



## 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