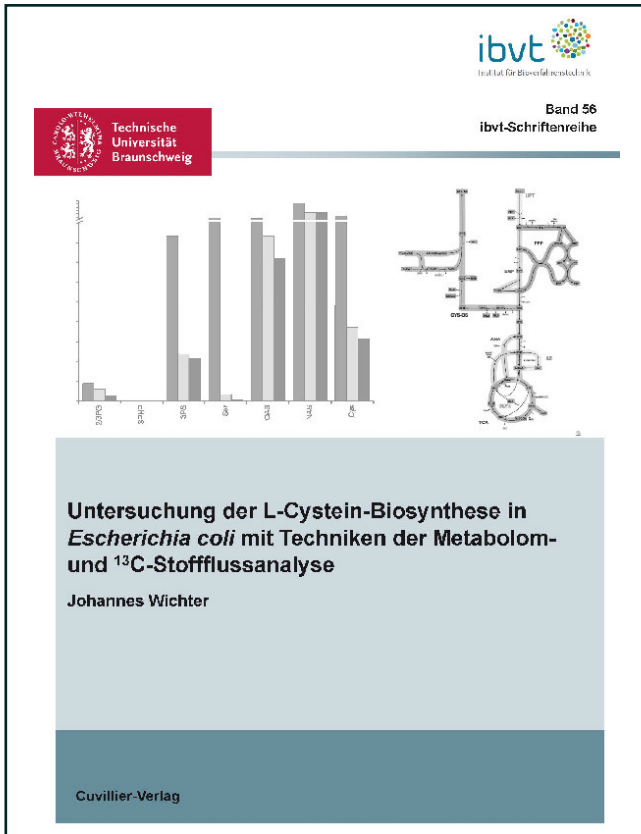




Johannes Wichter (Autor)

Untersuchung der L-Cystein-Biosynthese in *Escherichia coli* mit Techniken der Metabolom- und ^{13}C -Stoffflussanalyse



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/359>

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>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Zielsetzung	11
3	Theoretische Grundlagen	13
3.1	Biologische Grundlagen	13
3.1.1	L-Cystein	13
3.1.2	Industrielle Bedeutung von Cystein	14
3.1.3	Industrielle Herstellung von Cystein	14
3.1.4	<i>Escherichia coli</i>	15
3.1.5	Glucosestoffwechsel in <i>E. coli</i>	16
3.1.6	Biosynthese von Cystein in <i>E. coli</i>	19
3.2	Bioverfahrenstechnische Grundlagen	22
3.2.1	Prozessführung in Bioreaktoren	22
3.2.2	Abgeleitete Einflussgrößen	24
3.2.3	Bilanzierungen	27
3.3	Metabolomanalyse	28
3.4	Analytische Grundlagen	30
3.4.1	Quantifizierung von Cystein mittels Ninhydrintest	30
3.4.2	LC-MS/MS-Analytik	31
3.4.3	Auswertung und Quantifizierung der LC-MS/MS-Messungen ..	33
3.5	Grundlagen der ¹³ C-Stoffflussanalyse	37
4	Material und Methoden	41
4.1	Kultivierung	41
4.1.1	Kulturmedien und Lösungen	41
4.1.2	Verwendete Stämme	43
4.1.3	Kultivierung	44
4.2	Analytik	52

4.2.1	Messung der Cysteinkonzentration (Ninhydrintest).....	52
4.2.2	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	54
4.2.3	Messung der Glucose-Konzentration.....	54
4.2.4	Bestimmung der optischen Dichte.....	54
4.2.5	Methanolisches Quenching und Zellaufschluss.....	54
4.2.6	LC-MS/MS-Analytik.....	56
4.2.7	Interner markierter Standard IDMS.....	57
4.2.8	Auswertung ¹³ C-markierter intrazellulärer Metabolite.....	57
4.2.9	GC-MS Analytik.....	58
4.3	¹³ C-Stoffflussanalyse.....	61
4.3.1	Modellbildung.....	61
4.3.2	Modellvalidierung.....	62
5	Ergebnisse und Diskussion.....	65
5.1	Etablierung des WACKER-Prozesses.....	65
5.1.1	Etablierung der Vorkultur 2 im Bioreaktor.....	65
5.1.2	Etablierung der Hauptkultur im Bioreaktor.....	67
5.1.3	Fazit der Etablierung des WACKER-Prozesses.....	68
5.2	Etablierung der Analytik.....	70
5.2.1	Etablierung des Ninhydrintests.....	70
5.2.2	Etablierung der LC-MS/MS-Analytik.....	72
5.2.3	Interner markierter Standard.....	74
5.2.4	Fazit der Etablierung der Analytik.....	76
5.3	Metabolomanalyse.....	77
5.3.1	Metabolomdaten des Wildtyps.....	77
5.3.2	Metabolomdaten des Stammes CYS1.....	83
5.3.3	Metabolomdaten des Stammes CYS2.....	91
5.3.4	Metabolomdaten des Stammes CYS2 $\Delta pckA \Delta poxB ppsA+$...	97
5.3.5	Fazit aus den Metabolomdaten.....	103
5.3.6	Markierungsexperiment.....	106
5.3.7	Fazit der Metabolomanalyse.....	114
5.4	¹³ C-Stoffflussanalyse.....	117
5.4.1	Prozess Etablierung in der Kleinkulturanlage.....	117
5.4.2	Untersuchung der Medienkomponente CSL.....	118
5.4.3	Vorarbeiten zur ¹³ C-Stoffflussanalyse.....	122
5.4.4	Simulationsergebnis ¹³ C-Stoffflussanalyse Stamm CYS1.....	128
5.4.5	¹³ C-Stoffflussanalyse mit Stamm CYS2 $\Delta sthA$	135
5.4.6	Substratoptimierung.....	142
5.4.7	Fazit der ¹³ C-Stoffflussanalyse.....	145
6	Zusammenfassung.....	149
7	Ausblick.....	153

Literaturverzeichnis	155
Anhang.....	163
Abbildungsverzeichnis	171
Tabellenverzeichnis	177
Abkürzungsverzeichnis	179
Danksagung.....	183