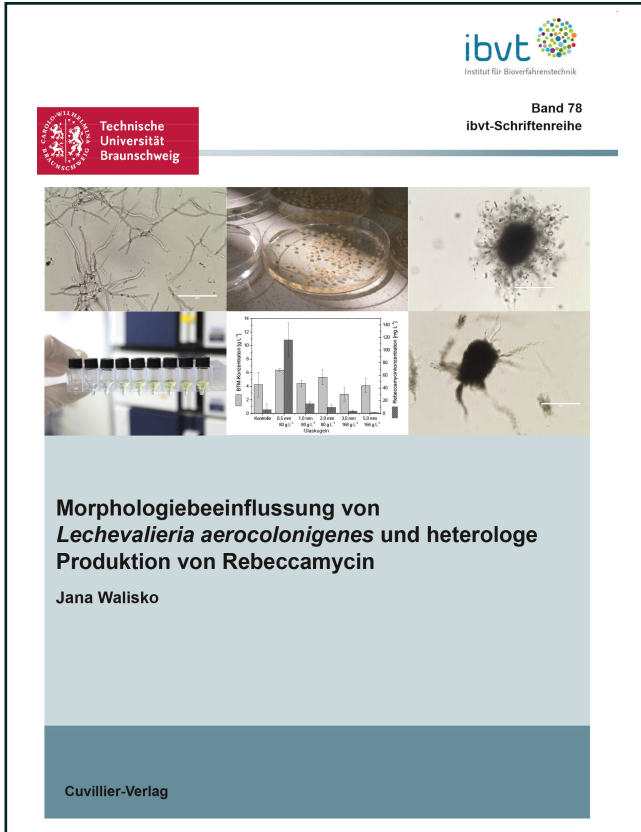




Jana Walisko (Autor)

Morphologiebeeinflussung von *Lechevalieria aerocolonigenes* und heterologe Produktion von Rebeccamycin



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7495>

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 und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	4
2.1	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	4
2.2	Rebeccamycin	4
2.2.1	Biosynthese von Rebeccamycin.....	5
2.2.2	Chemische Synthese.....	7
2.2.3	Produktion von Rebeccamycin	8
2.2.4	Medizinischer Einsatz.....	8
2.3	Morphologie von Prokaryoten.....	9
2.3.1	Entstehung von Morphologie.....	9
2.3.2	Vor- und Nachteile morphologischer Ausprägung.....	12
2.3.3	Morphologiebeeinflussung von filamentösen Mikroorganismem.....	13
2.4	Einsatz von Genapol C 200 als Extraktionsmittel	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Stämme und Plasmide.....	18
3.2	Chemikalien	19
3.3	Kultivierungsmedien	20
3.3.1	Medien für <i>L. aerocolonigenes</i>	20
3.3.2	Medien für <i>E. coli</i>	23
3.3.3	Medium für <i>S. cerevisiae</i>	24
3.3.4	Medium für <i>A. gossypii</i>	24
3.3.5	Medium für <i>C. glutamicum</i>	25
3.4	Kultivierungsmethoden	25
3.4.1	Sporenernte.....	25
3.4.2	Anlegen einer Kryokultur von <i>L. aerocolonigenes</i>	25
3.4.3	Kultivierungen im Biolector	26
3.4.4	Kultivierungen im Schüttelkolben	26



3.4.5	Reaktorkultivierung	28
3.5	Gentechnische Methoden	28
3.5.1	Isolation genomischer DNA aus <i>L. aerocolonigenes</i>	28
3.5.2	Isolation Plasmid-DNA	29
3.5.3	Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter Zellen	29
3.5.4	Herstellung und Transformation elektrokompeter Zellen	30
3.5.5	Klonierung des Rebeccamycinclusters	30
3.5.6	Klonierung der Promotoren des Rebeccamycinclusters	40
3.6	Analytische Methoden	42
3.6.1	Bestimmung der Biotrockenmasse	42
3.6.2	Bestimmung der Zellkonzentration	43
3.6.3	Mikroskopie und Bildanalyse	43
3.6.4	Kryotomschnitte	43
3.6.5	Quantifizierung von Kohlenstoffquellen und Produkten	43
3.6.6	Qualitativer Nachweis von Rebeccamycin mittels LC-MS/MS	45
3.7	Analytische Methoden der Genexpression	46
3.7.1	Transkriptomanalyse	46
3.7.2	Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	47
4	Ergebnisse und Diskussion	51
4.1	Produktion von Rebeccamycin mit <i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	51
4.1.1	Medienscreening	51
4.1.2	Wachstums- und Produktkinetik	60
4.1.3	Einfluss von Mikropartikeln auf Morphologie und Produktivität	63
4.1.4	Einfluss von Makropartikeln durch mechanische Beanspruchung	74
4.2	Heterologe Produktion von Rebeccamycin in <i>Escherichia coli</i>	79
4.2.1	Klonierungsstrategien und –techniken	80
4.2.2	Produktion im Schüttelkolben	83
4.2.3	Produktion im Bioreaktor	84
4.2.4	Analyse der mRNA und qRT-PCR	89
4.2.5	Analyse der Promotorstärke und des genetischen Codes	90



4.3	Aufreinigung hydrophober Produkte mit Genapol.....	93
4.3.1	Einfluss auf verschiedene Mikroorganismen.....	93
4.3.2	Einfluss auf Deoxyviolacein und <i>E. coli</i>	95
4.3.3	Einfluss auf Riboflavin und <i>A. gossypii</i>	102
4.3.4	Einfluss auf Rebeccamycin und <i>L. aerocolonigenes</i>	104
5	Zusammenfassung und Ausblick	107
6	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	111
7	Referenzen.....	113