

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1	Isomaltulose (Palatinose <sup>TM</sup> ) .....	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 <sup>TM</sup> .....	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
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>33</b>
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 <sub>600</sub> ).....	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
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>61</b>
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 <sup>TM</sup> -Melasse .....	107
4.5.2.3	Enzymimmobilisierung in LentiKats <sup>®</sup> .....	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
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>119</b>
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
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Chemische Struktur der Isomaltulose (Palatinose <sup>TM</sup> ).....	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 <sup>®</sup> .....	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 <sup>®</sup> .....	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 <sub>600</sub> -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