

Claudia Wilkens

Entwicklung eines hocheffizienten Verfahrens zur fermentativen Herstellung und Immobilisierung rekombinanter Isomaltulose-Synthase

Dissertation



Cuvillier Verlag Göttingen

Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Entwicklung eines hocheffizienten Verfahrens zur fermentativen Herstellung und Immobilisierung rekombinanter Isomaltulose-Synthase

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Claudia Wilkens
aus Hannover

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2009

978-3-86955-108-1

1. Referent:	Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop
2. Referent:	apl. Professor Dr. Siegmund Lang
eingereicht am:	22.06.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am:	12.10.2009

Druckjahr 2009

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2009

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-108-1

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des interessanten Themas und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen. Seine fortwährende Diskussionsbereitschaft, sein stetes Interesse an der Arbeit, und seine vielen hilfreichen Anregungen haben wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Willke für seine Unterstützung bei analytischen Fragestellungen und bei der Onlineverschaltung des Fermentersystems.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Milada Schubert bedanken, die mir während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie hat mich mit zahlreichen ergiebigen Diskussionen und mit vielfältigen Anregungen und Ideen unterstützt.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Ava Prieß für ihre Mitarbeit im Labor.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Agrartechnologie des Johann Heinrich von Thünen-Instituts Braunschweig für das überdurchschnittlich nette Arbeitsklima, die vielseitigen Hilfestellungen, für die Diskussion der Ergebnisse und für die Motivation während der gesamten Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Anja Kuenz, Frau Dr. Tanja Hartwich, Herrn Dipl.-Biotechnol. Claus Decker, Frau Dr. Wibke Hußmann, Frau Dipl.-Biotechnol. Anne Ringel, Frau Diana Böttcher, Herrn Dipl.-Biol. Hendrik Krauter, Frau Dipl.-Biotechnol. Susann Baumert und Frau Dipl.-Biotechnol. Katrin Riedmann.

Der Südzucker AG und dem BMELV danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie für ihre große Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Schließlich möchte ich Herrn Dipl.-Biotechnol. Erik Mildner für seine Unterstützung, sein Verständnis und die unendliche Geduld danken, die mir vor allem im letzten halben Jahr sehr viel Kraft gegeben hat.

Zusammenfassung

Das Zuckerkonsumverhalten der Verbraucher hat sich durch die neuen Ernährungstrends *Functional* und *Wellness Food* deutlich gewandelt. Die Nachfrage nach Zuckeraustauschstoffen ist in den letzten Jahren extrem gestiegen. Isomaltulose, ein Isomer der Saccharose, ist ein zahnfreundlicher Zucker mit niedrigem Glykämischen Index, aus dem im industriellen Maßstab der kalorienreduzierte Zuckeralkohol PalatinitTM hergestellt wird. Darüber hinaus kann Isomaltulose als regenerativer Ausgangsstoff für die chemische Industrie verwendet werden. Isomaltulose wird durch enzymatische Konversion aus Saccharose gewonnen. Das für die Isomerisierung verantwortliche Enzym ist die Isomaltulose-Synthase (Pall-Enzym).

Ziel dieser Arbeit war die Bioprozessoptimierung zur Herstellung von Isomaltulose mittels rekombinanter Isomaltulose-Synthase von der fermentativen Enzymproduktion bis zum industriell einsetzbaren Enzymimmobilisat. Zur Optimierung der heterologen Enzymbildung wurde ein für den industriellen Prozess geeigneter robuster Expressionsstamm ausgewählt und anschließend das Scale up der Kultivierung vom Schüttelkolben- in den 10-L-Fermentationsmaßstab durchgeführt. Da eine konventionelle Prozessführung zu keiner ausreichenden Enzymexpression führte, wurde ein neues, erfolgreiches Zwei-Phasen-Fermentationsverfahren entwickelt, das durch Steuerung der Sauerstoffversorgung der Zellen eine hohe Biomassebildung und heterologe Enzymproduktion ermöglichte. Mit Hilfe dieser Zwei-Phasen-Fermentationsstrategie wurden 12 g/L Biotrockenmasse und 1,6 g/L hoch aktive Isomaltulose-Synthase produziert.

Zur Stabilisierung des Enzyms für den industriellen Einsatz wurde die Isomaltulose-Synthase durch Quervernetzung und Matrixeinschluss in LentiKats[®] immobilisiert. In den LentiKats[®] wurden über 50 % der eingesetzten Pall-Aktivität bzw. 65 EU/g Katalysatorfeuchtmasse wiedergefunden. Die Selektivität der immobilisierten Isomaltulose-Synthase blieb auch beim Mehrfacheinsatz auf höchstem Niveau erhalten (maximale Isomaltulose-Ausbeute von 87 %). Zusätzlich zeigten die Immobilisate eine gute physikalische und katalytische Stabilität.

Durch die Überexpression der Isomaltulose-Synthase konnte erstmals eine für die industrielle Anwendung profitable Enzymimmobilisierung ohne kostenintensive Aufkonzentrierungs- und Aufreinigungsstufen realisiert werden. Durch den 6-maligen Einsatz von LentiKats[®], die aus einem Liter Enzymlösung mit 1,6 g Pall-Enzym hergestellt werden, können ca. 33 kg Isomaltulose produziert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Isomaltulose (Palatinose™)	3
2.1.1	Chemische Struktur und physikalische Daten.....	3
2.1.2	Besondere Eigenschaften der Isomaltulose	4
2.1.3	Einsatzmöglichkeiten von Isomaltulose	5
2.1.3.1	Isomaltulose im Nahrungsmittelbereich.....	5
2.1.3.2	Isomaltulose als Ausgangsmaterial für die chemische Industrie.....	6
2.1.4	Industrielle Herstellung von Isomaltulose.....	7
2.1.4.1	Entdeckung und Etablierung der Isomaltulose.....	7
2.1.4.2	Industrielle Herstellungsverfahren von Palatinose™	8
2.2	Charakterisierung des Enzyms Isomaltulose-Synthase.....	11
2.2.1	Nomenklatur und Klassifizierung der Isomaltulose-Synthase	11
2.2.2	Isomaltulose-Synthase bildende Mikroorganismen	11
2.2.3	Reaktion der Isomaltulose-Synthase	12
2.3	Fremdgenexpression in <i>E. coli</i>	14
2.3.1	Grundlagen der rekombinanten Genexpression in <i>E. coli</i>	14
2.3.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	15
2.3.2.1	Satzverfahren (Batch).....	15
2.3.2.2	Kontinuierliches Verfahren	18
2.3.2.3	Zulaufverfahren (Fed-Batch).....	18
2.3.3	Einflussfaktoren auf die Fremdgenexpression	19
2.3.3.1	Induktion.....	20
2.3.3.2	Kultivierungstemperatur und Medienzusammensetzung	21
2.3.3.3	Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit.....	22
2.4	Immobilisierung von Biokatalysatoren.....	23
2.4.1	Grundlagen der Immobilisierung	23

2.4.2	Quervernetzung mit Glutardialdehyd.....	25
2.4.3	Immobilisierung durch Matrixeinschluss.....	26
2.4.3.1	Matrixeinschluss mit Polyvinylalkohol.....	27
2.4.3.2	LentiKats®.....	29
2.4.4	Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase.....	31
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Verwendete <i>E.-coli</i> -Stämme.....	33
3.2	Kultivierungsbedingungen.....	35
3.2.1	Verwendete Medien.....	35
3.2.2	Stammhaltung und Herstellung von Arbeitskulturen.....	36
3.2.2.1	Kryostockkulturen.....	36
3.2.2.2	Arbeitskulturen.....	36
3.2.3	Kultivierung in Schüttelkolben.....	36
3.2.3.1	Herstellung einer Vorkultur.....	37
3.2.3.2	Herstellung einer Hauptkultur.....	37
3.2.3.3	Versuche in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen.....	38
3.2.4	Kultivierung im 10-L-Fermentationsmaßstab.....	38
3.2.4.1	Aufbau des Fermentersystems.....	38
3.2.4.2	Durchführung der Fermentationen.....	40
3.2.4.2.1	Vorbereitung des Fermenters und Herstellung der Vorkultur.....	40
3.2.4.2.2	Start und Verlauf der Kultivierung.....	41
3.2.4.2.3	Abbruch der Kultivierung.....	41
3.2.4.3	Scale up der Überexpression des rekombinanten Pali-Enzyms.....	41
3.3	Analytik.....	44
3.3.1	Mikroskopie.....	44
3.3.2	Bestimmung der Biomassekonzentration.....	45
3.3.2.1	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM).....	45
3.3.2.2	Bestimmung der optischen Dichte (OD ₆₀₀).....	45
3.3.2.3	Korrelation unterschiedlicher Biomassebestimmungen der <i>E.-coli</i> -Stämme.....	46
3.3.3	<i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC).....	47
3.3.4	Bestimmung der Plasmid-DNA-Menge.....	50
3.3.5	Bestimmung der löslichen Proteinkonzentration.....	51
3.3.6	SDS-PAGE.....	51
3.4	Zellaufschluss und Herstellung der Zellextrakte.....	53

3.4.1	Zellaufschluss per Ultraschallsonde.....	53
3.4.2	Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator	54
3.5	Standard-Enzymaktivitätstest.....	54
3.5.1	Freies und quervernetztes Enzym.....	54
3.5.2	LentiKats®	55
3.5.3	Berechnung der Enzymaktivität der Isomaltulose-Synthase.....	55
3.6	Analyse des Produktspektrums der Isomaltulose-Synthase.....	56
3.7	Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase.....	57
3.7.1	Einfluss von Glutardialdehyd auf die Pali-Aktivität.....	57
3.7.2	Immobilisierungsverfahren	57
3.8	Mehrfachverwendung des immobilisierten Biokatalysators.....	58
3.9	Chemikalienliste.....	59
4	Ergebnisse und Diskussion.....	61
4.1	Charakterisierung der Pali-Expression in <i>E. coli</i>	61
4.1.1	Wachstumsverhalten und Morphologie der Zellen	61
4.1.2	Substratverbrauch, Produktion organischer Säuren und Bildung löslicher Proteine	63
4.1.3	Untersuchung der Pali-Expression.....	64
4.1.3.1	Plasmidstabilität	64
4.1.3.2	Semiquantitative Erfassung der Pali-Expression	66
4.1.3.3	Pali-Aktivität der löslichen Zellfraktionen.....	68
4.1.4	Zusammenfassung: Charakterisierung der Pali-Expression in <i>E. coli</i>	69
4.2	Vergleichende Analyse der Stämme XMS und JMS – Auswahl des besten Produktionsstammes	70
4.2.1	Ermittlung der optimalen Kultivierungstemperatur	71
4.2.2	Kultivierung in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen.....	72
4.2.2.1	Wachstumsverhalten der Stämme XMS und JMS	72
4.2.2.2	Substratverbrauch und Bildung organischer Säuren	74
4.2.2.3	Untersuchung der Pali-Expression von XMS und JMS.....	76
4.2.2.3.1	Plasmidstabilität.....	76
4.2.2.3.2	Semiquantitative Erfassung der Pali-Expression.....	77
4.2.2.3.3	Pali-Aktivität der löslichen Zellfraktionen	80
4.2.3	Untersuchung der Reversibilität der gestörten Pali-Expression in dem Stamm XMS	83

4.2.4	Zusammenfassung: Vergleichende Analyse der Stämme XMS und JMS – Auswahl des besten Produktionsstammes.....	85
4.3	Scale up der Überexpression des rekombinanten PalI-Enzyms.....	88
4.3.1	Einfluss der Sauerstoffzufuhr auf die Fermentation von JMS	88
4.3.2	Entwicklung einer neuen Fermentationsstrategie.....	91
4.3.3	Zwei-Phasen-Fermentationsstrategie und ihre Optimierung.....	94
4.3.4	Gesamtergebnis der Fermentationsoptimierung.....	96
4.3.4.1	Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen	97
4.3.4.2	Bildung organischer Säuren	98
4.3.4.3	Untersuchung der PalI-Expression der optimierten Fermentation	99
4.4	Zusammenfassung der Prozessoptimierung zur Überproduktion des PalI-Enzyms	101
4.5	Charakterisierung und Immobilisierung des Enzyms Isomaltulose-Synthase.....	102
4.5.1	Charakterisierung der freien Isomaltulose-Synthase.....	102
4.5.1.1	Aktivität des freien PalI-Enzyms.....	102
4.5.1.2	Selektivität des freien PalI-Enzyms mit 25 % und 40 % Saccharose als Substratstartkonzentration	102
4.5.2	Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase.....	105
4.5.2.1	Einfluss von Glutardialdehyd auf die PalI-Aktivität	105
4.5.2.2	Einfluss von Glutardialdehyd auf die Enzymaktivität bei Zusatz von Saccharose und Palatinose TM -Melasse	107
4.5.2.3	Enzymimmobilisierung in LentiKats [®]	108
4.5.2.4	Einfluss der Immobilisierungsprozedur auf die Enzymselektivität.....	110
4.5.2.5	Prüfung der Stabilität des immobilisierten Biokatalysators bei Mehrfachverwendung.....	112
4.5.3	Zusammenfassung: Charakterisierung und Immobilisierung des Enzyms Isomaltulose-Synthase.....	115
5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	117
6	Anhang	119
6.1	Scale up der Kultivierung	119
6.1.1	Einfluss der Begasungsrate auf die Fermentationen von JMS	119
6.1.2	Strategie der Zwei-Phasen-Fermentation	120
6.2	Mehrfachverwendung des immobilisierten Biokatalysators.....	122
7	Literaturverzeichnis.....	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Chemische Struktur der Isomaltulose (Palatinose TM).....	3
Abbildung 2.2:	Enzymatische Reaktion der Isomaltulose-Synthese nach Park (Park et al., 2007).....	13
Abbildung 2.3:	Wachstumskurve des Batch-Verfahrens nach Chmiel (Chmiel, 1991).....	16
Abbildung 2.4:	Einteilung der Immobilisierungsmethoden, zusammengefasst nach Klein et al., 1985 und Hartmeier, 1986.....	24
Abbildung 2.5:	Chemische Struktur eines PVAL-Hydrogels.....	28
Abbildung 2.6:	Schematische Ansicht eines LentiKats [®]	29
Abbildung 3.1:	Genkarten des <i>pall</i> -Expressionsplasmids pMSpal127 (links) und des Basisplasmids pUC19 (rechts).....	34
Abbildung 3.2:	Schematischer Aufbau des erweiterten Fermentersystems Biostat E.....	38
Abbildung 3.3:	Schemazeichnung des Kulturgefäßes vom Fermentersystem Biostat E.....	39
Abbildung 3.4:	OD/BTM- und OD/Zellzahl-Korrelation der Stämme PUC und XMS.....	46
Abbildung 3.5:	Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse von JMS.....	47
Abbildung 3.6:	Prozedur zur Immobilisierung des <i>Pall</i> -Enzyms.....	57
Abbildung 3.7:	Zeitlicher Verlauf des Versuchs zur Mehrfachverwendbarkeit der LentiKats [®]	58
Abbildung 4.1:	Wachstumskurven der Stämme XMS und PUC.....	62
Abbildung 4.2:	Zellmorphologie der Stämme XMS und PUC nach 16 h Fermentationsdauer.....	63
Abbildung 4.3:	Substratverbrauch, Produktion organischer Säuren und Bildung löslicher Proteine der Stämme XMS und PUC im Vergleich.....	64
Abbildung 4.4:	Restriktionskarte des linearisierten Plasmids pMSpal127 (<i>pall</i> -Plasmid) und Foto des Agarosegels mit den Restriktionsfragmenten <i>Eco RI/Hind III</i> von XMS und PUC.....	65
Abbildung 4.5:	Agarosegel mit Restriktionsfragmenten <i>Eco RI/Hind III</i> der Plasmid-DNA von XMS..	66
Abbildung 4.6:	Vergleichende SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte von XMS und PUC.....	67
Abbildung 4.7:	Zeitlicher Verlauf der spezifischen <i>Pall</i> -Aktivitäten von XMS und PUC.....	69
Abbildung 4.8:	Zellspezifische <i>Pall</i> -Aktivitäten und OD ₆₀₀ -Werte von XMS und JMS nach Kultivierung bei 30, 33,5 und 37 °C.....	72
Abbildung 4.9:	Wachstumskurven von XMS und JMS in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen.....	73
Abbildung 4.10:	Substratverbrauch und Bildung organischer Säuren während der Kultivierung von XMS und JMS in Schüttelkolben mit (S) und ohne (O) Schikanen.....	74
Abbildung 4.11:	Restriktionskarte des linearisierten Plasmids pMSpal127 (<i>pall</i> -Plasmid) und Foto der Agarosegele mit den Restriktionsfragmenten <i>Eco RI/Hind III</i> von XMS und JMS.....	76

Abbildung 4.12: Vergleichende SDS-PAGE-Analyse der Pali-Expression im Schüttelkolben mit und ohne Schikanen, Zellextrakte aus XMS	77
Abbildung 4.13: Vergleichende SDS-PAGE-Analyse der Pali-Expression im Schüttelkolben mit und ohne Schikanen, Zellextrakte aus JMS.....	78
Abbildung 4.14: Verlauf der Pali-Aktivität der Ansätze mit und ohne Schikanen von XMS und JMS.....	81
Abbildung 4.15: Semiquantitative Erfassung der Pali-Expression und -Aktivität bezogen auf 1 L Kultur von XMS (links) und JMS (rechts).....	82
Abbildung 4.16: Untersuchung auf Reversibilität der Pali-Expressionsstörung bei Kultivierung von XMS in Schüttelkolben mit Schikanen	84
Abbildung 4.17: Chromatogrammausschnitte einer vergleichenden Sequenzanalyse der Plasmid-DNA aus den XMS-Kultivierungen mit und ohne Schikanen.....	85
Abbildung 4.18: Wachstumsverhalten und erreichte Pali-Aktivitäten der Fermentationen BGS 1, 2 und 3	89
Abbildung 4.19: SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte von Fermentation BGS 3 und dazugehörige, schematisch dargestellte Pali-Aktivitäten pro Liter Kultur (blaue Säulen)	90
Abbildung 4.20: Zeitlicher Verlauf der Fermentation BGS E	92
Abbildung 4.21: SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte der Fermentationen BGS E und BGS 3 sowie dazugehörige, schematisch dargestellte Pali-Aktivitäten pro Liter Kultur (grün/blaue Säulen).....	93
Abbildung 4.22: Wachstumsverhalten und Verlauf der Pali-Aktivitäten der Fermentationen Ferm 1, 2 und 3	94
Abbildung 4.23: Detaillierter Verlauf der Fermentation Ferm 3	97
Abbildung 4.24: SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte von Fermentation Ferm 3	99
Abbildung 4.25: Zeitlicher Verlauf der semiquantitativ erfassten Pali-Expression und der Pali-Aktivität der Zellextrakte von Fermentation Ferm 3	100
Abbildung 4.26: Zusammenfassende Ergebnisübersicht der einzelnen Stufen zur Prozessoptimierung der Pali-Produktion.....	101
Abbildung 4.27: Produktspektrum des Pali-Enzyms bei 22,5 °C und 25 bzw. 40 % Saccharose-Lösung	104
Abbildung 4.28: Einfluss von Glutardialdehyd auf die Pali-Aktivität	106
Abbildung 4.29: Einfluss von Glutardialdehyd auf die Pali-Aktivität ohne und mit Zusatz von Saccharose oder Palatinose-Melasse	107
Abbildung 4.30: Vergleich der Aktivitäten des freien, mit GDA quervernetzten und in LentiKats [®] immobilisierten Pali-Enzyms	109
Abbildung 4.31: Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme bei Einsatz von freiem, quervernetztem und in LentiKats [®] immobilisiertem Pali-Enzym	111
Abbildung 4.32: Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme beim wiederholten Einsatz der LentiKats [®]	113
Abbildung 4.33: Enzymaktivitäten und maximale Palatinose-Ausbeuten sowie dazugehörige Zeitpunkte der einzelnen LentiKat [®] -Einsätze.....	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Physikalische Eigenschaften von Saccharose und Isomaltulose.....	4
Tabelle 2.2:	Patentanmeldungen für Isomaltulose-Herstellungsverfahren mit immobilisierten Biokatalysatoren	9
Tabelle 2.3:	Nomenklatur der Isomaltulose-Synthase	11
Tabelle 2.4:	Produktspektrum des Pall-Enzyms von <i>P. rubrum</i> bei 20 °C.....	13
Tabelle 2.5:	Einfluss der Immobilisierungsmethode auf die Biotransformation von Saccharose zu Isomaltulose durch <i>Erwinia-rhapontici</i> -Zellen.....	25
Tabelle 3.1:	Genotypen der <i>E.-coli</i> -Wirtsstämme	33
Tabelle 3.2:	Verwendete rekombinante <i>E.-coli</i> -Stämme	33
Tabelle 3.3:	LB-Medium für die <i>E.-coli</i> -Kultivierung	35
Tabelle 3.4:	Pall-Produktionsmedium YeGly.....	35
Tabelle 3.5:	Ampicillin-Stammlösung.....	36
Tabelle 3.6:	Geräteliste für die Kultivierung in Schüttelkolben	37
Tabelle 3.7:	Geräteliste für die Fermentationen im Bioreaktor	40
Tabelle 3.8:	Prozessparameter der Fermentationen BGS 1, 2 und 3	41
Tabelle 3.9:	Prozessparameter der Fermentation BGS E.....	42
Tabelle 3.10:	Prozessparameter der Fermentationen Ferm 1, 2 und 3.....	43
Tabelle 3.11:	Substrat- und Ampicillin-Zugabe der Zwei-Phasen-Fermentation Ferm 1.....	43
Tabelle 3.12:	Substrat- und Ampicillin-Zugabe der Zwei-Phasen-Fermentation Ferm 2.....	43
Tabelle 3.13:	Substrat- und Ampicillin-Zugabe der Zwei-Phasen-Fermentation Ferm 3.....	44
Tabelle 3.14:	OD/BTM- und OD/Zellzahl-Korrelation der Stämme PUC und XMS	46
Tabelle 3.15:	Geräteliste und Betriebsparameter des HPLC-Systems 1	48
Tabelle 3.16:	Geräteliste und Betriebsparameter des HPLC-Systems 2.....	48
Tabelle 3.17:	Geräteliste und Betriebsparameter des HPLC-Systems 3	48
Tabelle 3.18:	Retentionszeiten der analysierten Substanzen	49
Tabelle 3.19:	Verwendete Lösungen für die Quantifizierung der Plasmid-DNA-Menge	50
Tabelle 3.20:	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA	50
Tabelle 3.21:	Bestandteile des DNA-Größenstandards	51
Tabelle 3.22:	Lösungen für die SDS-PAGE.....	52
Tabelle 3.23:	Bestandteile des Protein-Molekulargewichtsmarkers.....	53
Tabelle 3.24:	Bestandteile des Reaktionspuffers	53

Tabelle 3.25:	Geräteliste für die Bestimmung der Pall-Aktivität	54
Tabelle 3.26:	Substratstammlösung für die Pall-Enzymreaktion	55
Tabelle 3.27:	Liste der wichtigsten verwendeten Chemikalien	59
Tabelle 4.1:	Entwicklung der Biomasse über die Zeit von XMS und PUC im 50-mL-Maßstab.....	62
Tabelle 4.2:	Glycerin-Abnahme, Produktion organischer Säuren und Bildung löslicher Proteine der Stämme XMS und PUC.....	63
Tabelle 4.3:	Quantifizierung der Plasmid-DNA von XMS.....	66
Tabelle 4.4:	Semiquantitative Auswertung der SDS-PAGE der Zellextrakte von XMS und PUC	68
Tabelle 4.5:	Zeitliche Entwicklung der Pall-Aktivitäten von XMS- und PUC-Zellen	68
Tabelle 4.6:	Überblick über die wichtigsten Merkmale der Pall-Expression in XMS	70
Tabelle 4.7:	OD ₆₀₀ -Werte und Enzymaktivitäten von XMS und JMS nach Kultivierung bei 30, 33,5 und 37 °C	71
Tabelle 4.8:	Zeitliche Entwicklung der Biomassebildung von XMS und JMS in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen.....	73
Tabelle 4.9:	Substratverbrauch und Bildung organischer Säuren während der Kultivierung von XMS und JMS in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen	75
Tabelle 4.10:	Quantifizierung der Plasmid-DNA von XMS und JMS	77
Tabelle 4.11:	Gesamtausbeute an Pall-Protein aus 1 L XMS-Kultur	78
Tabelle 4.12:	Gesamtausbeute an Pall-Protein aus 1 L JMS-Kultur	79
Tabelle 4.13:	Vergleichende Analyse der Gesamtausbeute des exprimierten Pall-Enzyms.....	79
Tabelle 4.14:	Pall-Aktivitäten der Zellextrakte aus XMS nach Kultivierungen mit und ohne Schikanen	80
Tabelle 4.15:	Pall-Aktivitäten der Zellextrakte aus JMS nach Kultivierungen mit und ohne Schikanen	81
Tabelle 4.16:	Semiquantitative Erfassung der Pall-Expression und -Aktivität von XMS und JMS.....	82
Tabelle 4.17:	Untersuchung auf Reversibilität der Pall-Expressionsstörung bei Kultivierung von XMS in Schüttelkolben mit Schikanen	84
Tabelle 4.18:	Bezeichnung der Fermentationen zum Einfluss der Sauerstoffversorgung auf die Kultivierung von JMS.....	88
Tabelle 4.19:	Erreichte Biomassen und Pall-Aktivitäten der Fermentationen zum Einfluss der Sauerstoffversorgung auf die Kultivierung von JMS	89
Tabelle 4.20:	Zeitlicher Verlauf der Parameter von Fermentation BGS E	91
Tabelle 4.21:	Zeitliche Biomasse- und Pall-Aktivitätsverläufe der Fermentationen BGS E und BGS 3	93
Tabelle 4.22:	Zeitliche Entwicklung der Biomassen und Pall-Aktivitäten der Fermentationen Ferm 1, 2 und 3	95
Tabelle 4.23:	Zeitlicher Verlauf von Wachstum, pO ₂ -Werten und Glycerin-Konzentrationen sowie Bildung organischer Säuren von Fermentation Ferm 3	96
Tabelle 4.24:	Semiquantitative Erfassung der Pall-Expression der Fermentation Ferm 3	100

Tabelle 4.25:	Ergebnisse der einzelnen Stufen zur Prozessoptimierung der Pall-Produktion.....	101
Tabelle 4.26:	Zeitlicher Verlauf des Produktspektrums des Pall-Enzyms bei 25 % und 40 % Saccharose-Startkonzentration.....	103
Tabelle 4.27:	Pall-Aktivität bei Zusatz verschiedener GDA-Mengen.....	105
Tabelle 4.28:	Einfluss von Glutardialdehyd auf die Pall-Aktivität ohne und mit Zusatz von Saccharose oder Palatinose-Melasse	108
Tabelle 4.29:	Aktivitäten des freien, quervernetzten und in LentiKats [®] immobilisierten Enzyms	109
Tabelle 4.30:	Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme bei Einsatz von freiem, quervernetztem und in LentiKats [®] immobilisiertem Pall-Enzym	110
Tabelle 4.31:	Maximale Palatinose-Ausbeuten und dazugehörige Zeitpunkte.....	111
Tabelle 4.32:	Enzymaktivitäten der sechs LentiKat [®] -Einsätze	112
Tabelle 4.33:	Maximale Palatinose-Ausbeuten und dazugehörige Reaktionsdauer bis zum Substratumsatz von 0,2 % Rest-Saccharose	114
Tabelle 6.1:	Wachstumsverhalten und pO ₂ -Werte der Fermentationen BGS 1, 2, 3 und E.....	119
Tabelle 6.2:	Wachstumsverhalten der Zwei-Phasen-Fermentationen Ferm 1, 2 und 3	120
Tabelle 6.3:	Zeitlicher Verlauf der Fermentation Ferm 3	121
Tabelle 6.4:	Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme beim wiederholten Einsatz der LentiKats [®]	122

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Einheit	Bezeichnung
BTM	[g/L]	Biotrockenmasse
c	[g/L]	Konzentration
c_{Pal}	[g/L]	Palatinose-Konzentration
EU	[μ mol/min]	Enzymeinheit (engl. <i>enzyme unit</i>)
f	[-]	Verdünnungsfaktor
K_S	[g/L]	Sättigungs- oder Affinitätskonstante des Substrates
m	[g]	Masse
MW	[g/mol]	molare Masse
μ	[h ⁻¹]	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
μ_{max}	[h ⁻¹]	maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
OD	[-]	optische Dichte
S	[g/L]	Substratkonzentration
t	[min], [h], [d]	Zeit
T	[°C]	Temperatur
T_{600}	[-]	Transmission bei einer Wellenlänge von 600 nm
V	[L]	Volumen
v/vm	[L/(L*min)]	Begasungsrate
X	[g/L]	Biomassekonzentration

Abkürzung	Bezeichnung
Amp	Ampicillin
<i>ampR</i>	Amp-Resistenzgen
BGS	Begasungsstufe
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
BTM	Biotrockenmasse
Dal	Dalton
deion.	deionisiert
Diff.	Differenz
DO	Gelöstsauerstoff (engl. <i>diluted oxygen</i>)

Abkürzung	Bezeichnung
ee	Enantiomerenüberschuss (engl. <i>enantiomeric excess</i>)
Ferm	Fermentation
Fru	Fructose
GDA	Glutardialdehyd
GI	Glykämischer Index
Glu	Glucose
Gly	Glycerin
GRAS	engl. <i>generally recognized as safe</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Isomal	Isomaltose
Isomel	Isomelezitose
JMS	Produktionsstamm, Wirt: <i>E. coli</i> JM105
Kat	Katalysatorfeuchtmasse
konvent.	konventionell
Konz.	Konzentration
LB	Medium f. Vorkulturen, Stammhaltung (engl. <i>lysogeny broth</i>)
lösl.	löslich
MCS	multiple Restriktionsschnittstelle (engl. <i>multiple cloning site</i>)
MO	Mikroorganismus
O	Schüttelkolben ohne Schikanen
OD	Optische Dichte
P(LAC)	<i>lac</i> -Promotor
Pal	Palatinose (Isomaltulose)
<i>pall</i>	Isomaltulose-Synthase codierendes Gen
PalI	Isomaltulose-Synthase
Pal _{max}	maximale Palatinose-Ausbeute
PEG	Polyethylenglykol
pO ₂	prozentualer Partialdruck des Gelöstsauerstoffs
PUC	Kontrollstamm ohne <i>pall</i> -Gen
PVAL	Polyvinylalkohol
RI	Brechungsindex (engl. <i>refractive index</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
S	Schüttelkolben mit Schikanen
Sacc	Saccharose
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
spez.	spezifisch
UV	ultraviolett
XMS	Produktionsstamm, Wirt: <i>E. coli</i> XL1-Blue
YE	Hefeextrakt (engl. <i>yeast extract</i>)
YeGly	Produktionsmedium mit Hefeextrakt und Glycerin
zellspez.	zellspezifisch

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Ansprüche des Konsumenten an Süßungsmittel haben sich in den letzten Jahren deutlich gewandelt. Durch die Bereiche *Functional* und *Wellness Food* sind die Anforderungen an Lebensmittel erheblich gestiegen. Nahrungsmittel sollen nicht nur einen guten Geschmack besitzen, sondern sich auch positiv auf die Gesundheit und das Wohlbefinden des Verbrauchers auswirken. Aus diesen Gründen werden verstärkt Alternativen für den traditionellen Tafelzucker gesucht.

Während die Menge an verkauftem Zucker zwischen 2002 und 2006 um 16 % zurückging, stieg der Umsatz von Zuckeraustauschstoffen um 22 % (Mintel Group Inc., 2007). Von Interesse sind besonders neue Süßungsmittel, die durch enzymatische oder chemische Modifikationen aus natürlichen Zuckern gewonnen werden (Martä et al., 2008). Zu diesen alternativen Kohlenhydraten gehört auch Isomaltulose, die durch enzymatische Konversion von Saccharose hergestellt wird. Isomaltulose ist ein natürlich vorkommender, zahnfreundlicher Zucker, der nach dem Verzehr nur eine geringe Insulinantwort hervorruft. Neben der Anwendung als neuartiger *Wellness*-Zucker wird aus Isomaltulose (Palatinose™) großtechnisch von der Südzucker AG der kalorienreduzierte Zuckeralkohol Palatinit™ hergestellt. Darüber hinaus kann Isomaltulose in der chemischen Industrie als regenerativer Ausgangsstoff für die Herstellung von z.B. Tensiden, Detergenzien oder Polymeren eingesetzt werden.

Die Profitabilität eines industriellen Biokonversionsprozesses hängt unter anderem von der ausreichenden Bereitstellung des aktiven Biokatalysators und von dessen Langzeitstabilität ab. Bei der Nutzung mikrobieller Enzyme werden diese von dem Wildtyporganismus meist in unzureichenden Konzentrationen produziert. Dieses Problem kann mithilfe der Fremdgenexpression überwunden werden. Durch den Einsatz hochentwickelter, genetisch veränderter Mikroorganismen wie z.B. *Escherichia coli* kann das heterologe Zielenzym überexprimiert und mittels Hochzelldichtefermentation (Zelldichten ≥ 100 g/L Biotrockenmasse) in großen Mengen bereitgestellt werden. Die für den technischen Einsatz benötigte Stabilität des Enzyms wird durch seine Immobilisierung erreicht. Hierfür steht eine breite Palette an Immobilisierungsmethoden zur Verfügung, welche für die jeweilige Anwendung speziell

angepasst werden müssen. Durch den Einsatz innovativer Gen- und Immobilisierungstechniken können Produktionskosten gesenkt und industrielle Bioprozesse rentabel gemacht werden.

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der fermentativen Herstellung rekombinanter Isomaltulose-Synthase und ihrer Immobilisierung. Dies beinhaltete die Auswahl eines geeigneten Expressionsstammes und das Scale up der Kultivierung vom Schüttelkolben in den Fermentationsmaßstab. Gleichzeitig sollte eine geeignete Fermentationsstrategie für die Überexpression der Isomaltulose-Synthase entwickelt werden, die zu hohen Zelldichten und Enzymaktivitäten führt. Das produzierte heterologe Enzym sollte anschließend durch Zellaufschluss gewonnen und immobilisiert werden. Im Fokus dieser Optimierungsphase standen das Erreichen einer maximalen und stabilen Produktbildung sowie die Gewährleistung der Mehrfachverwendbarkeit der Biokatalysatoren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Isomaltulose (PalatinoseTM)

Isomaltulose, auch PalatinoseTM genannt, ist ein reduzierendes Disaccharid, das in geringen Mengen in Honig (Low et al., 1988) oder in zuckerreichen Flüssigkeiten wie z.B. Rohrzuckermelassen oder Zuckerrübenextrakten (Weidenhagen et al., 1957a) zu finden ist.

2.1.1 Chemische Struktur und physikalische Daten

Als eines der fünf Saccharose-Isomere besteht Isomaltulose (6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose, CAS-Nr. 13718-94-0) aus je einem Molekül α -1,6 glykosidisch verknüpfter Glucose und Fructose (siehe Abbildung 2.1) (Schiweck, 1980).

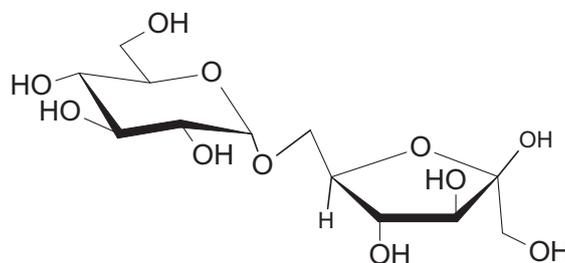


Abbildung 2.1: Chemische Struktur der Isomaltulose (PalatinoseTM)

Ihre α -1,6-Bindung verleiht der Isomaltulose im Vergleich zur Saccharose (α -1,2-Bindung) unterschiedliche Eigenschaften. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die physikalischen Eigenschaften von Saccharose und Isomaltulose.

Isomaltulose ist eine kristalline, nichthygroskopische Substanz, die leicht aus wässriger Lösung mit einem Mol Kristallwasser auskristallisiert (Schiweck, 1983). Im Vergleich zur Saccharose zeigt sie eine sehr hohe Säurestabilität (pH 2,5 - 6,0) (Cheetham, 1984; Cheetham et al., 1985). Isomaltulose besitzt 42 % der Süßkraft von Saccharose (10 %ige wässrige

Lösungen) und zeigt ein sehr ähnliches Geschmacksprofil ohne störenden Nachgeschmack. Ihr Süßungsgrad nimmt mit steigender Konzentration zu (Sträter, 1987). Beim Auflösen von Isomaltulose kommt es zu keinem Kühlungseffekt (*cooling mouth effect*) und das Geschmacksprofil ist nicht temperaturabhängig (Takazoe, 1989; Schiweck et al., 1990). Wie auch bei Saccharose werden dem Körper pro Gramm Isomaltulose 4 kcal zugeführt.

Tabelle 2.1: Physikalische Eigenschaften von Saccharose und Isomaltulose

Eigenschaft	Saccharose	Isomaltulose / Palatinose™
Süßkraft	100	42
Charakter der Süße	rund, ausgeglichen	neutral
Schmelzpunkt (Bereich) [°C]	160 - 185	123 - 124
Spezifische Drehung [°]	+ 66,5	+ 103
Lösungsenthalpie [kJ/kg]	- 18,2	- 21,7
Kühlungseffekt beim Auflösen	nicht vorhanden	nicht vorhanden
Löslichkeit bei 20 °C [g/g H ₂ O]	ca. 2	0,49
Hygroskopie des Pulvers	gering	sehr gering
Viskosität in Lösung	gering	gering
Bräunungsreaktion	+	+
Kalorien / Gramm Zucker [kcal/g]	4	4

Quelle: Schiweck et al., 1990

2.1.2 Besondere Eigenschaften der Isomaltulose

Aufgrund ihrer Süßkraft kann Isomaltulose als alternatives Süßungsmittel eingesetzt werden (Matsukubo et al., 2006; Martä et al., 2008). Ihr besonderer Vorteil gegenüber Süßstoffen liegt hierbei in dem reinen Geschmacksprofil und der Eigenschaft, andere unerwünschte Geschmacksnoten in Nahrungsmitteln zu maskieren. So ist es möglich, mit Isomaltulose den bei manchen Süßstoffen auftretenden metallischen Nachgeschmack zu überdecken.

Isomaltulose besitzt einen sehr geringen Glykämischen Index (GI) von 32 (Saccharose: GI = 100) (Godshall, 2007). Nach Verabreichung von Isomaltulose erfolgt der Anstieg des Blutzuckerspiegels nur sehr langsam und nicht so stark wie beim Verzehr von Saccharose. Dies kann auf die langsamere Isomaltulose-Hydrolyse aufgrund ihrer α -1,6-Bindung zurückgeführt werden. Isomaltulose ist sehr säurestabil und wird nur schwer von Enzymen in Mund und Magen abgebaut (Kawai et al., 1985; Achten et al., 2007). Ihre Hydrolyse erfolgt im unteren Bereich des Dünndarms durch den Saccharose/Isomaltase-Enzymkomplex. Die

freigesetzten Fructose- und Glucose-Einheiten werden anschließend auf den klassischen Stoffwechselwegen metabolisiert. Isomaltulose ermöglicht eine Langzeitversorgung mit der gleichen Energiemenge wie Saccharose (4 kcal/g), die jedoch langsamer an den Körper abgegeben wird (Tsuji et al., 1986; Lina et al., 2002). Somit bewirkt die Einnahme von Isomaltulose nur eine geringe Insulinantwort und ist auch für Diabetiker gut geeignet (Kawai et al., 1989).

Als langsamer Energielieferant kann Isomaltulose bei der Gewichtskontrolle eingesetzt werden. Studien haben gezeigt, dass der Zucker auch die Fettverbrennung im Körper fördert (Oizumi et al., 2007; Arai et al., 2007). Zusätzlich wird der Verabreichung von Isomaltulose eine bifidogene Wirkung und eine positive Wirkung auf die menschliche Gehirnfunktion zugesprochen (Kashimura et al., 2003; Krastanov et al., 2007). Probanden wiesen deutliche Verbesserungen des Gedächtnisses und der mentalen Konzentrationsfähigkeit auf.

Studien zur Sicherheit und Verträglichkeit von Isomaltulose zeigen, dass der Zucker nicht mutagen, nicht toxisch und gut verträglich ist (Takazoe, 1989; Jonker et al., 2002). Isomaltulose-Mengen von 1 g/kg Körpergewicht oder Dosen von 50 g/d (Macdonald et al., 1983; Kawai et al., 1985) werden auch von Diabetikern gut vertragen und führen zu keinen Magen-Darm-Beschwerden wie Flatulenz oder Diarrhoe (Takazoe, 1989; Lina et al., 2002).

Isomaltulose kann durch die meisten Mikroorganismen nicht verwertet werden, wodurch die Lagerungsfähigkeit von isomaltuloseenthaltenden Nahrungsmitteln erhöht wird (Takazoe, 1989; Pahl et al., 2008). Ein weiterer Vorteil von Isomaltulose gegenüber Saccharose ist ihre geringe Abbaubarkeit durch die Mundflora (Ooshima et al., 1983). Viele Plaquebakterien sind aufgrund der α -1,6-Verknüpfung nicht in der Lage Isomaltulose zu hydrolysieren, so dass nach ihrem Verzehr keine auffällige Säurebildung im Mund zu beobachten ist (Minami et al., 1990). Zusätzlich hemmt Isomaltulose die Bildung von wasserunlöslichen Glykanen (Ooshima et al., 1983; Minami et al., 1990), was die Plaquebildung deutlich senkt und die Zähne vor Säureeinwirkungen und Kariesbildung bewahrt (Hamada, 2002; Matsukubo et al., 2006).

2.1.3 Einsatzmöglichkeiten von Isomaltulose

2.1.3.1 Isomaltulose im Nahrungsmittelbereich

Aufgrund ihres niedrigen Glykämischen Indexes bei gleichzeitiger Energielangzeitversorgung ist Isomaltulose besonders gut für den *Functional* und *Wellness Food* Bereich einsetzbar. Hierbei zu nennen sind z.B. Fitness- und Sportgetränke (Dörr et al., 2005) sowie für

Diabetiker geeignete Lebensmittel. Weiterhin kann Isomaltulose in Diätprodukten für die Gewichtskontrolle verwendet werden. Durch Hitzebehandlung von Isomaltulose im sauren Milieu ist die Herstellung eines prebiotischen Kondensationsproduktes möglich, das eine proliferationsstimulierende Wirkung auf Bifidobakterien der Darmflora besitzt (Nakajima et al., 1989; Crittenden et al., 1996).

Als Zuckeraustauschstoff kann Isomaltulose in Süßigkeiten wie z.B. Hart- (Arenz et al., 2006; Kowalczyk et al., 2008) und Weichkaramellen (Bernard et al., 2006) sowie in Schokolade, zahnschonenden Kaugummis, Milchprodukten und Backwaren eingesetzt werden (Sträter, 1987; Beyts, 1990; Egerer, 1994). Hierbei stellt die Eigenschaft, beim Backen Bräunungsreaktionen einzugehen, einen wichtigen Vorteil von Isomaltulose gegenüber manchen künstlichen Süßstoffen dar (Schiweck et al., 1990). Weitere Patente schützen den Einsatz von Isomaltulose in den Bereichen Cerealien (Fritzsching et al., 2006; Fritzsching et al., 2008) und regenerativ wirkenden Nahrungsmitteln (Berg et al., 2008a; Berg et al., 2008b). Isomaltulose wurde auch als nachgeschmackreduzierendes Agens patentiert (Arenz et al., 2008).

Ein großer Anteil der Isomaltulose-Produktion fließt in die Herstellung des Zuckeraustauschstoffes Isomalt. Isomalt (CAS-Nr. 64519-82-0, auch PalatinitTM genannt) gehört zu den Zuckeralkoholen und wird durch Hydrierung von Isomaltulose an Raney-Nickel gewonnen (Schiweck, 1980). Es besteht aus einer äquimolaren Mischung aus 1-O- α -D-glucopyranosyl-D-mannitol und 6-O- α -D-glucopyranosyl-D-sorbitol (Schiweck, 1979; Gau et al., 1979). PalatinitTM wird von der Palatinit GmbH, einem Tochterunternehmen der Südzucker AG, mit 35.000 t/a hergestellt (Kunz et al., 1996; Rose et al., 2002). Der Zuckeraustauschstoff besitzt ein saccharoseähnliches Geschmacksprofil (Schiweck, 1979), führt dem Körper jedoch nur die Hälfte ihrer Kalorien (2 kcal/g) zu (Grupp et al., 1978). Wie auch Isomaltulose ist Isomalt zahnfreundlich und für Diabetiker geeignet (Bollinger, 1987). Mit 45 - 60 % der Süßkraft von Saccharose kann Isomalt diese 1:1 ersetzen und verleiht dem Produkt somit Körper und Textur (Irwin, 1990). Isomalt wird für Bonbons, Kaugummi, Schokolade, Backwaren und pharmazeutische Produkte (Cola et al., 1991; Bayerköhler et al., 2004; Fritzsching et al., 2007) verwendet.

2.1.3.2 Isomaltulose als Ausgangsmaterial für die chemische Industrie

Neben dem Lebensmittelsektor kann Isomaltulose auch im *Non Food* Bereich eingesetzt werden. Das reduzierende Disaccharid erlaubt aufgrund der 2-Ketogruppierung in der

offenkettigen Form des Fructoseteils selektive, klassische Carbonyl-Reaktionen. Aus diesem Grund gewinnt Isomaltulose für die chemische Industrie zunehmend als erneuerbarer *building block* an Bedeutung. Durch Reaktionen wie z.B. oxidative Spaltung (Trombotto et al., 2000), reduktive Aminierung (Cartarius et al., 2002) und katalytische Oxidation mit Metall- (Kunz et al., 1995) bzw. Biokatalysatoren (Buchholz et al., 1990) kann Isomaltulose funktionalisiert und in chemisch interessante Intermediate überführt werden. Auf diesem Weg können stabile Polyhydroxy-Verbindungen hergestellt werden, die Reaktionen mit z.B. Fettsäuren oder Vinyl-Derivaten zu Tensiden und polymerisierbaren Vinylsacchariden ermöglichen (Kunz, 1991; Lichtenthaler et al., 1991a).

Die mit Isomaltulose hergestellten Tenside können aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften auch in der Kosmetikindustrie eingesetzt werden (Desai, 1989). Die Produktion von biologisch abbaubaren Tensiden ist ebenfalls realisierbar (Cartarius et al., 2001). Vinylsaccharide ermöglichen hingegen die Herstellung von hydrophilen Biopolymeren und Tensid-Polymeren (Kunz, 1991). Zusätzlich ist Isomaltulose zu neuen Detergenzien verarbeitbar. Es wurden bereits Patente über die Vorstufen und Herstellung von Tensiden (Klein et al., 1988; Lichtenthaler et al., 1991b), Detergenzien (Driemel et al., 1990) und Polymeren (Klein et al., 1988) aus Isomaltulose angemeldet. Durch enzymatische Umwandlung in Isomaltulose kann die in großen Mengen zur Verfügung stehende Bulkchemikalie Saccharose als nachwachsender Rohstoff für die chemische Industrie eingesetzt werden.

2.1.4 Industrielle Herstellung von Isomaltulose

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften und vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten ist Isomaltulose eine wichtige Bereicherung für den Sektor der nachwachsenden Rohstoffe. Hierdurch erklären sich auch die zunehmenden Forschungsaktivitäten nach Entdeckung der Isomaltulose, die eine verbesserte Bereitstellung des Zuckers zum Ziel hatten.

2.1.4.1 Entdeckung und Etablierung der Isomaltulose

Erstmals wurde Isomaltulose 1952 von Stodola erwähnt, der das damals noch unbekanntes Disaccharid in Produkten des Mikroorganismus *Leuconostoc mesenteroides* fand (Stodola et al., 1952). Unabhängig davon entdeckten Weidenhagen und Lorenz 1957 im Forschungslabor der Süddeutschen Zucker AG (Südzucker AG), dass ein Eigenisolat aus Zuckerrübensaft die Fähigkeit besaß, ein unbekanntes reduzierendes Disaccharid aus Saccharose herzustellen

(Weidenhagen et al., 1957a). Das Disaccharid wurde als Isomaltulose identifiziert und mit dem Trivialnamen Palatinose, nach dem Ort der Entdeckung, Obrigheim in der Pfalz (lat. *Palatinum*), versehen (Bollinger, 1987). Der isolierte Mikroorganismus wurde später von Windisch als *Protaminobacter rubrum* identifiziert (Windisch, 1958). Das erste Patent über die Produktion von PalatinoseTM wurde 1957 der Süddeutschen Zucker AG, Mannheim erteilt (Weidenhagen et al., 1957b).

Isomaltulose wurde 1967 auch als natürlicher Bestandteil in Honig gefunden (Siddiqui et al., 1967). Hervorgerufen durch wissenschaftliche Publikationen über Struktur (Dreissig et al., 1973), Vorkommen (Low et al., 1988) und zu erwartende Eigenschaften der Isomaltulose (Weidenhagen, 1961; Cheetham et al., 1985) sowie des isomaltulosebildenden Enzyms (Cheetham, 1984), nahm das Interesse an Isomaltulose zu und auch andere Zuckerunternehmen fingen an, sich mit dem reduzierenden Disaccharid zu beschäftigen. Neben der Südzucker AG machten besonders die Unternehmen Mitsui Sugar C., Japan und Tate & Lyle, England durch Publikationen auf sich aufmerksam (Sträter, 1987).

In Japan wird Isomaltulose seit 1985 als Lebensmittelzusatz eingesetzt. In 2006 überstieg dort die jährliche Produktion 5.000 t (Krastanov et al., 2006). Im Juli 2005 ließ die Europäische Kommission Isomaltulose als neuartiges Lebensmittel (*Novel Food Zulassung*) gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 zu. Den GRAS Status (*Generally Recognized As Safe*) erhielt Isomaltulose im März 2006 (Godshall, 2007). Seit August 2007 besitzt PalatinoseTM auch die *Novel Food Zulassung* für Australien und Neuseeland und im September 2007 erkannte die US-Lebensmittelbehörde FDA PalatinoseTM als nichtkariogen an (Südzucker AG). Isomaltulose wird derzeit von den Unternehmen Südzucker AG (Palatinit GmbH), Mitsui Sugar C., Japan und Cargill Corp. in den USA im Großmaßstab produziert (Eggleston, 2008). Die Jahresproduktion der Südzucker AG beläuft sich auf über 60.000 t/a (Südzucker AG).

2.1.4.2 Industrielle Herstellungsverfahren von PalatinoseTM

Die chemische Synthese von Isomaltulose ist sehr aufwändig, aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Produktion des Zuckers überwiegend mit Hilfe von Biokatalysatoren durchgeführt. Erste Prozesse zur Herstellung von Isomaltulose nutzten lebende freie Zellen. Die Entwicklung eines kontinuierlichen, einstufigen Fermentationsprozess mit *Protaminobacter rubrum*, in dem Zellwachstum und Substratumsatz gleichzeitig vollzogen wurden, eröffnete 1976 die Möglichkeit zur industriellen Isomaltulose-Produktion (Crueger et al., 1979a; Crueger et al., 1979b; Crueger et al., 1979c). Probleme bei der Nutzung freier Zellen lagen jedoch in hohen Aufreinigungskosten und geringen Isomaltulose-Ausbeuten (Schiweck

et al., 1990). Fortschritte im Bereich der Immobilisierungstechniken ermöglichten die Entwicklung von stabileren, kosteneffektiveren Prozessen mit immobilisierten Mikroorganismen oder Enzymen, wobei aus ökonomischen Gesichtspunkten hauptsächlich ganze Zellen zum Einsatz kamen (Schiweck et al., 1991). Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über einige Patentanmeldungen für Isomaltulose-Herstellungsverfahren mit immobilisierten Biokatalysatoren.

Tabelle 2.2: Patentanmeldungen für Isomaltulose-Herstellungsverfahren mit immobilisierten Biokatalysatoren

Patentnummer	Offenlegungsdatum	Anmelder	Erfinder	Immobilisierter Biokatalysator
DE 30 38 219 A1	1982	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
EP 0 091 063 A2	1983	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
DE 32 13 107 A1	1983	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
US 4,640,894	1987	Südzucker AG	Munir, M.	ganzer MO
DE 30 38 218 A1	1982	Bayer AG	Kutzbach, C.; Schmidt-Kastner, G.; Schutt, H.	Enzym
EP 0 049 801 A2	1982	Bayer AG	Kutzbach, C.; Schmidt-Kastner, G.; Schutt, H.	Enzym
EP 0 160 260 A2	1985	Bayer AG	Egerer, P.; Haese, W.; Perrey, H.; Schmidt-Kastner, G.	ganzer MO
EP 0 160 253 A2	1985	Bayer AG	Haese, W.; Egerer, P.; Schmidt-Kastner, G.; Perrey, H.	ganzer MO
DE 35 28 752 A1	1986	Bayer AG	Egerer, P.; Crueger, W.; Schmidt-Kastner, G.	Enzym
US 4,857,461	1989	Bayer AG	Egerer, P.; Crueger, W.; Schmidt-Kastner, G.	Enzym
US 4,390,627	1983	Miles Laboratories	Lantero, O. J.	ganzer MO
GB 2 082 591 A	1982	Mitsui Sugar Co.	Shimizu, J.; Suzuki, K.; Nakajima, Y.	ganzer MO
DE 31 33 123 A1	1982	Mitsui Sugar Co.	Shimizu, J.; Yokohama, K.; Suzuki, K.; Ayase, K.; Nakajima, Y.; Yamato, K.	ganzer MO
EP 0 028 900 A1	1981	Tate & Lyle	Bucke, C.; Cheetham, P.S.J.	Enzym/ganzer MO
US 4,670,387	1987	Tate & Lyle	Bucke, C.; Cheetham, P.S.J.	Enzym/ganzer MO

MO = Mikroorganismus

Die Forschung zur Isomaltulose-Produktion mit immobilisierten Biokatalysatoren wurde ausgeweitet und dauern noch an (siehe Abschnitt 2.4.4). Weiterhin wurden Untersuchungen zur Isomaltulose-Herstellung in transgenen Pflanzen wie z. B. Kartoffeln (Börnke et al., 2002) und Zuckerrohr durchgeführt (Wu et al., 2007).

Im industriellen Maßstab (Deutschland: > 60.000 t/a) wird Isomaltulose durch die 1979 gegründete Palatinit GmbH, einem Tochterunternehmen der Südzucker AG, hergestellt. Mitsui Sugar, Japan und Cargill Corp., USA produzieren ebenfalls Isomaltulose (Eggleston, 2008).

Das von der Südzucker AG angewandte Verfahren beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Saccharose zu PalatinoseTM mit Hilfe von ganzen immobilisierten Zellen des nicht pathogenen Stamms *Protaminobacter rubrum* (Rose et al., 2002). Der erste Schritt des Prozesses ist die Vermehrung der Bakterien. Hierbei können als Medium Maisquellwasser oder Melassen mit zugesetztem Diammoniumhydrogenphosphat als Stickstoffquelle eingesetzt werden. Die Kultivierung unter sterilen Bedingungen erfolgt bei 30 °C, einem pH-Wert von 7,2 und einer Begasungsrate von 1 v/vm. Nach Abschluss der Fermentation werden die ganzen Zellen steril in Calcium-Alginat-Vollkugeln immobilisiert (Schiweck et al., 1990) und anschließend in einen Festbettreaktor transferiert. Die für die Umsetzung zu PalatinoseTM verwendete Saccharose-Lösung besitzt Lebensmittelqualität und wird mit einem pH-Wert von 6,0 steril in den Reaktor gepumpt. Die Fließrate wird so justiert, dass möglichst viel Saccharose umgesetzt werden kann. Auch bei Einsatz hoher Saccharose-Konzentrationen von bis zu 550 g/L sind Halbwertzeiten der Immobilisate von ca. 5.000 h üblich. Die anfallende PalatinoseTM wird durch Evaporation und anschließende Kristallisation gewonnen.

Für die PalatinitTM-Herstellung aus PalatinoseTM wurde ein zweiter Prozess etabliert (Rose et al., 2002). Hierbei wird die PalatinoseTM-Lösung direkt ohne Evaporation und Kristallisation für die Hydrierung zu PalatinitTM verwendet. Vorher muss jedoch die restliche Saccharose aus der PalatinoseTM-Lösung entfernt werden. Dies erfolgt mit immobilisierten toten *Saccharomyces-cerevisiae*-Zellen in einem dem ersten Festbettreaktor nachgeschalteten zweiten Enzymreaktor. Der größte Produktionsanteil der PalatinoseTM wird so direkt zu PalatinitTM umgesetzt (Munir, 1983).

Die bisher eine effizientere industrielle Isomaltulose-Herstellung limitierenden Faktoren sind unter anderem der unvollständige Substratumsatz sowie langsame Produktionsraten und der Anfall multipler Nebenprodukte (Fujii et al., 1983; Schiweck et al., 1991; Veronese et al., 1999). Eine Weiterentwicklung und Verbesserung der bestehenden Produktionsprozesse und

somit Senkung der Produktionskosten ist für die Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit, für die Erschließung neuer Märkte und den Erhalt des Produktionsstandortes Deutschland zwingend erforderlich.

2.2 Charakterisierung des Enzyms Isomaltulose-Synthase

2.2.1 Nomenklatur und Klassifizierung der Isomaltulose-Synthase

Das Enzym Isomaltulose-Synthase (Pall, EC 5.4.99.11) ist eine Isomerase und gehört wie auch α -Amylase zu der Glycosylhydrolase Familie 13 (Davies et al., 1995). Isomaltulose-Synthase katalysiert die Umwandlung von Saccharose in Isomaltulose und geringe Mengen Trehalulose. Codiert wird das Enzym durch das *pall*-Gen. Das Pall-Protein aus *Protaminobacter rubrum* ist ca. 70 kDal groß und besteht aus 600 Aminosäuren (Schubert et al., 2004). Die für Isomaltulose-Synthase zulässige Nomenklatur ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Nomenklatur der Isomaltulose-Synthase

EC 5.4.99.11 (Isomerase)	
Systematischer Name	Sucrose-Glucosylmutase (Isomaltulose-Synthase)
Weitere Namen	Isomaltulose Synthetase, Sucrose α -Glucosyltransferase, Trehalulose Synthase
Reaktion	Saccharose \rightarrow 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose
Substrat	Saccharose (1- α -D-Glucopyranosyl-2- β -D-fructofuranoside)
Produkt	Isomaltulose (6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose)

Quelle: Enzym-Datenbank BRENDA, *The Comprehensive Enzyme Information System*

2.2.2 Isomaltulose-Synthase bildende Mikroorganismen

Nur eine geringe Anzahl an Mikroorganismen ist in der Lage das Enzym Isomaltulose-Synthase zu bilden. Das Verhältnis von erzeugter Isomaltulose bzw. Trehalulose zu anderen Zuckern ist vom jeweiligen Stamm abhängig. Isomaltulose-Synthasen der Stämme *Protaminobacter rubrum* (Weidenhagen et al., 1957a; Schiweck et al., 1990), *Serratia plymuthica* (Krastanov et al., 2003), *Pantoea dispersa* (Wu et al., 2004), *Erwinia rhapontici* (Cheetham, 1984) und *Erwinia* sp. D12 (Kawaguti et al., 2007) erreichen Isomaltulose-

Ausbeuten von 75 - 85 %. Die höchsten Ausbeuten von 85 % werden mit Isomaltulose-Synthasen von *P. rubrum* und *E. rhapsodicum* erhalten. Die Ausbeute einiger Bakterien der Gattung *Klebsiella* variiert zwischen 65 bis 84 % Isomaltulose (Tsuyuki et al., 1992; Huang et al., 1998; Aroonual et al., 2007). *Leuconostoc mesenteroides* (Stodola et al., 1952) und einige *Enterobacter*-Spezies (Cho et al., 2007) sind ebenfalls in der Lage, Saccharose in Isomaltulose umzuwandeln. Die Stämme *Pseudomonas mesoacidophila* (Ravaud et al., 2005) und *Agrobacterium radiobacter* (Nagai-Miyata et al., 1993) produzieren hingegen als Hauptprodukt Trehalulose (Ausbeute ca. 90 %).

Die adaptive Rolle der Saccharose-Isomerisierung ist noch unklar. Es wird jedoch vermutet, dass die Umwandlung von Saccharose den Isomaltulose-Bildnern einen Selektionsvorteil verschafft. Isomaltulose kann nur von sehr wenigen Mikroorganismen metabolisiert werden, die Kohlenstoff- und Energiequelle Saccharose wird somit durch Umsetzung zu Isomaltulose für Konkurrenzorganismen unverwertbar gemacht (Cheetham et al., 1982; Zhang et al., 2002; Wu et al., 2004).

Für die industrielle Herstellung scheint bis jetzt nur der Stamm *P. rubrum* genutzt zu werden (Schiweck et al., 1991; Hamada, 2002). *P. rubrum* ist ein nicht pathogenes, stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, dessen Kolonien durch eine starke Rotfärbung auffallen (Windisch, 1958). Nach Immobilisierung der Zellen zeigte die Isomaltulose-Synthase von *P. rubrum* eine deutlich höhere Stabilität als die der immobilisierten *S.-plymuthica*-Zellen (Takazoe, 1989).

2.2.3 Reaktion der Isomaltulose-Synthase

Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Isomaltulose-Synthase ist Gegenstand intensiver Forschung. Für die Untersuchungen kamen dreidimensionale Kristallstrukturanalysen des Enzyms aus *Klebsiella* (Li et al., 2003a; Zhang et al., 2003a) und *P. rubrum* (Ravaud et al., 2006) und modernste Bioinformatik in Form computergestützter Strukturmodellierungen zum Einsatz (Lee et al., 2008).

Isomaltulose-Synthase katalysiert die Isomerisierung von Saccharose zu Isomaltulose, wobei der Glykosyltransfer durch einen 2-Schritt-Reaktionsmechanismus erfolgt (Davies et al., 1995; Veronese et al., 1999; Zhang et al., 2003b). Bei der Reaktion wird die glykosidische α -1,2-Bindung der Saccharose hydrolysiert und anschließend in eine α -1,6-Bindung überführt

(Zhang et al., 2002). Hierdurch entsteht die thermodynamisch stabilere Isomaltulose (Schiweck et al., 1990). Das Enzym besitzt zwei katalytische Aktivitäten: eine Hydrolase-Aktivität, wodurch die Nebenprodukte Glucose und Fructose gebildet werden, sowie eine Isomerase-Aktivität, die die Umwandlung zum Hauptprodukt Isomaltulose und zu Trehalulose katalysiert (Zhang et al., 2003a). In Abbildung 2.2 ist die enzymatische Reaktion der Isomaltulose-Synthese mit den entstehenden Produkten dargestellt.

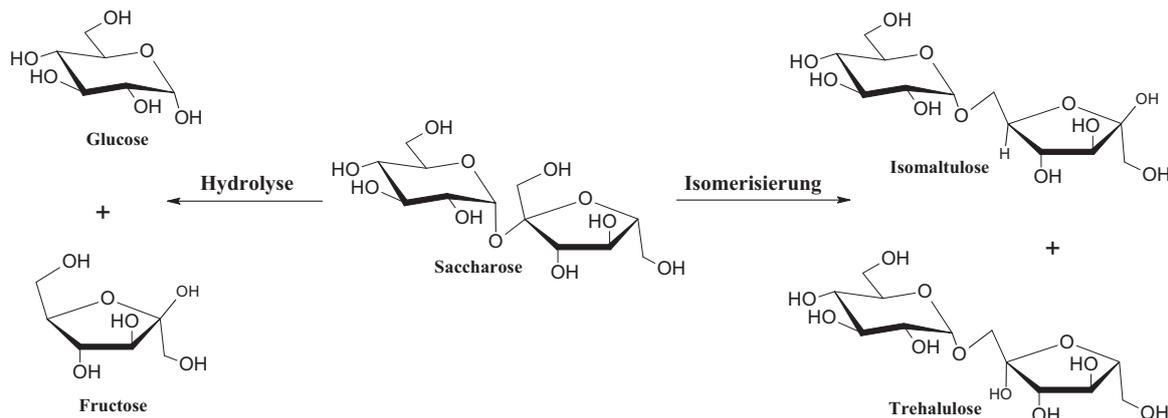


Abbildung 2.2: Enzymatische Reaktion der Isomaltulose-Synthese nach Park (Park et al., 2007)

Die Anteile der gebildeten Zucker sind unterschiedlich. Zusätzlich wirken sich Reaktionsparameter, hauptsächlich Temperatur und pH-Wert, auf das Produktspektrum aus (Schiweck et al., 1991; Ravaud et al., 2006). Die Bildung der Nebenprodukte verteuert den Herstellungsprozess durch höhere Aufarbeitungskosten und geringere Ausbeuten an Isomaltulose deutlich und ist deshalb unerwünscht. Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über das Produktspektrum des PalI-Enzyms von *P. rubrum* bei 20 °C.

Tabelle 2.4: Produktspektrum des PalI-Enzyms von *P. rubrum* bei 20 °C

Produkt	% Trockensubstanz
Isomaltulose (Palatinose™, Disaccharid)	79,0 - 84,5
Trehalulose (Disaccharid)	9,0 - 11,0
Fructose (Monosaccharid)	2,5 - 3,5
Glucose (Monosaccharid)	2,0 - 2,5
Isomaltose (Disaccharid)	0,8 - 1,5
Saccharose (Disaccharid)	0,5 - 1,0
Isomelezitose (Trisaccharid)	0,5
Rest	0,7 - 1,5

Quelle: Rose et al., 2002

Die Reaktion der Isomaltulose-Synthase ist irreversibel, d.h., dass keine Rückreaktion oder Gleichgewichtsreaktionen auftreten (Cheetham, 1984; Veronese et al., 1999). Das Enzym besitzt keine Bedürftigkeit von Ionen oder anderen Cofaktoren und kann durch Saccharose stabilisiert werden (Cheetham et al., 1982; Cheetham, 1984; Wu et al., 2005).

2.3 Fremdgenexpression in *E. coli*

2.3.1 Grundlagen der rekombinanten Genexpression in *E. coli*

Die Fremdgenexpression ermöglicht die Überwindung natürlicher Grenzen mikrobieller Produzenten. Durch den Einsatz moderner Gentechnik können viele wertvolle Substanzen wie z.B. therapeutische Proteine, Enzyme oder Chemikalien hergestellt werden. Aufgrund geringer Kosten, hoher Produktivitäten und Umsatzraten sowie breiter Anwendungsmöglichkeiten eignen sich bakterielle Expressionssysteme besonders gut für die Fremdgenexpression (Terpe, 2006).

Der am häufigsten für die heterologe Proteinexpression eingesetzte Wirt ist *Escherichia coli*. Das gramnegative Bakterium gehört zu den am besten genetisch und physiologisch charakterisierten Mikroorganismen und wird vielseitig für die industrielle und pharmakologische Proteinproduktion eingesetzt (Schmidt, 2004; Terpe, 2006; Walsh, 2006). *E. coli* zeichnet sich durch kurze Generationszeiten, eine einfache Handhabung und ein etabliertes Fermentations-*Know-how* aus (Baneyx, 1999; Schmidt, 2004). Neben der Fähigkeit, schnell zu hohen Zelldichten wachsen zu können, ist *E. coli* in der Lage, Fremdproteine in großen Mengen (> 20 % des totalen zellulären Proteingehaltes) mit hoher Ausbeute und Produktivität anzureichern (Schmidt, 2004). Aufgrund der intensiven Forschung der letzten Jahrzehnte ist heute eine große Anzahl an *E.-coli*-Expressionssystemen erhältlich (Sorensen et al., 2005; Yin et al., 2007). Zusätzlich steht ein reichhaltiges Repertoire an vielseitigen biotechnologischen Werkzeugen für die Klonierung, Fermentation und Produktaufreinigung zur Verfügung (Baneyx, 1999; Choi et al., 2006; Alexander et al., 2007).

Die Fremdgenexpression in *E. coli* weist jedoch Grenzen auf. Das Bakterium besitzt nur eine limitierte Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation und Sekretion von Proteinen (Schmidt, 2004; Alexander et al., 2007). Rekombinante Proteine werden meist im Cytoplasma oder im periplasmatischen Raum akkumuliert, wodurch ein Zellaufschluss erforderlich wird (Choi et al., 2006). Zusätzlich können sehr hohe Expressionsraten zur Bildung unlöslicher

Einschlusskörper (*Inclusion bodies*) führen, die eine aufwändige Rückfaltung der Proteine notwendig machen (Alexander et al., 2007).

Für eine erfolgreiche Produktion des Fremdproteins ist eine sorgfältige Auswahl des Expressionssystems zwingend erforderlich. Es gibt kein universelles System, das für jedes rekombinante Gen eine optimale Expression ermöglicht. Zusätzlich können sich Kultivierungsbedingungen auf die heterologe Expression auswirken. So kann z.B. die *Inclusion-body*-Bildung durch eine vorteilhafte Wahl des Expressionssystems und der Fermentationsbedingungen beeinflusst werden (Kopetzki et al., 1989; Friehs et al., 1993). Die wichtigsten Ansätze für eine Maximierung der rekombinanten Proteinproduktion sind daher die genetische Optimierung des Expressionssystems und die Optimierung der Kultivierungsbedingungen (Makrides, 1996; Jana et al., 2005).

2.3.2 Kultivierung von *E. coli*

Um hohe volumetrische Ausbeuten an Zielprotein zu erhalten, sollte die Kultivierung rekombinanter *E.-coli*-Zellen eine Vermehrung der Biomasse sowie eine hohe Fremdgenexpression ermöglichen. Für die Fermentation von Mikroorganismen können drei verschiedene Betriebsführungen zur Anwendung kommen. Hierbei unterscheidet man den Satzbetrieb (Batch, geschlossenes System) vom kontinuierlichen Betrieb (offenes System) und dem Zulaufverfahren (Fed-Batch, teiloffenes System) (Chmiel, 2006).

2.3.2.1 Satzverfahren (Batch)

Bei Satzverfahren werden alle für das Wachstum benötigten Nährstoffe am Anfang der Fermentation in dem Bioreaktor vorgelegt und die Produkte erst nach Beendigung des Wachstums entfernt. Während der Wachstumsphase werden ausschließlich Gase, z.B. für die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen, pH-Korrektur- oder Antischaummittel zugeführt und nur geringe Probenvolumina entnommen. Entstehende Volumenänderungen können vernachlässigt werden. Batch-Prozesse zeichnen sich durch einen geringen apparativen Aufwand und eine unkomplizierte Prozesskontrolle aus. Das Zellwachstum ist jedoch durch die nur begrenzt zur Verfügung stehenden Nährstoffe limitiert (Yee et al., 1992; Chmiel, 2006; Alexander et al., 2007).

Während des Batch-Verfahrens durchläuft das Wachstum mehrere charakteristische Phasen. Am Anfang der Fermentation liegen alle Nährstoffe im Überschuss vor, was zu einem unlimitierten Zellwachstum führt. Gegen Ende des Prozesses kommt es z.B. aufgrund von

Nährstoffmangel oder der Akkumulation inhibierender Produkte zum Erliegen des Wachstums (Chmiel, 1991). Abbildung 2.3 zeigt die für das Batch-Verfahren typische Wachstumskurve.

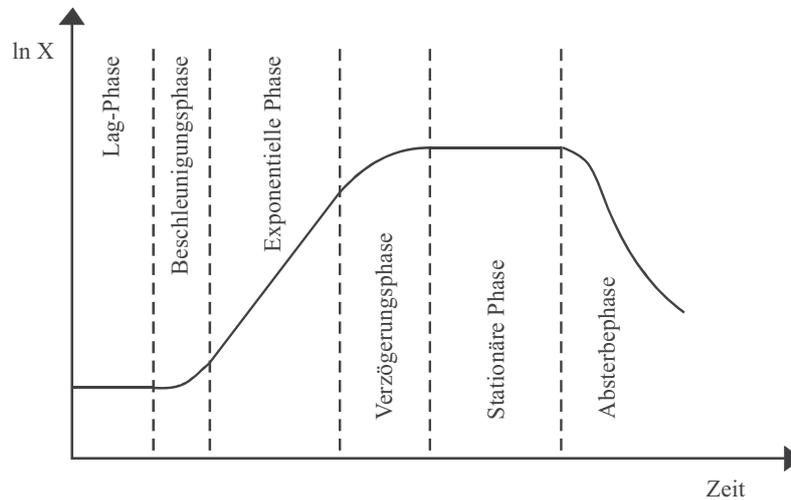


Abbildung 2.3: Wachstumskurve des Batch-Verfahrens nach Chmiel (Chmiel, 1991)

In der **Lag-Phase** (spezifische Wachstumsgeschwindigkeit $\mu \approx 0$) findet kein Wachstum statt. Die frisch in das Medium überführte Vorkultur adaptiert sich an die neue Umgebung. Hierbei wird die Expression der für den Substratabbau benötigten Enzyme induziert und die erste Zellteilung vorbereitet. Nach abgeschlossener Adaption an die neuen Kultivierungsbedingungen beginnen die Zellen in der **Beschleunigungsphase** ($\mu > 0$) zu wachsen. Die Wachstumsgeschwindigkeit nimmt zu. Bei Erreichen der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} beginnt die **Exponentielle Phase** ($\mu = \mu_{\max}$). Die Biomasse nimmt exponentiell mit der Zeit zu, wobei das Zellwachstum einer Kinetik 1. Reaktionsordnung folgt (Monod-Modell, siehe Gleichung 2-1). Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} ist eine für jeden Organismus spezifische Größe und wird in dieser Phase lediglich durch zellinterne Faktoren limitiert. Bei einer halblogarithmischen Auftragung der Biomasse über der Zeit (siehe Abbildung 2.3) entspricht μ_{\max} der Geradensteigung im Bereich der exponentiellen Phase (Chmiel, 1991).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot X \quad 2-1$$

- μ_{\max} : maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]
- X : Biomassekonzentration [g/L]
- t : Zeit [h]

Durch Integration der Gleichung 2-1 folgt Gleichung 2-2. Sie beschreibt die bei konstanter spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu = \mu_{\max}$) exponentielle Zunahme der Biomasse X.

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad 2-2$$

X_t : Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]

X_0 : Biomassekonzentration zu Beginn der exponentiellen Phase [g/L]

μ : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]

t : Zeit [h]

In der **Verzögerungsphase** ($\mu < \mu_{\max}$) verlangsamt sich das Zellwachstum aufgrund eintretender Substratlimitierung. Die Reaktion wird durch die aktuelle Substratkonzentration kontrolliert, wodurch die Gerade aus dem Bereich des exponentiellen Wachstums gegen $\mu = 0$ abflacht (siehe Abbildung 2.3). Der funktionelle Zusammenhang zwischen spezifischer Wachstumsgeschwindigkeit μ und der Konzentration des limitierenden Substrates S kann in einfachen Fällen durch die Monod-Kinetik beschrieben werden (Gleichung 2-3). Hierbei wird angenommen, dass das Wachstum nur durch eine Substanz limitiert ist (Chmiel, 1991).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S_t}{S_t + K_S} \quad 2-3$$

μ : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]

μ_{\max} : maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]

S_t : Substratkonzentration zum Zeitpunkt t [g/L]

K_S : Sättigungs- oder Affinitätskonstante des Substrates [g/L]

Neben der Limitierung von Nährstoffen kann auch eine Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten für die Verlangsamung des Zellwachstums verantwortlich sein. Dies wird in Gleichung 2.3 nicht berücksichtigt. Nach der vollständigen Erschöpfung der Substrate tritt die Kultur in die **Stationäre Phase** ($\mu \approx 0$) ein. Die maximale Biomassekonzentration wurde erreicht, es ist kein Zellwachstum mehr möglich. Durch Verbrauch von intrazellulären Speicherstoffen wird der Erhaltungsstoffwechsel kurzzeitig aufrecht erhalten. In der **Absterbephase** ($\mu < 0$) sind alle Energiereserven verbraucht. Die Zellen lysieren und die Biomassekonzentration nimmt ab (Chmiel, 1991).

2.3.2.2 Kontinuierliches Verfahren

Kontinuierliche Systeme sind für die Gas- und Flüssigphase ständig offen. Es tritt fortwährend flüssiges Medium in den Bioreaktor ein und es wird laufend bewachsene Kulturbrühe abgezogen. Bei gleichen Zu- und Ablaufraten bleibt das Arbeitsvolumen die gesamte Reaktionszeit über konstant und es stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein (Chmiel, 2006). Für die Produktion rekombinanter Proteine finden kontinuierliche Systeme wenig Anwendung. Diese Betriebsform wird z.B. zur Untersuchung relevanter Medienbestandteile (Yee et al., 1993b), der Acetat-Produktion (Han et al., 1992) oder des Einflusses der Wachstumsrate auf den Plasmidgehalt (Seo et al., 1986) verwendet.

2.3.2.3 Zulaufverfahren (Fed-Batch)

Zulaufverfahren sind besonders gut für die Erreichung hoher Zelldichten geeignet. Nach einer kurzen Batch-Phase mit unlimitiertem Zellwachstum werden in der anschließenden Fed-Batch-Phase dem Fermenter gezielt Nährstoffe zugeführt und somit die Wachstumsphase der Zellen verlängert. Das Arbeitsvolumen des Bioreaktors nimmt nun kontinuierlich zu (Yee et al., 1992). Im Vergleich zum Batch-Betrieb ermöglicht das Zulaufverfahren den Einsatz geringerer Substratstartkonzentrationen. Hohe Substratkonzentrationen können zu einer Wachstumshemmung (Substrathemmung) (Riesenberg, 1991) oder zur Nährstoffüberladung der Zellen führen (Overflow-Metabolismus) (Johnston et al., 2002). Ein Überschuss an Substrat und hohe Wachstumsraten verursachen bei *E. coli* auch unter strikt aeroben Bedingungen eine Produktion von Acetat (Bech Jensen et al., 1990). Die Aufnahmerate der Kohlenstoffquelle übersteigt in diesem Fall ihre Umsetzungsgeschwindigkeit in Biomasse und Stoffwechselenergie (Holms, 1986). Grund hierfür ist die begrenzte Kapazität des oxidativen Metabolismus, der durch den Citratzyklus (Han et al., 1992) und die Elektronentransportkette (Majewski et al., 1990) limitiert ist. Dieses Phänomen wird auch bakterieller *Crab-Tree*-Effekt genannt (Doelle, 1982). Abhängig vom jeweiligen Stamm führen Acetat-Konzentrationen ab 5 - 10 g/L zur Beeinträchtigung und ab 10 - 20 g/L zur vollständigen Hemmung des Zellwachstums (Bech Jensen et al., 1990; Yee et al., 1993a). Acetat kann sich auch negativ auf die Fremdgenexpression auswirken (Lee, 1996). Durch die Regelung der Zulauftrate des Mediums (*Feed*) können das Wachstum und der Metabolismus der Zellen gesteuert werden. Durch Limitierung der Nährstoffe (meist C-Quelle) ist es möglich, die Acetat-Produktion zu unterbinden und somit hohe Zelldichten und hohe volumetrische Produktivitäten zu erreichen. Es wurden in der Literatur verschiedene Fütterungsstrategien für

die Hochzelllichtfermentation beschrieben (Kleman et al., 1992; Riesenberg et al., 1999; Shiloach et al., 2005). Hierbei unterscheidet man vorgegebene Fütterungsprofile (konstante oder exponentielle Fütterungen) von Feedback-Kontrollsystemen (z.B. DO-stat, oder pH-stat). Bei konstanter (Märkl et al., 1993) und exponentieller (Korz et al., 1995; Vidal et al., 2005) Fütterung erfolgt die Nährstoffzufuhr unabhängig von Kultivierungsparametern nach einem vorgegebenen Profil. Die für diese Strategien benötigte Prozesskontrolle ist sehr einfach, das System ist jedoch nicht in der Lage, auf physiologische Veränderungen der Kultur zu reagieren. Feedback-Systeme regeln den *Feed*-Zulauf hingegen aufgrund von Prozessparametern wie z.B. CO₂- (Pinsach et al., 2006; Sun et al., 2006), pO₂- (Akesson et al., 1999; Whiffin et al., 2004; Velut et al., 2007) oder pH-Wert (Suzuki et al., 1990; Kim et al., 2004). Die Parameter werden während der Fermentation kontinuierlich aufgenommen, von der Regelungssoftware ausgewertet und anschließend die Nährstoffzufuhr entsprechend verändert. Hierdurch ist die flexible Anpassung der Fütterung an aktuelle Bedürfnisse der Zellen möglich. Die für diese Fütterung benötigte Prozesskontrolle ist im Vergleich zu vorgegebenen Systemen komplexer.

2.3.3 Einflussfaktoren auf die Fremdgenexpression

Für die Expression von Fremdproteinen wird meist eine große Anzahl an Ressourcen der Wirtszelle benötigt. Neben der wirtseigenen Synthese müssen rekombinante Mikroorganismen zusätzlich die Plasmid-Replikation, die Expression von Resistenzgenen sowie die Transkription und Translation des heterologen Proteins bewältigen. Hierbei entsteht eine starke Konkurrenz zwischen der Bildung zelleigener und rekombinanter Proteine um die Verfügbarkeit des Syntheseparameters und der vorhandenen Stoffwechselenergie (Bailey, 1993). Die für die Fremdgenexpression verwendeten Ressourcen stehen dem Wirtsmetabolismus nicht mehr zur Verfügung, wodurch der Zelle eine hohe metabolische Belastung auferlegt wird (Glick, 1995; Diaz-Ricci et al., 2000). Dies äußert sich z.B. in einer stark reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit (Birnbaum et al., 1991). Für eine erfolgreiche heterologe Expression ist daher eine zusammenhängende Betrachtung von rekombinanter Proteinproduktion und Wirtsstoffwechsel zwingend erforderlich.

Die Fremdgenexpression wird durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst. Diese können in molekularbiologische Einflussgrößen und Parameter der Prozessführung eingeteilt werden. Zu den molekularbiologischen Faktoren zählen z.B. das Wirt-/Vektorsystem (Jung et al.,

2008), die Gendosis (Jana et al., 2005), die Promotorstärke (Makrides, 1996), das Induktionssystem (Friehts et al., 1993) und die Plasmidstabilität (Zabriskie et al., 1986). Prozessparameter wie z.B. Kultivierungstemperatur (Donovan et al., 1996), Sauerstoffversorgung (Tomazetto et al., 2007) und Medienzusammensetzung (Hoffmann et al., 2004) sowie die gewählte Fütterungsstrategie (Zabriskie et al., 1987) und die resultierende Acetat-Produktion (Lee, 1996) können sich ebenfalls auf die heterologe Expression auswirken. Viele der oben genannten Faktoren beeinflussen die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Zelle. Diese stellt einen weiteren wichtigen Parameter dar, mit dem Einfluss auf die Fremdgenexpression genommen werden kann (Kim et al., 1996; Babaeipour et al., 2008).

2.3.3.1 Induktion

Die Expression rekombinanter Gene kann abhängig vom verwendeten Promotor konstitutiv oder kontrolliert erfolgen. Beide Systeme haben Vor- und Nachteile. Konstitutive Systeme ermöglichen eine einfache Betriebsführung. Die Produktion des heterologen Proteins erfolgt zeitgleich mit dem Zellwachstum ohne notwendige Temperaturveränderung oder Zugabe induzierender Substanzen. Eine konstitutive Fremdgenexpression kann sich jedoch aufgrund der zusätzlichen metabolischen Belastung der Zelle negativ auf die spezifische Wachstumsrate und die Plasmidstabilität auswirken (Zabriskie et al., 1986; Menart et al., 2003). Besonders bei der Produktion von für den Wirt toxischen Proteinen ist eine konstitutive Expression von Nachteil. In diesem Fall ist eine Trennung von Wachstum und Produktion unumgänglich. Dies kann mit Hilfe einer kontrollierten Induktion der Fremdgenexpression nach Erreichen hoher Zelldichten erfolgen. Der Zelle wird somit ein durch die heterologe Proteinproduktion unbeeinträchtigt Wachstum ermöglicht. Die richtige Wahl des Induktionszeitpunktes ist hierbei essentiell (Durany et al., 2005).

Eine Induktion kann chemisch oder durch Veränderung der Kultivierungstemperatur erfolgen. Die Kosten für chemische Induktoren und der Energieaufwand für die thermische Induktion können für industrielle Prozesse sehr hoch werden (Choi et al., 2006). Aus diesem Grund wird der Einsatz wirtschaftlich günstigerer Induktoren wie z.B. Lactose in Form von Molke untersucht (Viitanen et al., 2003). Eine zu starke Induktion kann die Wirtszelle erheblich belasten und zur Bildung von *Inclusion bodies* führen (Hewitt et al., 2007). So verursacht der Induktor IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid) eine Reduzierung der spezifischen Wachstumsrate und eine der bakteriellen Hitze-Schock-Antwort ähnlichen Reaktion (Kosinski et al., 1992; Haddadin et al., 2005).

2.3.3.2 Kultivierungstemperatur und Medienzusammensetzung

Für verschiedene Expressionssysteme variiert die optimale Kultivierungstemperatur. Im Allgemeinen vergrößert eine hohe Temperatur die Plasmidkopienzahl, sie kann jedoch gleichzeitig zu einer Verringerung der Plasmidstabilität führen (Friehs et al., 1993). Die Proteinexpression verläuft bei höheren Kultivierungstemperaturen schneller, bei niedrigeren Temperaturen ist hingegen oft eine langsame aber dafür länger andauernde Proteinproduktion zu beobachten. Durch Herabsetzen der Temperatur kann neben der Expressions- auch die Wachstumsrate der Zellen verringert werden. Beide Phänomene werden zur Verhinderung der Bildung unlöslicher *Inclusion bodies* eingesetzt (Schein et al., 1988; Kopetzki et al., 1989). Zusätzlich kann durch niedrigere Kultivierungstemperaturen die Lyse der Zellen reduziert werden (Chalmers et al., 1990). Zu geringe Temperaturen können jedoch zur vollständigen Einstellung der Fremdgenexpression führen (Shin et al., 1997).

Bei der Kultivierung rekombinanter Mikroorganismen kann sich die Medienzusammensetzung auf das Zellwachstum und auf die Fremdgenexpression auswirken. Durch den Einsatz von Minimalmedien ist aufgrund ihrer definierten Zusammensetzung eine genaue Kontrolle der Nährstoffkonzentrationen möglich. Dies ist bei einer substratlimitierten Fütterung von großem Vorteil (Yee et al., 1992). Aufgrund der zusätzlichen metabolischen Belastung der Zelle kann für eine optimale Fremdgenexpression bei gleichzeitig gutem Wachstum jedoch die Zugabe komplexer Medienbestandteile wie z.B. Hefeextrakt oder Pepton erforderlich sein (Donovan et al., 1996; Fu et al., 2006). Die Mikroorganismen werden hierdurch mit biosynthetischen Vorstufen und Wachstumsfaktoren versorgt. Die Supplementation von Hefeextrakt kann zu schnellerem Zellwachstum (Chen et al., 1992), einer erhöhten heterologen Expression (Panda et al., 2000; Fu et al., 2006) und einer verbesserten Stabilität der rekombinanten Proteine durch geringere Proteaseaktivitäten führen (Yoon et al., 1994a; Yoon et al., 1994b). Zusätzlich wurde in komplexen Medien eine höhere Plasmidstabilität erhalten (Chen et al., 1992). Durch die Zugabe von Hefeextrakt kann eine übermäßige Acetat-Produktion verhindert und gleichzeitig die Metabolisierung von Acetat bei limitierter Kohlenstoffquelle gefördert werden (Panda et al., 2000). Eine Verwendung von Glycerin als C-Quelle anstelle von Glucose reduziert bei aerobem Zellwachstum ebenfalls die Acetat-Produktion (Losen et al., 2004).

2.3.3.3 Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ ist der wichtigste Prozessparameter, der das dynamische Verhalten der Mikroorganismen während der Fermentation widerspiegelt (Babaeipour et al., 2008). Sie kann z.B. durch eine gezielte Nährstoffzufuhr, die Kultivierungstemperatur oder die Sauerstoffversorgung reguliert werden. Genetische Faktoren wie die Plasmidkopienzahl beeinflussen ebenfalls die maximale spezifische Wachstumsrate. Je höher die Anzahl der Plasmide pro Zelle, desto langsamer ist das Wachstum des rekombinanten Wirts (Birnbaum et al., 1991; Diaz-Ricci et al., 2000).

Durch die systematische Regulierung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit kann Einfluss auf die Fremdgenexpression genommen werden. So führen hohe Wachstumsraten aufgrund gesteigerter Ribosomenanteile in der Zelle zu einer vermehrten heterologen Proteinproduktion (Shin et al., 1998; Hoffmann et al., 2004). Gleichzeitig sinkt mit steigender Wachstumsgeschwindigkeit die Plasmidkopienzahl (Seo et al., 1985; Lin-Chao et al., 1986). Dies verursacht wiederum eine Abnahme der Fremdgenexpression (Koo et al., 1999). Bei zu schnellem Wachstum kann außerdem die Kapazität des Wirtsorganismus zur korrekten Proteinbildung überschritten werden. Die Folge ist eine Bildung unlöslicher *Inclusion bodies* (Hoffmann et al., 2004).

Eine Reduzierung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit bewirkt hingegen ein Ansteigen der Plasmidkopienzahl (Bentley et al., 1990; Friehs et al., 1993). Bleibt hierbei der Ribosomenanteil groß genug, so kann die Fremdgenexpression im Vergleich zu höheren Wachstumsraten erheblich gesteigert werden (Emerick et al., 1984; Riesenberget al., 1990). Dies ist mit Hilfe der Prozessführung z.B. durch Limitierung der Sauerstoffzufuhr realisierbar (Unutmaz et al., 1997; De Leon et al., 2003). In Hinblick auf die Prozessrentabilität ist zu beachten, dass das Herabsetzen der spezifischen Wachstumsrate zu verlängerten Fermentationszeiten und geringeren Biomasseausbeuten führt.

Die optimale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit für maximale heterologe Proteinproduktionen hängt vom verwendeten Expressionssystem ab (Sanden et al., 2003; Cheng et al., 2003; Kavanagh et al., 2008). Hierbei wurden von einigen Forschergruppen unterschiedliche Einflüsse der Wachstumsrate vor und nach dem Induktionszeitpunkt beobachtet (Kim et al., 1996; Wong et al., 1998; Babaeipour et al., 2008). Für eine erfolgreiche Überproduktion von Fremdproteinen sollte die Prozessführung unter Berücksichtigung der genetischen Konstruktion und der Physiologie der Wirtszelle angepasst werden (Hoffmann et al., 2004).

2.4 Immobilisierung von Biokatalysatoren

2.4.1 Grundlagen der Immobilisierung

Im Vergleich zu chemischen Katalysatoren besitzen Biokatalysatoren viele Vorteile wie z.B. extrem hohe Aktivitäten, einzigartige Reaktionsspezifitäten (Substrat- und Produktspezifitäten, Stereoselektivität, Regioselektivität, etc.) und die Eigenschaft, unter sehr milden Reaktionsbedingungen agieren zu können (wässrige Lösung bei mildem pH-Wert, Umgebungstemperatur und -druck) (Klein et al., 1985; Buchholz et al., 1997). Für den industriellen Einsatz sind jedoch besonders Enzyme zu instabil. Sie deaktivieren schnell durch Autolyse, Proteinfaltung oder Aggregation und können nur schwer wiederverwendet werden (Sangeetha et al., 2008). Mit Hilfe der Immobilisierung von Biokatalysatoren ist es möglich diese Nachteile zu überwinden (Klibanov, 1983; Chibata et al., 1986). So kann die Immobilisierung zu einer Stabilisierung der Biokatalysatoren gegenüber mechanischen und physiologischen Einwirkungen wie z.B. organischen Lösungsmitteln, extremeren pH-Werten und höheren Temperaturen führen (Clark, 1994; Mateo et al., 2007). Die Immobilisate sind aus der Reaktionslösung leicht abtrennbar, wodurch die Prozessführung vereinfacht und ein kontinuierlicher oder wiederholter Einsatz möglich wird (Buchholz et al., 1997). Zusätzlich kann die Raum-Zeit-Ausbeute durch Einsatz hoher katalytischer Aktivität auf engem Raum erhöht werden. Die Immobilisierung ermöglicht eine hohe Prozessstabilität und eine bessere Reproduzierbarkeit (Jekel et al., 1996). Die Langzeit- und Lagerstabilität der Immobilisate sind im Vergleich zu freien Enzymen oder Zellen meist sehr hoch. Aufgrund dieser Vorteile führt die Immobilisierung der Biokatalysatoren oft zu einer erheblichen Reduzierung der Prozesskosten (Katchalski-Katzir, 1993).

Per Definition stellen immobilisierte Biokatalysatoren Enzyme oder Zellen dar, die durch chemische und/oder physikalische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt oder fixiert sind, wodurch eine Wiederverwendbarkeit möglich wird (Chibata et al., 1986). Bei der Wahl der Immobilisierungsprozedur sollten mögliche Probleme wie Deaktivierung der Biokatalysatoren, Diffusionslimitierungen und Immobilisierungskosten beachtet werden. Die in der Literatur beschriebenen Immobilisierungsmethoden lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen. Hierbei unterscheidet man zwischen durch Kopplung und durch Einschluss immobilisierte Biokatalysatoren. Zu der Gruppe der durch Kopplung immobilisierenden Methoden gehören die Trägerbindung und Quervernetzung. Bei den Einschlussmethoden

unterscheidet man die Matrixeinhüllung von der Membrantrennung. Abbildung 2.4 gibt einen Überblick über die Einteilung der Immobilisierungsmethoden (Klein et al., 1985; Hartmeier, 1986).

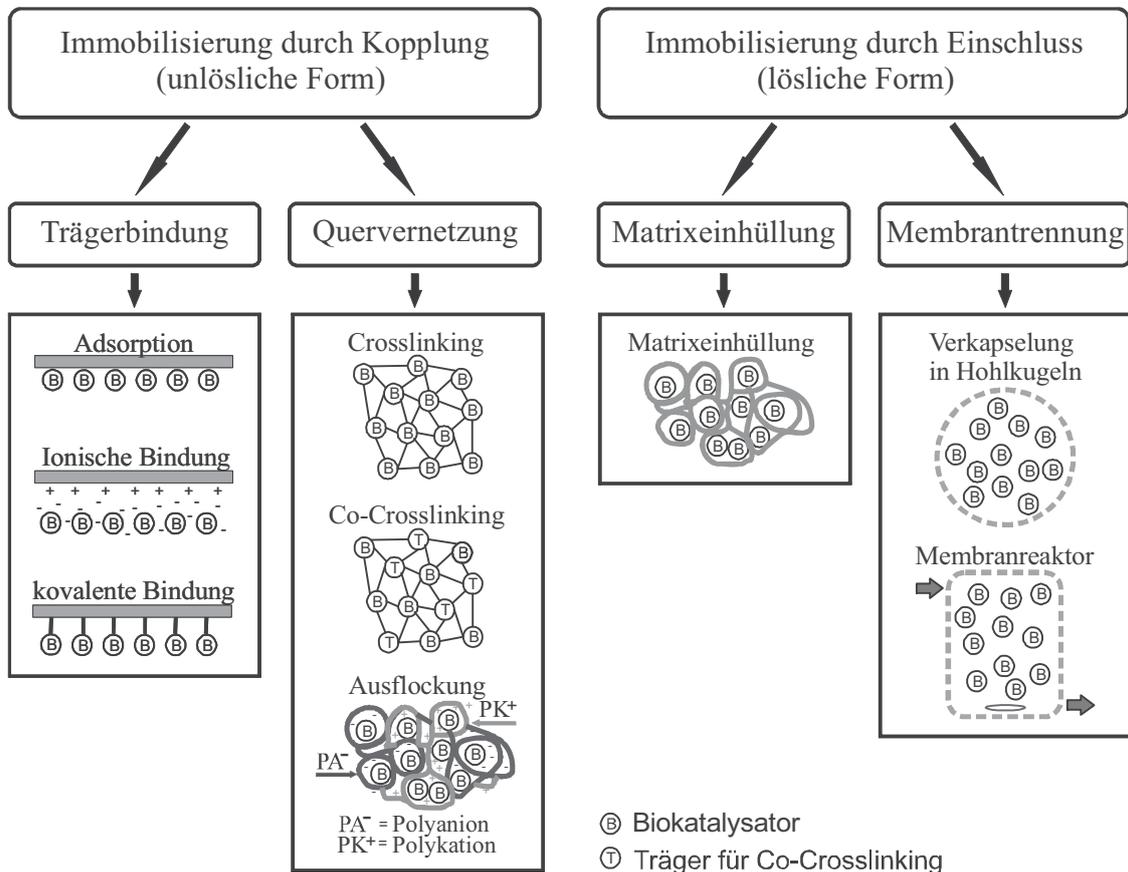


Abbildung 2.4: Einteilung der Immobilisierungsmethoden, zusammengefasst nach Klein et al., 1985 und Hartmeier, 1986

Jede Immobilisierungsmethode hat ihre Vorzüge und Nachteile. Die Adsorption an einen Träger stellt z.B. eine sehr einfache und schonende Methode dar. Die adsorptive Bindung ist jedoch relativ schwach, wodurch es bei Verwendung des Immobilisates zum Verlust des Biokatalysators kommen kann. Die kovalente Bindung führt hingegen zu einer sehr starken Befestigung. Hierbei kommt es jedoch aufgrund der rauen Immobilisierungsprozeduren fast immer zu Schädigungen der Biokatalysatoren und damit zu Aktivitätsverlusten (Hartmeier, 1986). Die Vor- und Nachteile der Immobilisierungsmethoden sollten für die jeweilige Anwendung sorgfältig abgewogen und so ein passendes Immobilisierungsverfahren ausgewählt werden. Tabelle 2.5 zeigt den Einfluss verschiedener Immobilisierungsmethoden auf die biokatalytische Aktivität von *Erwinia-rhapontici*-Zellen (Bucke, 1983).

Tabelle 2.5: Einfluss der Immobilisierungsmethode auf die Biotransformation von Saccharose zu Isomaltulose durch *Erwinia-rhapontici*-Zellen

	Aktivität [g/g BFM/h]	Halbwertszeit [h]
Freie Zellen	0,600	36
Einschluss in Calcium-Alginat	0,325	8500
Einschluss in Polyacrylamid	0,130	570
Adsorption an DEAE-Cellulose	0,583	400
Quervernetzung mit Glutardialdehyd	0,153	40
Einschluss in K-Carrageenan	0,263	38
Einschluss in Agar	0,340	27
Adsorption an Knochenkohle	0,010	25
Quelle: Bucke, 1983	BFM = Biofeuchtmasse	

2.4.2 Quervernetzung mit Glutardialdehyd

Bei der Quervernetzung, auch Crosslinking genannt, werden einzelne Biokatalysatoreinheiten durch bi- oder multifunktionale Reagenzien miteinander zu dreidimensionalen Strukturen kovalent vernetzt. Das am häufigsten verwendete bifunktionale Reagenz ist Glutardialdehyd (Hartmeier, 1986; Bickerstaff, 1997).

Glutardialdehyd (GDA), ein lineares 5-Carbon-Aldehyd, ist eine klare, farblose bis leicht strohfarbene, ölige Flüssigkeit, die in jeglichen Verhältnissen in Wasser, Alkohol und organischen Lösungsmitteln löslich ist (Migneault et al., 2004). Die erste Synthese von GDA erfolgte 1908 durch Harris und Tank (Harries et al., 1908). 1963 stellten Sabatini, Bensch und Barnett GDA als Reagenz für die Gewebefixierung vor (Sabatini et al., 1963). Weitere Verwendung fand GDA als Gerbstoff (Fein et al., 1959) und als Fixierungsmittel für die Röntgenstrukturanalyse (Quiocho et al., 1964). GDA wird außerdem vielfach zur Quervernetzung und Fixierung in der Immunochemie eingesetzt (Douillard et al., 1983).

Die breite Anwendung von GDA in der Proteinquervernetzung ist auf seine Stabilität in wässriger Lösung und die Fähigkeit bei neutralem pH-Wert schnell mit freien Aminogruppen reagieren zu können zurückzuführen. Zwischen GDA und den Proteinen kann es hierbei sowohl zu intra- als auch intermolekularen Reaktionen kommen (Klibanov, 1983; Okuda et al., 1991). Viele Forschungsgruppen haben sich mit den Reaktionen von Glutardialdehyd beschäftigt, der genaue Quervernetzungsmechanismus ist bis heute noch nicht völlig verstanden (Richards et al., 1968; Kawahara et al., 1997; Migneault et al., 2004). Fest steht jedoch, dass GDA in wässriger Lösung in vielen verschiedenen Formen vorliegen kann (Korn

et al., 1972; Kawahara et al., 1992), die von den jeweiligen Reaktionsbedingungen abhängen. Alle GDA-Strukturen scheinen Vernetzungsreaktionen mit Proteinen eingehen zu können, wodurch sich eine breite Palette an möglichen Konjugaten ergibt (Walt et al., 1994). Für eine erfolgreiche Vernetzung ist die individuelle Anpassung der jeweiligen Reaktionsbedingungen somit essentiell (Walt et al., 1994; Migneault et al., 2004).

GDA ist kommerziell erhältlich, günstig, hoch reaktiv und erlaubt eine einfache Handhabung, wodurch es effiziente und schnelle Quervernetzungsreaktionen ermöglicht. Aufgrund der kovalenten Bindung zwischen GDA und den Biokatalysatoren kann es jedoch durch Konformationsänderungen oder Bindungen im Aktiven Zentrum zu Aktivitätsverlusten kommen (Chui et al., 1997). Durch GDA quervernetzte Immobilisate zeigen meist nur sehr unzureichende mechanische Stabilität und sind z.B. für den Einsatz in Festbettreaktoren ungeeignet. Aus diesem Grund wird die Quervernetzung meist zur Stabilisierung toter Zellsysteme oder zur Molekulargewichtsvergrößerung von Enzymen eingesetzt, wonach ein weiterer Immobilisierungsschritt wie z.B. der Einschluss in Hydrogele folgt (Jahnz et al., 2002; Kostova et al., 2008). Die Beschaffenheit des GDA-Netzwerkes kann durch Co-Quervernetzung mit zusätzlichen Verbindungen wie z.B. Chitosan, Albumin oder Gelatine beeinflusst werden. Hierdurch kann eine weitere Molekulargewichtsvergrößerung erreicht oder sterischen Problemen entgegengewirkt werden (Bickerstaff, 1997).

2.4.3 Immobilisierung durch Matrixeinschluss

Die Methode des Matrixeinschlusses basiert auf der Immobilisierung von Zellen oder Enzymen durch Einbetten in eine polymere Matrix. Der Unterschied zur kovalenten Bindung und Quervernetzung liegt darin, dass die Biokatalysatoren nicht selber an die Matrix gebunden werden, sondern frei in Lösung vorliegen. Voraussetzung für die Funktionalität dieser Immobilisierungsmethode ist die Wahl der richtigen Porosität (*Cut Off*) des Gels. Substrate und Produkte sollen frei in der Matrix diffundieren können und gleichzeitig muss eine Rückhaltung der Biokatalysatoren gewährleistet sein. Bei der Auswahl der Matrix müssen aus diesem Grund Eigenschaften des Stofftransports und der Biokatalysatorrückhaltung gegeneinander abgewogen werden (Rosevear, 1984; Hartmeier, 1986). Enzyme sind meistens zu klein um allein durch Matrixeinschluss erfolgreich immobilisiert werden zu können. Mit Hilfe der Quervernetzung kann eine Molekulargewichtsvergrößerung der Enzyme erreicht und eine Rückhaltung im Gel realisiert werden. Durch den Einschluss in eine polymere Matrix wird der Biokatalysator vor äußeren mechanischen und physiologischen

Einflüssen geschützt. Aus diesem Grund ist diese Immobilisierungsmethode besonders für empfindliche lebende Zellen geeignet (Bucke, 1983).

Für den Matrixeinschluss können natürliche (Cheetham et al., 1979; Vorlop et al., 1987) oder synthetische Polymere (Mosbach et al., 1966; Vorlop et al., 1992a) eingesetzt werden. Zu den Biopolymeren zählen z.B. Agar, Gelatine, Alginat, Pectinat, κ -Carrageenan und Chitosan. Diese Materialien erlauben sehr milde Immobilisierungsprozeduren wie die Kältegelierung oder Ionotrophe Gelbildung (Klein et al., 1985). Sie besitzen jedoch eine oft unzureichende mechanische Stabilität und sind biologisch abbaubar, wodurch sie potentiellen Kontaminanten als Nährstoffquelle dienen können (Muscat et al., 1996). Im Gegensatz dazu sind synthetische Polymere wie Polyacrylamid, Polyurethanen, Polycarbamoylsulfonat oder Polyvinylalkohol stabiler und werden nur schwer biologisch abgebaut (Haschke et al., 1998). Sie erlauben somit eine unsterile Prozessführung, die eine erhebliche Kostenreduzierung für industrielle Prozesse darstellt (Wittlich et al., 2004).

2.4.3.1 Matrixeinschluss mit Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVAL) wurde 1915 durch Klatté (Chemische Fabrik Griesheim Elektron) entdeckt. Die Herstellung von PVAL durch Verseifung von Polyvinylacetat mit ätzendem Soda wurde erstmals 1924 von Herrmann und Haehnel beschrieben. Da das Monomer Vinylalkohol nicht in freier Form existieren kann, wird PVAL auch heutzutage noch durch Polymerisierung von Vinylacetat und anschließender Alkoholyse gewonnen (Herrmann et al., 1927; Staudinger et al., 1927). Vielfältige Anwendungen findet PVAL in der Kunststoff-, Textil-, Klebstoff-, Papier-, Farben- und Verpackungsindustrie (Clariant GmbH, 1999).

Polyvinylalkohol ist ein hydrophiles Polymer, dessen wässrige Lösungen fähig sind, selbständig zu gelieren. Hierbei bilden Hydroxylgruppen benachbarter Polymerketten Wasserstoffbrückenbindungen aus, wodurch ein nichtkovalentes Netzwerk entsteht. Der Prozess dauert jedoch lange und die Konsistenz der so entstehenden Gele ist sehr dünn. Zu den Parametern, die die Stärke von PVAL-Hydrogelen beeinflussen, zählen der Grad der Acetylierung des verwendeten PVAL, die Kettenlänge des Polymers und die PVAL-Konzentration in der Lösung (Clariant GmbH, 1999). Abbildung 2.5 zeigt die chemische Struktur eines PVAL-Hydrogels.

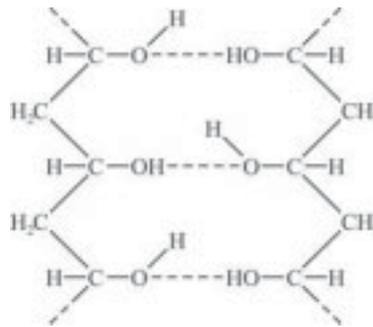


Abbildung 2.5: Chemische Struktur eines PVAL-Hydrogels

Eine effektivere Gelierung von PVAL ist durch seine Quervernetzung mit Borsäure (Clariant GmbH, 1999) oder durch Einfrieren und langsames Auftauen, die *freeze-thaw*-Methode (Watase et al., 1983; Lozinsky et al., 2008), möglich. Die PVAL-Lösung kann z.B. beim Tropfen in flüssigen Stickstoff mit Hilfe eines Strahlschneiders[®] (Vorlop et al., 1996) in < 1 mm große biokatalysatorbeladene Kugeln verarbeitet werden (Muscat et al., 1996). Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wird die Stabilität der PVAL-Hydrogele verbessert (Nambu et al., 1984). Stabile Hydrogele bei nur einmaligem Einfrieren erhält man durch die Zugabe von Alkohol oder Polyolen wie Glycerin und Polyethylenglykol zu wässrigen PVAL-Lösungen (Vorlop et al., 1991; Vorlop et al., 1992b). Die durch Quervernetzung mit Borsäure erhaltenen PVAL-Gele sind brüchig und zeigen eine unzureichende Stabilität. Die *freeze-thaw*-Methode bringt hingegen stabile und elastischere PVAL-Hydrogele hervor. Besonders bei wiederholtem Einfrieren ist diese Methode jedoch kompliziert, sehr energieaufwändig und teuer. Die 1995 von Vorlop und Ding entwickelte Gelierungsmethode ermöglicht die Herstellung von PVAL-Hydrogelen bei Raumtemperatur durch Zugabe von nichtwässriger OH- oder NH₂-Gruppen enthaltender Verbindungen (Ding et al., 1995). Ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt wird die von Vorlop und Jekel entwickelte neue Herstellungsmethode für LentiKats[®] (Jekel et al., 1998b; Vorlop et al., 2000). Diese schonende Methode zeichnet sich durch eine effiziente, einfache, schnelle und kostengünstige Immobilisierung aus (Wittlich et al., 2004).

Der Einschluss von Biokatalysatoren in PVAL-Hydrogele hat viele Vorteile. PVAL weist nur eine geringe Toxizität auf, benötigt keine Ionen für die Stabilität seines Hydrogels, ist kommerziell erhältlich und ermöglicht eine einfache Herstellung. PVAL-Hydrogele besitzen darüber hinaus eine gute mechanische und chemische Stabilität sowie Elastizität und zeigen keine merkliche Abrasion in Rührreaktoren (Ariga et al., 1994; Wittlich et al., 2004).

2.4.3.2 LentiKats[®]

LentiKats[®] sind linsenförmige Partikel aus makroporösen PVAL-Hydrogelen. Sie werden durch partielle Trocknung bei Raumtemperatur mit anschließender Rückquellung hergestellt (Jekel et al., 1998a; Vorlop et al., 2000). Zum Erreichen der gewünschten Porosität wird der wässrigen PVAL-Lösung Polyethylenglykol (PEG) zugesetzt. Hierbei ist die Porengröße durch das Molekulargewicht des verwendeten PEGs beeinflussbar (Jekel, 1999). Aufgrund der im Vergleich zur *freeze-thaw*-Methode (s. Abschnitt 2.4.3.1) milden und schnellen Herstellungsweise sind LentiKats[®] besonders gut für die Immobilisierung sensitiver Biokatalysatoren geeignet. Durch Einschluss in das schwer biologisch abbaubare PVAL-Netzwerk werden die Zellen bzw. Enzyme geschützt und gleichzeitig eine unsterile Prozessführung ermöglicht (Wittlich et al., 2004).

Die spezielle Linsenform verleiht den LentiKats[®] gute Diffusionseigenschaften (geringe Dicke von 200 - 400 μm) und zugleich die Möglichkeit zur einfachen Abtrennung (großer Durchmesser: 3 - 4 mm). Stofftransportprobleme vieler konventioneller Immobilisate können so minimiert werden. Die Verwendung von PVAL-Hydrogelen ermöglicht die Ausstattung der LentiKat[®]-Matrix mit vielen chemischen Additiven und den daraus folgenden Eigenschaften. Ausgenommen hiervon sind Verbindungen, die zur Auflösung des PVAL-Hydrogels führen (Schlieker et al., 2006). Abbildung 2.6 zeigt die schematische Ansicht eines LentiKats[®].



Abbildung 2.6: Schematische Ansicht eines LentiKats[®]

LentiKats[®] wurden schon vielseitig erfolgreich für die Immobilisierung von Mikroorganismen verwendet. Dabei kamen Bakterien wie z.B. Nitrifizierer (Jekel et al., 1998a; Sievers et al., 2002), *Oenococcus oeni* (Durieux et al., 2000; Durieux et al., 2002) und *Clostridium butyricum* (Wittlich et al., 1999) zum Einsatz. Bei der Nitrifikation des Abwassers konnten bereits im technischen Maßstab gute Ergebnisse erreicht werden (Sievers et al., 2002). Außerdem wurden die Pilze *Aspergillus terreus* (Welter et al., 1999) und

Beauveria bassiana (Bruß et al., 2002) sowie einige Hefen (Parascandola et al., 2006) in LentiKats[®] immobilisiert.

Auch im Bereich der Enzymimmobilisierung konnten LentiKats[®] erfolgreich eingesetzt werden. Das Enzym (R)-Oxynitrilase wurde nach Co-Quervernetzung mit Glutardialdehyd (GDA) und Chitosan in LentiKats[®] immobilisiert (Gröger et al., 2001). Das erwünschte Produkt konnte in guten Ausbeuten und mit einer Enantioselektivität von > 99 % ee erhalten werden. Die LentiKats[®] zeigten eine gute katalytische Langzeitstabilität (Tests > 140 h) und keinen signifikanten Aktivitätsverlust nach 20 wiederholten Einsätzen. Zusätzlich wurde die Oxynitrilase in voraktivierten LentiKats[®] immobilisiert. Hierbei erfolgte zuerst der Einschluss von Chitosan in LentiKats[®]. Als nächster Schritt wurde das Chitosan mit GDA aktiviert und anschließend die LentiKats[®] mit Oxynitrilase inkubiert (Capan et al., 2002).

Amyloglucosidase wurde nach Molekulargewichtserhöhung durch Ausflockung in Polyelektrolytkomplexen in LentiKats[®] eingeschlossen. Das immobilisierte Enzym zeigte 45 % seiner originalen Aktivität und eine gute katalytische Stabilität über mindestens fünf Batch-Einsätze (Czichocki et al., 2001).

Ein erfolgreicher Einschluss in LentiKats[®] ohne weitere Vorbehandlung konnte mit β -Galactosidase realisiert werden. Es war kein Aktivitätsverlust der LentiKats[®] innerhalb von 530 Stunden kontinuierlicher Verwendung sowie nach 35 aufeinander folgenden Einsätzen zu beobachten. Durch die Immobilisierung konnte eine um 10 % höhere relative Aktivität des Enzyms bei Produktinhibierungstests erreicht werden (Grosova et al., 2008).

Die Immobilisierung von Glucoamylase aus *Aspergillus niger* (Rebros et al., 2006) und einer Invertase aus Bäckerhefe (Rebros et al., 2007) in LentiKats[®] führte zu einer Verbreiterung des pH-Optimums. Beide Enzyme zeigten sehr gute Prozessstabilitäten im kontinuierlichen Betrieb und bei 100 bzw. 45 nacheinander folgenden Batch-Einsätzen. Es war keine Molekulargewichtsvergrößerung vor dem Einschluss nötig.

LentiKats[®] wurden ebenfalls zur Stabilisierung von mit GDA quervernetzten Aggregaten aus Penicillin G Acylase verwendet (Wilson et al., 2002; Wilson et al., 2004). Die hydrophobe Mikroumgebung der LentiKats[®] schützte die Enzyme vor Inaktivierung durch organische Lösungsmittel. Hierdurch konnten die Enzyme deutlich stabilisiert und höhere Ausbeuten erreicht werden.

Der Einsatz von LentiKats[®] ermöglicht die Überwindung vieler Nachteile konventioneller Biokatalysatorimmobilisate wie komplizierte Herstellungsverfahren, starke Diffusions-

barrieren, Aktivitätsverluste durch aggressive Immobilisierungsmethoden sowie hohe Kosten durch Rohmaterialien und den Zwang zur sterilen Prozessführung. Aufgrund ihrer hohen mechanischen und chemischen Stabilität und Elastizität sind LentiKats[®] für den Einsatz in Rühr- und Wirbelschichtreaktoren gut geeignet. (Gröger et al., 2001; Wittlich et al., 2004; Schlieker et al., 2006).

2.4.4 Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase

Bei der Herstellung von Isomaltulose ermöglicht die Immobilisierung des Enzymsystems eine deutliche Verbesserung des Prozesses. Der Einsatz von freien Zellen (Schiweck et al., 1973; Crueger et al., 1979c), wobei die Zellvermehrung und die Isomaltulose-Produktion gleichzeitig verlaufen, führt zu hohen Produktions- und Aufarbeitungskosten und geringeren Produktausbeuten. So kommt es zum Verlust eines Teils der Saccharose, welcher den Mikroorganismen als C-Quelle dient. Der Prozess bedarf einer hohen Belüftungsrate, da für das Zellwachstum Sauerstoff benötigt wird, und durch das Abtrennen der Zellen wird ein Verlust an Isomaltulose hervorgerufen. Zusätzlich wird aufgrund von Stoffwechselprodukten und der für das Zellwachstum benötigten Zusätze die Aufarbeitung der Isomaltulose sehr aufwändig und teuer (Kutzbach et al., 1982). Durch den Einsatz des immobilisierten Enzymsystems können Prozessstabilität und Isomaltulose-Ausbeute erhöht und gleichzeitig Produktions- und Aufreinigungskosten gesenkt werden (Cheetham et al., 1982; Schiweck et al., 1991).

Untersuchungen zur Isomaltulose-Herstellung mit immobilisierten Biokatalysatoren wurden überwiegend mit ganzen Zellen durchgeführt. Nur wenige Forschungsgruppen beschreiben die direkte Immobilisierung des Enzyms Isomaltulose-Synthase. Hierbei wird z.B. der Enzymeinschluss in Calcium-Alginat (Bucke et al., 1981), die Bindung des Enzyms an semipermeable Hohlfasern (Kutzbach et al., 1982) und die selektive Bindung an eine anionisierbare, sulfonsaure Kationenaustauschermatrix (Egerer et al., 1986) dargestellt.

Für die Immobilisierung isomaltuloseproduzierender ganzer Zellen können nahezu alle in der Literatur beschriebenen Methoden genutzt werden (Vorlop, 1984; Klein et al., 1985). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass das Enzym Isomaltulose-Synthase sensitiv gegenüber Glutardialdehyd (GDA) ist (Shimizu et al., 1982a; Schiweck et al., 1990). Die wohl am weitesten verbreitete Methode ist der Zelleinschluss in Calcium-Alginat-Gelen (Cheetham et al., 1982; Munir, 1982; Li et al., 2003b). Alginat ist ein preiswerter Rohstoff, der nicht toxisch

ist und gut im *Food* Bereich eingesetzt werden kann. Die Herstellung des Calcium-Alginat-Gels ist einfach und es verleiht dem Immobilisat eine ausreichende mechanische Stabilität. Cheetham et. al. verglichen verschiedene Immobilisierungsmethoden und erhielten die besten Ergebnisse durch Einschluss von Zellen in Calcium-Alginat (Cheetham et al., 1985). In der Literatur wird zur Stabilisierung die nachgeschaltete Quervernetzung mit Glutardialdehyd (Kawaguti et al., 2007) oder die Tränkung der Alginat-Immobilisate in Polyethylenimin mit anschließender GDA-Behandlung beschrieben (Shimizu et al., 1982b; Tsuyuki et al., 1992). Zellen wurden außerdem in Chitosan (Krastanov et al., 2003) oder Hohlfasermembranen (Krastanov et al., 2007) eingeschlossen. Die Bindung von Zellen an Chitin durch GDA wurde ebenfalls untersucht (Krastanov et al., 2006). Problematisch bei Einsatz biologisch abbaubarer Materialien ist jedoch der Zwang zur sterilen Prozessführung und damit entstehende Kosten (Wittlich et al., 2004) (siehe Abschnitt 2.4.3). In Patenten der Südzucker AG, werden neben dem Zelleinschluss in Calcium-Alginat und der Flockung mit Chitosan auch die Flockung mit kationischen und anionischen Flockungsmitteln, der Einschluss in Cellulosediacetat bzw. Cellulosetriacetat sowie der Einschluss in κ -Carrageenan-Gelen beschrieben (Munir, 1982; Munir, 1987). Ein weiteres Patent beinhaltet die Immobilisierung von Zellen durch Behandlung mit Tanninsäure, Polyethylenimin und einem Addukt aus GDA und Epihalohydrin/PolyaminCopolymer (Lantero, 1983). Die meisten der durch die oben genannten Methoden hergestellten Immobilisate können für die Isomaltulose-Herstellung in Festbettreaktoren eingesetzt werden.

Die industrielle Herstellung von Isomaltulose erfolgt bis jetzt ausschließlich mit immobilisierten ganzen Zellen (siehe Abschnitt 2.1.4.2). Ein Grund, weshalb kein immobilisiertes Enzym eingesetzt wird, sind die hohen Kosten für die Anreicherung und Aufreinigung der Isomaltulose-Synthase. Diese Probleme können durch den Einsatz von gentechnisch veränderten Mikroorganismen überwunden werden. Durch die Fremdgenexpression kann die Isomaltulose-Synthase kostengünstig in großen Mengen zur Verfügung gestellt und so der Einsatz von immobilisiertem Enzym profitabel werden. Bei hohen Anteilen an Zielenzym im Rohenzymextrakt ist vor der Immobilisierung keine weitere Aufkonzentrierung und Aufreinigung der Isomaltulose-Synthase notwendig. Im Vergleich zu lebenden ganzen Zellen können bei Nutzung des immobilisierten Enzyms Nebenreaktionen vermieden und zusätzlich eine viel höhere Enzymdichte im Immobilisat realisiert werden. Durch die Verwendung der Fremdexpression bietet sich darüber hinaus die Möglichkeit, die Enzymeigenschaften gentechnisch zu verändern und dem industriellen Bedarf anzupassen.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete *E.-coli*-Stämme

Die für diese Arbeit verwendeten rekombinanten *E.-coli*-Stämme wurden von Frau Dr. Milada Schubert (vTI, Braunschweig) konstruiert und zur Verfügung gestellt. In Tabelle 3.1 sind die Genotypen der *E.-coli*-Wirtsstämme und in Tabelle 3.2 die verwendeten rekombinanten *E.-coli*-Stämme aufgelistet.

Tabelle 3.1: Genotypen der *E.-coli*-Wirtsstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' Kan	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn5 (Kan ^r)]	Stratagene®
<i>E. coli</i> JM105	thi rpsL (Str ^r) endA sbcB15 hsdR4 supE Δ (lac-proAB) F' [traD36, proAB ⁺ , lacI ^q , lacZ Δ M15]	Amersham Pharmacia Biotech

Die Wirtsstämme XL1-Blue und JM105 sind *E. coli* K12 Stämme, die die Fähigkeiten besitzen, Plasmide der pUC-Reihe in einer hohen Kopienzahl zu replizieren und am *lac*-Promotor des Plasmids fremde Gene zu exprimieren. Der Stamm XL1-Blue ist kanamycin-resistent (100 µg/mL) und streptomycin- sowie ampicillinsensitiv. JM105 besitzt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Streptomycin (25 µg/mL) und reagiert sensitiv auf Kanamycin sowie Ampicillin.

Tabelle 3.2: Verwendete rekombinante *E.-coli*-Stämme

Stamm	Wirtsorganismus	Plasmid	Amp-Resistenz	<i>pall</i> -Gen
PUC	<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' Kan	pUC19	ja	nein
XMS	<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' Kan	pMSpal127	ja	ja
JMS	<i>E. coli</i> JM105	pMSpal127	ja	ja

XMS und JMS sind die routinemäßig eingesetzten *Pall*-Produktionsstämme, dessen Plasmide das *pall*-Gen tragen. Als Kontrollstamm kommt PUC zum Einsatz, der sich von XMS nur durch das Fehlen des *pall*-Gens unterscheidet. Die Genkarten des *pall*-Expressionsplasmids pMSpal127 und des Basisplasmids pUC19 sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

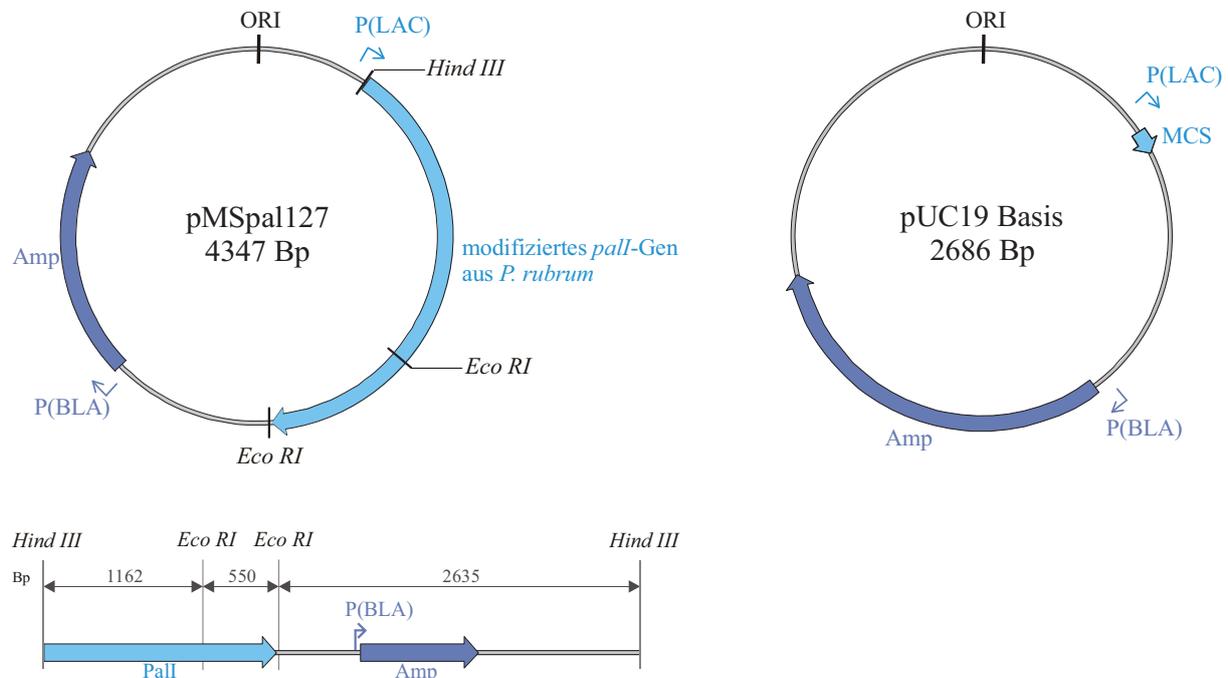


Abbildung 3.1: Genkarten des *pall*-Expressionsplasmids pMSpal127 (links) und des Basisplasmids pUC19 (rechts)

Als Basisvektor für die Klonierung und *Pall*-Expression wurde das Plasmid pUC19 genutzt (NEB Catalog# N3041S; GenBank Accession Number: L09137; siehe Abbildung 3.1, rechts). Das doppelsträngige Plasmid enthält das ORI (*origin of replication*) ColE1, und erreicht in einer *E. coli*-Zelle mehrere hundert Kopien (~ 500 – 700; *high-copy-number*-Plasmid). Für eine heterologe Expression kann der *lac*-Promotor P(LAC) genutzt werden, dem (*downstream*) ein Polylinker (MCS = *multiple cloning site*) mit singulären Schnittstellen für 13 verschiedene Restriktionsendonukleasen folgt. Als Selektionsmarker trägt das Basisplasmid das *amp*-Gen. Es verleiht dem Transformanden die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin.

Für die Konstruktion der *Pall*-Produktionsstämme wurde das *pall*-Gen aus *Protaminobacter rubrum* von Frau Dr. Schubert in das Plasmid pUC19 ligiert und am *lac*-Promotor in *E. coli* exprimiert. Die Expressionsprodukte werden in der Zelle kumuliert und können nach einem Zellaufschluss gewonnen werden.

3.2 Kultivierungsbedingungen

3.2.1 Verwendete Medien

Für diese Arbeit wurden standardmäßig zwei unterschiedliche Kulturmedien, LB und YeGly, verwendet. Ihre Zusammensetzungen sind in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.3: LB-Medium für die *E.-coli*-Kultivierung

LB-Medium		
Komponente	Menge [g/L]	
	LB fest	LB flüssig
Trypton	10,00	10,00
Hefeextrakt	5,00	5,00
NaCl	10,00	10,00
Agar-Agar	15,00	-
pH-Wert	7,00	7,00
ad. deion. H ₂ O	1 L	1 L

Tabelle 3.4: Pall-Produktionsmedium YeGly

YeGly-Medium	
Komponente	[g/L]
KH ₂ PO ₄	2,25
Na ₂ HPO ₄	6,09
Hefeextrakt	15,00
NaCl	10,00
Pharmaglycerin	25,00
pH-Wert	7,00
ad. deion. H ₂ O	1 L

Das LB-Medium, “*lysogeny broth*” (Bertani, 1951) wurde in fester Form für Plattenkultivierungen und als Flüssigmedium für die Herstellung von Kryostock- und Vorkulturen verwendet. Als Pall-Produktionsmedium kam YeGly zum Einsatz. Es begünstigt die Pall-Expression und stellt im Vergleich zu LB ein deutlich kostengünstigeres Medium dar.

Die Medien wurden 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert. Für alle Anwendungen, ausgenommen die Herstellung von Kryostockkulturen, wurden den Medien direkt vor der Verwendung 100 µg/mL Ampicillin (Amp) in Form einer sterilen Stammlösung zugesetzt (Tabelle 3.5). Aufgrund der Temperatursensitivität des Ampicillins

wurde für die Herstellung der LB-Platten das autoklavierte Medium vor der Amp-Zugabe auf 40 °C abgekühlt.

Tabelle 3.5: Ampicillin-Stammlösung

Amp-Stammlösung	
Komponente	[g/L]
Ampicillin (Na-Salz)	50
ad. deion. H ₂ O	1 L
End-Konzentration	
[µg/mL]	
Amp im Medium	100

Die Ampicillin-Stammlösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Bei 4 °C ist die Ampicillin-Lösung ca. 6 - 8 Wochen, bei -20 °C ca. 6 - 10 Monate haltbar.

3.2.2 Stammhaltung und Herstellung von Arbeitskulturen

3.2.2.1 Kryostockkulturen

50 mL einer in LB-Medium mit Ampicillin gewachsenen *E.-coli*-Kultur ($OD_{600} \approx 0,8$) wurden für 8 min bei 2218 g abzentrifugiert (Biofuge stratos, Heraeus Instruments, Hanau) und das Pellet in 2 mL frischen LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit sterilem Pharmaglycerin versetzt (Endkonzentration = 50 % (v/v)), der Ansatz gemischt und in sterile Kryostockgefäße überführt. Anschließend erfolgten eine Schockfrierung mittels flüssigem Stickstoff und eine Lagerung bei -80 °C.

3.2.2.2 Arbeitskulturen

Zur Herstellung einer Arbeitskultur wurde eine Kryostockkultur aufgetaut und die rekombinanten *E.-coli*-Stämme als Einzelkolonieausstrich auf LB-Platten mit Ampicillin 16 Stunden bei 37 °C kultiviert. Es folgte eine Lagerung der Platten bei 4 °C. Die Arbeitskultur wurde jede Woche auf eine frische LB-Platte überführt.

3.2.3 Kultivierung in Schüttelkolben

Die Standardkultivierungen der rekombinanten *E.-coli*-Stämme wurden in 100-mL-Schüttelkolben ohne Schikanen mit einem Arbeitsvolumen von 50 mL bei 150 rpm, 25 mm

Schüttlerauslenkung und 33,5 °C (JMS) bzw. 37 °C (PUC und XMS) durchgeführt. Die Kultivierungszeit betrug 16 - 19 Stunden. Alle Versuche erfolgten im Mehrfachansatz. Es wurde ein Gesamtansatz aus Medium, Ampicillin und Vorkultur in einer sterilen Schottflasche mit Rührkern hergestellt, die Lösung gemischt und anschließend auf die Schüttelkolben verteilt. Die für die Kultivierung in Schüttelkolben verwendeten Geräte werden in Tabelle 3.6 aufgelistet.

Tabelle 3.6: Geräteliste für die Kultivierung in Schüttelkolben

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius Analytica 200S.	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav	2540 ELC	Tuttnauer, Breda, NL
Autoklav	Fedegari	Tecnomara AG, Zürich, CH
Inkubator	RFI-125	INFORS HT, Bottmingen, CH
Magnetrührer	IKA-Combimag Reo	IKA-Werke, Staufen, D
pH-Elektrode	InLab Micro	Mettler Toledo, Giessen, D
Präzisionswaage	Kern PB	KERN EW, Balingen, D
Schüttler	TOP-MiX 11118 Bioblock Scientific	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, F
Sterilwerkbank	HeraSafe H18	Heraeus Instruments, Hanau
Trockenschrank	UE 400 1400 W	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D

3.2.3.1 Herstellung einer Vorkultur

Für die Vorkulturherstellung wurde eine *E.-coli*-Einzelkolonie von einer LB-Platte gepickt, in 50 mL LB-Medium mit Ampicillin überführt und bei 150 rpm, 25 mm Schüttlerauslenkung und 37 °C (alle *E.-coli*-Stämme) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 kultiviert. Die Vorkultur wurde sofort verwendet.

3.2.3.2 Herstellung einer Hauptkultur

Die *E.-coli*-Hauptkulturen zur Produktion des Pall-Enzyms wurden mit YeGly-Medium durchgeführt. Zum Animpfen wurden 1 Vol% (500 µL) einer frisch hergestellten Vorkultur auf 50 mL YeGly-Medium mit Ampicillin gegeben und bei 150 rpm, 25 mm Schüttlerauslenkung und 33,5 °C (JMS) bzw. 37 °C (PUC und XMS) inkubiert.

3.2.3.3 Versuche in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen

Für die Versuche in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen kamen 250-mL-Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 125 mL zum Einsatz. Es wurden Schüttelkolben ohne und mit drei Schikanen verwendet. Bis auf die Kulturgefäße und Mediovolumina wurden alle weiteren Kultivierungsparameter konstant gehalten (siehe Abschnitt 3.2.3.2).

3.2.4 Kultivierung im 10-L-Fermentationsmaßstab

Die *E.-coli*-Kultivierungen im 10-L-Fermentationsmaßstab wurden im Rührkesselbioreaktor Biostat E von Braun Biotech International, Melsungen durchgeführt.

3.2.4.1 Aufbau des Fermentersystems

Der schematische Aufbau des verwendeten Fermentationssystems ist in Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 dargestellt.

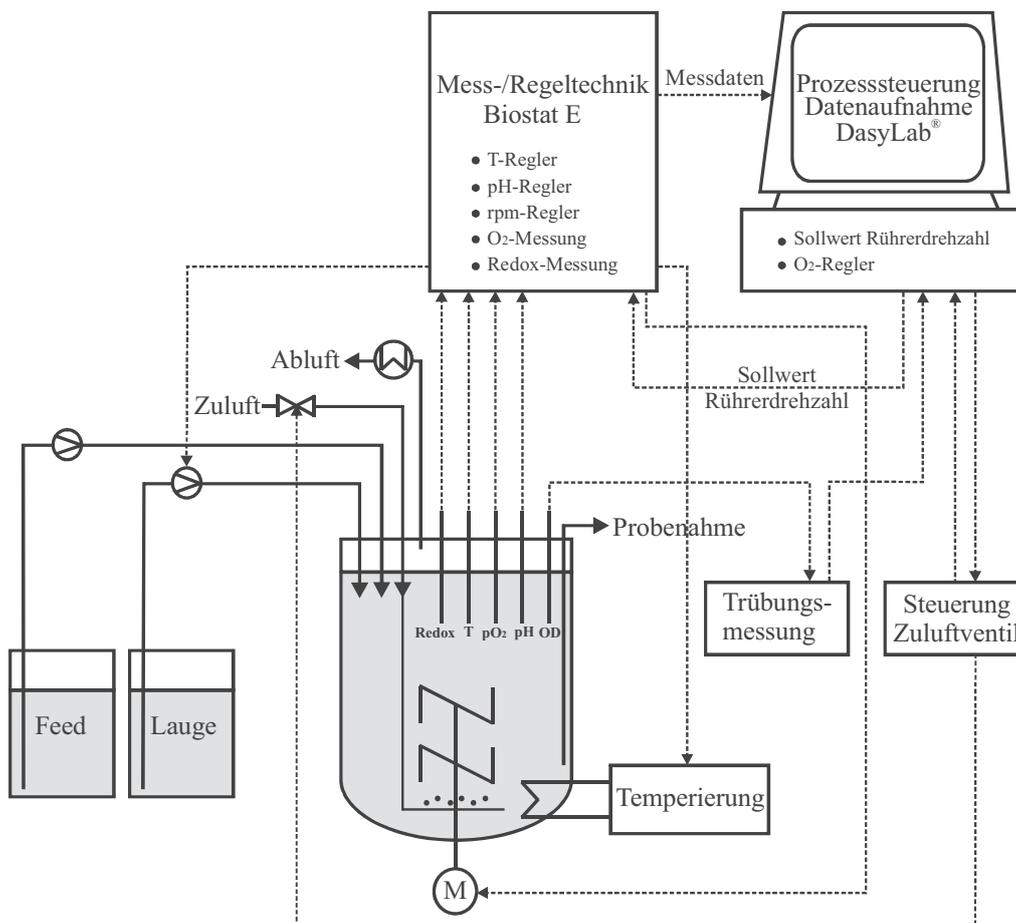


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des erweiterten Fermentersystems Biostat E

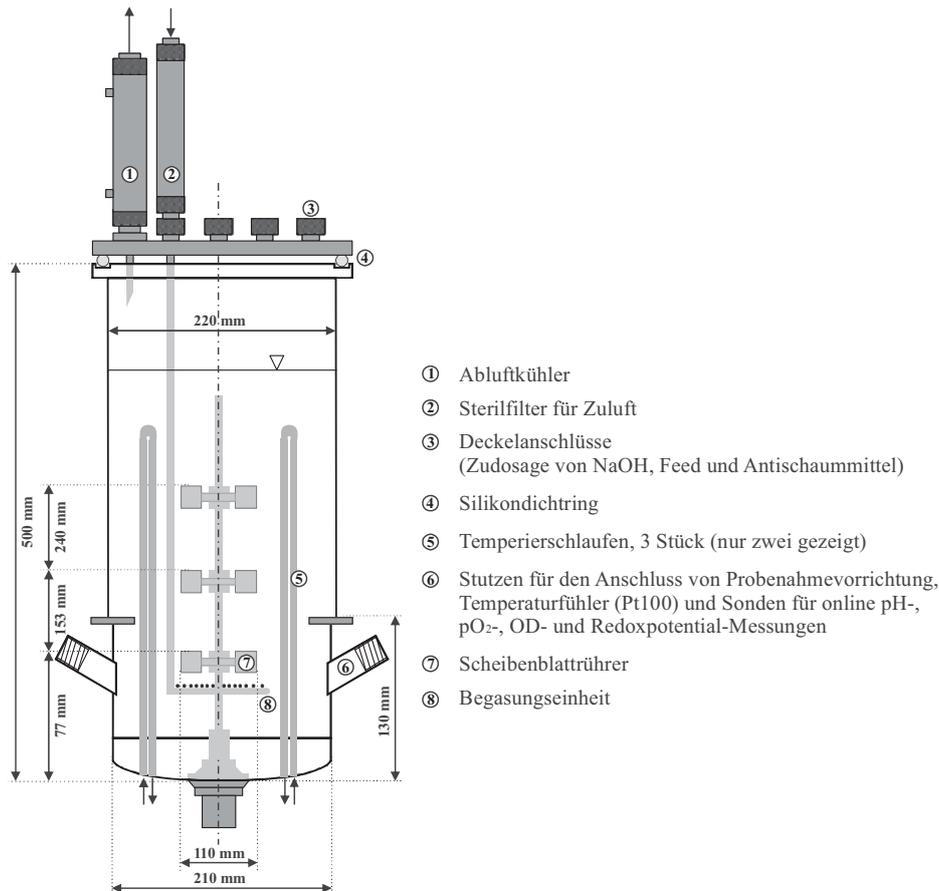


Abbildung 3.3: Schemazeichnung des Kulturgefäßes vom Fermentersystem Biostat E

Das Fermentersystem Biostat E besteht aus einem 15-L-Glaskulturgefäß mit Rührwerk, einem Temperiermodul für den Fermenterinnenraum sowie einer Einheit zur Aufnahme und Regelung von Messdaten. Für die Optimierung der Prozessregelung wurde das System mit einem zusätzlichen PC und Gasdurchflussregler sowie mit einer Vorrichtung zur Online-Trübungsmessung der Kulturbrühe ausgestattet.

Die pH-Wert- und Temperaturregelung erfolgte über die zum Reaktorsystem gehörige Schaltungstechnik. Die Steuerung von Rührerdrehzahl und Begasungsrate sowie die Online-Datenerfassung von Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Redoxpotential, Trübung, Rührerdrehzahl, Begasungsrate und dem Volumen der zudosierten Lauge erfolgte durch die Software DASYLab[®] 9.0. Während der Wachstumsphase wurde jeweils nach Erreichen und 5-minütigem Anhalten der maximalen Begasungsrate der Rührerdrehzahlsollwert von der Regelungssoftware um 50 rpm (Maximalwert: 550 rpm) erhöht. Zur Realisierung des gewünschten pO₂-Sollwertes erfolgte zusätzlich die entsprechende Ansteuerung des Begasungsventils. In der Produktionsphase wurden Drehzahl und Begasungsrate auf feste Sollwerte eingestellt. Die für die Fermentationen verwendeten Geräte werden in Tabelle 3.7 aufgelistet.

Tabelle 3.7: Geräteliste für die Fermentationen im Bioreaktor

Gerät	Modell	Hersteller
Bioreaktor Reaktorstand	15 L Biostat E Biostat	Braun Biotech International, Melsungen, D
Gasdurchflussregler	EL Flow, 0,1 - 5 L/min, F-201CV-AAD-33-V	Bronkhorst Mättig, Unna, D
Anzeige- und Regelmodul für Gasdurchflussregler	Flow Bus E-7000	Bronkhorst Mättig, Unna, D
Trübungsmessgerät	AS 82	Aquasant, Wettingen, CH
Lichtleitertrübungssonde	AF 44 S	Aquasant, Wettingen, CH
Sauerstoff-Messgerät	Fibox 3	Presens, Regensburg, D
pO ₂ -Elektrode	OIM-PS _t 3-D12/L120-L2.5	Presens, Regensburg, D
pO ₂ -Elektrode	322756701/71122	Ingold, Frankfurt, D
pH-Elektrode	405-DPAS-SC-K8S/120	Mettler Toledo, Giessen, D
Redoxelektrode	Pt-4865-90-VT	Ingold, Frankfurt, D

3.2.4.2 Durchführung der Fermentationen

Alle Fermentationen wurden mit dem Stamm JMS bei 33,5 °C Kultivierungstemperatur und einem konstanten pH-Wert von 7,0 (Korrekturmittel: 10 M NaOH) durchgeführt. Alle weiteren Prozessparameter variieren zwischen den einzelnen Fermentationen und werden bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

3.2.4.2.1 Vorbereitung des Fermenters und Herstellung der Vorkultur

Vor der Fermentation wurde das Kulturgefäß mit Temperaturfühler, Sauerstoff-, pH- und Redox-Elektrode sowie mit der Sonde für die optische Dichte-Messung ausgestattet und das Kulturmedium vorgelegt. Die Sauerstoffelektrode wurde vor dem Einbau für mindestens 6 Stunden polarisiert und die Redox- und pH-Elektrode wurden in entsprechenden Pufferlösungen überprüft und kalibriert. Anschließend erfolgte die 20-minütige Sterilisierung des Fermenterinnenraums bei 121 °C und 1 bar Überdruck. Kurz vor Ablauf der Autoklavierzeit wurde der Nullpunkt der Sauerstoffelektrode eingestellt. Nach dem Abkühlen auf Betriebstemperatur wurden die separat autoklavierten Zu- und Abluftfilter sowie die sterile Laugenzudosage- und Probenahmeverrichtung aseptisch installiert und das System mit Luft begast. Der Rückflusskühler der Ablufteinheit wurde an die Wasserversorgung angeschlossen und mit Kühlwasser durchströmt.

Für die Herstellung der Fermentationsvorkultur wurde eine *E.-coli*-Einzelkolonie in 250 mL LB mit Ampicillin in einem 500-mL-Schüttelkoben bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 kultiviert.

Anschließend wurde die warme Kultur unter der Sterilbank in eine sterile Animpfflasche überführt und sofort als Inokulum eingesetzt.

3.2.4.2.2 Start und Verlauf der Kultivierung

Vor dem Animpfen wurde dem auf 33,5 °C temperierten Kulturmedium mit einer sterilen Einwegspritze 100 µg/mL Ampicillin in Form einer sterilen 50-g/L-Stammlösung zugegeben. Unter starker Begasung erfolgte die Kalibrierung der Sauerstoffelektrode (100 %-Wert). Anschließend wurde der Fermenter mit einer frisch hergestellten LB-Vorkultur beimpft und gleichzeitig die Datenaufnahme der Online-Messung gestartet. Über die Kultivierungszeit verteilt wurden mit sterilen Einwegspritzen Proben entnommen und sofort auf 4 °C gekühlt. Bei Bedarf wurde mit einer sterilen Einwegspritze das Antischaummittel Struktol zudosiert.

3.2.4.2.3 Abbruch der Kultivierung

Nach Ablauf der gewünschten Fermentationsdauer wurde die Online-Datenerfassung gestoppt und die Kulturbrühe im Fermenter 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Die Messsonden wurden aus dem Kulturgefäß ausgebaut und zusammen mit dem Fermentationssystem gründlich gereinigt.

3.2.4.3 Scale up der Überexpression des rekombinanten Pall-Enzyms

Die Prozessparameter der Fermentationen BGS 1, 2 und 3, die zur Untersuchung des Einflusses der Sauerstoffzufuhr auf die Kultivierung von JMS dienen, sind in Tabelle 3.8 aufgelistet. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.3.1 dargestellt.

Tabelle 3.8: Prozessparameter der Fermentationen BGS 1, 2 und 3

Prozessparameter	BGS 1	BGS 2	BGS 3
Kultivierungstemperatur	33,5 °C	33,5 °C	33,5 °C
pH-Wert	7,0	7,0	7,0
Begasungsrate	0,015 v/vm	0,120 v/vm	0-1 v/vm
Sauerstoffpartialdruck	0 %	0 %	10 %
Drehzahl Rührer	200 rpm	200 rpm	250-300 rpm
Medium	YeGly	YeGly	YeGly
Arbeitsvolumen	10 L	10 L	5 L
Vorkultur-Menge	2,5 Vol%	2,5 Vol%	2,5 Vol%
Nachfütterung Gly/YE/Amp	-	-	-

Gly = Glycerin, YE = Hefeextrakt, Amp = Ampicillin

Vor dem Animpfen der Kultur wurde die Sauerstoffzufuhr des Fermenters geschlossen. Durch die Sauerstoffzehrung der wachsenden Zellen sank daraufhin der Sauerstoffpartialdruck auf den gewünschten Sollwert ab. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Luftbegasung wieder eingeschaltet und durch die Software DASyLab[®] 9.0 gesteuert. Die in Tabelle 3.8 aufgelisteten Sauerstoffpartialdrücke zeigen die nach 4 bis 8 Stunden Kultivierungsdauer vorherrschenden Werte.

Zur Erhöhung der Sauerstoffversorgung (v/vm-Wert) wurde bei der Fermentation BGS 3 die Rührerdrehzahl von 200 rpm auf 250 bis 300 rpm erhöht und das Arbeitsvolumen von 10 auf 5 L reduziert.

Tabelle 3.9 zeigt die Prozessparameter der Fermentation BGS E. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.3.2 dargestellt.

Tabelle 3.9: Prozessparameter der Fermentation BGS E

Prozessparameter	BGS E	
	1. Phase	2. Phase
Kultivierungstemperatur	33,5 °C	33,5 °C
pH-Wert	7,0	7,0
Begasungsrate	0-0,5 v/vm	0,5 v/vm
Sauerstoffpartialdruck	2 %	0 %
Drehzahl Rührer	200 rpm	200 rpm
Medium	YeGly	YeGly
Arbeitsvolumen	10 L	10 L
Vorkultur-Menge	2,5 Vol%	-
Nachfütterung Gly/YE/Amp	-	-

Gly = Glycerin, YE = Hefeextrakt, Amp = Ampicillin

Die Begasungsrate der Fermentation BGS E wurde sofort nach dem Start der Kultivierung durch die Software DASyLab[®] 9.0 gesteuert.

Die Prozessparameter der Kultivierungen zur Optimierung des Zwei-Phasen-Fermentationsverfahrens sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Tabelle 3.11, Tabelle 3.12 und Tabelle 3.13 zeigen die jeweiligen Fütterungszeitpunkte und -mengen der Substrate Glycerin und Hefeextrakt sowie die Zugabe von Ampicillin bei den Zwei-Phasen-Fermentationen Ferm 1, 2 und 3. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.3.3 dargestellt.

Tabelle 3.10: Prozessparameter der Fermentationen Ferm 1, 2 und 3

Prozessparameter	Ferm 1		Ferm 2		Ferm 3	
	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase	1. Phase	2. Phase
Kultivierungstemperatur	33,5 °C					
pH-Wert	7,0					
Begasungsrate	0-5 L/min 0-0,5 v/vm	5 L/min 0,5 v/vm	0-5 L/min 0-0,5 v/vm	5 L/min 0,4-0,5 v/vm	0-5 L/min 0-1 v/vm	5 L/min 0,7-1 v/vm
Sauerstoffpartialdruck	10 %	0 %	10 %	0 %	10 %	0 %
Drehzahl Rührer	200-300 rpm	200 rpm	200-450 rpm	200 rpm	200-550 rpm	300 rpm
Medium	YeGly					
Gly-Startkonzentration	25 g/L	-	10 g/L	-	10 g/L	-
Startvolumen	10 L	-	10 L	-	5 L	-
Vorkultur-Menge	2,5 Vol%	-	2,5 Vol%	-	5 Vol%	-

Gly = Glycerin

Tabelle 3.11: Substrat- und Ampicillin-Zugabe der Zwei-Phasen-Fermentation Ferm 1

Fütterung	Fermentationsphase	Kultivierungszeitpunkt [h]	Substanz	Konzentration im Medium [g/L]
Ferm 1 F0	1. Phase	-	keine Zugabe	
Ferm 1 F1	2. Phase	8,5	YE	10,00
Ferm 1 F2	2. Phase	22,0	YE Amp	5,00 0,05

Gly = Glycerin, YE = Hefeextrakt, Amp = Ampicillin

Tabelle 3.12: Substrat- und Ampicillin-Zugabe der Zwei-Phasen-Fermentation Ferm 2

Fütterung	Fermentationsphase	Kultivierungszeitpunkt [h]	Substanz	Konzentration im Medium [g/L]
Ferm 2 F1	1. Phase	8,0	YE	5,00
Ferm 2 F2	1. Phase	9,0	YE	5,00
Ferm 2 F3	1. Phase	10,1	YE	5,00
Ferm 2 F4	2. Phase	11,0	YE	10,00
Ferm 2 F5	2. Phase	24,0	YE Amp	10,00 0,05
Ferm 2 F6	2. Phase	27,8	YE Gly	8,75 10,00

Gly = Glycerin, YE = Hefeextrakt, Amp = Ampicillin

Tabelle 3.13: Substrat- und Ampicillin-Zugabe der Zwei-Phasen-Fermentation Ferm 3

Fütterung	Fermentations- phase	Kultivierungs- zeitpunkt [h]	Substanz	Konzentration im Medium [g/L]
Ferm 3 F1	1. Phase	6,3	YE	5,00
Ferm 3 F2	1. Phase	7,1	YE	10,00
Ferm 3 F3	1. Phase	8,1	YE	10,00
Ferm 3 F4	1. Phase	9,1	YE	10,00
Ferm 3 F5	1. Phase	10,1	YE	10,00
Ferm 3 F6	2. Phase	11,2	YE	10,00
			Gly	4,00
Ferm 3 F7	2. Phase	15,1	YE	5,00
			Gly	5,00
Ferm 3 F8	2. Phase	23,9	YE	5,00
			Gly	5,00
			Amp	0,05
Ferm 3 F9	2. Phase	28,1	YE	5,00
			Gly	5,00
Ferm 3 F10	2. Phase	32,0	YE	5,00
			Gly	8,00
Ferm 3 F11	2. Phase	37,8	YE	5,00
			Gly	7,50
Ferm 3 F12	2. Phase	48,3	YE	5,00
			Gly	5,00

Gly = Glycerin, YE = Hefeextrakt, Amp = Ampicillin

Die Fütterungen erfolgten durch die Zugabe von sterilem Pharmaglycerin und einer sterilen 250-g/L-Hefeextrakt-Stammlösung. Die Stammlösung wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt. Beide Substrate wurden 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Die Hefeextrakt-Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Überführung in den Fermenter wurden die sterilen Substrate unter der Sterilbank in eine sterile Animpfflasche überführt und dabei die Mengen über eine Waage kontrolliert. Die sterile Ampicillin-Stammlösung (siehe Tabelle 3.5) wurde der Kulturbrühe mit Hilfe einer sterilen Einwegspritze zugesetzt.

3.3 Analytik

3.3.1 Mikroskopie

Für die Untersuchung der Zellmorphologie wurden Proben der Wachstums- und Produktionsphase mikroskopiert. Es wurden Präparate mit dem Phasenkontrastmikroskop

(Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen) und Öl 100-fach vergrößert untersucht. Für die Bildverarbeitung kam die Software analySIS (analySIS 5.0, Soft Imaging System GmbH) zum Einsatz.

3.3.2 Bestimmung der Biomassekonzentration

3.3.2.1 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Die Biotrockenmassebestimmung der *E.-coli*-Zellen erfolgte gravimetrisch nach Gleichung 3-1. Es wurden 40 mL Zellsuspension in vorgetrockneten, ausgewogenen 50-mL-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (10 min, 6793 g, 10 °C, Biofuge stratos, Heraeus Instruments, Hanau) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 20 mL physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) resuspendiert, erneut abzentrifugiert (10 min, 6793 g, 10 °C) und der Überstand abgetrennt. Anschließend wurde das Pellet bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C im Trockenschrank (s. Tabelle 3.6) getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator das Gewicht auf der Analysenwaage (vgl. Tabelle 3.6) bestimmt. Die Biotrockenmasse der Probe wurde durch die ermittelte Gewichts Differenz (Gleichung 3-1) zwischen dem leeren Reaktionsgefäß und dem mit dem getrockneten Pellet befüllten Reaktionsgefäß erhalten.

$$BTM = \frac{m_{Pellet} - m_{leer}}{V} \quad 3-1$$

- BTM : Biotrockenmasse [g/L]
 m_{Pellet} : Gewicht Reaktionsgefäß mit getrocknetem Pellet [g]
 m_{leer} : Gewicht leeres, getrocknetes Reaktionsgefäß [g]
 V : Volumen der Zellsuspension [L]

3.3.2.2 Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀)

Die Biomassekonzentration wurde indirekt durch Ermittlung der optischen Dichte der Kulturbrühe bestimmt. Mit einem Photometer (T80 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments Ltd, London, GB) wurde die Transmission der Bakteriensuspensionen bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenzmedium kam deionisiertes Wasser zum Einsatz. Bei Bedarf wurden die Proben mit deionisiertem Wasser verdünnt, um im linearen Bereich des Photometers zu messen. Die optische Dichte kann unter Verwendung der Gleichung 3-2 aus der ermittelten Transmission errechnet werden. Diese Rechnung wurde

nach Einstellung der erforderlichen Parameter von der zum Photometer zugehörigen Software durchgeführt.

$$OD_{600} = -\log_{10}\left(\frac{T_{600}}{100}\right) \cdot f \quad 3-2$$

T_{600} : Transmission bei einer Wellenlänge von 600 nm

f : Verdünnungsfaktor

3.3.2.3 Korrelation unterschiedlicher Biomassebestimmungen der *E.-coli*-Stämme

In Abbildung 3.4 und Tabelle 3.14 sind die OD/BTM- und OD/Zellzahl-Korrelation der Stämme PUC und XMS gezeigt.

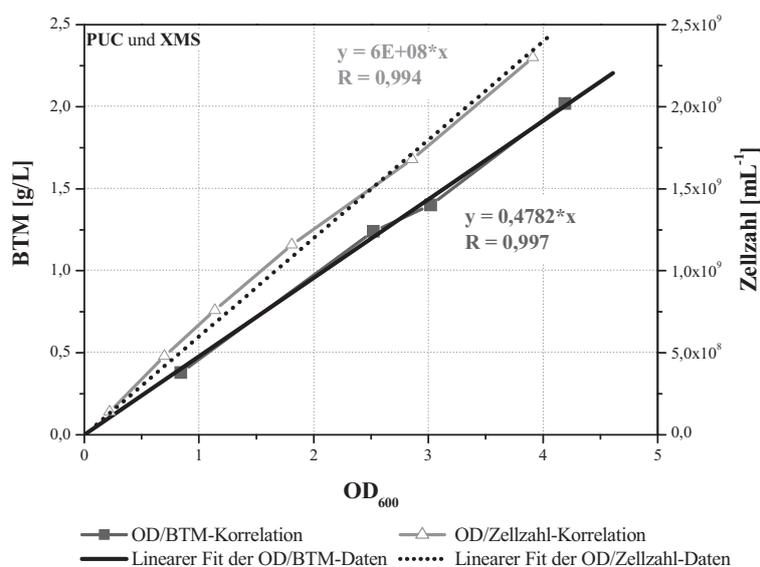


Abbildung 3.4: OD/BTM- und OD/Zellzahl-Korrelation der Stämme PUC und XMS

Tabelle 3.14: OD/BTM- und OD/Zellzahl-Korrelation der Stämme PUC und XMS

Stämme PUC und XMS			Stämme PUC und XMS		
Probe	OD ₆₀₀	BTM	Probe	OD ₆₀₀	Zellzahl
	[-]	[g/L]		[-]	[mL ⁻¹]
P1	0,84	0,38	P1	0,22	140000000
P2	2,52	1,24	P2	0,70	480000000
P3	3,02	1,40	P3	1,14	760000000
P4	4,19	2,02	P4	1,81	1160000000
			P5	2,86	1680000000
			P6	3,91	2300000000

Die Anzahl der Zellen wurde durch Auszählung mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma bestimmt. Die Unterschiede der Korrelationen von optischer Dichte und Biotrockenmasse sowie die von OD und Zellzahl der beiden XL1-Blue-Stämme PUC und XMS waren vernachlässigbar.

Die OD/BTM-Korrelation des Stammes JMS ist in Abbildung 3.5 graphisch und tabellarisch dargestellt.

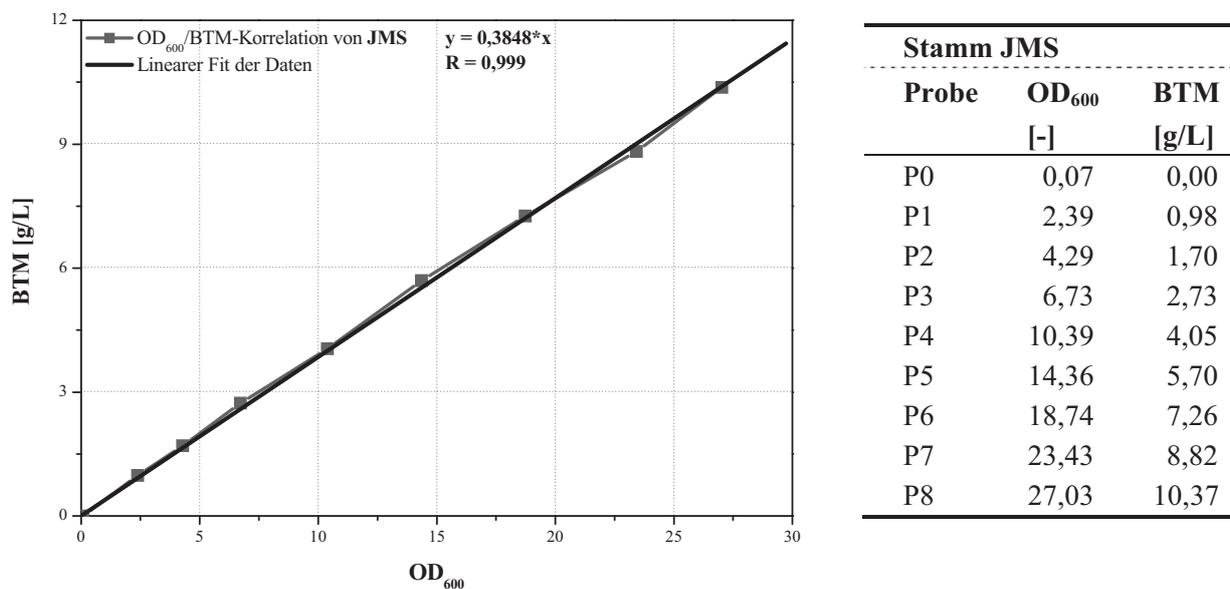


Abbildung 3.5: Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse von JMS

3.3.3 High performance liquid chromatography (HPLC)

Die *High performance liquid chromatography* (HPLC) ist eine chromatografische Präzisionsmethode zur qualitativen und quantitativen Analyse löslicher Stoffe. In dieser Arbeit wurden Kulturbrühen der *E.-coli*-Fermentationen und Proben aus den Aktivitätstests und Produktspektren der Isomaltulose-Synthese mittels HPLC-Analytik gemessen. Es wurden drei unterschiedliche HPLC-Systeme verwendet (siehe Tabelle 3.15, Tabelle 3.16 und Tabelle 3.17). Die Fermenterbrühe wurde auf ihren Glycerin-Gehalt und ihre Konzentration an organischen Säuren hin untersucht. In den Enzymassayproben wurden die Konzentrationen der Zucker Trehalulose, Palatinose, Isomaltose, Saccharose, Glucose und Fructose bestimmt.

Tabelle 3.15: Geräteliste und Betriebsparameter des HPLC-Systems 1

HPLC-System 1			
Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	HyperCarb, 100 x 3 mm	Thermo Hypersil-Keystone, Runcorn, GB	T _{Säule} : 60 °C, Flussrate 1 mL/min
RI-Detektor	Well Chrom K-2301	Knauer, Berlin, D	
Pumpe	Well Chrom K-501	Knauer, Berlin, D	
Degaser	Degasys Populaire	Sanwa Tsusho, J	
Datenerfassung	Chromgate 3.1.7	Knauer, Berlin, D	
Autosampler	Basic Marathon	Spark Holland, Emmen, NL	Pobenvolumen 10 µl
Eluent	1,5 % Acetonitril, 1 mM NaOH in Millipore-Wasser		

Tabelle 3.16: Geräteliste und Betriebsparameter des HPLC-Systems 2

HPLC-System 2			
Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	HPX87H, 300 mm	BioRad, München, D	T _{Säule} : 20 °C, Flussrate 0,5 mL/min
UV-Detektor	Well Chrom DAD K-2800	Knauer, Berlin, D	Wellenlänge 210 nm
RI-Detektor	Well Chrom K-2301	Knauer, Berlin, D	
Pumpe	Well Chrom K-1001	Knauer, Berlin, D	
Degaser	Well Chrom K-5004	Knauer, Berlin, D	
Datenerfassung	Chromgate 3.1.7	Knauer, Berlin, D	
Autosampler	Basic Marathon	Spark Holland, Emmen, NL	Pobenvolumen 20 µl
Eluent	5 mM Schwefelsäure		

Tabelle 3.17: Geräteliste und Betriebsparameter des HPLC-Systems 3

HPLC-System 3			
Gerät	Typ	Hersteller	Betriebsparameter
Säule	HPX87H, 300 mm	BioRad, München, D	T _{Säule} : 60 °C, Flussrate 0,7 mL/min
System Controller	SCL-10Avp	Shimadzu, Duisburg, D	
UV-Detektor	SPD-10A	Shimadzu, Duisburg, D	Wellenlänge 210 nm
RI-Detektor	RID-10A	Shimadzu, Duisburg, D	
Pumpe	LC-10AT	Shimadzu, Duisburg, D	
Degaser	DGU-3A	Shimadzu, Duisburg, D	
Datenerfassung	Class VP 7.4	Shimadzu, Duisburg, D	
Autosampler	SIL-10A	Shimadzu, Duisburg, D	Pobenvolumen 20 µl
Eluent	5 mM Schwefelsäure		

Mit dem HPLC-System 1 wurden die Konzentrationen der Zucker Trehalulose, Palatinose, Isomaltose und Saccharose analysiert. Die Messung einer Probe dauerte 6 min. Das Trennprinzip der verwendeten HyperCarb-Säule (Thermo Hypersil-Keystone, Runcorn, GB) wurde 1991 von Koizumi näher beschrieben (Koizumi et al., 1991).

Das HPLC-System 2 ermöglichte die Detektion eines allgemeinen Disaccharid-Peaks und die der Zucker Palatinose, Glucose und Fructose. Die Substanzen wurden innerhalb von 15 min auf der HPX87H-Säule (BioRad, München) getrennt. Das allgemeine Trennprinzip dieser Säule beruht auf einer Kombination aus Ionenaustausch-, Ionenausschluss- und Größenausschlusschromatographie.

Die organischen Säuren Acetat und Lactat und das Substrat Glycerin wurden mit Hilfe des HPLC-Systems 3 untersucht. Die Messung einer Probe dauerte 20 min.

Die zu analysierenden Proben wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 20800 g (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) von unlöslichen Bestandteilen befreit und entsprechend der enthaltenen Konzentrationen mit Millipore-Wasser verdünnt. Die HPLC-Analysen wurden nach den in der Tabelle 3.15, Tabelle 3.16 und Tabelle 3.17 aufgelisteten Betriebsparametern durchgeführt. Die Retentionszeiten der analysierten Substanzen sind der Tabelle 3.18 zu entnehmen.

Tabelle 3.18: Retentionszeiten der analysierten Substanzen

Substanz	HPLC-System	Retentionszeit [min]	
		RI-Detektor	UV-Detektor
Trehalulose	1	2,3	
Palatinose	1	3,0	
Isomaltose	1	3,5	
Saccharose	1	4,0	
Palatinose	2	8,4	8,1
Disaccharide	2	8,5	
Glucose	2	9,8	
Fructose	2	10,8	10,5
Lactat	3	10,7	10,5
Glycerin	3	11,3	
Acetat	3	12,6	12,4

3.3.4 Bestimmung der Plasmid-DNA-Menge

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem modifizierten Standardprotokoll von Birnboim und Doly (Birnboim et al., 1979) mit einem Kit für DNA-Isolierung und -Reinigung (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden). Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco RI* und *Hind III* (Appligene oncor, Heidelberg) 2 h bei 37 °C verdaut und in einem 0,7 %igen Agarosegel mit 0,2 mg/L Ethidiumbromid für 20 - 40 min bei 50 - 70 V elektrophoretisch getrennt (MINI Elektrophorese-Kammer, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Elektrophoresis Powersupply PHERO-stab. 500, Biotec-Fischer, Reiskirchen). Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator (Typ N-90, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bei 312 nm fotografiert. Die verwendeten Lösungen, der Restriktionsverdau und die Bestandteile des DNA-Größenstandards sind in Tabelle 3.19, Tabelle 3.20 und Tabelle 3.21 gezeigt.

Tabelle 3.19: Verwendete Lösungen für die Quantifizierung der Plasmid-DNA-Menge

Lösung	Inhaltsstoffe/Hersteller
10 x Restriktionspuffer	10 × NEBuffer 2, New England Biolabs Inc., Ipswich, GB (500 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl ₂ ; 10 mM Dithiothreitol; pH 7,9 bei 25 °C)
6 × Auftragspuffer	Gel loading solution (Type 1), Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA (0,25 % w/v Bromphenolblau; 0,25 % w/v Xylencyanol FF; 40 % Saccharose)
Laufpuffer TAE	40 mM Trisacetat; 1 mM EDTA • Na ₂ , pH 8,3
DNA-Größenstandard	1kB-DNA-Marker, New England Biolabs Inc., Ipswich, GB

Tabelle 3.20: Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Restriktionsverdau der Plasmid-DNA	
Komponente	Volumen [µL]
10 x Restriktionspuffer	3
BSA (c = 2 g/L)	1
Plasmid-DNA (bis zu 5 µg)	x
Restriktionsenzym <i>Eco RI</i> , <i>Hind III</i> (1 Unit Enzym/1µg DNA/1 h)	y
steriles Millipore-Wasser	z
Gesamtvolumen	30

BSA = Rinderserumalbumin

Tabelle 3.21: Bestandteile des DNA-Größenstandards

1 kB-DNA-Größenstandard		
Fragment	Größe [kBp]	Menge [ng]
1	10,0	42
2	8,0	42
3	6,0	50
4	5,0	42
5	4,0	33
6	3,0	125
7	2,0	48
8	1,5	36
9	1,0	42
10	0,5	42

3.3.5 Bestimmung der löslichen Proteinkonzentration

Die Mengen an Gesamtprotein und löslichem Proteinanteil der *E.-coli*-Zellextrakte wurden mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Die Proben wurden entsprechend ihrer enthaltenen Proteinkonzentration mit Reaktionspuffer (Tabelle 3.24) verdünnt und anschließend mit Bradfordreagenz (BF) im Verhältnis 1:31 (40 μ L Probe + 1200 μ L BF) versetzt, gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei 595 nm (T80 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments Ltd, London, GB) in Doppelansätzen. Anschließend wurden die erhaltenen Werte mit einer Kalibriergeraden aus Rinderserumalbumin (engl.: *bovine serum albumin*, BSA) korreliert (nähere Beschreibung siehe Produktinformation Bradford Reagent B 6916, Sigma, Saint Louis, USA).

3.3.6 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides braucht aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht

berücksichtigt werden. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke im Polyacrylamidgel mit der bekannter Proteine (Marker). In dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE nach einem von Frau Dr. Milada Schubert (vTI, Braunschweig) modifizierten und optimierten Verfahren durchgeführt.

Mit Hilfe der SDS-PAGE wurden *E.-coli*-Gesamtproteinextrakte sowie die lösliche Fraktion der Zellextrakte analysiert. Es wurden 29 μL Probe mit 16 μL Loading Buffer versetzt, 2 - 5 min bei 85 °C inkubiert und unmittelbar auf das Gel (10% Tris-Glycine-Gel, 1,0 mm; Novex[®], Invitrogen, Karlsruhe) geladen. Der mitgeführte Protein-Molekulargewichtsmarker wurde 1 min auf 40 °C erwärmt. Die Trennung erfolgte bei 125 V für ca. 100 min (MINI-Vertikal Doppel-Elektrophorese-Kammer Standard, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Elektrophoresis Powersupply PHERO-stab. 500, Biotec-Fischer, Reiskirchen).

Nach der Trennung der Proteine im elektrischen Feld wurde das Gel 60 min in Fixierlösung gebadet und anschließend dreimal je 5 min mit deionisiertem Wasser gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Färbung in Coomassie-Blue-Färbelösung, die nach 5 und 10 min durch eine Erwärmung des Gels in der Mikrowelle (20 sec, 560 Watt) beschleunigt wurde. Durch 30-minütiges Baden in Fixierungslösung, das ebenfalls durch Erhitzen nach 5 und 10 min in der Mikrowelle (20 sec, 560 Watt) intensiviert wurde, wurde der nichtgebundene Farbstoff aus dem Gel entfernt. Anschließend wurde das Gel in deionisiertes Wasser überführt und bei Tageslicht fotografiert. Die benötigten Lösungen und die Bestandteile des verwendeten Protein-Molekulargewichtsmarkers sind in Tabelle 3.22 und Tabelle 3.23 aufgelistet.

Tabelle 3.22: Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung	Inhaltsstoffe/Hersteller
SDS-PAGE-Loading Buffer	Roti [®] -Load 2, K930.1, Roth, Karlsruhe
Protein-Molekulargewichtsmarker	Roti [®] -Mark Standard, 14,5 - 200 kDal, Roth, Karlsruhe
10 x Elektrophorese-Laufpuffer	Rotiphorese [®] 10 x SDS-PAGE, Roth, Karlsruhe (0,25 M TRIS; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS; deion. H ₂ O) Gebrauchslösung: 1/10 Volumen in deion. H ₂ O lösen
Coomassie-Blue-Färbelösung	0,1 % Coomassie brillant blue R250, Roth, Karlsruhe; 40 % Ethanol; 10 % Eisessig; 50 % deion. H ₂ O; lösen und anschließend durch Faltenfilter filtrieren
Fixierlösung	10 % Ethanol; 7,5 % Eisessig; 82,5 % deion. H ₂ O

Tabelle 3.23: Bestandteile des Protein-Molekulargewichtsmarkers

Protein-Molekulargewichtsmarker		
Protein	MW	Konz.
	[kDal]	[mg/mL]
Myosin, Rind	200,0	0,20
β -Galactosidase, rek. <i>E. coli</i>	119,0	0,20
Serumalbumin, Rind	66,0	0,20
Ovalbumin, Huhn	43,0	0,27
Carboanhydrase	29,0	0,13
Trypsin Inhibitor, Soja	20,0	0,20
Lysozym, Huhn	14,5	0,20

3.4 Zellaufschluss und Herstellung der Zellextrakte

3.4.1 Zellaufschluss per Ultraschallsonde

Der Zellaufschluss im 5-mL-Maßstab erfolgte mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Sonoplus HD 200 mit Kegelspitze KE76, Bandelin electronic, Berlin). Es wurden 5 mL Kulturbrühe 8 min bei 2576 g abzentrifugiert (Rotofix 32 A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen), das Pellet in 5 mL vorgekühltem Reaktionspuffer resuspendiert und zweimal für 30 sec bei einer Dosis von 50 % aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (8 min, 2576 g, Rotofix 32 A). Um eine zu starke Erwärmung zu verhindern, wurden die Proben zwischen den Aufschlussläufen auf Eisschmelze gekühlt. Entsprechend der vorherrschenden Pall-Aktivität bzw. Biomassekonzentration erfolgte vor dem Aufschluss die Verdünnung der Proben mit Reaktionspuffer oder eine Aufkonzentrierung von Zellmaterial durch mehrmaliges Abzentrifugieren. Der verwendete Reaktionspuffer ist in Tabelle 3.24 gezeigt.

Tabelle 3.24: Bestandteile des Reaktionspuffers

Reaktionspuffer (0,01 M)	
Komponente	[g/L]
Calciumacetat	1,58
pH-Wert*	5,5
ad. Millipore-Wasser	1 L

* mit 10 % Essigsäure einstellen

3.4.2 Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator

Der Zellaufschluss der Kulturbrühe von 10-L-Fermentation Ferm 3 (Zellen + Medium; BTM = 12 g/L) wurde mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators des Typs LAB60 (APV Gaulin GmbH, Lübeck) in drei Passagen mit 65 MPa und einem Durchsatz von 0,5 L/min durchgeführt. Die Eintrittstemperatur betrug 2 °C, die Austrittstemperatur lag bei 13 °C. Nach Abfugen der Zelltrümmer wurde die erhaltene Enzymlösung bei -20 °C gelagert.

3.5 Standard-Enzymaktivitätstest

Die für die Enzymaktivitätstests verwendeten Geräte sind in der Tabelle 3.25 aufgelistet.

Tabelle 3.25: Geräteliste für die Bestimmung der Pall-Aktivität

Gerät	Typ	Hersteller	Bemerkung
Wasserbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D	ohne Kühlung
Wasserbad	F34-E	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D	mit Kühlung
Kochbad	3649	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, D	
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D	
Rührwerk	RW 16 basic	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen	40 - 1200 rpm
Rührer	fishclip [®]	Bürkle GmbH, Bad Bellingen, D	Rührkern: 30 x 8 mm

3.5.1 Freies und quervernetztes Enzym

Für die Substratzugabe wurde eine sterile 50 %ige Saccharose-Stammlösung (vgl. Tabelle 3.26) verwendet.

Die Lösungen des freien bzw. quervernetzten Pall-Enzyms wurden im Verhältnis 1:1 mit der Saccharose-Stammlösung vermischt (Substratstartkonzentration: 25 % Saccharose) und bei 22,5 °C 1 h im Wasserbad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Abkochen (8 min, 100 °C) abgestoppt und die Proben durch 5-minütige Zentrifugation bei 20800 g und 20 °C (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) von unlöslichen Bestandteilen befreit. Entsprechend ihrer enthaltenen Zuckerkonzentrationen wurden die Proben mit Millipore-Wasser verdünnt und mit den HPLC-Systemen 1 und 2 (siehe Abschnitt 3.3.3) gemessen. Die Berechnung der Pall-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben. Um Substrat-

limitierungen zu vermeiden, wurden Enzymlösungen mit sehr hohen Pali-Aktivitäten vor Zugabe des Substrates mit Reaktionspuffer verdünnt.

Tabelle 3.26: Substratstammlösung für die Pali-Enzymreaktion

Saccharose-Lösung (50 %)	
Komponente	[g/L]
Saccharose	500
ad. Reaktionspuffer*	1 L

* vgl. Tabelle 3.24

3.5.2 LentiKats[®]

Für die Bestimmung der Pali-Aktivität in LentiKats[®] wurden 20 g LentiKat[®]-Feuchtmasse in 100 mL 25 %iger Saccharose-Lösung (Lösungsmittel: Reaktionspuffer) eingesetzt und 15 min bei 22,5 °C im Wasserbad gerührt (420 rpm, Rührwerk IKA RW 16 basic mit fishclip[®]-Rührer). Die Enzymreaktion wurde durch Abtrennen der LentiKats[®] und anschließendes Abkochen der gezogenen Proben (8 min, 100 °C) abgestoppt. Die Proben wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 20800 g und 20 °C (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) von unlöslichen Bestandteilen befreit, entsprechend ihrer enthaltenen Zuckerkonzentrationen mit Millipore-Wasser verdünnt und anschließend mit den HPLC-Systemen 1 und 2 (siehe Abschnitt 3.3.3) gemessen. Die Berechnung der Pali-Aktivität erfolgte wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben.

3.5.3 Berechnung der Enzymaktivität der Isomaltulose-Synthase

Die Aktivität der Isomaltulose-Synthase (Pali-Aktivität) bezieht sich auf die Menge an Hauptprodukt (Palatinose in μmol), die durch Zellextrakte, die aus einem Liter *E.-coli*-Kultur hergestellt wurden, in einer Minute gebildet wird. Um verschiedene Versuchsansätze untereinander vergleichen zu können, wurde die Pali-Aktivitätsbestimmung der Schüttelkolbenversuche für die Zelldichte $\text{OD}_{600} = 4$ standardisiert (zellspezifische Pali-Aktivität). Die Bestimmung der Pali-Aktivität wurde unter Verwendung der Gleichung 3-3 durchgeführt.

$$Pall - Aktivität = c_{Pal} / (MW_{Pal} \cdot t) \cdot 1.000.000 \cdot f \quad 3-3$$

<i>Pall – Aktivität</i>	: Aktivität der Isomaltulose-Synthase [EU/L Kultur], EU/L Kultur = μmol/L/min
c_{Pal}	: Konzentration der gebildeten Palatinose [g/L]
MW_{Pal}	: Molekulargewicht von Palatinose [g/mol], 342,11621
1.000.000	: Umrechnungsfaktor von mol auf μmol
t	: Reaktionszeit [min]
f	: Verdünnungsfaktor

3.6 Analyse des Produktspektrums der Isomaltulose-Synthase

Für die Aufnahme des Produktspektrums der Isomaltulose-Synthase wird der zeitliche Verlauf der Enzymreaktion bis zum vollständigen Substratverbrauch analysiert. Die Lösungen des freien und quervernetzten Enzyms wurden mit steriler 50 %iger Saccharose-Stammlösung (siehe Tabelle 3.26) im Verhältnis 1:1 vermischt (Substratstartkonzentration: 25 % Saccharose) und bei 22,5 °C im Wasserbad (siehe Tabelle 3.25) bis zum Erreichen der maximalen Palatinose-Ausbeute inkubiert. Um einen zu schnellen Reaktionsverlauf zu vermeiden, wurden Enzymlösungen mit sehr hohen Pall-Aktivitäten vor Zugabe des Substrates mit Reaktionspuffer verdünnt. Für die Charakterisierung des freien Enzyms wurde ein zusätzlicher Ansatz mit 40 % Saccharose-Startkonzentration untersucht.

Für die Bestimmung des Pall-Produktspektrums der LentiKats[®] wurden 20 g LentiKat[®]-Feuchtmasse in 100 mL steriler 25 %iger Saccharose-Lösung (Lösungsmittel: Reaktionspuffer) eingesetzt und bei 22,5 °C im Wasserbad (siehe Tabelle 3.25) gerührt (420 rpm, Rührwerk IKA RW 16 basic mit fishclip[®]-Rührer). Bei den Ansätzen mit freiem, quervernetztem und in LentiKats[®] immobilisiertem Pall-Enzym wurden über die gesamte Reaktionszeit verteilt Proben gezogen und die Enzymreaktion durch Kochen (8 min, 100 °C) abgestoppt. Die Proben wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 20800 g und 20 °C (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) von unlöslichen Bestandteilen befreit, entsprechend ihrer enthaltenen Zuckerkonzentrationen mit Millipore-Wasser verdünnt und mit den HPLC-Systemen 1 und 2 (siehe Abschnitt 3.3.3) gemessen. Die Dauer der Inkubationszeit variierte je nach Pall-Aktivität der eingesetzten Katalysatoren.

3.7 Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase

3.7.1 Einfluss von Glutardialdehyd auf die PaII-Aktivität

Um den Einfluss von Glutardialdehyd (GDA) auf die PaII-Aktivität zu untersuchen, wurde GDA in verschiedenen Konzentrationen für die Quervernetzung eingesetzt. Die Versuchsansätze wurden in 50-mL-Reaktionsgefäßen durchgeführt, da im Anschluss in denselben Gefäßen die PaII-Aktivität analysiert wurde.

Es wurde je 1 mL der aufgetauten Rohenzymlösung (siehe Abschnitt 3.4.2), die einen löslichen Proteinanteil von 6,5 g/L enthielt, mit 0, 5, 15, 25 und 50 μL einer 50 %igen GDA-Lösung versetzt und für 16 Stunden bei 4 °C und 90 rpm auf einem Plattformschüttler (Rotamax 120, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach) durchmischt. Die GDA-Konzentrationen der Reaktionsansätze betragen 0; 0,06; 0,17; 0,27 und 0,54 mol/L und ihre pH-Werte sanken mit steigendem GDA-Zugabevolumen von pH 6,6 auf bis zu pH 5,7 ab. Anschließend wurden die Ansätze auf ihre PaII-Aktivität hin analysiert (vgl. Abschnitt 3.5.1).

3.7.2 Immobilisierungsverfahren

Die Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurde die Enzymlösung mit Glutardialdehyd (GDA) quervernetzt und anschließend in Polyvinylalkohol (PVAL) in LentiKats[®] (geniaLab GmbH, Braunschweig) eingeschlossen. Abbildung 3.6 fasst die verwendete Immobilisierungsprozedur zusammen.

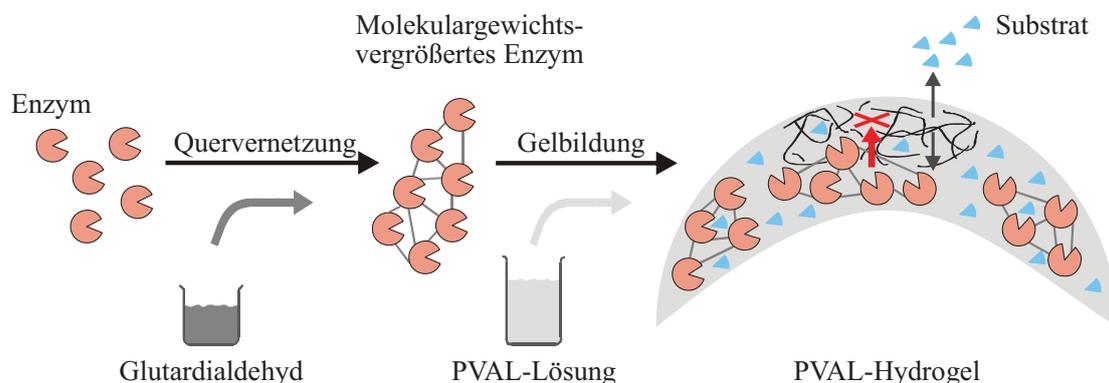


Abbildung 3.6: Prozedur zur Immobilisierung des PaII-Enzyms

Die Enzymquervernetzung wurde mit 50 mL aufgetauter Rohenzymlösung (siehe Abschnitt 3.4.2), die einen löslichen Proteinanteil von 6,5 g/L enthielt, in 250-mL-Schottflaschen

durchgeführt. Der Enzymlösung (pH 6,6) wurden 250 μL einer 50 %igen GDA-Lösung zugesetzt und der Ansatz (pH 6,4) wurde 16 Stunden bei 4 °C und 300 rpm gerührt (fishclip[®] mit Magnetkern, 30 * 8 mm; Magnetrührer, IKA-Combimag Reo, IKA-Werke, Staufen). Die GDA-Konzentration des Reaktionsansatzes betrug 0,06 mol/L. Der anschließende Enzymschluss in LentiKats[®] wurde nach der Vorschrift der Firma geniaLab durchgeführt. 10 mL quervernetzte Enzymlösung wurden mit 40 g geschmolzenem LentiKat[®]Liquid (40 °C) vermischt und mit einem LentiKat[®]Printer zu linsenförmigen LentiKats[®] verarbeitet. Die LentiKats[®] wurden bis zu einer Restfeuchte von ca. 30 % getrocknet und anschließend 2 Stunden in LentiKat[®]Stabilizer-Lösung ausgehärtet. Die fertigen LentiKats[®] wurden in Reaktionspuffer (siehe Tabelle 3.24) bei 4 °C gelagert.

3.8 Mehrfachverwendung des immobilisierten Biokatalysators

Für die Untersuchung der katalytischen Stabilität der LentiKats[®] wurden 20 g LentiKats[®] innerhalb von 10 Tagen 6-mal für die Umsetzung von Saccharose zu Palatinose eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.5.2 und 3.6). Zwischen den einzelnen Einsätzen wurden die LentiKats[®] abgetrennt, mit Reaktionspuffer (siehe Tabelle 3.24) gewaschen und bei 4 °C und 200 rpm (fishclip[®] mit Magnetkern, 30 * 8 mm; Magnetrührer, IKA-Combimag Reo, IKA-Werke, Staufen) gelagert. Hierdurch wurden die Zucker aus der Matrix gelöst, um einen Befall mit Mikroorganismen zu verhindern. In Abhängigkeit von der Zeitspanne zwischen den einzelnen Einsätzen wurde der Reaktionspuffer unterschiedlich oft gewechselt. Die Abbildung 3.7 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf des durchgeführten Versuches.

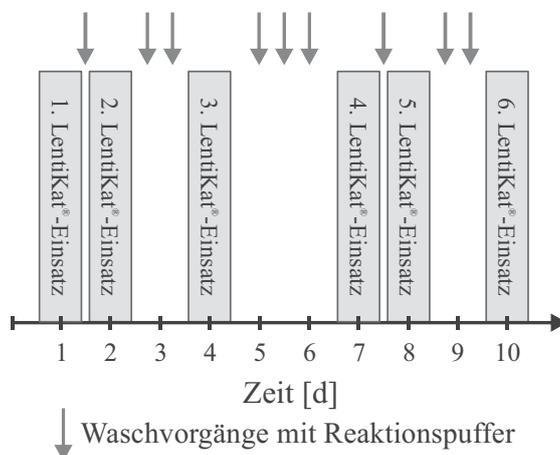


Abbildung 3.7: Zeitlicher Verlauf des Versuchs zur Mehrfachverwendbarkeit der LentiKats[®]

3.9 Chemikalienliste

Tabelle 3.27: Liste der wichtigsten verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Qualität
Trypton	Sigma-Aldrich	für die Molekularbiologie
Hefeextrakt	Merck	für die Mikrobiologie
NaCl	Merck	zur Analyse, $\geq 99,5\%$
Agar-Agar	Merck	für die Mikrobiologie
KH_2PO_4	Merck	zur Analyse, $\geq 99,5\%$
Na_2HPO_4	Merck	zur Analyse, $\geq 99,5\%$
Pharmaglycerin (Medium)	Carl Roth	$\geq 98,0\%$, wasserfrei
Pharmaglycerin (Molekularbiologie)	Carl Roth	zur Analyse, $\geq 99,5\%$, wasserfrei
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth	für die Molekularbiologie, 99%
Struktol J 673	Schill + Seilacher	
Ethanol (70 %)	Carl Roth	$99,8\%$, vergällt
NaOH	Merck	zur Analyse, $\geq 99,0\%$
Acetonitril	Carl Roth	HPLC-Qualität $\geq 99,5\%$
Palatinose*	Südzucker AG	$99,6\%$
Trehalulose	Südzucker AG	$90,0\%$
Isomaltose	Südzucker AG	$91,6\%$
Saccharose	Merck	für die Mikrobiologie
Glucose-Monohydrat	Carl Roth	für die Mikrobiologie
Fructose	Merck	für biochemische Zwecke
H_2SO_4	Riedel de Haen	$0,5\text{ mol}$ in Wasser
Essigsäure	Carl Roth	100%
DL-Milchsäure Natriumsalz	Fluka	$\geq 99,0\%$
BSA	New England Biolabs	
EDTA* Na_2	Boehringer Mannheim	
Tris	Boehringer Mannheim	
Ethanol (100 %)	Carl Roth	zur Analyse, $99,8\%$
Calciumacetat-Hydrat	Merck	zur Bodenuntersuchung, etwa 94% $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
Glutardialdehyd	Merck	50% ige Lösung in Wasser, zur Synthese
LentiKat [®] Liquid	geniaLab GmbH	
LentiKat [®] Stabilizer	geniaLab GmbH	
Millipore-Wasser	Millipore Corporation, Billerica, USA	Reinstwasser, hergestellt mit Milli-Q

*Zur besseren Unterscheidung von den Zuckern Isomelezitose und Isomaltose wird die Isomaltulose im Ergebnisteil mit Palatinose, Abkürzung Pal, bezeichnet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der Pall-Expression in *E. coli*

Die Pall-Expression des Stammes XMS wurde im Schüttelkolben-Maßstab näher charakterisiert. Hierfür wurde neben dem Produktionsstamm XMS der Referenzstamm PUC (gleicher *E.-coli*-Stamm, der das Basisplasmid pUC19 ohne *pall*-Gen trägt, und deshalb kein Pall-Enzym bilden kann) vergleichend mitgeführt. Für die nähere Stammbeschreibung siehe Abschnitt 3.1.

Die Kultivierung der beiden Stämme XMS und PUC erfolgte in YeGly-Medium unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 3.2.3). Für die Charakterisierung der Pall-Expression wurden folgende Parameter analysiert:

- Wachstumsverhalten und Morphologie der Zellen
- Substratverbrauch, Produktion organischer Säuren und Bildung löslicher Proteine
- Untersuchung der Pall-Expression
 - Plasmidstabilität
 - Semiquantitative Erfassung der Pall-Expression
 - Pall-Aktivität der löslichen Zellfraktionen

4.1.1 Wachstumsverhalten und Morphologie der Zellen

In Abbildung 4.1 und Tabelle 4.1 ist das Wachstumsverhalten der beiden Stämme XMS und PUC dargestellt. Die Ergebnisse wurden in Mehrfachansätzen reproduziert.

Der Kontrollstamm PUC wuchs etwas schneller als XMS. Dies könnte damit begründet werden, dass XMS neben seinen wirtseigenen Proteinen zusätzlich das in hoher Gendosis vorliegende Pall-Protein exprimiert und somit im Vergleich zu PUC einer höheren metabolischen Belastung ausgesetzt war.

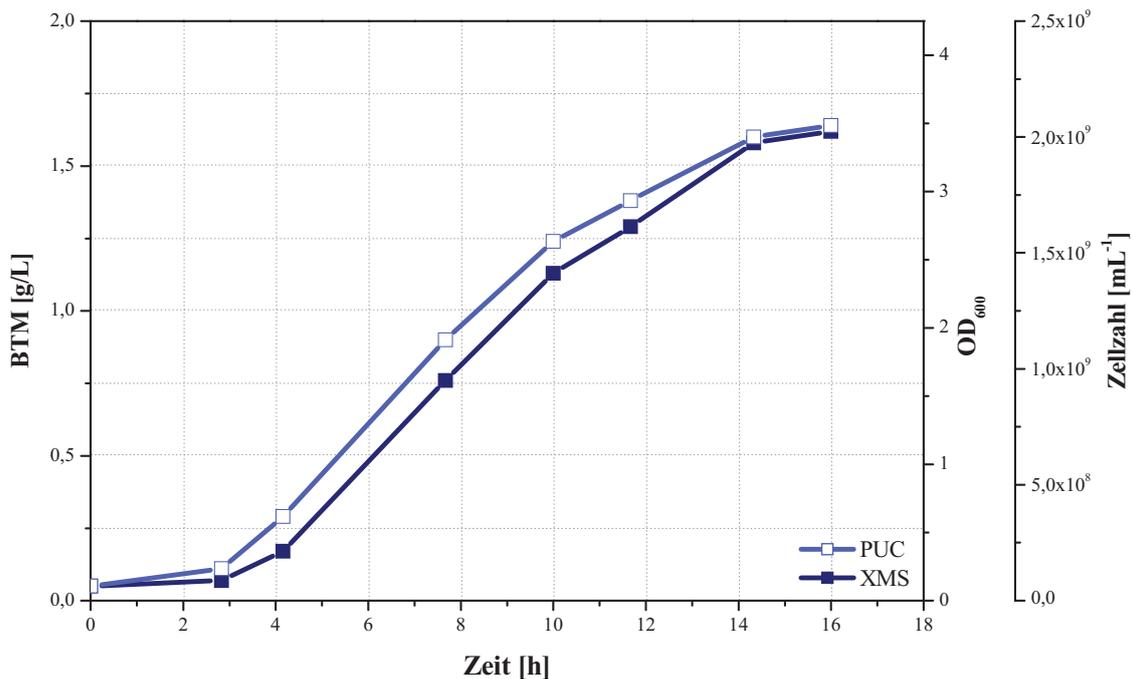


Abbildung 4.1: Wachstumskurven der Stämme XMS und PUC

Tabelle 4.1: Entwicklung der Biomasse über die Zeit von XMS und PUC im 50-mL-Maßstab

Probe	Zeit [h]	XMS			PUC		
		OD ₆₀₀ [-]	BTM [g/L]	Zellzahl [mL ⁻¹]	OD ₆₀₀ [-]	BTM [g/L]	Zellzahl [mL ⁻¹]
t0	0	0,11	0,05	66.064.340	0,11	0,05	66.064.340
t1	3	0,15	0,07	88.309.548	0,22	0,11	133.142.495
t2	4	0,35	0,17	212.738.989	0,61	0,29	364.475.518
t3	8	1,58	0,76	948.164.464	1,88	0,90	1.128.324.608
t4	10	2,37	1,13	1.420.823.194	2,60	1,24	1.559.088.227
t5	12	2,70	1,29	1.621.983.902	2,89	1,38	1.734.307.319
t6	14	3,31	1,58	1.985.082.455	3,34	1,60	2.002.359.912
t7	16	3,40	1,62	2.037.052.498	3,42	1,64	2.054.467.625

Abbildung 4.2 zeigt Fotos von XMS- und PUC-Zellen nach 16 Stunden Kultivierungsdauer. Es sind deutliche zellmorphologische Unterschiede zwischen den Stämmen zu erkennen. So wies nur XMS im Lichtmikroskop hell erscheinende „Kompartimente“ auf. Bei PUC waren diese zu keinem Fermentationszeitpunkt zu finden. Aufgrund der Tatsache, dass sich XMS und PUC nur durch das Vorhandensein des *palI*-Gens unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass diese morphologischen Unterschiede auf die Expression des *palI*-Gens

zurückzuführen sind. Es könnte sich um *Pall-Inclusion-bodies* oder Orte erhöhter Protein-syntheseaktivität handeln. Dieses Phänomen wird in Abschnitt 4.1.3.2 näher untersucht.

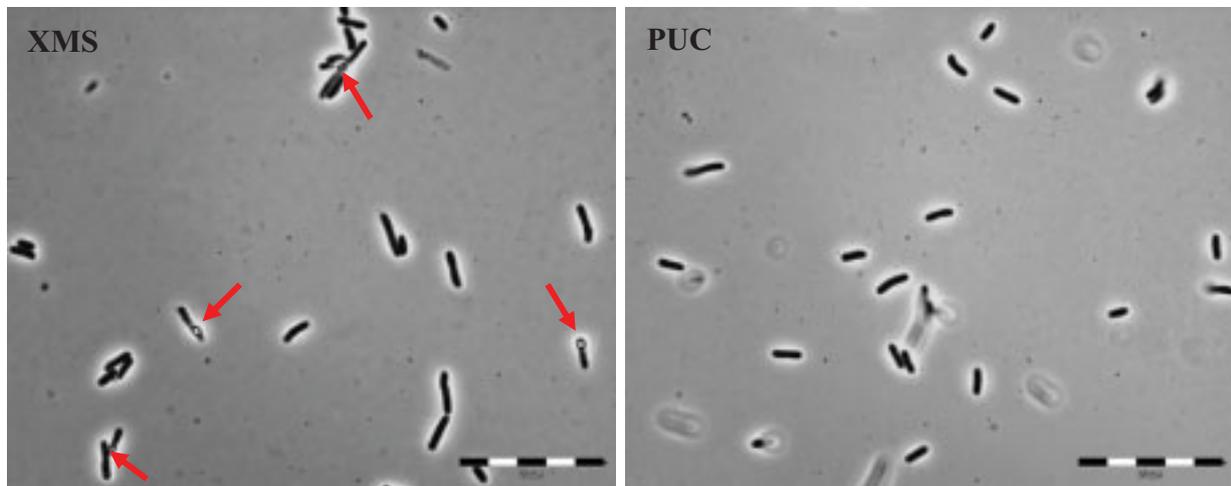


Abbildung 4.2: Zellmorphologie der Stämme XMS und PUC nach 16 h Fermentationsdauer

4.1.2 Substratverbrauch, Produktion organischer Säuren und Bildung löslicher Proteine

Um Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Zellen ziehen zu können, wurden der Verbrauch an Glycerin, die Produktion organischer Säuren und die Bildung an löslichem Gesamtprotein analysiert (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.3). Die größten Anteile an organischen Säuren stellten Acetat und Lactat dar. Weitere Säuren wurden aufgrund ihrer vernachlässigbaren Konzentrationen nicht berücksichtigt.

Tabelle 4.2: Glycerin-Abnahme, Produktion organischer Säuren und Bildung löslicher Proteine der Stämme XMS und PUC

Probe	Zeit [h]	BTM [g/L]	Glycerin [g/L]	Acetat [g/L]	Lactat [g/L]	lös. Protein [g/L]	lös. Protein [g/g BTM]
XMS t1	0	0,05	26,6	0,1	0,0	-	-
XMS t3	8	0,76	26,3	0,8	0,2	0,07	0,09
XMS t5	12	1,29	25,0	1,2	0,9	0,15	0,12
XMS t7	16	1,62	24,5	2,0	1,1	0,24	0,15
PUC t1	0	0,05	26,6	0,1	0,0	-	-
PUC t3	8	0,90	26,2	1,0	0,2	0,08	0,09
PUC t5	12	1,38	25,1	1,5	1,0	0,14	0,10
PUC t7	16	1,64	23,7	2,1	1,4	0,21	0,13

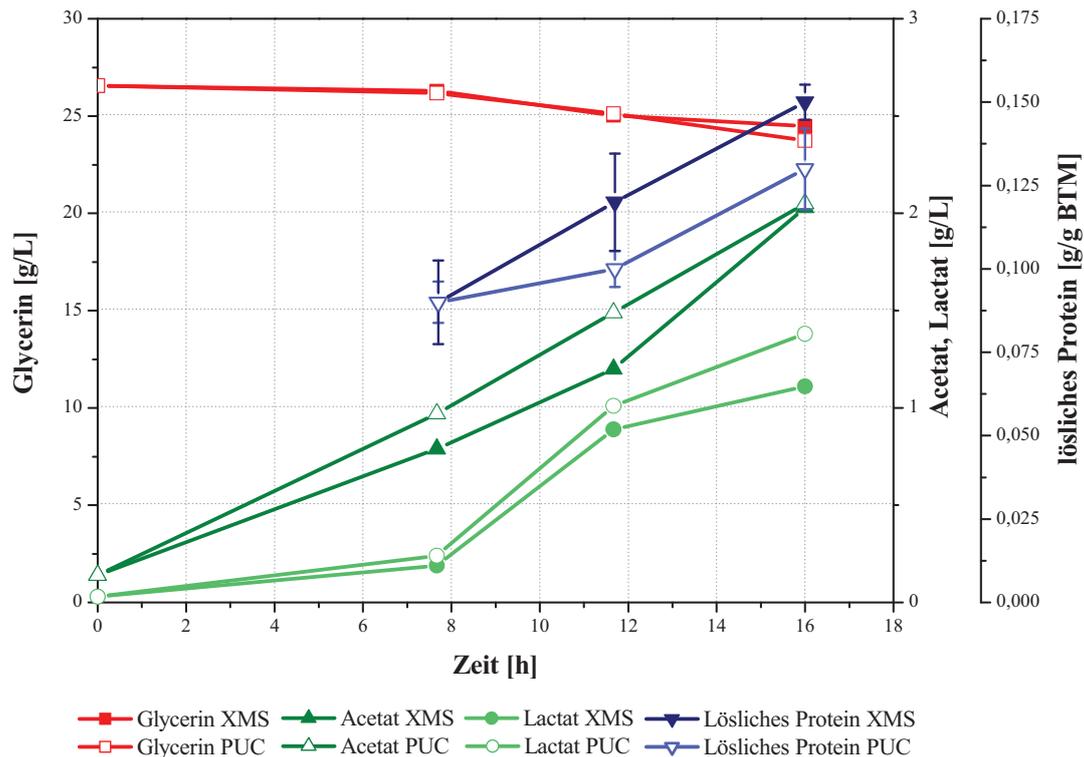


Abbildung 4.3: Substratverbrauch, Produktion organischer Säuren und Bildung löslicher Proteine der Stämme XMS und PUC im Vergleich

Die Verwertung von Glycerin und die Bildung von Acetat und Lactat zeigten bei beiden Stämmen sehr ähnliche Verläufe. Die leicht geringeren Konzentrationen an organischen Säuren der XMS-Kultivierung nach 8 und 12 Stunden sind auf die zu diesen Zeitpunkten geringeren Biomassekonzentrationen zurückzuführen. Für die Untersuchung der Proteinbildung wurde die Proteinmenge der löslichen Zellfraktionen bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.5). Es war für beide Stämme eine Proteinzunahme pro Zelle mit fortschreitender Kultivierungszeit zu verzeichnen. Hierbei wiesen die XMS-Zellen im Vergleich zu PUC eine höhere Konzentration löslicher Proteine auf. Diese wurde durch die zusätzliche Expression des Pall-Proteins hervorgerufen.

4.1.3 Untersuchung der Pall-Expression

4.1.3.1 Plasmidstabilität

Um die Plasmid-DNA-Menge von XMS und PUC während der Kultivierung verfolgen zu können, wurde die jeweilige Plasmid-DNA isoliert, mit den Restriktionsenzymen *Eco RI* und *Hind III* verdaut und anschließend in einem 0,7 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt

(siehe Abschnitt 3.3.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5 dargestellt. Die Bezeichnungen A und B stehen für die jeweiligen Doppelansätze.

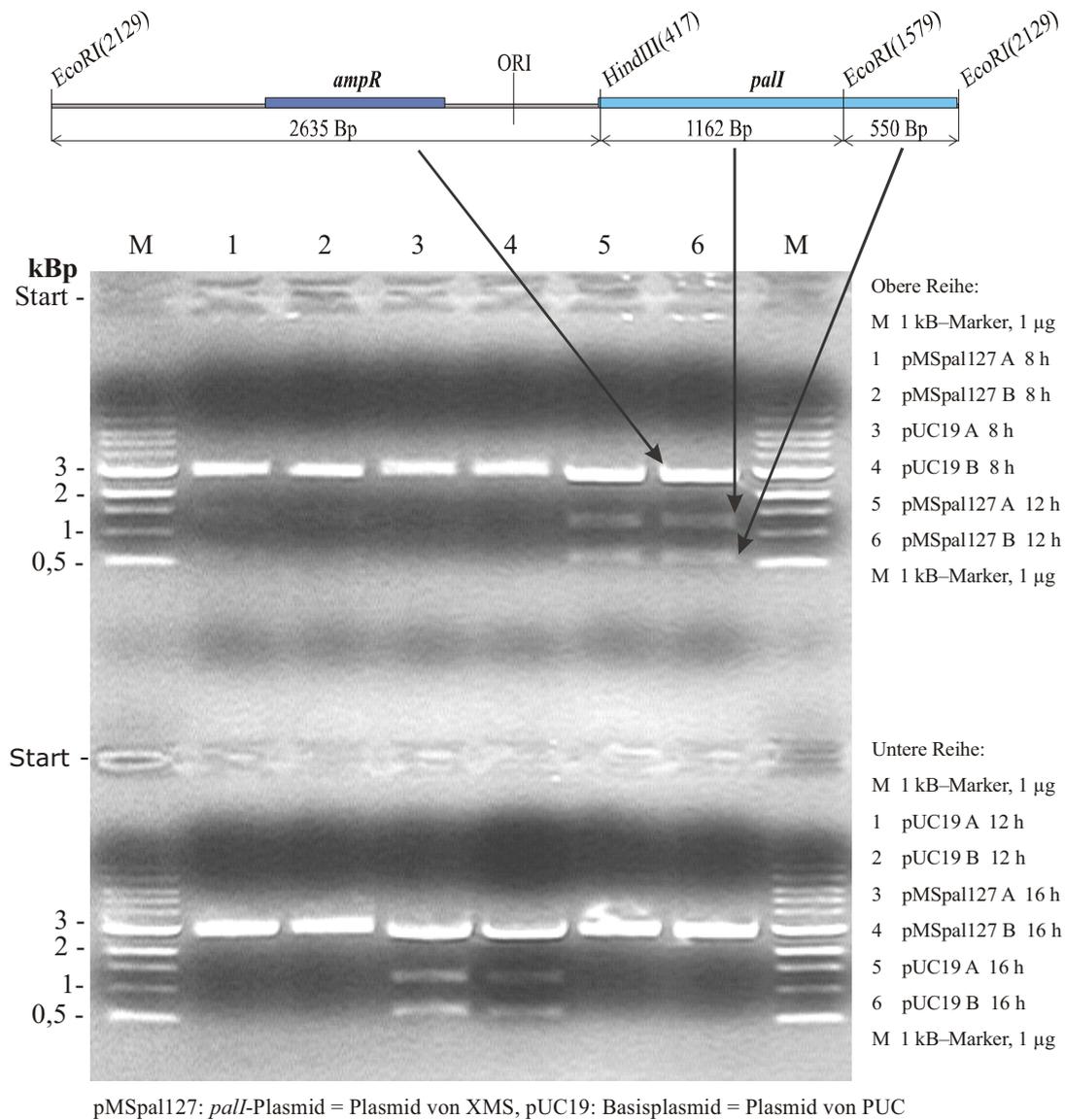


Abbildung 4.4: Restriktionskarte des linearisierten Plasmids pMSpal127 (*pall*-Plasmid) und Foto des Agarosegels mit den Restriktionsfragmenten *Eco RI/Hind III* von XMS und PUC

Die Restriktionsfragmente *Eco RI/Hind III* der isolierten Plasmid-DNA zeigen eindeutig, dass die Plasmide pMSpal127 von XMS neben dem 2.635 Bp großen *Hind III/Eco RI*-Fragment (Basisplasmid pUC19) auch das *pall*-Gen (gespalten in zwei Fragmente: *Hind III/Eco RI* 1.162 Bp und *Eco RI* 550 Bp) enthalten. Diese *pall*-Genfragmente fehlen den Plasmiden der PUC-Kontrollkulturen vollständig.

Für die Quantifizierung der Plasmid-DNA wurden nur die *Eco RI/Hind III*-Restriktionsfragmente von pMSpal127 (Stamm XMS) in einem 0,7 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 4.5 und Tabelle 4.3). Die Bezeichnungen A und B stehen für die jeweiligen Doppelansätze.

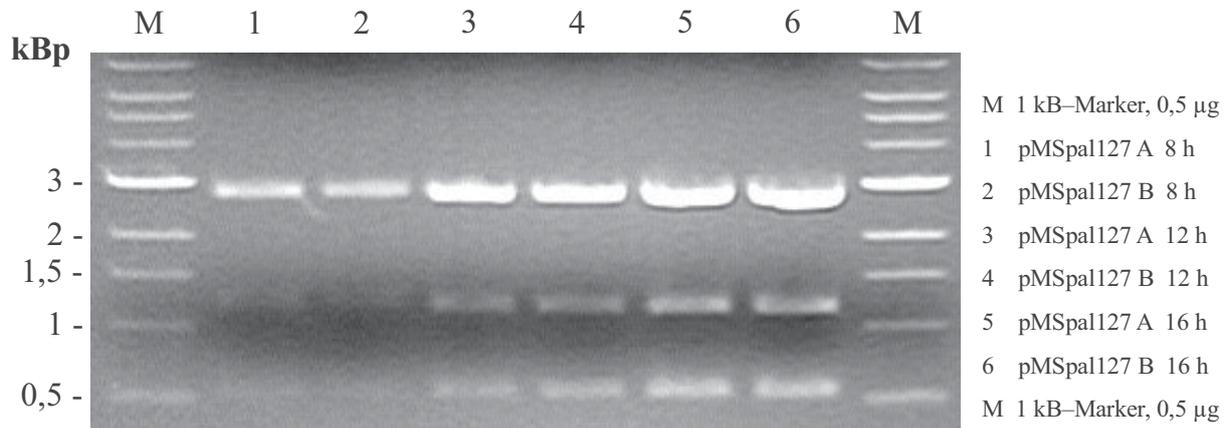


Abbildung 4.5: Agarosegel mit Restriktionsfragmenten *Eco RI/Hind III* der Plasmid-DNA von XMS

Tabelle 4.3: Quantifizierung der Plasmid-DNA von XMS

Probe	BTM	Plasmid-DNA	
	[g/L]	[mg/L Kultur]	[mg/g BTM]
XMS 8 h	0,76	6,4	8,5
XMS 12 h	1,29	8,4	6,5
XMS 16 h	1,62	11,7	7,2

Die Menge der Plasmid-DNA pro Liter Kultur stieg mit der Biomasse und der Kultivierungszeit an. Gleichzeitig blieben die auf 1 g BTM bezogenen Konzentrationen der Plasmid-DNA zwischen 12 und 16 Stunden annähernd konstant. Während der Fermentationsdauer von 16 Stunden blieb die Anzahl der Plasmide pro Zelle somit erhalten. Beide Stämme zeigten eine gute Plasmidstabilität.

4.1.3.2 Semiquantitative Erfassung der Pall-Expression

Für die Visualisierung der Pall-Expression wurde die SDS-PAGE-Analytik gewählt, da mit dieser Methode das Pall-Enzym sichtbar gemacht werden kann und eine semiquantitative Schätzung der Proteinmenge möglich ist. Kombiniert mit der Bestimmung von Proteinkonzentration und Enzymaktivität kann mit diesem Werkzeug ein umfassendes Profil der heterologen Pall-Expression erstellt werden. Von besonderer Bedeutung sind qualitativer und

semiquantitativer Nachweis der Pall-Moleküle, Differenzierung zwischen aktivem und nichtaktivem Pall-Enzym, Bildung von unlöslichen Pall-*Inclusion-bodies* und Schätzung der spezifischen Pall-Aktivität.

Für die Untersuchung der Pall-Expression auf der Proteinebene wurden die löslichen Fraktionen der Zellextrakte sowie der gesamte Inhalt der aufgeschlossenen XMS- und PUC-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.3.6). Die Ergebnisse werden in Abbildung 4.6 und in Tabelle 4.4 präsentiert.

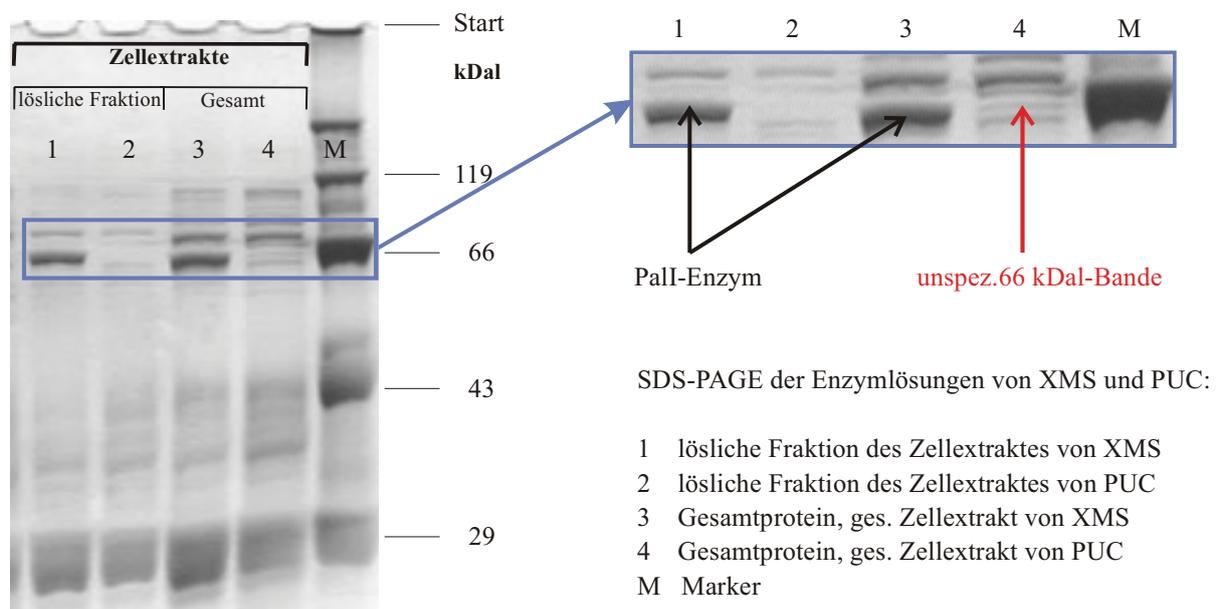


Abbildung 4.6: Vergleichende SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte von XMS und PUC

Abbildung 4.6 stellt die Proteinbandenprofile der Zellextrakte von XMS und PUC sowie einen Proteingrößenstandard (Marker) dar. In den Zellextrakten des Stammes XMS ist das Pall-Enzym als diskrete Bande im Bereich von 66 kDal sichtbar (berechnete Größe = 67.203 Dalton). Die lösliche Fraktion des Referenzstammes PUC zeigt in diesem Bereich keine Farbsignale. PUC trägt auf dem Basisplasmid pUC19 kein *pall*-Gen und kann deshalb kein Pall-Enzym bilden. Zur Detektion des Pall-Enzyms ist nur die lösliche Fraktion geeignet, da das Proteinbandenmuster der Gesamtzellextrakte im Bereich von 66 kDal ein Pall-unspezifisches Farbsignal enthält (roter Pfeil).

In Tabelle 4.4 sind die anhand der Bandenintensitäten semiquantitativ abgeschätzten Proteinmengen aufgelistet.

Tabelle 4.4: Semiquantitative Auswertung der SDS-PAGE der Zellextrakte von XMS und PUC

Probe	66 kDal [μ g]	Protein/Spur [μ g]	Protein im Zellextrakt [g/L]	Proben- volumen [μ l]	66 kDal [%]
Lösliche Fraktion XMS	0,65	2,36	0,244	9,67	27,6
Lösliche Fraktion PUC	0,01	2,03	0,210	9,67	0,5
Gesamtprotein XMS	1,01	5,89	0,609	9,67	17,1
Gesamtprotein PUC	0,28	4,26	0,441	9,67	6,6
Marker	2,00	14,00	1,400	10,00	14,3

Eine vergleichende Analyse der Proteinbandenmuster des Gesamtzellextraktes und seiner löslichen Fraktion gibt Auskunft über eine eventuelle Bildung von intrazellulären Pall-Einschlusskörpern (*Pall-Inclusion-bodies*). Hierbei wurde die 67 kDal-Bande als Vergleichsgröße herangezogen. Nach Abzug des Pall-unspezifischen Anteils in der 66 kDal-Bande des Gesamtproteins ($\sim 0,3 \mu\text{g}$) war die Pall-Menge in beiden Proben des Stammes XMS (Spur 1 lösliche Fraktion und Spur 3 Gesamt) etwa gleich ($\sim 0,7 \mu\text{g}$). Das bedeutet, dass unter den gewählten Expressionsbedingungen sich das rekombinante Pall-Enzym größtenteils in der löslichen Fraktion der Zellextrakte befand und eine nennenswerte Bildung von Pall-Einschlusskörpern ausgeschlossen werden kann. Am Ende der Fermentation lagen der Pall-Anteil der löslichen Proteinfraction bei 28 % und der Pall-Anteil am Gesamtprotein bei 11 %.

4.1.3.3 Pall-Aktivität der löslichen Zellfraktionen

Die Aktivitäten der Isomaltulose-Synthase (Pall-Enzym) in den Zellextrakten aus XMS und PUC wurden wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben ermittelt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.5 und Abbildung 4.7 dargestellt. In den Medienüberständen gemessene Pall-Aktivitäten waren bei diesen Kultivierungen vernachlässigbar.

Tabelle 4.5: Zeitliche Entwicklung der Pall-Aktivitäten von XMS- und PUC-Zellen

Probe	Zeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]	Zellspez. Enzymaktivität [EU/OD ₆₀₀ = 4]	Spez. Enzymaktivität [EU/mg lösl. Protein]
XMS t3	8	1,58	2.308	5.842	33
XMS t5	12	2,70	10.441	15.449	71
XMS t7	16	3,40	18.613	21.930	76
PUC t3	8	1,88	0	0	0
PUC t5	12	2,89	0	0	0
PUC t7	16	3,42	0	0	0

Abbildung 4.7 zeigt den zeitlichen Verlauf der spezifischen Enzymaktivitäten pro mg lösliches Protein.

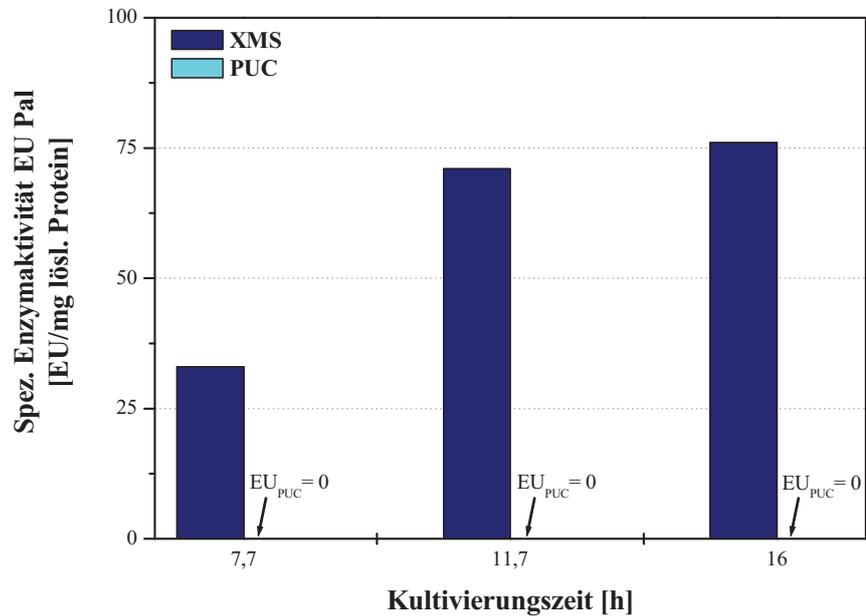


Abbildung 4.7: Zeitlicher Verlauf der spezifischen PalI-Aktivitäten von XMS und PUC

Der Stamm PUC zeigte zu keinem Kultivierungszeitpunkt eine PalI-Aktivität. Dies entspricht den Erwartungen, da PUC kein *pall*-Gen besitzt. Die Enzymaktivitäten von XMS stiegen hingegen mit der Fermentationszeit an. Es wurde eine PalI-Aktivität von über 18.500 EU/L Kultur bzw. 76 EU/mg lösliches Protein nach 16 Stunden Kultivierungszeit erreicht.

4.1.4 Zusammenfassung: Charakterisierung der PalI-Expression in *E. coli*

Es wurde die PalI-Expression im Schüttelkolben (Kulturvolumen: 50 mL) über eine Kultivierungszeit von 16 Stunden charakterisiert. Die Wachstumsgeschwindigkeiten des Produktionsstammes XMS und des Kontrollstammes PUC waren leicht unterschiedlich. XMS wuchs etwas langsamer als PUC, was auf die zusätzliche metabolische Belastung, ausgelöst durch die PalI-Expression, zurückzuführen ist. Für die Fremdgenexpression wird oft eine große Anzahl an Ressourcen der Wirtszelle benötigt. Diese stehen dem Wirtsmetabolismus nicht mehr zur Verfügung, was sich unter anderem in einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit äußert (Birnbaum et al., 1991; Glick, 1995; Diaz-Ricci et al., 2000).

Beide Stämme zeigten einen ähnlichen Substratverbrauch und eine entsprechende Produktion organischer Säuren. Die Bildung löslicher Proteine von XMS überstieg die von PUC, was ebenfalls durch die zusätzliche Expression des *pall*-Gens verursacht wurde. Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse belegen, dass das Pall-Protein in löslicher Form vorlag und eine Größe von 67 kDal besitzt. Eine nennenswerte Bildung von Pall-*Inclusion-bodies* konnte ausgeschlossen werden. Der Pall-Anteil der löslichen Proteinfraction variierte zwischen einzelnen Kultivierungen im Bereich von 20 - 28 %, der Pall-Anteil am Gesamtprotein lag bei 9 - 11 %. Die Analyse der Plasmid-DNA-Menge zeigte eine Stabilität der *pall*-Plasmide über die komplette Kultivierungszeit. Die Pall-Aktivität der Zellextrakte des Stammes XMS stieg über die gesamte Fermentationszeit an und erreichte nach 16 Stunden über 18.500 EU/L Kultur und eine spezifische Pall-Aktivität von 76 EU/mg lösliches Protein. Tabelle 4.6 fasst die wichtigsten Merkmale der Pall-Expression zusammen.

Tabelle 4.6: Überblick über die wichtigsten Merkmale der Pall-Expression in XMS

Merkmal des Stammes XMS	Kultivierungszeit [h]	Menge	Einheit
Pall-Aktivität/L Kultur	16	18.500	EU/L Kultur
Spez. Pall-Aktivität/lösl. Protein	16	76	EU/mg lösl. Protein
Anteil Pall-Protein/lösl. Protein	16	20 - 28	%
Lösliches Protein/BTM	16	150	[mg/g BTM]
Plasmid-DNA/BTM	16	ca. 7	[mg/g BTM]
Größe Pall-Protein	-	67	kDal

4.2 Vergleichende Analyse der Stämme XMS und JMS – Auswahl des besten Produktionsstammes

Neben dem Stamm XMS wurde mit JMS ein weiterer Produktionsstamm für die Herstellung des Pall-Enzyms untersucht. XMS und JMS sind auf unterschiedliche *E.-coli*-Wirtsstämme zurückzuführen, die das gleiche *pall*-Plasmid tragen (vgl. Abschnitt 3.1).

Für die Auswahl des besten Produktionsstammes wurde die Pall-Expression von XMS und JMS vergleichend analysiert. Hierfür wurde die optimale Wachstumstemperatur der Zellen ermittelt und eine Kultivierung in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen durchgeführt. Die Schikanen dienen zur Erzeugung verstärkter Scherkräfte sowie einer erhöhten Sauerstoffzufuhr. Durch den Einsatz von Schüttelkolben mit und ohne Schikanen wurde der Einfluss

relevanter Parameter auf die spätere Fermentation und Pall-Expression analysiert. Hierdurch können Aussagen über die Stabilität der Fremdgenexpression unter diesen Stressbedingungen gemacht und so die Auswahl eines robusten Produktionsstammes erleichtert werden.

Die Kultivierung der beiden Stämme XMS und JMS erfolgte in YeGly-Medium unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 3.2.3). Für die Charakterisierung der Pall-Expression von XMS und JMS wurden folgende Parameter analysiert:

- Wachstumsverhalten der Zellen
- Substratverbrauch und Bildung organischer Säuren
- Untersuchung der Pall-Expression
 - Plasmidstabilität
 - Semiquantitative Erfassung der Pall-Expression
 - Pall-Aktivität der löslichen Zellfraktionen

4.2.1 Ermittlung der optimalen Kultivierungstemperatur

Um den Temperatureinfluss auf die Pall-Expression einschätzen zu können und die optimale Wachstumstemperatur der XMS- und JMS-Zellen zu ermitteln, wurden die Stämme vergleichend bei 30, 33,5 und 37 °C kultiviert.

Tabelle 4.7 und Abbildung 4.8 zeigen die nach 19 Stunden Fermentationsdauer gemessenen zellspezifischen Enzymaktivitäten und OD₆₀₀-Werte von XMS und JMS nach Kultivierung bei 30, 33,5 und 37 °C.

Tabelle 4.7: OD₆₀₀-Werte und Enzymaktivitäten von XMS und JMS nach Kultivierung bei 30, 33,5 und 37 °C

Probe	OD ₆₀₀ [-]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]		Zellspez. Enzymaktivität [EU/OD ₆₀₀ = 4]	
		Zellen	Medium	Zellen	Medium
XMS 30,0 °C	2,73	11.373	586	16.665	858
XMS 33,5 °C	2,50	21.044	2.370	33.736	3.800
XMS 37,0 °C	2,39	23.400	1.193	39.107	1.993
JMS 30,0 °C	2,70	4.020	0	5.948	0
JMS 33,5 °C	1,84	13.808	4.107	30.041	8.936
JMS 37,0 °C	1,72	7.701	5.852	17.931	13.627

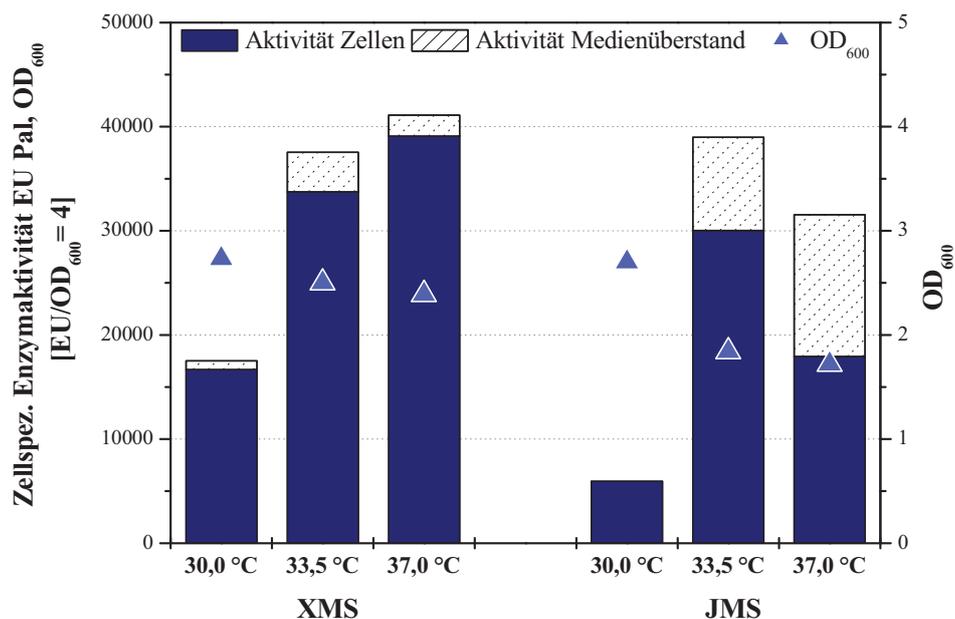


Abbildung 4.8: Zellspezifische Pectinase-Aktivitäten und OD₆₀₀-Werte von XMS und JMS nach Kultivierung bei 30, 33,5 und 37 °C

In dem untersuchten Temperaturintervall stiegen die von XMS erreichten Pectinase-Aktivitäten der löslichen Zellextrakte mit der Kultivierungstemperatur an. XMS zeigte bei 37 °C die höchste zellspezifische Pectinase-Aktivität von über 39.000 EU. Dies entspricht mehr als einer Verdopplung des bei 30 °C erhaltenen Wertes. Das Temperaturoptimum von JMS lag bei 33,5 °C. Der Stamm erreichte bei dieser Kultivierungstemperatur über 30.000 EU intrazelluläre Pectinase-Aktivität und ca. 9.000 EU Pectinase-Aktivität im Medium. Bereits die Zu- oder Abnahme von 3,5 °C führte zu erheblichen Einbußen der zellspezifischen Pectinase-Aktivität (bei 30 °C sank die Pectinase-Aktivität um 80 %). JMS wies im Vergleich zu XMS eine stärkere Zelllyse auf, die durch die Kultivierung bei höheren Temperaturen noch intensiviert wurde.

4.2.2 Kultivierung in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen

4.2.2.1 Wachstumsverhalten der Stämme XMS und JMS

In Abbildung 4.9 und Tabelle 4.8 ist das Wachstumsverhalten der beiden Stämme XMS und JMS dargestellt. Die Kultivierungen von XMS wurden bei 37 °C, die von JMS bei 33,5 °C durchgeführt (siehe Abschnitt und 3.2.3.3). Die Ergebnisse wurden in Mehrfachansätzen reproduziert.

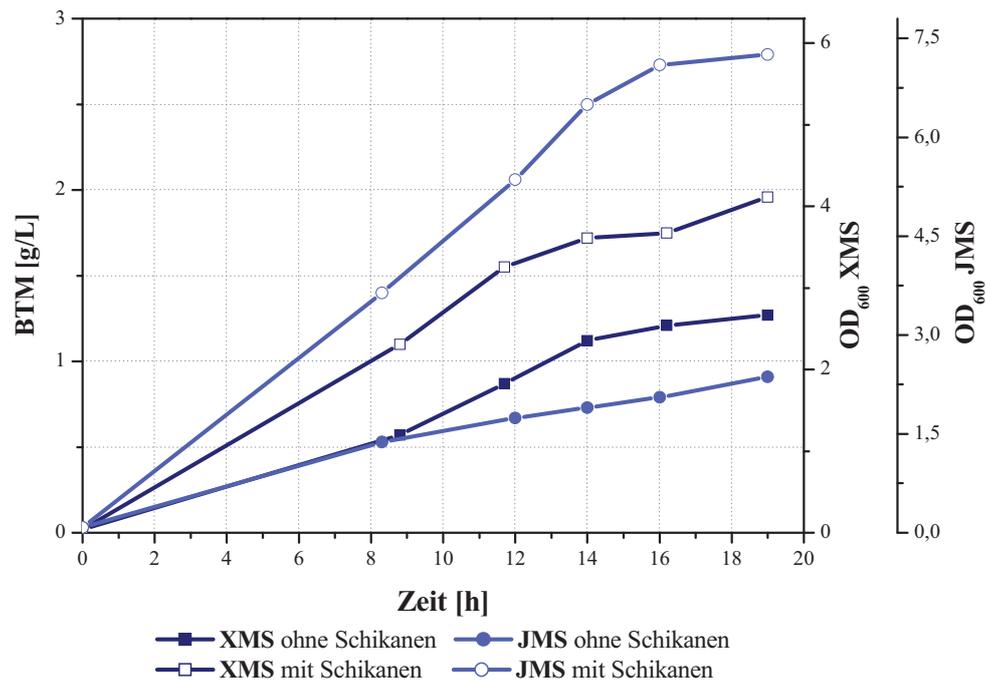


Abbildung 4.9: Wachstumskurven von XMS und JMS in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen

Tabelle 4.8: Zeitliche Entwicklung der Biomassebildung von XMS und JMS in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen

Probe	Zeit [h]	Ohne Schikanen		Mit Schikanen	
		OD ₆₀₀ [-]	BTM [g/L]	OD ₆₀₀ [-]	BTM [g/L]
XMS t0	0	0,04	0,02	0,04	0,02
XMS t1	9	1,18	0,57	2,29	1,10
XMS t2	12	1,81	0,87	3,25	1,55
XMS t3	14	2,34	1,12	3,60	1,72
XMS t4	16	2,52	1,21	3,66	1,75
XMS t5	19	2,65	1,27	4,10	1,96
JMS t0	0	0,07	0,03	0,07	0,03
JMS t1	8	1,38	0,53	3,64	1,40
JMS t2	12	1,74	0,67	5,36	2,06
JMS t3	14	1,90	0,73	6,50	2,50
JMS t4	16	2,05	0,79	7,08	2,73
JMS t5	19	2,37	0,91	7,26	2,79

XMS und JMS zeigten in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die Ansätze mit Schikanen wiesen bei beiden Stämmen ein schnelleres Wachstum als die Ansätze ohne Schikanen auf und erreichten höhere Biomassekonzentrationen. Dies kann auf einen verbesserten Sauerstoffeintrag zurückgeführt werden, der durch die Schikanen

erreicht wird. Die Kultivierung mit Schikanen führte bei dem Stamm JMS zu einer deutlich stärkeren Wachstumssteigerung als bei den XMS-Ansätzen.

4.2.2.2 Substratverbrauch und Bildung organischer Säuren

Für die Untersuchung der Stoffwechselaktivität beider Stämme wurden der Glycerin-Verbrauch sowie die von XMS und JMS während der Kultivierung gebildeten organischen Säuren (Acetat, Lactat) analysiert. Abbildung 4.10 und Tabelle 4.9 zeigen die Ergebnisse. Die Abkürzungen O und S stehen für Ansätze ohne (O) und mit (S) Schikanen, die Werte der optischen Dichte (OD_{600}) sind der Tabelle 4.8 zu entnehmen.

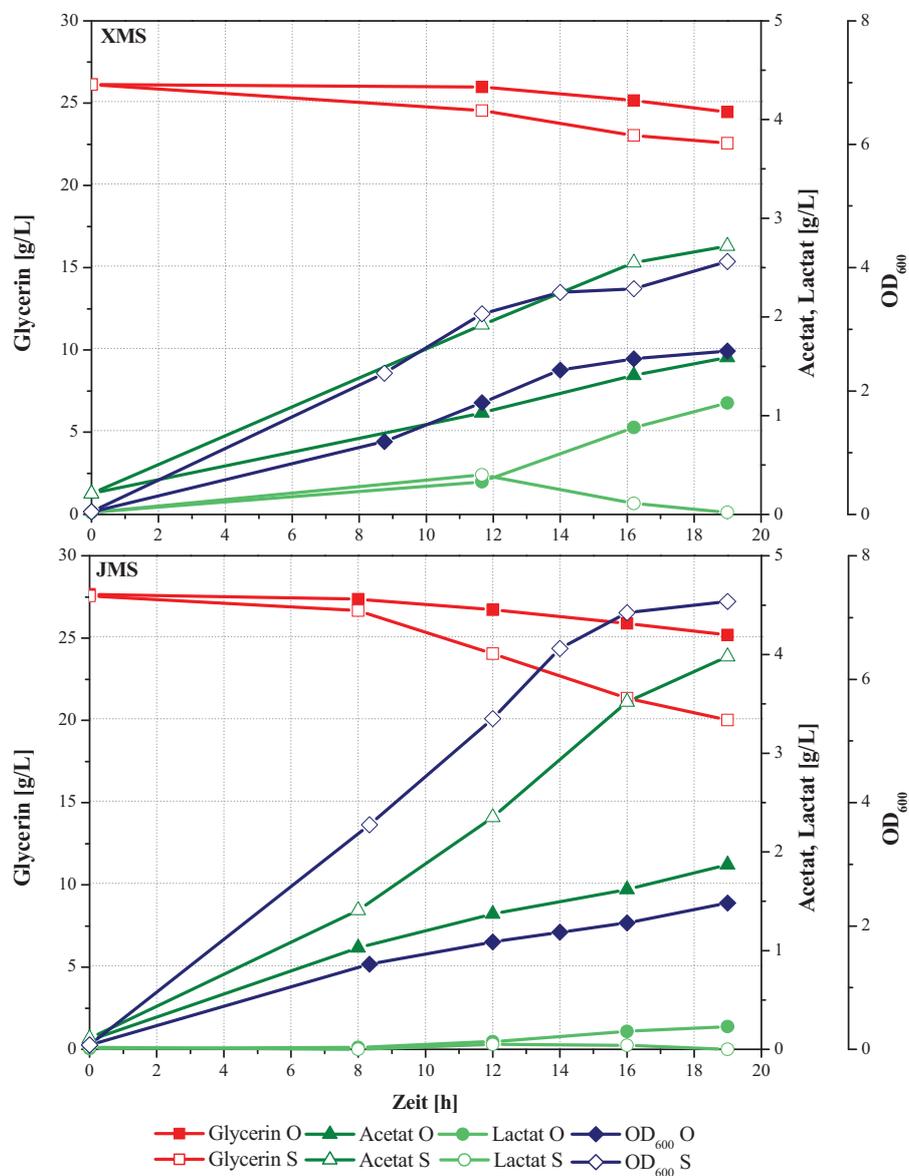


Abbildung 4.10: Substratverbrauch und Bildung organischer Säuren während der Kultivierung von XMS und JMS in Schüttelkolben mit (S) und ohne (O) Schikanen

Tabelle 4.9: Substratverbrauch und Bildung organischer Säuren während der Kultivierung von XMS und JMS in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen

Probe	Zeit [h]	Ansätze ohne Schikanen			Ansätze mit Schikanen				
		Glycerin		Acetat	Lactat	Glycerin		Acetat	Lactat
		[g/L]		[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	
		Konz.	Diff.			Konz.	Diff.		
XMS t0	0	26,13	-	0,21	0,02	26,13	-	0,21	0,02
XMS t2	12	25,99	0,14	1,03	0,33	24,54	1,59	1,92	0,40
XMS t4	16	25,15	0,98	1,41	0,88	23,03	3,10	2,55	0,11
XMS t5	19	24,46	1,67	1,59	1,13	22,56	3,58	2,72	0,02
JMS t0	0	27,66	-	0,09	0,01	27,57	-	0,11	0,02
JMS t1	8	27,37	0,29	1,03	0,02	26,66	0,91	1,41	0,00
JMS t2	12	26,72	0,95	1,37	0,08	24,06	3,51	2,35	0,05
JMS t4	16	25,89	1,77	1,62	0,18	21,35	6,22	3,52	0,04
JMS t5	19	25,20	2,46	1,87	0,23	20,01	7,56	3,98	0,00

Konz. = Konzentration, Diff. = Differenz Substratverbrauch

Der allgemeine Vergleich der Ansätze mit und ohne Schikanen beider Stämme zeigte einen generell höheren Glycerin-Verbrauch in den Ansätzen mit Schikanen, der durch das bessere Wachstum erklärt werden kann. Die Acetat-Bildung korrelierte ebenfalls mit dem Zellwachstum. Die Bildung von Lactat wies in den Ansätzen mit und ohne Schikanen Unterschiede auf. Die Lactat-Bildung der beiden Stämme war ebenfalls verschieden. Bei der Kultivierung von XMS ohne Schikanen nahm die Lactat-Konzentration mit der Fermentationszeit bis 1,1 g/L zu, in den Ansätzen mit Schikanen wurde das gebildete Lactat (0,4 g/L) nach etwa 12 Stunden Kultivierungszeit wieder abgebaut. JMS zeigte hingegen nur in den Ansätzen ohne Schikanen eine sehr geringe Lactat-Bildung von 0,2 g/L.

Beim Vergleich des Substratverbrauches von XMS und JMS fällt der deutlich höhere Glycerin-Verbrauch von JMS (7,6 g/L) in den Ansätzen mit Schikanen auf. XMS verstoffwechselte beim gleichen Ansatz nur 3,6 g/L Glycerin. Dieser vermehrte Glycerin-Konsum spiegelt das Wachstumsverhalten von JMS wider. XMS verbrauchte nur sehr wenig Glycerin und scheint für das Wachstum bevorzugt Komponenten des Cosubstrates Hefeextrakt zu verwenden. Mit dieser Fähigkeit zum erhöhten Glycerin-Konsum besitzt JMS gegenüber XMS einen deutlichen Vorteil für die Entwicklung einer kostengünstigen Hochzell-dichtefermentation.

4.2.2.3 Untersuchung der *Pall*-Expression von XMS und JMS

4.2.2.3.1 Plasmidstabilität

Um die Anzahl und Güte der Expressionsmatrizen während der Kultivierung beurteilen zu können, wurde der zeitliche Verlauf der Plasmid-DNA-Menge in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen gewachsener XMS- und JMS-Zellen untersucht. Die Plasmid-DNA wurde isoliert, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut und anschließend im Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe Abschnitt 3.3.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 und Tabelle 4.10 dargestellt.

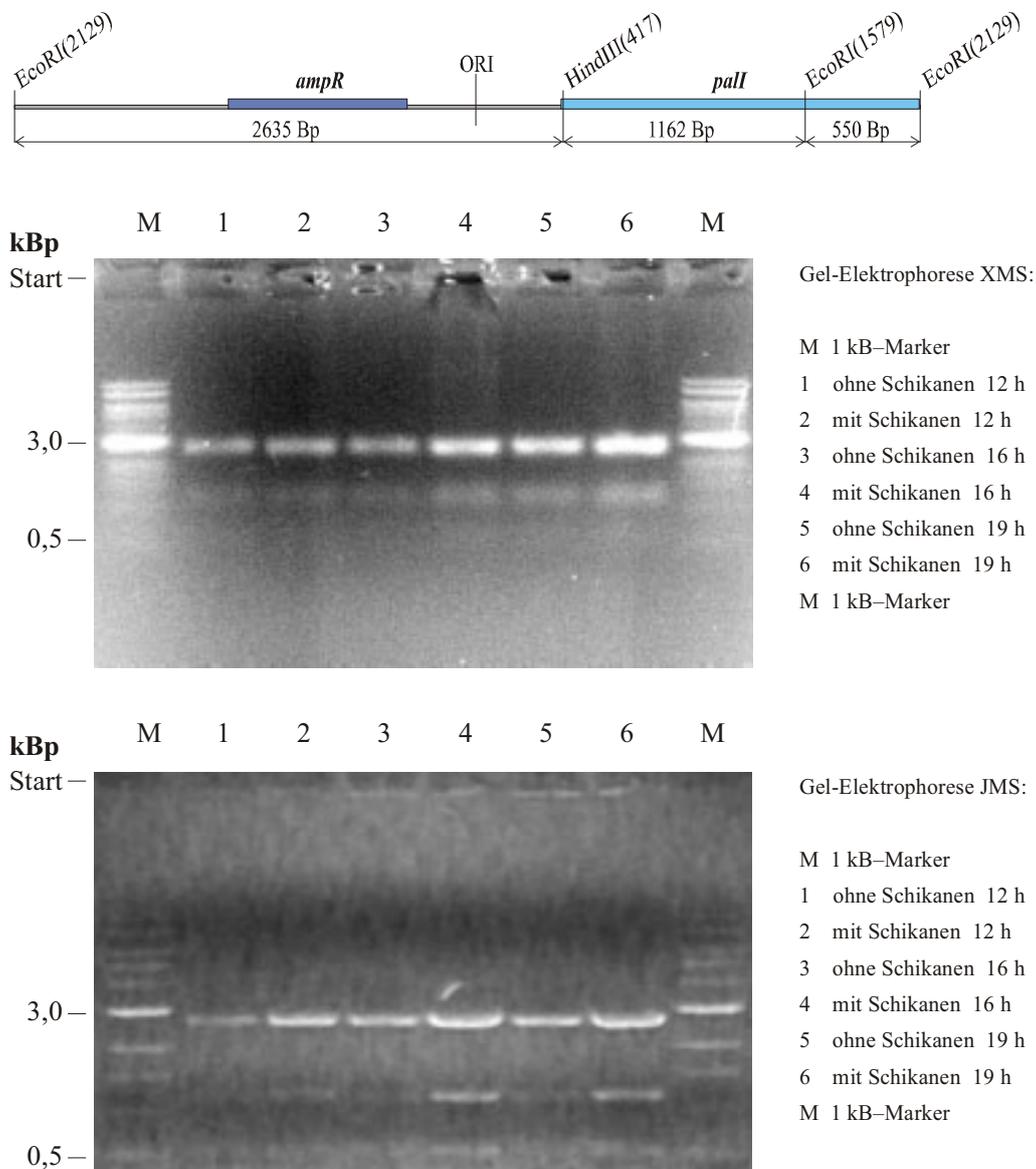


Abbildung 4.11: Restriktionskarte des linearisierten Plasmids pMSpal127 (*pall*-Plasmid) und Foto der Agarosegele mit den Restriktionsfragmenten *EcoRI*/*HindIII* von XMS und JMS

Tabelle 4.10: Quantifizierung der Plasmid-DNA von XMS und JMS

Probe	Zeit [h]	BTM [g/L]		Plasmid-DNA [mg/L Kultur]		Plasmid-DNA [mg/g BTM]	
		ohne S	mit S	ohne S	mit S	ohne S	mit S
S=Schikanen							
XMS t2	12	0,87	1,55	3,3	4,4	3,8	2,8
XMS t4	16	1,21	1,75	4,3	6,9	3,6	3,9
XMS t5	19	1,27	1,96	5,7	8,5	4,5	4,3
JMS t2	12	0,67	2,06	3,6	5,9	5,4	2,9
JMS t4	16	0,79	2,73	4,8	7,1	6,1	2,6
JMS t5	19	0,91	2,79	5,9	8,7	6,5	3,1

Die Restriktionsfragmente *Eco RI/Hind III* der isolierten Plasmid-DNA zeigen, dass die *pall*-Plasmide (pMSpal127) das 2.635 Bp große *Hind III/Eco RI*-Fragment (Basisplasmid pUC19) und das *pall*-Gen (gespalten in zwei Fragmente: *Hind III/Eco RI* 1.162 Bp und *Eco RI* 550 Bp) enthalten. In allen Ansätzen war eine deutliche Zunahme an Plasmid-DNA mit der Kultivierungszeit zu erkennen. Nach einer Fermentationsdauer von 19 h blieb die Anzahl der Plasmide pro BTM erhalten. Beide Stämme XMS und JMS zeigten eine gute Plasmidstabilität.

4.2.2.3.2 Semi quantitative Erfassung der Pall-Expression

Für die Untersuchung der Pall-Expression auf der Proteinebene wurden die löslichen Fraktionen der XMS- und JMS-Zellextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. Abschnitt 3.3.6). Das Pall-Protein (MW = 67.203 Dal) befindet sich in der 67 kDal-Bande der SDS-Gele. Aus der Bandenintensität wurde die Proteinmenge semiquantitativ geschätzt und tabellarisch dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12, Tabelle 4.11, Abbildung 4.13, Tabelle 4.12 und in Tabelle 4.13 gezeigt.



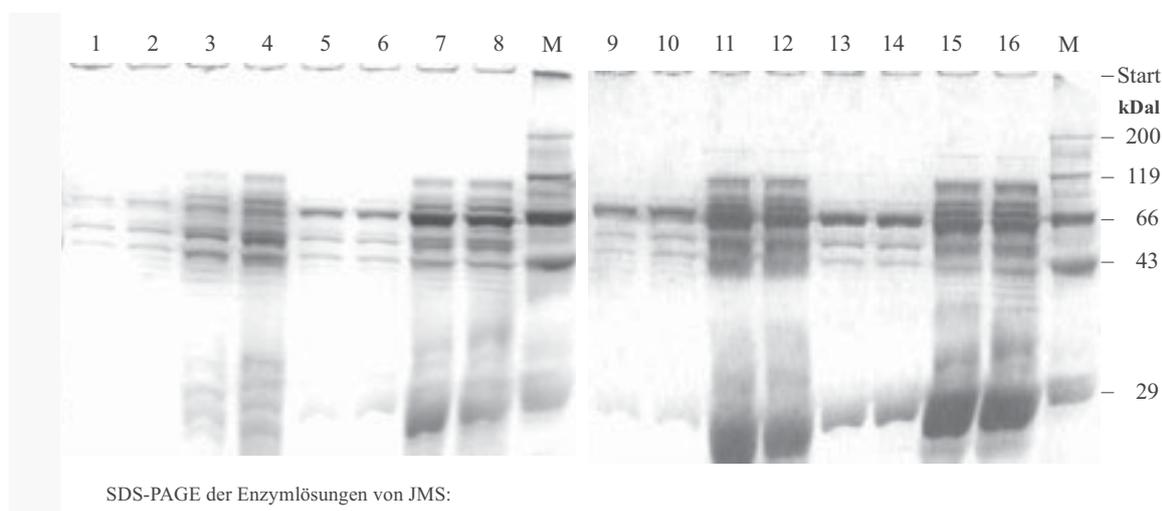
Abbildung 4.12: Vergleichende SDS-PAGE-Analyse der Pall-Expression im Schüttelkolben mit und ohne Schikanen, Zellextrakte aus XMS

Tabelle 4.11: Gesamtausbeute an Pall-Protein aus 1 L XMS-Kultur

Stamm XMS					
Gelplatz-Nr.	Ansätze S = Schikanen	Zeit [h]	lösl. Protein [mg/L Kultur]	Pall-Protein [mg/L Kultur]	Pall-Anteil am lösl. Protein [%]
1	Ohne S	9	119	2	1,5
2	Mit S	9	250	3	1,1
3	Ohne S	12	185	9	4,6
4	Mit S	12	423	8	1,9
5	Ohne S	16	331	31	9,4
6	Mit S	16	547	12	2,2
7	Ohne S	19	331	39	11,7
8	Mit S	19	699	14	2,0

Die Proteinbandenprofile von XMS zeigen, dass in den Ansätzen mit Schikanen deutlich weniger Pall-Protein im Vergleich zu den Ansätzen ohne Schikanen exprimiert wurde.

Die Abkürzungen A und B in der Abbildung 4.13 stehen für zwei unabhängige, parallel geführte Kultivierungen.



SDS-PAGE der Enzymlösungen von JMS:

1	ohne Schikanen A 8 h	5	ohne Schikanen A 12 h	M	Marker	13	ohne Schikanen A 19 h
2	ohne Schikanen B 8 h	6	ohne Schikanen B 12 h	9	ohne Schikanen A 16 h	14	ohne Schikanen B 19 h
3	mit Schikanen A 8 h	7	mit Schikanen A 12 h	10	ohne Schikanen B 16 h	15	mit Schikanen A 19 h
4	mit Schikanen B 8 h	8	mit Schikanen B 12 h	11	mit Schikanen A 16 h	16	mit Schikanen B 19 h
				12	mit Schikanen B 16 h	M	Marker

Abbildung 4.13: Vergleichende SDS-PAGE-Analyse der Pall-Expression im Schüttelkolben mit und ohne Schikanen, Zellextrakte aus JMS

Tabelle 4.12: Gesamtausbeute an Pall-Protein aus 1 L JMS-Kultur

Stamm JMS					
Gelplatz-Nr.	Ansätze S = Schikanen	Zeit [h]	lösl. Protein [mg/L Kultur]	Pall-Protein [mg/L Kultur]	Pall-Anteil am lösl. Protein [%]
1-2	Ohne S	8	96	4	4,2
3-4	Mit S	8	222	11	5,0
5-6	Ohne S	12	128	15	11,7
7-8	Mit S	12	315	32	10,2
9-10	Ohne S	16	174	30	17,2
11-12	Mit S	16	532	47	8,8
13-14	Ohne S	19	202	48	23,8
15-16	Mit S	19	565	48	8,5

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte von JMS zeigen in den Ansätzen mit Schikanen trotz des schnellen Wachstums und der hohen erreichten Biomassekonzentration eine über die gesamte Kultivierungszeit durchgehend zunehmende Pall-Bande. Nach 19 Stunden war die Pall-Expression pro Liter Kultur in den Ansätzen mit und ohne Schikanen etwa gleich stark ausgeprägt.

In Tabelle 4.13 sind die Gesamtausbeuten an exprimiertem Pall-Enzym der Stämme XMS und JMS vergleichend dargestellt.

Tabelle 4.13: Vergleichende Analyse der Gesamtausbeute des exprimierten Pall-Enzyms

Vergleich XMS und JMS							
Ansätze S = Schikanen	Zeit [h]	lösl. Protein [mg/L Kultur]		Pall-Protein [mg/L Kultur]		Pall-Anteil am lösl. Protein	
		XMS	JMS	XMS	JMS	XMS	JMS
Ohne S	8-9	119	96	2	4	1,5	4,2
Mit S	8-9	250	222	3	11	1,1	5,0
Ohne S	12	185	128	9	15	4,6	11,7
Mit S	12	423	315	8	32	1,9	10,2
Ohne S	16	331	174	31	30	9,4	17,2
Mit S	16	547	532	12	47	2,2	8,8
Ohne S	19	331	202	39	48	11,7	23,8
Mit S	19	699	565	14	48	2,0	8,5

Die Gesamtausbeute an Pall-Protein pro Liter Kultur des Stammes XMS betrug nach 19 Stunden in den Ansätzen ohne Schikanen 39 mg, wohingegen die Ansätze mit Schikanen nur

14 mg Pall-Enzym pro Liter Kultur hervorbrachten. Das entspricht 11,7 % (ohne Schikanen) bzw. 2 % (mit Schikanen) der löslichen Anteile des Gesamtproteins. Es lag vermutlich eine Störung der Pall-Expression in den Ansätzen mit Schikanen vor. Als Ursache könnte ein negativer Sauerstoffeinfluss bzw. eine daraus resultierende höhere Wachstumsrate und/oder eine erhöhte Scherbeanspruchung in Betracht gezogen werden. In Abschnitt 4.2.3 wird die Pall-Expressionsstörung näher analysiert.

Ganz andere Verhältnisse waren bei dem Stamm JMS zu beobachten. In beiden Ansätzen, mit bzw. ohne Schikanen, erreichte JMS nach 19 Stunden Fermentationszeit eine Gesamtausbeute von 48 mg Pall-Protein pro Liter Kultur. Das entspricht etwa 24 % (ohne Schikanen) bzw. 8 % (mit Schikanen) der löslichen Anteile des Gesamtproteins. In Ansätzen mit Schikanen zeigte JMS eine deutlich höhere Pall-Expression als XMS. JMS erwies sich als robuster Produktionsstamm, wohingegen XMS auf Kultivierungsveränderungen wie den Einsatz von Schüttelkolben mit und ohne Schikanen sehr sensibel reagierte.

4.2.2.3.3 Pall-Aktivität der löslichen Zellfraktionen

Die Pall-Aktivitäten der löslichen Zellextrakte von XMS und JMS wurden wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben ermittelt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4.14, Tabelle 4.15 und in Abbildung 4.14 dargestellt.

Tabelle 4.14: Pall-Aktivitäten der Zellextrakte aus XMS nach Kultivierungen mit und ohne Schikanen

Stamm XMS								
Zeit [h]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]			Zellspez. Enzymaktivität [EU/OD ₆₀₀ = 4]			Spez. Enzymaktivität [EU/mg lösl. Protein]	
	ohne Schikanen	Zellen	Medium	Summe	Zellen	Medium		Summe
9		2.046	0	2.046	6.911	0	6.911	31
12		5.076	194	5.270	11.217	428	11.645	54
16		17.985	683	18.668	28.533	1.084	29.617	115
19		23.060	1.642	24.702	34.795	2.478	37.273	141
mit Schikanen	Zellen	Medium	Summe	Zellen	Medium	Summe	Zellen	
9		1.675	0	1.675	2.921	0	2.921	13
12		4.214	773	4.986	5.184	951	6.135	21
16		4.599	1.434	6.033	5.025	1.566	6.592	16
19		5.534	1.575	7.109	5.406	1.539	6.944	15

Tabelle 4.15: Pall-Aktivitäten der Zellextrakte aus JMS nach Kultivierungen mit und ohne Schikanen

Stamm JMS								
Zeit [h]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]			Zellspez. Enzymaktivität [EU/OD ₆₀₀ = 4]			Spez. Enzymaktivität [EU/mg lösl. Protein]	
	ohne Schikanen	Zellen	Medium	Summe	Zellen	Medium	Summe	
8		2.815	0	2.815	8.163	0	8.163	28
12		9.106	1.799	10.905	20.928	4.135	25.063	71
16		16.838	3.416	20.254	32.893	6.673	39.566	95
19		20.433	5.091	25.524	34.515	8.600	43.114	97
mit Schikanen								
Zeit [h]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]			Zellspez. Enzymaktivität [EU/OD ₆₀₀ = 4]			Spez. Enzymaktivität [EU/mg lösl. Protein]	
	ohne Schikanen	Zellen	Medium	Summe	Zellen	Medium	Summe	
8		1.647	0	1.647	1.811	0	1.811	6
12		14.617	2.035	16.651	10.916	1.520	12.435	44
16		19.315	3.749	23.064	10.907	2.117	13.024	37
19		20.393	4.390	24.783	11.231	2.418	13.649	36

Die Abbildung 4.14 zeigt Pall-Aktivitäten der Ansätze mit und ohne Schikanen von XMS und JMS im zeitlichen Verlauf.

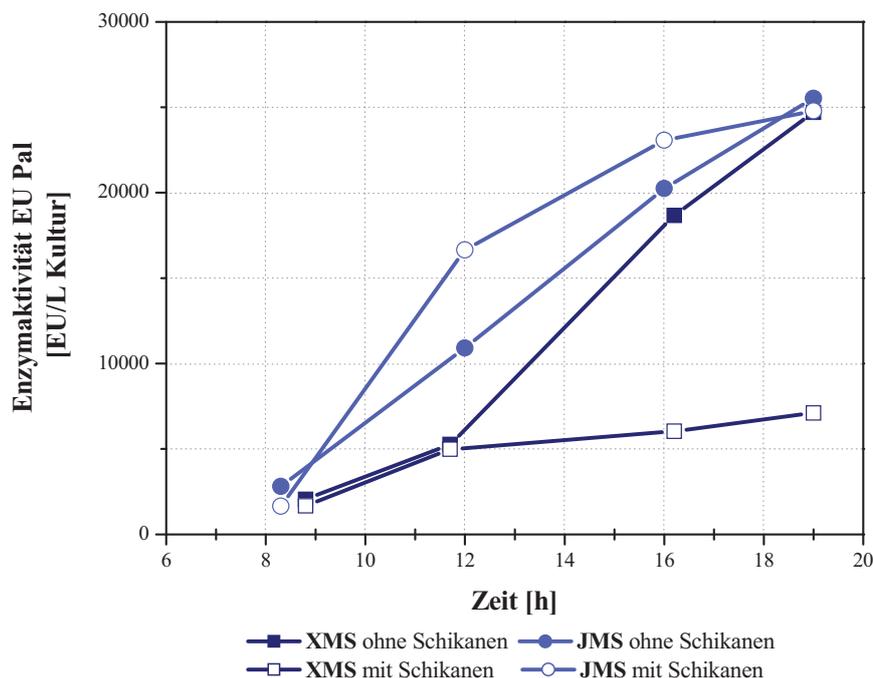


Abbildung 4.14: Verlauf der Pall-Aktivität der Ansätze mit und ohne Schikanen von XMS und JMS

Der Stamm JMS brachte in allen Ansätzen höhere Pall-Aktivitäten pro Liter Kultur als XMS hervor. Die Zellextrakte beider Ansätze von JMS und die der Kultivierungen ohne Schikanen von XMS enthielten annähernd gleiche Pall-Aktivitäten pro Liter Kultur. Die Enzymaktivität

der XMS-Kultivierung mit Schikanen wies jedoch deutlich geringere Werte auf. Im Vergleich zu JMS reagierte XMS sehr sensibel auf die durch die Schikanen hervorgerufenen Kultivierungsveränderungen. Die Pall-Aktivitäten der löslichen Zellextrakte spiegeln die Verhältnisse der Gesamtausbeuten an Pall-Enzym wider (siehe SDS-PAGE, Tabelle 4.13).

Für die Beurteilung der Pall-Expression ist neben der Menge des exprimierten Pall-Proteins auch das Verhältnis des gebildeten Enzyms zu seiner Aktivität ausschlaggebend. Hierdurch kann ermittelt werden, wie viel des exprimierten Enzyms tatsächlich aktiv ist. Diese semiquantitative Auswertung wird in Tabelle 4.16 zusammengefasst und in Abbildung 4.15 graphisch dargestellt. Für die Ermittlung der relativen Pall-Expression wurde die nach 19 Stunden Kultivierungszeit erhaltene Pall-Proteinmenge (67 kDal-Bande) der Ansätze ohne Schikanen auf 100 % gesetzt und alle weiteren Proteinmengen auf diesen Basiswert bezogen.

Tabelle 4.16: Semiquantitative Erfassung der Pall-Expression und -Aktivität von XMS und JMS

Probe	Zeit [h]	67 kDal-Bande [μ g]		Enzymaktivität [EU/L Kultur]		relat. Pall-Expression [%]	
		ohne S	mit S	ohne S	mit S	ohne S	mit S
S = Schikanen							
XMS t1	9	0,046	0,070	2.046	1.675	5	7
XMS t2	12	0,219	0,212	5.270	4.986	22	21
XMS t4	16	0,804	0,316	18.668	6.033	80	32
XMS t5	19	1,000	0,369	24.702	7.109	100	37
JMS t1	8	0,049	0,141	2.815	1.647	8	23
JMS t2	12	0,189	0,415	9.811	16.651	30	67
JMS t4	16	0,393	0,615	20.254	23.064	63	99
JMS t5	19	0,620	0,620	25.524	24.783	100	100

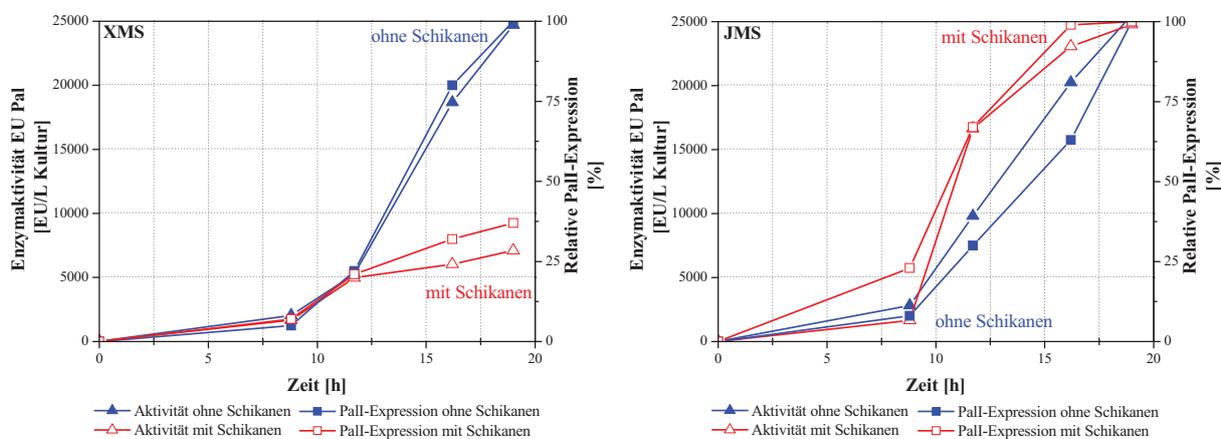


Abbildung 4.15: Semiquantitative Erfassung der Pall-Expression und -Aktivität bezogen auf 1 L Kultur von XMS (links) und JMS (rechts).

Aus der Abbildung 4.15 (rechte Seite) wird deutlich, dass die Palli-Aktivität der Ansätze mit und ohne Schikanen von JMS mit der Palli-Expression annähernd Hand in Hand geht. Dies spricht für eine über den gesamten Fermentationsverlauf andauernde Expression von aktivem Palli-Enzym. Hierbei steigt die Palli-Aktivität der Zellextrakte aus den Ansätzen mit Schikanen steil an und wird über die Fermentationszeit von der Enzymaktivität der Ansätze ohne Schikanen eingeholt. Gegen Ende der Kultivierung zeigen sich in beiden Ansätzen, mit und ohne Schikanen, die gleichen Palli-Aktivitäten von ca. 25.000 EU/L Kultur.

Bei den XMS-Kultivierungen mit Schikanen ist dies nicht der Fall. Hier liegt die Aktivitätskurve ab etwa 12 Stunden unter dem dazugehörigen Kurvenverlauf der Palli-Expression. Dies könnte auf funktionslose Palli-Moleküle in den Ansätzen mit Schikanen hinweisen. Am Fermentationsende erreichen die Ansätze mit Schikanen nur 37 % der Palli-Aktivität der Ansätze ohne Schikanen. Es lag vermutlich eine Störung der Palli-Expression von XMS in den Ansätzen mit Schikanen vor. Als Grund könnte die bereits in Abschnitt 4.2.2.3.2 erwähnte erhöhte Scherbeanspruchung und/oder der negative Sauerstoffeinfluss in Betracht gezogen werden. Die erhöhte Sauerstoffzufuhr könnte z.B. zu einer fehlerhaften Replikation der Plasmid-DNA durch zu schnelles Wachstum (irreversible Störung) führen. In Abschnitt 4.2.3 wird die Palli-Expressionsstörung näher analysiert.

4.2.3 Untersuchung der Reversibilität der gestörten Palli-Expression in dem Stamm XMS

Als mögliche Ursache für die gestörte Palli-Expression in dem Stamm XMS bei der Kultivierung in Schüttelkolben mit Schikanen könnte ein negativer Sauerstoffeinfluss und/oder eine erhöhte Scherbeanspruchung erachtet werden. Um die Reversibilität dieser Störung zu prüfen wurde eine kombinierte Kultivierung durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.3.3). In dieser Versuchsreihe wurde nach 14-stündiger Kultivierung mit Schikanen die Fermentationsbrühe in einen Schüttelkolben ohne Schikanen überführt und weitere 5 Stunden inkubiert. Als Referenz diente eine über die gesamte Fermentationszeit im Schüttelkolben ohne Schikanen durchgeführte Kultivierung. Die zellspezifischen Enzymaktivitäten und OD₆₀₀-Werte beider Ansätze wurden nach 14 und 19 Stunden Fermentationsdauer verglichen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4.16 und Tabelle 4.17 dargestellt. Die Abkürzung S steht für Schikanen.

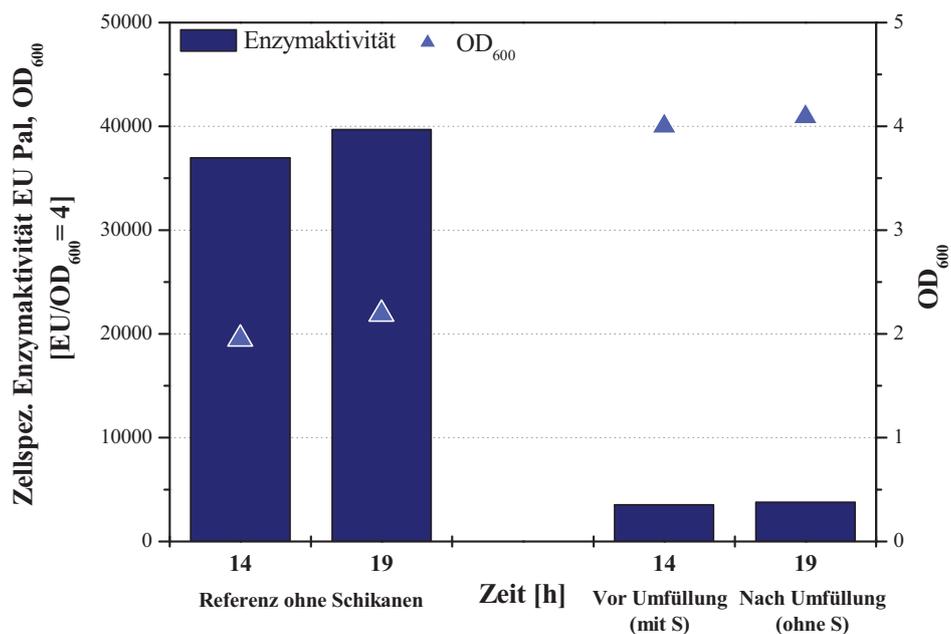


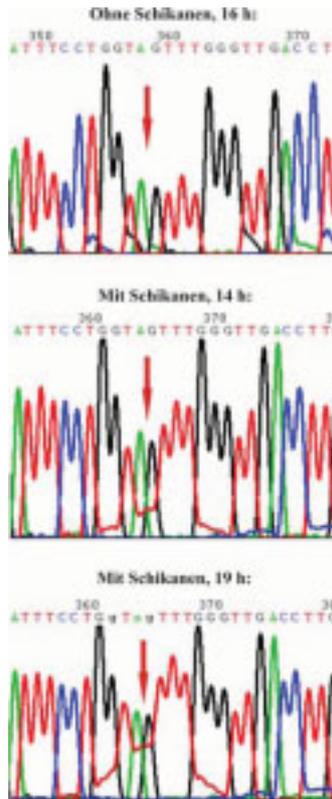
Abbildung 4.16: Untersuchung auf Reversibilität der Pall-Expressionsstörung bei Kultivierung von XMS in Schüttelkolben mit Schikanen

Tabelle 4.17: Untersuchung auf Reversibilität der Pall-Expressionsstörung bei Kultivierung von XMS in Schüttelkolben mit Schikanen

Probe	Zeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]	Zellspez. Enzymaktivität [EU/OD ₆₀₀ = 4]
Ref ohne S	14	1,95	18.025	36.945
Ref ohne S	19	2,19	21.765	39.687
Vor Umfüllung (mit S)	14	4,00	3.523	3.524
Nach Umfüllung (ohne S)	19	4,09	3.861	3.772

Das Überführen der Zellen nach 14 Stunden Fermentationsdauer aus einem Schüttelkolben mit Schikanen in einen ohne Schikanen führte nach anschließender fünfstündiger Kultivierung zu keiner Zunahme der Pall-Aktivität. Dieses Ergebnis deutet auf eine irreversible Pall-Expressionsstörung hin, die durch eine fehlerhafte Replikation der Plasmid-DNA verursacht werden könnte. Aus diesem Grund wurde die Plasmid-DNA dieser Versuchsreihe mittels Sequenzierung analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

Im Vergleich zu der Plasmid-DNA-Sequenz des Ansatzes ohne Schikanen ist in dem Chromatogramm der Plasmid-DNA der Ansätze mit Schikanen ein erhöhter Hintergrund zu beobachten, der tendenziell Nukleotidaustausche signalisiert. In Abbildung 4.17 ist ein Beispiel dokumentiert:



Der in dem Ansatz ohne Schikanen saubere grüne Peak des Adenin-Nukleotids (roter Pfeil) lässt eine eindeutige Identifizierung des Adenins an dieser Stelle der DNA-Sequenz zu. Daneben befindet sich der ebenfalls eindeutige schwarze Peak des Guanin-Nukleotids. In den Ansätzen mit Schikanen wurde an diesen Positionen Thymin an Stelle von Adenin und Guanin eingebaut. Der Thymin-Hintergrund verstärkt sich nach 19 Stunden Fermentationszeit deutlich. Das Ergebnis der Sequenzanalyse unterstützt die Hypothese einer irreversiblen *Pall*-Expressionsstörung, die möglicherweise auf Fehler auf dem DNA-Niveau zurückzuführen ist. Für genauere Aussagen wären jedoch weiterführende Analysen nötig, die sowohl den zeitlichen als auch den thematischen Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten.

Abbildung 4.17: Chromatogrammausschnitte einer vergleichenden Sequenzanalyse der Plasmid-DNA aus den XMS-Kultivierungen mit und ohne Schikanen

4.2.4 Zusammenfassung: Vergleichende Analyse der Stämme XMS und JMS – Auswahl des besten Produktionsstammes

Für die Auswahl des besten Produktionsstammes wurde die *Pall*-Expression von XMS und JMS vergleichend analysiert. Die Ermittlung der für die Fremdgenexpression optimalen Kultivierungstemperatur ließ erste Unterschiede der beiden Stämme erkennen. Während XMS die höchsten Enzymaktivitäten bei 37 °C hervorbrachte, zeigte JMS bei 33,5 °C Kultivierungstemperatur die besten Ergebnisse. Höhere Temperaturen förderten bei JMS zusätzlich die im Vergleich zu XMS stärker ausgeprägte Zelllyse. Diese Beobachtung deckt sich mit der Veröffentlichung von Chalmers, in der er unter anderem Temperatureffekte auf β -Lactamase überproduzierende *E.-coli*-Zellen beschrieb. Durch Herabsetzen der Kultivierungstemperatur konnte demnach die Lyse der Zellen reduziert werden (Chalmers et al., 1990). Zu geringe Temperaturen können jedoch zur vollständigen Einstellung der Fremdgenexpression führen (Shin et al., 1997). Die optimale Kultivierungstemperatur ist bei genetisch veränderten Mikroorganismen wie auch bei Wildtypen stammspezifisch.

Beim Vergleich von Kultivierungen der beiden Stämme in Schüttelkolben mit und ohne Schikanen zeigten die Ansätze mit Schikanen deutlich höhere Biomasseendkonzentrationen als die Ansätze ohne Schikanen. Dies ist auf den durch die Schikanen verbesserten Sauerstoffeintrag zurückzuführen, der das Zellwachstum begünstigt. Zusätzlich wird durch die stärkere Verwirbelung eine bessere Durchmischung erzielt, die z.B. Konzentrationsgradienten entgegen wirkt und somit zu einer besseren Versorgung der Zellen führt. Der Stamm JMS wuchs in den Ansätzen mit Schikanen deutlich schneller und erreichte höhere Biotrockenmassen als XMS. Folglich zeigte JMS ein für den späteren Industrieprozess vorteilhafteres Wachstumsverhalten.

Die Bildung organischer Säuren wies bei der Produktion von Lactat deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen auf. Bei der Kultivierung von XMS ohne Schikanen nahm die Lactat-Konzentration mit der Fermentationszeit zu, wohingegen das gebildete Lactat der Ansätze mit Schikanen nach etwa 12 Stunden Kultivierungszeit wieder abgebaut wurde. Hierdurch könnte eine mögliche Stoffwechselumstellung von XMS angezeigt werden, bei der für die Pall-Expression ungünstige Bedingungen vorlagen, da genau zu diesem Zeitpunkt auch eine Störung der Pall-Expression sichtbar wurde (s.u.). Dieses Phänomen wurde bei dem Stamm JMS nicht beobachtet.

Beim Vergleich des Substratverbrauchs der beiden Stämme zeigte JMS einen höheren Glycerin-Konsum als XMS. Möglicherweise bevorzugt XMS für das Zellwachstum und die Fremdgenexpression die Inhaltsstoffe des Cosubstrates Hefeextrakt. Hefeextrakt enthält viele biosynthetischen Vorstufen und Wachstumsfaktoren, die leicht für den Aufbau von Biomasse verwendet werden können. Hefeextrakt ist im Vergleich zu Glycerin jedoch ein kostenintensiveres Substrat. Als vorwiegende C-Quelle sollte deshalb Glycerin verwendet werden. Mit dieser Fähigkeit zum erhöhten Glycerin-Konsum besitzt JMS gegenüber XMS einen deutlichen Vorteil für die Entwicklung einer kostengünstigen Hochzelldichtefermentation.

Bei der Untersuchung der Plasmid-DNA-Menge wiesen XMS und JMS eine gute Plasmidstabilität auf. Die ermittelten Pall-Aktivitäten der löslichen Zellfraktionen und die Proteinbandenprofile der SDS-PAGE zeigten jedoch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. So stieg in den Ansätzen ohne Schikanen des Stammes XMS die spezifische Pall-Aktivität kontinuierlich über die gesamte Kultivierungszeit durch die im gleichen Maße ansteigende Anzahl der Pall-Moleküle pro Zelle an. Die XMS-Zellen in den Ansätzen mit Schikanen entwickelten hingegen eine irreversible Störung der Pall-Expression, wodurch weniger Pall-Enzym exprimiert wurde und ein Teil der Pall-Moleküle wahrscheinlich in

inaktiver Form vorlag. Die Ursache hierfür war möglicherweise eine durch zu schnelles Wachstum verursachte fehlerhafte Plasmid-DNA-Replikation, was durch die Sequenzierung der Plasmid-DNA untermauert wurde. Die Zellen des Stammes JMS wiesen hingegen keine inaktiven Pall-Enzyme auf. Sie entwickelten in den Kolben mit Schikanen ein anderes Expressionsverhalten als in den Kolben ohne Schikanen: In den Ansätzen mit Schikanen erreichten die Zellen nach 12 Stunden Fermentationszeit eine maximale spezifische Pall-Aktivität von ca. 40 EU/mg lösl. Protein. Ab diesem Zeitpunkt blieb die Anzahl der Pall-Moleküle pro Zelle konstant, und der Anstieg der Pall-Aktivität der Kultur war nur noch auf die anwachsende Zellzahl zurückzuführen. Die spezifische Pall-Aktivität von ca. 40 EU/mg lösl. Protein entspricht dem bisher höchsten publizierten Wert, der bei einer heterologen Expression des Pall-Enzyms in *E. coli* erreicht wurde (Ravaud et al., 2006). In den Ansätzen ohne Schikanen stieg die spezifische Pall-Aktivität kontinuierlich über die gesamte Kultivierungszeit durch die im gleichen Maße ansteigende Anzahl der Pall-Moleküle pro Zelle an und erreichte nach 19 Stunden ihr Maximum von etwa 100 EU/mg lösl. Protein. In beiden Kultivierungen, mit und ohne Schikanen, wurden die gleichen Pall-Aktivitäten von ca. 25.000 EU/L Kultur erhalten.

Die Vorteile des Stammes JMS in Kultivierungen mit Schikanen werden in der folgenden Auflistung noch einmal zusammengefasst:

- Besseres Wachstumsverhalten von JMS: höhere End-BTM-Werte von JMS (2,79 g/L) im Vergleich zu XMS (1,96 g/L)
- Höherer Glycerinkonsum von JMS (7,6 g/L) im Vergleich zu XMS (3,6 g/L)
- Deutlich höhere Pall-Aktivität der Zellextrakte aus JMS: 25.000 EU/L Kultur, XMS erreicht 7.000 EU/L Kultur
- Deutlich höhere spezifische Pall-Aktivitäten von JMS (ca. 40 EU/mg lösl. Protein) im Vergleich zu XMS (nur 15 EU/mg lösl. Protein)

Diese Vorteile des Stammes JMS gegenüber XMS zeigen, dass JMS für einen industriellen Prozess der geeignete Pall-Produktionsstamm ist, da er neben anderen Vorzügen (s.o.) die robustere Pall-Expression besitzt.

4.3 Scale up der Überexpression des rekombinanten Pall-Enzyms

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildete das Scale up der Überexpression des Pall-Enzyms. Für die industrielle Herstellung von Palatinose ist eine Produktion der Isomaltulose-Synthase im Großmaßstab zwingend erforderlich. Die Kultivierung des Stammes JMS wurde deshalb vom Schüttelkolben in den 10-L-Fermentationsmaßstab überführt.

4.3.1 Einfluss der Sauerstoffzufuhr auf die Fermentation von JMS

Die Versuchsreihen im Schüttelkolben zeigten, dass die Sauerstoffzufuhr einen entscheidenden Einfluss auf die Pall-Expression ausübt. Dieses Phänomen sollte auch im Fermenter intensiver analysiert werden. Es wurden drei Fermentationen mit jeweils unterschiedlicher Sauerstoffversorgung durchgeführt. Das verwendete Fermentersystem und die dazugehörigen Parameter sind in Abschnitt 3.2.4 näher beschrieben. Tabelle 4.18 gibt einen Überblick über die jeweilige Sauerstoffversorgung der unterschiedlichen Testfermentationen.

Tabelle 4.18: Bezeichnung der Fermentationen zum Einfluss der Sauerstoffversorgung auf die Kultivierung von JMS

Abkürzung Fermentation	Sauerstoff- zufuhr	Begasungsrate (v/vm-Wert)	Sauerstoffversorgung - Einstellungen
BGS 1 JMS	sehr gering	fest eingestellt	0,015 v/vm [L/(L*min)], O ₂ nicht messbar
BGS 2 JMS	gering	fest eingestellt	0,120 v/vm [L/(L*min)], O ₂ nicht messbar
BGS 3 JMS	stark	variiert	pO ₂ -Sollwert = 10 %

BGS = Begasungsstufe

Die Sauerstoffzufuhr wurde von Fermentation BGS 1 bis BGS 3 stetig gesteigert. Hierbei kamen verschiedene Begasungsstrategien wie konstante Begasungsraten (BGS 1 und 2, sauerstofflimitierte Fermentationen) und ein konstanter pO₂-Wert (Fermentation BGS 3) zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.19, Tabelle 6.1 im Anhang und in Abbildung 4.18 dargestellt.

Tabelle 4.19 zeigt die am Ende der Fermentationen erreichten OD₆₀₀-Werte und zellspezifische bzw. auf einen Liter Kultur bezogene Pall-Aktivitäten. Die detaillierten Verläufe der Biomassen werden im Anhang in Tabelle 6.1 aufgelistet.

Tabelle 4.19: Erreichte Biomassen und Pall-Aktivitäten der Fermentationen zum Einfluss der Sauerstoffversorgung auf die Kultivierung von JMS

Fermentation	OD ₆₀₀ [-]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]		Zellspez. Enzymaktivität [EU/OD ₆₀₀ = 4]	
		Zellen	Medium	Zellen	Medium
BGS 1 JMS	1,14	17.012	4.989	59.655	17.494
BGS 2 JMS	2,60	13.143	3.841	20.219	5.909
BGS 3 JMS	7,90	3.131	1.749	1.585	886

BGS = Begasungsstufe

In Abbildung 4.18 sind die Wachstumsverläufe (OD₆₀₀-Werte) und die pro Liter Kultur erreichten Pall-Aktivitäten der drei Fermentationen graphisch dargestellt.

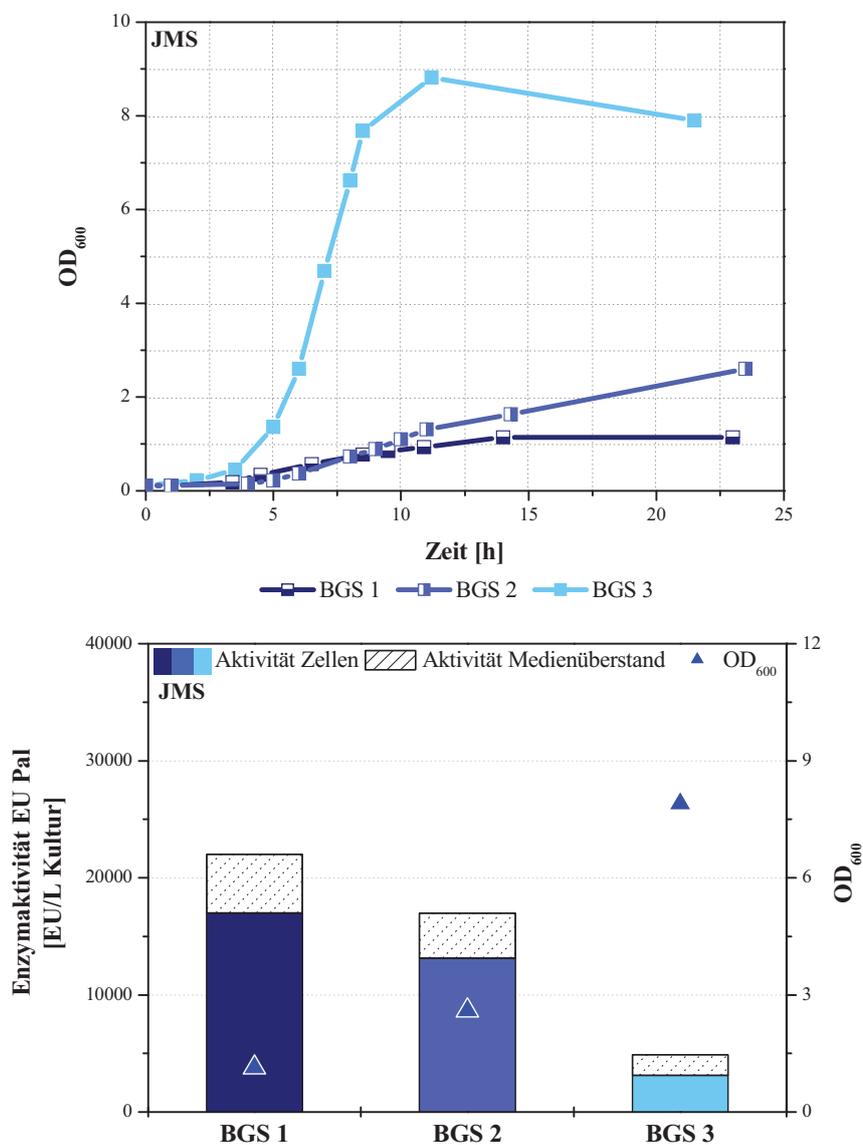


Abbildung 4.18: Wachstumsverhalten und erreichte Pall-Aktivitäten der Fermentationen BGS 1, 2 und 3

Die Sauerstoffzufuhr beeinflusst sowohl das Zellwachstum als auch die erreichte Palli-Aktivität beträchtlich. Eine Steigerung der Sauerstoffzufuhr bewirkte eine schnellere Bildung der Biomasse und höhere End-OD₆₀₀-Werte (positiver Einfluss). Ähnliche Beobachtungen wurden von McDaniel und Phue beschrieben (Mc Daniel et al., 1965; Phue et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde mit steigender Sauerstoffzufuhr eine niedrigere Palli-Aktivität der Zellextrakte erhalten (negativer Einfluss).

In Abbildung 4.19 ist das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse der löslichen Zellextrakte von Fermentation BGS 3 mit den dazugehörigen, schematisch dargestellten Palli-Aktivitäten gezeigt. Als Referenz wurde parallel zu der Fermentation ein Schüttelkolben für die Qualitätsüberprüfung des Inokulums mitgeführt.

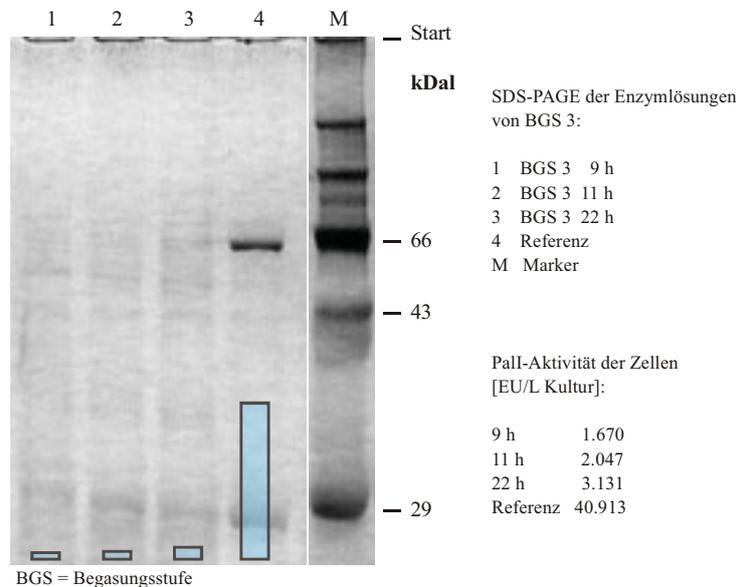


Abbildung 4.19: SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte von Fermentation BGS 3 und dazugehörige, schematisch dargestellte Palli-Aktivitäten pro Liter Kultur (blaue Säulen)

Die SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte aus BGS 3 zeigt, dass ihre geringen Palli-Aktivitäten nicht auf inaktive Palli-Moleküle, sondern auf eine sehr geringe Palli-Expression zurückzuführen sind. Die Konzentrationen des Palli-Enzyms sind so gering, dass vor dem Hintergrund der zelleigenen Proteine im SDS-Gel keine Palli-Banden zu erkennen sind. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf eine erheblich gesteigerte Wachstumsrate zurückzuführen, die durch die hohe Sauerstoffzufuhr verursacht wurde. Relevante zellinterne Ressourcen werden für das Wachstum verwendet und stehen der heterologen Expression des nichtessentiellen Palli-Enzyms nicht mehr zur Verfügung. Gleichzeitig ist das Zeitfenster, das

bei der hohen Teilungsrate der Pall-Expression verfügbar ist, sehr klein. Die Prioritäten der Zelle sind zu Ungunsten der Pall-Expression in Richtung Wachstum verschoben. Konforme Auswirkungen von Sauerstoff und unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten auf die heterologe Expression wurden auch von anderen Forschungsgruppen beobachtet (Ryan et al., 1989; Riesenberg et al., 1990; Koo et al., 1999).

Limitierte Sauerstoffbedingungen führten in einigen Experimenten zu einer Steigerung der Fremdgenexpression (Unutmaz et al., 1997; Losen et al., 2004). Dieses kann jedoch nicht generalisiert werden, da die optimale Sauerstoffversorgung unter anderem von dem verwendeten *E.-coli*-Stamm (Li et al., 1992) und dem zu exprimierenden Protein (Qoronfleh, 1999; De Leon et al., 2003) abhängt. Zusätzlich bleibt zu beachten, dass eine geringe Sauerstoffversorgung eine Verlangsamung des Zellwachstums zur Folge hat.

4.3.2 Entwicklung einer neuen Fermentationsstrategie

Um ein gutes Zellwachstum bei gleichzeitig hoher Pall-Expression zu erhalten, wurde eine neue Strategie entwickelt, mit der innerhalb einer Fermentation über die Regelung der Sauerstoffzufuhr günstige Bedingungen für beide Prozesse erreicht werden sollten. In Fermentation BGS E wurde zuerst eine mittlere Sauerstoffversorgung von $pO_2 = 2\%$ realisiert und anschließend wurden zur Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit limitierte Sauerstoffverhältnisse geschaffen. In Tabelle 4.20 und Abbildung 4.20 wird der zeitliche Verlauf der Fermentation BGS E dargestellt. Gezeigt sind die Pall-Aktivitäten der löslichen Zellextrakte, die OD_{600} -Werte sowie die Sauerstoffversorgung der Fermentation in Form von pO_2 -Werten.

Tabelle 4.20: Zeitlicher Verlauf der Parameter von Fermentation BGS E

Probe	Zeit [h]	OD_{600} [-]	pO_2 [%]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]		Spez. Enzymaktivität [EU/mg lösl. Protein]
				Zellen	Medium	Zellen
BGS E t0	0	0,12	93,5	-	-	-
BGS E t2	3	0,22	2,0	-	-	-
BGS E t4	5	0,86	1,6	-	-	-
BGS E t6	7	2,35	0,1	1.222	194	15
BGS E t8	9	3,19	0,0	11.618	1.277	86
BGS E t9	10	3,30	0,0	25.094	1.948	137
BGS E t10	24	4,49	0,0	55.092	15.885	130

BGS = Begasungsstufe

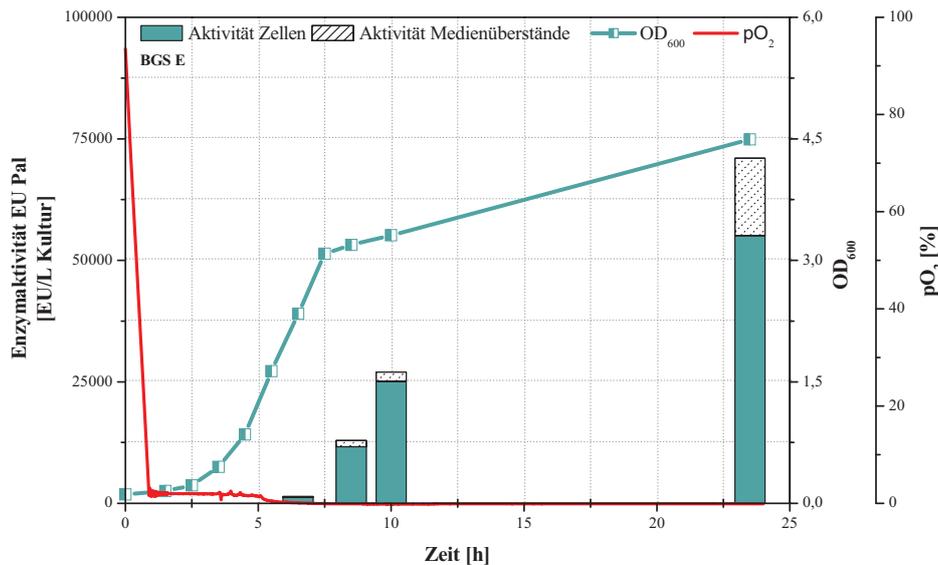


Abbildung 4.20: Zeitlicher Verlauf der Fermentation BGS E

Bei der Fermentation BGS E erfolgte bis zu einer Kultivierungszeit von ca. 5 Stunden die Sauerstoffversorgung mit einem pO_2 -Wert von 2 % (vgl. auch Tabelle 6.1 im Anhang). Ab diesem Zeitpunkt wurde die Begasungsrate konstant gehalten. Aufgrund der Sauerstoffzehrung der wachsenden Zellen sank der pO_2 -Wert daraufhin ab und erreichte nach einer Kultivierungszeit von ca. 7 Stunden einen Wert von 0 %. Diese Sauerstofflimitierung wirkte sich hemmend auf das Zellwachstum aus, was bei 7,5 Stunden in der Abnahme der OD_{600} -Kurve zu erkennen ist. Die Biomasse nahm ab diesem Zeitpunkt deutlich langsamer zu.

Innerhalb der sauerstofflimitierten Fermentationsphase war neben dem verlangsamten Zellwachstum ein deutlicher Anstieg der Pall-Aktivität der löslichen Zellfraktionen zu verzeichnen. Die Pall-Aktivität erreichte über 55.000 EU/L Kultur. Das entspricht einer 3-fachen Steigerung der Pall-Aktivität von BGS 1. Dieser Anstieg der Pall-Aktivität in den Zellextrakten könnte auf das verlangsamte Zellwachstum zurückzuführen sein. Durch die gebremste Wachstumsgeschwindigkeit werden zellinternen Ressourcen frei, die für die heterologe Expression des Pall-Enzyms verwendet werden können. Die Sauerstoffversorgung der Zellen dient in diesem Prozess als biochemischer Schalthebel, mit dem die heterologe Expression in Gang gesetzt wird.

Abbildung 4.21 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte aus den Fermentationen BGS E und BGS 3 mit den dazugehörigen, schematisch dargestellten Enzymaktivitäten pro Liter Kultur. Die zeitlichen Verläufe der Pall-Aktivitäten sind der Tabelle 4.21 zu entnehmen.

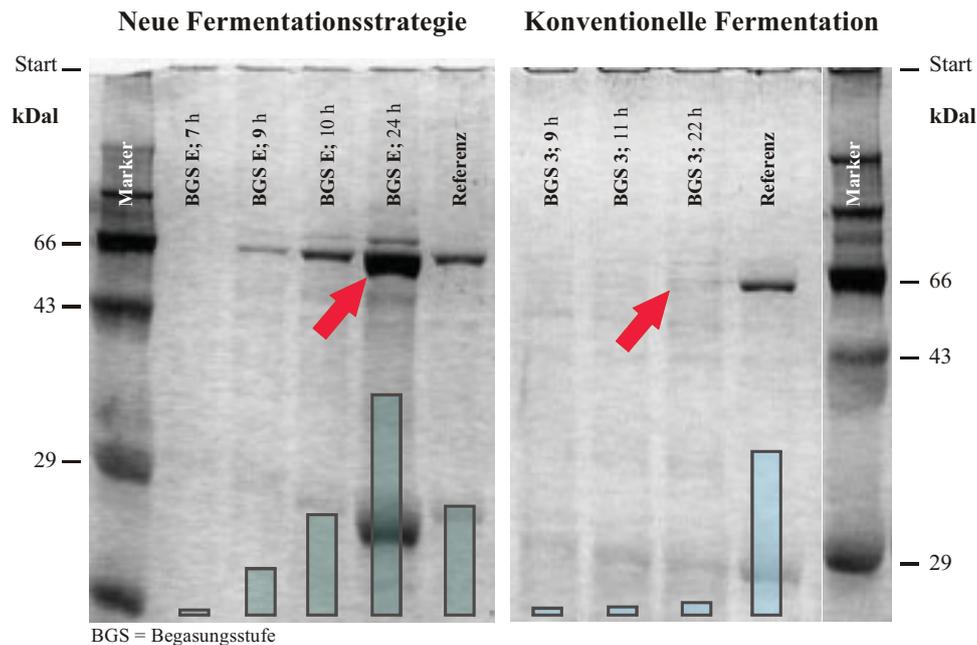


Abbildung 4.21: SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte der Fermentationen BGS E und BGS 3 sowie dazugehörige, schematisch dargestellte Palli-Aktivitäten pro Liter Kultur (grün/blau Säulen)

Tabelle 4.21: Zeitliche Biomasse- und Palli-Aktivitätsverläufe der Fermentationen BGS E und BGS 3

Fermentations- probe	Zeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]		
			Zellen	Medium	Summe
BGS E t6	7	2,35	1.222	194	1.416
BGS E t8	9	3,19	11.618	1.277	12.895
BGS E t9	10	3,30	25.094	1.948	27.042
BGS E t10	24	4,49	55.092	15.885	70.977
Referenz A	18	2,15	27.165	3.016	30.181
BGS 3 t7	9	7,68	1.670	512	2.181
BGS 3 t8	11	8,82	2.047	924	2.972
BGS 3 t9	22	7,90	3.131	1.749	4.880
Referenz B	18	2,15	40.913	3.906	44.818

BGS = Begasungsstufe

Im Gegensatz zu der Fermentation BGS 3 stieg die Menge an exprimiertem Palli-Enzym in der Fermentation BGS E ab der Sauerstofflimitierung kontinuierlich mit der Kultivierungsdauer an. Als Referenz wurde parallel zu beiden Fermentationen ein Schüttelkolben für die Qualitätsüberprüfung des Inokulums mitgeführt.

Durch eine gezielte Steuerung der Sauerstoffzufuhr konnte ein gutes Zellwachstum und eine deutlich gesteigerte Palli-Expression erzielt werden. Die neue Strategie der Fermentation

BGS E kann aufgrund ihrer Sauerstoffversorgung in zwei Phasen eingeteilt werden. Die erste Fermentationsphase ist reich an Sauerstoff, wodurch das Zellwachstum im Vordergrund steht, und die zweite Phase sauerstofflimitiert, was eine gute PalI-Expression ermöglicht. Die Sauerstoffversorgung der Zellen übernimmt bei dieser Prozesssteuerung die Funktion eines Induktors, mit dem die heterologe PalI-Expression angekurbelt wird. Im Folgenden wurde diese Strategie weiter entwickelt und optimiert.

4.3.3 Zwei-Phasen-Fermentationsstrategie und ihre Optimierung

Die Strategie der Trennung von Wachstum und PalI-Produktion durch Regulierung der Sauerstoffzufuhr wurde zu einem erfolgreichen Zwei-Phasen-Fermentationsverfahren weiterentwickelt. Hierfür wurden Fermentationen zur Steigerung der Biomasse und der PalI-Expression durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.4.3).

Die Optimierung der Fermentationsstrategie erfolgte in drei Stufen, Ferm 1, 2 und 3, die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 und Tabelle 4.22 zusammengefasst (s. auch Tabelle 3.10 bis Tabelle 3.13 und Tabelle 6.2 im Anhang). Die in Abbildung 4.22 dargestellten Enzymaktivitäten stellen die Summe aus intrazellulärer und im Medium enthaltener PalI-Aktivität dar.

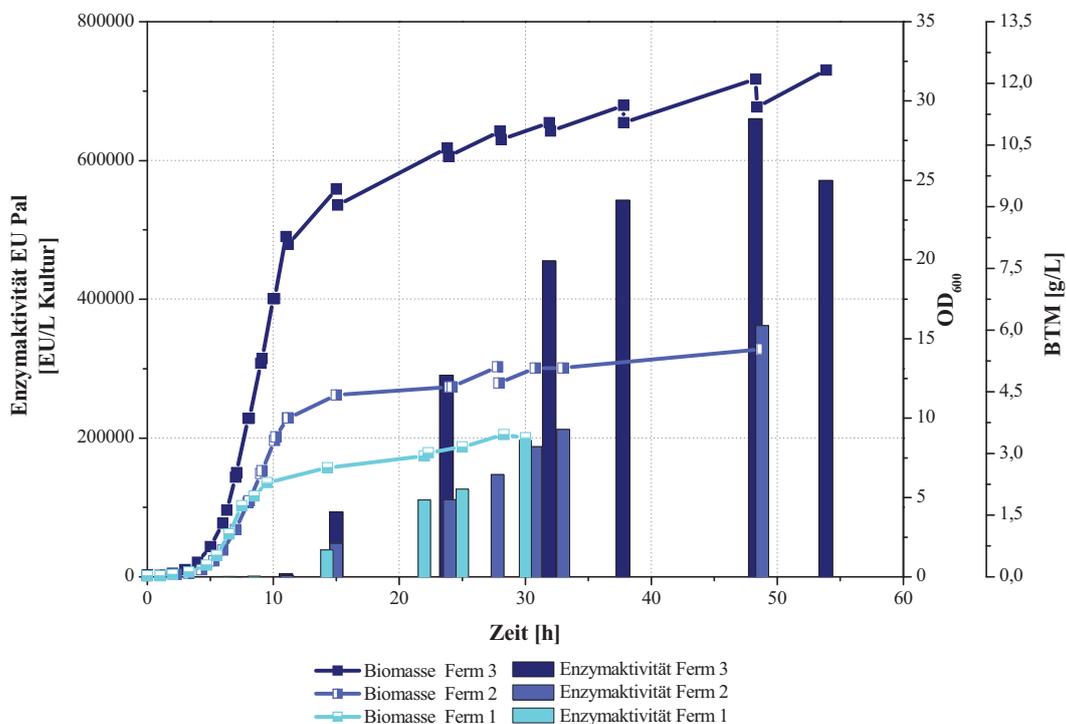


Abbildung 4.22: Wachstumsverhalten und Verlauf der PalI-Aktivitäten der Fermentationen Ferm 1, 2 und 3

Tabelle 4.22: Zeitliche Entwicklung der Biomassen und Pall-Aktivitäten der Fermentationen Ferm 1, 2 und 3

Fermentations- probe	Zeit [h]	OD ₆₀₀ [-]	BTM [g/L]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]		
				Zellen	Medium	Summe
Ferm 1 t6	7	2,70	1,04	174	89	263
Ferm 1 t8	9	5,09	1,96	348	442	790
Ferm 1 t10	14	6,87	2,64	36.361	2.609	38.970
Ferm 1 t11	22	7,62	2,93	100.621	10.211	110.832
Ferm 1 t13	25	8,19	3,15	113.267	13.123	126.390
Ferm 1 t15	30	8,77	3,38	178.560	17.938	196.498
Ferm 2 t7	7	2,97	1,14	0	162	162
Ferm 2 t14	11	10,00	3,85	1.590	456	2.046
Ferm 2 t16	15	11,46	4,41	46.968	1.291	48.259
Ferm 2 t17	24	11,97	4,60	106.624	4.681	111.305
Ferm 2 t19	28	13,25	5,10	140.968	6.610	147.578
Ferm 2 t21	31	13,16	5,06	177.940	9.737	187.677
Ferm 2 t22	33	13,16	5,06	201.004	11.185	212.189
Ferm 2 t23	49	14,36	5,53	341.811	20.385	362.196
Ferm 3 t15	11	21,45	8,25	3.304	840	4.144
Ferm 3 t17	15	24,44	9,40	90.288	3.096	93.384
Ferm 3 t19	24	27,03	10,40	277.385	13.049	290.434
Ferm 3 t23	32	28,63	11,02	449.843	5.327	455.170
Ferm 3 t25	38	29,72	11,44	498.309	44.332	542.641
Ferm 3 t27	48	31,38	12,08	593.641	66.425	660.066
Ferm 3 t29	54	31,95	12,29	502.614	68.737	571.351

Abbildung 4.22 und Tabelle 4.22 verdeutlichen, wie mit Hilfe des neuen Zwei-Phasen-Fermentationsverfahrens sowohl die Biomasse als auch die Pall-Produktion erfolgreich gesteigert werden konnte. In der ersten Stufe (Ferm 1) wurde während der Wachstumsphase die Sauerstoffzufuhr im Vergleich zur Fermentation BGS E ($pO_2 = 2\%$) auf einen pO_2 -Wert von 10 % erhöht. Kombiniert mit einer angepassten Fütterung bewirkte diese Erhöhung eine Verdoppelung der BTM und eine dreifach höhere Pall-Aktivität der Zellextrakte. In der zweiten Stufe (Ferm 2) wurde die Pall-Produktionsphase von 20 auf knapp 40 Stunden verlängert und der für die Pall-Expression benötigte Zeitraum abgesteckt. Mit dieser Maßnahme wurde die Pall-Aktivität der Zellextrakte erneut fast verdoppelt. In der dritten Optimierungsstufe erfolgte eine weitere Verdoppelung der Biomasse auf einen BTM-Endwert von 12 g/L. Die Pall-Aktivität dieser Biomasse erreichte über 600.000 EU/L Kultur. Bezogen auf die Ausgangslage der Ergebnisse, die mit der Testfermentation BGS E erzielt wurden (Pall-Aktivität von 71.000 EU/L Kultur), ermöglichte diese neue Fermentationsstrategie und

ihre Optimierung eine Steigerung der Pall-Produktion um den Faktor 9 (Pall-Aktivität von 660.000 EU/L Kultur).

4.3.4 Gesamtergebnis der Fermentationsoptimierung

Die erfolgreiche Strategie der Zwei-Phasen-Fermentation wird in Tabelle 4.23 und Abbildung 4.23 am Beispiel der besten Fermentation Ferm 3 ausführlicher dargestellt (vgl. auch Tabelle 3.13 und Tabelle 6.3 im Anhang). Im oberen Teil der Abbildung werden der Verlauf der Biomasse, die pro Liter Kultur erreichten Pall-Aktivitäten, die Einteilung in die zwei Fermentationsphasen und die unterschiedlichen Substratfütterungen mit dazugehörigen Zeitpunkten gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung sind die zeitlichen Verläufe von pO_2 -Wert und Glycerin-Konzentration sowie die Bildung der organischen Säuren Acetat und Lactat präsentiert.

Tabelle 4.23: Zeitlicher Verlauf von Wachstum, pO_2 -Werten und Glycerin-Konzentrationen sowie Bildung organischer Säuren von Fermentation Ferm 3

Fermentations- probe	Zeit [h]	OD₆₀₀ [-]	pO₂ [%]	Glycerin [g/L]	Acetat [g/L]	Lactat [g/L]
Ferm 3 t0	0	0,11	87,47	12,34	0,06	0,00
Ferm 3 t1	2	0,22	10,20	12,27	0,14	0,00
Ferm 3 t4	5	1,90	14,94	12,22	0,65	0,00
Ferm 3 t7	7	6,29	9,33	11,52	0,96	0,00
Ferm 3 t11	9	13,46	10,22	9,04	1,63	0,00
Ferm 3 t15	11	21,45	9,35	5,25	2,20	0,00
Ferm 3 t16	11	20,96	0,17	7,35	2,06	0,06
Ferm 3 t17	15	24,44	0,00	3,35	5,36	0,19
Ferm 3 t18	15	23,43	0,00	6,97	4,95	0,25
Ferm 3 t19	24	27,03	0,00	0,00	9,33	0,04
Ferm 3 t20	24	26,51	0,00	5,41	9,35	0,10
Ferm 3 t21	28	28,10	0,00	0,00	11,72	0,11
Ferm 3 t22	28	27,56	0,00	5,07	11,27	0,15
Ferm 3 t23	32	28,63	0,00	0,00	14,32	0,10
Ferm 3 t24	32	28,10	0,00	7,53	14,05	0,15
Ferm 3 t25	38	29,72	0,00	1,48	13,86	0,05
Ferm 3 t26	38	28,63	0,00	8,53	16,85	0,09
Ferm 3 t27	48	31,38	0,00	0,50	22,35	0,00
Ferm 3 t28	48	29,61	0,00	4,96	22,33	0,00
Ferm 3 t29	54	31,95	0,00	1,76	24,00	0,00

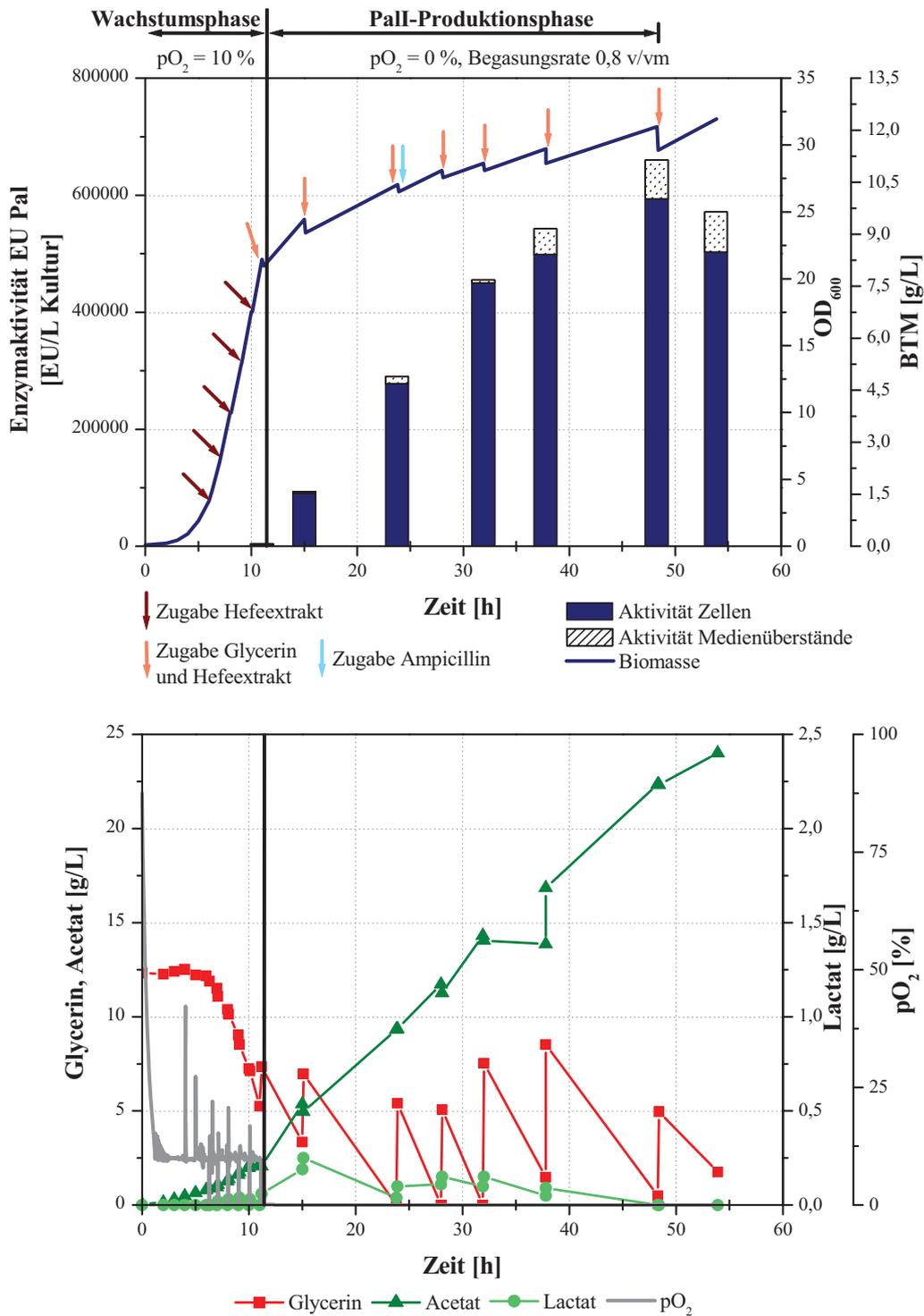


Abbildung 4.23: Detaillierter Verlauf der Fermentation Ferm 3

4.3.4.1 Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen

Durch die regulierte Zufuhr von Sauerstoff wird die Fermentation Ferm 3 in zwei Phasen unterteilt. In der ersten Phase wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO₂-Wert) bei 10 % konstant gehalten, wodurch ein schnelles Zellwachstum ermöglicht wurde. Nach 11 Stunden Kulti-

vierungsdauer wurde die Sauerstoffzufuhr auf einen Wert von 0,8 v/vm fest eingestellt und die Rührerdrehzahl ebenfalls konstant gehalten. Dieser Eingriff startete die zweite Fermentationsphase, in der der Sauerstoffpartialdruck schnell auf 0 % absank und somit eine Sauerstofflimitierung vorlag. Die geringe Sauerstoffversorgung der Zellen führte zu einer Verlangsamung des Wachstums. Die in dieser Phase sichtbaren Sprünge der Wachstumskurve sind auf Substratzugaben zurückzuführen. Während der ersten Phase wurde die C-Quelle Glycerin vorgelegt und nur Hefeextrakt zugefüttert. In der zweiten Fermentationsphase erfolgte die Zudosage eines Glycerin-Hefeextrakt-Gemisches und einer Einzeldosis Ampicillin zur Verhinderung von Plasmidverlusten. Als Kohlenstoffquelle wurde Glycerin ausgewählt, da *E. coli* beim aeroben Wachstum mit Glycerin weniger Acetat als mit Glucose bildet (Losen et al., 2004). Dies wird durch die Minimierung des bakteriellen *Crab-Tree*-Effektes (Doelle, 1982) erreicht. Geringe Acetat-Konzentrationen sind besonders für die Wachstumsphase wichtig, da Acetat ab 5-10 g/L das Zellwachstum beeinträchtigen kann (siehe Abschnitt 4.3.4.2).

Um der zusätzlichen metabolischen Belastung der Zellen, die durch die heterologe Expression ausgelöst wird, Rechnung zu tragen, erfolgte eine Zudosage des Cosubstrates Hefeextrakt. Die Zellen wurden so mit Stickstoff, Vitaminen, Spurenelementen, Wachstumsfaktoren und biosynthetischen Vorstufen versorgt und antworteten mit einer deutlich verbesserten Pall-Expression (Donovan et al., 1996; Panda et al., 2000; Fu et al., 2006).

4.3.4.2 Bildung organischer Säuren

Die Bildung organischer Säuren ist in den zwei Fermentationsphasen auf unterschiedliche stoffwechselphysiologische Zustände der Zellen zurückzuführen. Die Produktion von Acetat wurde in der ersten, sauerstoffreichen Phase durch den bakteriellen *Crab-Tree*-Effekt, der Nährstoffüberladung des oxidativen Metabolismus, verursacht (Doelle, 1982; vgl. Abschnitt 2.3.2.3). Durch den Einsatz von Glycerin und einer portionierten Hefeextraktfütterung konnte während der Wachstumsphase die Acetat-Produktion unter 2,5 g/L gehalten werden und lag damit deutlich unter der wachstumshemmenden Konzentration von 5-10 g/L (Bech Jensen et al., 1990; Yee et al., 1993a). In der zweiten Phase ist die Bildung der organischen Säuren Acetat und Lactat aufgrund der vorherrschenden Sauerstofflimitierung auf den anaeroben Stoffwechsel der Zellen zurückzuführen. Es wurden Acetat-Konzentrationen von 24 g/L erreicht. Neben der geringen Sauerstoffzufuhr kann in dieser Phase auch die Acetat-Konzentration hemmend auf das Zellwachstum gewirkt haben. Entgegen der Angaben von Lee (Lee, 1996) wirkte sich die hohe Acetat-Konzentration in den hier gezeigten Bereichen

nicht negativ auf die Pall-Expression aus. Die beobachtete Bildung von Lactat war mit maximal 0,3 g/L über den gesamten Fermentationsprozess sehr gering.

4.3.4.3 Untersuchung der Pall-Expression der optimierten Fermentation

Der zeitliche Verlauf der Pall-Aktivität in den Zellextrakten zeigte keine Aktivität während der ersten Fermentationsphase. Erst nach Herabsetzen der Sauerstoffversorgung konnte in der zweiten, sauerstofflimitierten Phase ein Anstieg der Pall-Aktivität verzeichnet werden. Es wurde eine maximale Enzymaktivität von 660.000 EU/L Kultur erreicht. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass eine Expressionsdauer von knapp 40 Stunden nicht überschritten werden sollte. Bereits eine Verlängerung von 5 Stunden führte zu einer Abnahme der zellinternen Pall-Aktivität. Da die fehlende Enzymaktivität nicht im Medienüberstand wiedergefunden wurde, ist eine übermäßige Zelllyse als Ursache auszuschließen. Die Ergebnisse deuten auf eine Pall-Degradation durch zellinterne Proteasen hin, was durch die Resultate der SDS-PAGE-Analyse unterstützt wird.

Abbildung 4.24 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse der löslichen Zellextrakte von Fermentation Ferm 3 mit der schematischen Darstellung der zwei unterschiedlichen Fermentationsphasen. Die semiquantitative Erfassung der Pall-Expression ist in Abbildung 4.25 und in Tabelle 4.24 dargestellt.

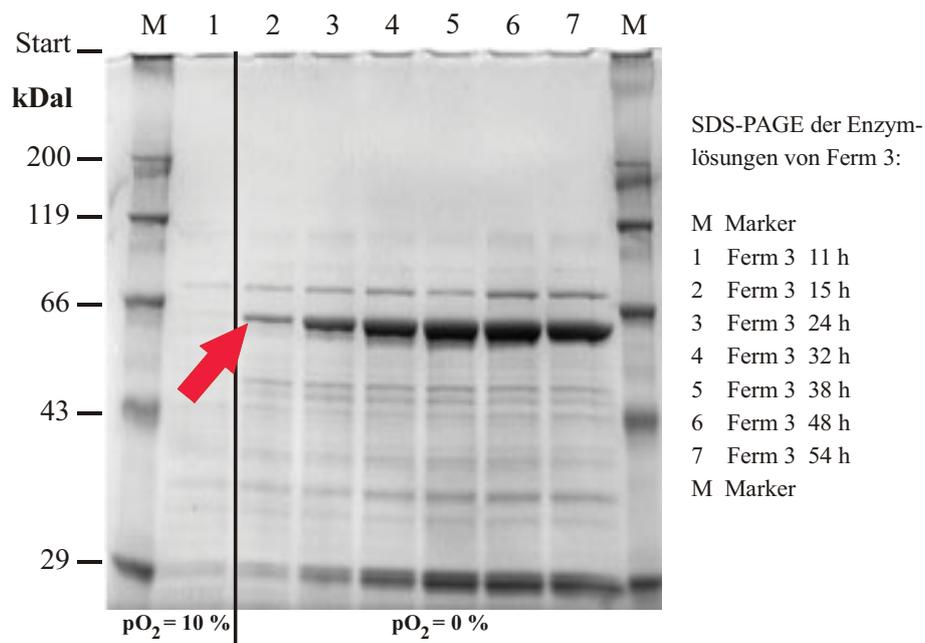


Abbildung 4.24: SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte von Fermentation Ferm 3

Das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse der löslichen Zellfraktionen von Ferm 3 bestätigt die anhand des Palli-Aktivitätsverlaufs vermutete Palli-Expression. Durch die Zwei-Phasen-Fermentationsstrategie gelingt die Trennung von Zellwachstum und Palli-Expression. In der ersten Phase, der Wachstumsphase, ist durch die hohe Sauerstoffzufuhr die Priorität der Zellen auf schnelles Wachstum gesetzt, neben dem keine Zeit für die Expression des nicht-essentiellen Palli-Enzyms verbleibt. Während der zweiten Phase, der Palli-Produktionsphase, wird das Wachstum durch die Limitierung der Sauerstoffversorgung verlangsamt und die Palli-Expression nimmt zu. Mit Hilfe der Zwei-Phasen-Fermentationsstrategie werden durch Regulierung des Prozessparameters Sauerstoffzufuhr die für das Zellwachstum bzw. für die Palli-Expression günstigen Bedingungen geschaffen.

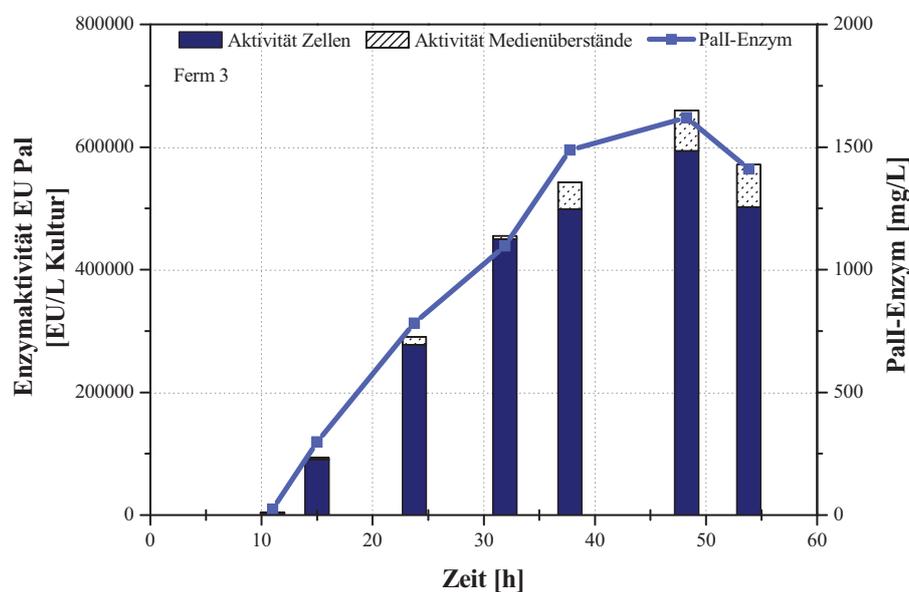


Abbildung 4.25: Zeitlicher Verlauf der semiquantitativ erfassten Palli-Expression und der Palli-Aktivität der Zellextrakte von Fermentation Ferm 3

Tabelle 4.24: Semiquantitative Erfassung der Palli-Expression der Fermentation Ferm 3

Fermentations- probe	Zeit [h]	Enzymaktivität [EU/L Kultur]		Spez. Enzymaktivität [EU/mg lösl. Protein]	Palli-Protein [mg/L Kultur]
		Zellen	Medium	Zellen	
Ferm 3 t15	11	3.304	840	4	23
Ferm 3 t17	15	90.288	3.096	53	298
Ferm 3 t19	24	277.385	13.049	112	783
Ferm 3 t23	32	449.843	5.327	147	1.097
Ferm 3 t25	38	498.309	44.332	133	1.488
Ferm 3 t27	48	593.641	66.425	139	1.620
Ferm 3 t29	54	502.614	68.737	126	1.411

Die Menge an exprimiertem Pall-Enzym der Fermentation Ferm 3 stieg entsprechend seiner Enzymaktivitäten an. Es wurde über die gesamte Produktionsphase aktives Pall-Protein gebildet. Die maximal erreichte Ausbeute an Pall-Enzym lag bei 1,6 g/L Kultur.

4.4 Zusammenfassung der Prozessoptimierung zur Überproduktion des Pall-Enzyms

Die Ergebnisse der einzelnen Optimierungsstufen der Prozessentwicklung zur Überproduktion des heterologen Pall-Enzyms sind in Abbildung 4.26 und in Tabelle 4.25 zusammengefasst.

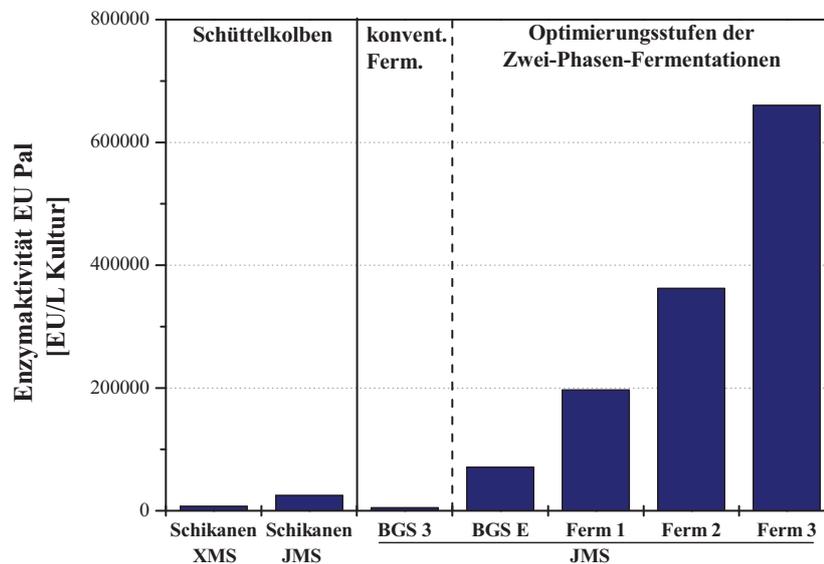


Abbildung 4.26: Zusammenfassende Ergebnisübersicht der einzelnen Stufen zur Prozessoptimierung der Pall-Produktion

Tabelle 4.25: Ergebnisse der einzelnen Stufen zur Prozessoptimierung der Pall-Produktion

Prozessstufe	Stamm	Maßstab	Optimierung	BTM [g/L]	Enzymaktivität* [EU/L Kultur]
Schikanen XMS	XMS	Schüttelkolben	-	1,96	7.109
Schikanen JMS	JMS	Schüttelkolben	-	2,79	24.783
BGS 3	JMS	Fermenter	-	3,04	4.880
BGS E	JMS	Fermenter	Zwei-Phasen-Ferm.	1,73	70.977
Ferm 1	JMS	Fermenter	pO ₂ -Wert 1. Phase	3,38	196.498
Ferm 2	JMS	Fermenter	Expressionsdauer	5,53	362.196
Ferm 3	JMS	Fermenter	Steigerung BTM	12,08	660.066

*Summe der Enzymaktivitäten aus Zellen und Medium

Die entwickelte Zwei-Phasen-Fermentationsstrategie führt zu einer erfolgreichen Erhöhung der Biomasse und Pall-Aktivität. Durch Regulierung der Sauerstoffversorgung wird eine rein prozesstechnisch vermittelte Trennung von Wachstums- und Produktionsphase erreicht, die ohne eine kostenintensive Induktion der Fremdgenexpression auskommt.

Durch die Prozessoptimierung wurde die Pall-Aktivität der Zellsate pro Liter Kultur vom Schüttelkolben bis zum Endergebnis der Zwei-Phasen-Fermentation Ferm 3 um den Faktor 25 erhöht. Die Pall-Produktion wurde von anfänglichen 48 mg/L Pall-Enzym im Schüttelkolben über die einzelnen Optimierungsstufen bis auf über 1.600 mg/L Pall-Enzym im Fermenter gesteigert.

4.5 Charakterisierung und Immobilisierung des Enzyms Isomaltulose-Synthase

Das rekombinante Enzym Isomaltulose-Synthase (Pall-Enzym) wurde im freien und immobilisierten Zustand charakterisiert.

4.5.1 Charakterisierung der freien Isomaltulose-Synthase

Für die Charakterisierung des freien Pall-Enzyms wurden dessen Aktivität und Selektivität analysiert. Die Herstellung der für diese Analysen eingesetzten Enzymlösung erfolgte durch Hochdruckhomogenisator-Aufschluss (Abschnitt 3.4.2). Die erhaltene Enzymlösung wurde auch für die Enzymimmobilisierung verwendet (siehe Abschnitt 4.5.2).

4.5.1.1 Aktivität des freien Pall-Enzyms

Die Aktivität der Enzymlösung wurde bei den Standardbedingungen 22,5 °C und 25 % Saccharose als Substratstartkonzentration ermittelt (siehe Abschnitt 3.5.1). Die aus der Fermentation Ferm 3 stammende Enzymlösung zeigte nach dem Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator und der Lagerung bei -20 °C eine stabile Pall-Aktivität von über 600.000 EU/L Kultur.

4.5.1.2 Selektivität des freien Pall-Enzyms mit 25 % und 40 % Saccharose als Substratstartkonzentration

Die Untersuchung der Enzymselektivität erfolgte über die Aufnahme der Produktspektren während des gesamten Ablaufs der Enzymreaktion bis zum vollständigen Substratverbrauch.

Bei der Auswertung der Messdaten wurde die maximale Palatinose-Ausbeute ermittelt. Das Produktspektrum des freien PalI-Enzyms wurde für die Substratstartkonzentration von 25 % bzw. 40 % Saccharose analysiert. Die genaue Versuchsanordnung ist dem Abschnitt 3.6 zu entnehmen. Tabelle 4.26 und Abbildung 4.27 zeigen die zeitlichen Verläufe der erhaltenen Produktspektren. Die Summe aller detektierten Zucker bildet die Bezugsgröße 100 %, worauf die Anteile der einzelnen Zucker bezogen wurden. Die Messergebnisse wurden durch Kontrollmessungen im Labor der Südzucker AG verifiziert. Die Anteile der Zucker Isomaltose und Isomelezitose liegen beide deutlich unter einem Prozent und werden deshalb in der Abbildung 4.27 nicht dargestellt.

Tabelle 4.26: Zeitlicher Verlauf des Produktspektrums des PalI-Enzyms bei 25 % und 40 % Saccharose-Startkonzentration

Probe	Zeit [min]	Fru [%]	Glu [%]	Sacc [%]	Pal [%]	Tre [%]	Isomal [%]	Isomel [%]
25% Sacc t1	5	1,2	0,9	54,7	37,2	5,5	<0,1	0,5
25% Sacc t3	15	1,7	1,4	34,7	54,9	6,8	0,2	0,3
25% Sacc t5	25	2,0	1,7	21,2	67,7	7,0	0,2	0,2
25% Sacc t7	35	2,3	1,9	11,3	76,7	7,4	0,3	0,1
25% Sacc t9	45	2,4	1,9	5,3	81,9	7,9	0,4	0,2
25% Sacc t11	55	2,5	2,1	2,3	84,6	8,0	0,4	0,1
25% Sacc t12	60	2,5	2,1	1,6	85,2	8,1	0,4	0,1
25% Sacc t13	65	2,5	2,1	1,1	85,5	8,2	0,4	0,2
25% Sacc t14	70	2,6	2,1	0,6	86,1	8,2	0,4	<0,1
25% Sacc t15	75	2,5	2,0	0,5	86,6	8,1	0,3	<0,1
25% Sacc t16	80	2,6	2,2	0,3	86,7	7,8	0,3	0,1
25% Sacc t17	85	2,5	2,1	0,2	86,4	8,3	0,4	0,1
<hr/>								
40% Sacc t1	10	0,8	0,5	74,8	21,1	2,4	<0,1	0,4
40% Sacc t3	30	1,3	1,0	44,0	48,1	5,0	0,2	0,4
40% Sacc t5	50	1,6	1,3	23,4	66,8	6,4	0,3	0,2
40% Sacc t7	70	1,8	1,5	11,1	77,8	7,4	0,2	0,2
40% Sacc t9	90	2,0	1,6	5,0	83,1	7,8	0,3	0,2
40% Sacc t11	110	2,0	1,6	2,2	85,1	8,4	0,4	0,2
40% Sacc t12	120	2,0	1,6	1,5	85,7	8,5	0,4	0,2
40% Sacc t13	130	2,0	1,6	1,0	86,2	8,6	0,4	0,1
40% Sacc t14	140	2,1	1,6	0,6	86,4	8,7	0,4	0,1
40% Sacc t15	150	2,0	1,6	0,5	86,0	8,9	0,6	0,3
40% Sacc t16	160	2,1	1,6	0,3	86,8	8,6	0,4	0,2
40% Sacc t17	170	2,1	1,6	0,2	87,0	8,6	0,3	0,1

Fru = Fructose, Glu = Gucose, Sacc = Saccharose, Pal = Palatinose, Tre = Trehalulose, Isomal = Isomaltose, Isomel = Isomelezitose

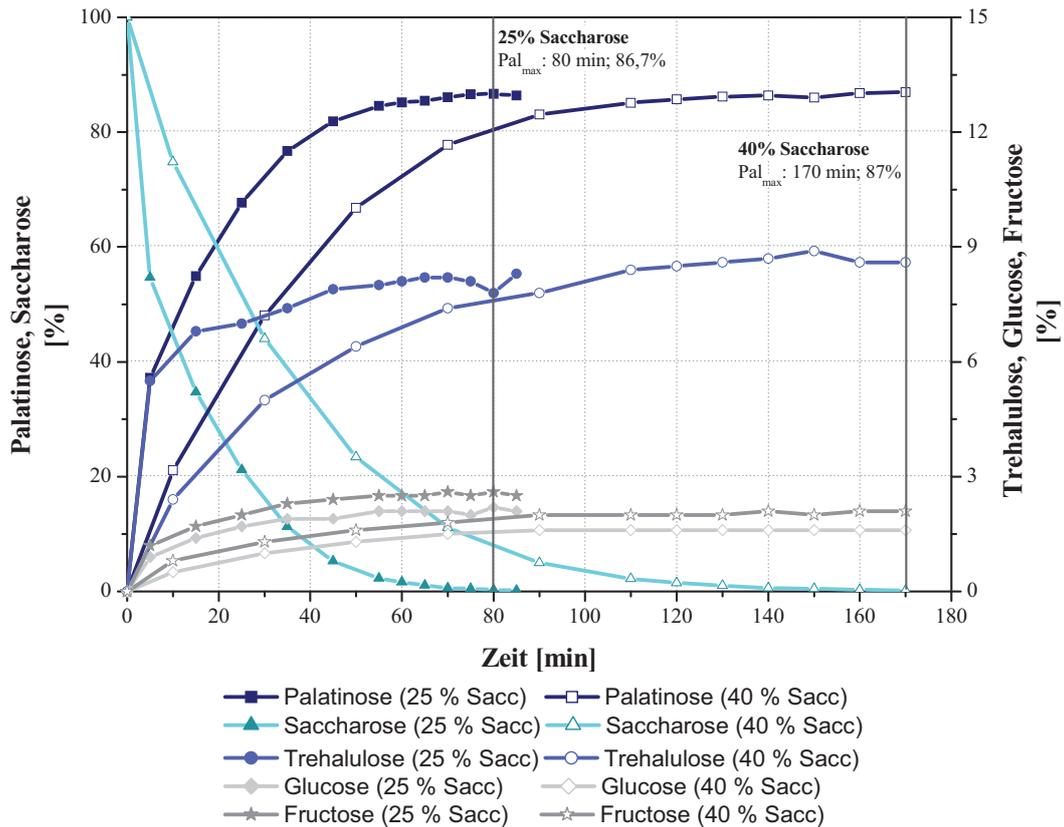


Abbildung 4.27: Produktspektrum des PalI-Enzyms bei 22,5 °C und 25 bzw. 40 % Saccharose-Lösung

Palatinose stellte mit 87 % das Hauptprodukt der enzymatischen Saccharose-Umsetzung dar. Diese Palatinose-Ausbeute von 87 % deckt sich mit den früher ermittelten Werten für dieses modifizierte PalI-Enzym (M. Schubert, vertraulicher Bericht, 06/2008) und überragt deutlich die Höchstwerte von 85 %, die bisher mit dem Wildtyp- bzw. dem rekombinanten Enzym erreicht wurden (Ravaud et al., 2006). Als Nebenprodukte wurden Trehalulose (ca. 8 %), Fructose (ca. 2,5 %), Glucose (ca. 2 %) und geringe Mengen an Isomaltose und Isomelezitose gebildet. Die Messgenauigkeit der Palatinose-Ausbeute lag bei ca. einem Prozentpunkt, die der Monosaccharide bei maximalen Abweichungen von 0,3 Prozentpunkten. Die unterschiedlichen Anteile der Monosaccharide Fructose und Glucose von ges. 4,6 % (25 % Sacc-Ansatz) und 3,7 % (40 % Sacc-Ansatz) sind aufgrund der geringen Konzentration dieser Zucker im Gesamtansatz signifikant. Durch die höhere Startkonzentration des Substrats veränderte sich die Selektivität des PalI-Enzyms und das Produktspektrum verschob sich zu Ungunsten der Monosaccharide, so dass etwa 20 % weniger Monosaccharide gebildet wurden. Die genaue Ursache konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Startkonzentration des Substrats die PalI-Selektivität signifikant beeinflusst. Die Palatinose-Ausbeute blieb jedoch in dem untersuchten Konzen-

trationsfenster (25 - 40 %) unverändert. Für alle weiteren Versuche wurden die Standardbedingungen von 25 % Saccharose beibehalten.

4.5.2 Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase

Das rekombinante Enzym Isomaltulose-Synthase (Pall-Enzym) wurde auf seine Immobilisierbarkeit hin untersucht und die Qualität der hergestellten Immobilisate analysiert. Hierfür wurden Zellextrakte aus JMS (siehe Abschnitt 3.4.2) zuerst mit Glutardialdehyd (GDA) quervernetzt und anschließend in Polyvinylalkohol (PVAL) eingeschlossen und zu LentiKats[®] verarbeitet. Es wurde der Einfluss der verschiedenen Immobilisierungsschritte sowohl auf die Aktivität als auch auf die Selektivität des Pall-Enzyms untersucht. Nachfolgend wurde die Stabilität des immobilisierten Biokatalysators bei Mehrfachverwendung geprüft.

4.5.2.1 Einfluss von Glutardialdehyd auf die Pall-Aktivität

Um das Molekulargewicht der Isomaltulose-Synthase zu vergrößern und somit eine spätere Auswaschung des Enzyms aus dem Polyvinyl-Hydrogel zu verhindern, wurde die Enzymlösung mit Hilfe des bifunktionalen Reagenz Glutardialdehyd (GDA) quervernetzt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die optimale GDA-Konzentration bestimmt. Um den Einfluss von GDA auf die Pall-Aktivität zu untersuchen, wurde GDA in verschiedenen Konzentrationen (0; 0,06; 0,17; 0,27 und 0,54 mol/L) für die Quervernetzung eingesetzt. Die Ansätze wurden 16 Stunden bei 4 °C gerührt und anschließend auf ihre Pall-Aktivität hin analysiert (s. Abschnitte 3.5.1 und 3.7.1). Tabelle 4.27 und Abbildung 4.28 zeigen die Pall-Aktivitäten, die durch Quervernetzung mit unterschiedlichen GDA-Konzentrationen erhalten wurden. Als Referenzgröße wurde die Pall-Aktivität der parallel untersuchten, unbehandelten Rohenzym-Lösung (freies Enzym) auf den Wert 100 % gesetzt.

Tabelle 4.27: Pall-Aktivität bei Zusatz verschiedener GDA-Mengen

GDA-Konzentration im Ansatz [mol/L]	Enzymaktivität	
	[EU/L Kultur]	[%]
0,00	645.662	100
0,06	498.989	77
0,17	220.595	34
0,27	79.832	12
0,54	33.066	5

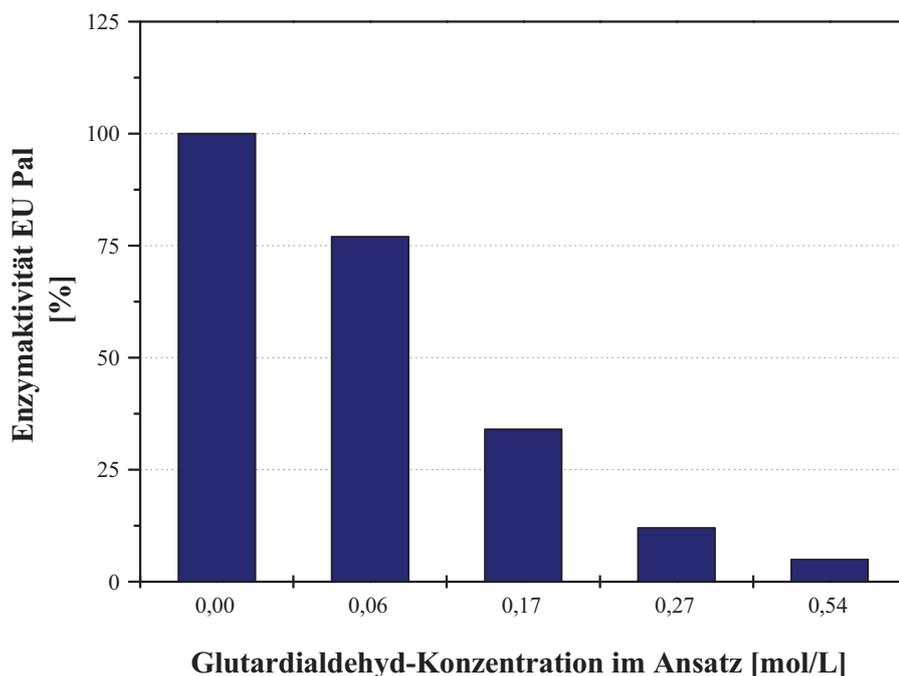


Abbildung 4.28: Einfluss von Glutardialdehyd auf die PII-Aktivität

Mit steigender GDA-Konzentration sank die Aktivität des quervernetzten PII-Enzyms drastisch. Das beste Ergebnis wurde mit der geringsten GDA-Menge von 0,06 mol/L erreicht. Hierbei konnten über 75 % der eingesetzten PII-Aktivität wiedergefunden werden. Für die nachfolgenden Quervernetzungsreaktionen wurde deshalb GDA in dieser Konzentration verwendet.

Die Sensitivität gegenüber Glutardialdehyd hängt vom jeweiligen Enzym ab. Bei Einsatz einer vergleichbaren GDA-Konzentration erhielt Kostova ähnliche Restaktivitäten nach Quervernetzung von D-Aminosäureoxidase in permeabilisierten Hefe-Zellen. Das Enzym Katalase zeigte hingegen nur eine Restaktivität von 51 % (Kostova et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnte Jahnz keine signifikante Beeinträchtigung rekombinanter Inulase II durch die Behandlung mit 0,25 Vol% GDA (0,06 mol/L) feststellen (Jahnz et al., 2002).

Die GDA-Sensitivität des PII-Enzyms wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Schiweck et al., 1990; Kawaguti et al., 2007). Eine GDA-Konzentration von 2,5 Vol% (0,6 mol/L) führt zu einer vollständigen Inaktivierung der Isomaltulose-Synthase (Egerer, 1994). Dieser Enzymaktivitätsverlust wird möglicherweise durch Reaktionen der GDA-Moleküle mit Aminosäuren des Aktiven Zentrums verursacht. Zusätzlich kann es durch die Quervernetzung zu ungünstigen Konformationsänderungen des PII-Enzyms kommen (Chui et al., 1997).

4.5.2.2 Einfluss von Glutardialdehyd auf die Enzymaktivität bei Zusatz von Saccharose und PalatinoseTM-Melasse

Die Quervernetzung der Isomaltulose-Synthase mit Glutardialdehyd (GDA) wurde auch in Anwesenheit von Saccharose und Palatinose-Melasse durchgeführt. Diesem Versuch lag die Überlegung zugrunde, dass eine Substrat- bzw. Produktbindung im Aktiven Zentrum des Enzyms als Schutzschild fungieren und eine Bindung von GDA an dieser Stelle verhindern könnte.

Es wurden verschiedene Mengen (w/v) Saccharose (0 %, 15 %, 30 % und 45 %) und Palatinose-Melasse (25 %) in der Enzymlösung aufgelöst und die Ansätze mit verschiedenen GDA-Konzentrationen (0,06; 0,17; 0,27 und 0,54 mol/L) quervernetzt (siehe Abschnitt 3.7.1). Anschließend wurden die Enzymaktivitäten nach Abschnitt 3.5.1 ermittelt.

Abbildung 4.29 und Tabelle 4.28 zeigen einen Gesamtüberblick über die Pall-Aktivitäten der Ansätze mit und ohne Substrat- bzw. Produktzusatz. Als Referenzgröße wurde die Pall-Aktivität der mitgeführten Rohenzymlösung ohne GDA-Zugabe auf den Wert 100 % gesetzt.

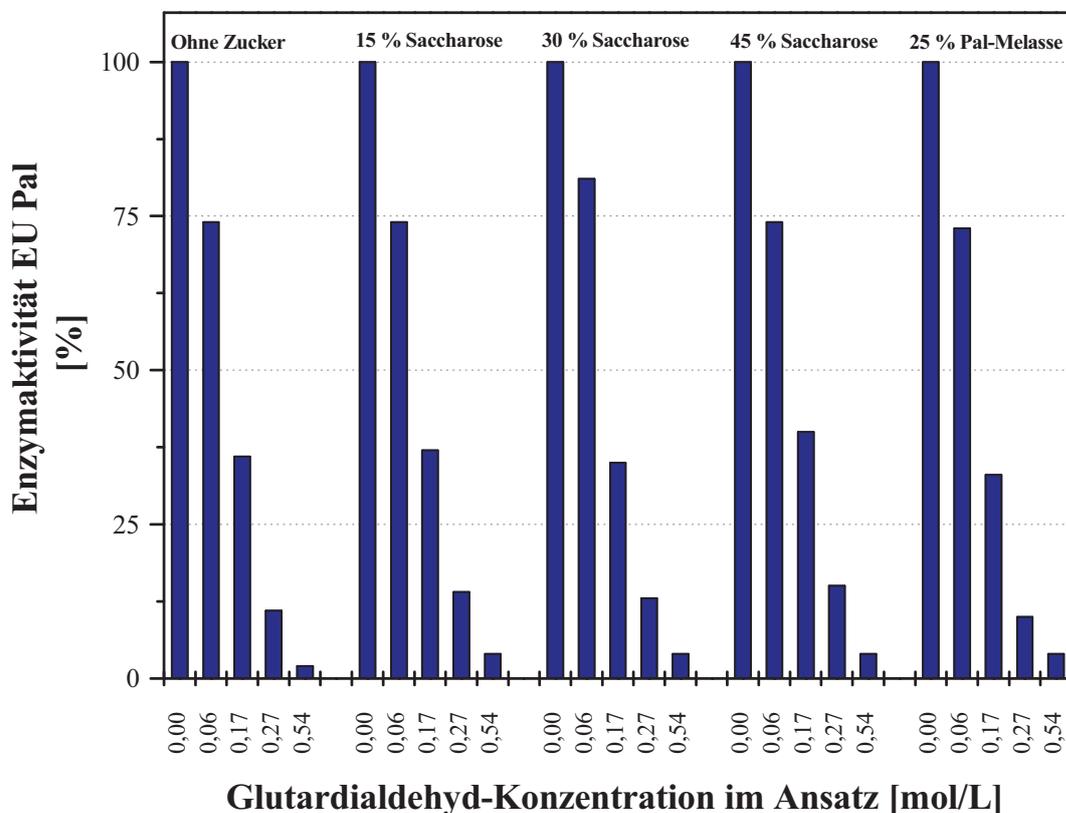


Abbildung 4.29: Einfluss von Glutardialdehyd auf die Pall-Aktivität ohne und mit Zusatz von Saccharose oder Palatinose-Melasse

Tabelle 4.28: Einfluss von Glutardialdehyd auf die Pall-Aktivität ohne und mit Zusatz von Saccharose oder Palatinose-Melasse

Ansatz	Enzymaktivität	
	[EU/L Kultur]	[%]
0,00 mol/L GDA	505.320	100
0,06 mol/L GDA	375.177	74
0,17 mol/L GDA	183.406	36
0,27 mol/L GDA	55.846	11
0,54 mol/L GDA	11.686	2
15% Sacc + 0,00 mol/L GDA	460.545	100
15% Sacc + 0,06 mol/L GDA	339.505	74
15% Sacc + 0,17 mol/L GDA	168.522	37
15% Sacc + 0,27 mol/L GDA	66.425	14
15% Sacc + 0,54 mol/L GDA	18.697	4
30% Sacc + 0,00 mol/L GDA	424.381	100
30% Sacc + 0,06 mol/L GDA	342.949	81
30% Sacc + 0,17 mol/L GDA	150.071	35
30% Sacc + 0,27 mol/L GDA	54.124	13
30% Sacc + 0,54 mol/L GDA	15.253	4
45% Sacc + 0,00 mol/L GDA	335.445	100
45% Sacc + 0,06 mol/L GDA	247.248	74
45% Sacc + 0,17 mol/L GDA	133.096	40
45% Sacc + 0,27 mol/L GDA	51.172	15
45% Sacc + 0,54 mol/L GDA	14.761	4
25% Melasse + 0,00 mol/L GDA	384.772	100
25% Melasse + 0,06 mol/L GDA	279.230	73
25% Melasse + 0,17 mol/L GDA	125.592	33
25% Melasse + 0,27 mol/L GDA	38.994	10
25% Melasse + 0,54 mol/L GDA	14.515	4

Obwohl der Zusatz von Substanzen, die im Aktiven Zentrum binden, in vielen Fällen zur Abschwächung der Enzymaktivierung führte (Klibanov, 1983), konnte durch die Zugabe von Saccharose bzw. von Palatinose-Melasse keine merkliche Schutzwirkung auf die Aktivität des Pall-Enzyms erzielt werden. Der Erfolg dieser Methode scheint von dem zu immobilisierenden Enzym abzuhängen. In allen weiteren Quervernetzungsreaktionen wurde auf den Zusatz von Saccharose und Palatinose-Melasse verzichtet.

4.5.2.3 Enzymimmobilisierung in LentiKats[®]

Nach der Behandlung mit Glutardialdehyd wurde die quervernetzte Isomaltulose-Synthase in linsenförmigen PVAL-Hydrogelen (LentiKats[®]) eingeschlossen (siehe Abschnitt 3.7.2). In einer vergleichenden Analyse wurde die Beeinträchtigung des Pall-Enzyms, die durch die

Immobilisierung verursacht wurde, untersucht. Betrachtet wurden die Aktivitätsverluste in den einzelnen Zwischenstufen des Immobilisierungsprozesses. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.30 und Tabelle 4.29 dargestellt. Die Pall-Aktivität des freien Enzyms wurde als Referenzgröße auf den Wert 100 % gesetzt. Als indirektes Maß der Immobilisierungsqualität diente die in der LentiKat[®] Stabilizer-Lösung wieder findbare Pall-Aktivität. Die Pall-Aktivität der LentiKats[®] wurde wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben ermittelt.

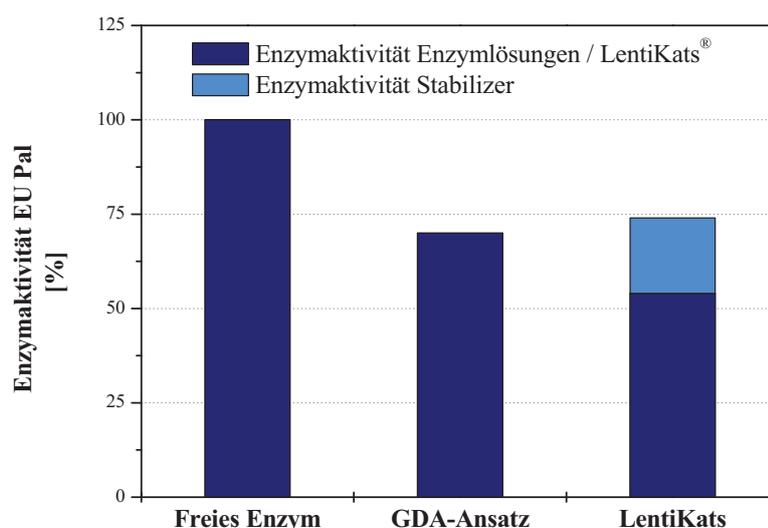


Abbildung 4.30: Vergleich der Aktivitäten des freien, mit GDA quervernetzten und in LentiKats[®] immobilisierten Pall-Enzyms

Tabelle 4.29: Aktivitäten des freien, quervernetzten und in LentiKats[®] immobilisierten Enzyms

Ansatz	Enzymaktivität		
	[EU/L Kultur]	[%]	[EU/g Kat*]
Freies Enzym	602.097	100	-
GDA-Ansatz	422.880	70	-
LentiKats [®]	326.214	54	65
Stabilizer	120.762	20	-

*Kat = Katalysatorfeuchtmasse

Nach der Immobilisierung der Enzymlösung in LentiKats[®] wurden 54 % der eingesetzten Pall-Aktivität wiedergefunden. Etwa 30 % der Aktivität des freien Pall-Enzyms gingen durch die Quervernetzung mit GDA verloren, ca. 20 % wurden während der Stabilisierungsphase durch die LentiKat[®] Stabilizer-Lösung aus den Immobilisaten gewaschen. Mit dieser Methode konnten gut 50 % der eingesetzten Enzymaktivität in LentiKats[®] immobilisiert werden. Die

PalI-Aktivität betrug 65 EU/g Katalysatorfeuchtmasse. Nach adsorptiver Bindung der Isomaltulose-Synthase an CM-Cellulose und anschließender Vernetzung mit 0,2 Vol% GDA fand Kutzbach mit 49,2 EU/g ebenfalls 50 % der eingesetzten PalI-Aktivität im Immobilisat wieder (Kutzbach et al., 1982).

4.5.2.4 Einfluss der Immobilisierungsprozedur auf die Enzymselektivität

Um Auswirkungen der Immobilisierung auf die Selektivität des PalI-Enzyms aufzeigen zu können, wurden von den einzelnen Zwischenstufen des Immobilisierungsprozesses die Kinetiken der Palatinose-Bildung mit den jeweiligen Produktspektren aufgenommen (siehe Abschnitt 3.6). In dieser Versuchsreihe kamen gleiche Mengen an freiem, quervernetztem und immobilisiertem PalI-Enzym zum Einsatz.

In Tabelle 4.30 und Abbildung 4.31 werden die zeitlichen Verläufe der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme bei Einsatz von freiem, quervernetztem (GDA-Ansatz) und in LentiKats[®] immobilisiertem Enzym dargestellt. Die Summe aller detektierten Zucker bildet die Bezugsgröße 100 %, worauf die Anteile von Palatinose und Saccharose bezogen wurden. Die Abkürzung Pal_{max} steht für die maximale Palatinose-Ausbeute (bei Sacc = 0,2 %). Die Messergebnisse wurden durch Kontrollmessungen im Labor der Südzucker AG verifiziert.

Tabelle 4.30: Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme bei Einsatz von freiem, quervernetztem und in LentiKats[®] immobilisiertem PalI-Enzym

Freies Enzym			GDA-Ansatz			LentiKats [®]		
Zeit [min]	Pal [%]	Sacc [%]	Zeit [min]	Pal [%]	Sacc [%]	Zeit [min]	Pal [%]	Sacc [%]
0	0,0	100,0	0	0,0	100,0	0	0,7	99,0
15	44,3	48,9	15	29,4	66,0	15	23,5	73,2
30	69,3	20,8	30	51,5	40,8	30	44,1	49,7
45	81,4	7,1	45	67,4	22,9	45	59,6	31,9
60	85,8	2,1	60	77,4	11,6	60	71,2	18,8
80	86,9	0,4	80	83,7	4,3	80	79,7	8,9
85	87,4	0,3	100	86,1	1,5	100	84,0	3,9
90	87,3	0,2	120	86,7	0,5	120	85,8	1,8
95	87,4	0,1	140	86,7	0,2	140	86,3	0,8
100	87,4	0,1	160	86,9	0,1	160	86,6	0,4
120	87,5	0,1	180	86,6	0,1	180	86,7	0,2
						200	86,5	0,1
						220	86,7	0,1

Pal = Palatinose, Sacc = Saccharose

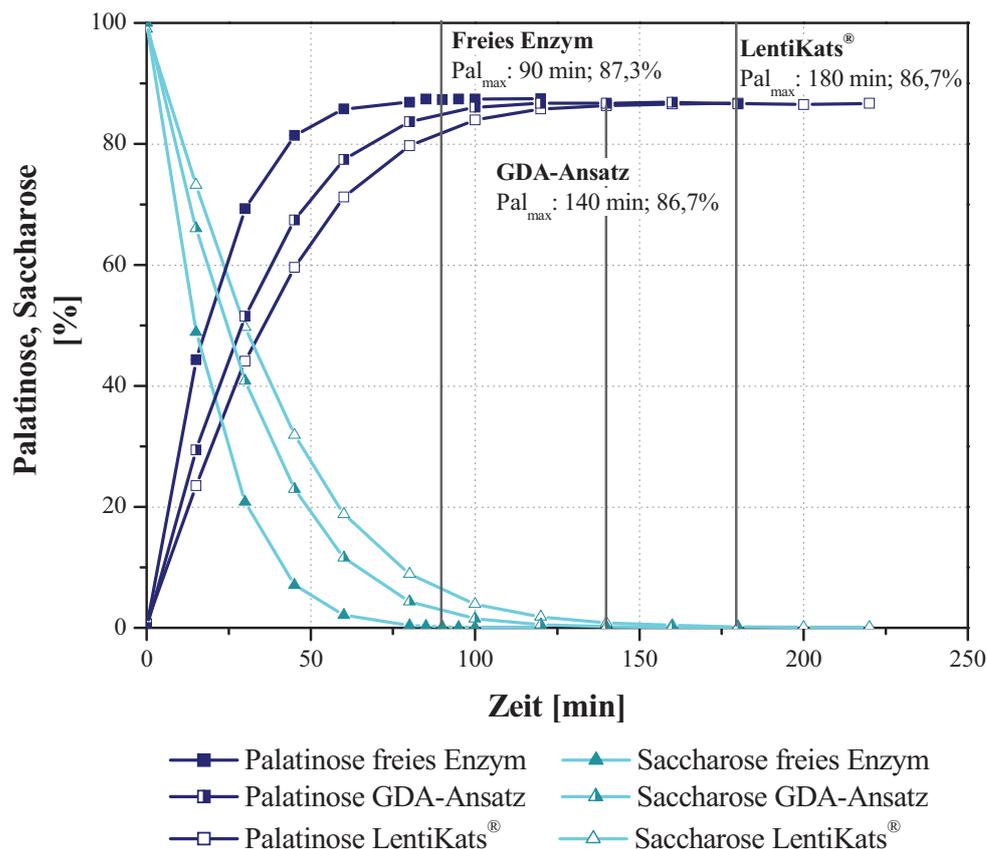


Abbildung 4.31: Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme bei Einsatz von freiem, quervernetztem und in LentiKats® immobilisiertem Pali-Enzym

Tabelle 4.31 zeigt die maximalen Palatinose-Ausbeuten (Pal_{max}) und die dazugehörigen Zeitpunkte der drei Ansätze mit freiem, quervernetztem und in LentiKats® immobilisiertem Pali-Enzym.

Tabelle 4.31: Maximale Palatinose-Ausbeuten und dazugehörige Zeitpunkte

Ansatz	Zeitpunkte		Pal _{max} [%]
	[min]		
	Sacc ≤ 0,1 %		
		Pal _{max}	
Freies Enzym	95	90	87,3
GDA-Ansatz	160	140	86,7
LentiKats®	200	180	86,7

Sacc = Saccharose, Pal_{max} = maximale Palatinose-Ausbeute

In Abbildung 4.31 wird anhand der Steigungen der Palatinose-Bildungskurven deutlich, dass die Palatinose-Bildung des freien Pali-Enzyms schneller als die des quervernetzten (GDA-

Ansatz) und die der LentiKats[®] erfolgt. Das freie Enzym erreicht seine maximale Palatinose-Ausbeute nach bereits 90 min, wohingegen der GDA-Ansatz 140 min und die LentiKats[®] 180 min benötigen. Dies ist auf den durch die Immobilisierungsprozedur verursachten Enzymaktivitätsverlust zurückzuführen.

Eine Beeinträchtigung der Selektivität der Isomaltulose-Synthase war weder durch die Quervernetzung mit Glutardialdehyd noch durch die Immobilisierung in LentiKats[®] festzustellen. Die maximale Palatinose-Ausbeute aller drei Ansätze blieb unverändert bei 87 %.

4.5.2.5 Prüfung der Stabilität des immobilisierten Biokatalysators bei Mehrfachverwendung

Für die Untersuchung der katalytischen Stabilität der LentiKats[®] wurden 20 g Immobilisat innerhalb von 10 Tagen 6-mal für die Umsetzung von Saccharose zu Palatinose eingesetzt. Zwischen den einzelnen Einsätzen wurden die LentiKats[®] abgetrennt, gewaschen und bei 4 °C unter Rührung gelagert (nähere Versuchsbeschreibung siehe Abschnitt 3.8).

Tabelle 4.32 gibt einen Überblick über die nach 15 min Reaktionszeit erhaltenen Pall-Aktivitäten der sechs LentiKat[®]-Einsätze. Für die Bestimmung der prozentualen Enzymaktivität wurde die des ersten LentiKat[®]-Einsatzes 100 % gesetzt und folgende Aktivitäten wurden entsprechend umgerechnet.

Tabelle 4.32: Enzymaktivitäten der sechs LentiKat[®]-Einsätze

Einsatz LentiKats [®]	Zeit [min]	Enzymaktivität		
		[EU/L Kultur]	[%]	[EU/g Kat*]
1	15	285.140	100	57
2	15	273.497	96	55
3	15	273.355	96	55
4	15	250.732	88	50
5	15	242.554	85	49
6	15	246.801	87	49

*Kat = Katalysatorfeuchtmasse

In Abbildung 4.32 sind die zeitlichen Verläufe der Palatinose-Bildungs- und Saccharose-Umsatzkurven der sechs LentiKat[®]-Einsätze dargestellt (siehe auch Tabelle 6.4 im Anhang). Die Summe aller detektierten Zucker bildet die Bezugsgröße 100 %, worauf die Anteile von

Palatinose und Saccharose bezogen wurden. Die Messergebnisse wurden durch Kontrollmessungen im Labor der Südzucker AG verifiziert.

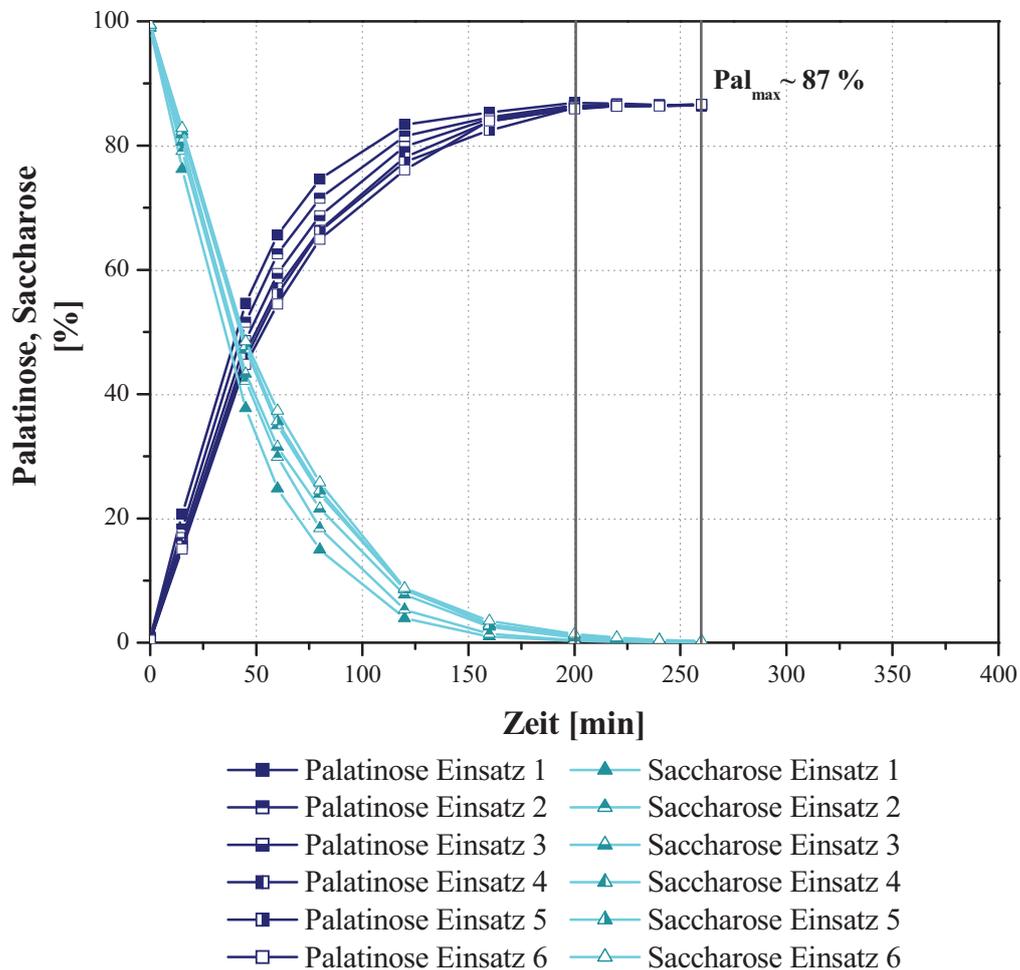


Abbildung 4.32: Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme beim wiederholten Einsatz der LentiKats[®]

Die Steigungen der einzelnen Palatinose-Bildungskurven nehmen mit aufsteigender Anzahl der LentiKat[®]-Einsätze leicht ab. Die Enzymaktivität pro Einsatz verringerte sich jedoch nur minimal. Die Pall-Aktivitäten lagen im Rahmen von 57 (1. Einsatz) bis 49 EU/g Katalysatorfeuchtmasse (6. Einsatz). Über die gesamte Versuchszeit war eine Abnahme der Pall-Aktivität von nur maximal 15 % zu beobachten. Dies ist auf einen wiederholten geringen Verlust an Immobilisat im Zuge des Abtrennens und Waschens der LentiKats[®] zurückzuführen.

Tabelle 4.33 zeigt die maximalen Palatinose-Ausbeuten der sechs LentiKat[®]-Einsätze und die jeweilige Reaktionsdauer bis zum Erreichen einer Saccharose-Konzentration von $\leq 0,2\%$.

Tabelle 4.33: Maximale Palatinose-Ausbeuten und dazugehörige Reaktionsdauer bis zum Substratumsatz von 0,2 % Rest-Saccharose

Einsatz LentiKats [®]	Pal _{max} [%]	Zeitpunkte Pal _{max} [min]
1	86,7	220
2	86,5	240
3	86,6	260
4	86,6	260
5	86,5	260
6	86,6	260

Pal_{max} = maximale Palatinose-Ausbeute

In Abbildung 4.33 werden die Daten aus Tabelle 4.33 und die PalI-Aktivitäten nach 15 min Reaktionszeit zusammenfassend dargestellt.

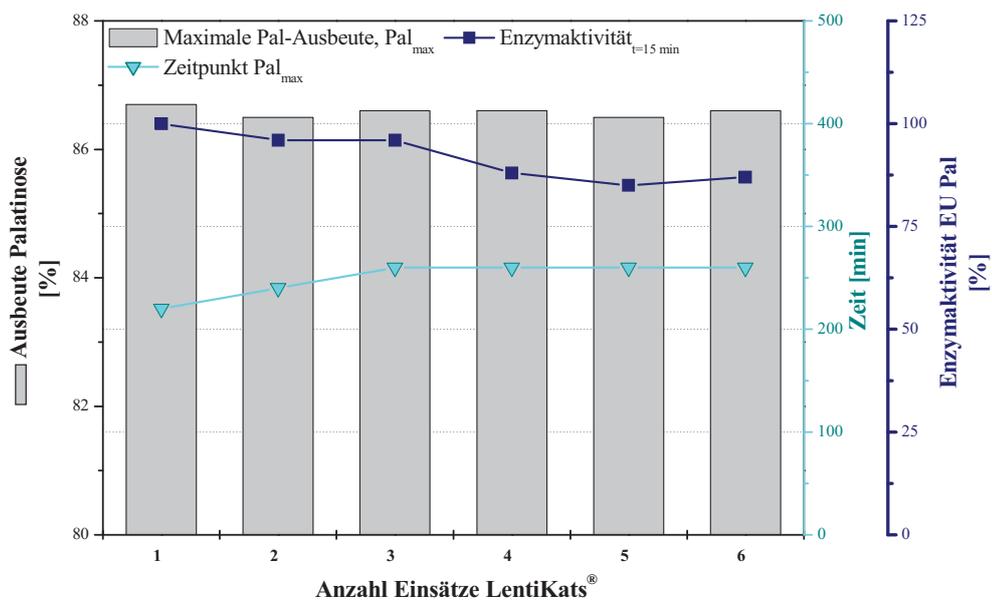


Abbildung 4.33: Enzymaktivitäten und maximale Palatinose-Ausbeuten sowie dazugehörige Zeitpunkte der einzelnen LentiKat[®]-Einsätze

Die Zeitspanne bis zum Erreichen der maximalen Palatinose-Ausbeute verlängerte sich nur über die ersten drei Ansätze von 220 auf 260 min und blieb danach konstant. Die Selektivität der immobilisierten Isomaltulose-Synthase blieb auch bei Mehrfacheinsatz der LentiKats[®] gleich. Die maximalen Palatinose-Ausbeuten aller sechs Einsätze lagen konstant bei 87 %.

4.5.3 Zusammenfassung: Charakterisierung und Immobilisierung des Enzyms Isomaltulose-Synthase

Bei der Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase lag der Fokus auf der Enzymquervernetzung mit Hilfe des bifunktionalen Reagenz Glutardialdehyd (GDA) und anschließendem Matrixeinschluss in Polyvinylalkohol (PVAL) in Form von LentiKats[®].

Innerhalb des Immobilisierungsprozesses reagiert das PalI-Enzym auf die Quervernetzung mit Glutardialdehyd am empfindlichsten. Es wurden drastische Aktivitätseinbußen mit steigender GDA-Konzentration beobachtet. Durch Optimierung der verwendeten GDA-Konzentration ist es dennoch gelungen, hoch aktive Immobilisate zu erzeugen. Die hergestellten LentiKats[®] zeigten über 50 % der PalI-Aktivität des freien Enzyms und eine PalI-Aktivität von 65 EU/g Katalysatorfeuchtmasse. Die Selektivität des PalI-Enzyms blieb nach Quervernetzung und LentiKat[®]-Herstellung unverändert. Auch beim Mehrfacheinsatz der LentiKats[®] wurde eine maximale Palatinose-Ausbeute von 87 % erreicht. Die LentiKats[®] zeigten zusätzlich eine gute katalytische Stabilität. Die geringe Abnahme der PalI-Aktivität zwischen den einzelnen Ansätzen ist auf handlingbedingte LentiKat[®]-Verluste zurückzuführen. Durch die Molekulargewichtsvergrößerung mittels Quervernetzung mit GDA konnte eine stabile Rückhaltung der PalI-Enzyme im PVAL-Hydrogel realisiert werden. Der Einschluss von quervernetztem Enzym in LentiKats[®] stellt somit eine effiziente, für Isomaltulose-Synthase gut geeignete Immobilisierungsmethode dar.

Ein wichtiger Vorteil der rekombinanten Isomaltulose-Synthase-Herstellung gegenüber den publizierten Wildtyp-Verfahren (Kutzbach et al., 1982; Egerer, 1994) ist der Wegfall der kostenintensiven Enzymaufkonzentrierung und -aufreinigung aus dem Zelllysat. Aufgrund der Überexpression in *E. coli* wird das PalI-Enzym in sehr hohen Konzentrationen in der Zelle angereichert, so dass eine direkte Immobilisierung der Rohenzymextrakte die profitable Herstellung aktiver Biokatalysatoren ermöglicht.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelte Zwei-Phasen-Fermentationsstrategie ermöglicht erstmals ein gutes Zellwachstum und eine erfolgreiche Pall-Expression im Fermentationsmaßstab, was durch Einsatz einer konventionellen Prozessführung nicht realisiert werden konnte. Die gesteuerte Sauerstoffversorgung der Zellen bewirkt eine Trennung von Zellwachstum und Pall-Enzymproduktion ohne Einsatz kostenintensiver und zellschädigender chemischer Induktoren. Durch die spezifische Führung des Prozessparameters Sauerstoff wurde reproduzierbar eine Biotrockenmasse von 12 g/L erreicht und 1,6 g/L hoch aktives Pall-Enzym hergestellt.

Die Pall-Expression in der Produktionsphase wurde bereits weitestgehend optimiert. In dieser Fermentationsphase könnte möglicherweise die Nachdosierung von Ampicillin (Amp) reduziert oder vollständig eingespart werden. Durch die Anwesenheit des Antibiotikums werden die zelleigenen Ressourcen vermehrt für die Expression des ampicillinabbauenden Enzyms β -Lactamase eingesetzt und hierdurch von der Pall-Expression abgezogen. Eine Verringerung der Amp-Zugabe könnte eine weitere Erhöhung der Pall-Produktion ermöglichen. Von einer Steigerung der Expressionsrate sollte abgesehen werden, da eine zu starke Fremdgenexpression zu unlöslichen *Inclusion bodies* führen kann, die mithilfe aufwändiger Verfahren und mit meist nur geringen Ausbeuten zu aktiven Proteinen rückgefaltet werden müssen.

Für eine weitergehende Fermentationsoptimierung sollte das Hauptaugenmerk auf die Verbesserung der Wachstumsphase gerichtet werden. Eine deutliche Steigerung der Pall-Enzymmenge könnte durch eine Erhöhung der Biomasse realisiert werden. Durch Hochzell-dichtefermentationsverfahren mit automatisierten Fütterungsstrategien wie z.B. pH-stat könnten hohe Biotrockenmassekonzentrationen bis zu möglicherweise 100 g/L und mehr erreicht werden. Bei gleichbleibender Fremdgenexpression würde dies einer Konzentration an Pall-Enzym von über 13 g/L entsprechen. Ein weiterer Optimierungsfaktor stellt die Menge an zugefüttertem Hefeextrakt dar. Da im Vordergrund der Prozessentwicklung eine ausreichende Versorgung der Zellen stand, wurde die Hefeextraktkonzentration im Rahmen dieser Arbeit nicht kostenorientiert dosiert. Eine weitere Reduzierung der verwendeten Hefeextrakt-

menge ist deshalb denkbar. Zusätzlich könnten Prozesskosten durch den Einsatz von Hefeextraktersatzstoffen wie Molke oder Kartoffelrestfruchtwasser gesenkt werden.

Die Überexpression des PalI-Enzyms in *E. coli* ermöglicht erstmals eine für den industriellen Einsatz profitable Enzymimmobilisierung, die keine kostenintensive Enzymaufkonzentrierung oder -aufreinigung benötigt. Trotz der GDA-Sensitivität der Isomaltulose-Synthase konnten hoch aktive LentiKats[®] mit stabiler Enzymselektivität und hoher katalytischer Stabilität hergestellt werden. Die Verwendung linsenförmiger LentiKats[®] ermöglicht durch deren spezifische Form besonders gute Diffusionseigenschaften bei gleichzeitig leichter Abtrennbarkeit aus dem Reaktionsmedium. Das schwer biologisch abbaubare PVAL-Netzwerk schützt die Enzyme und erlaubt gleichzeitig eine unsterile Prozessführung (Wittlich et al., 2004).

Um die nach der Enzymquervernetzung erhaltene PalI-Aktivität noch stärker zu erhöhen, könnte die eingesetzte GDA-Konzentration weiter reduziert werden, sofern die Enzymrückhaltung nicht negativ beeinträchtigt wird. Ferner besteht die Möglichkeit, die Isomaltulose-Synthase mit Hilfe des Enzymdesigns genetisch so auszustatten, dass eine schonendere Quervernetzung realisierbar wird. Beispielweise wäre eine gentechnische Konstruktion spezifischer Ankerstellen für die Enzymimmobilisierung vorstellbar.

Aufgrund der guten Immobilisierbarkeit des PalI-Enzyms ist eine Vertiefung der Untersuchungen zur Immobilisierung der Isomaltulose-Synthase als erfolgversprechend zu beurteilen. Optional könnten andere Immobilisierungsmethoden für weitere Anwendungsfelder zum Einsatz kommen. Für die industrielle Palatinose-Produktion wäre z.B. auch die Herstellung kugelförmiger Immobilisate für den Einsatz in Festbettreaktoren denkbar.

6 Anhang

6.1 Scale up der Kultivierung

6.1.1 Einfluss der Begasungsrate auf die Fermentationen von JMS

Tabelle 6.1: Wachstumsverhalten und pO₂-Werte der Fermentationen BGS 1, 2, 3 und E

Probe	Zeit	OD₆₀₀	BTM	pO₂	Probe	Zeit	OD₆₀₀	BTM	pO₂
JMS	[h]	[-]	[g/L]	[%]	JMS	[h]	[-]	[g/L]	[%]
BGS 1 t0	0,0	0,11	0,04	86,0	BGS 2 t0	0,0	0,11	0,04	92,1
BGS 1 t2	2,0	0,15	0,06	44,8	BGS 2 t1	1,0	0,11	0,04	25,9
BGS 1 t3	3,4	0,18	0,07	20,5	BGS 2 t3	4,0	0,15	0,06	4,8
BGS 1 t4	4,5	0,34	0,13	0,4	BGS 2 t4	5,0	0,22	0,09	5,0
BGS 1 t5	5,6	0,49	0,19	0,0	BGS 2 t5	6,0	0,37	0,14	1,3
BGS 1 t6	6,5	0,57	0,22	0,0	BGS 2 t7	8,0	0,73	0,28	0,0
BGS 1 t7	8,5	0,77	0,30	0,0	BGS 2 t8	9,0	0,89	0,34	0,0
BGS 1 t8	9,5	0,85	0,33	0,0	BGS 2 t9	10,0	1,10	0,42	0,0
BGS 1 t9	10,9	0,93	0,36	0,0	BGS 2 t10	11,0	1,31	0,51	0,0
BGS 1 t10	14,0	1,14	0,44	0,0	BGS 2 t11	14,3	1,63	0,63	0,0
BGS 1 t11	23,0	1,14	0,44	0,0	BGS 2 t12	23,5	2,60	1,00	0,0
Probe	Zeit	OD₆₀₀	BTM	pO₂	Probe	Zeit	OD₆₀₀	BTM	pO₂
JMS	[h]	[-]	[g/L]	[%]	JMS	[h]	[-]	[g/L]	[%]
BGS 3 t0	0,0	0,11	0,04	90,3	BGS E t0	0,0	0,11	0,04	93,5
BGS 3 t1	2,0	0,22	0,09	45,6	BGS E t1	1,5	0,15	0,06	2,2
BGS 3 t2	3,5	0,45	0,17	10,6	BGS E t3	3,5	0,45	0,17	2,1
BGS 3 t3	5,0	1,36	0,52	10,9	BGS E t4	4,5	0,85	0,33	1,6
BGS 3 t4	6,0	2,60	1,00	14,8	BGS E t5	5,5	1,63	0,63	0,4
BGS 3 t5	7,0	4,69	1,80	12,9	BGS E t6	6,5	2,34	0,90	0,1
BGS 3 t6	8,0	6,62	2,55	9,6	BGS E t7	7,5	3,08	1,19	0,0
BGS 3 t7	8,5	7,68	2,95	9,5	BGS E t8	8,5	3,19	1,23	0,0
BGS 3 t8	11,2	8,82	3,39	9,9	BGS E t9	10,0	3,31	1,27	0,0
BGS 3 t9	21,5	7,90	3,04	10,1	BGS E t10	23,5	4,49	1,73	0,0

BGS = Begasungsstufe

6.1.2 Strategie der Zwei-Phasen-Fermentation

Tabelle 6.2: Wachstumsverhalten der Zwei-Phasen-Fermentationen Ferm 1, 2 und 3

Probe	Zeit	OD₆₀₀	BTM	Probe	Zeit	OD₆₀₀	BTM	Probe	Zeit	OD₆₀₀	BTM
JMS	[h]	[-]	[g/L]	JMS	[h]	[-]	[g/L]	JMS	[h]	[-]	[g/L]
Ferm 1 t0	0,0	0,07	0,03	Ferm 2 t0	0,0	0,07	0,03	Ferm 3 t0	0,0	0,11	0,04
Ferm 1 t1	1,0	0,07	0,03	Ferm 2 t1	1,0	0,11	0,04	Ferm 3 t1	2,0	0,22	0,09
Ferm 1 t2	2,0	0,15	0,06	Ferm 2 t2	2,3	0,15	0,06	Ferm 3 t2	3,0	0,45	0,17
Ferm 1 t3	3,3	0,30	0,11	Ferm 2 t3	3,3	0,22	0,09	Ferm 3 t3	4,0	0,93	0,36
Ferm 1 t4	4,7	0,73	0,28	Ferm 2 t4	4,3	0,45	0,17	Ferm 3 t4	5,0	1,90	0,73
Ferm 1 t5	5,5	1,36	0,52	Ferm 2 t5	5,3	1,01	0,39	Ferm 3 t5	6,0	3,37	1,30
Ferm 1 t6	6,5	2,70	1,04	Ferm 2 t6	6,0	1,67	0,64	Ferm 3 t6	6,3	4,19	1,61
Ferm 1 t7	7,5	4,49	1,73	Ferm 2 t7	7,0	2,97	1,14	Ferm 3 t7	7,0	6,29	2,42
Ferm 1 t8	8,5	5,09	1,96	Ferm 2 t8	8,0	4,69	1,80	Ferm 3 t8	7,1	6,58	2,53
Ferm 1 t9	9,5	5,94	2,29	Ferm 2 t9	8,1	4,79	1,84	Ferm 3 t9	8,0	9,98	3,84
Ferm 1 t10	14,3	6,87	2,64	Ferm 2 t10	9,0	6,50	2,50	Ferm 3 t10	8,1	9,98	3,84
Ferm 1 t11	22,0	7,62	2,93	Ferm 2 t11	9,1	6,69	2,57	Ferm 3 t11	9,0	13,46	5,18
Ferm 1 t12	22,3	7,81	3,00	Ferm 2 t12	10,1	8,59	3,30	Ferm 3 t12	9,1	13,76	5,29
Ferm 1 t13	25,0	8,19	3,15	Ferm 2 t13	10,2	8,82	3,39	Ferm 3 t13	10,0	17,55	6,75
Ferm 1 t14	28,3	8,97	3,45	Ferm 2 t14	11,1	10,00	3,85	Ferm 3 t14	10,1	17,55	6,75
Ferm 1 t15	30,0	8,77	3,38	Ferm 2 t15	11,2	10,00	3,85	Ferm 3 t15	11,0	21,45	8,25
				Ferm 2 t16	15,0	11,46	4,41	Ferm 3 t16	11,2	20,96	8,06
				Ferm 2 t17	24,0	11,97	4,60	Ferm 3 t17	15,0	24,44	9,40
				Ferm 2 t18	24,2	11,97	4,60	Ferm 3 t18	15,1	23,43	9,02
				Ferm 2 t19	27,8	13,25	5,10	Ferm 3 t19	23,8	27,03	10,40
				Ferm 2 t20	27,9	12,22	4,70	Ferm 3 t20	23,9	26,51	10,20
				Ferm 2 t21	30,8	13,16	5,06	Ferm 3 t21	28,0	28,10	10,81
				Ferm 2 t22	33,0	13,16	5,06	Ferm 3 t22	28,1	27,56	10,61
				Ferm 2 t23	48,8	14,36	5,53	Ferm 3 t23	31,9	28,63	11,02
								Ferm 3 t24	32,0	28,10	10,81
								Ferm 3 t25	37,8	29,72	11,44
								Ferm 3 t26	37,8	28,63	11,02
								Ferm 3 t27	48,3	31,38	12,08
								Ferm 3 t28	48,4	29,61	11,39
								Ferm 3 t29	53,9	31,95	12,29

Tabelle 6.3: Zeitlicher Verlauf der Fermentation Ferm 3

Fermentations- probe	Zeit [h]	OD₆₀₀ [-]	pO₂ [%]	Glycerin [g/L]	Acetat [g/L]	Lactat [g/L]
Ferm 3 t0	0,0	0,11	87,47	12,34	0,06	0,00
Ferm 3 t1	2,0	0,22	10,20	12,27	0,14	0,00
Ferm 3 t2	3,0	0,45	9,99	12,41	0,30	0,00
Ferm 3 t3	4,0	0,93	10,18	12,53	0,48	0,00
Ferm 3 t4	5,0	1,90	14,94	12,22	0,65	0,00
Ferm 3 t5	6,0	3,37	9,98	12,18	0,81	0,00
Ferm 3 t6	6,3	4,19	7,46	11,90	0,89	0,00
Ferm 3 t7	7,0	6,29	9,33	11,52	0,96	0,00
Ferm 3 t8	7,1	6,58	2,70	11,08	1,08	0,02
Ferm 3 t9	8,0	9,98	10,48	10,39	1,27	0,00
Ferm 3 t10	8,1	9,98	8,05	10,13	1,39	0,03
Ferm 3 t11	9,0	13,46	10,22	9,04	1,63	0,00
Ferm 3 t12	9,1	13,76	10,04	8,52	1,76	0,04
Ferm 3 t13	10,0	17,55	9,84	7,25	1,99	0,00
Ferm 3 t14	10,1	17,55	13,68	7,12	2,16	0,03
Ferm 3 t15	11,0	21,45	9,35	5,25	2,20	0,00
Ferm 3 t16	11,2	20,96	0,17	7,35	2,06	0,06
Ferm 3 t17	15,0	24,44	0,00	3,35	5,36	0,19
Ferm 3 t18	15,1	23,43	0,00	6,97	4,95	0,25
Ferm 3 t19	23,8	27,03	0,00	0,00	9,33	0,04
Ferm 3 t20	23,9	26,51	0,00	5,41	9,35	0,10
Ferm 3 t21	28,0	28,10	0,00	0,00	11,72	0,11
Ferm 3 t22	28,1	27,56	0,00	5,07	11,27	0,15
Ferm 3 t23	31,9	28,63	0,00	0,00	14,32	0,10
Ferm 3 t24	32,0	28,10	0,00	7,53	14,05	0,15
Ferm 3 t25	37,8	29,72	0,00	1,48	13,86	0,05
Ferm 3 t26	37,8	28,63	0,00	8,53	16,85	0,09
Ferm 3 t27	48,3	31,38	0,00	0,50	22,35	0,00
Ferm 3 t28	48,4	29,61	0,00	4,96	22,33	0,00
Ferm 3 t29	53,9	31,95	0,00	1,76	24,00	0,00

6.2 Mehrfachverwendung des immobilisierten Biokatalysators

Tabelle 6.4: Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme beim wiederholten Einsatz der LentiKats®

Zeit [min]	Einsatz 1		Einsatz 2		Einsatz 3	
	Pal [%]	Sacc [%]	Pal [%]	Sacc [%]	Pal [%]	Sacc [%]
0	0,9	98,9	0,8	99,1	0,5	99,4
15	20,7	76,2	18,3	79,1	16,9	80,6
45	54,6	37,7	51,6	42,1	48,6	43,3
60	65,6	24,8	62,6	29,9	59,4	31,5
80	74,6	15,0	71,5	18,4	68,7	21,6
120	83,4	3,9	81,5	5,3	79,8	7,7
160	85,3	1,0	84,6	1,4	84,3	2,6
200	86,9	0,3	86,4	0,4	86,3	0,8
220	86,7	0,2	86,5	0,5	86,6	0,5
240	86,6	0,1	86,5	0,2	86,4	0,3
260	86,4	0,1	86,6	0,1	86,6	0,1
Zeit [min]	Einsatz 4		Einsatz 5		Einsatz 6	
	Pal [%]	Sacc [%]	Pal [%]	Sacc [%]	Pal [%]	Sacc [%]
0	0,5	99,4	0,3	99,5	0,4	99,4
15	16,0	81,8	15,6	82,3	15,1	82,8
45	46,6	47,2	45,8	47,7	44,8	48,5
60	57,1	35,0	56,1	35,6	54,5	37,3
80	66,4	23,9	66,2	24,5	64,9	25,8
120	78,1	8,6	77,4	8,6	76,1	8,8
160	83,9	3,0	82,4	2,8	84,0	3,5
200	86,0	1,1	86,1	1,2	85,9	1,4
220	86,4	0,6	86,4	0,7	86,3	0,8
240	86,5	0,4	86,4	0,4	86,4	0,4
260	86,6	0,2	86,5	0,2	86,6	0,3

Pal = Palatinose, Sacc = Saccharose

7 Literaturverzeichnis

Achten, J.; Jentjens, R. L.; Brouns, F. & Jeukendrup, A. E. (2007) Exogenous oxidation of isomaltulose is lower than that of sucrose during exercise in men. *Journal of Nutrition*, 137, pp. 1143-1148.

Akesson, M.; Hagander, P. & Axelsson, J. P. (1999) A probing feeding strategy for *Escherichia coli* cultures. *Biotechnology Techniques*, 13, pp. 523-528.

Alexander, P.; Rudolph, D. B.; Underwood, S. A.; Desai, S. G. & Liu, X. G. (2007) Optimizing microbial fermentation and mammalian cell culture: An overview. *Biopharm International*, pp. 16-24.

Arai, H.; Mizuno, A.; Sakuma, M.; Fukaya, M.; Matsuo, K.; Muto, K.; Sasaki, H.; Matsuura, M.; Okumura, H.; Yamamoto, H.; Taketani, Y.; Doi, T. & Takeda, E. (2007) Effects of a palatinose-based liquid diet (Inslow) on glycemic control and the second-meal effect in healthy men. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 56, pp. 115-121.

Arenz, M.; Bernard, J. & Kowalczyk, J. (2006) Hartkaramellen mit Isomaltulose. Südzucker AG. [DE 10 2005 022 601 A1]. DE.

Arenz, M.; Hausmanns, S. & Kowalczyk, J. (2008) Isomaltulose as an aftertaste-reducing agent. Südzucker AG. [KR 1020080014851 A]. DE.

Ariga, O.; Itoh, K.; Sano, Y. & Nagura, M. (1994) Encapsulation of biocatalyst with PVA capsules. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78, pp. 74-78.

Aroonanal, A.; Takuya, N.; Tatsuji, S. & Watanalai, P. (2007) Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33-98-8. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, pp. 1221-1227.

Babaeipour, V.; Shojaosadati, S. A.; Khalilzadeh, R.; Maghsoudi, N. & Tabandeh, F. (2008) A proposed feeding strategy for the overproduction of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 49, pp. 141-147.

Bailey, J. E. (1993) Host-vector interactions in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 48, pp. 29-52.

- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, pp. 411-421.
- Bayerköhler, T.; Dörr, T.; Kowalczyk, J.; Kunz, M. & Riffel, P. (2004) Verfahren zur Herstellung eines Komprimates aus Isomaltulose, Isomalt oder Isomalt-Varianten sowie entsprechende Produkte. Südzucker AG. [EP 1 214 093 B1]. DE.
- Bech Jensen, E. & Carlsen, S. (1990) Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli* - Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, pp. 1-11.
- Bentley, W. E.; Mirjalili, N.; Andersen, D. C.; Davis, R. H. & Kompala, D. S. (1990) Plasmid-encoded protein - The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, pp. 668-681.
- Berg, A.; König, D.; Kowalczyk, J.; Kozianowski, G. & Theis, S. (2008a) Use of isomaltulose in food products having a regenerative effect. Südzucker AG. [WO 2008/014871 A1]. DE.
- Berg, A.; König, D.; Kowalczyk, J.; Kozianowski, G. & Theis, S. (2008b) Verwendung von Isomaltulose in regenerativ wirkenden Nahrungsmitteln. Südzucker AG. [DE 10 2006 035 912 A1]. DE.
- Bernard, J. & Kowalczyk, J. (2006) Gelatinefreie, Isomaltulose-haltige Weichkaramelle. Südzucker AG. [EP 1 677 618 A1]. DE.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis 1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62, pp. 293-300.
- Beyts, P. K. (1990) Sweetening compositions comprising sucralose and isomaltulose. Tate & Lyle public limited company. [EP 0 390 438 A1]. GB.
- Bickerstaff, G. F. (1997) Immobilization of enzymes and cells. In G. F. Bickerstaff (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells*, pp. 1-11. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Birnbaum, S. & Bailey, J. E. (1991) Plasmid presence changes the relative levels of many host-cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 37, pp. 736-745.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, pp. 1513-1523.
- Bollinger, H. (1987) Palatinit[®] (Isomalt) - ein kalorienreduzierter Zuckeraustauschstoff - Technologische und physikalische Eigenschaften, Teil 1. *Gordian*, 87, pp. 92-95.

- Börnke, F.; Hajirezaei, M. & Sonnewald, U. (2002) Potato tubers as bioreactors for palatinose production. *Journal of Biotechnology*, 96, pp. 119-124.
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.
- Bruß, T.; Mika, D.; Westermann, B. & Warnecke, H.-J. (2002) Enantioselective hydrolysis of racemic epoxides with LentiKats[®]-encapsulated microorganisms. *Landbauforschung Völkenrode*, SH 241, pp. 127-129.
- Buchholz, K. & Kasche, V. (1997) Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. VCH, Weinheim.
- Buchholz, K. & Kunz, M. (1990) Biotechnologische und chemische Wege zu Synthesebausteinen aus Saccharose. *Zuckerindustrie*, 115, pp. 20-24.
- Bucke, C. (1983) Immobilized cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 300, pp. 369-389.
- Bucke, C. & Cheetham, P. S. J. (1981) Production of isomaltulose. Tate & Lyle patent holdings limited and Talres Development (n.a.) n.v. [EP 0 028 900 A1].
- Capan, E.; Jahnz, U. & Vorlop, K.-D. (2002) Pre-activated LentiKat[®]-hydrogels for covalent binding of enzymes. *Landbauforschung Völkenrode*, SH 241, pp. 151-153.
- Cartarius, R.; Krause, T. & Vogel, H. (2001) Degradable surfactants via heterogeneously catalyzed reductive amination of isomaltulose - Examination of catalyst deactivation in a continuous gradient free reaction vessel (Reprinted from Chem. Ing. Tech., vol 73, pg 118-123, 2001). *Chemical Engineering & Technology*, 24, pp. 55A-59A.
- Cartarius, R.; Krause, T. & Vogel, H. (2002) Katalysatorentwicklung für die reduktive Aminierung von Isomaltulose. *Chemie Ingenieur Technik*, 74, pp. 869-875.
- Chalmers, J. J.; Kim, E.; Telford, J. N.; Wong, E. Y.; Tacon, W. C.; Shuler, M. L. & Wilson, D. B. (1990) Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth-factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, pp. 104-111.
- Cheetham, P. S. J. (1984) The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. *Biochemical Journal*, 220, pp. 213-220.
- Cheetham, P. S. J.; Blunt, K. W. & Bucke, C. (1979) Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, pp. 2155-2168.

- Cheetham, P. S. J.; Garrett, C. & Clark, J. (1985) Isomaltulose production using immobilized cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, pp. 471-481.
- Cheetham, P. S. J.; Imber, C. E. & Isherwood, J. (1982) The formation of isomaltulose by immobilized *Erwinia rhapontici*. *Nature*, 299, pp. 628-631.
- Chen, H. C.; Hwang, C. F. & Mou, D. G. (1992) High-density *Escherichia coli* cultivation process for hyperexpression of recombinant porcine growth-hormone. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, pp. 321-326.
- Cheng, L. C.; Hor, L. I.; Wu, J. Y. & Chen, T. L. (2003) Effect of specific growth rate on the production of a recombinant nuclease by *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 14, pp. 101-107.
- Chibata, I.; Tosa, T. & Sato, T. (1986) Biocatalysis - Immobilized cells and enzymes. *Journal of Molecular Catalysis*, 37, pp. 1-24.
- Chmiel, H. (1991) Bioprozeßtechnik 1 und 2. (1. ed.) Gustav Fischer.
- Chmiel, H. (2006) Bioprozesstechnik. (2. ed.) Spektrum Akademischer Verlag.
- Cho, M. H.; Park, S. E.; Lim, J. K.; Kim, J. S.; Kim, J. H.; Kwon, D. Y. & Park, C. S. (2007) Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. *Biotechnology Letters*, 29, pp. 453-458.
- Choi, J. H.; Keum, K. C. & Lee, S. Y. (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61, pp. 876-885.
- Chui, W. K. & Wan, L. S. C. (1997) Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 14, pp. 51-61.
- Clariant GmbH. (1999) Mowiol - Polyvinyl Alkohol. Frankfurt/Main: Clariant GmbH.
- Clark, D. S. (1994) Can immobilization be exploited to modify enzyme-activity. *Trends in Biotechnology*, 12, pp. 439-443.
- Cola, K. A. & Lynch, M. J. (1991) Hart confections containing hydrogenated isomaltulose and a medicinally active ingredient. Haarmann & Reimer Corp. [EP 0 431 376 A1]. US.
- Crittenden, R. G. & Playne, M. J. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 7, pp. 353-361.

- Crueger, W.; Draht, L. & Munir, M. (1979c) Verfahren zur kontinuierlichen Fermentation von Mikroorganismen mit gleichzeitiger Umsetzung von Saccharose in Isomaltulose. Bayer AG. [DE 27 41 197 A1]. DE.
- Crueger, W.; Draht, L. & Munir, M. (1979a) Verfahren zur kontinuierlichen Fermentation von Mikroorganismen mit gleichzeitiger Umsetzung von Saccharose in Isomaltulose. Bayer AG. [DE 28 06 216 A1]. DE.
- Crueger, W.; Draht, L. & Munir, M. (1979b) Verfahren zur kontinuierlichen Fermentation von Mikroorganismen mit gleichzeitiger Umsetzung von Saccharose in Isomaltulose. Bayer AG. [EP 0 001 099 A1]. DE.
- Czichocki, G.; Dautzenberg, H.; Capan, E. & Vorlop, K.-D. (2001) New and effective entrapment of polyelectrolyte-enzyme-complexes in LentiKats. *Biotechnology Letters*, 23, pp. 1303-1307.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3, pp. 853-859.
- De Leon, A.; Hernandez, V.; Galindo, E. & Ramirez, O. T. (2003) Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, pp. 689-697.
- Desai, N. B. (1989) Kosmetische Spezialprodukte aus nachwachsenden Rohstoffen. *Parfümerie und Kosmetik*, 70, pp. 332-341.
- Diaz-Ricci, J. C. & Hernandez, M. E. (2000) Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20, pp. 79-108.
- Ding, W. A. & Vorlop, K.-D. (1995) Gel aus Polyvinylalkohol und Verfahren zu seiner Herstellung. ARBO Medizin-Technologie GmbH. [DE 43 27 923 C2]. DE.
- Doelle, H. W. (1982) Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 23, pp. 1-35.
- Donovan, R. S.; Robinson, C. W. & Glick, B. R. (1996) Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, pp. 145-154.
- Dörr, T.; Keme, T.; Sentko, A. & Kowalczyk, J. (2005) Isomaltulose-haltige Instant-Getränkpulver. Südzucker AG. [EP 1 524 911 A1]. DE.
- Douillard, J. Y. & Hoffman, T. (1983) Enzyme-linked immunosorbent-assay for screening monoclonal-antibody production using enzyme-labeled second antibody. *Methods in Enzymology*, 92, pp. 168-174.

- Dreissig, V. W. & Luger, P. (1973) Structural determination of isomaltulose. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*, B 29, pp. 514-521.
- Driemel, K.; Bunthoff, K.; Rohe, D. & Nies, H. (1990) Copolymerisate ungesättigter Carbonsäuren und ihre Verwendung. Grillo-Werke AG. [DE 3834237 A1]. DE.
- Durany, O.; de Mas, C. & Lopez-Santin, J. (2005) Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 40, pp. 707-716.
- Durieux, A.; Nicolay, X. & Simon, J. P. (2000) Continuous malolactic fermentation by *Oenococcus Oeni* entrapped in LentiKats. *Biotechnology Letters*, 22, pp. 1679-1684.
- Durieux, A.; Nicolay, X. & Simon, J. P. (2002) Continuous malolactic fermentation by *Oenococcus Oeni* entrapped in LentiKats®. *Landbauforschung Völkenrode*, SH 241, pp. 131-133.
- Egerer, P. (1994) Downstream processing of sucrose 6-glucosylmutase and production of isomaltulose, a non-cariogenic, low-caloric sweetener. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 36, pp. 65-77.
- Egerer, P.; Crueger, W. & Schmidt-Kastner, G. (1986) Kontinuierliches Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Isomaltulose. Bayer AG. [DE 35 28 752 A1]. DE.
- Eggleston, G. (2008) Sucrose and related oligosaccharides. In B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, & J. Thiem (Eds.), *Glycoscience*, pp. 1163-1183. Springer Berlin Heidelberg.
- Emerick, A. W.; Bertolani, B. L.; Benbassat, A.; White, T. J. & Konrad, M. W. (1984) Expression of a beta-lactamase preproinsulin fusion protein in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 2, pp. 165-168.
- Fein, M. L.; Harris, E. H. Jr.; Naghski, J. & Filachione, E. M. (1959) Tanning with glutaraldehyde. I. Rate studies. *Journal of the American Leather Chemists Association*, pp. 488-502.
- Friehs, K. & Reardon, K. F. (1993) Parameters influencing the productivity of recombinant *E. coli* cultivations. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 48, pp. 53-77.
- Fritzsching, B. & Kowalczyk, J. (2008) Isomaltulose in cereal products. Südzucker AG. US 2008/0102164 A1. DE.
- Fritzsching, B. & Kowalczyk, J. (2006) Isomaltulose in Cerealien-Produkten. Südzucker AG. [DE 10 2005 010 834 A1]. DE.
- Fritzsching, B. & Kowalczyk, J. (2007) Isomalt in Cerealien-Produkten. Südzucker AG. [EP 1 858 349 A1]. DE.

Fu, X. Y.; Wei, D. Z. & Tong, W. Y. (2006) Effect of yeast extract on the expression of thioredoxin-human parathyroid hormone from recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, pp. 1866-1871.

Fujii, S.; Kishihara, S.; Komoto, M. & Shimizu, J. (1983) Isolation and characterization of oligosaccharides produced from sucrose by transglucosylation action of *Serratia plymuthica*. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 30, pp. 339-344.

Gau, W.; Kurz, J.; Muller, L.; Fischer, E.; Steinle, G.; Grupp, U. & Siebert, G. (1979) Analytische Charakterisierung von Palatinit. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung*, 168, pp. 125-130.

Glick, B. R. (1995) Metabolic load and heterologous gene-expression. *Biotechnology Advances*, 13, pp. 247-261.

Godshall, M. (2007) The expanding world of nutritive and non-nutritive sweeteners. *Sugar Journal*, 69, pp. 12-20.

Gröger, H.; Capan, E.; Barthuber, A. & Vorlop, K.-D. (2001) Asymmetric synthesis of an (R)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels. *Organic Letters*, 3, pp. 1969-1972.

Grosova, Z.; Rosenberg, M.; Rebros, M.; Sipocz, M. & Sedlackova, B. (2008) Entrapment of beta-galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnology Letters*, 30, pp. 763-767.

Grupp, U. & Siebert, G. (1978) Metabolism of hydrogenated palatinose, an equimolar mixture of alpha-D-glucopyranosido-1,6-sorbitol and alpha-D-glucopyranosido-1,6-mannitol. *Research in Experimental Medicine*, 173, pp. 261-278.

Haddadin, F. T. & Harcum, S. W. (2005) Transcriptome profiles for high-cell-density recombinant and wild-type *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 90, pp. 127-153.

Hamada, S. (2002) Role of sweeteners in the etiology and prevention of dental caries. *Pure and Applied Chemistry*, 74, pp. 1293-1300.

Han, K.; Lim, H. C. & Hong, J. (1992) Acetic-acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, pp. 663-671.

Harries, C. & Tank, L. (1908) Über die Aufspaltung des Cyclopentens zum Halbaldehyd der Glutarsäure bzw. zum Glutardialdehyd. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 41, pp. 1701-1711.

Hartmeier, W. (1986) Immobilisierte Biokatalysatoren. Berlin: Springer.

- Haschke, H.; Tomka, I. & Keilbach, A. (1998) Systematic investigations on the biological degradability of packing material II. On the biodegradability of polyvinylalcohol based films. *Monatshefte für Chemie*, 129, pp. 365-386.
- Herrmann, W. O. & Haehnel, W. (1927) Über den Poly-vinylalkohol. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, pp. 1658-1663.
- Hewitt, C. J.; Onyeaka, H.; Lewis, G.; Taylor, I. W. & Nienow, A. W. (2007) A comparison of high cell density fed-batch fermentations involving both induced and non-induced recombinant *Escherichia coli* under well-mixed small-scale and simulated poorly mixed large-scale conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 96, pp. 495-505.
- Hoffmann, F.; van den Heuvel, J.; Zidek, N. & Rinas, U. (2004) Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, pp. 235-241.
- Holms, W. H. (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation*, 28, pp. 69-105.
- Huang, J. H.; Hsu, L. H. & Su, Y. C. (1998) Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21, pp. 22-27.
- Irwin, W. E. (1990) Isomalt - A sweet, reduced-calorie bulking agent. *Food Technology*, 44, pp. 128.
- Jahnz, U.; Schubert, M. & Vorlop, K.-D. (2002) Process development for production of DFA from inulin on an industrial scale : screening, genetic engineering and immobilisation. *Landbauforschung Völkenrode*, 241, pp. 113-119.
- Jana, S. & Deb, J. K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, pp. 289-298.
- Jekel, M. (1999) Entwicklung von Trägermaterialien für Biokatalysatoren. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- Jekel, M.; Buhr, A.; Willke, T. & Vorlop, K.-D. (1998a) Neuartige Geleinschlusßimmobilisate (LentiKats) in der Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik*, 70, pp. 438-441.
- Jekel, M.; Buhr, A.; Willke, T. & Vorlop, K.-D. (1998b) Immobilization of biocatalysts in LentiKats. *Chemical Engineering & Technology*, 21, pp. 275-278.
- Jekel, M. & Vorlop, K.-D. (1996) Bioencapsulation Technology. Dauzenberg, H. & Poncelet, D. (Eds.) Proceedings of the International workshop on Bioencapsulation V

- Johnston, W.; Cord-Ruwisch, R. & Cooney, M. J. (2002) Industrial control of recombinant *E. coli* fed-batch culture: new perspectives on traditional controlled variables. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25, pp. 111-120.
- Jonker, D.; Lina, B. A. & Kozianowski, G. (2002) 13-Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose®) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 40, pp. 1383-1389.
- Jung, Y. & Lim, D. (2008) Comparisons of recombinant protein expression in diverse natural isolates of *Escherichia coli*. *Molecules and Cells*, 25, pp. 446-451.
- Kashimura, J.; Nagai, Y. & Ebashi, T. (2003) The effect of palatinose on mental concentration in humans. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 49, pp. 214-216.
- Katchalski-Katzir, E. (1993) Immobilized enzymes - Learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology*, 11, pp. 471-478.
- Kavanagh, J. M. & Barton, G. W. (2008) Productivity improvement of recombinant *Escherichia coli* fermentation via robust optimization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31, pp. 137-143.
- Kawaguti, H. Y. & Sato, H. H. (2007) Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 36, pp. 202-208.
- Kawahara, J.; Ishikawa, K.; Uchimaru, T. & Takaya, N. (1997) Chemical cross-linking by glutaraldehyde between amino groups: its mechanism and effects. In G. Swift, Jr. C. E. Carraher, & C. N. Bowman (Eds.), *Polymer Modifications*. Plenum Press, New York, pp. 119-131.
- Kawahara, J.; Ohmori, T.; Ohkubo, T.; Hattori, S. & Kawamura, M. (1992) The structure of glutaraldehyde in aqueous-solution determined by ultraviolet-absorption and light-scattering. *Analytical Biochemistry*, 201, pp. 94-98.
- Kawai, K.; Okuda, Y. & Yamashita, K. (1985) Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinologia japonica*, 32, pp. 933-936.
- Kawai, K.; Yoshikawa, H.; Murayama, Y.; Okuda, Y. & Yamashita, K. (1989) Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. *Hormone and Metabolic Research*, 21, pp. 338-340.
- Kim, B. S.; Lee, S. C.; Lee, S. Y.; Chang, Y. K. & Chang, H. N. (2004) High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, pp. 147-150.
- Kim, S. S.; Kim, E. K. & Rhee, J. S. (1996) Effects of growth rate on the production of *Pseudomonas fluorescens* lipase during the fed-batch cultivation of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 12, pp. 718-722.

- Klein, J.; Behrens, W. & Kunz, M. (1988) Isomaltamine sowie deren N-Acylderivate, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung. Südzucker AG. [EP 0 255 033 A2]. DE.
- Klein, J. & Vorlop, K.-D. (1985) Immobilization techniques -Cells. In Moo-Young. (Ed.), pp. 203-224. Pergamon Press.
- Kleman, G. L. & Strohl, W. R. (1992) High cell density and high-productivity microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 3, pp. 93-98.
- Klibanov, A. M. (1983) Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 219, pp. 722-727.
- Koizumi, K.; Okada, Y. & Fukuda, M. (1991) High-performance liquid chromatography of mono- and oligo-saccharides on a graphitized carbon column. *Carbohydrate Research*, 215, pp. 67-80.
- Koo, T. Y. & Park, T. H. (1999) Increased production of recombinant protein by *Escherichia coli* deficient in acetic acid formation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, pp. 789-793.
- Kopetzki, E.; Schumacher, G. & Buckel, P. (1989) Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth-conditions. *Molecular & General Genetics*, 216, pp. 149-155.
- Korn, A. H.; Fearhel, S. H. & Filachio, E. M. (1972) Glutaraldehyde - Nature of reagent. *Journal of Molecular Biology*, 65, pp. 525-529.
- Korz, D. J.; Rinas, U.; Hellmuth, K.; Sanders, E. A. & Deckwer, W. D. (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 39, pp. 59-65.
- Kosinski, M. J.; Rinas, U. & Bailey, J. E. (1992) Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, pp. 782-784.
- Kostova, D. D.; Petrova, V. Y. & Kujumdzieva, A. V. (2008) Over-expression of DAAO and catalase in *Kluyveromyces marxianus* through media optimization, permeabilization and GA stabilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, pp. 113-120.
- Kowalczyk, J.; Bernard, J. & Arenz, M. (2008) Hartkaramellen mit Isomaltulose. Südzucker AG. [EP 1 895 855 A1]. DE.
- Krastanov, A.; Blazheva, D. & Stanchev, V. (2007) Sucrose conversion into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells in a hollow-fibre bioreactor. *Process Biochemistry*, 42, pp. 1655-1659.

- Krastanov, A.; Blazheva, D. & Yoshida, T. (2006) Conversion of sucrose into palatinose with immobilized *Serratia plymuthica* cells. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 12, pp. 721-726.
- Krastanov, A. & Yoshida, T. (2003) Production of palatinose using *Serratia plymuthica* cells immobilized in chitosan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, pp. 593-598.
- Kunz, M. (1991) Sucrose-based hydrophilic building blocks as intermediates for the synthesis of surfactants and polymers. In F. W. Lichtenthaler (Ed.), *Carbohydrates as Organic Raw Materials*, pp. 127-154. VCH, Weinheim, New York.
- Kunz, M.; Degelmann, H.; Wach, W.; Munir, M.; Kowalczyk, J. & Vogel, M. (1996) Sweetener, process for its preparation and the use thereof. Südzucker AG. [US 5,578,339]. DE.
- Kunz, M.; Puke, H. & Recker, C. (1995) Katalytische Oxidation von Isomaltulose. *Chemie Ingenieur Technik*, 67, pp. 836-842.
- Kutzbach, C.; Schmidt-Kastner, G. & Schutt, H. (1982) Saccharose-Mutase, immobilisierte Saccharose-Mutase und Verwendung von dieser immobilisierten Saccharose-Mutase zur Herstellung von Isomaltulose (6-O- α -D-Glucopyranosido-D-fructose). Bayer AG. [DE 30 38 218 A1]. DE.
- Lantero, O. J. (1983) Immobilization of the sucrose mutase in whole cells of *Protaminobacter rubrum*. Miles Laboratories, Inc. [US 4,390,627]. Ind.
- Lee, H. C.; Kim, J. H.; Kim, S. Y. & Lee, J. K. (2008) Isomaltose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from "*Protaminobacter rubrum*". *Applied and Environmental Microbiology*, 74, pp. 5183-5194.
- Lee, S. Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14, pp. 98-105.
- Li, N.; Zhang, D. H.; Zhang, L. H. & Swaminathan, K. (2003a) Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of isomaltulose synthase (Pall) from *Klebsiella* sp. LX3. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 59, pp. 150-151.
- Li, X.; Zhao, C.; An, Q. & Zhang, D. (2003b) Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3. *Journal of Applied Microbiology*, 95, pp. 521-527.
- Li, X. L.; Robbins, J. W. & Taylor, K. B. (1992) Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, pp. 1-9.
- Lichtenthaler, F. W.; Cuny, E.; Martin, D.; Rönniger, S. & Weber, T. (1991a) Practical routes from mono- and disaccharides to building blocks with industrial application profiles. In F. W. Lichtenthaler (Ed.), *Carbohydrates as Organic Raw Materials*, pp. 208-246. VCH Weinheim, New York.

- Lichtenthaler, F. W.; Martin, D.; Weber, T. & Schiweck, H. (1991b) 5-(α -D-Glucopyranosyloxymethyl)-furan-2-carboxaldehyd und dessen Derivate und Folgeprodukte sowie Verfahren zur Herstellung der Verbindungen und deren Verwendung. Südzucker AG. [DE 39 36 522 A1]. DE.
- Lin-Chao, S. & Bremer, H. (1986) Effect of the bacteria growth rate on replication control of plasmid Pbr322 in *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*, 203, pp. 143-149.
- Lina, B. A.; Jonker, D. & Kozianowski, G. (2002) Isomaltulose (Palatinose[®]): a review of biological and toxicological studies. *Food and Chemical Toxicology*, 40, pp. 1375-1381.
- Losen, M.; Frolich, B.; Pohl, M. & Buchs, J. (2004) Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnology Progress*, 20, pp. 1062-1068.
- Low, N. H. & Sporns, P. (1988) Analysis and quantitation of minor di- and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *Journal of Food Science*, 53, pp. 558-561.
- Lozinsky, V. I.; Damshkaln, L. G.; Kurochkin, I. N. & Kurochkin, I. I. (2008) Study of cryostructuring of polymer systems: 28. Physicochemical properties and morphology of poly(vinyl alcohol) cryogels formed by multiple freezing-thawing. *Colloid Journal*, 70, pp. 189-198.
- Macdonald, I. & Daniel, J. W. (1983) The bio-availability of isomaltulose in man and rat. *Nutrition Reports International*, 28, pp. 1083-1090.
- Majewski, R. A. & Domach, M. M. (1990) Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, pp. 732-738.
- Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60, pp. 512-538.
- Märkl, H.; Zenneck, C.; Dubach, A. C. & Ogbonna, J. C. (1993) Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, pp. 48-52.
- Martä, N.; Funes, L. L.; Saura, D. & Micol, V. (2008) An update on alternative sweeteners. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 19, pp. 8-10.
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, pp. 1451-1463.
- Matsukubo, T. & Takazoe, I. (2006) Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *International Dental Journal*, 56, pp. 119-130.

Mc Daniel, L. E.; Bailey, E. G. & Zimmerli, A. (1965) Effect of oxygen-supply rates on growth of *Escherichia coli* .2. Comparison of results in shake flasks and 50-liter fermenter. *Applied Microbiology*, 13, pp. 115-119.

Menart, V.; Jevsevar, S.; Vilar, M.; Trobis, A. & Pavko, A. (2003) Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong P_R, P_L promoters from phage lambda. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, pp. 181-190.

Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J. & Waldron, K. C. (2004) Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37, pp. 790-802.

Minami, T.; Fujiwara, T.; Ooshima, T.; Nakajima, Y. & Hamada, S. (1990) Interaction of structural isomers of sucrose in the reaction between sucrose and glucosyltransferases from mutans streptococci. *Oral Microbiology and Immunology*, 5, pp. 189-194.

Mintel Group Inc. (2007) Sugar and Sweeteners - US. *Mintel Reports: USA, Food and Foodservice*.

Mosbach, K. & Mosbach, R. (1966) Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their application in column techniques. *Acta Chemica Scandinavica*, 20, pp. 2807-2810.

Munir, M. (1983) Verfahren zur Herstellung von Isomaltulose (6-O- α -D-Glucopyranosido-D-fructose) mit Hilfe von immobilisierten Bakterienzellen. Südzucker AG. [DE 32 13 107 A1]. DE.

Munir, M. (1987) Production of isomaltulose using immobilized microorganisms. Südzucker AG. [US 4,640,894]. DE.

Munir, M. (1982) Verfahren zur Herstellung von Isomaltulose (6-O- α -D-Glucopyranosido-D-fructose) mit Hilfe von immobilisierten Bakterienzellen. Südzucker AG. [DE 30 38 219 A1]. DE.

Muscat, A.; Pruesse, U. & Vorlop, K.-D. (1996) Stable support materials for the immobilization of viable cells. In R. H. Wijffels, R. M. Buitelaar, C. Bucke, & J. Tramper (Eds.), *Immobilized cells: Basics and applications*, pp. 55-61. Elsevier Science B.V.

Nagai-Miyata, J.; Tsuyuki, K.; Sugitani, T.; Ebashi, T. & Nakajima, Y. (1993) Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of *Agrobacterium*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57, pp. 2049-2053.

Nakajima, Y.; Yamato, K.; Nishio, K.; Kashiwa, C.; Mizutani, T.; Yokohama, K.; Ogasa, K.; Kamakura, K. & Kashimura, J. (1989) Palatinose-Kondensationsprodukt, Verfahren zu dessen Herstellung und dessen Verwendung zur Proliferation von Bifidobakterium. Mitsui Sugar Co. [DE 38 18 884 A1]. JP.

- Nambu, M.; Kinoshita, T. & Watase, M. (1984) Artificial organs or membranes for medical use. Nippon Oil Co.Ltd. [EP 0 107 055 B1]. JP.
- Oizumi, T.; Daimon, M.; Jimbu, Y.; Kameda, W.; Arawaka, N.; Yamaguchi, H.; Ohnuma, H.; Sasaki, H. & Kato, T. (2007) A palatinose-based balanced formula improves glucose tolerance, serum free fatty acid levels and body fat composition. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 212, pp. 91-99.
- Okuda, K.; Urabe, I.; Yamada, Y. & Okada, H. (1991) Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71, pp. 100-105.
- Ooshima, T.; Izumitani, A.; Sobue, S.; Okahashi, N. & Hamada, S. (1983) Non-cariogenicity of the disaccharide palatinose in experimental dental caries of rats. *Infection and Immunity*, 39, pp. 43-49.
- Pahl, R.; Methner, F. J.; Schneider, J.; Kowalczyk, J.; Hausmanns, S. & Radowski, A. (2008) Study on the applicability of isomaltulose (Palatinose™) in beer and beer specialities, and its remarkable results. *Brewing Science*, pp. 49-55.
- Panda, A. K.; Khan, R. H.; Mishra, S.; Rao, K. B. C. A. & Totey, S. M. (2000) Influences of yeast extract on specific cellular yield of ovine growth hormone during fed-batch fermentation of *E. coli*. *Bioprocess Engineering*, 22, pp. 379-383.
- Parascandola, P.; Branduardi, P. & de Alteriis, E. (2006) PVA-gel (Lentikats®) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, pp. 184-189.
- Park, S. E.; Cho, M. H.; Lim, J. K.; Kim, J. S.; Kim, J. H.; Kwon, D. Y. & Park, C. S. (2007) A new colorimetric method for determining the isomerization activity of sucrose isomerase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71, pp. 583-586.
- Phue, J. N. & Shiloach, J. (2005) Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metabolic Engineering*, 7, pp. 353-363.
- Pinsach, J.; de Mas, C. & Lopez-Santin, J. (2006) A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, 29, pp. 235-242.
- Qoronfleh, M. W. (1999) Dissolved oxygen concentration affects the accumulation of HIV-1 recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 80, pp. 107-120.
- Quiocho, F. A. & Richards, F. M. (1964) Intermolecular cross linking of protein in crystalline state - carboxypeptidase-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52, pp. 833-839.

- Ravaud, S.; Watzlawick, H.; Haser, R.; Mattes, R. & Aghajari, N. (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 61, pp. 100-103.
- Ravaud, S.; Watzlawick, H.; Haser, R.; Mattes, R. & Aghajari, N. (2006) Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA. *Acta Crystallographia*, pp. 74-76.
- Rebros, M.; Rosenberg, M.; Mlichova, Z. & Kristofikova, L. (2007) Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. *Food Chemistry*, 102, pp. 784-787.
- Rebros, M.; Rosenberg, M.; Mlichova, Z.; Kristofikova, L. & Paluch, M. (2006) A simple entrapment of glucoamylase into LentiKats[®] as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, pp. 800-804.
- Richards, F. M. & Knowles, J. R. (1968) Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *Journal of Molecular Biology*, 37, pp. 231-233.
- Riesenberg, D. (1991) High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2, pp. 380-384.
- Riesenberg, D. & Guthke, R. (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, pp. 422-430.
- Riesenberg, D.; Menzel, K.; Schulz, V.; Schumann, K.; Veith, G.; Zuber, G. & Knorre, W. A. (1990) High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, pp. 77-82.
- Rose, T. & Kunz, M. (2002) Production of Isomalt. *Landbauforschung Völkenrode*, SH 241, pp. 75-80.
- Rosevear, A. (1984) Immobilized biocatalysts - a critical review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34, pp. 127-150.
- Ryan, W.; Parulekar, S. J. & Stark, B. C. (1989) Expression of beta-lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes - Effects of pH, phosphate, and dissolved-oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, pp. 309-319.
- Sabatini, D. D.; Bensch, K. & Barnett, R. J. (1963) Cytochemistry and electron microscopy - Preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *Journal of Cell Biology*, 17, pp. 19-58.

- Sanden, A. M.; Prytz, I.; Tubulekas, I.; Forberg, C.; Le, H.; Hektor, A.; Neubauer, P.; Pragai, Z.; Harwood, C.; Ward, A.; Picon, A.; de Mattos, J. T.; Postma, P.; Farewell, A.; Nystrom, T.; Reeh, S.; Pedersen, S. & Larsson, G. (2003) Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, pp. 158-166.
- Sangeetha, K. & Abraham, T. E. (2008) Investigation on the development of sturdy bioactive hydrogel beads. *Journal of Applied Polymer Science*, 107, pp. 2899-2908.
- Schein, C. H. & Noteborn, M. H. M. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology*, 6, pp. 291-294.
- Schiweck, H. (1983) Isomalt (und Isomaltulose). Ullmanns Enzyklopädie der Technischen Chemie, pp. 780-781. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Schiweck, H. (1979) Palatinit[®] - technological properties. *Health and Sugar Substitutes.Proc.ERGOB Conf., Geneva 1978, (Karger, Basel 1978).*, pp. 138-144.
- Schiweck, H. (1980) Palatinit[®] - Herstellung, technologische Eigenschaften und Analytik palatinithaltiger Lebensmittel. *Alimenta*, 19, pp. 5-16.
- Schiweck, H.; Munir, M.; Rapp, K. M.; Schneider, B. & Vogel, M. (1990) New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. *Zuckerindustrie*, 115, pp. 555-565.
- Schiweck, H.; Munir, M.; Rapp, K. M.; Schneider, B. & Vogel, M. (1991) New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. In F. W. Lichtenthaler (Ed.), *Carbohydrates as Organic Raw Materials*, pp. 57-94. VCH, Weinheim, New, York.
- Schiweck, H.; Steinle, G. & Haberl, L. (1973) Verfahren zur Herstellung von α -D-Glucopyranosido-[1,6]sorbit (Isomaltit). Südzucker AG. [DE 2 217 628 B]. DE.
- Schlieker, M. & Vorlop, K.-D. (2006) A novel immobilization method for entrapment LentiKats[®]. *Methods in biotechnology*, pp. 333-343. Humana Press.
- Schmidt, F. R. (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, pp. 363-372.
- Schubert, M. & Vorlop, K.-D. (2004) Vertraulicher Projektbericht BMELV:FAL-TEC, Projekt-Nr. 1128; 2002-2004.
- Seo, J. H. & Bailey, J. E. (1985) Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, pp. 1668-1674.

- Seo, J. H. & Bailey, J. E. (1986) Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli* - Existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, pp. 1590-1594.
- Shiloach, J. & Fass, R. (2005) Growing *E. coli* to high cell density -a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23, pp. 345-357.
- Shimizu, J.; Suzuki, K. & Nakajima, Y. (1982a) Method of producing an immobilized α -glucosyl transferase useful in the production of palatinose from sucrose. Mitsui Sugar Co. [GB 2 082 591 A]. JP.
- Shimizu, J.; Yokohama, K.; Suzuki, K.; Ayase, K.; Nakajima, Y. & Yamato, K. (1982b) Verfahren zur Herstellung von Palatinose durch unbeweglich gemachte α -Glukosyltransferase. Mitsui Sugar Co. [DE 31 33 123 A1]. JP.
- Shin, C. S.; Hong, M. S.; Bae, C. S. & Lee, J. (1997) Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress*, 13, pp. 249-257.
- Shin, C. S.; Hong, M. S.; Kim, D. Y.; Shin, H. C. & Lee, J. (1998) Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, pp. 364-370.
- Siddiqui, I. R. & Furgala, B. (1967) Isolation and characterization of oligosaccharides from honey. Part I. Disaccharides. *Journal of Agricultural Research*, 6, pp. 139-145.
- Sievers, M.; Schäfer, S.; Jahnz, U.; Schlieker, M. & Vorlop, K.-D. (2002) Significant reduction of energy consumption for sewage treatment by using LentiKat[®] encapsulated nitrifying bacteria. *Landbauforschung Völkenrode*, SH 241, pp. 81-86.
- Sorensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115, pp. 113-128.
- Staudinger, H.; Frey, K. & Starck, B. C. (1927) Hochmolekulare Verbindungen, 9.Mitteilung: Über Poly-vinylacetat und Poly-vinylalkohol. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, pp. 1782-1792.
- Stodola, F. H.; Koepsell, H. J. & Sharpe, E. S. (1952) A new disaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of the American Chemical Society*, 74, pp. 3202-3203.
- Sträter, P. J. (1987) Palatinose[®]. *Zuckerindustrie*, 112, pp. 900-902.

- Sun, Z. Y.; Ramsay, J. A.; Guay, M. & Ramsay, B. A. (2006) Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, pp. 423-431.
- Suzuki, T.; Yamane, T. & Shimizu, S. (1990) Phenomenological background and some preliminary trials of automated substrate supply in pH-Stat modal fed-batch culture using a setpoint of high limit. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69, pp. 292-297.
- Takazoe, I. (1989) Palatinose - an isomeric alternative to sucrose. In T. H. Grenby (Ed.), *Progress in Sweeteners*, pp. 143-167. Elsevier, London.
- Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, pp. 211-222.
- Tomazetto, G.; Mulinari, F.; Staniscuaski, F.; Settembrini, B.; Carlini, C. R. & Ayub, M. A. Z. (2007) Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, pp. 821-827.
- Trombotto, S.; Bouchu, A.; Descotes, G. & Queneau, Y. (2000) Hydrogen peroxide oxidation of palatinose and trehalulose: direct preparation of carboxymethyl alpha-D-glucopyranoside. *Tetrahedron Letters*, 41, pp. 8273-8277.
- Tsuji, Y.; Yamada, K.; Hosoya, N. & Moriuchi, S. (1986) Digestion and absorption of sugars and sugar substitutes in rat small intestine. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 32, pp. 93-100.
- Tsuyuki, K.; Sugitani, T.; Miyata, Y.; Ebashi, T. & Nakajima, Y. (1992) Isolation and characterization of isomaltulose- and trehalulose-producing bacteria from thailand soil. *Journal of General and Applied Microbiology*, 38, pp. 483-490.
- Unutmaz, C.; Cail, R. G. & Haggett, K. D. (1997) Increased alpha-lytic protease production from recombinant *Escherichia coli* grown with oxygen limitation. *Biotechnology Letters*, 19, pp. 731-734.
- Velut, S.; de Mare, L. & Hagander, P. (2007) Bioreactor control using a probing feeding strategy and mid-ranging control. *Control Engineering Practice*, 15, pp. 135-147.
- Veronese, T. & Perlot, P. (1999) Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, pp. 263-269.
- Vidal, L.; Ferrer, P.; Alvaro, G.; Benaiges, M. D. & Caminal, G. (2005) Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase production by *Escherichia coli* using the T5 promoter. *Journal of Biotechnology*, 118, pp. 75-87.

Viitanen, M. I.; Vasala, A.; Neubauer, P. & Alatossava, T. (2003) Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2, pp. 2.

Vorlop, K.-D. (1984) Entwicklung und Verfahren zur Polymerfixierung von Mikroorganismen und Anwendung der Biokatalysatoren zur Spaltung von Penicillin G und Synthese von L-Tryptophan. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Vorlop, K.-D. & Breford, J. (1996) Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von Teilchen aus einem flüssigen Medium. Vorlop, K.-D. and Breford, J. [DE 44 24 998 A1]. DE.

Vorlop, K.-D. & Jekel, M. (2000) Verfahren zur Herstellung eines Gels aus Polyvinylalkohol und nach dem Verfahren hergestelltes mechanisch hoch stabiles Gel. Vorlop, K.-D. [DE 198 27 552 C1]. DE.

Vorlop, K.-D. & Klein, J. (1987) Entrapment of microbial cells in chitosan. *Methods in Enzymology*, 135, pp. 259-268.

Vorlop, K.-D.; Muscat, A. & Beyersdorf, J. (1992a) Entrapment of microbial cells within polyurethane hydrogel beads with the advantage of low toxicity. *Biotechnology Techniques*, 6, pp. 483-488.

Vorlop, K.-D. & Remmers, P. (1992b) Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren. Vorlop, K.-D. [EP 0 478 097 A1]. DE.

Vorlop, K.-D. & Remmers, P. (1991) Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren. Vorlop, K.-D. [DE 40 27 218 C1]. DE.

Walsh, G. (2006) Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotechnology*, 24, pp. 769-776.

Walt, D. R. & Agayn, V. I. (1994) The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in Analytical Chemistry*, 13, pp. 425-430.

Watase, M.; Nishinari, K. & Nambu, M. (1983) Anomalous increase of the elastic modulus of frozen poly (vinyl alcohol) gels. *Cryo-Letters*, 4, pp. 197-200.

Weidenhagen, R. (1961) Biochemische Umsetzung der Saccharose. *Zucker*, pp. 456-462.

Weidenhagen, R. & Lorenz, S. (1957a) Ein neues bakterielles Umwandlungsprodukt der Saccharose. *Angewandte Chemie*, 69, pp. 641.

Weidenhagen, R. & Lorenz, S. (1957b) Verfahren zur Herstellung von Palatinose (6- α -Glucosido-fructofuranose). Südzucker AG. [DE 1 049 800 A]. DE.

- Welter, K.; Willke, T. & Vorlop, K.-D. (1999) Production of itaconic acid by LentiKats®. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe
- Whiffin, V. S.; Cooney, M. J. & Cord-Ruwisch, R. (2004) Online detection of feed demand in high cell density cultures of *Escherichia coli* by measurement of changes in dissolved oxygen transients in complex media. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, pp. 422-433.
- Wilson, L.; Illanes, A.; Abian, R. & Guisan, J. M. (2002) Encapsulation of very soft cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in very rigid LentiKats®. *Landbauforsch Völkenrode*, SH 241, pp. 121-125.
- Wilson, L.; Illanes, A.; Pessela, B. C. C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R. & Guisan, J. M. (2004) Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in LentiKats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, pp. 558-562.
- Windisch, S. (1958) Über einen Farbstoffbildner von Zuckerrüben, *Protaminobacter rubrum* (den Dooren de Jong). *Zuckerindustrie*, pp. 446.
- Wittlich, P.; Capan, E.; Schlieker, M.; Vorlop, K.-D. & Jahnz, U. (2004) Entrapment in LentiKats®. In V. Nedovic & R. Willaert (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, pp. 53-63. Kluwer Academic Publishers.
- Wittlich, P.; Schlieker, M.; Lutz, J.; Reimann, C.; Willke, T. & Vorlop, K.-D. (1999) Bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol by LentiKats®. 6th symposium on renewable resources and 4th European symposium on industrial crops and products: 23-25 March 1999, Bonn, pp. 524-532. Landwirtschaftsverlag.
- Wong, H. H.; Kim, Y. C.; Lee, S. Y. & Chang, H. N. (1998) Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 60, pp. 271-276.
- Wu, L. & Birch, R. G. (2007) Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnology Journal*, 5, pp. 109-117.
- Wu, L. & Birch, R. G. (2005) Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, pp. 1581-1590.
- Wu, L. & Birch, R. G. (2004) Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 97, pp. 93-103.
- Yee, L. & Blanch, H. W. (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio/Technology (N.Y.)*, 10, pp. 1550-1556.

Yee, L. & Blanch, H. W. (1993b) Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, pp. 221-230.

Yee, L. & Blanch, H. W. (1993a) Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, pp. 781-790.

Yin, J. C.; Li, G. X.; Ren, X. F. & Herrler, G. (2007) Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127, pp. 335-347.

Yoon, S. K.; Kang, W. K. & Park, T. H. (1994a) Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing *trp* promoter with controlled specific growth rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, pp. 995-999.

Yoon, S. K.; Kwon, S. H.; Park, M. G.; Kang, W. K. & Park, T. H. (1994b) Optimization of recombinant *Escherichia coli* fed-batch fermentation for bovine somatotropin. *Biotechnology Letters*, 16, pp. 1119-1124.

Zabriskie, D. W. & Arcuri, E. J. (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, pp. 706-717.

Zabriskie, D. W.; Wareheim, D. A. & Polansky, M. J. (1987) Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology*, 2, pp. 87-95.

Zhang, D.; Li, N.; Lok, S. M.; Zhang, L. H. & Swaminathan, K. (2003a) Isomaltulose synthase (Pall) of *Klebsiella* sp. LX3 - Crystal structure and implication of mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp. 35428-35434.

Zhang, D.; Li, N. & Zhang, L. H. (2003b) A motif rich in charged residues determines product specificity in isomaltulose synthase. *Febs Letters*, pp. 151-155.

Zhang, D.; Li, X. Z. & Zhang, L. H. (2002) Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: Gene cloning and characterization and engineering of thermostability. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp. 2676-2682.

