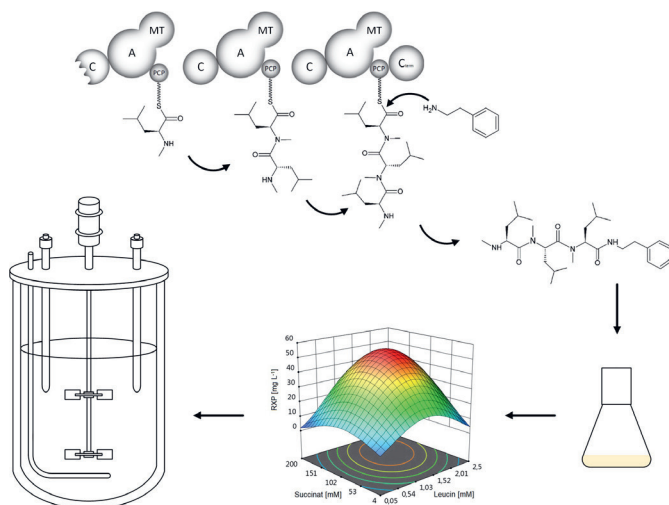


Arne Michael Oestreich

Prozessentwicklung und Prozessintensivierung zur fermentativen Produktion eines nichtribosomalen Peptides mittels einer multifunktionalen Megasyntase



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie | Band 26

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Cermak

**Prozessentwicklung und Prozessintensivierung zur
fermentativen Produktion eines nichtribosomalen Peptides
mittels einer multifunktionalen Megasyntase**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

Arne Michael Oestreich

Geboren am 06.07.1986 in Gießen

Gießen 2022

Erstgutachter:

Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie

Fachbereich Life Science Engineering

Technische Hochschule Mittelhessen

Honorarprofessor

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Helge Björn Bode

Institut für Molekulare Biowissenschaften

Fachbereich Biowissenschaften

Goethe Universität Frankfurt

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 26

Arne Michael Oestreich

**Prozessentwicklung und Prozessintensivierung
zur fermentativen Produktion eines
nichtribosomalen Peptides mittels einer
multifunktionalen Megasyntase**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Düren 2023

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2022

Copyright Shaker Verlag 2023

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-8969-1

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Und wenn du lange in [ein Mikroskop] blickst, blickt [das Mikroskop] auch in dich hinein.

Abgewandelt nach Friedrich Nietzsche

Jenseits von Gut und Böse

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak, für die Betreuung meiner Promotion sowie allen anderen wissenschaftlichen Arbeiten, die hervorragende fachkundige Unterstützung, die beständige Zuverlässigkeit und den Rückhalt, die Schaffung von Freiräumen und die damit einhergehende Möglichkeit zur wissenschaftlichen Entfaltung durch Bereitstellung von technologisch herausragend ausgestatteten Laboratorien, die dafür benötigte monetäre Akquise und die Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen.

Prof. Dr. rer. nat. Helge Björn Bode danke ich für die Koordination des MegaSyn-Projekts, die wissenschaftliche Unterstützung, die Bereitstellung von Expressionsstämmen und Vektoren und die Übernahme des Zweitgutachters.

Dr. rer. nat. Rong Fan, Dr. Doreen Gerlach und Dr.-Ing. Tobias Weidner danke ich für die sachkundige Unterstützung und die anregenden Diskussionen während meiner Arbeit am Institut.

Eine besondere Freude war für mich die Betreuung der Abschlussarbeiten von Merlinda Ilire Suli, Sebastian Reinhardt und Julia Bitter, denen ich für ihren enormen Beitrag zu der vorliegenden Dissertation danke.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Institutsmitgliedern für die freundliche Zusammenarbeit und die Unterstützung während der Promotion.

Des Weiteren danke ich Hanna Dambeck und Hans-Jürgen Oestreich für die Rechtschreibprüfung der vorliegenden Arbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mich während meines Schaffens unterstützt haben. Besonders danke ich meiner Familie, die stets eine Quelle der Motivation für mich war und mit viel Geduld und Verständnis meine Abwesenheit an langen Arbeitstagen akzeptiert hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Arne Michael Oestreich, geboren am 06.07.1986 in Gießen, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Prozessentwicklung und Prozessintensivierung zur fermentativen Produktion eines nichtribosomalen Peptides mittels einer multifunktionalen Megasynthase“

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Alle aus veröffentlichten Schriften wörtlich oder sinngemäß übernommene Textstellen sind als Zitate im Text gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis angegeben. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware erkläre ich mich einverstanden.

Wettenberg, 22.01.2023

Arne Michael Oestreich

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein fermentativer Prozess zur Produktion eines nichtribosomalen Peptids (Rhabdopeptid – RXP) sowie ein dazugehöriges Aufreinigungsverfahren entwickelt. Als Basis der Prozessentwicklung wurde ein Promotor- und Expressionsstamm-Screening durchgeführt. Dabei erwies sich der Stamm *Escherichia coli* DH10 β in Verbindung mit einem Arabinosepromotor zur Regulierung der Expression der VietABC-Synthase als vielversprechender Produktionsstamm. Die statistische Versuchsplanung war ein wiederkehrendes Element, das in Form von Screenings zur Bestimmung von signifikanten Einflussfaktoren und der Optimierung von Prozessen mittels Wirkungsflächenversuchsplänen genutzt wurde. Darunter die Entwicklung eines chemisch definierten Mediums, das im Schüttelkolbenmaßstab eine höhere Produktkonzentration lieferte, als Kultivierungen mit LB-Medium. Teil der Medienentwicklung war ein Kohlenstoffquellen-Screening, das entscheidend für die Leistung des Mediums war, da Glycerin oder ein Intermediat des Glycerinmetabolismus die Aktivität der VietABC-Synthase hemmt. Basierend auf einer Aminosäureanalytik von Prozessen mit Komplexmedium wurden Intermediate der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus identifiziert, die sich weniger hemmend auf die Aktivität der Synthase auswirkten. Darunter Succinat, das verglichen mit Glycerin die ~5-fache RXP-Konzentration im chemisch definierten Medium lieferte und als alleinige Kohlenstoffquelle verwendet wurde. Resultat der Medienentwicklung war eine Steigerung der RXP-Konzentration von $2,73 \pm 0,83 \text{ mg L}^{-1}$ des initialen M9-Mediums auf $55,9 \pm 3,93 \text{ mg L}^{-1}$ des zur RXP-Produktion optimierten M9_{RXP}-Mediums. Des Weiteren wurden mittels statistischer Versuchsplanung die Expression und die Aktivität der VietABC-Synthase untersucht sowie die Prozessparameter im Rührkesselreaktor optimiert. Es stellte sich heraus, dass die Aktivität der Synthase im Allgemeinen hoch war, wenn wachstumsinhibierende Konditionen bei den Kultivierungen herrschten. Die Untersuchung der Prozessparameter zeigte, dass die optimale Temperatur für die Produktion deutlich unterhalb der Temperatur lag, die für Kultivierungen mit *E. coli* üblich ist. Die RXP-Konzentration mit dem M9_{RXP}-Medium konnte im Rührkesselreaktor, verglichen mit den Schüttelkolbenkultivierungen, mehr als verdoppelt werden. Unter Berücksichtigung prozesstechnischer Vor- und Nachteile wurden bei der Optimierung des *Batch*-Prozesses mehrere Zielgrößen betrachtet. Zum einen die Optimierung der Produktkonzentration, die $126,07 \pm 14,28 \text{ mg L}^{-1}$ erreichte und zum anderen die Optimierung der Raumzeitausbeute, die eine etwas geringere Produktkonzentration von $117 \pm 6,63 \text{ mg L}^{-1}$ lieferte, aber mit einer Reduktion der Prozessdauer von ~25% verbunden war. Der Prozess mit der optimierten Raumzeitausbeute bei 29 °C und pH 7 wurde als Basis für die Entwicklung eines Zulaufverfahrens genutzt. Der finale Prozess im *Fed-Batch*-Modus erreichte eine Produktkonzentration von $309 \pm 54,13 \text{ mg L}^{-1}$ und übersteigt vergleichbare Prozesse mit *Escherichia coli* in chemisch definiertem Medium um ein Vielfaches. Unter

Verwendung eines chemisch definierten Mediums konnte die Produktkonzentration durch prozesstechnische Maßnahmen um mehr als das 110-fache gesteigert werden. Zusätzlich wurde eine *in situ* Produktabtrennung in den Prozess integriert, die den Aufwand des Aufreinigungsprozesses reduzierte. Dazu wurde das Produkt über einen Bypass mit Amberlite XAD-16N aus dem Prozess isoliert. Der zugrunde liegende physikalische Adsorptionsprozess und die Kapazität des Adsorbers wurden im Rahmen der Isolierung des RXP durch Sorptionsisotherme charakterisiert. Regressionsanalysen verschiedener Sorptionsisothermenmodelle zeigten, dass das Modell nach Freundlich die geringste Chi-Quadrat-Verteilung aufwies. Somit wurde angenommen, dass es sich aufgrund von Kondensation um eine Multilayer-Adsorption handelt. Darüber hinaus wurde die Desorption des Produkts mit Methanol und Ethanol untersucht. Ethanol wurde aufgrund der geringeren Toxizität und der einfacheren Handhabung verwendet, um mit linearem Gradient und verschiedenen Kombinationen an Stufengradienten hydrophile und schwach hydrophobe Verunreinigungen vom RXP abzutrennen. Die Elution mit einem Stufengradient führte zu einer ~7-fachen Aufkonzentrierung des Produkts. Aufgrund der physikalischen und chemischen Eigenschaften waren die meisten untersuchten Aufreinigungsverfahren, darunter Größenausschluss-, Ionenaustausch- und Hydrophobeinteraktionschromatographie, ungeeignet das RXP und die Nebenprodukte der VietABC-Synthase voneinander zu trennen. Das einzige Verfahren mit ausreichender Selektivität war die präparative UHPLC. Dabei wurde die Auflösung mittels statistischer Versuchsplanung auf $2,36 \pm 0,02$ gesteigert. Als Resultat der hohen Auflösung konnte das Produkt nahezu vollständig wiedergewonnen werden, was dazu führte, dass nach dem finalen Prozessschritt der Aufreinigung $81,7 \pm 8,4\%$ des Produkts mit hoher Reinheit isoliert werden konnten.

Abstract

In the present work, a fermentative process for the production of a nonribosomal peptide (rhabdopeptide - RXP) and an associated purification procedure were developed. As a basis for the process development, a promoter and expression strain screening was conducted. Thereby, the strain *Escherichia coli* DH10 β in combination with an arabinose promoter to regulate the expression of VietABC synthase, proved to be a promising production strain. Design of experiment was a recurring element, used in the form of screenings to determine significant influencing factors and optimize processes using response surface methodology. Among these was the development of a chemically defined medium, which provided a higher product concentration than cultivations using LB medium in shake flask scale. Part of the medium development was a carbon source screening, which was critical to the performance of the medium because glycerol or an intermediate of glycerol metabolism inhibits VietABC synthase activity. Based on amino acid analysis of processes with complex medium, intermediates of glycolysis and citric acid cycle were identified, which had less inhibitory effect on synthase activity. Among these was succinate, which provided ~5-fold RXP concentration in the chemically defined medium compared to glycerol and was used as the sole carbon source. The result of the medium development was an increase in RXP concentration from $2.73 \pm 0.83 \text{ mg L}^{-1}$ of the initial M9 medium, to $55.9 \pm 3.93 \text{ mg L}^{-1}$ of the M9_{RXP} medium optimized for RXP production. Furthermore, the expression and activity of VietABC synthase were investigated and the process parameters were optimized in stirred tank reactors, by statistical experimental designs. It was found that the activity of the synthase was generally high when growth inhibitory conditions prevailed in the cultivations. Examination of the process parameters showed that the optimal temperature for production was considerably lower than the temperature commonly used for cultivating *Escherichia coli*. The RXP concentration was more than doubled in the stirred tank reactor compared to the shake flask cultivations with the M9_{RXP} medium. Several target parameters were examined in the optimization of the batch process. One was the optimization of the product concentration which reached $126.07 \pm 14.28 \text{ mg L}^{-1}$ and the other was the optimization of the space-time yield, which provided a slightly lower product concentration of $117 \pm 6.63 \text{ mg L}^{-1}$ but was associated with a reduction in process time of ~25%. The process with the optimized space-time yield at 29 °C and pH 7 was used as the basis for developing a fed-batch process. The final fed-batch process achieved a product concentration of $309 \pm 54.13 \text{ mg L}^{-1}$, which is several times higher than comparable processes using *Escherichia coli* in chemically defined medium. Overall the product concentration in a chemically defined medium was increased more than 110-fold by process engineering measures. In addition, an *in situ* product separation was integrated into the process, which reduced the effort of downstream processing. For this purpose, the product was isolated from the process via a bypass using Amberlite XAD-16N. The underlying physical

adsorption process and the capacity of the adsorber were characterized by sorption isotherms as part of the isolation of the RXP. Regression analyses of different sorption isotherm models showed that the Freundlich model had the lowest chi-square distribution. Thus, it was assumed to be multilayer adsorption due to condensation. In addition, the desorption of the product with methanol and ethanol was investigated. Ethanol was used due to its lower toxicity and easier handling to separate hydrophilic and weakly hydrophobic impurities with linear gradient and various combinations of step gradients. Elution with a step gradient resulted in ~7 fold increase of product concentration. Due to the physical and chemical properties, most of the purification methods investigated, including hydrophobic interaction chromatography, ion exchange chromatography, and size exclusion chromatography, were unsuitable to separate the RXP from the byproducts of the VietABC synthase. The only method with sufficient selectivity was preparative UHPLC. Here, the resolution was increased to 2.36 ± 0.02 using a statistical experimental design. As a result of the high resolution, the product was almost completely recovered during intermediate purification, resulting in $81.7 \pm 8.4\%$ of the product being recovered in high purity after polishing.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
ACP	Acylträgerprotein (<i>Acyl-Carrier-Protein</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BET	Brunauer, Emmett & Teller
BTM	Biotrockenmasse
CAD	Detektor für geladene Aerosole (<i>charged aerosol detector</i>)
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CoA	Coenzym A
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
Da	Dalton
df	Freiheitsgrad (<i>degrees of freedom</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Gelöstsauerstoff (<i>dissolved oxygen</i>)
DoE	Statistische Versuchsplanung (design of experiments)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>good manufacturing practice</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
KS	Ketoacylsynthase
KR	Ketoreduktase
LB	Lysogeny Broth
LOF	Anpassungsmangel (<i>lack of fit</i>)
m-RNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MT	Methyltransferase
NP	Normalphase
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthase
OD	Optische Dichte
OFAT	Ein Faktor nach dem Anderen (<i>one factor at a time</i>)

Abkürzung	Bedeutung
PCP	Peptidylträgerprotein (<i>Peptidyl-Carrier-Protein</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEA	Phenethylamin
PKS	Polyketidsynthase
ppan	Phosphopantethein
PPTase	Phosphopantetheintransferase
RXP	Rhabdopeptid
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reverse phase</i>)
RSM	Wirkungsflächenmethode (<i>response surface methodology</i>)
TB	Terrific Broth
TE	Thioesterase
TRA	Tryptamin
t-RNA	Transferribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
TYA	Tyramin
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>ultra high performance liquid chromatography</i>)
ΔOD_{600}	Optische Dichte der Zellmasse

Notation

Bei den verwendeten Einheiten kann eine anwendungsbezogene Abweichung zu SI-Basiseinheiten vorliegen. Dabei treten hauptsächlich Dezimalpräfixe von SI-Einheiten auf.

Zeichen	Bezeichnung	Einheit
A	Streudiffusionskoeffizient	[m]
Adjusted R ²	Angepasstes Bestimmtheitsmaß	
B	Longitudinaldiffusionskoeffizient eluierender Partikel	[m ² s ⁻¹]
c	Konzentration	[g L ⁻¹]
C	Massentransferwiderstandskoeffizient eines Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase	[s]
C _{BET}	BET-Sorptionskoeffizient	[L mg ⁻¹]
C _{eq}	Gleichgewichtskonzentration	[mg L ⁻¹]
C _F	Substratkonzentration im <i>Feed</i>	[g L ⁻¹]
C _s	Sättigungskonzentration	[mg L ⁻¹]
F	Fluss	[L h ⁻¹]
F _s	Anzahl der Versuche eines Screenings	
HETP	Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens	[m]
k	Kapazitätsfaktor	
k _v	Anzahl der unabhängigen Variablen	
K _F	Freundlich-Sorptionskoeffizient	[mg g ⁻¹]
K _L	Langmuir-Sorptionskoeffizient	[L mg ⁻¹]
K _s	Affinitätskonstante	[g L ⁻¹]
L	Länge	[m]
m	Masse	[g]
m _E	Erhaltungsstoffwechsel	[g g ⁻¹ h ⁻¹]
m _i	Anzahl der Niveaus eines Versuchsplans	
m _s	Massenstrom	[g h ⁻¹]
n	Anzahl von Stichproben	
n _F	Adsorptionsintensität nach Freundlich	
n _i	Anzahl der Beobachtungen eines Versuchsplans	
n _s	Anzahl der Versuche eines Screenings	
N	Anzahl der theoretischen Böden	
N _s	Anzahl der Niveaus eines Screenings	
p _i	Anzahl der Terme eines Modells	
Predicted R ²	Vorhergesagtes Bestimmtheitsmaß	
PRESS	Quadrate des Vorhersagefehlers	

Zeichen	Bezeichnung	Einheit
q	Beladung	$[\text{mg g}^{-1}]$
q_{max}	Maximale Beladung	$[\text{mg g}^{-1}]$
q_{monomax}	Maximale Beladung des Monolayers	$[\text{mg g}^{-1}]$
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit	$[\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}]$
r_s	Substratverbrauchsgeschwindigkeit	$[\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}]$
R_s	Auflösung	
r_x	Wachstumsgeschwindigkeit	$[\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}]$
R^2	Bestimmtheitsmaß	
s	Substratkonzentration	$[\text{g L}^{-1}]$
S	Substratmasse	$[\text{g}]$
SS_E	Fehlerquadratsumme	
SS_{LoF}	Quadratsumme des Anpassungsmangels	
SS_{Model}	Quadratsumme des Modells	
SS_{PE}	Quadratsumme des reinen Fehlers	
SS_{Total}	Gesamte Quadratsumme	
t	Zeit	$[\text{h}]$
t_R	Retentionszeit	$[\text{min}]$
t'_R	Reduzierte Retentionszeit	$[\text{min}]$
t_{tot}	Totzeit	$[\text{min}]$
v	Laufmittelgeschwindigkeit	$[\text{m s}^{-1}]$
V	Volumen	$[\text{L}]$
V_{IF}	Reaktorvolumen beim Start der Fütterung	$[\text{L}]$
w	Peakbreite an der Basis	$[\text{min}]$
x	Biomassekonzentration	$[\text{g L}^{-1}]$
X	Biomasse	$[\text{g}]$
x_i	Unabhängige Variable i	
x_i^2	Quadratische unabhängige Variable i	
x_j	Unabhängige Variable j	
x_{IF}	Biomassekonzentration beim Start der Fütterung	
$X_1 - X_n$	Einflussfaktoren eines Versuchsplans	
$\bar{y}$	Arithmetisches Mittel der betrachteten Zielgröße	
y_i	Ausprägung einer Stichprobe	
$\bar{y}_i$	Mittelwert von Replikaten bei identischen Niveaus	
$\hat{y}_i$	Geschätzter Wert des Modells beim Niveau i	
y_{ij}	Replikat der Zielgröße bei individuellen Niveaus	
$Y_{x/s}$	Substratausbeutekoeffizient der Biomasse	$[\text{g g}^{-1}]$

Zeichen	Bezeichnung	Einheit
α	Selektivität	
ε	Residuen	
Δt	Zeitdifferenz	[h]
μ	Wachstumsrate	[h ⁻¹]
$\mu_{\max}$	Maximale Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_{set}	Eingestellte Wachstumsrate	[h ⁻¹]
β_0	Arithmetisches Mittel der betrachteten Zielgröße aller Versuche	
β_i	Regressionskoeffizient eines linearen Faktors	
β_{ji}	Regressionskoeffizient eines quadratischen Faktors	
β_{ij}	Regressionskoeffizient der Interaktion der Faktoren i und j	

Publikationen

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in Open-Access-Medien oder in Form von Konferenzbeiträgen veröffentlicht.

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

A.M. Oestreich, M.I. Suli, D. Gerlach, R. Fan und P. Czermak. Media development and process parameter optimization using statistical experimental designs for the production of nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. Electronic Journal of Biotechnology 2021, 52. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.05.001> [1].

A.M. Oestreich, S. Reinhardt, D. Gerlach, R. Fan und P. Czermak. Isolation and Purification of a Hydrophobic Nonribosomal Peptide from an *Escherichia coli* Fermentation Broth. Separations 2021, 8, 241. <https://doi.org/10.3390/separations8120241> [2].

Mündliche Konferenzbeiträge:

A.M. Oestreich, J. Bitter, D. Gerlach und P. Czermak. Recombinant production of multifunctional mega-synthases for nonribosomal peptide synthesis in *Escherichia coli*, Frankfurt am Main, ACHEMA 2018.

Poster:

A.M. Oestreich, D. Gerlach, T. Weidner und P. Czermak. Process development and process intensification for the production of polyketides and nonribosomal peptides via multifunctional mega-synthases, Straubing, Summer School: Synthetic Biology, Current concepts and tools for strain development 2017.

A.M. Oestreich, J. Bitter, D. Gerlach und P. Czermak. Process Design for Recombinant Expression of Nonribosomal Peptide Synthases as Factories of Potential Biomolecules, Frankfurt am Main, European Conference on Natural Products 2018.

A.M. Oestreich, M.I. Suli, D. Gerlach, R. Fan und P. Czermak. Design of Experiment supported Media Development and Process Parameter Optimization for nonribosomal Peptide Production in *Escherichia coli*, online, European Federation of Biotechnology 2021.

Nutzungsrechte von veröffentlichten Inhalten

Daten, Figuren und Tabellen, die in den genannten Open-Access-Medien veröffentlicht wurden, dürfen ohne gesonderte Lizenzierung für die vorliegende Dissertation, in gedruckter oder digitaler Form, verwendet werden. Eine Veränderung der genannten Inhalte, inklusive der Übersetzung in die deutsche Sprache bzw. Schrift, ist damit eingeschlossen. Dies geht aus den Lizenzvereinbarungen von Electronic Journal of Biotechnology (Elsevier) und Separations (MDPI) hervor.

Nutzungsrechte von Auftragsarbeiten

Abbildung 2: Schematische Darstellung des symbiotischen Infektionszyklus einer Insektenlarve durch die entomopathogene Nematode *Steinernema sangi* und das Bakterium *Xenorhabdus vietnamensis* mit dem Tod der Larve 48 – 72 h nach dem Befall, wurde von einem Illustrator als Auftragsarbeit angefertigt, der mit folgendem Schreiben die Nutzung der Abbildung im Rahmen der Dissertation erlaubt:

Hiermit räume ich, Dennis Seng, Herrn Arne Oestreich sämtliche nichtkommerziellen Nutzungsrechte an der von mir angefertigten Illustration „Infektionszyklus einer Insektenlarve [...]“ ein.

In der Zeichnung zu sehen ist eine nicht näher bezeichnete Larve und dieselbe Larve nach ihrem Ableben (im Comicstil dargestellt), aus welcher Würmer austreten. Diese sind, mit der Bezeichnung „Nematode *Steinernema sangi*“, vergrößert in der Bildmitte zu sehen. Eine weitere Vergrößerung zeigt, mit der Bezeichnung „Bakterium *Xenorhabdus vietnamensis*“ zwei Bakterien, welche im Verdauungstrakt der Nematode zu erkennen waren.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'D.' followed by a long, sweeping horizontal line that ends in a small hook.

Dennis Seng

Betreuung von Abschlussarbeiten

Teile der im Folgenden gezeigten Ergebnisse sind im Rahmen von studentischen Abschlussarbeiten erzeugt worden. Konzeptionierung und Planung der Versuche, Auswertung und Validierung von Ergebnissen sowie deren Visualisierung stammen von Arne Michael Oestreich. Die Analytik und die praktischen Arbeiten wurden von den genannten Studenten und teilweise von Arne Michael Oestreich durchgeführt.

Bachelorarbeit von Julia Bitter

“Rekombinante Produktion einer nichtribosomalen Peptidsynthetase in verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen“

Bachelorarbeit von Sebastian Reinhardt

“Prozessentwicklung zur Aufreinigung eines nichtribosomalen hydrophoben Peptids aus einer Fermentationsbrühe von *Escherichia coli* DH10β“

Bachelorarbeit von Merlinda Ilire Suli

“Prozessentwicklung zur Produktion eines nichtribosomalen Peptids in *Escherichia coli* mittels statistischer Versuchsplanung“

Forschungs- und Entwicklungsprojekt von Merlinda Ilire Suli

“Expression und Aufreinigung nichtribosomaler Peptidsynthasen in *Escherichia coli* zur zellfreien Synthese eines nichtribosomalen Peptids“

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Megasyntasen	3
2.1.1	Polyketidsyntasen	3
2.1.2	Nichtribosomale Peptidsyntasen	4
2.1.2.1	VietABC-Synthase	5
2.2	Modellorganismus <i>Escherichia coli</i>	11
2.3	Kulturbedien	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