

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Danksagung | I |
| Zusammenfassung..... | II |
| Abstract..... | IV |
| Erklärung wissenschaftlicher Integrität..... | VI |
| Inhaltsverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | XIII |
| 1 Einführung | 1 |
| 1.1 Ziel der Arbeit | 1 |
| 2 Theoretische Grundlagen..... | 3 |
| 2.1 Biokonservierungsmittel..... | 3 |
| 2.2 Antimikrobielle Peptide (AMPs) | 3 |
| 2.2.1 Insektenstämmige AMPs | 5 |
| 2.2.2 Anwendungsgebiete von AMPs | 6 |
| 2.2.3 Herstellung von AMPs..... | 8 |
| 2.3 Rekombinante Proteinproduktion – <i>Upstream Processing</i> | 10 |
| 2.3.1 <i>Kluyveromyces lactis</i> | 11 |
| 2.3.2 Fermentationsmedien aus Nebenströmen..... | 13 |
| 2.3.3 Kultivierung von Mikroorganismen | 17 |
| 2.3.4 Verfahrenstechnische Beschreibung des Bioreaktors | 20 |
| 2.4 Membranfiltration..... | 25 |
| 2.5 Statistische Versuchsplanung für Mischungen..... | 29 |
| 3 Material und Methoden | 36 |
| 3.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Geräte..... | 36 |
| 3.2 <i>Escherichia coli</i> Stämme | 36 |
| 3.3 <i>Kluyveromyces lactis</i> Stamm | 36 |
| 3.4 Kultivierungsmedien..... | 36 |
| 3.4.1 LB und TB-Medium | 36 |
| 3.4.2 YCB + Acetamid-Agar | 36 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 3.4.3 | YPD-Medien | 37 |
| 3.4.4 | YPGal-Medium | 37 |
| 3.4.5 | Nebenstrommedium | 37 |
| 3.4.6 | FM22-Medium..... | 37 |
| 3.5 | Molekularbiologische Arbeiten | 38 |
| 3.5.1 | Erzeugung von linearen DNA-Fragmenten | 38 |
| 3.5.2 | Restriktion und Ligation..... | 39 |
| 3.5.3 | Mutagenese..... | 39 |
| 3.5.4 | Transformation und Plasmid-Vermehrung | 40 |
| 3.5.5 | DNA-Aufreinigung..... | 40 |
| 3.5.6 | Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung | 40 |
| 3.5.7 | Linearisierung von Expressionsplasmiden..... | 41 |
| 3.5.8 | Elektroporation von <i>K. lactis</i> und Selektion | 41 |
| 3.5.9 | Identifizierung von genomischer Mehrfachintegration | 41 |
| 3.5.10 | Bestätigung der Korrektheit der genomischen Integration | 41 |
| 3.6 | Schüttelkolbenkultivierungen | 42 |
| 3.6.1 | Herstellung von Kryokulturen von <i>K. lactis</i> | 42 |
| 3.6.2 | Erzeugung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen | 42 |
| 3.6.3 | Erzeugung von elektrokompenten <i>K. lactis</i> Zellen | 42 |
| 3.6.4 | Kultivierung des nativen und rekombinanten <i>K. lactis</i> | 43 |
| 3.6.5 | Medienentwicklung – Screening und Mischungs-DoE..... | 43 |
| 3.7 | Bioreaktorkultivierungen | 43 |
| 3.7.1 | Bioreaktorvorbereitung..... | 44 |
| 3.7.2 | Herstellung von Krokulturen im MiniBio500 System..... | 45 |
| 3.7.3 | Experimentelle Bestimmung der Sauerstofflöslichkeit | 45 |
| 3.7.4 | Herstellung von Krokulturen im ADI 1030/1035 System | 46 |
| 3.7.5 | Herstellung und Prozessierung von Fermentationsbrühe zur Membranfiltration | 46 |
| 3.8 | Charakterisierung der keramischen Membranfiltration..... | 47 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.8.1 | Filtrationsaufbau und verwendete Membranen..... | 47 |
| 3.8.2 | Berechnung des intrinsischen Membranwiderstands und des irreversiblen Widerstands..... | 48 |
| 3.8.3 | Berechnung des totalen, fouling und reversiblen Widerstandes | 49 |
| 3.8.4 | Membranreinigung | 50 |
| 3.8.5 | Untersuchung der Oberflächenrauigkeit und der Trennschichtdicke von keramischen Membranen..... | 50 |
| 3.8.6 | Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen keramischer Membranen zur Foulinganalyse..... | 51 |
| 3.9 | Analytik..... | 51 |
| 3.9.1 | Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 51 |
| 3.9.2 | Optische Dichte (ΔOD_{600})..... | 51 |
| 3.9.3 | Biotrockenmassebestimmung mittels Heizschrank | 52 |
| 3.9.4 | Bestimmung von Kohlenhydraten, Säuren und Metaboliten..... | 52 |
| 3.9.5 | <i>Primary Amino Nitrogen</i> Assay | 53 |
| 3.9.6 | β -Galaktosidase Assay | 53 |
| 3.9.7 | ELISA | 54 |
| 3.9.8 | SDS-Page | 54 |
| 3.9.9 | Western Blot..... | 54 |
| 3.9.10 | UHPLC | 55 |
| 3.9.11 | MIC-Assay..... | 56 |
| 3.9.12 | Affinitätschromatographie (Ni-IMAC)..... | 57 |
| 3.9.13 | Pufferaustausch mittels Dialyse..... | 59 |
| 3.9.14 | Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz..... | 59 |
| 3.9.15 | Lichtmikroskopische Aufnahmen | 59 |
| 3.9.16 | Größenverteilung von <i>K. lactis</i> | 60 |
| 3.9.17 | Viskosität | 60 |
| 3.9.18 | Massenspektroskopische Untersuchungen von Proteinbanden | 60 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion..... | 61 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.1 | Entwicklung eines Fermentationsmediums auf Basis von agro-industriellen Nebenströmen..... | 62 |
| 4.1.1 | Charakterisierung der Medienkomponenten..... | 62 |
| 4.1.2 | Definierung der Designgrenzen..... | 64 |
| 4.1.3 | Statistisches Mischungsdesign zur Medienentwicklung..... | 67 |
| 4.1.4 | Skalierung des Mediums in den Bioreaktor..... | 73 |
| 4.1.5 | Integration und Einfluss der pH-Regelung..... | 78 |
| 4.1.6 | Sauerstofflöslichkeit des 4x CW-Mediums..... | 82 |
| 4.1.7 | <i>k_{La}</i> -Wert und Sauerstoffbedarf in 4xCW-Medium..... | 84 |
| 4.1.8 | Fazit des Kapitels..... | 88 |
| 4.2 | Untersuchung der rekombinanten Produktion eines Biokonservierungsmittels | 90 |
| 4.2.1 | Auswahl eines AMPs zur rekombinanten Produktion..... | 90 |
| 4.2.2 | Erzeugung des Vektorplasmids pKLAC2_029HG..... | 93 |
| 4.2.3 | Genomische Integration von pKLAC2_29HG in <i>K. lactis</i> | 95 |
| 4.2.4 | Vergleich des Wachstums der <i>K. lactis</i> 029HG Klone..... | 97 |
| 4.2.5 | Vergleich der Produktion der <i>K. lactis</i> 029HG Klone..... | 99 |
| 4.2.6 | Aufreinigung, Pufferaustausch und Aktivität vom chem. syn. AMP 029H | 101 |
| 4.2.7 | Wiederfindung von 029H aus Überständen und frischen Medien..... | 104 |
| 4.2.8 | Wiederfindung von 029H aus prozentualen YPGal-Anteilen..... | 105 |
| 4.2.9 | AMP 029HG Produktion in drei Fermentationsmedien..... | 109 |
| 4.2.10 | Massenspektroskopische Untersuchung von Proteinbanden..... | 110 |
| 4.2.11 | Fazit des Kapitels..... | 116 |
| 4.3 | Biomasseabtrennung mittels keramischer Filtrationsmembran..... | 117 |
| 4.3.1 | Charakterisierung der Fermentationsbrühe zur Filtration..... | 117 |
| 4.3.2 | Beschreibung der Oberflächencharakteristika..... | 119 |
| 4.3.3 | Vergleich der intrinsischen Membranwiderstände..... | 123 |
| 4.3.4 | Filtrationsleistung der Membranen mit Fermentationsbrühe..... | 124 |
| 4.3.5 | Widerstände bei der Filtration von Fermentationsbrühe..... | 126 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.3.6 | Filtrationsverhalten der <i>K. lactis</i> Zellsuspension | 128 |
| 4.3.7 | Filtrationsverhalten des zellfreien Fermentationsüberstands | 131 |
| 4.3.8 | <i>Fouling</i> -Analyse mittels Rasterelektronenmikroskopie | 132 |
| 4.3.9 | Fazit des Kapitels | 135 |
| 5 | Fazit..... | 137 |
| 6 | Ausblick..... | 142 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 144 |
| 8 | Veröffentlichungen | 163 |
| 9 | Anhang | 164 |
| 9.1 | Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte und Software | 164 |
| 9.1.1 | Chemikalien für Medien | 164 |
| 9.1.2 | Weitere verwendete Chemikalien | 165 |
| 9.1.3 | Kits und Enzyme | 166 |
| 9.1.4 | Chromatographiesäulen und Membranen | 167 |
| 9.1.5 | Geräte..... | 168 |
| 9.1.6 | Software | 169 |
| 9.1.7 | pMK_029 Plasmidkarte und Gensequenz | 169 |
| 9.1.8 | pKLAC_029HG Plasmidkarte | 170 |
| 9.1.9 | Schematische Darstellung des MiniBio500 Systems | 171 |
| 9.1.10 | Messprotokoll massenspektroskopische Untersuchungen..... | 171 |
| 9.2 | Anhang Kapitel 4.1 | 173 |
| 9.2.1 | Statistischer Versuchsplan zur Medienentwicklung..... | 173 |
| 9.2.2 | Modellgleichungen und ANOVA - Wachstumsrate innerhalb der ersten 6 h | 173 |
| 9.2.3 | Modellgleichungen und ANOVA - BTM nach 24 h..... | 174 |
| 9.2.4 | Modellgleichungen und ANOVA - Biomassenspezifische β - Galaktosidaseaktivität..... | 175 |
| 9.2.5 | Modellgleichungen und ANOVA - Volumenspezifische β - Galaktosidaseaktivität..... | 175 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|-----|
| 9.2.1 | Rührerdrehzahl, DO-Wert und Begasungsrate in exemplarischer Kultivierung mit 4xCW-Medium | 177 |
| 9.3 | Anhang Kapitel 4.2 | 178 |
| 9.3.1 | Untersuchte antimikrobielle Peptide | 178 |
| 9.4 | Anhang Kapitel 4.3 | 179 |
| 9.4.1 | Gesamtprotein- und ΔOD_{600} -Verläufe der Filtration der Fermentationsbrühe | 179 |
| 9.5 | Abbildungsverzeichnis | 179 |
| 9.6 | Tabellenverzeichnis | 181 |