

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](http://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 Palatinit<sup>TM</sup> 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 Enzyymbildung 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<sup>®</sup> immobilisiert. In den LentiKats<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>, die aus einem Liter Enzymlösung mit 1,6 g Pall-Enzym hergestellt werden, können ca. 33 kg Isomaltulose produziert werden.

# 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

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 <sup>®</sup> immobilisierten PalI-Enzyms .....	109
Abbildung 4.31: Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme bei Einsatz von freiem, quervernetztem und in LentiKats <sup>®</sup> immobilisiertem PalI-Enzym .....	111
Abbildung 4.32: Kinetik der Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme beim wiederholten Einsatz der LentiKats <sup>®</sup> .....	113
Abbildung 4.33: Enzymaktivitäten und maximale Palatinose-Ausbeuten sowie dazugehörige Zeitpunkte der einzelnen LentiKat <sup>®</sup> -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 <sub>600</sub> -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 <sub>2</sub> -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 <sup>®</sup> immobilisierten Enzyms .....	109
Tabelle 4.30:	Palatinose-Bildung und Saccharose-Abnahme bei Einsatz von freiem, quervernetztem und in LentiKats <sup>®</sup> immobilisiertem Pall-Enzym .....	110
Tabelle 4.31:	Maximale Palatinose-Ausbeuten und dazugehörige Zeitpunkte.....	111
Tabelle 4.32:	Enzymaktivitäten der sechs LentiKat <sup>®</sup> -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 <sub>2</sub> -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 <sup>®</sup> .....	122



# Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Einheit	Bezeichnung
BTM	[g/L]	Biotrockenmasse
$c$	[g/L]	Konzentration
$c_{Pal}$	[g/L]	Palatinose-Konzentration
EU	[ $\mu$ 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
$\mu$	[h <sup>-1</sup> ]	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
$\mu_{max}$	[h <sup>-1</sup> ]	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
$v/v_m$	[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> )

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
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- $\beta$ -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 <sub>max</sub>	maximale Palatinose-Ausbeute
PEG	Polyethylenglykol
pO <sub>2</sub>	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