]			Ausbeuten [mol/mol]	
	Ethanol	CO ₂	CH ₄	Y _{CH4/CO2}	Y _{CH4/Eth}
Experiment D=0,001 h ⁻¹	0,59	0,27	0,87	3,25	1,48
bvM	0,16-9,03	0,080-4,17	0,24-12,50	3,00-14,47	0,97-1,50
lvM μ _c =0,001 h ⁻¹	0,21-8,35	0,086-4,15	0,29-12,50	3,01-3,43	1,40-1,50
lrM μ _c =0,001 h ⁻¹	0,21-1,31	0,086-0,63	0,30-1,94	3,06-3,43	1,40-1,48

Da das Drei-Organismen-Modell eine Subgemeinschaft des Sechs-Organismen-Modells ist und dasselbe Substrat verwendet wurde, muss auch die Sechs-Organismen-Modell mindestens die gleiche maximale Wachstumsrate erreichen (die Lösung des Drei-Organismen-Modells ist im Lösungsraum des Sechs-Organismen-Modells enthalten). Eine wahrscheinliche Ursache für die gefundene Lösung ist die Form der Zielfunktion, die je nach Modell Plateaus enthalten kann (gleiche Wachstumsrate für verschiedene Gemeinschaftskompositionen). Die Gemeinschaftsrate ist durch den langsamsten essentiellen Organismus beschränkt. In Fällen, in denen es mehrere alternative Gemeinschaften gibt, kann sich die maximale Wachstumsrate je nach enthaltenen Organismen unterscheiden, sodass das globale Maximum nicht gefunden wird. Auch die Verwendung verschiedener Startflussverteilungen blieb für die Ermittlung der maximalen Wachstumsrate erfolglos und zeigt, dass die nichtlineare Optimierung zu Problemen in der Lösungsfindung führen kann. Die Analyse mit den linearisierten Modellen (siehe unten) zeigt in der Tat, dass die maximale Wachstumsrate für das Sechs-Organismen-Modell bei 0,10 h⁻¹ liegt. Die ermittelten Bereiche für Substrataufnahme- und Produktausscheideraten, Ausbeuten und Gemeinschaftszusammensetzung erscheinen sinnvoll, allerdings sind die Bereiche wie auch im Drei-Organismen-Modell sehr groß und deshalb wenig aussagekräftig.

Linearisiertes vollständiges und lineares reduziertes Modell

In einem zweiten Schritt wurden die linearisierten Modelle (vollständiges und reduziertes Modell) analysiert. Als Wachstumsraten wurden die in den Anreicherungsexperimenten verwendeten Verdünnungsraten festgesetzt. Abbildung 24 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für eine Wachstumsrate von 0,001 h⁻¹ (vgl. mit Tabelle 15).

Im vollständigen Modell war keine Berechnung von EFVs möglich (vgl. Tabelle 10). Aus diesem Grund wurden mittels Flussvariabilitätsanalyse (FVA) bzw. linearer fraktionaler Optimierung die

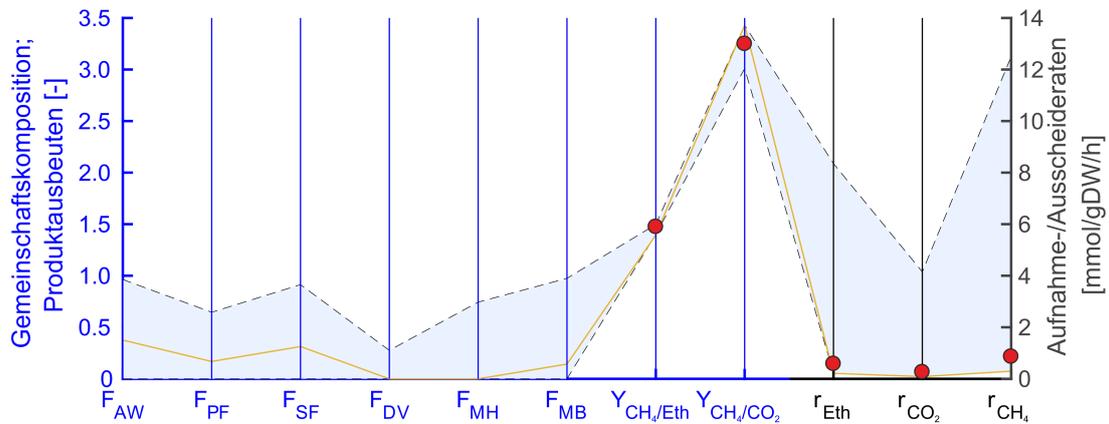
Bereiche für die Gemeinschaftskomposition, die Methanausbeute, das Methan:CO₂-Verhältnis sowie die Ethanolaufnahme- und Produktausseideraten berechnet (Abbildung 24A). Im reduzierten Modell war die Berechnung der EFVs ohne Probleme möglich und diese wurden zur Darstellung der Kenngrößen herangezogen (Abbildung 24).

Die prädizierten Bereiche für die spezifischen Raten unterscheiden sich stark zwischen beiden Modellen. Im vollständigen Modell sind die vorausgesagten Bereiche deutlich breiter. Die experimentellen Daten liegen jeweils am unteren Rand dieses Bereichs. Dies ist ein Hinweis auf effiziente Substratnutzung und legt nahe, dass das gewählte Optimalitätskriterium im reduzierten Gemeinschaftsmodell geeignet ist.

Wie oben erwähnt konnten die EFVs (farbige Linien in Abbildung 24) im reduzierten Gemeinschaftsmodell berechnet werden. Diese liefern zusätzliche Informationen über den Lösungsraum. Beispielsweise ist erkennbar, dass *P. freudenreichii* und *S. fumaroxidans* voneinander abhängig sind, da sie in allen Lösungen gemeinsam oder gar nicht auftreten. Weiterhin gibt es nur eine Lösung, in der sowohl *M. barkeri* als auch *M. hungatei* einen hohen Anteil an der Gemeinschaft haben. In den übrigen Lösungen ist eine Antikorrelation erkennbar, die das Konkurrenzverhalten widerspiegelt. Die experimentellen Daten werden von den Simulationen im reduzierten Modell gut abgebildet.

Im vollständigen Modell kann die effiziente Substratnutzung als Zielfunktion für die verschiedenen Organismen nicht ohne Weiteres umgesetzt werden, da die verschiedenen Organismen unterschiedliche Substrate nutzen und verschiedene spezifische Biomasseausbeuten haben. Dieses Problem wurde zuvor für das Drei-Organismen-Modell untersucht. Als vereinfachte Variante wurde für das vollständige Sechs-Organismen-Modell die Gesamtsubstrataufnahme minimiert, was einer Maximierung der Gesamtbiomasseausbeute der Gemeinschaft entspricht. Dadurch sollten die vorhergesagten Bereiche des vollständigen Modells eingeeengt werden, um präzisere Vorhersagen zu treffen. Anschließend wurde die Ethanolaufnahme auf diesen Wert festgelegt und anschließend eine FVA für die übrigen Raten durchgeführt. In dieser Simulation (orange Linie in Abbildung 24A) gab es keinerlei Variabilität in der Zusammensetzung der Gemeinschaft und in den vorhergesagten Aufnahme- und Ausseideraten, sowie den Produktausbeuten. Eine tiefergehende Analyse der Flüsse zeigte, dass hier das Ethanol ausschließlich von *P. freudenreichii* oxidiert und zu Propionat, H₂ und CO₂ umgesetzt wird. Das Propionat wird anschließend von *S. fumaroxidans* zu Acetat, CO₂ und H₂ umgewandelt. H₂ wird zusammen mit CO₂ vollständig in der Homoacetogenese durch *A. woodii* zu Acetat umgesetzt. Die Methanogenese erfolgt in dieser Simulation ausschließlich über die acetoclastische Methanogenese in *M. barkeri*. Die ermittelte Lösung liegt relativ nah an den gemessenen Daten. Bei diesem Ansatz (Gesamtbiomassemaximierung im vollständigen Modell) werden jedoch immer Organismen mit hohen spezifischen Biomasseausbeuten bevorzugt.

A



B

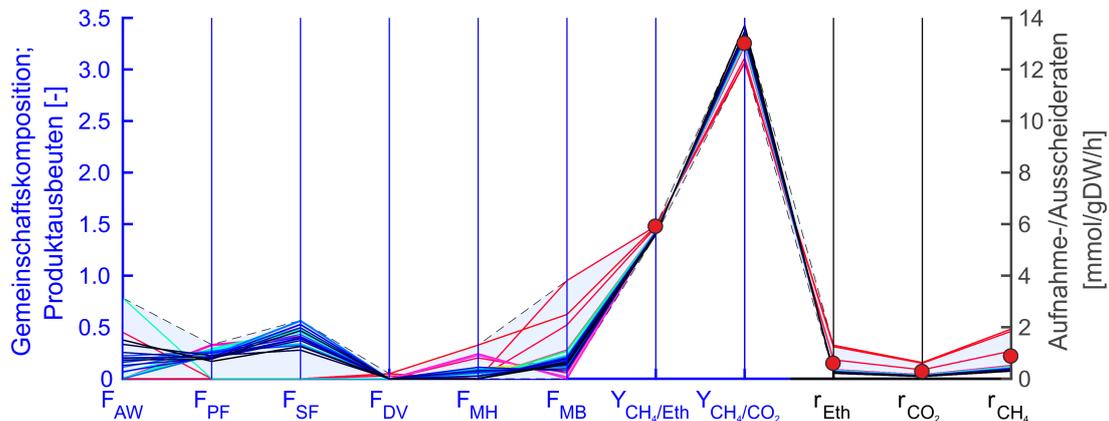


Abbildung 24: Simulationsergebnisse des Sechs-Organismen-Modells für das linearisierte vollständige (A) und das lineare reduzierte (B) Modell. Dargestellt sind die (hellblauen) Bereiche für die Gemeinschaftszusammensetzung F , die Ethanolaufnahme-, CO_2 - und Methanproduktionsrate, sowie die Methanausbeute und das Methan: CO_2 -Verhältnis. Im reduzierten Modell sind zusätzlich die EFVs aufgetragen (farbige Linien), die im vollständigen Modell nicht berechnet werden konnten. Im vollständigen Modell ist die Lösung für eine Gesamtbiomasseoptimierung mit dargestellt (orange Linie). Zusätzlich sind die experimentellen Daten (rote Kreise) als Mittelwert aus zwei Experimenten aufgetragen. Die Verdünnungs- bzw. Wachstumsrate lag in den Modellen und bei den experimentellen Daten jeweils bei $0,001 \text{ h}^{-1}$. Organismen: AW: *A. woodii*, PF: *P. freudenreichii*, SF: *S. fumaroxidans*, DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*.

Alternative Wege, wie die Ethanoloxidation durch *A. woodii* oder *D. vulgaris* oder auch die hydrogenotrophe Methanogenese werden hier ausgeschlossen, während sie im reduzierten Modell noch vorhanden sind. Im reduzierten Modell sind alle Lösungen, bei denen die Organismen in Bezug auf das Optimalitätskriterium optimal wachsen, gleich relevant, auch wenn ein Organismus im Vergleich zu einem anderen eine niedrigere spezifische Biomasseausbeute aufweist.

Während für die Reaktionsraten die prädiktive Power im vollständigen Modell sehr gering und für das reduzierte Modell höher (aber noch immer relativ gering) ist, ergibt sich für beide Modelle eine hohe prädiktive Power für die Ausbeuten (Biogaszusammensetzung, Methanausbeute).

Einfluss des Ethanoloxidierers

Die prädizierten Bereiche für die spezifischen Raten sind in beiden Modellen relativ groß. Ein möglicher Einflussfaktor auf die Produktivität einer mikrobiellen Gemeinschaft kann die Zusammensetzung der Gemeinschaft sein. Das Modell enthält drei verschiedene potentielle Ethanoloxidierer. *A. woodii* oxidiert Ethanol vollständig zu Acetat und repräsentiert somit die Homoacetogenese. *P. freudenreichii* produziert im Gegensatz dazu bei der Ethanoloxidation über den Methylmalonyl-CoA-Weg Propionat, welches im Anschluss von *S. fumaroxidans* zu Acetat, CO₂ und Wasserstoff weiterverarbeitet wird. Die dritte Möglichkeit ist der Abbau von Ethanol zu Acetat und Formiat oder Acetat und Wasserstoff. Dieser Weg wird durch *D. vulgaris* repräsentiert. Um den Einfluss der einzelnen Ethanoloxidierer auf die Simulationsergebnisse zu untersuchen, wurden Simulationen, bei denen nur jeweils einer der drei möglichen Ethanoloxidierer in der Gemeinschaft verwendet wird, mit dem reduzierten Modell durchgeführt. Abbildung 25 zeigt den Vergleich der ursprünglichen Simulation mit allen sechs Organismen und Simulationen bei denen nur *A. woodii*, *D. vulgaris* oder *P. freudenreichii* (letzterer zusammen mit *S. fumaroxidans*) für die Ethanolverwertung vorhanden waren.

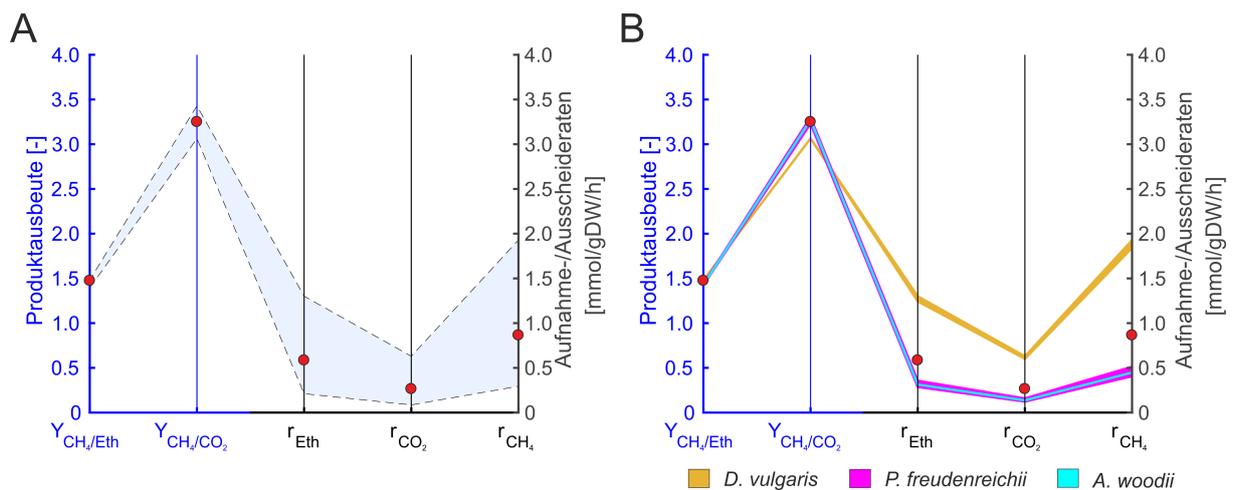


Abbildung 25: Einfluss des Ethanoloxidierers auf die Simulationsergebnisse des reduzierten Sechs-Organismen-Modells. Hierfür wurden die Ergebnisse der Simulation mit allen sechs Organismen aus Abbildung 24 (A) verglichen mit Simulationen in denen jeweils nur *D. vulgaris* (orange), *A. woodii* (cyan) oder *P. freudenreichii* (zusammen mit *S. fumaroxidans*) (pink) aktiv waren (B). Die farbigen Bereiche spiegeln die Simulationsergebnisse für die spezifischen Austauschraten r , die Methanausbeute $Y_{CH_4/Eth}$ und das Methan:CO₂-Verhältnis wider. Zusätzlich sind die experimentellen Daten aus einer Ethanolanreicherungskultur (Mittelwert aus zwei parallelen Experimenten) dargestellt (rote Kreise).

Die prädizierten Bereiche sind für die drei Simulationen mit je einem Ethanoloxidierer sehr schmal. Die Bereiche für die Simulation mit *A. woodii* und *P. freudenreichii* sind fast identisch und liegen für die Ethanolaufnahme, Methan- und CO₂-Bildungsrate nur leicht unter den experimentellen Daten. Für die Simulation mit *D. vulgaris* weichen die vorhergesagten Raten dagegen nach oben ab. Eine mögliche Ursache liegt im geschätzten Erhaltungskoeffizienten, der in *D. vulgaris* mit 4,3 mmol/g_{TM}/h deutlich höher als für die übrigen Organismen ist (siehe Tabelle 9). Der folgende Abschnitt beschäftigt sich deshalb mit dem Einfluss des Erhaltungsko-

effizienten auf die Simulationsergebnisse. Insgesamt scheinen die beteiligten Zwischenprodukte (Acetat, Propionat, Formiat, Wasserstoff) in der Gesamtbilanz des Modells eine untergeordnete Rolle zu spielen, solange diese Metabolite weiter abgebaut werden.

Einfluss des Erhaltungskoeffizienten

Die aus Literaturdaten geschätzten Erhaltungskoeffizienten variieren stark zwischen den einzelnen Organismen und in einigen Fällen waren keine Daten verfügbar (siehe Tabelle 8). Teilweise unterscheiden sich auch die Erhaltungskoeffizienten für einen Organismus bei Daten aus verschiedenen Quellen. Da der Erhaltungskoeffizient insbesondere bei kleinen Wachstumsraten einen großen Einfluss hat, wurde der Einfluss des Erhaltungskoeffizienten auf die Simulationsergebnisse im reduzierten Modell untersucht. Hierfür wurde der Erhaltungskoeffizient aller Organismen auf denselben Wert festgesetzt. Die Werte wurden sukzessive erst auf $1 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$, $2 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$ und dann auf $3 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$ fixiert (Abbildung 26).

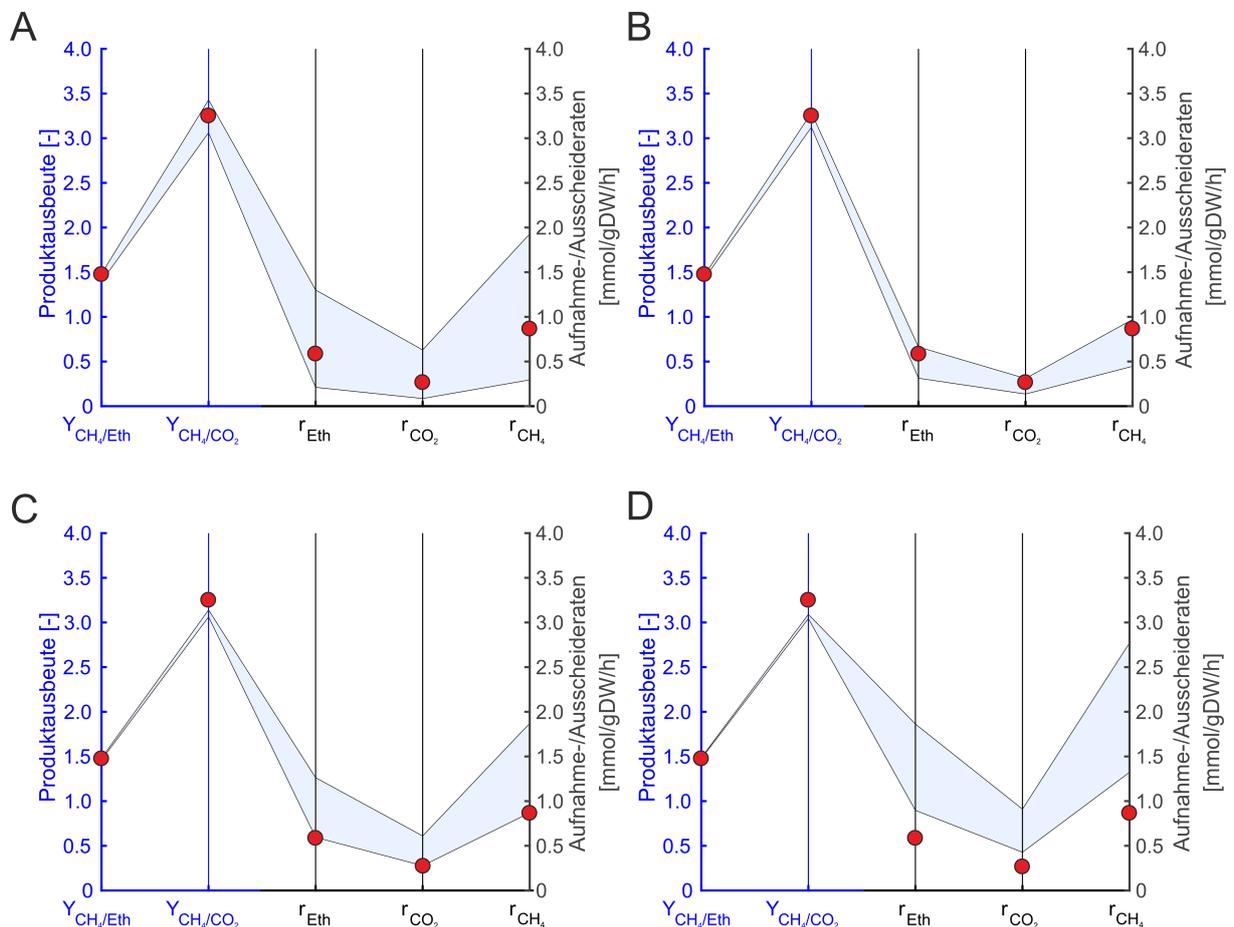


Abbildung 26: Einfluss des Erhaltungskoeffizienten auf die Simulationsergebnisse des reduzierten Sechs-Organismen-Modells. Simuliert wurde mit den originalen Erhaltungskoeffizienten (A) und mit identischen Erhaltungskoeffizienten für alle Organismen von $1 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/(\text{g}_{\text{TM}}\text{h})$ (B), $2 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/(\text{g}_{\text{TM}}\text{h})$ (C) und $3 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/(\text{g}_{\text{TM}}\text{h})$ (D). Die Bereiche für spezifische Austauschraten r , Methanausbeute und Methan:CO₂-Verhältnis sind hellblau dargestellt. Zusätzlich sind die experimentellen Daten der Ethanolanreicherungskultur (Mittelwert aus zwei parallelen Experimenten) dargestellt (rote Kreise). $\mu_c = 0,01 \text{ h}^{-1}$. Organismen: A. *woodii*, P. *freudenreichii*, S. *fumaroxidans*, D. *vulgaris*, M. *hungatei*, M. *barkeri*.

Bei identischen Erhaltungskoeffizienten für alle Spezies sind die vorhergesagten Bereiche für die spezifischen Raten deutlich schmäler als bei organismenspezifisch verschiedenen Erhaltungskoeffizienten. Mit steigendem Erhaltungskoeffizienten liegen auch die Bereiche für die vorhergesagten spezifischen Raten höher, da zusätzliche Energie für den erhöhten Erhaltungskoeffizienten benötigt wird und deshalb mehr Substrat in Produkte (und weniger Biomasse) umgesetzt werden muss. Bei einem Erhaltungskoeffizienten von $1 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$ für alle Organismen wurden die experimentellen Daten am besten wiedergegeben.

Es gibt verschiedene Faktoren, die den Erhaltungskoeffizienten beeinflussen können. Hierzu zählen beispielsweise die Temperatur, Stressfaktoren wie z.B. ein niedriger pH-Wert, osmotischer Stress oder die Motilität von Zellen, die zusätzliche Energie beansprucht [191, 192]. Die Sensitivitätsanalyse zeigte, dass der Erhaltungskoeffizient einen großen Einfluss auf die prädierten spezifischen Raten hat. Deshalb ist es wichtig, die Erhaltungskoeffizienten mittels experimenteller Daten möglichst genau zu bestimmen. Im gezeigten Beispiel spiegelt ein Wert von $1 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$ die experimentellen Daten am besten wieder und könnte somit als erste Näherung angenommen werden, wenn keine Daten für einen konkreten Organismus vorhanden sind. Desweiteren zeigen die ermittelten Ausbeuten im Gegensatz zu den spezifischen Raten nur geringe Unterschiede für die verschiedenen Erhaltungskoeffizienten und hatten damit eine geringe Sensitivität gegenüber diesem Faktor. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Vorhersagen für Ausbeuten generell zuverlässiger und robuster sind.

Metaproteomanalyse

Neben den experimentellen Daten für die Substrate und Biomasse wurde auch das Metaproteom der Ethanolanreicherungskultur analysiert (s. Methoden Abschnitt 3.2). Zum einen wurde untersucht, welche Taxonomien in der Biomasse zu finden sind und inwieweit sie sich auf die berücksichtigten Gilden im Modell übertragen lassen. Zum anderen wurde das Metaproteom bezüglich der vorhandenen Enzyme für charakteristische Stoffwechselwege untersucht.

In einem ersten Schritt wurden Daten bezüglich der gefundenen Taxonomien untersucht. Die Spektrenanzahl (SpeC; aus dem Englischen: Spectral Counts) diente dabei als Annäherung für die Berechnung des Anteils der taxonomischen Gruppen an der Gesamtbio­masse. Zunächst wurde die Stufe "Domäne", in der sich Eukaryonten, Bakterien, Archaeen und Viren unterscheiden lassen, analysiert. Im Mittel wurden 45,7% der Spektren den Archaea, 22,0% den Bacteria, 10,2% den Eukaryota und 0,2% den Viren zugeordnet, während 21,9% keiner Domäne zugewiesen werden konnten. Die methanogenen Organismen gehören der Domäne Archaea und die Gärer der Domäne Bacteria an. Mit einem Anteil von 10,2% sind relativ viele Spektren aus der Domäne der Eukaryota vorhanden. Möglicherweise sind die entsprechend gefundenen Proteine auf Pflanzenrückstände aus früheren Substraten der Anreicherungskultur und auf Verunreinigungen zurückzuführen. Eukaryota und Viren sind in den Modellen nicht berücksichtigt. Insgesamt waren die Spektrenanteile über die verschiedenen Verdünnungsraten und zwischen den beiden

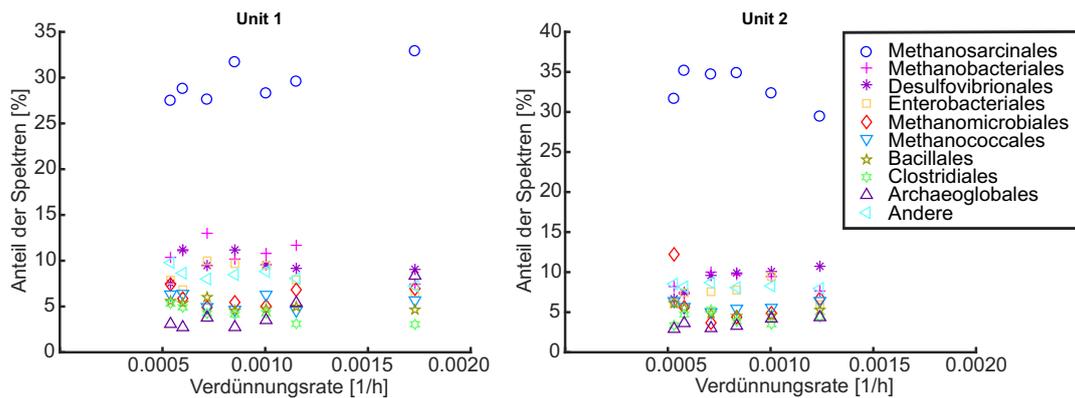


Abbildung 27: Spektrenanteil der verschiedenen Ordnungen in der Ethanolanreicherungskultur für verschiedene Verdünnungsraten. Hierbei wurden nur die Spektren berücksichtigt, die einer Ordnung zugewiesen werden konnten, die Unbekannten wurden entfernt (durchschnittlicher Anteil an Unbekannten: 49%). Ordnungen, die in keiner Probe auf 5% oder mehr der Gesamtspektren kamen, wurden in „Andere“ zusammengefasst.

Reaktoren sehr ähnlich. In den Simulationen gab es sowohl Lösungen mit hohen Anteilen an methanogenen Organismen, als auch Lösungen mit hohen Anteilen an Bakterien (siehe Abbildung 24). Für eine genauere Aufschlüsselung sind tiefergehende Analysen notwendig. Hierfür wurden die Daten auf Ordnungsebene untersucht. Auf dieser taxonomischen Ebene ist der Anteil an Unbekannten (keiner Ordnung zugeordnet) Spektren mit durchschnittlich 49,2% sehr hoch. Als abundanteste Ordnung war Methanosarcinales mit 15,1% vertreten. Dem folgen Methanobacteriales (4,7%), Desulfovibrionales (4,5%), Enterobacteriales (3,8%), Methanomicrobiales (3,0%), Methanococcales (2,7%), Bacillales (2,5%), Clostridiales (2,0%) und Archaeoglobales (1,9%). In Abbildung 27 sind die Spektrenanteile der verschiedenen Ordnungen für beide Reaktoren aufgeführt. Dabei wurden die Unbekannten nicht mit berücksichtigt und der Anteil der identifizierten Ordnungen dargestellt. Alle Ordnungen, die dabei in keiner Probe eine Abundanz von mehr als 5,0% erreichen, wurden als „Andere“ zusammengefasst.

Einige der genannten Gruppen lassen sich auf die Modellorganismen übertragen. Methanosarcinales entspricht *M. barkeri* im Modell. Methanobacteriales, Methanomicrobiales und Methanococcales beinhalten cytochromfreie hydrogenotrophe Methanogene und können damit *M. hungatei* zugeordnet werden. *D. vulgaris* kann als Stellvertreter für Desulfovibrionales angesehen werden. Da die verbleibenden ebenfalls hochabundanten Organismen keinem Modellorganismus zugewiesen werden konnten, wurden die Ergebnisse noch detaillierter untersucht.

Die identifizierten Spektren, der Ordnung Enterobacteriales, gehörten zu 78,6% zu Treffern für eine Alkohol-Dehydrogenase, welche zu den 10 Proteinen mit dem höchsten Spektrenanteil gehörte. Dieses Enzym ist neben der Aldehyd-Dehydrogenase ein Schlüsselenzym für die Ethanoloxidation. Deshalb ist zu vermuten, dass beide Enzyme demselben Organismus entspringen. Die Aldehyd-Dehydrogenase stammte hauptsächlich aus der Ordnung Desulfovibrionales. Die Treffer für die Alkohol-Dehydrogenase wurden durch einen BLAST zugeordnet und in Uniprot

war kein Eintrag für eine Alkohol-Dehydrogenase in einer *Desulfovibrio* Spezies zu finden. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass beide Enzyme aus *Desulfovibrionales* stammen und auf Grund fehlender Daten in der Datenbank falsch zugeordnet wurden. Für die Schätzung der Biomasseanteile wurden die Spektrenanteile für die Alkohol-Dehydrogenase manuell der Ordnung *Desulfovibrionales* zugewiesen.

Organismen der Ordnung *Bacillales* sind überwiegend aerob [193, 194] und spielen im Biogasprozess deshalb wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle. Dennoch wurden sie wiederholt in Biogasanlagen gefunden [82]. Möglicherweise verwerten sie Reste von Sauerstoff die mit in den Prozess gelangen und stellen dadurch anaerobe Bedingungen für die übrigen Organismen sicher. Organismen der Gattung *Archaeoglobales* sind nicht zu erwarten, da es sich um hyperthermophile Organismen handelt [195] und die Kultivierungen unter mesophilen Bedingungen durchgeführt wurden. Bei den identifizierten Proteinen handelte es sich um housekeeping-Proteine, die keinen Rückschluss auf die Funktion der Organismen in der Gemeinschaft zulassen. Hinweise auf zusätzliche bisher nicht berücksichtigte Abbauewege gab es nicht.

Clostridiales waren ebenfalls unter den häufigsten identifizierten Taxonomien. Diese taxonomische Gruppe ist jedoch sehr divers und die zugeordneten Proteine waren nicht spezifisch für bekannte Abbauewege. Unter den häufigsten Proteinen waren Malat-Dehydrogenase, Chaparonine (GroEL) und Zellmembranproteine.

Insgesamt ergibt sich ein Verhältnis der Spektren der zugeordneten Gruppen zueinander von 26% *Desulfovibrionales*, 30% hydrogenotrophe cytochromfreie Methanogene und 44% *Methanosarcinales*. Diese Verhältnisse wurden als grobe Schätzwerte für die Gemeinschaftszusammensetzung für den Vergleich mit den Modellen herangezogen (s. Abbildung 28). Dabei ist allerdings zu beachten, dass diese Schätzwerte aufgrund der zahlreichen nicht zugeordneten Spektren und taxonomischen Gruppen von hoher Unsicherheit sind.

Nicht immer lassen sich Taxonomien eindeutig mit metabolischen Funktionen verknüpfen. *Chlostridien* sind beispielsweise sehr vielfältig und können eine Vielzahl von metabolischen Stoffwechselwegen ausbilden. Auf der anderen Seite sind einige Stoffwechselwege in vielen verschiedenen Organismen aus unterschiedlichen Ordnungen vorhanden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu den Taxonomien auch die Proteine bezüglich der zugehörigen Stoffwechselwege untersucht.

Für den Ethanolabbau wurde eine Liste mit potenziellen Schlüsselenzymen und der zugehörigen Taxonomie erstellt (Tabelle 16). Die einzelnen Stoffwechselwege überschneiden sich teilweise. Folglich können nicht alle Proteine eindeutig einem Stoffwechselweg zugeordnet werden. Die Proteine wurden so ausgewählt, dass sie möglichst spezifisch für den angegebenen Stoffwechselweg und somit als Marker geeignet sind. In einigen Fällen kann eine zusätzliche Betrachtung der Taxonomie Aufschluss über den zugehörigen Stoffwechselweg geben. Ein Beispiel hierfür ist die CO-methylierende Acetyl-CoA-Synthase (EC 2.3.1.169). Dieses Enzym ist sowohl an

der acetoklastischen Methanogenese als auch an der Homoacetogenese beteiligt [196]. Ist das Enzym hauptsächlich bakteriellen Ursprungs, handelt es sich um Homoacetogenese, stammt das Enzym jedoch aus Archaeen, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Methanogenese aktiv. In der Tabelle ist deshalb die Taxonomie, die für den entsprechenden Stoffwechselweg erwartet wird, mit angegeben. In Tabelle 16 ist neben den Schlüsselenzymen auch die gemessene durchschnittliche Spektrenzahl aus der jeweiligen Taxonomie aufgeführt. Die Enzyme für die Ethanoloxidation, die hydrogenotrophe Methanogenese und die acetoklastische Methanogenese wurden zum überwiegenden Teil in hoher Abundanz (>500) gefunden. Eine Ausnahme bilden die 5-Methyltetrahydrosarcinapterin-Corrinoid CO-Methyl-Transferase (2.1.1.245, SpeC: 0), sowie die CO-methylierende Acetyl-CoA-Synthase (EC 2.3.1.169, SpeC: 38,9) der acetoklastischen Methanogenese, die nicht oder nur in kleinen Mengen identifiziert wurden. Die Spektrenzahl, die für die CO-methylierende Acetyl-CoA-Synthase (EC 2.3.1.169) aus Bakterien gemessen wurden lagen dagegen nur bei durchschnittlich zwei. Für den Propionatstoffwechsel wurden die beiden Enzyme Propionyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.3) und Methylmalonyl-CoA Carboxy-Transferase in geringen Mengen (SpeC: 8) gefunden. Im Vergleich zur Ethanoloxidation und der Methanogenese scheinen die Homoacetogenese und die Propionatgärung eine untergeordnete Rolle in dieser Kultur zu spielen.

Die Analyse zeigt auch, dass nicht alle Proteine gleich gut wiedergefunden werden. Unter den häufigsten Enzymen sind viele Enzyme für die Methanogenese und die taxonomischen Einordnung gibt Hinweise darauf, dass die acetoklastische Methanogenese aktiv ist. Dennoch wurde das Schlüsselenzym 5-Methyltetrahydrosarcinapterin-Corrinoid CO-Methyl-Transferase (2.1.1.245) nicht nachgewiesen, obwohl es bei acetoklastischer Methanogenese aktiv sein sollte. Eine mögliche Ursache ist die schlechte Ionisierbarkeit bestimmter Peptide, die dazu führt, dass die Peptide mit dem Massenspektrometer nicht detektiert werden können. Weiterhin können Enzyme mit besonders hoher spezifischer Enzymaktivität in verhältnismäßig geringen Mengen vorliegen. Diese Faktoren sollten bei der Auswahl geeigneter Schlüsselenzyme berücksichtigt werden. Vorversuche mit definierten Kulturen, bei denen die ablaufenden Stoffwechselwege bekannt sind, können bei der Auswahl helfen.

Neben den Schlüsselenzymen wurden die Proteine nach ihren Spektrenzahlen sortiert (Tabelle 17), um gegebenenfalls Hinweise auf weitere wichtige Abbauwege zu finden. Unter den häufigsten Enzymen waren Enzyme der Methanogenese (EC:1.5.98.2: 185 SpeC; EC:2.8.4.1: 1.585 SpeC; EC:1.5.98.1: 700 SpeC; EC:2.1.1.86: 937 SpeC), der Acetatproduktion und acetoklastischen Methanogenese (EC:6.2.1.1: 688 SpeC; EC:1.2.7.4: 588 SpeC) und Ethanoloxidation (EC:1.1.1.1: 594 SpeC; 1.2.99.7: 807 SpeC).

Zusätzlich wurden einige ATPasen, die mit dem Energiemetabolismus der Organismen verknüpft sind, gefunden. Auffällig waren hohe Spektrenzahlen für eine Ornithin-Racemase (EC:5.1.1.12) und eine 1,3-Propandiol-Dehydrogenase (EC:1.1.1.202). Eine genauere Analyse zeigte jedoch, dass die Treffer für die Ornithinracemase jeweils mit denen für die Acetyl-CoA-

Synthase zusammenfallen und die Treffer für 1,3-Propandiol-Dehydrogenase mit denen der Alkohol-Dehydrogenase (EC: 1.1.1.1). Einige Peptide sind in mehreren Proteinen vorhanden und können deshalb nicht eindeutig zugeordnet werden, was dann zu Mehrfachtreffern führt. Aus dem Kontext der Ethanolanreicherungskultur wurde angenommen, dass es sich bei den gefundenen Enzymen um Alkohol-Dehydrogenasen und Acetyl-CoA-Synthasen handelt.

Tabelle 16: Potenzielle Schlüsselenzyme für verschiedene Stoffwechselwege. Die Enzyme wurden so ausgewählt, dass sie möglichst spezifisch für die zugehörigen Stoffwechselwege sind. Einige der Enzyme gehören zu mehreren Stoffwechselwegen, können aber über die Taxonomie zugeordnet werden. Neben Stoffwechselwegen und Schlüsselenzymen sind deshalb die erwartete Taxonomie sowie die durchschnittlichen Spektrenanzahlen SpeC (für das Enzym und die entsprechende Taxonomie) der Anreicherungskultur aufgeführt.

Stoffwechselweg	Enzym	Taxonomie	SpeC
Ethanol-oxidation	Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	Bacteria	584.6
	Aldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.99.7)	Bacteria	763.2
Methanogenese aus Acetat	5-Methyl-tetrahydrosarcinapterin-Corrinoid/Eisen-Schwefelprotein CO-Methyl-Transferase (2.1.1.245)	Archaea	0
	anaerobe Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase (EC 1.2.7.4)	Archaea	569.4
	CO-methylierende Acetyl-CoA-Synthase (EC 2.3.1.169)	Archaea	38.9
	Acetyl-CoA-Synthase (EC 6.2.1.1)	Archaea	508
Methanogenese aus CO ₂ + H ₂ oder Formiat	Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (EC 1.5.98.1)	Archaea	665.1
	5,10-Methylen-tetrahydromethanopterin-Reduktase (EC 1.5.98.2)	Archaea	723.8
Homoacetogenese (aus CO ₂ + H ₂)	anaerobe Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase (EC 1.2.7.4)	Bacteria	0.00
	CO-methylierende Acetyl-CoA-Synthase (EC 2.3.1.169)	Bacteria	2.35
Propionatabbau	Propionat-CoA-Transferase (EC 2.8.3.1)	Bacteria	0.00
	Propionyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.3)	Bacteria	8.23
Methylmalonyl-CoA-Weg	Methylmalonyl-CoA-Carboxy-Transferase (EC 2.1.3.1)	Bacteria	8.23
	(S)-Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (EC 4.1.1.41)	Bacteria	0.00

Tabelle 17: Enzyme (nach EC-Nummern) mit der höchsten spektralen Abundanz in der Ethanolanreicherungskultur. Aufgeführt ist jeweils die EC-Nummer, das zugehörige Enzym, der durchschnittliche Spektrenanteil aus den Metaproteomdaten aus der Ethanolanreicherungskultur und der zugeordnete Stoffwechselweg.

EC-Nr.	Protein	%-SpeC	Stoffwechselweg
-	unbekannt	10.33	
2.8.4.1	Methyl-CoM-Reduktase	7.51	Methanogenese
2.1.1.86	Tetrahydromethanopterin-S-Methyl-Transferase	4.76	Methanogenese
1.2.99.7	Aldehyd-Dehydrogenase (FAD-abhängig);	4.12	Ethanoloxidation
1.5.98.2	5,10-Methylen-tetrahydromethanopterin-Reduktase	3.95	Methanogenese
1.5.98.1	Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase	3.51	Methanogenese
6.2.1.1	Acetyl-CoA-Synthase	3.49	nicht eindeutig
5.1.1.12	Ornithin-Racemase	3.39	
1.1.1.202	1,3-Propandiol-Dehydrogenase	3.04	
1.1.1.1	Alkohol-Dehydrogenase	3.03	Ethanoloxidation
1.2.7.4	anaerobe Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase	2.85	Methanogenese
1.12.98.1	Coenzyme-F420-Hydrogenase	2.59	Methanogenese
1.8.98.1	Dihydromethanophenazine:CoB-CoM-Heterodisulfid-Reduktase	1.68	Methanogenese
1.2.1.2	Formiat-Dehydrogenase	1.67	Methanogenese (Formiat)
3.6.3.14	ATP-Synthase	1.42	Energiemetabolismus
1.11.1.15	Thioredoxin-Peroxidase	1.14	
3.6.3.15	Na ⁺ -transportierende ATPase	0.91	Energiemetabolismus
1.8.-.-	Oxidoreduktase (aktiv an Schwefelgruppen der Donatoren)	0.87	
1.-.-.-	Oxidoreduktase	0.80	
1.1.99.33	Formiat-Dehydrogenase	0.80	Methanogenese (Formiat)
3.6.4.6	vesikelfusionierende ATPase	0.70	Energiemetabolismus

Verwendung der Metaproteomdaten für die Modellanpassung

Es wurden sowohl Organismen und Enzyme für die acetoklastische als auch die hydrogenotrophe Methanogenese gefunden. Hinweise auf Homoacetogenese, syntrophe Acetatoxidation oder die Ethanoloxidation über Propionat waren dagegen kaum zu finden. Eine Abschätzung der Gemeinschaftszusammensetzung zeigte eine Dominanz der acetoklastischen Methanogenen,

gefolgt von den hydrogenotrophen Methanogen. Insgesamt lassen sich die experimentellen Daten im Wesentlichen auf drei der sechs Modellorganismen übertragen: *D. vulgaris*, *M. barkeri* und *M. hungatei*.

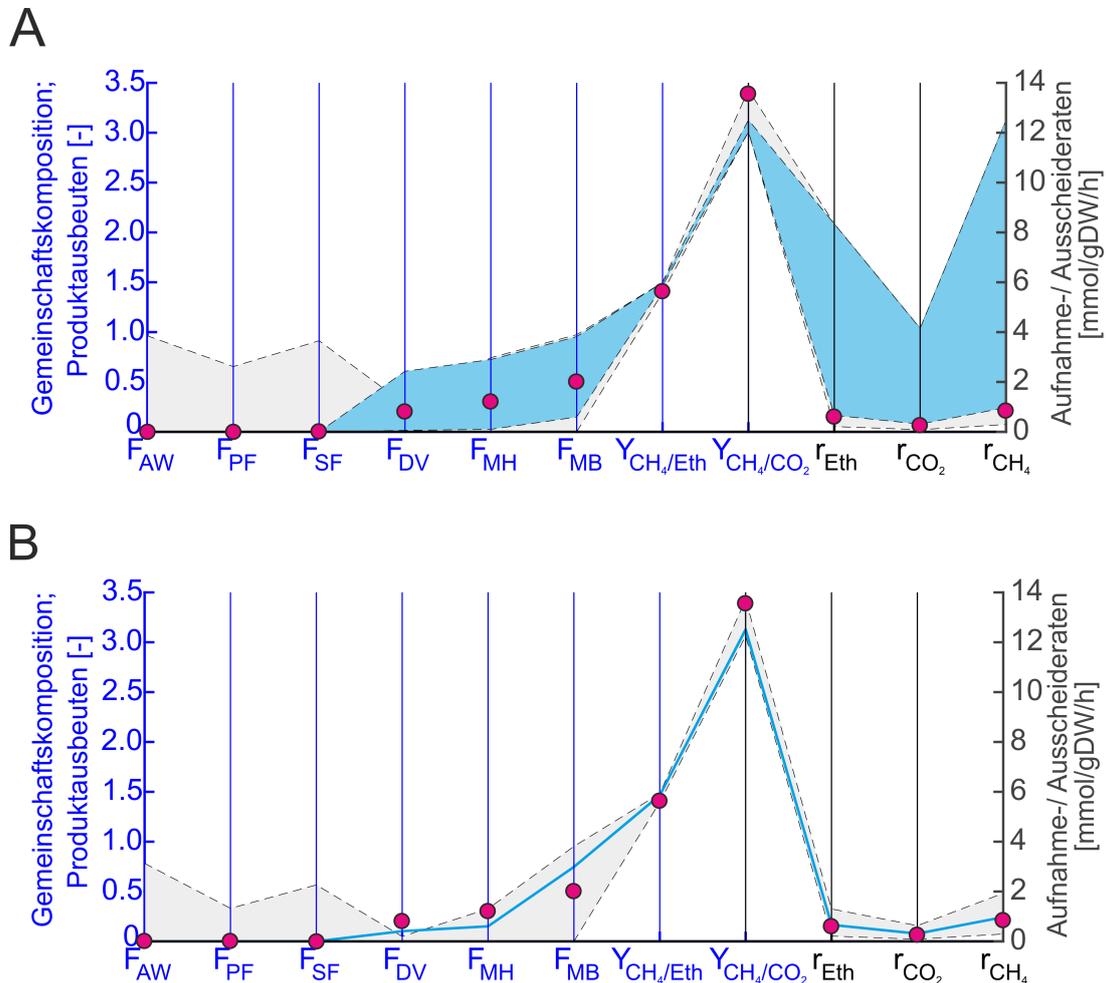


Abbildung 28: Simulationsergebnisse des Sechs-Organismen-Modells für das linearisierte vollständige (A) und das reduzierte (B) Modell nach Einbeziehung der Metaproteomdaten. Der blaue Bereich zeigt die Ergebnisse nach Ausschalten von *A. woodii*, *P. freudenreichii* und *S. fumaroxidans* entsprechend der Metaproteomdaten. Der graue Bereich zeigt die Ergebnisse der ursprünglichen Simulationen der Sechs-Organismen-Gemeinschaft mit allen Organismen (Abbildung 24). Zusätzlich sind die experimentellen Daten (Durchschnitt aus zwei parallelen Experimenten) dargestellt (rote Kreise). Die Daten beinhalten die Gemeinschaftszusammensetzung F , die spezifischen Austauschraten r , die Methanausbeute $Y_{CH_4/Eth}$ und das Methan:CO₂-Verhältnis Y_{CH_4/CO_2} . $\mu_c=0,001 \text{ h}^{-1}$; Organismen: AW: *A. woodii*, PF: *P. freudenreichii*, SF: *S. fumaroxidans*, DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*.

Diese Informationen wurden für die Anpassung der Modelle verwendet, indem die nicht relevanten Organismen ausgeschaltet wurden ($F_i=0$), was eine Reduktion des Lösungsraumes zur Folge hat. Das resultierende Ergebnis ist für beide Modelle zusammen mit den experimentellen Daten in Abbildung 28 dargestellt. Zufälligerweise entsprechen die drei Organismen, die aus dem Sechs-Organismen-Modell übrig bleiben, genau den drei Organismen aus dem Drei-Organismen-Modell (Abschnitt 4.3.1). Die Simulationsergebnisse unterscheiden sich jedoch

zu denen aus Abbildung 18 darin, dass hier keine Akkumulation von Acetat erlaubt war, eine andere Gemeinschaftswachstumsrate und die angepassten Erhaltungskoeffizienten (siehe oben) verwendet wurden. Für das linearisierte vollständige Modell ergeben sich nach wie vor breite Bereiche, während sich für das reduzierte Modell eine einzelne Gemeinschaftszusammensetzung mit zugehörigen Produktionsraten ergibt. Im reduzierten Modell ist *M. barkeri* der dominante Organismus, während *D. vulgaris* den kleinsten Teil der Gemeinschaft annimmt. Die gleiche Tendenz wird auch in den Metaproteomdaten widerspiegelt, auch wenn hier der Anteil an *M. barkeri* kleiner und der Teil an *D. vulgaris* größer geschätzt wird als im Modell. Es sollte hierbei jedoch beachtet werden, dass es sich dabei nur um grobe Schätzungen handelte.

Ein Vergleich der aus den Daten geschätzten Zusammensetzung mit den Ergebnissen der Gesamtbiomasseausbeutemaximierung im linearisierten vollständigen Sechs-Organismen-Modell (Abbildung 24) zeigt große qualitative Unterschiede. Folglich scheint die Maximierung der Gesamtbiomasse als Zielfunktion für das Gemeinschaftsmodell zumindest hier nicht relevant zu sein. Zwar wurden die spezifischen Substrataufnahme- und Produktbildungsraten sowie Biogaszusammensetzung und Methanausbeute relativ gut wiedergegeben. Auf der anderen Seite konnten die beteiligten Organismen und Stoffwechselwege nicht korrekt abgebildet werden. Organismen und Stoffwechselwege, die im Modell als relevant vorhergesagt wurden (Homoacetogenese, Propionsäuregärung), wurden im Experiment nicht nachgewiesen, während nachgewiesene Stoffwechselwege (hydrogenotrophe Methanogenese) im Modell ausgeschlossen wurden. Wie oben bereits erwähnt, werden die verschiedenen möglichen Stoffwechselwege im reduzierten Modell als gleich relevant betrachtet, während bei der Gesamtbiomasseausbeuteoptimierung die Biomasseausbeuten der einzelnen Organismen ausschlaggebend sind.

4.3.3. Neun-Organismen-Modell und Glukoseanreicherungskultur

Um eine Gemeinschaft zu simulieren, die auch Glukose abbauen kann, wurden dem Sechs-Organismen-Modell die Organismen *E. coli*, *C. acetobutylicum* und *S. wolfei* zugefügt. Als Vergleich diente ein zuvor durchgeführtes Experiment mit zwei Anreicherungskulturen, die ein Glukose-/Cellulosemedium als Substrat nutzen [197]. Da der Celluloseabbau im Modell bisher nicht implementiert ist, wurde angenommen, dass die Cellulose vollständig zu Glukose abgebaut wird, sodass Glukose als Ausgangspunkt im Modell dient.

Wie bei den vorhergehenden Modellen wurden in einem ersten Schritt Simulationen mit dem bilinearen vollständigen Modell durchgeführt, um den gesamten Lösungsraum zu untersuchen. Die Ergebnisse für die vorhergesagten Bereiche der Gemeinschaftszusammensetzung, Produktbildungs- und Substrataufnahmeraten, sowie die Biogaszusammensetzung und Methanausbeute sind in Abbildung 29 dargestellt.

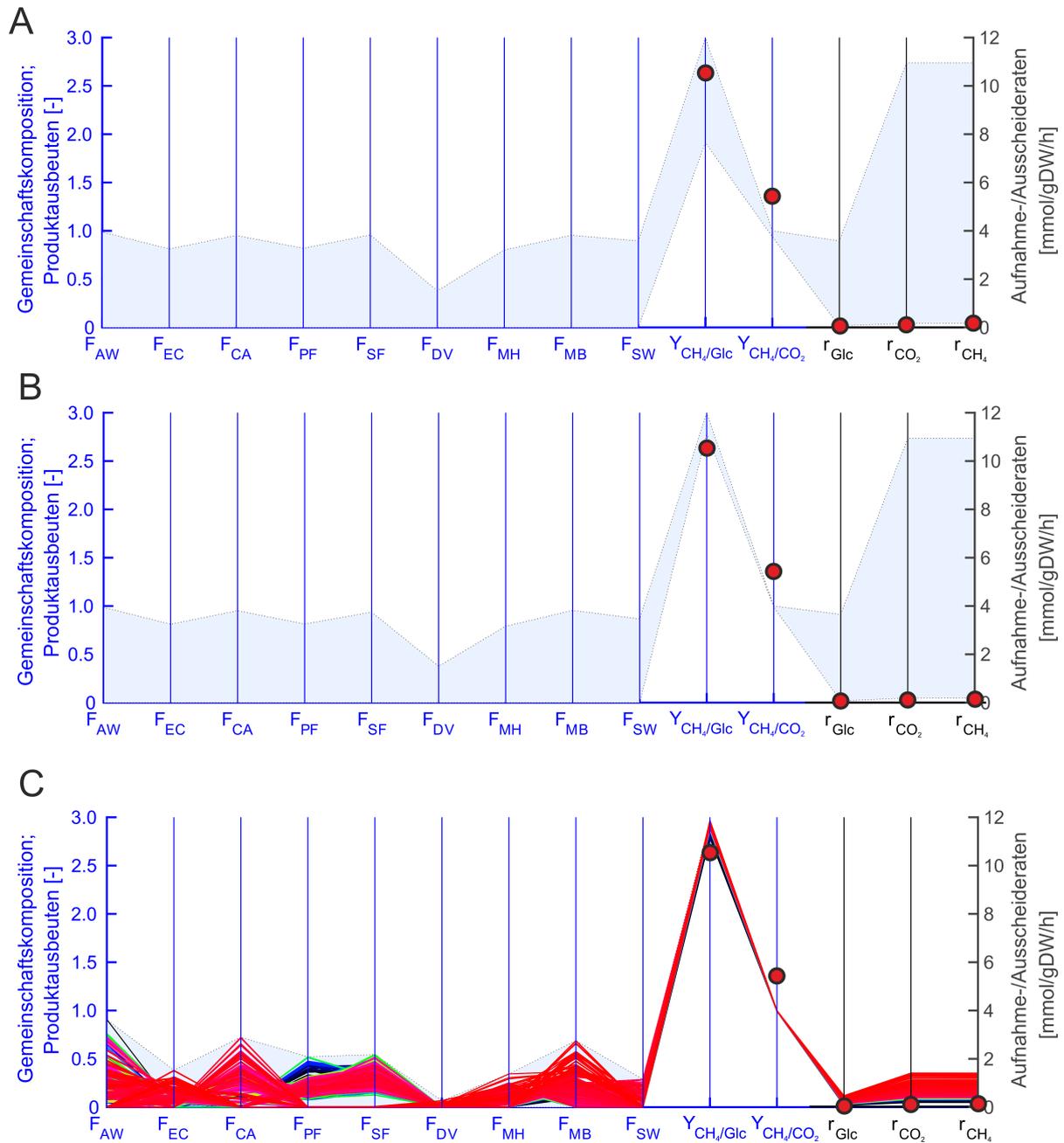


Abbildung 29: Simulationsergebnisse des Neun-Organismen-Modells für das bilineare (A), linearisierte vollständige (B) und das rezuzierte (C) Modell. Dargestellt sind die Bereiche für die Gemeinschaftszusammensetzung F , die Ethanolaufnahme-, CO_2 - und Methanproduktionsrate, sowie die Methanausbeute und das Methan: CO_2 -Verhältnis (hellblaue Bereiche). Im reduzierten Modell sind zusätzlich die EFVs aufgetragen (farbige Linien), die im vollständigen Modell nicht berechnet werden konnten. Die experimentellen Daten (rote Kreise) sind als Mittelwert aus zwei Experimenten aufgetragen. Die Gemeinschaftswachstumsrate lag für die linearisierten Modelle (B und C) bei $0,00067 \text{ h}^{-1}$. Organismen: AW: *A. woodii*, EC: *E. coli*, CA: *C. acetobutylicum*, PF: *P. freudenreichii*, SF: *S. fumaroxidans*, DV: *D. vulgaris*, MH: *M. hungatei*, MB: *M. barkeri*, SW: *S. wolfei*.

Die experimentellen Daten sowie die Produktionsraten und Produktausbeuten für alle Modelle sind zudem in Tabelle 18 zusammengefasst. Wie auch im Sechs-Organismen-Modell war eine zuverlässige Bestimmung der Gemeinschaftswachstumsrate mit dem bilinearen Modell nicht

möglich. Zudem sind die vorhergesagten Bereiche erneut breit und wenig aussagekräftig.

Anschließend wurden Simulationen mit dem linearisierten vollständigen und dem reduzierten Modell durchgeführt. Die Gemeinschaftswachstumsrate wurde hierbei auf die Verdünnungsrate aus dem Experiment festgesetzt. Wie auch in den Drei- und Sechs-Organismen-Modellen waren die vorhergesagten unteren Grenzen für die Glukoseaufnahmerate und die CO_2 - und CH_4 -Produktionsrate zwischen linearisiertem vollständigem und linearem reduziertem Modell identisch, die obere Grenze lag im vollständigen Modell jedoch um einen Faktor zwischen sieben und acht über dem Ergebnis des reduzierten Modells. Die Bereiche für das vollständige Modell sind damit deutlich breiter als im reduzierten Modell und stimmen annähernd mit dem Ergebnis des bilinearen Modells überein, obwohl dort keine Wachstumsrate festgelegt worden ist.

Die aus dem Experiment ermittelten spezifischen Raten lagen knapp unterhalb der in beiden Modellen bestimmten Minima. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Biomasseausbeute im Modell unterschätzt wird. Mögliche Ursachen können Organismen sein, die für die vorhandenen Substrate effizientere Stoffwechselwege und dadurch höhere Biomasseausbeuten besitzen. Zudem kann es, wie oben diskutiert, sein, dass Erhaltungskoeffizienten überschätzt wurden, was insbesondere bei kleinen Wachstumsraten einen großen Einfluss auf das Ergebnis hat.

Die Methanausbeuten sind in beiden Modellen nur leicht höher als im Experiment. Gleichzeitig wurde im Experiment ein deutlich höherer Methananteil im produzierten Biogas gemessen, als durch das Modell abgebildet wird. Die theoretische Zusammensetzung des Biogases bei einem reinen Kohlenhydratsubstrat ist ungefähr 50% CH_4 und 50% CO_2 . Im Modell wurden ebenfalls annähernd gleiche Anteile von CH_4 und CO_2 vorhergesagt. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz zwischen Modell und Experiment ist die Tatsache, dass das Modell die Lösung der Gase in der flüssigen Phase nicht mit berücksichtigt. Im Modell werden keinerlei Konzentrationen von Metaboliten im Medium oder Phasenübergänge und Löslichkeiten berücksichtigt. Da CO_2 in Wasser eine höhere Löslichkeit als CH_4 aufweist, ist möglicherweise ein Teil des CO_2 in der flüssigen Phase gelöst und wird damit nicht bei der Gasanalyse gemessen. Eine Möglichkeit, gelöstes CO_2 zu messen besteht in der Messung des FOS/TAC-Wertes [198]. Dabei handelt es sich um das Verhältnis der flüchtigen Fettsäuren zu der Pufferkapazität der Lösung und kann durch Titration ermittelt werden. Die Pufferkapazität beruht auf dem gelösten CO_2 (Carbonatpuffer) und lässt deshalb Rückschlüsse auf die CO_2 -Konzentration in der Lösung zu. Zwar wurden die Fettsäuren im Reaktor bestimmt, für die Pufferkapazität lagen jedoch keine Messwerte vor. Desweiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der produzierten Gase aus dem System entwichen ist, da eine hundertprozentige Dichtheit nicht garantiert werden kann. Auch Messungenauigkeiten können zu Abweichungen in den Ergebnissen führen, insbesondere, wenn sich die Durchlässigkeit für die verschiedenen Gase unterscheidet.

Tabelle 18: Simulationsergebnisse des Neun-Organismen-Modells und experimentelle Daten für die Glukoseanreicherungskultur. Aufgelistet sind die Simulationsergebnisse für das bilieare (bvM), linearisierte vollständige (lvM) und das reduzierte Modell (rvM). Zudem sind die experimentellen Daten aus zwei parallelen Anreicherungskulturen auf Glukose gezeigt.

Experiment/ Simulation	μ_c [h ⁻¹]	Austauschraten [mmol/g _{TM} /h]			Ausbeuten [mol/mol]	
		Glukose	CO ₂	CH ₄	CH ₄ :CO ₂	CH ₄ : Glukose
Reaktor 1	0,00067	0,042	0,074	0,11	1,44	2,56
Reaktor 2	0,00067	0,074	0,14	0,19	1,38	2,64
Mittelwert	0,00067	0,058	0,11	0,15	1,41	2,60
bvM	n.b.	0,059- 4,07	0,18- 10,95	0,17- 10,95	0,94-1,00	1,91-3,00
lvM	0,00067 (fixiert)	0,069- 3,65	0,19- 10,95	0,19- 10,94	0,99-1,00	2,79-3,00
lrM	0,00067 (fixiert)	0,069- 0,48	0,19- 1,41	0,19-1,41	0,99-1,00	2,78-2,97

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Mikrobielle Gemeinschaften spielen eine wichtige Rolle in der Natur, bei der menschlichen Gesundheit und in technischen Anwendungen. Während constraint-based Modeling (CBM) wesentlich zu einem besseren Verständnis metabolischer Netzwerke beigetragen hat, gibt es bei Gemeinschaftsmodellen, die von ausbalanciertem Wachstum ausgehen, verschiedene Herausforderungen und Probleme:

1. Die Modelle sind im Gegensatz zu Modellen einzelner Organismen bilinear. Deshalb können Standardmethoden aus dem CBM nicht direkt auf die Gemeinschaftsmodelle angewendet werden. Die Modelle können entweder mit nicht-linearer Optimierung analysiert werden oder müssen linearisiert werden. Bei der nicht linearen Optimierung können optimale Lösungen nicht garantiert werden. Für die Linearisierung wird entweder die Gemeinschaftswachstumsrate oder die Gemeinschaftskomposition festgelegt. Um den Lösungsraum zu untersuchen, müssen dabei in der Regel mehrere Simulationen durchgeführt werden.
2. Flussvariabilitätsanalyse (FVA) wird im CBM typischerweise genutzt, um die möglichen Bereiche für verschiedene Raten zu bestimmen. Dabei ergeben sich oft breite Bereiche und Abhängigkeiten der verschiedenen Raten sind nicht direkt sichtbar. Um die Zusammenhänge und Abhängigkeiten genauer zu untersuchen muss eine Vielzahl von Simulationen durchgeführt werden. Für Gemeinschaftsmodelle mit einer höheren Anzahl an Organismen ist eine tiefgehende Analyse nicht mehr möglich.
3. Im Lösungsraum von Gemeinschaftsmodellen sind häufig unrealistische Lösungen enthalten, bei denen Organismen eine große Menge an Substrat zu Produkt umsetzen und dabei nur geringe Mengen Biomasse produzieren, obwohl eine höhere Menge möglich wäre. Solche Lösungen sind teilweise auch bei der maximalen Gemeinschaftswachstumsrate möglich. Um ein realistisches Verhalten der Gemeinschaft zu untersuchen, müssen solche Lösungen identifiziert und entfernt werden.
4. Die detaillierte Analyse von Stoffwechselwegen mithilfe von Elementarmoden und elementaren Flussvektoren (EFVs) ist in der Regel nur für sehr kleine Gemeinschaften (siehe Tabelle 10) möglich. Die EFV-Analyse erlaubt eine tiefgehende Analyse der Netzwerke als es beispielsweise durch FVA der Fall ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Ansatz (RedCom) für die Erstellung reduzierter Gemeinschaftsmodelle auf Basis von Nettoumsätzen der Einzelmodelle entwickelt. Drei der oben genannten Aspekte werden hierbei berücksichtigt. Taffs et al. [44] veröffentlichten eine Methode, bei der ebenfalls Lösungen aus den Einzelmodellen (basierend auf EM und nicht wie hier EFV) als Reaktionen in einem Gemeinschaftsmodell verwendet wurden („nested pathway consortium analysis approach“). Das Grundprinzip beider Ansätze ist gleich, allerdings wird durch die

Verwendung von EFVs zum einen das ausbalancierte Wachstum sichergestellt und zum anderen die Verwendung inhomogener Nebenbedingungen (Erhaltungskoeffizienten, Ratengrenzen) ermöglicht.

In einem ersten Schritt werden im RedCom-Ansatz alle EFVs in den Einzelmodellen für eine bestimmte Wachstumsrate berechnet. Hieraus werden EFVs, die einem Optimalitätskriterium entsprechen, ausgewählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden minimale Substratumsätze verwendet, was die Verschwendung von Substraten im Modell verhindert (siehe Punkt 3)). Alternative Optimalitätskriterien, wie die Minimierung der Gesamtflüsse oder der Enzymkosten, können alternativ ebenfalls eingesetzt werden. Die ausgewählten EFVs dienen als Reaktionen im reduzierten Gemeinschaftsmodell. Für Gemeinschaften von zwei bis neun Organismen wurden sowohl reduzierte Gemeinschaftsmodelle mit dem RedCom-Ansatz, als auch bilineare vollständige und linearisierte vollständige Modelle erstellt und miteinander verglichen. In allen Fällen waren die reduzierten Modelle deutlich kleiner und erlaubten eine detaillierte Analyse mit Hilfe von EFVs. Gemeinschaftsmodelle mit drei, sechs und neun Organismen wurden im Detail untersucht und führten in den reduzierten Modellen zu kleineren Lösungsräumen und wie erwünscht den Ausschluss von unrealistischen Lösungen mit Substratverschwendung.

Es gibt zwei potenzielle Nachteile bei der entwickelten Methode. Zum einen enthalten die reduzierten Modelle lediglich Informationen über die Austauschmetabolite und die entsprechenden Nettoumsätze. Informationen zum internen Stoffwechsel fehlen dagegen. In den meisten Fällen liegt der Fokus bei der Modellierung mikrobieller Gemeinschaft jedoch auf dem Austausch von Metaboliten (Interaktionen) sowie der Gemeinschaftszusammensetzung. Beides kann mit den reduzierten Modellen abgebildet werden. Da die reduzierten Modelle auf EFVs aus vollständigen Einzelmodellen basieren, besteht die Möglichkeit, nachträglich in den Einzelmodellen die zugrundeliegenden Stoffwechselwege von Lösungen im reduzierten Modell zu analysieren. Ein zweiter potenzieller Nachteil besteht darin, dass die Berechnung von EFVs im Normalfall nicht für genomskalige Netzwerke geeignet ist. Für die typischen Anwendungen, bei denen der Austausch der Metabolite und die Struktur der Gemeinschaft im Mittelpunkt steht, scheinen kleinere Einzelmodelle mit dem Fokus auf dem Zentralstoffwechsel ausreichend zu sein. Desweiteren besteht die Möglichkeit die elementaren Konversionen [199] direkt, ohne den Zwischenschritt über die EFVs, zu berechnen, was auch in genomskaligen Modellen machbar erscheint.

Für erstellte linearisierte vollständige und reduzierte Drei-Organismen-Modelle wurden Minimal Cut Sets (MCS) für eine erhöhte Methanausbeute sowie eine erhöhte spezifische Methanbildungsrate berechnet. Die Berechnung lieferte für beide Modelle sinnvolle Lösungen, die Anzahl der MCS war im linearisierten vollständigen Modell jedoch deutlich höher. Wenn beispielsweise eine Strategie in der Unterdrückung des Wachstums eines Organismus liegt, ist dies im reduzierten Modell ein Cut Set während im linearisierten vollen Modell auch jede essentielle Reaktion im Stoffwechsel dieses Organismus ein Cut Set darstellt. Deshalb kann es im linearisierten vollständigen Modell ähnlich wie bei der EFV-Berechnung schneller zu Problemen durch eine

kombinatorische Explosion kommen. Die gefundenen Strategien waren in beiden Modellen weitestgehend äquivalent, es gab jedoch auch eine Lösung für die Erhöhung der Methanausbeute, die nur im linearisierten vollständigen Modell gefunden wurde. Grund hierfür war eine Lösung, die auf einer Kopplung zweier Substrate (Acetat und Wasserstoff) bei der Methanogenese beruhte und das Fehlen eines entsprechenden Nettoumsatzes im reduzierten Modell. Im reduzierten Modell wurde der entsprechende EFV entfernt, da er sich als Kombination anderer EFVs darstellen lässt. Hier kann es sinnvoll sein, gekoppelte Lösungen beizubehalten um alle relevanten Cut Sets zu finden. Dies erhöht allerdings die Anzahl der Reaktionen und damit die Komplexität der Modelle.

Mit dem linearisierten vollständigen Drei-Organismen-Modell wurden verschiedene mögliche Zielfunktionen für Gemeinschaftsmodelle getestet. Dies waren die Maximierung der Gemeinschaftswachstumsrate, der Gesamtbiomasseausbeute und eine simultane Maximierung der Biomasseausbeuten aller Organismen. Von den untersuchten Zielfunktionen erscheint die simultane Biomasseausbeutenmaximierung am sinnvollsten, zeitgleich jedoch am schwierigsten umzusetzen. Bei der Gemeinschaftswachstumsratenmaximierung sind im Lösungsraum zahlreiche Lösungen enthalten, bei denen ein oder mehr Organismen Substrat verschwenden. Zudem kann nur die maximale Gemeinschaftswachstumsrate untersucht werden. Bei der Gesamtbiomassemaximierung ist der Lösungsraum stark eingeschränkt und Organismen werden vorrangig auf Grund ihrer maximalen spezifischen Biomasseausbeuten bevorzugt. Ergebnisse eines Sechs-Organismen-Modells zeigten große qualitative Unterschiede der Vorhersagen zu experimentellen Daten einer Anreicherungskultur. Das Optimalitätskriterium, welches im RedCom-Ansatz verwendet wurde, kommt einer simultanen Maximierung aller Biomasseausbeuten am nächsten, unterscheidet sich jedoch darin, dass auch Lösungen für verschiedene Substrat-Produktkombinationen übernommen werden, selbst wenn sie bezogen auf ein Substrat eine niedrigere Biomasseausbeute haben. Damit wird eine Flexibilität des mikrobiellen Stoffwechsels ermöglicht.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit erstellten Gemeinschaftsmodellen mit bis zu neun Organismen sollte der Prozess der Biogasbildung abgebildet werden. Hierfür wurden Modellorganismen (funktionale Gilden) ausgewählt, die jeweils eine bestimmte metabolische Funktion im Prozess widerspiegeln. Bei den Modellen handelte es sich um sogenannte Kernmodelle, deren Fokus auf dem Zentralmetabolismus lag. Für die verschiedenen Modelle wurde jeweils mit den drei Modellierungsansätzen (bilineares und linearisiertes vollständiges sowie reduziertes (RedCom) Modell) die maximale Wachstumsrate, sowie die möglichen Bereiche für die Austauschraten, Ausbeuten und Gemeinschaftszusammensetzung bestimmt. Im reduzierten Modell war der Lösungsraum im Vergleich zum bilinearen und linearisierten vollständigen Modell deutlich kleiner, da unrelevante Lösungen ausgeschlossen werden und dadurch wesentlich präzisere Vorhersagen getroffen werden können (höhere prädiktive Power). Die Lösungen vom bilinearen Modell waren konsistent mit denen der linearisierten Modelle und können einen Überblick über den Lösungsraum geben. Allerdings ist der Solver von den Startwerten abhängig und insbesondere bei größeren Modellen kann es zu Problemen beim Finden des globalen Optimums

geben. Wenn die Gemeinschaftswachstumsrate fixiert wird (z.B. anhand von experimentellen Daten), wird das Modell linear, wodurch die Analysen einfacher werden und Standardmethoden des CBM angewendet werden können. Mit steigender Anzahl von Organismen steigen die Rechenkosten, z.B. bei Scannen des Lösungsraumes durch FVA, stark an und einige Methoden wie die Berechnung von EFVs war bei den analysierten Gemeinschaften nur für kleine Modelle von bis zu vier Organismen möglich. Im Vergleich dazu konnten EFVs für Modelle von bis zu neun Organismen im reduzierten (RedCom) Modell berechnet werden.

Für einen Vergleich mit experimentellen Daten von Biogaskommunitäten und um die relevantesten Lösungen des Lösungsraums zu identifizieren, wurden Experimente mit Ethanolanreicherungskulturen mit verschiedenen Verdünnungsraten durchgeführt. Zunächst wurden die experimentellen Daten mit Voraussagen des linearisierten vollständigen und linearen reduzierten Modells für spezifische Substrataufnahme- und Produktbildungsraten, Biogaskomposition und die Methanausbeute verglichen. Die Daten wurden von den Modellen gut abgedeckt, die vorhergesagten Bereiche waren jedoch, insbesondere im vollständigen Modell, breit und hatten folglich eine geringe Voraussagekraft. Die Erhaltungskoeffizienten hatten einen beachtlichen Einfluss auf die Modellvorhersagen, insbesondere für die Gemeinschaftszusammensetzung. Dies zeigt, dass die Erhaltungskoeffizienten für sinnvolle Modellvorhersagen möglichst genau bestimmt werden müssen. Insbesondere bei Gemeinschaften mit niedrigen Wachstumsraten, wie es auch im Biogasprozess der Fall ist, wird ein großer Anteil des Substrates für Prozesse des Erhaltungsstoffwechsels verwendet. Bei dem verwendeten Modell war eine gute Übereinstimmung zwischen Simulation und experimentellen Daten bei einem Erhaltungskoeffizienten von $1 \text{ mmol}_{\text{ATP}}/\text{g}_{\text{TM}}/\text{h}$ gegeben. Im Gegensatz zu den spezifischen Raten und der Gemeinschaftskomposition waren die Biogaszusammensetzungen und Methanausbeuten nur wenig sensitiv gegenüber dem Erhaltungskoeffizienten und lagen sowohl im vollständigen als auch reduzierten Modell nah an den experimentellen Daten.

Die vorhergesagten maximalen Wachstumsraten waren zwischen dem linearisierten vollständigen und reduzierten Modell identisch, jedoch deutlich höher als die Verdünnungsraten (entsprechen der Gemeinschaftswachstumsrate) im Experiment, bei denen ein stabiler Prozess zu beobachten war. Die Wachstumsratenoptimierung scheint für den gegebenen Prozess keine geeignete Zielfunktion zu sein. Eine mögliche Ursache für die deutlich überschätzte maximale Gemeinschaftswachstumsraten liegt in den geschätzten Aufnahmeleistungsgrenzen für die einzelnen Organismen, die aus Daten von Reinkulturexperimenten abgeschätzt wurden und die die Gemeinschaftswachstumsrate limitieren. In Reinkulturen sind die Kultivierungsbedingungen (Mediumszusammensetzung, pH-Wert, Temperatur) in der Regel auf den jeweiligen Organismus für ein maximales Wachstum abgestimmt. Die optimalen Kultivierungsbedingungen unterscheiden sich meist zwischen den einzelnen Organismen. Im Biogasprozess haben die säurebildenden Bakterien eine höhere pH-Toleranz und können auch bei niedrigeren pH-Werten gut wachsen, während die Methanogenen empfindlich gegenüber niedrigen pH-Werten sind [41]. Ähnlich verhält es sich mit Metabolitkonzentrationen, beispielsweise bei der Syntrophie.

Während der wasserstoffproduzierende Organismus niedrige Wasserstoffkonzentrationen für ein optimales Wachstum benötigt, sind für den Wasserstoffkonsumenten hohe Konzentrationen von Vorteil. Aus diesen Gründen unterscheiden sich die Wachstumsbedingungen in Mischkulturen von den Optimalbedingungen in Reinkulturexperimenten, wodurch sich in der Realität geringere Wachstumsraten in der Gemeinschaft ergeben.

Um anwesende Taxonomien und aktive Stoffwechselwege zu identifizieren, wurden Metaproteomdaten der Ethanolanreicherungskulturen analysiert. Die Taxonomien mit der höchsten Abundanz waren *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales* und *Desulfovibrionales*, die den Modellorganismen *M. barkeri*, *M. hungatei* und *D. vulgaris* des Sechs-Organismen-Modells zugeordnet werden können. Die gefundenen Enzyme wiesen auf Ethanoloxidation in *Desulfovibrionales* sowie hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogenese der Archaeen hin. Hinweise für Homoacetogenese, syntrophe Acetatoxidation und Ethanoloxidation zu Propionat wurden dagegen kaum gefunden, was in Übereinstimmung mit der taxonomischen Analyse steht. Im letzten Schritt wurden diese Informationen in das Sechs-Organismen-Modell eingearbeitet und der Lösungsraum erneut untersucht. *M. barkeri* war der abundanteste Organismus gefolgt von *M. hungatei*, während *D. vulgaris* den geringsten Teil ausmachte. Diese Tendenz stimmt auch mit dem Spektranteil der jeweiligen Taxonomien überein.

Um die Untersuchungen dieser Arbeit fortzuführen, kann die Gemeinschaft um weitere Organismen (z.B. Aminosäureabbau) erweitert werden, um den kompletten Biogasprozess ausgehend von organischen Polymeren darzustellen. Weiterhin könnten die Modelle mit anderen Ansätzen kombiniert werden. Bisher fließen beispielsweise keinerlei Informationen zu Metabolitkonzentrationen im Medium, die für mehrere Aspekte bedeutsam sind, in die Modelle ein. Zum einen beeinflussen sie, mit welcher Rate die Organismen ihre Substrate aufnehmen können und bestimmte Metabolite haben ab einer gewissen Konzentration einen hemmenden Einfluss. Zum anderen kann die Metabolitkonzentration in Konkurrenzsituationen darüber entscheiden, welcher Organismus einen Wachstumsvorteil erlangt. Dynamische Modelle, wie das ADM1 beinhalten verschiedene Aufnahmekinetiken für die einzelnen Substrate und berücksichtigen dabei auch den pH-Wert und die Temperatur. Die Aufnahmearten können für konkrete Prozessbedingungen mit Hilfe des ADM1 abgeschätzt und für das stöchiometrische Modell genutzt werden [200].

Eine weitere Möglichkeit die Modelle und Modellprädiktionen zu verbessern, ist die Erweiterung um thermodynamische Informationen, die über die Reversibilität von Reaktionen hinaus gehen. Für Einzelmodelle gibt es bereits Ansätze verschiedene thermodynamische Erweiterungen zur Einschätzung, welche Stoffwechselwege unter gegebenen Bedingungen realistisch sind [57, 201]. In einer syntrophen Zweiergemeinschaft wurden ebenfalls thermodynamische Daten verwendet, um die Modellvorhersagen zu verbessern [57]. Wenn dieses Konzept auf hier erstellten Modelle mikrobieller Gemeinschaften erweitert wird, könnten mitunter auch Kombinationen von Stoffwechselwegen aus verschiedenen Organismen ausgeschlossen oder

notwendige Randbedingungen ermittelt werden. Ein Beispiel wäre hier die Syntrophie, bei der niedrige Konzentrationen eines zwischen den Organismen übertragenen Metaboliten (häufig Wasserstoff) notwendig sind [40, 202]. Zudem gibt es gegenläufige Stoffwechselwege wie die Homoacetogenese aus H_2 und CO_2 und die syntrophe Acetatoxidation [203]. Bei beiden Wegen wird Energie für die Biomasseproduktion gespeichert und beide Wege können daher aus thermodynamischer Sicht nicht gleichzeitig ablaufen. Die Konzentrationen an Acetat, H_2 und CO_2 entscheiden darüber welcher der Wege ablaufen kann [203, 204]. Ein weiteres Beispiel ist das Konkurrenzverhalten zwischen cytochromfreien und cytochromexprimierenden Methanogenen. Bei der hydrogenotrophen Methanogenese gibt es Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der ATP-Ausbeute und des Schwellenwerts für den Wasserstoffpartialdruck, der ein Wachstum ermöglicht. Cytochromfreie Methanogene haben niedrigere ATP-Ausbeuten, benötigen gleichzeitig aber geringere Wasserstoffpartialdrücke, was zu einem Wachstumsvorteil unter substratlimitierenden Bedingungen führen kann [157]. Mit einem thermodynamischen Ansatz könnten solche Unterschiede und daraus resultierende Vor- und Nachteile in Konkurrenzsituationen besser dargestellt werden. Für eine solche Erweiterung müssten dem Modell für jede Reaktion zusätzliche thermodynamische Informationen zugefügt werden und zusammengefasste Reaktionen in Einzelreaktionen aufgeschlüsselt werden.

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Modellierungsansatz für mikrobielle Gemeinschaften entwickelt, mit dem sich Gemeinschaftmodelle mit vergleichsweise geringer Komplexität erstellen lassen. Die reduzierten Modelle weisen durch Einbeziehung eines Optimalitätskriteriums bei Erstellen der Modelle einen deutlich kleineren Lösungsraum als vollständige Modelle auf und geben die experimentellen Daten von untersuchten Anreicherungskulturen dennoch gut wieder. Mit den Modellen ließen sich auch Konzepte wie die Berechnung von MCS anwenden und Gemeinschaften von bis zu neun Organismen detailliert untersuchen. Mithilfe der Modelle konnte der Einfluss verschiedener Faktoren wie beispielsweise der Gemeinschaftszusammensetzung auf biogasproduzierende Gemeinschaften untersucht werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sich modellgestützt auch Strategien für eine erhöhte Methanausbeute oder -bildungsrate entwickeln lassen.

Anhang

Im Folgenden sind die Metabolite (Tabelle 19) und Reaktionen (Tabelle 20) der Einzelmodelle aufgelistet. Der Anabolismus ist dabei weitestgehend identisch für die verschiedenen Modelle. Bei *M. barkeri* und *S. wolfeii* werden in geringen Mengen weitere Metabolite gebildet (Fumarat), die im Katabolismus nicht weiterverwertet werden und die deshalb stöchiometrisch vernachlässigt wurden. Desweiteren ist exemplarisch das reduzierte Drei-Organismen-Modell gezeigt. Aufgelistet sind Metabolite (Tabelle 21) und Reaktionen (Tabelle 22) des Modells.

Zudem sind alle Modelle auf der beigelegten CD hinterlegt. Neben den Modellen sind die Daten der Ethanolanreicherungskultur inklusive der Metaproteomdaten und die Funktionen zum Erstellen der Gemeinschaftsmodelle enthalten.

A. Einzelmodelle

Tabelle 19: Metabolite der Einzelmodelle. Alle externen Metabolite haben die Endung _EX und befinden sich im unteren Teil der Tabelle. Die übrigen Metabolite sind intern. Abkürzungen der Organismen: MB: *M. barkeri*, MH: *M. hungatei*, DV: *D. vulgaris*, AW: *A. woodii*, SW: *S. wolfeii*, CA: *C. acetobutylicum*, EC: *E. coli*, PF: *P. freudenreichii*, SF: *S. fumaroxidans*.

Bezeichnung	Metabolit	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
2PG	2-Phosphoglycerat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3PG	3-Phosphoglycerat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5CHOMPT	5-Formyl-Tetrahydrosarcinapterin	x	x							
ADPGlc	Glykogenomer	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ATP	Adenosintriphosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ac	Acetat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
AcCoA	Acetyl-CoA	x	x	x	x	x	x	x	x	x
AcP	Acetyl-Phosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Acac	Acetoacetat						x			
AcacCoA	Acetoacetyl-CoA					x	x			
Acon	Aceton						x			
Adh	Acetaldehyd			x	x	x	x	x	x	x
Ala	Alanin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Arg	Arginin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Asn	Asparagin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Asp	Aspartat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BM	Biomasse	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BM_tot	Gesamtbiomasse	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ButCoA	Butyryl-CoA					x	x			
Butal	Butanal						x			
Butol	Butanol						x			
Buty	Butyrat					x	x			
ButyP	Butyryl-Phosphat						x			
C14_0_FS	C14:0 Fettsäure	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CDPEth	CDP-Ethanolamin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CH-FH4	Methenyl-Tetrahydrofolat				x					
CH2-FH4	Methylen-Tetrahydrofolat				x					
CH2H4MPT	5,10-Methylen-Tetrahydrosarcinapterin	x	x							
CH3-Co-E	Enzymgebundenes Methyl-Corrinoid	x			x					x

Tabelle 19: Metabolite der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Metabolit	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
CH3-FH4	Methyl-Tetrahydrofolat				X					X
CH3-H4-MPT	5-Methyl-Tetrahydrosarcinapterin	X								
CH3H4MPT	5-Methyl-Tetrahydromethanopterin		X							
CH4	Methan	X	X							
CHH4MPT	5,10-Methenyl-Tetrahydrosarcinapterin	X	X							
CHOMFR	Formyl-Methanofuran	X	X							
CMP_KDO	CMP-Ketodesoxyoctulusonsäure	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CO	Kohlenstoffmonoxid	X			X					
CO-Ni-E	Enzyme bound CO				X					
CO2	Kohlenstoffdioxid	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Chor	Chorismat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cit	Citrat	X		X	X	X	X	X	X	X
CoA	Coenzym A									X
CroCoA	Crotonyl-CoA					X	X			
Crot	Crotonat					X				
Cys	Cystein	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DHAP	Dihydroxyaceton-Phosphat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DHB_CoA	Hydroxybutanoyl-CoA					X				
DNA	DNA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DPG	Diphosphoglycerat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E4P	Erythrose-4-Phosphat		X	X	X	X	X	X	X	X
ETF_red	Elektronentransfer-Flavoprotein (reduziert)					X				
Eth	Ethanol			X	X		X	X	X	
F16P	Fruktose-1,6-Bisphosphat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F6P	Fruktose-6-Phosphat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Form	Formiat		X	X	X	X	X	X	X	X
Forma	Formaldehyd	X								
Fum	Fumarat		X	X	X	X	X	X	X	X
G3P	Glyceraldehyd-3-Phosphat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G6P	Glukose-6-Phosphat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glc	Glukose				X		X	X	X	
Gln	Glutamin	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glu	Glutamat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glucn	Glukonat					X	X	X	X	
Gly	Glycin	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glyc	Glycerol			X			X	X		
Glyc3P	Glycerol-3-Phosphat	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glyco	Glykogen	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Glyox	Glyoxylat					X	X	X	X	X
H2	Wasserstoff	X	X	X	X	X	X			X
H2S	Schwefelwasserstoff			X						X
HCO-FH4	Formyl-Tetrahydrofolat				X					
H_out	Protonen (extraplasmatisch)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
His	Histidin	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hu5P	Hexulose-5-Phosphat	X								
HyButCoA	3-Hydroxybutyryl-CoA					X	X			
ICit	Iso-Citrat	X		X	X	X	X	X	X	X
Ile	Isoleucin	X	X	X	X	X	X	X	X	X
KetoPGLuc	2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphoglukonat			X	X	X	X	X	X	X
LPS	Lipopolysacharide	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lac	Laktat			X	X	X	X	X	X	X

Tabelle 19: Metabolite der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Metabolit	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
Leu	Leucin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Lip	Lipide	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Lys	Lysin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MM-CoA	Methylmalonyl-CoA								x	x
MTHF	5-10-Methylen-Tetrahydrofolat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mal	Malat		x	x	x	x	x	x	x	x
MeCoM	Methyl-Coenzym M	x	x							
MeOH	Methanol	x								
Met	Methionin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MetOH	Methanol				x					
N	Stickstoff(NH4)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-Phosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NDPHep	Nucleosiddiphosphat-Heptose	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Na_out	Natriumionen (extraplasma-tisch)	x	x		x					
O2	Sauerstoff				x	x	x	x	x	
OH_myrcac	OH-Myristinsäure	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OxA	Oxalacetat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PEP	Phosphoenolpyruvate	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PGlac	6-Phospho-Gluconolacton	x			x	x	x	x	x	x
PGluc	6-Phospho-Gluconat	x		x	x	x	x	x	x	x
PHB	Polyhydroxybuttersäure					x				
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PepGly	Peptidoglykan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phe	Phenylalanin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Polyphos	Polyphosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pro	Prolin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Prop	Propionat								x	x
PropCoA	Propionyl-CoA								x	x
Propal	Propanal								x	
Propol	Propanol								x	
Prot	Protein	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pyr	Pyruvat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
QuiH2	Ubichinol (reduziert)		x	x	x	x	x	x	x	x
R5P	Ribose-5-Phosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
RNA	RNA	x	x	x	x	x	x	x	x	x
RSH2	Heterodisulfide (reduziert)			x						
R15P	Ribulose-5-Phosphat	x	x	x	x	x	x	x	x	x
S	Schwefel(SO4)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
S7P	Seduheptulose-7-Phosphat		x	x	x	x	x	x	x	x
SO4	Sulfat			x						x
Ser	Serin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Succ	Succinat		x	x	x	x	x	x	x	x
SuccCoA	Succinyl-Coenzym-A		x	x	x	x	x	x	x	x
TDPGlc	TDP-Glucosamin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Thr	Threonin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Trp	Tryptophan	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Tyr	Tyrosin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
UDPGlc	UDP-Glukose	x	x	x	x	x	x	x	x	x
UDP_NAG	UDP-Acetylglucosamin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
UDP_NAM	UDP-N-Acetylmuraminsäure	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabelle 19: Metabolite der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Metabolit	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
Val	Valin	x	x	x	x	x	x	x	x	x
X5P	Xylolose-5-Phosphat		x	x	x	x	x	x	x	x
alKG	alpha-Ketoglutarat (Oxoglutarat)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
avg_FS	Fettsäuren	x	x	x	x	x	x	x	x	x
dATP	ATPfürDNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
dCTP	CTPfürDNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
dGTP	GTPfürDNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
dTTP	TTPfürDNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
di_am_pim	Diaminopimelinsäure	x	x	x	x	x	x	x	x	x
fd_red	Ferredoxin (reduziert)			x	x	x	x		x	x
rATP	ATPfürRNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rCTP	CTPfürRNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rGTP	GTPfürRNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rUTP	UTPfürRNA_Synth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ac_EX	Acetat (extrazellular)	x		x	x	x	x	x	x	x
Acon_EX	Aceton (extrazellular)						x			
Butol_EX	Butanol (extrazellular)						x			
Buty_EX	Butyrat (extrazellular)					x	x			
CH4_EX	Methan (extrazellular)	x	x							
CO2_EX	CO2 (extrazellular)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Crot_EX	Crotonat (extrazellular)					x				
Eth_EX	Ethanol (extrazellular)			x	x		x	x	x	
Form_EX	Formiat (extrazellular)		x	x	x	x	x	x	x	x
Fruc_EX	Fruktose (extrazellular)				x					
Fum_EX	Fumarat (extrazellular)									x
Glc_EX	Glukose (extrazellular)				x		x	x	x	
Glucn_EX	Gluconate (extrazellular)							x	x	
Glyc_EX	Glycerol (extrazellular)						x	x	x	
H2S_EX	Schwefelwasserstoff (extrazellular)			x						x
H2_EX	H2 (extrazellular)	x	x	x	x	x	x			x
Lac_EX	Laktat (extrazellular)			x	x		x	x	x	
Mal_EX	Malat (extrazellular)					x				
MetOH_EX	Methanol (extrazellular)	x			x					
O2_EX	Sauerstoff (extrazellular)							x	x	
Prop_EX	Propionat (extrazellular)								x	x
Propol_EX	Propanol (extrazellular)								x	
Pyr_EX	Pyruvate (extrazellular)			x						
SO4_EX	Sulfat (extrazellular)			x						x
Succ_EX	Succinate (extrazellular)							x	x	x

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. Abürzungen der Organismen: MB: *M. barkeri*, MH: *M. hungatei*, DV: *D. vulgaris*, AW: *A. woodii*, SW: *S. wolfei*, CA: *C. acetobutylicum*, EC: *E. coli*, PF: *P. freudenreichii*, SF: *S. fumaroxidans*.

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
2PG::PEP	2PG ↔ PEP			X	X	X	X	X	X	X
3PG::2PG	3PG ↔ 2PG			X	X	X	X	X	X	X
3PG::2PG::3PG	2PG ↔ 3PG									
5CHOMPT::CHH4MPT	5CHOMPT ↔ CHH4MPT	X	X							
ADPGlc_Synth	G6P + ATP → ADPGlc	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ATPSynth	3 H ₂ out ↔ ATP			X	X	X	X	X	X	X
ATPSynth	4 H ₂ out ↔ ATP									
ATPSynth	4 H ₂ out → ATP									
ATPSynth_M	4 Na ₂ out → ATP	X								
ATPSynth_AP	3.3 Na ₂ out ↔ ATP			X						
ATPmaint	ATP →	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ac::AcCoA	2 ATP + Ac → AcCoA			X						
Ac::Ac_P	ATP + Ac ↔ AcP			X						
Ac::Adh	Adh → Ac + fd _{red}	X	X	X						
AcCoA::Pyr	AcCoA + CO ₂ + 2 H ₂ ↔ Pyr + NADH			X	X	X	X	X	X	X
AcCoA::AcP	AcCoA ↔ AcP									
AcCoA::AcacCoA	2 AcCoA ↔ AcacCoA				X					
AcCoA::AcacCoA	2 AcCoA → AcacCoA					X				
AcCoA::Adh	AcCoA + NADH ↔ Adh						X			
AcCoA::Adh	AcCoA + fd _{red} → Adh			X						
AcCoA::CH3_corrinoid	AcCoA → CO ₂ + CH ₃ -Co-E + 2 fd _{red}									X
AcCoA::Cit	AcCoA + Oxa → Cit			X	X	X	X	X	X	X
AcCoA::Formate	Methyl-Tetrahydrofolat → ATP + 2 NADH + Form			X						
AcCoA::Pyr	AcCoA + CO ₂ + 2 H ₂ → Pyr + NADH	X								
AcCoA::Pyr	AcCoA + CO ₂ + fd _{red} → Pyr									X
AcCoA::Pyr	Pyr ↔ AcCoA + Form				X					
AcCoA::aCH3-Co(III)Fe-S	AcCoA ↔ CO + CH ₃ -Co-E	X								
AcP::Ac	AcP ↔ ATP + Ac			X	X	X	X	X	X	X
AcP::Ac	AcP ↔ Ac									
AcP::AcCoA	AcP ↔ AcCoA	X	X							
Acac::Aceton	Acac ↔ CO ₂ + Acon									
AcacCoA::Acac	Ac + AcacCoA ↔ AcCoA + Acac						X			
AcacCoA::HyButCoA	NADH + AcacCoA ↔ HyButCoA						X			
Adh::AcCoA	Adh → AcCoA + fd _{red}									X
Adh::Eth	NADH + Adh ↔ Eth			X			X	X	X	X

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
Ala_Synth	Pyr + Glu → alKG + Ala	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Arg_Synth	AcCoA + 4 ATP + NADPH + CO ₂ + N + Asp + 2 Glu → alKG + Ac + Arg + Fum	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Arg_Synth_2	AcCoA + 4 ATP + NADPH + CO ₂ + N + Asp + 2 Glu → alKG + Ac + Arg	x			x					
Asn_Synth	2 ATP + N + Asp → Asn	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Asp_synth	OxA + Glu → alKG + Asp	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BM_Synth	0.1 Lip + 0.015 LPS + 0.015 PepGly + 0.64 Prot + 0.185 RNA + 0.03 DNA + 0.015 Glyco → BM	x	x	x	x	x	x	x	x	x
But::Acon	AcacCoA + Buty → ButCoA + Acac						x			
ButCoA::Butal	NADH + ButCoA ↔ Butal						x			
ButCoA::ButyP	ButCoA ↔ ButyP						x			
ButCoA::CroCoA	ButCoA ↔ CroCoA + ETF_red				x					
ButP::Buty	ButyP → ATP + Buty						x			
Butol::Butal	Butol ↔ NADH + Butal						x			
Buty::ButCoA	AcCoA + Buty ↔ Ac + ButCoA				x					
C14_0_FS_Synth	7 AcCoA + 6 ATP + 12 NADPH → C14_0_FS	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CDPEth_Synth	3PG + 3 ATP + NADPH + N → NADH + CDPEth	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CH-THF::CH2-THF	NADH + CH-FH4 ↔ CH2-FH4									
CH2-THF::CH3-TH4	2 NADH + CH2-FH4 ↔ fd_red + CH3-FH4									
CH2H4MPT::CH3H4MPT	CH2H4MPT + H ₂ ↔ CH3H4MPT	x	x							
CH3-Co-E::AcCoA	CH3-Co-E + CO-Ni-E ↔ AcCoA				x					
CH3-H4-MPT::MeCoM	CH3-H4-MPT ↔ MeCoM + 2 Na_out	x								
CH3-THF::CH3-Co-E	CH3-FH4 ↔ CH3-Co-E									
CH3H4MPT::MeCoM	CH3H4MPT ↔ MeCoM + 2 Na_out									
CH3_corr::5_met_THF	CH3-Co-E → Methyl-Tetrahydrofolat									x
CHH4MPT::CH2H4MPT	CHH4MPT + H ₂ ↔ CH2H4MPT	x	x							
CHOMFR::5CHOMPT	CHOMFR ↔ 5CHOMPT	x	x							
CMP_KDO_Synth	PEP + R5P + 2 ATP → CMP_KDO	x	x							
CO2::AcCoA	ATP + 2 NADPH + 2 CO ₂ + 4 H ₂ → AcCoA + 2 NADH	x								
CO2::CHOMFR	CO ₂ + 2 H_out + H ₂ ↔ CHOMFR									
CO2::CHOMFR_2	CO ₂ + H ₂ ↔ CHOMFR									
CO2::CO-Ni-E	CO ₂ + fd_red ↔ CO-Ni-E	x								
CO2::Form	CO ₂ + H ₂ ↔ Form									
CO2::Form_2	NADH + 2 CO ₂ + 2 fd_red → 2 Form									
CO2::Form_3	NADPH + CO ₂ → Form									

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
CO::CO-Ni-E	CO ↔ CO-Ni-E				X					
CO::CO2	CO ↔ CO2 + H _{out} + H2	X								
Chor_Synth	2 PEP + ATP + NADPH + E4P → Chor		X			X	X	X	X	X
Chor_Synth_2	F16P + PEP + 2 ATP + 2 NADPH + Asp → DHAP + Chor	X								
Cit::ICit	Cit ↔ ICit	X		X		X	X	X	X	X
CroCoA::ButCoA	H2 + CroCoA → 2 H _{out} + ButCoA				X					
CroCoA::ButCoA_2	NADH + CroCoA ↔ ButCoA					X				
CroCoA::DHBCoA	CroCoA ↔ DHB_CoA				X					
CroCoA::HybutCoA	CroCoA ↔ HyButCoA				X					
Crot::CroCoA	AcCoA + Crot → Ac + CroCoA				X					
Crot::CroCoA2	ButCoA + Crot → CroCoA + Buty				X					
Cys_Synth	AcCoA + S + Ser → Ac + Cys	X		X		X	X	X	X	X
DHAP::G3P	DHAP ↔ G3P			X		X	X	X	X	X
DHAP::Glyc3P	DHAP + NADH ↔ Glyc3P	X		X		X	X	X	X	X
DHB_CoA::PHB	11.6158 DHB_CoA ↔ PHB									
DNA_Synth	4.4129 ATP + 0.7968 dATP + 0.8194 dGTP + 0.8194 dCTP + 0.7968 dTTP → DNA	X		X		X	X	X	X	X
DPG::3PG	DPG ↔ 3PG + ATP			X		X	X	X	X	X
DPG::3PG::DPG	3PG + ATP ↔ DPG	X		X		X	X	X	X	X
EthOH::AcCoA	Eth ↔ AcCoA + 2 NADH				X					
F16P::F6P	F16P → F6P	X		X		X	X	X	X	X
F16P::T3P	F16P ↔ DHAP + G3P	X		X		X	X	X	X	X
F6P::F16P	F6P + ATP → F16P			X		X	X	X	X	X
F6P::G6P	F6P ↔ G6P	X		X		X	X	X	X	X
F6P::Hu5P	F6P ↔ Hu5P	X		X		X	X	X	X	X
Fdred::Form	CO2 + fd _{red} → H _{out} + Form			X						
Fdred::H2	fd _{red} ↔ H _{out} + H2			X						
Fdred::NADH	fd _{red} ↔ NADH			X						
Form::AcCoA	ATP + NADPH + CO2 + 4 H2 + Form → AcCoA + 2 NADH			X			X			
Form::CO2	Form ↔ CO2 + H2	X		X						
Form::CO2_2	Form → CO2 + H2	X		X			X			X
Form::HCO-TH4	ATP + Form ↔ HCO-FH4			X						
FormDehydro_ex	CO2 + 2 H _{out} + ETF _{red} → Form				X					
Forma::CO2	Forma → NADH + CO2 + H2	X								
Fum::Mal	Fum ↔ Mal			X		X	X	X	X	X

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
Fum::Succ	Fum + QuiH2 → 2 H_out + Succ									X
Fum::Succ_2	Fum + QuiH2 → Succ		X	X				X	X	
G3P::3PG	G3P → 3PG + NADH					X				
G3P::3PG_2	G3P → 3PG + NADPH									X
G3P::DHAP	G3P ↔ DHAP	X	X							
G3P::DPG	G3P ↔ DPG + NADH	X	X	X			X	X	X	X
G3P::DPG:G3P	DPG + NADH ↔ G3P	X	X							
G6P::F6P	G6P ↔ F6P		X	X			X	X	X	X
G6P::PGlac	G6P ↔ PGlac + NADPH	X						X	X	
Glc_ATP_up	ATP + Glc → G6P			X			X	X	X	
Glc_PTS_up	PEP + Glc → G6P + Pyr			X			X	X	X	
Gln_Synth	ATP + N + Glu → Gln	X	X	X			X	X	X	X
Glu_synth	alKG + NADPH + N → Glu	X	X	X			X	X	X	X
Glucn::PGluc	ATP + Glucn → PGluc							X		
Gly_Synth	Ser → MTHF + Gly	X	X	X			X	X	X	X
Glyc::Glyc3P	ATP + Glyc → Glyc3P		X	X			X	X	X	
Glyc_Synth	6.16 ADPGlc → Glyco	X	X	X			X	X	X	X
Glyox::Mal	AcCoA + Glyox → Mal							X		
H/Na_Antiporter	Na_out ↔ 2 Hout			X						
H2::Ffred	fd_red → H2					X				
HCO-THF::CH-THF	HCO-FH4 ↔ CH-FH4									
His_Synth	ATP + PRPP + Gln → alKG + 2 NADH + His	X	X	X			X	X	X	X
Hu5P::R15P	Hu5P ↔ R15P + Forma	X								
HyButCoA::AcacCoA	HyButCoA ↔ NADH + AcacCoA					X				
HyButCoA::CroCoA	HyButCoA ↔ CroCoA						X			
Hydro_ex	2 H_out + ETF_red → H2							X		
Hydrogenase	fd_red ↔ H2									
ICit::Glyox	ICit → Succ + Glyox							X		
ICit::alKG	ICit ↔ alKG + NADPH + CO2	X		X			X	X	X	X
Ile_Synth	Pyr + NADPH + Glu + Thr → alKG + CO2 + N + Ile	X	X	X			X	X	X	X
KetoPGluc::G3P_Pyr	KetoPGluc ↔ G3P + Pyr		X	X				X		
LPS_Synth	0.46176 UDPGlc + 0.69118 CDPEth + 0.69118 OH_my.ac + 0.69118 C14_0_FS + 0.69118 CMP_KDO + 0.69118 NDPHep + 0.46176 TDPGles → LPS		X	X			X	X	X	X
Lac::Pyr	Lac ↔ Pyr + NADH			X						
Lac::Pyr2	Lac → Pyr + RSH2			X						

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
Leu_Synth	2 Pyr + AcCoA + NADPH + Glu → alKG + NADH + 2 CO ₂ + Leu	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Lip_Synth	1.4176 Glyc3P + 2.8352 ATP + 1.4176 Ser + 2.8352 avg_FS → Lip	x	x	x	x	x	x	x	x	
Lys_Synth	di_am_pim → CO ₂ + Lys	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MIM-CoA::SuccCoA	MIM-CoA ↔ SuccCoA									x
MTHF_Synth	ATP + NADPH ↔ MTHF	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mal::Fum	Mal ↔ Fum		x							
Mal::OxA	Mal ↔ OxA + NADH			x			x	x	x	x
Mal::Pyr	Mal ↔ Pyr + NADPH + CO ₂		x							
Mal:Pyr_2	Mal ↔ Pyr + NADH + CO ₂				x					
MeCoM::Meth	MeCoM + H ₂ ↔ CH ₄ + 4 H ₂ out	x								
MeCoM::Meth_2	MeCoM + H ₂ ↔ CH ₄		x							
MeOH::CH3-Co-E	MeOH ↔ CH ₃ -Co-E			x						
MeOH::MeCoM	MeOH → MeCoM	x								
Met_Synth	ATP + 2 NADPH + MTHF + Cys + Asp + SuccCoA → Pyr + N + Met + Succ		x	x	x	x	x	x	x	x
Met_Synth_2	ATP + 2 NADPH + MTHF + Cys + Asp → Pyr + N + Met	x								
NADH::Fd_red	NADH ↔ 0.5 fd_red + 0.5 RSH ₂		x							
NADHDehydro	NADH ↔ 2 H ₂	x								
NADHDehydro	NADH ↔ 2 H ₂ out + QuiH ₂		x			x	x	x	x	
NADH_Fdred::H2	NADH + fd_red ↔ 2 H ₂				x					
NADP_Hydrogenase	H ₂ ↔ NADPH		x							
NDPHep_Synth	1.5 G6P + ATP → 4 NADPH + NDPHep	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Naout::Hout	Na ₂ out ↔ 2 H ₂ out	x								
OH_myr_ac_Synth	7 AcCoA + 6 ATP + 11 NADPH → OH_myr_ac	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OxA::Mal	OxA + NADH ↔ Mal		x							
OxA::PEP	OxA + ATP → PEP + CO ₂			x						
OxA::Pyr	OxA → Pyr + CO ₂				x					
Oxidase	QuiH ₂ + 0.5 O ₂ → 2 H ₂ out									x
PEP::2PG	PEP ↔ 2PG		x							
PEP::OxA	PEP + CO ₂ → OxA + ATP	x	x							
PEP::OxA_2	PEP + CO ₂ → OxA	x							x	x
PEP::PYR	PEP → Pyr + ATP			x						
PGlac::PGluc	PGlac → PGluc	x								
PGluc::KetoPGluc	PGluc → KetoPGluc									x

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
PGluc::R15P	PGluc → R15P + NADPH + CO2	x		x				x	x	
PRPP_Synth	R5P + 2 ATP → PRPP	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PYR::AcCoA	Pyr ↔ AcCoA + CO2 + fd_red			x	x	x				x
PYR::AcCoA_2	Pyr → AcCoA + NADH + CO2			x				x	x	
Pyr::AcCoA	Pyr → AcCoA + Form			x			x	x		
Pyr::AcCoA_3	Pyr → AcCoA + Form			x			x	x		
PepGly_Synth	5.52 ATP + 2.208 Ala + 1.104 Glu + 1.104 UDP_NAG + 1.104 UDP_NAM + 1.104 di_am_pim → PepGly	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phe_Synth	Chor + Glu → alKG + CO2 + Phe	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PolyHB_mue	0.8 BM_SW1 + 0.2 PHB → BM			x						
Polyphos_Synth	12.66 ATP → Polyphos	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pro_Synth	ATP + 2 NADPH + Glu → Pro	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Prop::PropCoA	AcCoA + Prop → Ac + PropCoA									x
Prop::PropCoA_2	ATP + Prop → PropCoA									x
PropCoA::MM-CoA	ATP + CO2 + PropCoA ↔ MM-CoA									x
PropCoA::Prop	PropCoA → Prop									x
Prot_Synth	39.9455 ATP + 0.88727 Ala + 0.15818 Cys + 0.41636 Asp + 0.45455 Glu + 0.32 Phe + 1.0582 Gly + 0.16364 His + 0.50182 Ile + 0.59273 Lys + 0.77818 Leu + 0.26546 Met + 0.41636 Asn + 0.38182 Pro + 0.45455 Gln + 0.51091 Arg + 0.37273 Ser + 0.43818 Thr + 0.73091 Val + 0.09818 Trp + 0.23818 Tyr → Prot	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pyr::Lac	Pyr + NADH ↔ Lac						x	x	x	
Pyr::OxA	Pyr + ATP + CO2 → OxA			x		x	x			x
Pyr::OxA_2	Pyr + MM-CoA ↔ OxA + PropCoA							x	x	
Pyr::PEP	Pyr + 2 ATP → PEP			x	x	x	x	x	x	x
RNA_Synth	1.2488 ATP + 0.80488 rATP + 0.99024 rGTP + 0.61436 rCTP + 0.66341 rUTP → RNA	x	x	x	x	x	x	x	x	x
RSH2::H2	2 H_out + RSH2 ↔ H2			x						
R15P::R5P	R15P ↔ R5P	x	x	x	x	x	x	x	x	x
R15P::X5P	R15P ↔ X5P	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Rnf-complex	2 fd_red ↔ NADH + H_out									
Rnf-complex_2	NADH + Na_out ↔ fd_red									
S_up	4 ATP ↔ S									
Ser_Synth	3PG + Glu → alKG + NADH + Ser	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Succ::Fum	2 H_out + Succ → Fum + QuiH2	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
Succ::Fum_2	Succ → Fum + QuiH2	x	x	x				x	x	
Succ::Prop	Succ + PropCoA → SuccCoA + Prop								x	
Succ::SuccCoA	ATP + Succ ↔ SuccCoA	x								
SuccCoA::MM-CoA	SuccCoA → MM-CoA								x	
SuccCoA::Succ	SuccCoA ↔ ATP + Succ								x	
SuccCoA::alKG	NADH + CO2 + SuccCoA → alKG	x							x	
Sulfatreduktion	2 ATP + 4 H2 + SO4 → 9 H ₂ out + H2S									x
T3P::F16P	DHAP + G3P ↔ F16P	x								
TDPGlc_Synth	F6P + 2 ATP + N → TDPGlc	x							x	
Thr_Synth	2 ATP + 2 NADPH + Asp → Thr	x							x	
TransHydro	NADH + H ₂ out ↔ NADPH	x							x	
Transaldo	G3P + S7P ↔ F6P + E4P								x	
Transket1	R5P + X5P ↔ G3P + S7P								x	
Transket2	E4P + X5P ↔ F6P + G3P								x	
Trp_Synth	Chor + PRPP + Gln + Ser → G3P + Pyr + CO2 + Glu + Trp	x							x	
Tyr_Synth	Chor + Glu → alKG + NADH + CO2 + Tyr	x							x	
UDPGlc_Synth	G6P + ATP → UDPGlc	x							x	
UDP_NAG_Synth	F6P + AcCoA + ATP + Gln → Glu + UDP_NAG	x							x	
UDP_NAM_Synth	PEP + NADPH + UDP_NAG → UDP_NAM	x							x	
Val_Synth	2 Pyr + NADPH + Glu → alKG + CO2 + Val	x							x	
aCH3-Co(III)Fe-S::CH3-H4-MPT	CH3-Co-E → CH3-H4-MPT	x								
alKG::Glu	alKG + NADPH → Glu									x
alKG::SuccCoA	alKG → CO2 + SuccCoA + 2 fd_red									x
alKG::SuccCoA_2	alKG → NADH + CO2 + SuccCoA								x	
avg_FS_Synth	8.24 AcCoA + 7.24 ATP + 13.91 NADPH → avg_FS	x							x	
ch2ase	NADH + 2 fd_red → 2 H2								x	
cytH2ase	QuiH2 ↔ H2								x	
dATP_Synth	NADPH + rATP → dATP	x							x	
dCTP_Synth	NADPH + rCTP → dCTP	x							x	
dGTP_Synth	NADPH + rGTP → dGTP	x							x	
dTTP_Synth	2 NADPH + MTHF + rUTP → dTTP	x							x	
di_am_pim_Synth	Pyr + ATP + 2 NADPH + Asp + Glu + SuccCoA → alKG + di_am_pim + Succ								x	
di_am_pim_Synth_2	Pyr + ATP + 2 NADPH + Asp + Glu → alKG + di_am_pim	x							x	
frH2ase	2 fd_red → H2									x

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
hydrogenase	$0.5 \text{ NADH} + 0.5 \text{ fd_red} \leftrightarrow \text{H}_2$				x					
rATP_Synth	$5 \text{ ATP} + \text{CO}_2 + \text{PRPP} + 2 \text{ MTHF} + 2 \text{ Asp} + \text{Gly} + 2 \text{ Gln} \rightarrow \text{NADPH} + 2 \text{ Glu} + \text{rATP} + 2 \text{ Fum}$	x	x	x		x	x	x	x	x
rATP_Synth	$5 \text{ ATP} + \text{CO}_2 + \text{PRPP} + 2 \text{ MTHF} + 2 \text{ Asp} + \text{Gly} + 2 \text{ Gln} \rightarrow \text{NADPH} + 2 \text{ Glu} + \text{rATP}_2$	x			x					
rCTP_Synth	$\text{ATP} + \text{Gln} + \text{rUTP} \rightarrow \text{Glu} + \text{rCTP}$	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rGTP_Synth	$6 \text{ ATP} + \text{CO}_2 + \text{PRPP} + 2 \text{ MTHF} + \text{Asp} + \text{Gly} + 3 \text{ Gln} \rightarrow \text{NADH} + \text{NADPH} + 3 \text{ Glu} + \text{rGTP} + 2 \text{ Fum}$	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rGTP_Synth_2	$6 \text{ ATP} + \text{CO}_2 + \text{PRPP} + 2 \text{ MTHF} + \text{Asp} + \text{Gly} + 3 \text{ Gln} \rightarrow \text{NADH} + \text{NADPH} + 3 \text{ Glu} + \text{rGTP}$	x			x					
rUTP_Synth	$4 \text{ ATP} + \text{N} + \text{PRPP} + \text{Asp} \rightarrow \text{NADH} + \text{rUTP}$	x	x	x	x	x	x	x	x	x
r_BMMB2BMc	$\text{BM} \rightarrow \text{BM_tot}$	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ac_ex	$\text{Ac} \rightarrow \text{Ac_EX}$									
Ac_up	$\text{Ac_EX} \rightarrow \text{Ac}$									
Acon_ex	$\text{Acon} \rightarrow \text{Acon_EX}$									
Butol_ex	$\text{Butol} \rightarrow \text{Butol_EX}$									
Buty_ex	$\text{Buty} \rightarrow \text{Buty_EX}$					x	x			
Buty_up	$\text{Buty_EX} \rightarrow \text{Buty}$					x	x			
CH4_ex	$\text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_4_EX$									
CO2_ex	$\text{CO}_2 \rightarrow \text{CO}_2_EX$	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CO2_up	$\text{CO}_2_EX \rightarrow \text{CO}_2$	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Crot_up	$\text{Crot_EX} \rightarrow \text{Crot}$									
Eth_ex	$\text{Eth} \rightarrow \text{Eth_EX}$									
Eth_up	$\text{Eth_EX} \rightarrow \text{Eth}$									
Form_ex	$\text{Form} \rightarrow \text{Form_EX}$									
Form_up	$\text{Form_EX} \rightarrow \text{Form}$									
Fum_up	$\text{Fum_EX} \rightarrow \text{Fum}$	x			x	x				
Glc_up	$\text{Glc_EX} \rightarrow \text{Glc}$									
Glucn_up	$\text{Glucn_EX} \rightarrow \text{Glucn}$									
Glyc_up	$\text{Glyc_EX} \rightarrow \text{Glyc}$									
H2S_ex	$\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{H}_2\text{S_EX}$									
H2_ex	$\text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2_EX$									
H2_up	$\text{H}_2_EX \rightarrow \text{H}_2$									
Lac_ex	$\text{Lac} \rightarrow \text{Lac_EX}$	x	x	x	x	x	x	x		
Lac_up	$\text{Lac_EX} \rightarrow \text{Lac}$									
Lac_up	$\text{Lac_EX} + \text{Hout} \rightarrow \text{Lac}$									

Tabelle 20: Reaktionen der Einzelmodelle. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Reaktion	MB	MH	DV	AW	SW	CA	EC	PF	SF
MeOH_up	MeOH_EX \rightarrow MeOH	x			x					
N_up	\rightarrow N	x	x	x	x	x	x	x	x	x
O2_up	O2_EX \rightarrow O2							x		
PTS_Fruc_up	PEP + Fruc_EX \rightarrow F6P + Pyr			x						
Prop_ex	Prop \rightarrow Prop_EX								x	
Prop_up	Prop_EX \rightarrow Prop									x
Pyr_up	H _{out} + Pyr_EX \rightarrow Pyr			x						
SO4_up	SO4_EX \rightarrow SO4			x						x
S_up	4 ATP + 4 NADPH \rightarrow S		x	x	x	x	x	x	x	x
Succ_ex	Succ \rightarrow Succ_EX			x				x	x	x

B. Reduziertes Drei-Organismen-Modell

Tabelle 21: Metabolite des reduzierten Drei-Organismen-Modells. Organismen: *M. barkeri*, *M. hungatei*, *D. vulgaris*.

Bezeichnung	Metabolit	Typ
H2_EX	Wasserstoff	intern
Ac_EX	Acetat	intern
CO2_EX	Kohlenstoffdioxid	intern
Form_EX	Formiat	intern
SO4_EX	Sulfat	intern
H2S_EX	Schwefelwasserstoff	intern
Eth_EX	Ethanol	intern
Lac_EX	Laktat	intern
Pyr_EX	Pyruvat	intern
CH4_EX	Methan	intern
MetOH_EX	Methanol	intern
BM_MB	Biomasse <i>M. barkeri</i>	intern
BM_MH	Biomasse <i>M. hungatei</i>	intern
BM_DV	Biomasse <i>D. vulgaris</i>	intern
BM_tot	Gesamtbiomasse	intern

Tabelle 22: Reaktionen des reduzierten Drei-Organismen-Modells. Organismen: MB: *M. barkeri*, MH: *M. hungatei*, DV: *D. vulgaris*.

Bezeichnung	Reaktion
EV1_DV	4,94 Pyr_EX → 4,73 H2_EX + 4,82 Ac_EX + 4,85 CO2_EX + 0,008 BM_DV
EV2_DV	0,13 H2_EX + 4,94 Pyr_EX → 4,82 Ac_EX + 4,85 Form_EX + 0,008 BM_DV
EV3_DV	11,56 Pyr_EX → 5,76 Ac_EX + 11,47 CO2_EX + 5,67 Eth_EX + 0,008 BM_DV
EV4_DV	14,69 CO2_EX + 14,82 Lac_EX → 14,70 Ac_EX + 29,42 Form_EX + 0,008 BM_DV
EV5_DV	14,82 Lac_EX → 29,42 H2_EX + 14,70 Ac_EX + 14,73 CO2_EX + 0,008 BM_DV
EV6_DV	0,087 CO2_EX + 29,64 Eth_EX → 59,06 H2_EX + 29,51 Ac_EX + 0,008 BM_DV
EV7_DV	59,14 CO2_EX + 29,64 Eth_EX → 29,51 Ac_EX + 59,06 Form_EX + 0,008 BM_DV
r_synBM_DV	BM_DV → BM_tot
EV1_MM	13,27 H2_EX + 3,47 CO2_EX → 3,14 CH4_EX + 0,008 BM_MM
EV2_MM	13,27 Form_EX → 9,80 CO2_EX + 3,14 CH4_EX + 0,008 BM_MM
r_synBM_MH	BM_MH → BM_tot
EV1_MB	9,26 H2_EX + 2,49 CO2_EX → 2,12 CH4_EX + 0,008 BM_MB
EV2_MB	2,68 Ac_EX → 2,51 CO2_EX + 2,49 CH4_EX + 0,008 BM_MB
EV3_MB	8,51 H2_EX + 0,13 Ac_EX + 2,17 CO2_EX → 2,07 CH4_EX + 0,008 BM_MB
r_synBM_MB	BM_MB → BM_tot
rH2_in	→ H2_EX
rH2_ex	H2_EX →
rAc_in	→ Ac_EX
rAc_ex	Ac_EX →
rCO2_in	→ CO2_EX
rCO2_ex	CO2_EX →
rForm_in	→ Form_EX
rForm_ex	Form_EX →
rEth_in	→ Eth_EX
rEth_ex	Eth_EX →
rLac_in	→ Lac_EX
rPyr_in	→ Pyr_EX
rCH4_ex	CH4_EX →
BM_tot_Synth	BM_tot →

Literatur

- [1] PAERL, H. W.; PINCKNEY, J. L.: A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. In: *Microbial Ecology* 31 (1996), Nr. 3, S. 225–247. – ISSN 0095–3628 (Print) 0095–3628 (Linking)
- [2] BARDGETT, R. D.; FREEMAN, C.; OSTLE, N. J.: Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. In: *The ISME Journal* 2 (2008), Nr. 8, S. 805–814. – ISSN 1751–7362
- [3] MCINERNEY, M. J.; SIEBER, J. R.; GUNSALUS, R. P.: Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. In: *Current Opinion in Biotechnology* 20 (2009), Nr. 6, S. 623–632. DOI 10.1016/j.copbio.2009.10.001. – ISSN 1879–0429 (Electronic) 0958–1669 (Linking)
- [4] TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, Jeffrey I.: The human microbiome project. In: *Nature* 449 (2007), Nr. 7164, S. 804–810. DOI 10.1038/nature06244. – ISSN 1476–4687
- [5] CHO, I.; BLASER, M. J.: The human microbiome: at the interface of health and disease. In: *Nature reviews. Genetics* 13 (2012), Nr. 4, S. 260–270. DOI 10.1038/nrg3182. – ISSN 1471–0064
- [6] HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R.; ABUBUCKER, S.; BADGER, J.; CHINWALLA, A. T.; CREASY, H. H.; EARL, A. M.; FITZGERALD, M. G.; FULTON, R. S. u. a.: Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. In: *Nature* 486 (2012), Nr. 7402, S. 207–214. DOI 10.1038/nature11234. – ISSN 1476–4687
- [7] KUMAR, C. G.; ANAND, S. K.: Significance of microbial biofilms in food industry: A review. In: *International Journal of Food Microbiology* 42 (1998), Nr. 1-2, S. 9–27. DOI 10.1016/S0168–1605(98)00060–9. – ISSN 0168–1605
- [8] WHITELEY, A. S.; BAILEY, M. J.: Bacterial Community Structure and Physiological State within an Industrial Phenol Bioremediation System. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000), Nr. 6, S. 2400–2407. DOI 10.1128/AEM.66.6.2400–2407.2000. – ISSN 0099–2240
- [9] WAGNER, M.; LOY, A.; NOGUEIRA, R. ; PURKHOLD, U.; LEE, N.; DAIMS, H.: Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 81 (2002), Nr. 1/4, S. 665–680. DOI 10.1023/A:1020586312170. – ISSN 0003–6072, 1572–9699
- [10] TALBOT, G.; TOPP, E.; PALIN, M. F.; MASSE, D. I.: Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. In: *Water Research* 42 (2008), Nr. 3, S. 513–537. – ISSN 1879–2448
- [11] MA, Q.; ZHOU, J.; ZHANG, W.; MENG, X.; SUN, J.; YUAN, Y.-J.: Integrated proteomic and metabolomic analysis of an artificial microbial community for two-step production of vitamin C. In: *PloS One* 6 (2011), Nr. 10, S. e26108. DOI 10.1371/journal.pone.0026108
- [12] HEYER, R.; KOHRS, F.; BENNDORF, D.; RAPP, E.; KAUSMANN, R.; HEIERMANN, M.; KLOCKE, M.; REICHL, U.: Metaproteome analysis of the microbial communities in agricultural biogas plants. In: *New Biotechnology* 30 (2013), Nr. 6, S. 614–622. – ISSN 1871–6784
- [13] KUCZYNSKI, J.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; PARFREY, L. W.; CLEMENTE, J. C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R.: Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. In: *Nature Reviews. Genetics* 13 (2012), Nr. 1, S. 47–58. DOI 10.1038/nrg3129. – ISSN 1471–0064

- [14] BERNSTEIN, H. C.; CARLSON, R. P.: Microbial Consortia Engineering for Cellular Factories: in vitro to in silico systems. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal* 3 (2012), S. e201210017. DOI 10.5936/csbj.201210017. – ISSN 2001–0370 (Electronic) 2001–0370 (Linking)
- [15] NEVELING, K.; HOISCHEN, A.: Einführung in die Grundlagen der Hochdurchsatzsequenzierung. In: *Medizinische Genetik* 26 (2014), Nr. 2, S. 231–238. DOI 10.1007/s11825–014–0447–7. – ISSN 0936–5931
- [16] OZKAYA, B.; DEMIR, A.; BILGILI, M. S.: Neural network prediction model for the methane fraction in biogas from field-scale landfill bioreactors. In: *Environmental Modelling & Software* 22 (2007), Nr. 6, S. 815–822. DOI 10.1016/j.envsoft.2006.03.004. – ISSN 1364–8152
- [17] BORDBAR, A.; MONK, J. M.; KING, Z. A.; PALSSON, B. O.: Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. In: *Nature Reviews. Genetics* 15 (2014), Nr. 2, S. 107–120. DOI 10.1038/nrg3643. – ISSN 1471–0064
- [18] SONG, H.-S.; CANNON, W.; BELIAEV, A.; KONOPKA, A.: Mathematical Modeling of Microbial Community Dynamics: A Methodological Review. In: *Processes* 2 (2014), Nr. 4, S. 711–752. DOI 10.3390/pr2040711
- [19] BIGGS, M. B.; MEDLOCK, G. L.; KOLLING, G. L.; PAPIN, J. A.: Metabolic network modeling of microbial communities. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 7 (2015), Nr. 5, S. 317–334. DOI 10.1002/wsbm.1308. – ISSN 1939–005X (Electronic) 1939–005X (Linking)
- [20] GOTTSTEIN, W.; OLIVIER, B. G.; BRUGGEMAN, F. J.; TEUSINK, B.: Constraint-based stoichiometric modelling from single organisms to microbial communities. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 13 (2016), Nr. 124. DOI 10.1098/rsif.2016.0627. – ISSN 1742–5662
- [21] FREILICH, S.; ZARECKI, R.; EILAM, O.; SEGAL, E. S.; HENRY, C. S.; KUPIEC, M.; GOPHNA, U.; SHARAN, R.; RUPPIN, E.: Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. In: *Nature Communications* 2 (2011), S. 589. DOI 10.1038/ncomms1597. – ISSN 2041–1723 (Electronic) 2041–1723 (Linking)
- [22] DAMORE, J. A.; GORE, J.: Understanding microbial cooperation. In: *Journal of Theoretical Biology* 299 (2012), S. 31–41. DOI 10.1016/j.jtbi.2011.03.008. – ISSN 0022–5193
- [23] SIEBER, J. R.; MCINERNEY, M. J.; GUNSALUS, R. P.: Genomic Insights into Syntrophy: The Paradigm for Anaerobic Metabolic Cooperation. In: *Annual Review of Microbiology* 66 (2012), Nr. 1, S. 429–452. DOI 10.1146/annurev-micro-090110–102844. – ISSN 0066–4227, 1545–3251
- [24] SCHINK, B.; STAMS, A. J. M.: Syntrophism Among Prokaryotes. Version: 2013. In: ROSENBERG, Eugene (Hrsg.); DELONG, Edward F. (Hrsg.); LORY, Stephen (Hrsg.); STACKEBRANDT, Erko (Hrsg.); THOMPSON, Fabiano (Hrsg.): *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013. – DOI 10.1007/978–3–642–30123–0_59. – ISBN 978–3–642–30122–3, S. 471–493
- [25] MORRIS, B. E. L.; HENNEBERGER, R.; HUBER, H.; MOISSL-EICHINGER, C.: Microbial syntrophy: interaction for the common good. In: *FEMS Microbiology Reviews* 37 (2013), Nr. 3, S. 384–406. DOI 10.1111/1574–6976.12019. – ISSN 01686445
- [26] HAMADY, M.; KNIGHT, R.: Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. In: *Genome Research* 19 (2009), Nr. 7, S. 1141–1152. DOI 10.1101/gr.085464.108.. – ISSN 1088–9051

- [27] MCINERNEY, M. J.; BRYANT, M. P.: Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. In: *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels*. Springer, 1981. – ISBN 1475703031, S. 277–296
- [28] FLEMMING, H.-C. (Hrsg.): *Biofouling bei Membranprozessen*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1995. ISBN 978–3–642–79372–1
- [29] DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J.-F.: Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. In: *Water research* 39 (2005), Nr. 11, S. 2207–2218. DOI 10.1016/j.watres.2005.04.007. – ISSN 1879–2448
- [30] LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J.: Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997), Nr. 11, S. 4516–4522. – ISSN 0099–2240
- [31] WILMES, P.; BOND, P. L.: Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. In: *Trends in Microbiology* 14 (2006), Nr. 2, S. 92–97. DOI 10.1016/j.tim.2005.12.006. – ISSN 0966–842X
- [32] VERBERKMOES, N. C.; DENEFF, V. J.; HETTICH, R. L.; BANFIELD, J. F.: Systems biology: Functional analysis of natural microbial consortia using community proteomics. In: *Nature Reviews. Microbiology* 7 (2009), Nr. 3, S. 196–205. DOI 10.1038/nrmicro2080. – ISSN 1740–1534
- [33] BASHIARDES, S.; ZILBERMAN-SCHAPIRA, G.; ELINAV, E.: Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. In: *Bioinformatics and Biology Insights* 10 (2016), S. 19–25. DOI 10.4137/BBI.S34610. – ISSN 1177–9322
- [34] FIEHN, O.: Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes. Version: 2002. In: TOWN, Chris (Hrsg.): *Functional Genomics* Bd. 95. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2002. – DOI 10.1007/978–94–010–0448–0_11. – ISBN 978–94–010–3903–1, S. 155–171
- [35] TANG, J.: Microbial metabolomics. In: *Current Genomics* 12 (2011), Nr. 6, S. 391–403. DOI 10.2174/138920211797248619
- [36] NEUFELD, J. D.; DUMONT, M. G.; VOHRA, J. ; MURRELL, J. C.: Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. In: *Microbial Ecology* 53 (2007), Nr. 3, S. 435–442. DOI 10.1007/s00248–006–9125–x. – ISSN 0095–3628
- [37] TATTON, M. J.; ARCHER, D. B.; POWELL, G. E.; PARKER, M. L.: Methanogenesis from ethanol by defined mixed continuous cultures. In: *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989), Nr. 2, S. 440–445. – ISSN 0099–2240
- [38] DANIEL-GROMKE, J.; RENSBERG, N.; DENYSENKO, V.; STINNER, W.; SCHMALFUSS, T.; SCHEFTELOWITZ, M.; NELLES, M.; LIEBETRAU, J.: Current Developments in Production and Utilization of Biogas and Biomethane in Germany. In: *Chemie Ingenieur Technik* 90 (2018), Nr. 1-2, S. 17–35. DOI 10.1002/cite.201700077. – ISSN 0009286X
- [39] SCARLAT, N.; DALLEMAND, J.-F.; FAHL, F.: Biogas: Developments and perspectives in Europe. In: *Renewable Energy* 129 (2018), S. 457–472. DOI 10.1016/j.renene.2018.03.006. – ISSN 09601481
- [40] SCHINK, B.: Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (1997), Nr. 2, S. 262–280. – ISSN 1092–2172

- [41] WEILAND, P.: Biogas production: current state and perspectives. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (2009), Nr. 4, S. 849–860. – ISSN 0175–7598
- [42] BATSTONE, D. J.; KELLER, J.; ANGELIDAKI, I. ; KALYUZHNYI, S. V.; PAVLOSTATHIS, S. G.; ROZZI, A.; SANDERS, W. T.; SIEGRIST, H.; VAVILIN, V. A.: The IWA Anaerobic Digestion Model No 1(ADM 1). In: *Water Science Technology* 45 (2002), Nr. 10, S. 65–73
- [43] STOLYAR, S.; VAN DIEN, S.; HILLESLAND, K. L.; PINEL, N.; LIE, T. J.; LEIGH, J. A.; STAHL, D. A.: Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. In: *Molecular Systems Biology* 3 (2007), Nr. 1, S. 92. – ISSN 1744–4292 (Electronic) 1744–4292 (Linking)
- [44] TAFFS, R.; ASTON, J. E.; BRILEYA, K.; JAY, Z.; KLATT, C. G.; MCGLYNN, S.; MALLETTE, N.; MONTROSS, S.; GERLACH, R.; INSKEEP, W. P.; WARD, D. M.; CARLSON, R. P.: In silico approaches to study mass and energy flows in microbial consortia: a syntrophic case study. In: *BMC Systems Biology* 3 (2009), Nr. 1, S. 114. DOI 10.1186/1752–0509–3–114. – ISSN 1752–0509 (Electronic) 1752–0509 (Linking)
- [45] BIZUKOJC, M.; DIETZ, D.; SUN, J.; ZENG, A. P.: Metabolic modelling of syntrophic-like growth of a 1,3-propanediol producer, *Clostridium butyricum*, and a methanogenic archeon, *Methanosarcina mazei*, under anaerobic conditions. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33 (2010), Nr. 4, S. 507–523. – ISSN 1615–7591, 1615–7605
- [46] BALDINI, F.; HEINKEN, A.; HEIRENDT, L.; MAGNUSDOTTIR, S.; FLEMING, R. M.; THIELE, I.: The Microbiome Modeling Toolbox: from microbial interactions to personalized microbial communities. In: *Bioinformatics* 35 (2019), Nr. 13, S. 2332–2334 – 2018.
- [47] HEINKEN, A.; SAHOO, S.; FLEMING, R. M. T.; THIELE, I.: Systems-level characterization of a host-microbe metabolic symbiosis in the mammalian gut. In: *Gut Microbes* 4 (2013), Nr. 1, S. 28–40. DOI 10.4161/gmic.22370. – ISSN 1949–0984
- [48] ZOMORRODI, A. R.; MARANAS, C. D.: OptCom: a multi-level optimization framework for the metabolic modeling and analysis of microbial communities. In: *PLoS Computational Biology* 8 (2012), Nr. 2, S. e1002363. – ISSN 1553–7358 (Electronic) 1553–734X (Linking)
- [49] ZOMORRODI, A. R.; ISLAM, M. M.; MARANAS, C. D.: d-OptCom: Dynamic multi-level and multi-objective metabolic modeling of microbial communities. In: *ACS Synthetic Biology* 3 (2014), Nr. 4, S. 247–257. DOI 10.1021/sb4001307. – ISSN 2161–5063 (Electronic) 2161–5063 (Linking)
- [50] BUDINICH, M.; BOURDON, J.; LARHLIMI, A.; EVEILLARD, D.: A multi-objective constraint-based approach for modeling genome-scale microbial ecosystems. In: *PLoS One* 12 (2017), Nr. 2, S. e0171744. DOI 10.1371/journal.pone.0171744
- [51] ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. O.: What is flux balance analysis? In: *Nature Biotechnology* 28 (2010), Nr. 3, S. 245–248
- [52] KHANDELWAL, R. A.; OLIVIER, B. G.; ROLING, W. F.; TEUSINK, B.; BRUGGEMAN, F. J.: Community flux balance analysis for microbial consortia at balanced growth. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 5, S. e64567. – ISSN 1932–6203 (Electronic) 1932–6203 (Linking)
- [53] CHAN, S. H. J.; SIMONS, M. N.; MARANAS, C. D.: SteadyCom: Predicting microbial abundances while ensuring community stability. In: *PLoS Computational Biology* 13 (2017), Nr. 5, S. e1005539. DOI 10.1371/journal.pcbi.1005539. – ISSN 1553–7358 (Electronic) 1553–734X (Linking)

- [54] ZHUANG, K.; IZALLALEN, M.; MOUSER, P.; RICHTER, H.; RISSO, C.; MAHADEVAN, R.; LOVLEY, D. R.: Genome-scale dynamic modeling of the competition between *Rhodospirillum rubrum* and *Geobacter* in anoxic subsurface environments. In: *The ISME Journal* 5 (2011), Nr. 2, S. 305–316. DOI 10.1038/ismej.2010.117. – ISSN 1751–7362
- [55] HARCOTBE, W. R.; RIEHL, W. J.; DUKOVSKI, Ilija; GRANGER, B. R.; BETTS, A.; LANG, A. H.; BONILLA, G.; KAR, A.; LEIBY, N.; MEHTA, P.; MARX, C. J.; SEGRÈ, D.: Metabolic resource allocation in individual microbes determines ecosystem interactions and spatial dynamics. In: *Cell Reports* 7 (2014), Nr. 4, S. 1104–1115. DOI 10.1016/j.celrep.2014.03.070. – ISSN 2211–1247
- [56] BAUER, E.; ZIMMERMANN, J.; BALDINI, F.; THIELE, I.; KALETA, C.: BacArena: Individual-based metabolic modeling of heterogeneous microbes in complex communities. In: *PLoS Computational Biology* 13 (2017), Nr. 5, S. e1005544. DOI 10.1371/journal.pcbi.1005544
- [57] HAMILTON, J. J.; CALIXTO CONTRERAS, M.; REED, J. L.: Thermodynamics and H₂ Transfer in a Methanogenic, Syntrophic Community. In: *PLoS Computational Biology* 11 (2015), Nr. 7, S. e1004364. DOI 10.1371/journal.pcbi.1004364. – ISSN 1553–7358 (Electronic) 1553–734X (Linking)
- [58] CHIU, H. C.; LEVY, R.; BORENSTEIN, E.: Emergent biosynthetic capacity in simple microbial communities. In: *PLoS Computational Biology* 10 (2014), Nr. 7, S. e1003695. DOI 10.1371/journal.pcbi.1003695. – ISSN 1553–7358 (Electronic) 1553–734X (Linking)
- [59] ZAMPIERI, M.; SAUER, U.: Model-based media selection to minimize the cost of metabolic cooperation in microbial ecosystems. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 32 (2016), Nr. 11, S. 1733–1739. DOI 10.1093/bioinformatics/btw062. – ISSN 1367–4803
- [60] J.-L., A.; BULTEAU, L.; PARROT, D.; MARCHETTI-SPACCAMELA, A.; STOUGIE, L.; VINGA, S.; MARY, A.; SAGOT, M.-F.: A Combinatorial Algorithm for Microbial Consortia Synthetic Design. In: *Scientific Reports* 6 (2016), S. 29182. DOI 10.1038/srep29182. – ISSN 2045–2322
- [61] LLOYD, C. J.; KING, Z. A.; SANDBERG, T. E.; HEFNER, Y.; OLSON, C. A.; PHANEUF, P. V.; O'BRIEN, E.J.; SANDERS, J. G.; SALIDO, R. A.; SANDERS, K.; BRENNAN, C.; HUMPHREY, G.; KNIGHT, R.; FEIST, A. M.: The genetic basis for adaptation of model-designed syntrophic co-cultures. In: *PLoS Computational Biology* 15 (2019), Nr. 3, S. e1006213. DOI 10.1371/journal.pcbi.1006213
- [62] PRICE, N. D.; PAPIN, J. A.; SCHILLING, C. H.; PALSSON, B. O.: Genome-scale microbial in silico models: the constraints-based approach. In: *Trends in Biotechnology* 21 (2003), Nr. 4, S. 162–169. – ISSN 0167–7799 (Print) 0167–7799 (Linking)
- [63] PFEIFFER, T.; SCHUSTER, S.; BONHOEFFER, S.: Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. In: *Science* 292 (2001), Nr. 5516, S. 504–507. DOI 10.1126/science.1058079. – ISSN 1095–9203 (Electronic) 0036–8075 (Linking)
- [64] KLAMT, S.; MÜLLER, S.; REGENSBURGER, G.; ZANGHELLINI, J.: A mathematical framework for yield (vs. rate) optimization in constraint-based modeling and applications in metabolic engineering. In: *Metabolic Engineering* 47 (2018), S. 153–169. DOI 10.1016/j.ymben.2018.02.001. – ISSN 1096–7184
- [65] SCHUSTER, S.; HILGETAG, C.: On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. In: *Journal of Biological Systems* 02 (1994), Nr. 02, S. 165–182. DOI 10.1142/S0218339094000131. – ISSN 0218–3390

- [66] ZANGHELLINI, J.; RUCKERBAUER, D. E.; HANSCHO, M.; JUNGREUTHMAYER, C.: Elementary flux modes in a nutshell: Properties, calculation and applications. In: *Biotechnology Journal* 8 (2013), Nr. 9, S. 1009–1016. DOI 10.1002/biot.201200269. – ISSN 18606768
- [67] KLAMT, S.; GILLES, E. D.: Minimal cut sets in biochemical reaction networks. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 20 (2004), Nr. 2, S. 226–234. DOI 10.1093/bioinformatics/btg395. – ISSN 1367–4803
- [68] KLAMT, S.: Generalized concept of minimal cut sets in biochemical networks. In: *Bio Systems* 83 (2006), Nr. 2-3, S. 233–247. DOI 10.1016/j.biosystems.2005.04.009. – ISSN 0303–2647
- [69] HAUS, U.-U.; KLAMT, S.; STEPHEN, T.: Computing knock-out strategies in metabolic networks. In: *Journal of Computational Biology : a journal of computational molecular cell biology* 15 (2008), Nr. 3, S. 259–268. DOI 10.1089/cmb.2007.0229. – ISSN 1066–5277
- [70] HÄDICKE, O.; KLAMT, S.: Computing complex metabolic intervention strategies using constrained minimal cut sets. In: *Metabolic Engineering* 13 (2011), Nr. 2, S. 204–213. DOI 10.1016/j.ymben.2010.12.004. – ISSN 1096–7184
- [71] BALLERSTEIN, K.; KAMP, A. v.; KLAMT, S.; HAUS, U.-U.: Minimal cut sets in a metabolic network are elementary modes in a dual network. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (2012), Nr. 3, S. 381–387. DOI 10.1093/bioinformatics/btr674. – ISSN 1367–4803
- [72] RAMAN, K.; CHANDRA, N.: Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. In: *Briefings in Bioinformatics* 10 (2009), Nr. 4, S. 435–449. DOI 10.1093/bib/bbp011. – ISSN 1467–5463, 1477–4054
- [73] LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; & RANDALL, R. J.: Protein Measurement with the folin phenol reagent. In: *The Journal of Biological Chemistry* (1951), Nr. 193.1, S. 265–275. – ISSN 0021–9258
- [74] MUTH, T.; BEHNE, A.; HEYER, R.; KOHRS, F.; BENNDORF, D.; HOFFMANN, M. ; LEHTEVÄ, M.; REICHL, U.; MARTENS, L.; RAPP, E.: The MetaProteomeAnalyzer: A powerful open-source software suite for metaproteomics data analysis and interpretation. In: *Journal of Proteome Research* 14 (2015), Nr. 3, S. 1557–1565. DOI 10.1021/pr501246w. – ISSN 1535–3893
- [75] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 5259, S. 680–685. DOI 10.1038/227680a0. – ISSN 0028–0836 (Print) 0028–0836 (Linking)
- [76] SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M.: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. In: *Analytical Chemistry* 68 (1996), Nr. 5, S. 850–858. DOI 10.1021/ac950914h. – ISSN 0003–2700
- [77] AWAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A.: Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. In: *Applied Spectroscopy Reviews* 50 (2015), Nr. 2, S. 158–175. DOI 10.1080/05704928.2014.954046. – ISSN 0570–4928
- [78] MAKAROV, A.; DENISOV, E.; KHOLOMEEV, A.; BALSCHUN, W.; LANGE, O.; STRUPAT, K.; HORNING, S.: Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. In: *Analytical Chemistry* 78 (2006), Nr. 7, S. 2113–2120. DOI 10.1021/ac0518811. – ISSN 0003–2700

- [79] EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J.: Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. In: *Applied Spectroscopy Reviews* 44 (2009), Nr. 3, S. 210–230. DOI 10.1080/05704920902717872. – ISSN 0570–4928
- [80] FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M.: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. In: *Science (New York, N.Y.)* 246 (1989), Nr. 4926, S. 64–71. DOI 10.1126/science.2675315. – ISSN 0036–8075
- [81] HEYER, R.; SCHALLERT, K.; SIEWERT, C.; KOHRS, F.; GREVE, J.; MAUS, I.; KLANG, J.; KLOCKE, M.; HEIERMANN, M.; HOFFMANN, M.; PÜTTKER, S.; CALUSINSKA, M.; ZOUN, R.; SAAKE, G.; BENNDORF, D.; REICHL, U.: Metaproteome analysis reveals that syntrophy, competition, and phage-host interaction shape microbial communities in biogas plants. In: *Microbiome* 7 (2019), Nr. 1, S. 69. DOI 10.1186/s40168–019–0673–y
- [82] HEYER, R.; BENNDORF, D.; KOHRS, F.; VRIEZE, J. de; BOON, N.; HOFFMANN, M.; RAPP, E.; SCHLÜTER, A.; SCZYRBA, A.; REICHL, U.: Proteotyping of biogas plant microbiomes separates biogas plants according to process temperature and reactor type. In: *Biotechnology for Biofuels* 9 (2016), S. 155. DOI 10.1186/s13068–016–0572–4. – ISSN 1754–6834 (Electronic) 1754–6834 (Linking)
- [83] BOECKMANN, B.: The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. In: *Nucleic Acids Research* 31 (2003), Nr. 1, S. 365–370. DOI 10.1093/nar/gkg095
- [84] KANEHISA, M.; ARAKI, M.; GOTO, S.; HATTORI, M.; HIRAKAWA, M.; ITOH, M.; KATAYAMA, T.; KAWASHIMA, S.; OKUDA, S.; TOKIMATSU, T.; YAMANISHI, Y.: KEGG for linking genomes to life and the environment. In: *Nucleic Acids Research* 36 (2008), Nr. Database issue, S. D480–4. DOI 10.1093/nar/gkm882. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [85] OGATA, H.; GOTO, S.; SATO, K.; FUJIBUCHI, W.; BONO, H.; KANEHISA, M.: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. In: *Nucleic Acids Research* 27 (1999), Nr. 1, S. 29–34. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [86] BAIROCH, A.; BOUGUELERET, L.; ALTAIRAC, S.; AMENDOLIA, V.; AUCHINCLOSS, A.; ARGOUD-PUY, G.; AXELSEN, K.; BARATIN, D.; BLATTER, M. C.; BOECKMANN, B. u. a.: The Universal Protein Resource (UniProt) 2009. In: *Nucleic Acids Research* 37 (2009), Nr. Database issue, S. D169–74. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [87] CASPI, R.; ALTMAN, T.; DREHER, K.; FULCHER, C. A.; SUBHRAVETI, P.; KESELER, I. M.; KOTHARI, A.; KRUMMENACKER, M.; LATENDRESSE, M.; MUELLER, L. A.; ONG, Q.; PALEY, S.; PUJAR, A.; SHEARER, A. G.; TRAVERS, M.; WEERASINGHE, D.; ZHANG, P.; KARP, P. D.: The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), Nr. Database issue, S. D742–53. DOI 10.1093/nar/gkr1014. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [88] SCHEER, M.; GROTE, A.; CHANG, A.; SCHOMBURG, I.; MUNARETTO, C.; ROTHER, M.; SÖHNGEN, C.; STELZER, M.; THIELE, J.; SCHOMBURG, D.: BRENDA, the enzyme information system in 2011. In: *Nucleic Acids Research* 39 (2011), Nr. suppl 1, S. D670–D676. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [89] SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; PLACZEK, S.; SÖHNGEN, C.; ROTHER, M.; LANG, M.; MUNARETTO, C.; ULAS, S.; STELZER, M.; GROTE, A. u. a.: BRENDA in 2013: integrated

- reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. In: *Nucleic Acids Research* 41 (2013), Nr. D1, S. D764–D772. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [90] SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; SCHOMBURG, D.: BRENDA, enzyme data and metabolic information. In: *Nucleic Acids Research* 30 (2002), Nr. 1, S. 47–49. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [91] ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSARDI, G.; CASTRO, E. de; DUVAUD, S.; FLEGEL, V.; FORTIER, A.; GASTEIGER, E.; GROSDIDIER, A.; HERNANDEZ, C.; IOANNIDIS, V.; KUZNETSOV, D.; LIECHTI, R.; MORETTI, S.; MOSTAGUIR, K.; REDASCHI, N.; ROSSIER, G.; XENARIOS, I.; STOCKINGER, H.: ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), Nr. W1, S. W597–W603. DOI 10.1093/nar/gks400. – ISSN 1362–4962 (Electronic) 0305–1048 (Linking)
- [92] KLAMT, S.; SAEZ-RODRIGUEZ, J.; GILLES, E. D.: Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. In: *BMC Systems Biology* 1 (2007), Nr. 1, S. 2. DOI 10.1186/1752–0509–1–2. – ISSN 1752–0509 (Electronic) 1752–0509 (Linking)
- [93] KAMP, A. v.; THIELE, S.; HÄDICKE, O. ; KLAMT, S.: Use of CellNetAnalyzer in biotechnology and metabolic engineering. In: *Journal of Biotechnology* 261 (2017), S. 221–228. DOI 10.1016/j.jbiotec.2017.05.001. – ISSN 01681656
- [94] CLARK, D. P.: The fermentation pathways of Escherichia coli. In: *FEMS Microbiology Letters* 63 (1989), Nr. 3, S. 223–234. DOI 10.1111/j.1574–6968.1989.tb03398.x. – ISSN 03781097
- [95] JONES, D. T.; WOODS, D. R.: Acetone-butanol fermentation revisited. In: *Microbiological reviews* 50 (1986), Nr. 4, S. 484–524. – ISSN 0146–0749
- [96] KATAGIRI, H.; IMAI, K.; SUGIMORI, T.: On the Metabolism of Organic Acids by Clostridium acetobutylicum. In: *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 24 (1960), Nr. 2, S. 163–181. DOI 10.1080/03758397.1960.10857649. – ISSN 0375–8397
- [97] THIERRY, A.; DEUTSCH, S.-M.; FALENTIN, H.; DALMASSO, M.; COUSIN, F. J.; JAN, Gwenaël: New insights into physiology and metabolism of Propionibacterium freudenreichii. In: *International Journal of Food Microbiology* 149 (2011), Nr. 1, S. 19–27. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026. – ISSN 0168–1605
- [98] SEELIGER, S.; JANSSEN, P. H.; SCHINK, B.: Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. In: *FEMS Microbiology Letters* 211 (2002), Nr. 1, S. 65–70. DOI 10.1111/j.1574–6968.2002.tb11204.x. – ISSN 03781097
- [99] BALCH, W. E.; SCHOBERTH, S.; TANNER, R. S.; WOLFE, R. S.: Acetobacterium, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 27 (1977), Nr. 4, S. 355–361. DOI 10.1099/00207713–27–4–355. – ISSN 0020–7713, 1465–2102
- [100] POSTGATE, J. R.; CAMPBELL, L. L.: Classification of Desulfovibrio species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. In: *Bacteriological Reviews* 30 (1966), Nr. 4, S. 732–738. – ISSN 0005–3678
- [101] BRYANT, M. P.; CAMPBELL, L. L.; REDDY, C. A.; CRABILL, M. R.: Growth of Desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology* 33 (1977), Nr. 5, S. 1162–1169. – ISSN 0099–2240

- [102] MCINERNEY, M. J.; BRYANT, M. P.: Anaerobic degradation of lactate by syntrophic associations of *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio* species and effect of H₂ on acetate degradation. In: *Applied and Environmental Microbiology* 41 (1981), Nr. 2, S. 346–354. – ISSN 0099–2240
- [103] MCINERNEY, M. J.; BRYANT, M. P.; HESPELL, R. B.; COSTERTON, J. W.: *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. In: *Applied and Environmental Microbiology* 41 (1981), Nr. 4, S. 1029–1039. – ISSN 0099–2240
- [104] HARMSSEN, H. J.; VAN KUIJK, B. L.; PLUGGE, C. M.; AKKERMANS, A. D.; VOS, W. M.; STAMS, A. J.: *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 Pt 4 (1998), S. 1383–1387. DOI 10.1099/00207713-48-4-1383. – ISSN 0020–7713, 1465–2102
- [105] PATEL, G. B.; ROTH, L. A.; VAN DEN BERG, L.; CLARK, D. S.: Characterization of a strain of *Methanospirillum hungatei*. In: *Canadian Journal of Microbiology* 22 (1976), Nr. 9, S. 1404–1410. DOI 10.1139/m76-208. – ISSN 0008–4166
- [106] SCHAUER, N. L.; BROWN, D. P.; FERRY, J. G.: Kinetics of formate metabolism in *Methanobacterium formicicum* and *Methanospirillum hungatei*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 44 (1982), Nr. 3, S. 549–554. – ISSN 0099–2240
- [107] HUTTEN, T. J.; BONGAERTS, H. C. M.; VAN DER DRIFT, C.; VOGELS, G. D.: Acetate, methanol and carbon dioxide as substrates for growth of *Methanosarcina barkeri*. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 46 (1980), Nr. 6, S. 601–610. – ISSN 0003–6072, 1572–9699
- [108] HIPPE, H.; CASPARI, D.; FIEBIG, K.; GOTTSCHALK, G.: Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (1979), Nr. 1, S. 494–498. DOI 10.1073/pnas.76.1.494. – ISSN 0027–8424
- [109] KOCH, S.: *Erweiterung und Validierung eines stöchiometrischen Netzwerkmodells der Biogasbildung*. Magdeburg, Otto-von-Guericke Universität, Masterarbeit, 13.04/2013
- [110] HEINRICH, R.; SCHUSTER, S.: *The Regulation of Cellular Systems*. New York : Chapman and Hall, 1996. – ISBN 1461311616
- [111] BUCKEL, W.; THAUER, R. K.: Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation. In: *Biochimica Biophysica Acta* 1827 (2013), Nr. 2, S. 94–113. DOI 10.1016/j.bbabi.2012.07.002. – ISSN 0006–3002 (Print) 0006–3002 (Linking)
- [112] PIRT, S. J.: The maintenance energy of bacteria in growing cultures. In: *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 163 (1965), Nr. 991, S. 224–231. – ISSN 0950–1193 (Print) 0950–1193 (Linking)
- [113] FRONK, K.: *Stöchiometrische Netzwerkanalyse der Biogasbildung*, Magdeburg, Otto-von-Guericke Universität, Masterarbeit, 01.01.2013
- [114] WENDSCHUH, S.: *Aufbau und Validierung eines stöchiometrischen Netzwerkmodells des Propionsäureverwerters S. fumaroxidans*. Magdeburg, Otto-von-Guericke Universität, Bachelorarbeit, 21.10./2016
- [115] BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A.: Propionic acid fermentation from glycerol: Comparison with conventional substrates. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 47 (1997), Nr. 4, S. 441–446. DOI 10.1007/s002530050953. – ISSN 0175–7598

- [116] HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L.: Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (2000), Nr. 4, S. 435–440. DOI 10.1007/s002530051638. – ISSN 0175–7598
- [117] FALENTIN, H.; DEUTSCH, S.-M.; JAN, G.; LOUX, V.; THIERRY, A.; PARAYRE, S.; MAILLARD, M.-B.; DHERBECOURT, J.; COUSIN, F. J.; JARDIN, J.; SIGUIER, P.; COULOUX, A.; BARBE, V.; VACHERIE, B.; WINCKER, P.; GIBRAT, J.-F.; GAILLARDIN, C.; LORTAL, S.: The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. In: *PLoS One* 5 (2010), Nr. 7, S. e11748. DOI 10.1371/journal.pone.0011748. – ISSN 1932–6203 (Electronic) 1932–6203 (Linking)
- [118] SCHINK, B.; KREMER, D. R.; HANSEN, T. A.: Pathway of propionate formation from ethanol in *Pelobacter propionicus*. In: *Archives of Microbiology* 147 (1987), Nr. 4, S. 321–327. DOI 10.1007/BF00406127. – ISSN 0302–8933
- [119] CROWN, S. B.; INDURTHI, D. C.; AHN, W. S.; CHOI, J.; PAPOUTSAKIS, E. T.; ANTONIEWICZ, M. R.: Resolving the TCA cycle and pentose-phosphate pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: Isotopomer analysis, in vitro activities and expression analysis. In: *Biotechnology Journal* 6 (2011), Nr. 3, S. 300–305. DOI 10.1002/biot.201000282. – ISSN 18606768
- [120] NÖLLING, J.; BRETON, G.; OMELCHENKO, M. V.; MAKAROVA, K. S.; ZENG, Q.; GIBSON, R.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; QIU, D.; HITTI, J.; WOLF, Y. I.; TATUSOV, R. L.; SABATHE, F.; DOUCETTE-STAMM, L.; SOUCAILLE, P.; DALY, M. J.; BENNETT, G. N.; KOONIN, E. V.; SMITH, D. R.: Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. In: *Journal of Bacteriology* 183 (2001), Nr. 16, S. 4823–4838. DOI 10.1128/JB.183.16.4823–4838.2001. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)
- [121] KIM, B. H.; BELLOWS, P.; DATTA, R.; ZEIKUS, J. G.: Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. In: *Applied and Environmental Microbiology* 48 (1984), Nr. 4, S. 764–770. – ISSN 0099–2240
- [122] WIESENORN, D. P.; RUDOLPH, F. B.; PAPOUTSAKIS, E. T.: Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. In: *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989), Nr. 2, S. 323–329. – ISSN 0099–2240
- [123] WIESENORN, D. P.; RUDOLPH, F. B.; PAPOUTSAKIS, E. T.: Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. In: *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989), Nr. 2, S. 317–322. – ISSN 0099–2240
- [124] BAINOTTI, A. E.; NISHIO, N.: Growth kinetics of *Acetobacterium* sp. on methanol-formate in continuous culture. In: *Journal of Applied Microbiology* 88 (2000), Nr. 2, S. 191–201. – ISSN 1364–5072, 1365–2672
- [125] BERTSCH, J.; SIEMUND, A. L.; KREMP, F.; MÜLLER, V.: A novel route for ethanol oxidation in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*: the acetaldehyde/ethanol dehydrogenase pathway. In: *Environmental Microbiology* (2016). – ISSN 1462–2920 (Electronic) 1462–2912 (Linking)
- [126] DIEKERT, G.; WOHLFARTH, G.: Metabolism of homoacetogens. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 66 (1994), Nr. 1-3, S. 209–221. DOI 10.1007/BF00871640. – ISSN 0003–6072, 1572–9699

- [127] REIDLINGER, J.; MÜLLER, V.: Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na⁺-translocating F1F0-type enzyme. In: *European Journal of Biochemistry* 223 (1994), Nr. 1, S. 275–283. DOI 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18992.x. – ISSN 0014-2956
- [128] MÜLLER, V.; AUFURTH, S.; RAHLFS, S.: The Na⁺ cycle in *Acetobacterium woodii*: identification and characterization of a Na⁺ translocating F1F0-ATPase with a mixed oligomer of 8 and 16 kDa proteolipids. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1505 (2001), Nr. 1, S. 108–120. DOI 10.1016/S0005-2728(00)00281-4. – ISSN 00052728
- [129] BERG, I. A.: Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2011), Nr. 6, S. 1925–1936. – ISSN 0099-2240
- [130] POEHLEIN, A.; SCHMIDT, S.; KASTER, A.-K.; GOENRICH, M.; VOLLMERS, J.; THÜRMER, A.; BERTSCH, J.; SCHUCHMANN, K.; VOIGT, B.; HECKER, M.; DANIEL, R.; THAUER, R. K.; GOTTSCHALK, G.; MÜLLER, Volker: An Ancient Pathway Combining Carbon Dioxide Fixation with the Generation and Utilization of a Sodium Ion Gradient for ATP Synthesis. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 3, S. e33439. DOI 10.1371/journal.pone.0033439. – ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking)
- [131] SCHUCHMANN, K.; MÜLLER, V.: Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. In: *Nature Reviews Microbiology* 12 (2014), 809 EP -. DOI 10.1038/nrmicro3365. – ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking)
- [132] MÜLLER, V.: Energy Conservation in Acetogenic Bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2003), Nr. 11, S. 6345–6353. DOI 10.1128/AEM.69.11.6345-6353.2003. – ISSN 0099-2240
- [133] HESS, V.; SCHUCHMANN, K.; MÜLLER, V.: The ferredoxin: NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (2013), Nr. 44, S. 31496–31502. – ISSN 00219258
- [134] FRITZ, M.; KLYSZEJKO, A. L.; MORGNER, N.; VONCK, J.; BRUTSCHY, B.; MÜLLER, D. J.; MEIER, T.; MÜLLER, V.: An intermediate step in the evolution of ATPases—a hybrid F0–V0 rotor in a bacterial Na⁺ F1F0 ATP synthase. In: *The FEBS Journal* 275 (2008), Nr. 9, S. 1999–2007. – ISSN 1742-4658
- [135] BIEGEL, E.; SCHMIDT, S.; MÜLLER, V.: Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. In: *Environmental Microbiology* 11 (2009), Nr. 6, S. 1438–1443. – ISSN 1462-2920 (Electronic) 1462-2912 (Linking)
- [136] MÜLLER, V.; IMKAMP, F.; BIEGEL, E.; SCHMIDT, S.; DILLING, S.: Discovery of a Ferredoxin: NAD⁺-Oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125 (2008), Nr. 1, S. 137–146. – ISSN 1749-6632
- [137] VAN KUIJK, B. L. M.; STAMS, A. J. M.: Sulfate reduction by a syntrophic propionate-oxidizing bacterium. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 68 (1995), Nr. 4, S. 293–296. DOI 10.1007/BF00874139. – ISSN 0003-6072, 1572-9699
- [138] PLUGGE, C. M.; HENSTRA, A. M.; WORM, P.; SWARTS, D. C.; PAULITSCH-FUCHS, A. H.; SCHOLTEN, J. C. M.; LYKIDIS, A.; LAPIDUS, A. L.; GOLTSMAN, E.; KIM, E.;

- McDONALD, E.; ROHLIN, L.; CRABLE, B. R.; GUNSALUS, R. P.; STAMS, A. J. M.; MCINERNEY, M. J.: Complete genome sequence of *Syntrophobacter fumaroxidans* strain (MPOB(T)). In: *Standards in Genomic Sciences* 7 (2012), Nr. 1, S. 91–106. DOI 10.4056/sigs.2996379. – ISSN 1944–3277
- [139] MÜLLER, N.; WORM, P.; SCHINK, B.; STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M.: Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. In: *Environmental Microbiology Reports* 2 (2010), Nr. 4, S. 489–499. DOI 10.1111/j.1758–2229.2010.00147.x. – ISSN 1758–2229
- [140] BEATY, P. S.; MCINERNEY, M. J.: Growth of *Syntrophomonas wolfei* in pure culture on crotonate. In: *Archives of Microbiology* 147 (1987), Nr. 4, S. 389–393. DOI 10.1007/BF00406138. – ISSN 0302–8933
- [141] BEATY, P. S.; MCINERNEY, M. J.: Nutritional Features of *Syntrophomonas wolfei*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990), Nr. 10, S. 3223–3224. – ISSN 0099–2240
- [142] SIEBER, J. R.; SIMS, D. R.; HAN, C.; KIM, E.; LYKIDIS, A.; LAPIDUS, A. L.; McDONALD, E.; ROHLIN, L.; CULLEY, D. E.; GUNSALUS, R.; MCINERNEY, M. J.: The genome of *Syntrophomonas wolfei*: new insights into syntrophic metabolism and biohydrogen production. In: *Environmental Microbiology* 12 (2010), Nr. 8, S. 2289–2301. DOI 10.1111/j.1462–2920.2010.02237.x. – ISSN 1462–2920 (Electronic) 1462–2912 (Linking)
- [143] WALLRABENSTEIN, C.; SCHINK, B.: Evidence of reversed electron transport in syntrophic butyrate or benzoate oxidation by *Syntrophomonas wolfei* and *Syntrophus buswellii*. In: *Archives of Microbiology* 162 (1994), Nr. 1–2, S. 136–142. DOI 10.1007/BF00264387. – ISSN 0302–8933
- [144] SCHMIDT, A.; MÜLLER, N.; SCHINK, B.; SCHLEHECK, D.: A proteomic view at the biochemistry of syntrophic butyrate oxidation in *Syntrophomonas wolfei*. In: *PLoS One* 8 (2013), Nr. 2, S. e56905. DOI 10.1371/journal.pone.0056905. – ISSN 1932–6203 (Electronic) 1932–6203 (Linking)
- [145] MCINERNEY, M. J.; WOFFORD, N. Q.: Enzymes involved in crotonate metabolism in *Syntrophomonas wolfei*. In: *Archives of Microbiology* 158 (1992), Nr. 5, S. 344–349. DOI 10.1007/BF00245363. – ISSN 0302–8933
- [146] AMOS, D. A.; MCINERNEY, M. J.: Poly- β -hydroxyalkanoate in *Syntrophomonas wolfei*. In: *Archives of Microbiology* 152 (1989), Nr. 2, S. 172–177. DOI 10.1007/BF00456097. – ISSN 0302–8933
- [147] HEIDELBERG, J. F.; SESHADRI, R.; HAVEMAN, S. A.; HEMME, C. L.; PAULSEN, I. T.; KOLONAY, J. F.; EISEN, J. A.; WARD, N.; METHE, B.; BRINKAC, L. M.; DAUGHERTY, S. C.; DEBOY, R. T.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; SULLIVAN, S. A.; FOUTS, D.; HAFT, D. H.; SELENGUT, J.; PETERSON, J. D.; DAVIDSEN, T. M.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; RADUNE, D.; DIMITROV, G.; HANCE, Mark; TRAN, K.; KHOURI, H.; GILL, J.; UTTERBACK, Terry R.; FELDBLYUM, T. V.; WALL, J. D.; VOORDOUW, G.; FRASER, C. M.: The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. In: *Nature Biotechnology* 22 (2004), Nr. 5, S. 554–559. DOI 10.1038/nbt959
- [148] TANG, Y.; PINGITORE, F.; MUKHOPADHYAY, A.; PHAN, R.; HAZEN, T. C.; KEASLING, J. D.: Pathway confirmation and flux analysis of central metabolic pathways in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough using gas chromatography-mass spectrometry and Fourier

- transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. In: *Journal of Bacteriology* 189 (2007), Nr. 3, S. 940–949. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)
- [149] WALKER, C. B.; HE, Z.; YANG, Z. K.; RINGBAUER, J. A., JR.; HE, Q.; ZHOU, J.; VOORDOUW, G.; WALL, J. D.; ARKIN, A. P.; HAZEN, T. C.; STOLYAR, S.; STAHL, D. A.: The electron transfer system of syntrophically grown *Desulfovibrio vulgaris*. In: *Journal of Bacteriology* 191 (2009), Nr. 18, S. 5793–5801. DOI 10.1128/JB.00356–09. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)
- [150] PEREIRA, I. A.; RAMOS, A. R.; GREIN, F.; MARQUES, M. C.; DA SILVA, S. M.; VENCESLAU, S. S.: A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. In: *Frontiers in Microbiology* 2 (2011), S. 69. DOI 10.3389/fmicb.2011.00069. – ISSN 1664–302X (Electronic) 1664–302X (Linking)
- [151] MEYER, B.; KUEHL, J. V.; PRICE, M. N.; RAY, J.; DEUTSCHBAUER, A. M.; ARKIN, A. P.; STAHL, D. A.: The energy-conserving electron transfer system used by *Desulfovibrio alaskensis* strain G20 during pyruvate fermentation involves reduction of endogenously formed fumarate and cytoplasmic and membrane-bound complexes, Hdr-Flox and Rnf. In: *Environmental Microbiology* 16 (2014), Nr. 11, S. 3463–3486. DOI 10.1111/1462–2920.12405. – ISSN 1462–2920 (Electronic) 1462–2912 (Linking)
- [152] PRICE, M. N.; RAY, J.; WETMORE, K. M.; KUEHL, J. V.; BAUER, S.; DEUTSCHBAUER, A. M.; ARKIN, A. P.: The genetic basis of energy conservation in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio alaskensis* G20. In: *Frontiers in Microbiology* 5 (2014), S. 577. DOI 10.3389/fmicb.2014.00577. – ISSN 1664–302X (Electronic) 1664–302X (Linking)
- [153] MEYER, B.; KUEHL, J. V.; DEUTSCHBAUER, A. M.; ARKIN, A. P.; STAHL, D. A.: Flexibility of syntrophic enzyme systems in *Desulfovibrio* species ensures their adaptation capability to environmental changes. In: *Journal of Bacteriology* 195 (2013), Nr. 21, S. 4900–4914. DOI 10.1128/Jb.00504–13. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)
- [154] MEYER, B.; KUEHL, J.; DEUTSCHBAUER, A. M.; PRICE, M. N.; ARKIN, A. P.; STAHL, D. A.: Variation among *Desulfovibrio* Species in Electron Transfer Systems Used for Syntrophic Growth. In: *Journal of Bacteriology* 195 (2013), Nr. 5, S. 990–1004. DOI 10.1128/Jb.01959–12. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)
- [155] HENSGENS, C. M.; HAGEN, W. R.; HANSEN, T. A.: Purification and characterization of a benzylviologen-linked, tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*. In: *Journal of Bacteriology* 177 (1995), Nr. 21, S. 6195–6200. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)
- [156] KÜHN, W.; GOTTSCHALK, G.: Characterization of the cytochromes occurring in *Methanosarcina* species. In: *European Journal of Biochemistry* 135 (1983), Nr. 1, S. 89–94. DOI 10.1111/j.1432–1033.1983.tb07621.x. – ISSN 0014–2956
- [157] THAUER, R. K.; KASTER, A. K.; SEEDORF, H.; BUCKEL, W.; HEDDERICH, R.: Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. In: *Nature Reviews Microbiology* 6 (2008), Nr. 8, S. 579–591. DOI 10.1038/nrmicro1931. – ISSN 1740–1534 (Electronic) 1740–1526 (Linking)
- [158] SAUER, K.; HARMS, U.; THAUER, R. K.: Methanol: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. In: *European Journal of Biochemistry* 243 (1997), Nr. 3, S. 670–677. – ISSN 0014–2956
- [159] SHAPIRO, S.; WOLFE, R. S.: Methyl-coenzyme M, an intermediate in methanogenic dissimilation of C1 compounds by *Methanosarcina barkeri*. In: *Journal of Bacteriology* 141 (1980), Nr. 2, S. 728–734. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)

- [160] BLAUT, M.: Metabolism of methanogens. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 66 (1994), Nr. 1-3, S. 187–208. – ISSN 0003–6072, 1572–9699
- [161] THAUER, R. K.: Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. In: *Microbiology* (1998), Nr. 144, S. 2377–2406. – ISSN 1350–0872, 1465–2080
- [162] ZHANG, A.; SUN, J.; WANG, Z.; YANG, S. T.; ZHOU, H.: Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. In: *Bioresource Technology* 175 (2015), S. 374–381. DOI 10.1016/j.biortech.2014.10.046. – ISSN 09608524
- [163] LEWIS, V. P.; YANG, S. T.: Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: Effect of growth substrate. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 37 (1992), Nr. 4. DOI 10.1007/BF00180964. – ISSN 0175–7598
- [164] GODLEY, A. R.; LINNETT, P. E.; ROBINSON, J. P.: The effect of carbon dioxide on the growth kinetics of fructose-limited chemostat cultures of *Acetobacterium woodii* DSM 1030. In: *Archives of Microbiology* 154 (1990), Nr. 1, S. 5–11. DOI 10.1007/BF00249170. – ISSN 0302–8933
- [165] PETERS, V.; JANSSEN, P. H.; CONRAD, R.: Efficiency of hydrogen utilization during unitrophic and mixotrophic growth of *Acetobacterium woodii* on hydrogen and lactate in the chemostat. In: *FEMS Microbiology Ecology* 26 (1998), Nr. 4, S. 317–324. DOI 10.1111/j.1574–6941.1998.tb00516.x. – ISSN 01686496, 15746941
- [166] BUSCHHORN, H.; DÜRRE, P.; GOTTSCHALK, G.: Production and Utilization of Ethanol by the Homoacetogen *Acetobacterium woodii*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989), Nr. 7, S. 1835–1840. – ISSN 0099–2240
- [167] BAINOTTI, A. E.; YAMAGUCHI, K.; NAKASHIMADA, Y.; NISHIO, N.: Kinetics and energetics of *Acetobacterium* sp. in chemostat culture on methanol-CO₂. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85 (1998), Nr. 2, S. 223–229. – ISSN 0922–338X
- [168] SCHOLTEN, J. C. M.; CONRAD, R.: Energetics of Syntrophic Propionate Oxidation in Defined Batch and Chemostat Cocultures. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000), Nr. 7, S. 2934–2942. DOI 10.1128/AEM.66.7.2934–2942.2000. – ISSN 0099–2240
- [169] NETHE-JAENCHEN, R.; THAUER, R. K.: Growth yields and saturation constant of *Desulfovibrio vulgaris* in chemostat culture. In: *Archives of Microbiology* 137 (1984), Nr. 3, S. 236–240. – ISSN 0302–8933
- [170] BADZIONG, W.; THAUER, R. K.: Growth yields and growth rates of *Desulfovibrio vulgaris* (Marburg) growing on hydrogen plus sulfate and hydrogen plus thiosulfate as the sole energy sources. In: *Archives of Microbiology* 117 (1978), Nr. 2, S. 209–214. – ISSN 0302–8933
- [171] SCHÖNHEIT, P.; MOLL, J.; THAUER, R. K.: Growth parameters (K_s , μ_{max} , Y_s) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. In: *Archives of Microbiology* 127 (1980), Nr. 1, S. 59–65. DOI 10.1007/bf00414356. – ISSN 0302–8933
- [172] CHUA, H. B.; ROBINSON, J. P.: Formate-limited growth of *Methanobacterium formicium* in steady-state cultures. In: *Archives of Microbiology* 135 (1983), Nr. 2, S. 158–160. DOI 10.1007/Bf00408027. – ISSN 0302–8933
- [173] KRZYCKI, J. A.; WOLKIN, R. H.; ZEIKUS, J. G.: Comparison of unitrophic and mixotrophic substrate metabolism by acetate-adapted strain of *Methanosarcina barkeri*. In: *Journal of Bacteriology* 149 (1982), Nr. 1, S. 247–254. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)

- [174] RAJOKA, M. I.; TABASSUM, R.; MALIK, K. A.: Enhanced rate of methanol and acetate uptake for production of methane in batch cultures using *Methanosarcina mazei*. In: *Bioresource Technology* 67 (1999), Nr. 3, S. 305–311. DOI 10.1016/S0960–8524(98)00112–6. – ISSN 09608524
- [175] SCHERER, P.; SAHM, H.: Influence of sulfur-containing-compounds on the growth of *Methanosarcina barkeri* in a defined medium. In: *European Journal of Applied Microbiology* 12 (1981), Nr. 1, S. 28–35. DOI 10.1007/Bf00508115. – ISSN 0340–2118
- [176] WEIMER, P. J.; ZEIKUS, J. G.: One carbon metabolism in methanogenic bacteria. Cellular characterization and growth of *Methanosarcina barkeri*. In: *Archives of Microbiology* 119 (1978), Nr. 1, S. 49–57. DOI 10.1007/BF00407927. – ISSN 0302–8933
- [177] BEATY, P. S.; MCINERNEY, M. J.: Effects of Organic Acid Anions on the Growth and Metabolism of *Syntrophomonas wolfei* in Pure Culture and in Defined Consortia. In: *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989), Nr. 4, S. 977–983. – ISSN 0099–2240
- [178] KREMER, D. R.; NIENHUISKUIPER, H. E.; HANSEN, T. A.: Ethanol dissimilation in *Desulfovibrio*. In: *Archives of Microbiology* 150 (1988), Nr. 6, S. 552–557. DOI 10.1007/Bf00408248. – ISSN 0302–8933
- [179] OKABE, S.; NIELSEN, P. H.; CHARCKLIS, W. G.: Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. In: *Biotechnology and Bioengineering* 40 (1992), Nr. 6, S. 725–734. DOI 10.1002/bit.260400612. – ISSN 1097–0290 (Electronic) 0006–3592 (Linking)
- [180] NAGPAL, S.; CHUICHULCHERM, S.; LIVINGSTON, A.; PEEVA, L.: Ethanol utilization by sulfate-reducing bacteria: an experimental and modeling study. In: *Biotechnology and Bioengineering* 70 (2000), Nr. 5, S. 533–543. – ISSN 1097–0290 (Electronic) 0006–3592 (Linking)
- [181] HARDER, W.; DIJKHUIZEN, L.: Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 297 (1982), Nr. 1088, S. 459–480. DOI 10.1098/rstb.1982.0055
- [182] RÖLING, W. F. M.; FERRER, M.; GOLYSHIN, P. N.: Systems approaches to microbial communities and their functioning. In: *Current Opinion in Biotechnology* 21 (2010), Nr. 4, S. 532–538. DOI 10.1016/j.copbio.2010.06.007. – ISSN 1879–0429 (Electronic) 0958–1669 (Linking)
- [183] KLITGORD, N.; SEGRÈ, D.: Ecosystems biology of microbial metabolism. In: *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2011), Nr. 4, S. 541–546. DOI 10.1016/j.copbio.2011.04.018. – ISSN 1879–0429 (Electronic) 0958–1669 (Linking)
- [184] DESOUKI, A. A.; JARRE, F.; GELIUS-DIETRICH, G.; LERCHER, M. J.: CycleFreeFlux: efficient removal of thermodynamically infeasible loops from flux distributions. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (2015), Nr. 13, S. 2159–2165. DOI 10.1093/bioinformatics/btv096. – ISSN 1367–4803
- [185] MARTINO, D. d.; CAPUANI, F.; MORI, M.; MARTINO, A. d.; MARINARI, E.: Counting and correcting thermodynamically infeasible flux cycles in genome-scale metabolic networks. In: *Metabolites* 3 (2013), Nr. 4, S. 946–966. DOI 10.3390/metabo3040946. – ISSN 2218–1989
- [186] KOCH, S.; BENNDORF, D.; FRONK, K.; REICHL, U.; KLAMT, S.: Predicting compositions of microbial communities from stoichiometric models with applications for the biogas process. In: *Biotechnology for Biofuels* 9 (2016), S. 17. DOI 10.1186/s13068–016–0429–x. – ISSN 1754–6834 (Electronic) 1754–6834 (Linking)

- [187] HERBERT, D.; ELSWORTH, R.; TELLING, R. C.: The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. In: *Journal of General Microbiology* 14 (1956), Nr. 3, S. 601–622. DOI 10.1099/00221287-14-3-601
- [188] RUSSELL, James B.; BALDWIN, R. L.: Comparison of Substrate Affinities Among Several Rumen Bacteria: a Possible Determinant of Rumen Bacterial Competition. In: *General Microbial Ecology* (1979), Nr. 37-4, S. 531–536
- [189] SCHÖNHEIT, P.; KRISTJANSSON, J. K.; THAUER, R. K.: Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to out-compete methanogens for acetate. In: *Archives of Microbiology* 132 (1982), Nr. 3, S. 285–288. DOI 10.1007/BF00407967. – ISSN 0302–8933
- [190] HARDER, B.-J.; BETTENBROCK, K.; KLAMT, S.: Model-based metabolic engineering enables high yield itaconic acid production by *Escherichia coli*. In: *Metabolic Engineering* 38 (2016), S. 29–37. DOI 10.1016/j.ymben.2016.05.008. – ISSN 1096–7184
- [191] PRICE, P. B.; SOWERS, T.: Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Nr. 13, S. 4631–4636. DOI 10.1073/pnas.0400522101. – ISSN 0027–8424
- [192] VARELA, C. A.; BAEZ, M. E.; AGOSIN, E.: Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004), Nr. 7, S. 4222–4229. DOI 10.1128/AEM.70.7.4222–4229.2004. – ISSN 0099–2240
- [193] SHIDA, O.; TAKAGI, H.; KADOWAKI, K.; KOMAGATA, K.: Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (1996), Nr. 4, S. 939–946. DOI 10.1099/00207713-46-4-939. – ISSN 0020–7713, 1465–2102
- [194] SPENCER, R. C.: *Bacillus anthracis*. In: *Journal of Clinical Pathology* 56 (2003), Nr. 3, S. 182–187. DOI 10.1136/jcp.56.3.182. – ISSN 0021–9746
- [195] HUBER, H.; STETTER, K. O.: Archaeoglobales ord. nov. Version: 2015. In: WHITMAN, William B. (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* Bd. 20. [Hoboken, New Jersey] : Wiley, 2015. – DOI 10.1002/9781118960608.obm00047. – ISBN 9781118960608, S. 1
- [196] CAN, M.; ARMSTRONG, F. A.; RAGSDALE, S. W.: Structure, function, and mechanism of the nickel metalloenzymes, CO dehydrogenase, and acetyl-CoA synthase. In: *Chemical Reviews* 114 (2014), Nr. 8, S. 4149–4174. DOI 10.1021/cr400461p
- [197] KOHRS, F.; HEYER, R.; BISSINGER, T.; KOTTLER, R.; SCHALLERT, K.; PÜTTKER, S.; BEHNE, A.; RAPP, E.; BENNDORF, D.; REICHL, U.: Proteotyping of laboratory-scale biogas plants reveals multiple steady-states in community composition. In: *Anaerobe* (2017). DOI 10.1016/j.anaerobe.2017.02.005. – ISSN 1075–9964
- [198] VOSS, E.; WEICHHREBE; ROSENWINKEL, K.: FOS/TAC: herleitung, methodik, anwendung und aussagekraft. In: *Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 3* (2009), S. 675–682
- [199] URBANCZIK, R.; WAGNER, C.: Functional stoichiometric analysis of metabolic networks. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 21 (2005), Nr. 22, S. 4176–4180. DOI 10.1093/bioinformatics/bti674. – ISSN 1367–4803

- [200] WEINRICH, S.; KOCH, S.; BONK, F.; POPP, D.; BENNDORF, D.; KLAMT, S.; CENTLER, F.: Augmenting Biogas Process Modeling by Resolving Intracellular Metabolic Activity. In: *Frontiers in Microbiology* 10 (2019), S. 973. DOI 10.3389/fmicb.2019.01095
- [201] NOOR, E.; BAR-EVEN, A.; FLAMHOLZ, A.; REZNIK, E.; LIEBERMEISTER, W.; MILO, R.: Pathway thermodynamics highlights kinetic obstacles in central metabolism. In: *PLoS Computational Biology* 10 (2014), Nr. 2, S. e1003483. DOI 10.1371/journal.pcbi.1003483. – ISSN 1553–7358 (Electronic) 1553–734X (Linking)
- [202] SIEBER, J. R.; MCINERNEY, M. J.; PLUGGE, C. M.; SCHINK, B.; GUNSALUS, R. P.: Methanogenesis: Syntrophic Metabolism. In: TIMMIS, Kenneth N. (Hrsg.): *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin and Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2010. – ISBN 978–3–540–77584–3, 978–3–540–77587–4, S. 337–355
- [203] HATTORI, S.; GALUSHKO, A. S.; KAMAGATA, Y.; SCHINK, B.: Operation of the CO dehydrogenase/acetyl coenzyme A pathway in both acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium *Thermacetogenium phaeum*. In: *Journal of Bacteriology* 187 (2005), Nr. 10, S. 3471–3476. DOI 10.1128/JB.187.10.3471–3476.2005. – ISSN 0021–9193 (Print) 0021–9193 (Linking)
- [204] HATTORI, S.: Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. In: *Microbes and Environments* 23 (2008), Nr. 2, S. 118–127. DOI 10.1264/jsme2.23.118. – ISSN 1342–6311