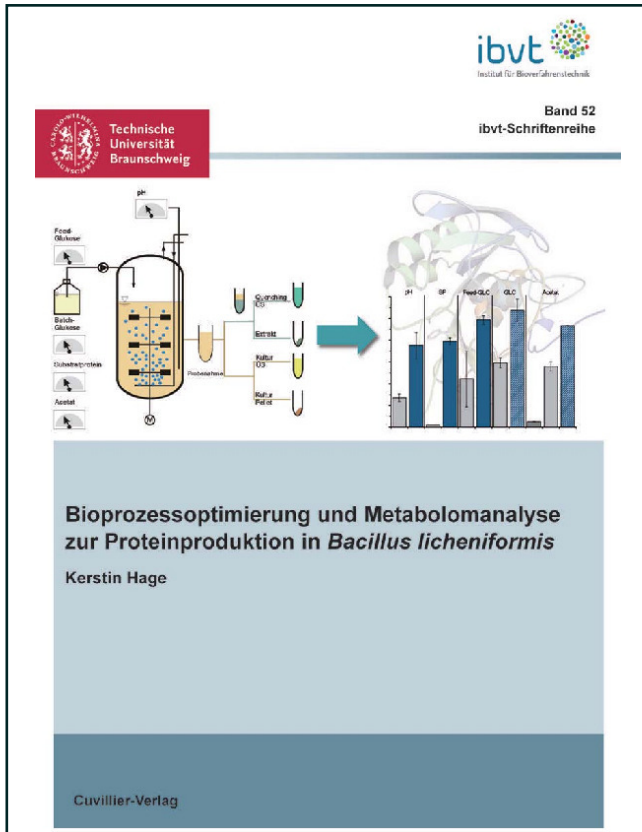




Kerstin Hage (Autor)

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, Website: <https://cuvillier.de>

Kapitel 1

Einleitung

Die Biotechnologie definiert sich als eine kombinierte Anwendung von Natur- und Ingenieurwissenschaften zur Nutzung des natürlichen Potentials von Organismen. Als interdisziplinäre Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts bedient sie sich des Wissens um die allgemeine Biologie, Molekulargenetik, Biochemie, Bioverfahrenstechnik sowie der Bioinformatik.

Die Ursprünge der Biotechnologie gehen bis in die Vorgeschichte zurück, wo bereits die Milchsäure- sowie alkoholische Gärung zur Herstellung von Sauermilchprodukten und Alkohol zum Einsatz kamen. Louis Pasteur legte 1864 bei der mikroskopischen Untersuchung der Wein- und Essigherstellung den Grundstein für diese anwendungsbezogene Wissenschaft. Die zufällige Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1922 führte in den darauffolgenden Jahrzehnten zu einer industriellen Antibiotika-Produktion und der Isolierung von über 1000 verschiedenen Antibiotika [Schmid (2006)]. Seit 1973 gelang es weit über 40 verschiedene gentechnische Therapeutika (Insulin, Faktor VIII, β -Interferon) zuzulassen.

Die fermentative Herstellung von Glycerin und Aceton durch Hefen und Clostridien-Stämme in den 1920er Jahren verhalf der weißen Biotechnologie zu erstem Auftrieb. Diese beschreibt die Produktion von Bulk- und Feinchemikalien, die bis heute mit der biotechnologischen Herstellung von Essig, Aminosäuren, organischen Säuren, Vitaminen, Pharmaka sowie rekombinanten Enzymen auf ein umfangreiches Produktspektrum erweitert werden konnte. Durch die Verwendung biologischer Katalysatoren soll auf diese Weise ein nachhaltiges Wirtschaften durch Regeneration von Rohstoffen ermöglicht werden. Häufig stellt die Biotechnologie dabei eine günstigere und umweltschonendere Alternative zur chemischen Synthese dar.

Die Systembiologie gibt als ein junges, umfangreiches und interdisziplinäres Forschungsgebiet eine ganzheitliche Beschreibung aller Zellfunktionen eines Organismus wider, wobei die Wechselwirkungen zwischen den Genen (Genom), Proteinen (Proteom), der Stoffwechselwege (Metabolom), ihrer Regulationsmechanismen (Transkriptom) und der Stoffflüsse zwischen den Metabolit-Pools (Fluxom) besser verstanden werden sollen [Nöh et al. (2007); Oldiges et al. (2007); Luo et al. (2007); Lee Sang Yup und Yong (2005); Park et al. (2005)]. Anhand der als Metabolomanalyse bezeichneten Untersuchungsmethode soll ein umfangreiches Verständnis des mikrobiellen Stoffwechsels und seiner in vivo Regulation unter

bestimmten Bedingungen erlangt werden. Während sich die Fluxomics (Stoffflussanalyse) mit den Flüssen zwischen verschiedenen Metabolit-Pools in einem biochemischen Netzwerk beschäftigt, liegen bei der Metabolomics die Identifizierung und Quantifizierung der Metabolit-Pools einer Spezies im Fokus [Koffas und Stephanopoulos (2005); Krömer et al. (2005)]. Die einzelnen Disziplinen weisen alle ihre Grenzen auf, da sich Veränderungen in einem Organismus nicht in jeder System-Ebene widerspiegeln. Erst durch die Ergänzung der verschiedenen "omics"-Technologien können durch Synergieeffekte ein besseres Verständnis und ein hoher Informationsgewinn innerhalb eines Organismus erworben werden.

Auf Grundlage dessen können neue Medikamente entwickelt und Ursachen für das Auftreten von Krankheiten aufgeklärt werden. Durch die Komplexität der biologischen Wechselwirkungen sind die Zusammenhänge jedoch noch nicht vollständig erfasst.

Im Gegensatz zu früheren Verfahren, bei denen eine ungerichtete Mutation mit anschließender Selektion stattfand, kann mit Hilfe dieser verschiedenen Technologien eine gezielte und kontrollierte Verbesserung vorgenommen werden, um Merkmale von Mikroorganismen und Zellen zur Herstellung bestimmter Produkte anzupassen.

Durch den Einsatz rekombinanter DNA-Technologien (Metabolic Engineering) kann so beispielsweise eine gerichtete Optimierung des Genoms eines Organismus zur Erweiterung und Verbesserung der Ausbeute erfolgen.

Als eines der Hauptprodukte der biotechnologischen Herstellung können Proteasen angeführt werden, die beispielsweise als Waschmittelzusätze Verwendung finden. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden bereits durch Otto Röhm erstmals Pankreas-Enzyme einem Waschmittel zugesetzt. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden verfügbare alkalische *Bacillus*-Proteasen kontinuierlich weiter entwickelt, so dass sie heute in Mengen von mehr als 10.000 t pro Jahr hergestellt werden.

Waschmittelproteasen müssen an die Bedingungen in einem Waschmittelvorgang optimal angepasst sein. Das bedeutet unter anderem, dass sie unempfindlich gegenüber alkalischen pH-Werten und Temperaturen bis 60 °C sein müssen und geringe Spezifitäten gegenüber Substraten aufweisen müssen. Dabei haben sich ausschließlich Serin-Proteasen aus *Bacillus*-Stämmen durch entsprechende Charakteristika durchgesetzt. Aufgrund seiner effizienten Produktions- und Sekretionsleistung wird das Bodenbakterium *Bacillus licheniformis* seit Jahren in Kultivierungsprozessen insbesondere zur Herstellung von Proteasen der Subtilisin-Gruppe für die Waschmittelindustrie eingesetzt.

Im Rahmen des vorliegenden Promotionsprojektes soll anhand dieses Stammes ein reproduzierbarer Fedbatch-Prozess unter produktionsrelevanten Bedingungen mit prozessbegleitender Analytik etabliert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine effiziente Subtilisin-Produktion nur unter Glukose-Limitierung stattfindet und die Zugabe eines zweiten Substrats in Form eines komplexen Substratproteins erforderlich ist. Eine umfangreiche Analytik soll die Charakterisierung des Organismus während des Prozesses auf Metabolom-Ebene ermöglichen. Darüber hinaus steht die Optimierung verschiedener Kultivierungsparameter zur Steigerung der Effizienz und Produktivität im Fokus der Untersuchungen (Process Engineering).

Kapitel 2

Zielsetzung

Bacillus licheniformis und sein Verhalten als Protease-Produzent stellt im Vergleich zu *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* ein wenig detailliert beschriebenes System dar. In der Vergangenheit wurden *Bacillus licheniformis* und die Optimierung der Subtilisin-Produktion insbesondere auf der Genom-, Proteom- und Transkriptom-Ebene analysiert [Freudl (1992); Veith et al. (2004); Nahrstedt et al. (2005); Voigt et al. (2006)].

Es wurden viele Analysen zur Optimierung von Prozessen zur Aminosäure-Herstellung mittels Prozessoptimierung in Kombination mit dem "Metabolic Engineering" durchgeführt [Oldiges (2004); Oldiges et al. (2007)]. Die Optimierung eines Prozesses zur Protease-Herstellung ist jedoch aufgrund der höheren Komplexität vielschichtiger. Beim Aufbau einer Protease muss neben der Transkription eine ausreichende Verfügbarkeit an Aminosäuren, tRNAs und Energieäquivalente für eine erfolgreiche Translation gewährleistet sein. Darüber hinaus sind die Sekretion des Enzyms in den extrazellulären Raum und die für die Funktion wichtige korrekte Faltung zu berücksichtigen. Eine Untersuchung der Vorgänge des Zentralstoffwechsels, der prozesstechnischen Charakteristika sowie der Verstoffwechslung der Substrate in einem Modellprozess zur Subtilisin-Produktion sind für ein übergreifendes Verständnis des Produktionsprozesses daher unabdingbar.

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit verschiedenen industriellen und universitären Kooperationspartnern durchgeführt, wobei der Fokus dieser Arbeit auf der Bioprozessoptimierung und Metabolomanalyse lag. Übergreifend sollten störende Einflussgrößen und Engpässe durch verschiedene Methoden identifiziert und charakterisiert und so Hinweise für die Optimierung gefunden werden. Dabei ist anzuführen, dass sich durch die Komplexität des Zielprodukts und die Verwendung komplexer Medienbestandteile im Prozess neue Fragestellungen bezüglich des Bedarfs an Aminosäuren und Energieäquivalenten ergaben.

Als ein besonders wichtiges Werkzeug sollten LC-MS/MS-Analysen für verschiedene Anforderungen eingesetzt und neue Methoden etabliert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung sowie Optimierung eines Modellprozesses zur Subtilisin-Produktion in *Bacillus licheniformis* unter Verwendung der Metabolomanalyse und Bioprozessoptimierung. Zur Realisierung dieser Zielsetzung kann die vorliegende Arbeit in die folgenden Aufgabenfelder untergliedert werden:

- *Modellprozess-Etablierung:*
Ziel war es, einen reproduzierbaren Modellprozess zur Subtilisin-Produktion zu etablieren, welcher sich einerseits am Produktionsprozess orientieren und gleichzeitig die Anwendung umfangreicher und vielfältiger Analyseverfahren ermöglichen sollte. Anhand dieses Prozesses unter Verwendung einer komplexen Medienkomponente war eine Charakterisierung der Produkt- und Nebenproduktbildung sowie die Entwicklung einiger Prozessparameter vorzunehmen.
- *Substratprotein-Charakterisierung:*
Das für die Subtilisin-Produktion verwendete komplexe Substratprotein sollte im Prozessverlauf charakterisiert werden. Des Weiteren waren unter anderen GC-TOF sowie LC-MS/MS-Analysen zur Charakterisierung des Substratproteins und seiner löslichen Bestandteile durchzuführen, um Subtilisin-induzierende Verbindungen zu identifizieren.
- *Charakterisierung der Zielprotease:*
Für die Bestimmung möglicherweise limitierender Kohlenstoffverbindungen bei der Subtilisin-Expression und Sekretion sollten zunächst vergleichende Untersuchungen der Aminosäure-Zusammensetzungen vorgenommen werden. Dazu waren die Aminosäure-Zusammensetzungen der Substrate mit denen des Produktes bzw. der Nebenprodukte gegenüberzustellen. Des Weiteren stand die Identifizierung und Quantifizierung des Subtilisins anhand verschiedener Analyse-Werkzeuge im Fokus der Untersuchungen, wobei eine Isolierung und Aufreinigung des Produktenzyms unerlässlich waren.
- *Metabolomanalyse:*
Zur Untersuchung möglicherweise limitierender Metabolite und Aminosäuren bei der Subtilisin-Produktion sollte die Metabolomanalyse bei Verwendung komplexer Medienbestandteile etabliert werden. Des Weiteren waren dabei die Stabilität der Metabolite sowie die Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen an den Modellprozess anzupassen.
- *Markierungsexperimente:*
Aufgrund der Verwendung von Glukose und einer zusätzlichen komplexen Kohlenstoffquelle als zwei verschiedenen Substraten sollten inverse Markierungsexperimente durchgeführt und anhand dieser die Inkorporation der Substrate bzw. Substratbestandteile für Biomasse-, Produkt- und Nebenproduktbildung charakterisiert werden.
- *Optimierung des Modellprozesses:*
Einige Prozessparameter waren hinsichtlich ihrer Einflussmöglichkeiten auf die Subtilisin-Produktion zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere ein Fokus auf der Optimierung der Substratkonzentrationen (Glukose, Substratprotein) liegen sowie gegebenenfalls inhibierende Größen identifiziert und ihr Auftreten nach Möglichkeit verhindert werden.