

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Megasynthasen	3
2.1.1	Polyketidsynthasen	3
2.1.2	Nichtribosomale Peptidsynthasen	4
2.1.2.1	VietABC-Synthase	5
2.2	Modellorganismus <i>Escherichia coli</i>	11
2.3	Kulturmedien	12
2.4	Bioprozesstechnik	13
2.4.1	Satzbetrieb	14
2.4.2	Zulaufverfahren	15
2.5	Statistische Versuchsplanung	16
2.5.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	21
2.5.2	Detektor für geladene Aerosole	24
2.6	Amberlite XAD-16N	25
2.7	Sorptionsisotherme	25
2.7.1	Langmuir Sorptionsisotherme	25
2.7.2	Freundlich Sorptionsisotherme	26
2.7.3	BET Sorptionsisotherme	26
3	Material und Methoden	28
3.1	Materialien	28
3.1.1	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	28
3.1.2	Plasmide	28
3.1.3	Primer	28
3.2	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1	Polymerasekettenreaktion	28
3.2.2	Kolonie-PCR	29
3.2.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	29

3.2.4	Aufreinigung von Plasmiden	29
3.2.5	Restriktionsverdau	30
3.2.6	Gibson Klonierung.....	30
3.3	Mikrobiologische Methoden.....	30
3.3.1	Kulturmedien.....	30
3.3.2	Schüttelkolbenkultivierung.....	31
3.3.3	Reaktorkultivierung	32
3.3.3.1	Reaktorkultivierungen mit Zulaufverfahren	32
3.3.4	Kultivierung auf festen Nährmedien.....	33
3.3.5	Anlegen von Kryokulturen	33
3.3.6	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	34
3.3.7	Transformation von chemisch kompetenten Zellen	34
3.3.7.1	Co-Transformation von chemisch kompetenten Zellen.....	34
3.4	Analytik	35
3.4.1	Messung der optischen Dichte	35
3.4.2	Biotrockenmasse Bestimmung	35
3.4.3	RXP-Analytik.....	35
3.4.4	Succinatanalytik	37
3.4.5	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	37
3.4.6	Gelelektrophorese	38
3.4.7	Nukleinsäuren-Quantifizierung	38
3.5	Aufreinigungsverfahren	38
3.5.1	Zellaufschluss	38
3.5.2	Stabilitätsuntersuchung des RXP bei unterschiedlichen Lagerbedingungen.....	39
3.5.3	Charakterisierung des Adsorberharz Amberlite XAD-16N	39
3.5.4	Untersuchung von Ethanol und Methanol zur Desorption des RXP von XAD-16N 39	
3.5.5	Gradientenelution zur Vorreinigung und Aufkonzentrierung des RXP.....	39
3.5.6	<i>Polishing</i> des RXP	40
3.6	Statistische Versuchsplanung	40

3.6.1	DoE zur Medienentwicklung	40
3.6.2	DoE zur Untersuchung der Induktion.....	40
3.6.3	DoE zur Optimierung der Prozessparameter im Rührkesselreaktor.....	41
3.6.4	DoE zur Methodenentwicklung der RXP-Aufreinigung mittel HPLC.....	41
3.7	Berechnung der Wachstumsrate	41
3.8	Berechnung von Mittelwerten und der Standardabweichung	41
4	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1	RXP-Analytik.....	42
4.2	Austausch des p_{BAD} gegen $pT7/lac$ auf den Plasmiden $pCX71$ und $pACYC$	43
4.3	Expressionsstamm-Screening	46
4.4	Medienentwicklung.....	48
4.5	DoE zur Untersuchung der Induktion.....	69
4.6	Prozessentwicklung und Prozessintensivierung	82
4.6.1	Optimierung der Prozessparameter im Rührkesselreaktor	82
4.6.2	Untersuchung des Einflusses der Sauerstoffsättigung auf die RXP-Produktion 95	
4.7	Entwicklung eines <i>Fed-Batch</i> -Prozesses.....	98
4.8	Isolierung und Aufreinigung des RXP – <i>Downstream processing</i>	106
4.8.1	Produktlokalisierung	106
4.8.2	Nebenprodukte der VietABC-Synthase	106
4.8.3	Stabilitätsuntersuchung des RXP bei unterschiedlichen Lagerbedingungen..	107
4.8.4	Sättigungskonzentration des RXP in $M9_{RXP}$ -Medium.....	109
4.8.5	<i>Capturing</i> des RXP aus einer Fermentationsbrühe	110
4.8.5.1	Vorversuche zur Charakterisierung des Adsorbers XAD-16N.....	110
4.8.5.2	Sorptionsisotherme	111
4.8.5.3	Untersuchung von Ethanol und Methanol zur Desorption des RXP von XAD- 16N	117
4.8.5.4	Gradientenelution zur Vorreinigung und Aufkonzentrierung des RXP.....	118
4.8.6	<i>Intermediate purification</i> des RXP mittels präparativer UHPLC	122
4.8.7	<i>Polishing</i> des RXP	127

5	Fazit und Ausblick	129
6	References.....	131
7	Abbildungsverzeichnis.....	152
8	Tabellenverzeichnis.....	158
9	Anhang.....	164
9.1	Chemikalien	164
9.2	Geräte	166
9.3	<i>E. coli</i> Stämme	168
9.4	Kits.....	168
9.5	Software.....	168
9.6	Primer	169
9.7	Versuchspläne der M9-Medienentwicklung mittels DoE	170
9.8	Versuchsplan zur Untersuchung der Induktion mittels DoE	171
9.9	Versuchsplan zur Optimierung der Prozessparameter im Rührkesselreaktor mittels DoE	172
9.10	Versuchspläne zur Optimierung der Auflösung der präparativen UHPLC-Methode der <i>intermediate purification</i> mittels DoE.....	172