

**Inhaltsverzeichnis**

Danksagung .....	I
Zusammenfassung .....	II
Abstract .....	IV
Erklärung wissenschaftlicher Integrität .....	VI
Inhaltsverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	XIII
<b>1 Einführung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ziel der Arbeit .....	1
<b>2 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
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
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
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 elektrokompetenten <i>K. lactis</i> Zellen .....	42
3.6.4	Kultivierung des nativen und rekombinannten <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 Kyrokulturen im MiniBio500 System.....	45
3.7.3	Experimentelle Bestimmung der Sauerstofflöslichkeit .....	45
3.7.4	Herstellung von Kyrokulturen im ADI 1030/1035 System .....	46
3.7.5	Herstellung und Prozessierung von Fermentationsbrühe zur Membranfiltration .....	46
3.8	Charakterisierung der keramischen Membranfiltration.....	47

## Inhaltsverzeichnis

---

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 ( $\Delta OD_{600}$ ) .....	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 Assay</i> .....	53
3.9.6	$\beta$ -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>kLa</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

---

	Inhaltsverzeichnis	
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 - Biomassespezifische $\beta$ - Galaktosidaseaktivität .....	175
9.2.5	Modellgleichungen und ANOVA - Volumenspezifische $\beta$ - 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 $\Delta OD_{600}$ -Verläufe der Filtration der Fermentationsbrühe .....	179
9.5 Abbildungsverzeichnis .....	179
9.6 Tabellenverzeichnis.....	181