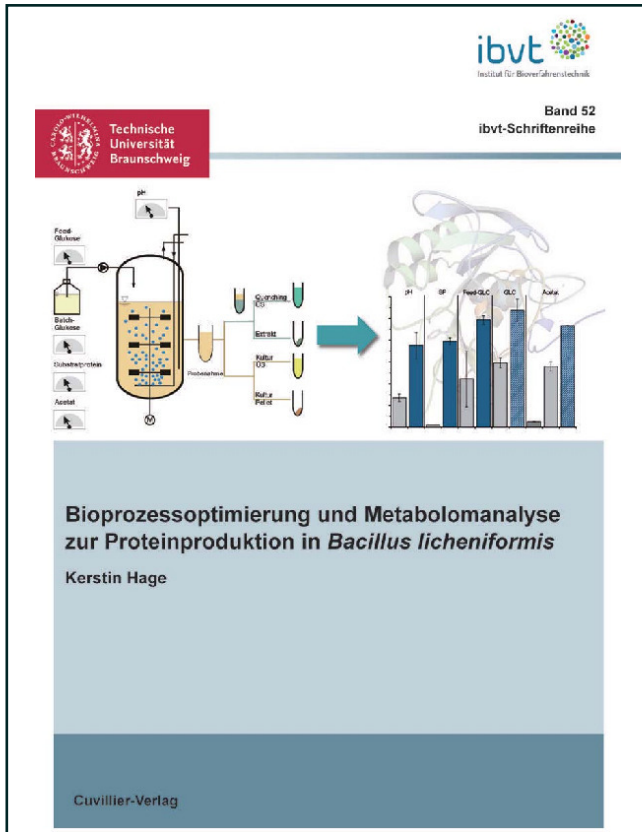




Kerstin Hage (Autor)

# Bioprozessoptimierung und Metabolomanalyse zur Proteinproduktion in *Bacillus licheniformis*



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/538>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XVII
Abkürzungsverzeichnis	XVIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>3</b>
<b>3 Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
3.1 Biologische Grundlagen . . . . .	5
3.1.1 <i>Bacillus licheniformis</i> als Protease-Produzent . . . . .	5
3.1.2 Serin-Proteasen im industriellen Kontext . . . . .	6
3.1.3 Zentralstoffwechsel von <i>Bacillus licheniformis</i> . . . . .	7
3.2 Bioverfahrenstechnische Grundlagen . . . . .	11
3.2.1 Kultivierungstechnik . . . . .	11
3.2.2 Prozessführung . . . . .	11
3.2.3 Kultivierungsparameter im Prozess . . . . .	13
3.2.4 Berechnungsgrundlagen kinetischer Parameter . . . . .	13
3.3 Analytische Grundlagen . . . . .	15
3.3.1 Probenahme und Metabolomanalyse . . . . .	15
3.3.2 Massenspektrometrische Analyse-Verfahren . . . . .	17
3.3.3 Proteinanalytik . . . . .	22
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
4.1 Kultivierungstechnik . . . . .	25
4.1.1 Biologische Systeme . . . . .	25
4.1.2 Medien . . . . .	26
4.1.3 Kultivierungsmethoden . . . . .	28
4.2 Prozessanalytik . . . . .	31
4.2.1 Bestimmung der Substrate . . . . .	32
4.2.2 Bestimmung und Charaktersistierung der Biomasse . . . . .	33
4.2.3 Biomasse und Produkt in Markierungsexperimenten . . . . .	33
4.2.4 Quantifizierung organischer Säuren . . . . .	34
4.3 Metabolomanalyse . . . . .	35
4.3.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie . . . . .	35
4.3.2 Probenahme . . . . .	36
4.3.3 Probenprozessierung . . . . .	36

4.3.4	LC-MS/MS . . . . .	37
4.4	Proteinanalytik . . . . .	38
4.4.1	Aktivitätsbestimmung des Subtilisins . . . . .	40
4.4.2	Subtilisin-Charakterisierung . . . . .	40
<b>5</b>	<b>Etablierung eines Modellprozesses</b>	<b>45</b>
5.1	Modellprozess Variante 1 . . . . .	46
5.1.1	Kultivierung in Komplexmedium . . . . .	46
5.2	Modellprozess Variante 2 . . . . .	49
5.2.1	Kultivierung in Komplexmedium . . . . .	51
5.2.2	Vergleich der Modellprozess-Varianten . . . . .	54
5.3	Kultivierung in verschiedenen Maßstäben . . . . .	56
5.3.1	Sauerstoffbedarf . . . . .	56
5.3.2	Wachstum und Produktbildung . . . . .	58
5.3.3	Anpassung der Sauerstoffversorgung . . . . .	59
5.4	Modellprozess-Übertragung . . . . .	59
5.5	Fazit . . . . .	61
<b>6</b>	<b>Charakterisierung des Substratproteins</b>	<b>63</b>
6.1	Substratprotein-Bestimmung . . . . .	63
6.2	Charakterisierung des Überstandes . . . . .	65
6.2.1	LC-MS/MS-Analytik . . . . .	66
6.2.2	Analysen mittels GC-TOF . . . . .	68
6.3	Kultivierung mit Substratprotein-Überstand . . . . .	70
6.4	Kultivierung mit Substratprotein-Bestandteilen . . . . .	72
6.5	Fazit . . . . .	75
<b>7</b>	<b>Charakterisierung der Zielprotease</b>	<b>77</b>
7.1	Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung . . . . .	77
7.1.1	Enzym-Zusammensetzung in <i>Bacillus licheniformis</i> . . . . .	77
7.1.2	Zusammensetzung des Substratproteins . . . . .	78
7.2	Identifizierung mittels MALDI-TOF . . . . .	80
7.3	Charakterisierung der Proteinformen . . . . .	81
7.4	Quantifizierung mittels LC-MS/MS . . . . .	82
7.5	Fazit . . . . .	85
<b>8</b>	<b>Metabolomanalyse</b>	<b>87</b>
8.1	Minimalmedium . . . . .	88
8.1.1	Etablierung der Metabolomanalyse . . . . .	89
8.1.2	Metabolomanalyse in Minimalmedium . . . . .	91
8.2	Komplexmedium . . . . .	95
8.3	Fazit . . . . .	100
<b>9</b>	<b>Markierungskultivierungen</b>	<b>103</b>
9.1	Kultivierungsparameter . . . . .	103
9.2	Markierungszustände . . . . .	106
9.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse . . . . .	110
9.4	Fazit . . . . .	113

<b>10 Modellprozess-Optimierung</b>	<b>115</b>
10.1 Einfluss der pH-Regelung . . . . .	115
10.2 Einfluss der Substratprotein-Konzentration . . . . .	117
10.3 Einfluss der zudosierten Glukose . . . . .	121
10.3.1 Einfluss von Glukose und Substratprotein . . . . .	124
10.4 Einfluss der vorgelegten Glukose . . . . .	126
10.5 Einfluss der Acetatkonzentration . . . . .	129
10.5.1 Inhibierung . . . . .	129
10.5.2 Reduktion der Acetatkonzentration . . . . .	131
10.6 Kombination optimierter Parameter . . . . .	134
10.7 Fazit . . . . .	135
<b>11 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>139</b>
11.1 Zusammenfassung . . . . .	139
11.2 Ausblick . . . . .	142
<b>Literatur</b>	<b>XXIII</b>
<b>A Etablierung</b>	<b>XXXI</b>
<b>B Substratprotein-Charakterisierung</b>	<b>XXXIII</b>
<b>C Metabolomanalyse</b>	<b>XXXV</b>
C.1 Extrazelluläre Konzentrationen . . . . .	XXXV
C.2 Berechnungsgrundlagen . . . . .	XXXVI
<b>D Markierungsexperimente</b>	<b>XXXIX</b>
<b>E Optimierung</b>	<b>XLI</b>