

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

## **D-Mannitsynthese mit rekombinanten Milchsäurebakterien**

Dipl. Biol. Univ. Michael Finke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 05.07.2010 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 13.09.2010  
angenommen.







## Vorwort

Während der vergangenen drei Jahre entstand sowohl am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik als auch am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München die vorgelegte Arbeit und die darin präsentierten Ergebnisse. Ich hatte die einmalige Gelegenheit zwei Lehrstühle während meiner Promotion kennen zu lernen und konnte sowohl von ihrem Know-How als auch der Qualität profitieren. Obwohl sich beide Lehrstühle in ihrer Fachrichtung und ihrer Art unterscheiden, fühlte ich mich stets bei beiden gut aufgehoben und motiviert. Ich konnte in verschiedenste Arbeitsweisen und Methoden Einblick erhalten. Ich werde beide Lehrstühle in sehr positiver Erinnerung behalten.

Eine Dissertation ist im direkten Sinne zwar immer das Werk eines Einzelnen, jedoch tragen viele Personen zu ihrem guten Gelingen etwas bei. Im Folgenden möchte ich mich bei ihnen bedanken:

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing Dirk Weuster-Botz für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl promovieren zu dürfen. Ich hatte bereits in vorangegangenen Studienarbeiten seinen Lehrstuhl aufgrund des Arbeitsklimas und der kompetenten Betreuung schätzen gelernt. Der Lehrstuhl ist ein Aushängeschild für die Bioverfahrenstechnik.

Bei meinem Co-Referenten und zweiten Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel für die Möglichkeit, auch an seinem Lehrstuhl promovieren zu dürfen und für das jederzeit offene Ohr, sowie die hilfreichen und anregenden Diskussionen. Ich fühlte mich am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie sofort integriert und zu hundert Prozent unterstützt.

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling für die Übernahme des Vorsitzes in der Prüfungskommission.

Bei meinen weiteren Betreuern am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie appl. Prof. Dr. rer. nat. Mathias Ehrmann und Dr. rer. nat. Daniel Meissner.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die finanzielle Unterstützung des Projektes im Stipendenschwerpunkt „Nachhaltige Bioprozesse“. Im Einzelnen möchte ich mich bei Fr. Dr. Hedda Schlegel-Starmann seitens der DBU für die Unterstützung während der letzten drei Jahre bedanken. Die DBU werde ich in sehr guter Erinnerung behalten da sie mir die Möglichkeit gegeben hat viele neue „Weggefährten“ kennen zu lernen, ebenso durch die Ermöglichung von vielfältigen Weiterbildungen und Seminaren.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Andreas Liese, Institut für Technische Biokatalyse der Technischen Universität Hamburg-Harburg und Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der RWTH Aachen, für die zusätzliche Betreuung seitens der DBU.

Bei allen Kollegen des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik – Irma Einsle, Norbert Werth, Georg Kojro, Markus Amann, Dariusch Hekmat, Hannes Link, Andrea Vester, Kathrin Hölsch, Martin Demler, Michael Hofinger, Ralf Horsch, Peter Riedlberger, Michael Weiner, Nils Janzen, Eva-Maria Gross, Michael Braun, Michael Schmidt, Torben Höfel, Danielle Dennewald, Clara Delhomme, Christoph Bendig, Stefanie Brüning, Bernd Anselment, Dirk Hebel, Benjamin Smejkal, Gabi Gebhardt und Tanja Kurzrock.

Bei allen Kollegen des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie – Angela Seppour, Monika Hadek, Eva Bengler, Jana Kolew, Ludwig Niessen, Georg Lutterschmidt, Simone Freiding, Patrick Preissler, Matthias Stübner, Kai Linke, Jürgen Behr, Florian Waldherr, André Jänsch, Holger Teichert, Angela Lindenstrauß, Marina Lamparter und Amelie Gutsche.

Bei den Firmen Nordzucker und Südzucker für die freundliche Überlassung der Melasseproben.

Bei Dominik für die vielen Gespräche und die wertvollen Tipps.

Bei meinen Studenten Sebastian Haas und Jörn Holger Schmidt für die tatkräftige Unterstützung während einer sehr spannenden Zeit.

Bei Michael und Dominik für das aufmerksame Korrekturlesen der Dissertation.

Bei all den Freunden und Verwandten, vor allem meinem Bruder, die mir immer zur Seite standen.

Bei meinen Eltern für eine mutige Entscheidung.

Bei Marianne für Alles und das Wichtigste.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1</b>	<b><i>D-Mannit.....</i></b>	<b>6</b>
3.1.1	Natürliches Vorkommen von D-Mannit.....	6
3.1.2	Eigenschaften von D-Mannit .....	7
3.1.3	Anwendungsmöglichkeiten von D-Mannit .....	9
3.1.4	D-Mannit-Markt .....	10
<b>3.2</b>	<b><i>Synthesewege zur Herstellung von D-Mannit.....</i></b>	<b>10</b>
3.2.1	Katalytische Hydrierung .....	11
3.2.2	Enzymatische Hydrierung und D-Mannitdehydrogenase .....	14
<b>3.3</b>	<b><i>D-Mannitbildung mit Mikroorganismen.....</i></b>	<b>17</b>
3.3.1	D-Mannitsynthese mit Pilzen.....	17
3.3.2	D-Mannitsynthese mit Hefen .....	18
3.3.3	D-Mannitsynthese mit Bakterien .....	19
<b>3.4</b>	<b><i>Milchsäurebakterien.....</i></b>	<b>23</b>

---

3.4.1	Milchsäurebakterien – eine kurze Charakterisierung .....	24
3.4.2	Verwendung von Milchsäurebakterien .....	25
3.4.3	Wachstum von Milchsäurebakterien .....	25
3.4.4	Homofermentativer Zuckerstoffwechsel .....	30
3.4.5	Heterofermentativer Zuckerstoffwechsel .....	33
3.4.6	Zuckertransport in Milchsäurebakterien .....	35
3.4.7	Saccharosetransport und Verwertung bei Milchsäurebakterien .....	38
3.4.8	Verwendung von Fructose als Elektronenakzeptor .....	39
<b>3.5</b>	<b><i>Lactobacillus frumenti</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6</b>	<b><i>β-Fructofuranosidase (BfrA)</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>3.7</b>	<b><i>Isolierung von D-Mannit aus Fermentationslösungen</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8</b>	<b><i>Aufarbeitung und Reinigung von Melassehaltigen Medien</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Material</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b><i>Molekularbiologische Methoden</i> .....</b>	<b>45</b>
4.2.1	Isolierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA .....	45
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	46
4.2.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	46
4.2.4	Verwendung von Agarose-Gelelektrophorese .....	46
4.2.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	47
4.2.6	Modifizierung von DNA mit alkalischer Phosphatase .....	47
4.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	47
4.2.8	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> und <i>L. frumenti</i> .....	47
4.2.9	Hitzeschock-Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	48
4.2.10	Elektroporation von <i>Lactobacillus frumenti</i> .....	49

---

4.2.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	49
4.2.12	Coomassie-Färbung.....	49
4.2.13	Kolonie-Polymerasekettenreaktion.....	50
<b>4.3</b>	<b><i>Mikrobiologische Methoden</i></b> .....	<b>50</b>
4.3.1	pH-Messung.....	50
4.3.2	Bestimmung der optischen Dichte.....	50
4.3.3	Bestimmung der spezifischen Biotrockenmasse .....	51
4.3.4	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels Bradford-Assay.....	51
4.3.5	Zellaufschluss .....	52
4.3.6	Ermittlung der Saccharose-spaltenden Aktivität.....	53
<b>4.4</b>	<b><i>Kultivierung von <i>Lactobacillus frumenti</i></i></b> .....	<b>53</b>
4.4.1	Stamm und Stammhaltung.....	53
4.4.2	Kultivierung von <i>L. frumenti</i> auf Agarplatten .....	54
4.4.3	Kultivierung in 50 – 250 mL Kulturflaschen .....	54
4.4.4	Kultivierung im 2,0 L-Rührkesselreaktor .....	55
4.4.5	Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor .....	56
<b>4.5</b>	<b><i>Klonierung der <math>\beta</math>-Fructofuranosidase aus <i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 10140 56</i></b>	
4.5.1	Shuttle-Vektor pMG36e.....	56
4.5.2	Shuttle-Vektor pGKV259.....	58
4.5.3	Modifizierung des Genfragmentes der $\beta$ -Fructofuranosidase .....	59
4.5.4	Oligonukleotidsequenzen.....	61
4.5.5	Verifizierung von <i>Lactobacillus frumenti</i> mittels 16S-PCR .....	64
<b>4.6</b>	<b><i>Ganzzell-Biotransformation</i></b> .....	<b>64</b>
4.6.1	Herstellung des Biokatalysators für die Ganzzell-Biotransformation ...	64
4.6.2	Ganzzell-Biotransformation im 50 – 200 mL-Maßstab .....	65

---

4.6.3	Ganzzell-Biotransformation im Liter-Maßstab .....	65
<b>4.7</b>	<b>Zuckerrübenmelasse .....</b>	<b>66</b>
4.7.1	Gewinnung von Zuckerrübenmelasse .....	66
4.7.2	Zusammensetzung und Eigenschaften von Zuckerrübenmelasse .....	66
<b>4.8</b>	<b>Aufarbeitung von Fermentationslösungen zur Produktisolierung .....</b>	<b>67</b>
<b>4.9</b>	<b>Flüssigchromatographische Analytik von Edukten und Produkten .....</b>	<b>68</b>
<b>4.10</b>	<b>Enzymatische Analytik von Saccharose, D-Mannit und D-Glucose .....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1</b>	<b>Klonierung der <math>\beta</math>-Fructofuranosidase aus <i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 10140 .....</b>	<b>72</b>
5.1.1	Modifizierung und Amplifikation der $\beta$ -Fructosidase mittels PCR .....	72
5.1.2	Restriktionsverdau der Shuttle-Vektoren pGKV259 und pMG36e .....	73
5.1.3	pMGe:: <i>BfrA</i> .....	74
5.1.4	pGKV:: <i>BfrA</i> .....	75
5.1.5	Transformation von <i>Lactobacillus frumenti</i> mit pGKV:: <i>BfrA</i> .....	76
5.1.6	Kontroll-PCR mit vergleichender 16S-Sequenzierung .....	76
5.1.7	Diskussion .....	77
<b>5.2</b>	<b>Expressionsanalyse der <math>\beta</math>-Fructosidase .....</b>	<b>78</b>
5.2.1	Kontrolle der Genexpression mittels SDS-PAGE .....	79
5.2.2	Enzymatische Aktivität im Zellaufschluss .....	80
5.2.3	Enzymatische Saccharosespaltung während verschiedener Prozessphasen .....	82
5.2.4	Diskussion .....	87
<b>5.3</b>	<b>Wachstumsanalyse von <i>L. frumenti</i> in Saccharose- und Melassemedium .....</b>	<b>89</b>
5.3.1	Satzverfahren ohne pH-Kontrolle .....	89

---

5.3.2	Satzverfahren mit pH-Kontrolle .....	96
5.3.3	Diskussion.....	98
<b>5.4</b>	<b><i>D-Mannitbildung mit wachsenden Zellen</i></b> .....	<b>99</b>
5.4.1	D-Mannitbildung mit Melasse im Satzverfahren.....	99
5.4.2	D-Mannitbildung mit Melasse im Zulaufverfahren .....	103
5.4.3	Diskussion.....	106
<b>5.5</b>	<b><i>D-Mannitbildung mit ruhenden Zellen</i></b> .....	<b>108</b>
5.5.1	D-Mannitbildung mit Melasse im Satzverfahren.....	109
5.5.2	D-Mannitbildung mit Melasse im wiederholten Satzverfahren.....	118
5.5.3	D-Mannitbildung mit Melasse im Zulaufverfahren .....	123
5.5.4	Diskussion.....	126
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>148</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>152</b>
<b>9.1</b>	<b><i>Geräte, Chemikalien</i></b> .....	<b>152</b>
9.1.1	Geräte .....	152
9.1.2	Chemikalien .....	154
<b>9.2</b>	<b><i>Enzyme und (Puffer-) Lösungen</i></b> .....	<b>156</b>
9.2.1	Enzyme .....	156
9.2.2	Puffer .....	157
9.2.3	Lösungen .....	159
<b>9.3</b>	<b><i>Kultivierungsmedien und Medienbestandteile</i></b> .....	<b>160</b>
<b>9.4</b>	<b><i>Enzymkits</i></b> .....	<b>163</b>
<b>9.5</b>	<b><i>Sequenzen</i></b> .....	<b>164</b>

9.5.1	pMGe::BfrA .....	164
9.5.2	pGKV::BfrA.....	167
9.5.3	$\beta$ -Fructosidase (BfrA).....	172

## 1 Einleitung

Die Verwendung von Bakterien im Lebensmittelbereich hat bereits eine über tausende Jahre alte Tradition (Becker et al. 2007). Vor allem Milchsäurebakterien haben durch ihre Fähigkeit, Lebensmittel durch Ansäuerung haltbarer zu machen, ebenso wie durch Aromabildung einen hohen Stellenwert und eine universelle Verbreitung gefunden. Längst werden sie nicht mehr nur als Starterkulturen in Milchprodukten, Wurstwaren, bei der Sauerteigherstellung und vielen anderen Lebensmitteln eingesetzt. Das große Interesse an ihnen und dem einzigartigen Stoffwechsel, ebenso wie stetige methodische Verbesserungen rücken sie zunehmend in den Fokus der Gentechnik (Konings et al. 2000). Maßgeschneiderte Modellorganismen auf der Basis von Milchsäurebakterien halten Einzug in den Sektor der Lebensmitteltechnologie und –mikrobiologie (Berlec et al. 2009).

In unserer heutigen Gesellschaft werden an Lebensmittel immer höhere Ansprüche gestellt. Dies begründet sich nicht nur durch eine stetige Zunahme an Produkten, sondern auch durch eine veränderte Wahrnehmung. Viele Lebensmittel haben heute nicht mehr nur die Funktion „satt zu machen“, sie sollen auch zunehmend darüber hinaus eine bestimmte Lebensqualität vermitteln oder zum Wohlbefinden beitragen. Zu Beginn der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde in Japan der Begriff „Foshu“ (Food for specific health use) geprägt. Dieser Begriff bezeichnete den Beginn des „Functional Food“. In den Bereich des „Functional Food“ fallen unter anderem Probiotika oder aber auch Zuckeralkohole wie Sorbit oder D-Mannit (Grobben et al. 2001). Probiotische Lebensmittel, beispielsweise auf der Basis von Milchprodukten, enthalten Milchsäurebakterien welche wiederum die Darmflora positiv beeinflussen sollen.

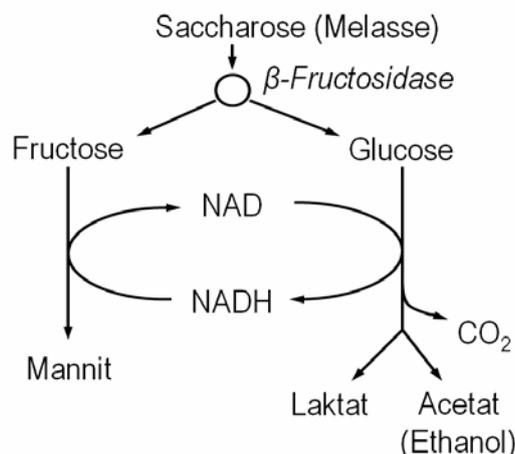
Zuckeralkohole sind Reduktionsprodukte von Kohlenhydraten und ubiquitär in der Natur vorhanden. Ihre Verbreitung umfasst sowohl die Pflanzen- als auch die Tierwelt. Prominenteste Vertreter sind unter anderem Sorbit und D-Mannit. Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften und der nahen Verwandtschaft zu den Zuckern erfahren sie vor allem im Bereich des „Functional Food“ einen wachsenden Zuspruch. Ein reduzierter Kaloriengehalt gegenüber Saccharose und eine Insulin-unabhängige Verstoffwechslung sind nur zwei Gründe warum sie in zunehmendem Maße in Lebensmitteln eingesetzt werden.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

D-Mannit, ein in der Natur vorkommender Zuckeralkohol, wird in zunehmendem Maße sowohl in der Lebensmittelindustrie als Zuckeraustauschstoff als auch in der Pharmaindustrie eingesetzt. Erste industrielle Synthesen von D-Mannit fanden bereits ab 1937 statt (Albert et al. 1980). Seitdem wurde der Syntheseprozess zwar verbessert, stößt aber dennoch aufgrund von prozesstechnischen Beschränkungen an seine Grenzen. Bei der katalytischen Hydrierung, dem Standardverfahren bis in die heutige Zeit, liegt die Ausbeute zwischen 20 und 30 % (Makkee et al. 1985). Limitierungen gibt es durch eine geringe Selektivität der Metallkatalysatoren, wie zum Beispiel Raney-Nickel. Des Weiteren ist der Prozess sehr energieaufwendig (hoher Druck, hohe Temperatur). Die momentane jährliche Produktionsmenge von D-Mannit liegt bei circa 50.000 t (Song und Vieille 2009). Schätzungen gehen davon aus, dass sich die Nachfrage für D-Mannit an den Trends für Massenkonsumgüter orientiert. Hier geht man von einer jährlichen Zunahme von 1 - 2 % aus (von Weymarn 2002 c; ZuChem, 2005).

Alternativ zur bisherigen „chemischen Hydrierung“ verwendet die amerikanische Firma zuChem, Inc. ([www.zuChem.com](http://www.zuChem.com)) den Stamm *Lactobacillus intermedius* (*fermentum*) zur mikrobiellen D-Mannitherstellung. Als Ausgangsmaterial wird „High-Fructose Corn Sirup“ (HFCS) verwendet. Der zugrunde liegende Prozess wurde 2004 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) genehmigt (FDA, 2004F-0066). Nähere Angaben zur Raum-Zeit-Ausbeute liegen nicht vor.

Im Vergleich zum hochreinen „High Fructose Corn Sirup“ ist Zuckerrübenmelasse ein weitaus günstigeres Ausgangssubstrat. Als Abfallsubstrat aus der Zuckerherstellung müsste Melasse sich gut für die D-Mannitsynthese eignen, da Melasse über einen Rest-Saccharoseanteil von etwa 50 % verfügt. Aufgrund seiner vielen Verunreinigungen kann Melasse allerdings nicht für die katalytische Hydrierung eingesetzt werden. Um Melasse für die Herstellung von D-Mannit aus Saccharose nutzen zu können sollen Milchsäurebakterien verwendet werden. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie natürlicherweise D-Mannit aus Fructose mit einer zellulären D-Mannitdehydrogenase bilden können. Insbesondere scheint hierzu die Gattung *Lactobacillus frumenti* geeignet zu sein, da sich die Zellen darüber hinaus durch eine hohe Osmo- und pH-Toleranz auszeichnen. Um eine Verbesserung der Spaltungsreaktion und damit auch eine gesteigerte Verfügbarkeit von Fructose zur D-Mannitsynthese zu gewährleisten, soll ein Enzym zur Saccharosespaltung in die Zellen kloniert werden, das sich vor allem durch eine hohe Spaltungsaktivität hinsichtlich Saccharose auszeichnet. Eine Substratlimitierung für die D-Mannitdehydrogenase wird somit ausgeschlossen. Besonders geeignet für die Klonierung scheint hierzu die  $\beta$ -Fructosidase (BfrA; EC 3.2.1.26) aus *Bifidobacterium lactis* (Ehrmann et al. 2003). Das Enzym spaltet das Disaccharid ausschließlich in die Monomere Glucose und Fructose. Fructose soll durch Reduktion in eine äquimolare Menge an D-Mannit reduziert werden, Glucose dient der Cofaktorregenerierung (siehe Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1** Prinzipskizze zur D-Mannitherstellung mit integrierter Cofaktorregenerierung (NADH) mit rekombinantem *Lactobacillus frumenti*.

Um *L. frumenti* mit der Expression einer  $\beta$ -Fructosidase zur industriellen Nutzung verfügbar machen zu können, sollen die StoffwechsellLeistungen des rekombinanten Stammes im Vergleich zum Wildtyp zur Melasseverwertung reaktionstechnisch untersucht und charakterisiert werden. Im Einzelnen sollen folgende Aufgaben bearbeitet werden:

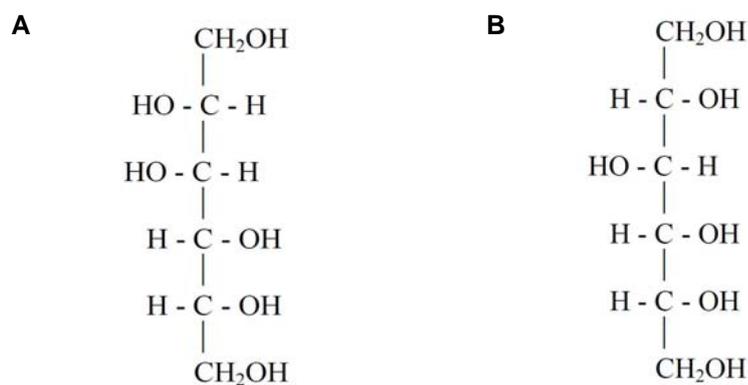
- Isolierung des Gens der  $\beta$ -Fructosidase aus *Bifidobacterium lactis* DSM 10140
- Klonierung des Gens in *Lactobacillus frumenti* (Wildtyp/ Isolat TMW 1.660 des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München)
- Evaluierung der enzymatischen Aktivität
- Reaktionstechnische Untersuchungen der D-Mannitsynthese von *Lactobacillus frumenti* (rekombinanter Stamm und Wildtyp) mit Melasse als Substrat

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 D-Mannit

#### 3.1.1 Natürliches Vorkommen von D-Mannit

D-Mannit (Mannite, Mannitol, Mannazucker) ist ein in der Natur weit verbreiteter Zuckeralkohol. Strukturell leitet er sich von der Mannose ab, man findet ihn ausschließlich in der D-Form. Ebenso weit verbreitet ist das Stereoisomer Sorbit (siehe Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1** Strukturformeln der Zuckeralkohole D-Mannit (A) und Sorbit (B)

D-Mannit kommt natürlicherweise in Pflanzen, Pilzen, Hefen und Bakterien vor. Namensgeber für den Zuckeralkohol war die Manna-Esche, *Fraxinus ornus*. Bereits

1806 wurde die Isolierung von D-Mannit daraus beschrieben (Albert et al. 1980). Weitere Pflanzen in denen D-Mannit eine wichtige Rolle spielt sind Algen (Ikawa et al. 1972, Iwamoto und Shiraiwa 2005, Karsten et al. 1997), Ölbaumgewächse (Peltier et al. 1997, Oddo et al. 2002, Conde et al. 2007), Kürbisse, Zwiebeln, Sellerie (Rumpho et al. 1983) und Flechten. Insgesamt wurden in Pflanzen bis zu 13 verschiedene Zuckeralkohole nachgewiesen, wobei D-Mannit bei vielen Pflanzen die wichtigste Rolle unter ihnen einnimmt (Loescher 1987, Loescher et al. 1992). Lewis et al. (1967) bietet eine umfassende Übersicht über die Verteilung und den Metabolismus von D-Mannit in höheren Pflanzen.

In Pflanzen erfüllt D-Mannit unter anderem wichtige protektive Funktionen gegen verschiedene umweltbedingte Stressfaktoren (Ruijter et al. 2003; Stoop und Mooibroek 1998, Tarczynski et al. 1993) wie zum Beispiel osmotischen Stress (Chaturvedi et al. 1996), verringerte Wasseraktivität (Kets et al. 1996) oder auch Schutz gegen oxidativen Schaden durch Hydroxylradikale (Shen et al. 1997 a, Shen et al. 1997 b). Darüber hinaus kann D-Mannit die Funktion eines Kohlenstoffspeichers erfüllen (Keller und Matile 1989).

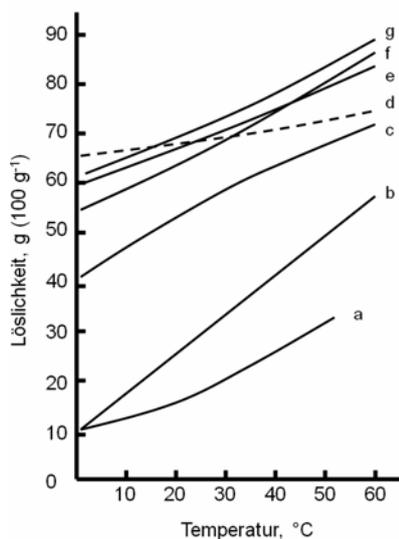
### **3.1.2 Eigenschaften von D-Mannit**

Vor allem die geringe Löslichkeit und die geringe Hygroskopizität machen D-Mannit zu einer begehrten Chemikalie in der Pharma- und Lebensmittelindustrie. Tabelle 3.1 gibt eine kurze Übersicht über die physikalischen und chemischen Eigenschaften von D-Mannit.

**Tabelle 3.1** Übersicht über die physikalischen und chemischen Eigenschaften von D-Mannit

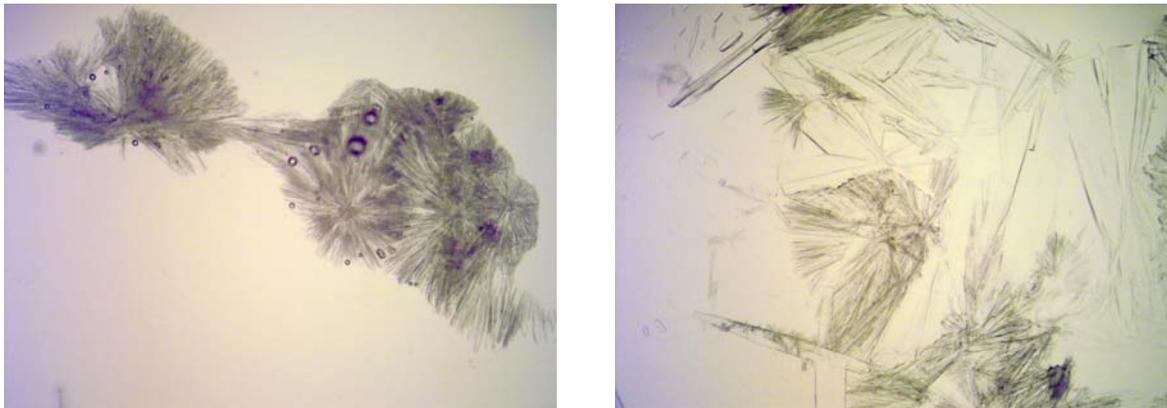
Molare Masse	182,17 g Mol <sup>-1</sup>
Aggregatzustand	Fest (1 bar, RT)
Dichte	1,52 g cm <sup>-3</sup>
Schmelzpunkt	166-168 °C
Siedepunkt	290-295 °C (4 hPa)
pK <sub>s</sub>	13,5
Löslichkeit (in Wasser)	216 g L <sup>-1</sup> (bei 25 °C)
Lösungsenthalpie	20 kJ Mol <sup>-1</sup>

Obwohl in seinen Eigenschaften nahezu identisch zu Sorbit, unterscheiden sich beide Stereoisomere vor allem durch ihr unterschiedliches Löslichkeitsverhalten voneinander (siehe Abbildung 3.2). Unter den bekannten Zuckeralkoholen weist D-Mannit die geringste Löslichkeit auf. In organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder Glycerin ist D-Mannit schwer löslich, in Ether praktisch unlöslich (Patra et al. 2009).



**Abbildung 3.2** Darstellung des Löslichkeitsverhalten von verschiedenen Zuckeralkoholen in Wasser: (a) D-Mannit; (b) Isomalt; (c) Lactit; (d) Saccharose; (e) Maltit; (f) Xylit; (g) Sorbit. (Nach Schiweck et al. 2002).

Wird in einer wässrigen Lösung die Löslichkeitsgrenze überschritten, kommt es zu einer spontanen Kristallisation (siehe Abbildung 3.3). Die Kristalle weisen hierbei keine homogene Struktur beziehungsweise Größenverteilung auf.



**Abbildung 3.3** D-Mannitkristalle aus einer wässrigen Lösung, aufgenommen bei einer 40-fachen Vergrößerung.

### 3.1.3 Anwendungsmöglichkeiten von D-Mannit

Neben dem Einsatz in der Lebensmittelindustrie und seiner Verwendung als Zuckeraustauschstoff (Zulassungsnummer E421) ist vor allem die Pharmazie primärer Abnehmer von D-Mannit. Aufgrund seiner geringen chemischen Aktivität und Hygroskopizität wird D-Mannit bei der Herstellung von Tabletten als Trägerstoff oder als Pulver zur Oberflächenbeschichtung von Kaugummis eingesetzt (Schiweck et al. 2002). Darüber hinaus wird es als osmotisches Diuretikum verwendet. Stellvertretend sei hier die Anwendung bei Nierenfunktionsstörung (Sirivella et al. 2000) genannt. Die geringe Resorption im Darm kann bei übermäßigem Gebrauch abführend wirken.

In der Lebensmittelindustrie findet D-Mannit vor allem als Zuckeraustauschstoff Anwendung. Im Gegensatz zu kommerziellen Süßstoffen wie Aspartam und Thaumatin, deren Süßkraft circa das 200- beziehungsweise 3500-fache von Saccharose umfasst (von Rymon-Lipinski 2005) beträgt sie für D-Mannit lediglich die Hälfte derer von Saccharose.

Aufgrund der Insulin-unabhängigen Verstoffwechslung kommt es vor allem in Lebensmitteln für Diabetiker zum Einsatz. Ebenso ist der nicht-kariogene Charakter

von D-Mannit von großer Bedeutung (Hayes 2001, Livesey 2003, van Loveren 2004). Die hohe Lösungsenthalpie von D-Mannit bewirkt einen kühlenden Effekt, den man sich bei Kaugummis oder Kaubonbons zu Nutze macht. Bei getrockneten Starterkulturen wird D-Mannit eingesetzt, um ein erhöhtes Überleben der Zellen zu gewährleisten (Efiuvwevwere et al. 1999).

Dass D-Mannit trotz seiner ähnlichen Eigenschaften zu Sorbit einen höheren Verkaufspreis erzielt begründet sich durch das teurere Ausgangssubstrat Fructose (Albert et al. 1980).

### **3.1.4 D-Mannit-Markt**

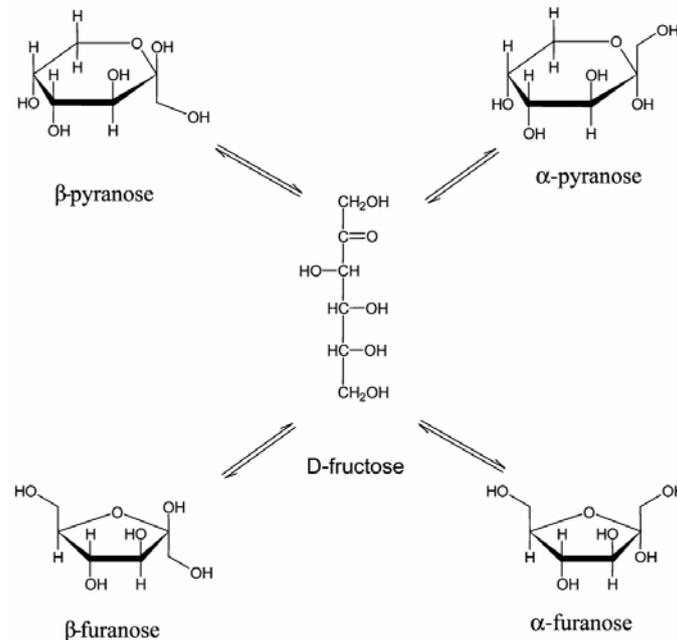
Die Marktanteile der Zuckeralkohole werden von Sorbit dominiert. Ausgehend von Glucose als Substrat ist Sorbit sowohl leichter als auch günstiger herzustellen. Lichtenthaler (2005) geht von einer Jahresproduktion von 900 000 Tonnen Sorbit aus. Das Marktvolumen für Zuckeralkohole allgemein wird weltweit auf circa 11 Mrd. US Dollar geschätzt, wobei der Verbrauchsanstieg bei etwa 15 % pro Jahr liegt (Patra et al. 2009). Im Gegensatz zur Sorbitsynthese wird bei der Herstellung von D-Mannit das teurere Substrat Fructose oder alternativ Saccharose verwendet. Die jährliche Produktionsmenge von D-Mannit wurde für das Jahr 1978 mit 6000 Tonnen beziffert (Albert et al. 1980). Für das Jahr 1992 mit 20.000 Tonnen (Schiweck et al. 2002) und für das Jahr 2000 mit 30.000 Tonnen (Kuusisto et al. 2005). Mittlerweile liegt die weltweite Jahresproduktion bei etwa 50.000 Tonnen (Song und Vieille 2009). Der Marktpreis für D-Mannit betrug nach Lichtenthaler (2005) circa 8 € kg<sup>-1</sup>.

## **3.2 *Synthesewege zur Herstellung von D-Mannit***

Aufgrund eines wachsenden Bedarfs und verbesserten Synthesemöglichkeiten rückt die D-Mannitgewinnung aus Pflanzen immer weiter in den Hintergrund, wenngleich die saure Extraktion aus marinen Algen in China immer noch verwendet wird (Schiweck et al. 2002). Das Mittel der Wahl ist seit mehreren Jahrzehnten die chemische beziehungsweise katalytische Hydrierung von Fructose.

### 3.2.1 Katalytische Hydrierung

Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts begannen die Arbeiten zur Herstellung von Zuckeralkoholen wie Sorbit und D-Mannit mittels katalytischer Hydrierung. Die ersten Versuche zur D-Mannitproduktion wurden sowohl mit reiner Fructose als auch mit Invertzucker nach saurer beziehungsweise thermischer Saccharosespaltung (siehe Abbildung 3.5) durchgeführt (Brandner und Wright 1967, Power 1942, Dewing et al. 1980, Kasehagen und Luskin 1956). Die Notwendigkeit und daraus resultierend die Verwendung von Metallkatalysatoren, wie zum Beispiel Raney Nickel (Pijnenburg et al. 1978), war früh bekannt. Weitergehende Entwicklungen der Katalysatoren basierten auf den Edelmetallen Ruthenium, Paladium, Platin oder waren Legierungen davon (Heinen et al. 2000). Invertzuckerlösungen (Glucose und Fructose im Verhältnis 1:1) führten im Verfahren allerdings nur zu 25 % (w/w) D-Mannit, wohingegen der Sorbitanteil 75 % betrug (Soetaert et al. 1999). Ursache hierfür ist eine unvollständige Spezifität des Metallkatalysators unter den gegebenen Reaktionsbedingungen, ebenso wie eine auftretende Mutarotation der Fructose (siehe Abbildung 3.4). Im Syntheseprozess wird der Glucoseanteil vollständig zu Sorbit reduziert, vom Fructoseanteil wird lediglich die  $\beta$ -Furanose zu D-Mannit umgewandelt (Makkee et al. 1980, Makkee et al. 1985, Toukoniitty et al. 2005).

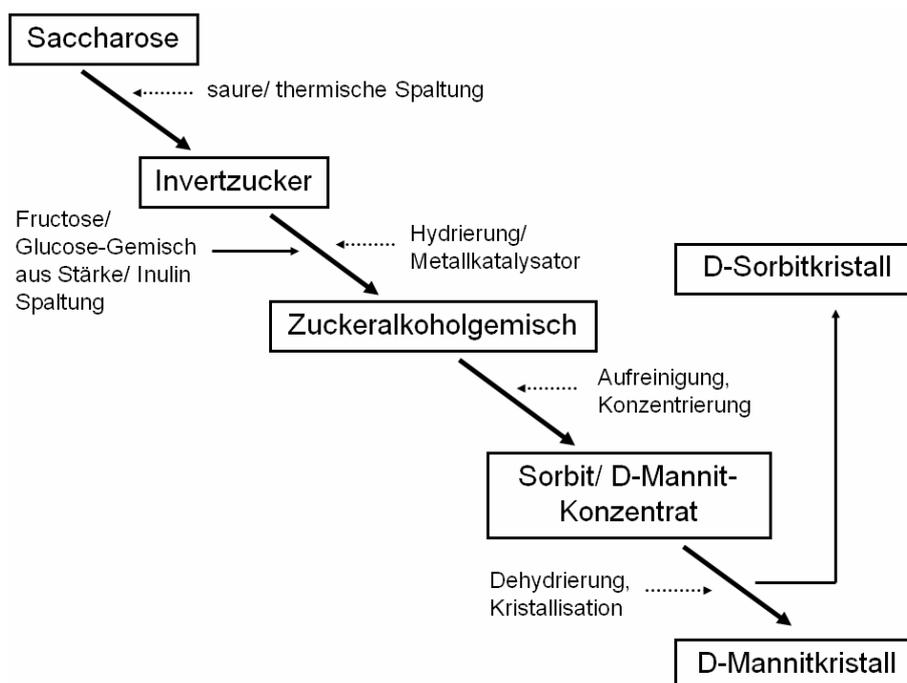


**Abbildung 3.4** Mutarotation von D-Fructose, wodurch bei der katalytischen Hydrierung nur ein Teil der Fructose zu D-Mannit reduziert wird.

Ausgehend von einer Saccharoselösung erfolgt im industriellen Prozess zunächst die saure Spaltung, beispielsweise mit Schwefelsäure. Anschließend wird die Invertzuckerlösung neutralisiert bevor unter hohem Druck ( $p > 100 \text{ bar}$ ) und hoher Temperatur ( $T > 150 \text{ °C}$ ) die Hydrierung zu D-Mannit stattfindet. Dabei können Raum-Zeit-Ausbeuten von über  $40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht werden (Brandner und Wright 1967, Power 1942). Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch die D-Mannitsynthese auf der Basis einer Saccharoselösung.

Ein weiterer Syntheseweg basiert auf einer Epimerisierungsreaktion von Glucose zu seinem Stereoisomer Mannose. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die katalytische Hydrierung der Mannose zu D-Mannit (Takemura et al. 1978, Deberardinis und Kruse 1981, Kruse 1977). Mohr et al. (2003) hingegen verwendete einen kontinuierlichen Prozess, wobei eine Fructoselösung durch einen Festbettreaktor geleitet wurde. Unter hohem Druck, hoher Temperatur und in Anwesenheit eines Kupfer-Katalysators erfolgte die Umsetzung zu D-Mannit. Es wurden 62,8 % D-Mannit und 35,4 % Sorbit gemessen. Ebenso wie reine Fructose wurde durch Devos et al. (1995) auch Fructosesirup zur D-Mannitbildung eingesetzt.

Wie auch in vorangegangenen Beschreibungen erfolgt bei diesem Prozess zunächst eine enzymatische Epimerisierung und abschließend eine Hydrierung der Zwischenprodukte. Heinen et al. (2001) verwendete einen Ruthenium-Katalysator zur D-Mannitbildung aus Inulin, einem Fructosepolymer mit endständigem Glucoserest. Da D-Mannit in den meisten Fällen den geringeren Produktanteil bildet, sind eine Aufkonzentrierung sowie eine Abtrennung von Sorbit notwendig. Rückstände der Metallkatalysatoren müssen aufwendig chromatographisch entfernt werden. Abgesehen von zusätzlichen Aufarbeitungsschritten treiben vor allem die hohen Energiekosten der Prozesse sowie die Notwendigkeit hochreiner Substrate die Kosten in die Höhe.



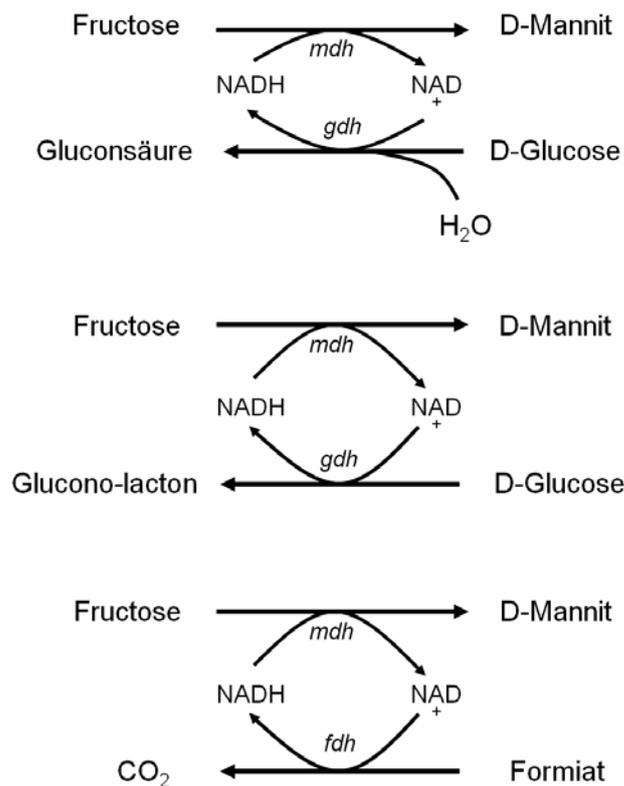
**Abbildung 3.5** D-Mannitproduktion basierend auf dem Substrat Saccharose. Der Prozess umfasst zwei Schritte, wobei zunächst die Saccharose im sauren Milieu gespalten wird. Anschließend erfolgt die Hydrierung der Spaltprodukte Fructose und Glucose. Die Produkte Sorbit und D-Mannit werden chromatographisch aufgereinigt und voneinander getrennt. (Nach Schiweck et al. 2002).

### 3.2.2 Enzymatische Hydrierung und D-Mannitdehydrogenase

Im Gegensatz zur katalytischen Hydrierung kann D-Mannit auch rein enzymatisch gebildet werden. Hierbei kommen sowohl NADH-abhängige (EC 1.1.1.67) als auch NADPH-abhängige (EC 1.1.1.138) D-Mannitdehydrogenasen zum Einsatz. D-Mannitdehydrogenasen gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen (EC 1.1.1.x) und katalysieren die Reduktion von Carbonylverbindungen. Die Cofaktoren NAD(P)H+H<sup>+</sup> werden stöchiometrisch verbraucht. Für die enzymatische Hydrierung durch D-Mannitdehydrogenasen wurden die Enzyme bereits aus verschiedensten Organismen isoliert und charakterisiert: *Lactobacillus brevis* (Martinez et al. 1963), *Lactobacillus sanfranciscensis* (Korakli und Vogel 2003), *Lactobacillus intermedius* (Saha 2004), *Pseudomonas fluorescens* (Slatner et al. 1999, Brunker et al. 1997), *Gluconobacter suboxydans* (Adachi et al. 1999), *Leuconostoc mesenteroides* (Yamanaka 1975, Aarnikunnas et al. 2002, Sakai und Yamanaka 1968, Yamanaka et al. 1977), *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 (Hahn et al. 2003), *Agaricus bisporus* (Horer et al. 2001, Ruffner et al. 1978, Stoop und Mooibroek 1998), *Aspergillus parasiticus* (Niehaus und Dilts 1982) und *Sclerotinia sclerotiorum* (Wang und Le Tourneau 1972). Die isolierten D-Mannitdehydrogenasen können sowohl als Monomere (Ruffner et al. 1978) aber auch als Polymere, häufig Tetramere, auftreten (Saha 2005). Die Enzyme haben keine Signalsequenz und liegen intrazellulär vor. Die Sättigungskonstante K<sub>S</sub> beträgt für das Substrat Fructose, folglich für die Reduktionsreaktion, häufig ein Vielfaches gegenüber der Oxidationsreaktion und dem Zuckeralkohol D-Mannit. Durch Komplexbildner wie EDTA wird die Aktivität des Enzyms in vielen Fällen negativ beeinflusst, wohingegen die Anwesenheit von Mangan- oder Magnesiumionen die Aktivität wiederherstellt oder gar verbessert (Hahn et al. 2003).

Um die D-Mannitbildung auf enzymatischer Basis kontinuierlich durchführen zu können wird ein Regenerationssystem für die Cofaktoren benötigt (Wichmann et al. 2000, Wichmann und Vasic-Racki 2005). Hierbei wurde bereits die Reduktionsreaktion mit der Oxidation von Formiat oder auch Glucose gekoppelt (Haltrich et al. 1996, Nidetzky et al. 1996). Generell sind enzymgekoppelte Regenerationsansätze in rekombinanten Mikroorganismen weit verbreitet (Endo und Koizumi 2001). Drei gekoppelte Ansätze zur D-Mannitbildung sind in Abbildung 3.6

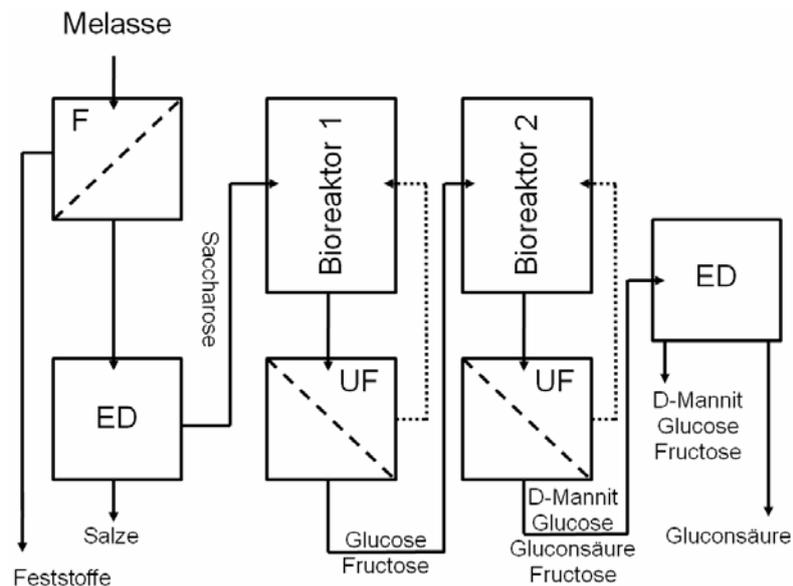
dargestellt, wobei neben der D-Mannitdehydrogenase (MDH) von *Pseudomonas fluorescens* sowohl eine Glucosedehydrogenase (GDH) von *Bacillus megaterium* als auch eine Formiatdehydrogenase (FDH) von *Candida boidinii* eingesetzt wurden (Haltrich et al. 1996, Slatner et al. 1998 b, Kulbe et al. 1987 a).



**Abbildung 3.6** Darstellung der Kopplung von enzymatischer D-Mannitbildung bei gleichzeitiger Regeneration des Cofaktors NADH. *Mdh*, D-Mannitdehydrogenase; *Gdh*, Glucosedehydrogenase; *Fdh*, Formiatdehydrogenase. (Nach Kulbe et al. 1987 a und Howaldt et al. 1986).

Der Vorteil der enzymatischen Hydrierung gegenüber der industriellen D-Mannitsynthese liegt in der Vermeidung von Nebenprodukten, wengleich aufgrund niedriger Raum-Zeit-Ausbeuten ( $2,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), beispielsweise in einem MDH/FDH-Ansatz (Slatner et al. 1998 a) die enzymatische Hydrierung keine industrielle Anwendung findet. Darüber hinaus können zu hohe Substrat- oder Produktkonzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit durch Enzyminhibierung beeinflussen

(Slatner et al. 1998 b). Eine Immobilisierung von Cofaktor-Derivaten führte sowohl zu erhöhten Sättigungskonstanten als auch zu verringerten Umsetzungsgeschwindigkeiten (Kulbe et al. 1987 b). Abbildung 3.7 zeigt den schematischen Versuchsaufbau einer Anlage zur Bildung von Gluconsäure und D-Mannit auf der Grundlage von Melasse. Für den Prozess wird zunächst der in der Melasse enthaltene Saccharoseanteil durch Invertaseaktivität gespalten. In einem zweiten enzymatischen Schritt erfolgen die Oxidations- beziehungsweise Reduktionsreaktion mithilfe einer Kopplung von GDH und MDH (Kulbe et al. 1987 b).



**Abbildung 3.7** Schematische Darstellung der enzymatischen Umsetzung von Saccharose zu D-Mannit mittels Inversion der Saccharoselösung (Bioreaktor 1) und anschließender Umsetzung von Fructose zu D-Mannit bei gleichzeitiger Reduktion des Cofaktors durch Glucose-Oxidation (Bioreaktor 2). F, Filtration; ED, Elektrodeialyse; UF, Ultrafiltration. (Nach Kulbe et al. 1987 b).

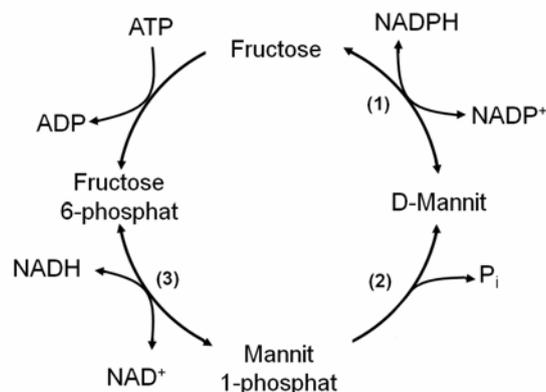
Aufgrund von niedrigen Raum-Zeit-Ausbeuten, Limitierungen durch Produkt- oder Substratkonzentrationen und prozesstechnischen Einschränkungen (verringerte Umsatzgeschwindigkeiten bei immobilisierten Cofaktor-Derivaten) haben sich rein enzymatische Hydrierungen industriell bisher nicht durchsetzen können.

### 3.3 D-Mannitbildung mit Mikroorganismen

Die D-Mannitherstellung mit Pro- oder Eukaryonten wird in heutiger Zeit vermehrt untersucht. Längst werden nicht nur Wildtyp-Zellen zur Herstellung dieses Zuckeralkohols vorgeschlagen. Vor allem sogenannte Plattformorganismen wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* oder auch *Bacillus megaterium* werden, obwohl sie natürlicherweise nicht in der Lage sind D-Mannit zu bilden, gezielt genetisch verändert.

#### 3.3.1 D-Mannitsynthese mit Pilzen

Die große Bedeutung von D-Mannit zur Cofaktor-Regeneration bei Pilzen zeigt sich in der weiten Verbreitung des D-Mannitzyklus. Nahezu alle Gattungen der „Fungi imperfecti“, wie zum Beispiel *Alternaria alternata*, *Aspergillus spec.* und *Penicillium spec.* besitzen die Enzyme D-Mannit 1-phosphatdehydrogenase, D-Mannit 1-phosphatase und D-Mannitdehydrogenase (Hult et al. 1980, siehe Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8** Darstellung des D-Mannitzyklus wie er vor allem bei den „Fungi imperfecti“ zur Cofaktorregenerierung eingesetzt wird. Die beteiligten Enzyme sind: (1) D-Mannitdehydrogenase, (2) D-Mannit 1-phosphatase, (3) D-Mannit 1-phosphatdehydrogenase. (Nach Hult et al. 1980).

Isoliert und charakterisiert wurde die NADPH-abhängige D-Mannitdehydrogenase unter anderem auch aus *Agaricus bisporus*, in dem der Zuckeralkohol sowohl für die Wachstumsregulation als auch für die Fruchtkörperentwicklung, die Osmoregulation

und die Salztoleranz eine essentielle Rolle spielt (Hörer et al. 2001, Dutsch und Rast 1969). Unabhängig von der weiten Verbreitung ist eine industrielle Nutzung bisher nicht anwendbar, da D-Mannit von Pilzen nur in geringen Konzentrationen gebildet wird (Domelsmith et al. 1988) und eine Kultivierung sehr anspruchsvoll ist.

*Cryptococcus neoformans* erreichte  $0,9 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit nach Wachstum auf Glucose (Niehaus und Flynn 1994), bei *Aspergillus candidus* NRRL 305 konnten im Zulaufverfahren mit wachsenden Zellen nach einer Kultivierungsdauer von bis zu drei Tagen eine Ausbeute von  $0,25 \text{ mol mol}^{-1}$  bezogen auf verbrauchte Glucose nachgewiesen werden (Smiley et al. 1967).

### 3.3.2 D-Mannitsynthese mit Hefen

Ebenso wie bei den Pilzen ist auch die D-Mannitsynthese bei Hefen weit verbreitet. Onishi et al. (1968) identifizierten aus einer großen Auswahl an Hefen vielversprechende Kandidaten für die D-Mannitsynthese: *Torulopsis versatilis*, *Torulopsis anomala* und das Isolat T-6 der Gattung *Torulopsis* bildeten vor allem bei Wachstum auf Glucose D-Mannit. Ausgehend von etwa  $100 \text{ g L}^{-1}$  Glucose bildete das Isolat T-6, später neu beschrieben als *Torulopsis mannitofaciens* (Onishi und Suzuki 1969), im Satzverfahren  $21 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit, was einer Ausbeute von  $0,3 \text{ mol mol}^{-1}$  entsprach (bezogen auf verbrauchtes Substrat). Auf der Basis von Glycerin bildete *Torulopsis versatilis*, als ruhende Zellen eingesetzt, nach 24 Stunden Kultivierung,  $0,41 \text{ mol mol}^{-1}$  D-Mannit ebenfalls im Satzverfahren. Mit zunehmender Kultivierungsdauer (nach 46 Stunden) war die Ausbeute allerdings rückläufig (Onishi und Suzuki 1970). Stankovic et al. (1989) hingegen beschrieben D-Mannitbildung mit *Rhodotorula minuta* nach Wachstum auf D-Ribose. Es entstand eine Produktmischung mit 16 % D-Mannit und 3 % Arabinitol. Mit der Verwendung von n-Alkanen (C12-C15) als Kohlenstoffquelle beschrieb Hattori et al. (1974) neue Wege zur D-Mannitsynthese. *Candida zeylanoides* produzierte nach einer Kultivierungsdauer von 100 Stunden  $63 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit, bei einer Selektivität von 52 %. Ebenfalls mit der Gattung *Candida* arbeiteten Song et al. (2002) und Baek et al. (2003). Song et al. (2002) identifizierten *Candida magnoliae* HH-01 als vielversprechenden D-Mannitproduzenten. Konnten mit dem Stamm in einem Satzverfahren nach 168 Stunden aus  $150 \text{ g L}^{-1}$  Fructose  $67 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit gebildet

werden (Selektivität von  $0,49 \text{ g g}^{-1}$ ), betrug die Produktkonzentration im Zulaufverfahren sogar  $209 \text{ g L}^{-1}$ . Der Versuch dauerte circa 200 Stunden und die Raum-Zeit-Ausbeute wurde mit  $0,99 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  errechnet. Baek et al. (2003) hingegen zeigte die unterschiedliche Produktbildung in Abhängigkeit der Substrate Fructose, Glucose und Saccharose. Costenoble et al. (2003) verwendeten für ihre Versuche eine Doppelmutante der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*. Durch eine Deletion der Gene für die Glycerin 3-phosphatdehydrogenase (Gpd1p und Gpd2p) war der Stamm nicht mehr in der Lage, bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen die entstandenen Cofaktoren zu oxidieren. Eine Regeneration von NADH bei gleichzeitiger Glycerinbildung war somit nicht möglich. Die Nutzung von  $\text{NAD}^+$  sollte mit der Klonierung einer D-Mannit 1-phosphatdehydrogenase (*mtlD*) von *Escherichia coli* ausgenutzt werden. Costenoble et al. (2003) konnten zwar durch die *mtlD*-Expression D-Mannitbildung bei Wachstum unter anaeroben Bedingungen nachweisen, das Produkt akkumulierte allerdings intrazellulär.  $3,3 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit (korrigiert um die Volumenzunahme der Zellen) konnten nachgewiesen werden. Nur geringe Mengen von D-Mannit wurden ins Medium sekretiert. Vor allem der zuletzt genannte Aspekt stellt ein wesentliches Hindernis in der Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* dar. Generell ist die geringe Produktivität der Hefezellen für eine industrielle D-Mannitsynthese von Nachteil.

### 3.3.3 D-Mannitsynthese mit Bakterien

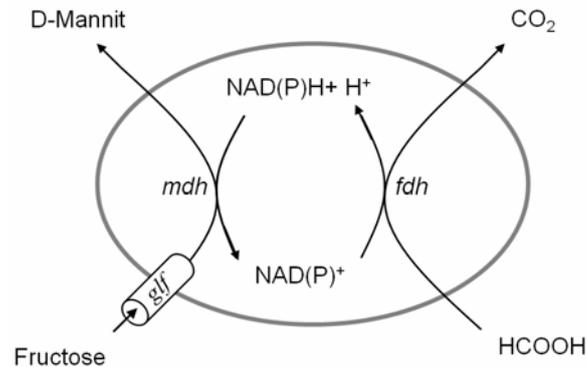
Die D-Mannitsynthese mit Bakterien ist ein vielversprechender Ansatz und könnte eine Alternative zur katalytischen Hydrierung darstellen. Im Folgenden werden einzelne Ansätze zur bakteriellen D-Mannitsynthese dargestellt.

Aufgrund ihrer genetischen Ausstattung stehen vor allem Milchsäurebakterien im Fokus der bakteriellen D-Mannitsynthese. Innerhalb der genannten Gruppe sind allerdings diejenigen Arten von größerem Interesse, die den heterofermentativen Stoffwechselweg verwenden, da abgesehen von Pyruvat auch Fructose als Elektronenakzeptor verwendet wird. Yun et al. (1996) verwendeten für ihre Versuche *Lactobacillus spec. KY-107* und konnten auf der Basis von Fructose im Satzverfahren mit wachsenden Zellen nach 75 Stunden  $71 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit nachweisen. Die Raum-Zeit-Ausbeute betrug  $0,95 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bei einer Ausbeute von

0,7 mol mol<sup>-1</sup>. Saha (2006 a) und Racine et al. (2007) konnten in vielversprechenden Ansätzen *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 zur D-Mannitbildung einsetzen. 200 g L<sup>-1</sup> und eine Raum-Zeit-Ausbeute von etwa 3 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> erreichten sie im Satzverfahren. Als Kohlenstoffquelle dienten Fructose und das Heteropolymer Inulin. Die Ausbeute erreichte den theoretischen Maximalwert von 0,67 mol mol<sup>-1</sup>. Durch Variation der Prozessführung (Zulaufverfahren beziehungsweise kontinuierliche Fermentation mit Zellrückhaltung) konnten sogar 5,9 beziehungsweise 28,4 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Racine und Saha 2007) gemessen werden. Bei den Versuchen zeigte sich ebenfalls, dass eine Verwendung von Maisquellwasser als kostengünstige Kohlenstoffquelle möglich ist. Von Weymarn et al. (2002 a) identifizierte sowohl *Lactobacillus fermentum* NRRL B-1932 als auch *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135 (von Weymarn et al. 2002 b, von Weymarn et al. 2003) als vielversprechende D-Mannitbildner. In einem Satzverfahren mit einer Fructose: Glucose Mischung (Verhältnis 2:1) produzierten die Zellen im Litermaßstab 83 g L<sup>-1</sup> D-Mannit mit einer durchschnittlichen volumetrischen Produktivität von 7,6 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Die Selektivität erreichte 0,9 mol mol<sup>-1</sup>. In einem wiederholten Satzverfahren konnte von Weymarn et al. (2002 b) ebenfalls die Stabilität von *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135 als Biokatalysator unter Beweis stellen. In 14 aufeinanderfolgenden Satzverfahren behielten die ruhenden Zellen eine nahezu gleich bleibende volumetrische Produktivität von bis zu 26,2 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Die maximal ermittelte D-Mannitkonzentration in einem einzelnen Versuch betrug 98 g L<sup>-1</sup>, die Ausbeute 0,96 mol mol<sup>-1</sup>. Die Maßstabsvergrößerung auf 100 L mit einem Satzverfahren wurde ebenfalls gezeigt, wobei allerdings die Produktkonzentration (87 g L<sup>-1</sup>) ebenso wie die Produktivität (18,8 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) und die Ausbeute (0,87 mol mol<sup>-1</sup>) nicht die Ergebnisse des wiederholten Satzverfahrens erreichten (von Weymarn et al. 2003). Fontes et al. (2009) beschrieb die D-Mannitbildung mit *Leuconostoc mesenteroides* B-512F mit Cashew-Saft als Kohlenstoffquelle im Satzverfahren mit wachsenden Zellen. In einem kombinierten Medium mit Melasse, Fructosesirup und Bactopepton erreichte *Lactobacillus fermentum* NRRL B-3693 in einem Satzversuch nach 40 Stunden 40,4 g L<sup>-1</sup> D-Mannit (Saha 2006 b), wobei die Zellen darüber hinaus 51,6 g L<sup>-1</sup> Lactat bildeten. Eine theoretisch 100 %-ige Umsetzung von Fructose zu D-Mannit wurde von Korakli et al. (2000) mit *Lactobacillus sanfranciscensis* präsentiert.

Die Verwendung von *Lactococcus lactis*, einem Vertreter des homofermentativen Zuckerabbaus, wurde durch eine Mutation ermöglicht. Aufgrund einer Deletion der Lactatdehydrogenase konnte *Lactococcus lactis* seine Redoxbilanz nicht durch die Lactatsynthese ausgleichen was schließlich zur D-Mannitsynthese führte. Eine weitere Deletion von *mtlF* beziehungsweise *mtlA*, beide beteiligt an der D-Mannitaufnahme mittels Phosphotransferase-System, verhinderten einen D-Mannitabbau bei Glucosemangel. Ruhende Zellen bildeten im Satzverfahren auf der Grundlage von D-Glucose somit circa  $2,4 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit (Gaspar et al. 2004). Eine Deletion der Lactatdehydrogenase und eine Überexpression von D-Mannit 1-phosphatdehydrogenase (*mtlD*) von *Lactobacillus plantarum* sowie D-Mannit 1-phosphatase von *Eimeria tenella* ermöglichte *Lactococcus lactis* die Bildung von  $9,1 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit (Wisselink et al. 2005). Durch die genetische Veränderung wurde eine Regeneration der Cofaktoren ermöglicht. Die Produktivität und die Ausbeute betragen  $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,50 \text{ mol mol}^{-1}$ .

Abgesehen von „natürlichen“ D-Mannitproduzenten wurden auch erhebliche Anstrengungen unternommen, um etablierte und vollständig charakterisierte Mikroorganismen wie *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium glutamicum* oder *Escherichia coli* für die D-Mannitbildung einzusetzen. Das zugrunde liegende Prinzip bei der Verwendung dieser Bakterien ist die Kopplung einer Oxidations- an eine Reduktionsreaktion. Darüber hinaus wurde in den Zellen durch Überexpression von Zuckeraufnahmesystemen eine verbesserte Substratversorgung gewährleistet (siehe Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9** Schematische Darstellung der Kopplung einer Oxidations- an eine Reduktionsreaktion (*mdh/fdh*-Kopplung) in *Corynebacterium glutamicum*. Bei der D-Mannitbildung oxidierte Cofaktoren werden gleichzeitig mit Hilfe von Ameisensäure wieder reduziert wobei  $\text{CO}_2$  freigesetzt wird. Für eine verbesserte Substratversorgung wird zusätzlich eine Permease (*glf*) exprimiert. (Nach Bäumchen et al. 2007 b).

Wie bereits in zellfreier Umgebung gezeigt wurde, ist die Verfügbarkeit von Cofaktoren für die D-Mannitsynthese von ebenso großer Bedeutung wie die Substrat- oder Endprodukthemmung. Viele Ansätze beruhen somit auf der Etablierung eines intrazellulären Redoxsystems. Für das in Abbildung 3.9 dargestellte Redoxsystem wurden die D-Mannitdehydrogenase von *Leuconostoc pseudomesenteroides*, ebenso wie die Formiatdehydrogenase von *Mycobacterium vaccae* N10 eingesetzt. Durch die Expression des *mdh/fdh*-Systems war *Bacillus megaterium* in der Lage,  $22 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit zu bilden. Im Zulaufverfahren mit ruhenden Zellen wurden  $0,24 \text{ mol D-Mannit pro Mol D-Fructose}$  umgesetzt (Bäumchen et al. 2007 a). Durch die zusätzliche Expression eines Transportproteins (*glf*, *Glucose Facilitator Protein*) von *Zymomonas mobilis* wurde bei *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 eine deutlich verbesserte Fructoseaufnahme erreicht, wodurch im Satzverfahren nach 24 Stunden  $87 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit, im wiederholten Zulaufverfahren nach 96 Stunden  $285 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit gebildet wurden. Trotz der verlängerten Versuchsdauer kam es lediglich zu einer geringen Abnahme der Produktivität von  $3,63$  auf  $2,97 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Bäumchen und Bringer-Meyer 2007 b). Weiterführende genomische Analysen führten zur Identifikation eines Transporters für myo-Inositol welcher allerdings ebenfalls für Fructosetransport eingesetzt werden kann (Bäumchen et al. 2009). Eine zusätzliche Expression des *glf*-Proteins, neben

dem mdh/fdh-Systems, führte bei *Escherichia coli* zu einer deutlichen Steigerung der D-Mannitkonzentration von 2,7 auf 38,3 g L<sup>-1</sup>. Die Ausbeute konnte von 0,03 auf 0,42 mol mol<sup>-1</sup> gesteigert werden. Im Satzverfahren mit ruhenden Zellen konnte durch eine pH-Kontrolle das Ergebnis nochmals auf 65,9 g L<sup>-1</sup> verbessert werden. Bei einer volumetrischen Produktivität von 8,24 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> betrug die Ausbeute sogar 0,72 mol mol<sup>-1</sup> (Kaup et al. 2004). Um einen kosteneffizienteren Prozess zu gestalten, wurde das Substrat Fructose durch Glucose ersetzt. Die Zugabe einer Glucoseisomerase von *S. rubiginosus* ermöglichte eine Produktbildung von 142 g L<sup>-1</sup> D-Mannit innerhalb von 40 Stunden auf der Basis von Glucose. Die Ausbeute betrug 0,78 mol mol<sup>-1</sup> (Kaup et al. 2005).

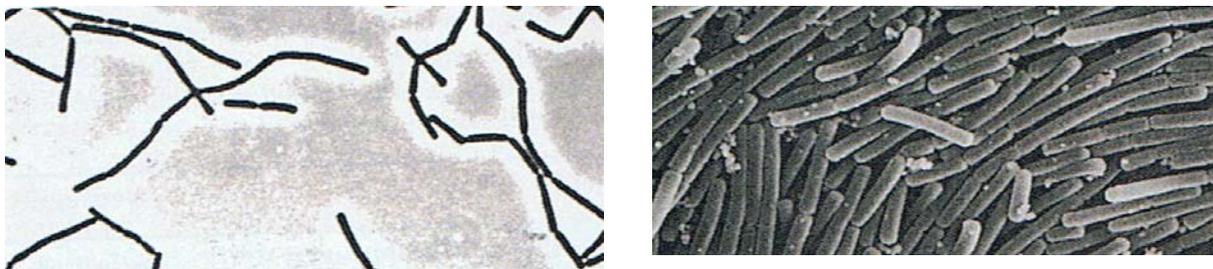
### **3.4 Milchsäurebakterien**

In den folgenden Kapiteln werden sowohl die Verbreitung und Anwendungsmöglichkeiten, als auch das bakterielle Wachstum von Milchsäurebakterien, ihr Stoffwechsel und der Zuckertransport näher betrachtet.

Insbesondere bezüglich des Stoffwechsels kann man die Gattung der Milchsäurebakterien in drei Gruppen einteilen: obligat homofermentativ (Gruppe A), fakultativ heterofermentativ (Gruppe B) und obligat heterofermentativ (Gruppe C) (Kandler 1983, Wood 1995). Diese Aufteilung beruht sowohl auf der Verwertung von Hexosen und den daraus entstehenden Endprodukten als auch auf dem damit verbundenen Vorhandensein spezifischer Enzyme. Aufgrund der genetischen Ausstattung für eine homo- und heterofermentative Zuckerverwertung bei Milchsäurebakterien der Gruppe B, wie zum Beispiel bei *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Kleerebezem et al. 2003), geht man davon aus, dass sie eine ursprünglichere Form darstellen, wohingegen die Gruppen A und C sich erst später daraus entwickelt haben. Auf die Gruppe B wird im Folgenden allerdings nicht näher eingegangen.

### 3.4.1 Milchsäurebakterien – eine kurze Charakterisierung

Milchsäurebakterien, in der englischen Literatur zumeist mit LAB für „*Lactic Acid Bacteria*“ abgekürzt, befinden sich in der Gruppe der *Lactobacteriaceae*. Übereinstimmende Merkmale, bis auf wenige Ausnahmen, sind ihr Gram-positives Verhalten, keine Sporenbildung und Unbeweglichkeit (Ausnahme: *Lactobacillus vini*). Hinsichtlich der Morphologie gibt es die meisten Variationen, da sowohl lange wie auch kurze Stäbchen und Kokken (siehe Abbildung 3.10) beschrieben sind (Schlegel und Zaborosch 1992).



**Abbildung 3.10** Aufnahmen von Kolonien der Gattung *Lactobacillus acidophilus* (links; Phasenkontrastaufnahme) und *Lactobacillus delbrueckii* (rechts; Elektronenmikroskopische Aufnahme). (Madigan et al. 2000).

Die Familie der Milchsäurebakterien umfasst die folgenden Gattungen: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* und *Bifidobacterium*. Ihr Stoffwechsel wird als obligat homofermentativ, obligat heterofermentativ oder fakultativ heterofermentativ beschrieben. Milchsäurebakterien können in Anwesenheit von Sauerstoff und in sauerstofffreier Umgebung wachsen, wobei sie ihre Energie durch den Abbau von Kohlenhydraten gewinnen. Aufgrund ihrer natürlichen Habitate (Darm, Milchprodukte, etc.) und der daraus entstandenen Anpassung können sie nur in Komplexmedien mit hohen Nährstoffgehalten und Zusatzstoffen, unter anderem Vitaminen, kultiviert werden. Da sie nicht zur Synthese von Porphyrinkomponenten befähigt sind erfolgt die Energiegewinnung mit Hilfe der Substratkettenphosphorylierung (Wood 1995). Einzelne Vertreter können allerdings Porphyrinkomponenten aus dem Medium aufnehmen.

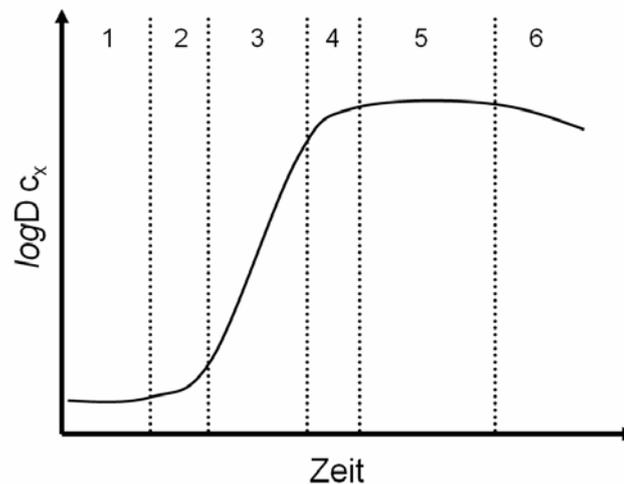
### 3.4.2 Verwendung von Milchsäurebakterien

Die Verwendung von Milchsäurebakterien hat bereits eine lange Tradition und ist weltweit verbreitet. Seit Jahrtausenden werden diese Bakterien im Lebensmittelbereich eingesetzt (Dworkin et al. 2006, Caplice und Fitzgerald 1999), sei es bei der Herstellung von Salami (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*), Sauerkraut (*Leuconostoc spec.*, *Lactobacillus plantarum*), Joghurt (*Lactobacillus bulgaricus*), Sauerteig (*Lactobacillus sanfranciscensis*) oder bei der Weinherstellung (*Oenococcus oeni*). In der Verwendung als Starterkulturen besitzen sie große industrielle Bedeutung (Pfeiler und Klaenhammer 2007). Durch ihren Stoffwechsel und die damit verbundene Herstellung von organischen Säuren führen sie nicht nur zu einer Haltbarmachung von Lebensmitteln, sondern auch zu einer Veredelung (Sybesma et al. 2006, Teusink und Smid 2006). Mit zunehmendem Einfluss der Molekularbiologie im Lebensmittelbereich, ebenso wie durch die Verfügbarkeit vollständiger Genomsequenzen (z.B. *Lactococcus lactis*, Neves et al. 2005, Bolotin et al. 2001, Siezen et al. 2004, Pfeiler und Klaenhammer 2007) rückten auch genetische Modifikationen zur Stammverbesserung in den Fokus des Interesses. Längst werden Milchsäurebakterien für eine mögliche Herstellung von Aromastoffen, therapeutischen Proteinen (beispielsweise Interleukin-10, Steidler et al. 2000, de Vos und Hugenholtz 2004 a) und zur Zuckeralkoholherstellung (Monedero et al. 2010) untersucht und auch dahingehend gezielt genetisch verändert. Im prophylaktischen Sinne werden unter anderem *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium lactis* sowohl „probiotischen“ Lebensmitteln zugefügt, um eine Fehlbesiedlung des Darmes mit Hefen oder anderen Keimen zu verhindern, als auch per se als „probiotisch“ beschrieben (Trindade et al. 2003).

### 3.4.3 Wachstum von Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien zeigen unter optimalen Bedingungen eine für sie charakteristische Wachstumskurve (Abbildung 3.11). Diese ist abhängig von dem Vorhandensein verschiedener Nährstoffquellen (Kohlenstoff, Phosphate), von Spurenelementen oder auch der Gasphase im Medium. Nach dem Animpfen des Mediums befinden sich die Zellen in einer Adaptationsphase während der sie sich an das Medium anpassen. Während dieser Phase findet kein deutliches Wachstum

statt. Fehlen dem Medium wichtige Bestandteile oder weichen die Kultivierungsbedingungen (z. B. Temperatur, pH) vom Optimum ab, kann es zu einer deutlichen Verzögerung dieser ersten Phase kommen. Im Anschluss an die Adaptationsphase kommen die Zellen in die Übergangsphase und darauf folgend in die Wachstumsphase. In dieser Phase kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der Biomasse, die Zellen erreichen eine konstante und maximale Wachstumsrate ( $\mu_{max}$ ). Vor allem  $\mu_{max}$  ist ein wichtiges Kriterium bei der Beschreibung des Wachstums, da der Wert Stammspezifisch ist. Die Ursache für den Übergang in die anschließende stationäre Phase liegt zumeist entweder in einem Verbrauch an Nährstoffen oder in einem Anhäufen von Nebenprodukten. Der Zuwachs an Biomasse ist in dieser Phase im Gleichgewicht mit dem Anteil an sterbenden Zellen. Verschlechtert sich das Nährstoffangebot weiterhin für die Zellen oder überschreiten Metabolitkonzentrationen eine kritische Konzentration, kommt es zu einem verstärkten Absterben der Zellen und einem Absinken der Biomassekonzentration. Der in Abbildung 3.11 dargestellte Verlauf steht stellvertretend für ein Satzverfahren unter nicht-limitierenden Bedingungen bezüglich dem vorliegenden Substrat.



**Abbildung 3.11** Charakteristische Wachstumskurve in einem Satzverfahren unter nicht-limitierenden Bedingungen. Nach einer Adaptationsphase (1) von mehreren Stunden kommt die erste Übergangsphase (2) zur exponentiellen Wachstumsphase (3). Treten Limitierungen auf, kommt es zur zweiten Übergangsphase (4) mit einer anschließenden stationären Phase (5). Überwiegt das Absterben der Zellen die Wachstumsrate kommt es zur Absterbephase (6).

Wachstum wird bei Mikroorganismen als Massezunahme beschrieben, wohingegen Vermehrung mit einer Zunahme der Zellzahl verbunden ist. Für Milchsäurebakterien, die sich durch Zellteilung vermehren, kann somit die Anzahl der Zellen ausgehend von einer Startzellzahl  $c_{N0}$  in Abhängigkeit der Teilungsvorgänge  $n$  beschrieben werden (siehe Gleichung 3.1).

**Gleichung 3.1** 
$$c_N = c_{N0} \cdot 2^n$$

mit  $c_N$  Zellzahl, -  
 $c_{N0}$  Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_0$ , -  
 $n$  Generationszahl, -

Für eine vergleichende Charakterisierung verschiedener Arten von Bakterien wird häufig die Wachstumsrate  $\mu$  herangezogen, deren Definition in Gleichung 3.2 dargestellt ist. Während der exponentiellen Wachstumsphase entspricht die Wachstumsrate  $\mu = \mu_{max}$ .

**Gleichung 3.2** 
$$\mu = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt}$$

mit  $\mu$  Wachstumsrate,  $h^{-1}$   
 $c_x$  Konzentration der Biotrockenmasse,  $g_{BTM} L^{-1}$

Der Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase beruht zumeist darauf, dass ein oder mehrere Substrate in einer Wachstums-limitierenden Konzentration vorliegen. Diese Substratlimitierung kann empirisch in Abhängigkeit von der limitierenden Substratkonzentration  $c_s$  beschrieben werden (Gleichung 3.3).

**Gleichung 3.3**

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S}$$

mit  $\mu_{\max}$  maximale Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_S$  limitierendes Substrat,  $\text{g L}^{-1}$   
 $K_S$  Sättigungskonstante des limitierenden Substrates,  $\text{g L}^{-1}$

In Analogie zur Wachstumsrate  $\mu$  wird die spezifische Substrataufnahmerate  $q_S$  (siehe Gleichung 3.4) beschrieben.

**Gleichung 3.4**

$$q_S = \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_S}{dt}$$

mit  $q_S$  spezifische Substrataufnahmerate,  $\text{g}_S \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$   
 $c_x$  Konzentration der Biotrockenmasse,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

Unter Berücksichtigung der Substrataufnahme für Zellwachstum ( $q_{S,\mu}$ ) und Produktbildung ( $q_{S,P}$ ), bei gleichzeitiger Vernachlässigung der Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel ( $q_{S,m}$ ), kann  $q_S$  wie folgt definiert werden:

**Gleichung 3.5**

$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,P}$$

mit  $q_S$  spezifische Substrataufnahmerate,  $\text{g}_S \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$

Die spezifische Substrataufnahmerate für das Zellwachstum kann darüber hinaus wie folgt beschrieben werden (Gleichung 3.6):

**Gleichung 3.6**

$$q_{S,\mu} = \frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} \quad \left( Y_{XS,\mu} = \frac{dc_X}{dc_S} \right)$$

mit  $Y_{XS,\mu}$  Ertragskoeffizient (Biotrockenmasse pro Substrat),  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}_S^{-1}$

Die Bestimmung der spezifischen Produktbildungsrate ergibt sich aus Gleichung 3.7:

**Gleichung 3.7** 
$$q_P = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_P}{dt}$$

mit  $q_P$  spezifische Produktbildungsrate,  $g_P \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$   
 $c_X$  Konzentration der Biotrockenmasse,  $g_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$

Für die Stoffbilanzen und Formalkinetiken werden die Bedingungen im Rührkesselreaktor als ideal angenommen. Alle Reaktionskomponenten und Reaktionsgeschwindigkeiten sind räumlich konstant.

Eine Kopplung von Stoffbilanz und Kinetik für eine Kultivierung im Satzreaktor ist für die Zellkonzentration  $c_X$  und die Substratkonzentration  $c_S$  in den folgenden Gleichungen dargestellt (Gleichung 3.8 und Gleichung 3.9). Da die Menge an Titrationsmittel gegenüber dem Gesamtvolumen verhältnismäßig klein ist wird das Reaktionsvolumen als konstant betrachtet.

**Gleichung 3.8** 
$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X$$

**Gleichung 3.9** 
$$\frac{dc_S}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} + m_S\right) \cdot c_X$$

Unter Berücksichtigung des zugeführten Volumens kann auch für ein Zulaufverfahren im idealen Rührkesselreaktor die Kopplung der Stoffbilanzen und Kinetiken für die Biomasse- und Substratkonzentration vorgenommen werden.

**Gleichung 3.10**

$$\frac{dc_X}{dt} = -\frac{F_{ein}}{V_R} \cdot c_X + \mu \cdot c_X$$

mit  $F_{ein}$  Zulaufvolumenstrom, L h<sup>-1</sup>  
 $V_R$  Reaktionsvolumen, L

**Gleichung 3.11**

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{F_{ein}}{V_R} \cdot (c_{S,0} - c_S) - q_{S,\mu} \cdot c_X$$

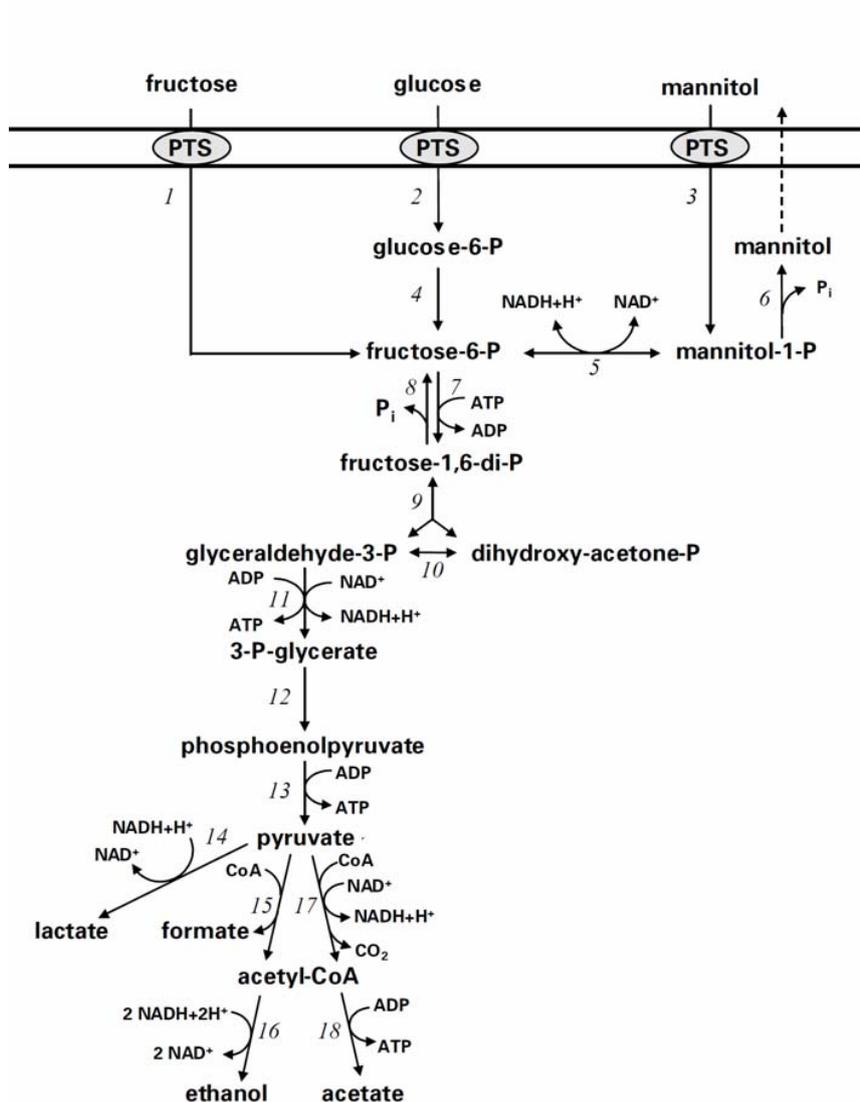
$c_{S,0}$  Substratkonzentration im Zulaufmedium, g L<sup>-1</sup>

**3.4.4 Homofermentativer Zuckerstoffwechsel**

Der Glucosemetabolismus bei homofermentativen Milchsäurebakterien beginnt mit der Aufnahme von Glucose über das Phosphotransferasesystem (PTS, nähere Beschreibung siehe 3.4.6). Hierdurch gelangt Glucose als Glucose 6-phosphat in die Zelle. Die weitere Verwertung folgt der Glykolyse, auch als Embden-Meyerhof-Parnas Weg (EMP) bezeichnet. Durch die Umwandlung in Fructose 6-phosphat mittels Phosphoglucoseisomerase und einer weiteren Phosphorylierung durch die 6-Phosphofruktokinase wird das zentrale Intermediat Fructose 1,6-diphosphat gebildet. Die Spaltung von Fructose 1,6-diphosphat in zwei Triosephosphate erfolgt durch Fructose 1,6-diphosphataldolase, dem charakteristischen Enzym der Glykolyse. Die Triosephosphate werden abschließend zu Lactat reduziert, dem alleinigen Stoffwechselendprodukt der homofermentativen Milchsäuregärung. Stöchiometrisch werden aus 1 Mol Glucose 2 Mol ATP gebildet. Die Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch die Lactatdehydrogenase führt zu einer ausgeglichenen Redoxbilanz. Abbildung 3.12 zeigt einen schematischen Überblick über den homofermentativen Stoffwechsel von Milchsäurebakterien. Darüber hinaus kann es bei diesen Bakterien zu einer gemischten Säuregärung mit den Endprodukten Acetat, Ethanol, Acetoin, Diacetyl und 2,3-Butandiol kommen. Diese Form des Zuckerabbaus stellt eine direkte Alternative zum homofermentativen Stoffwechsel dar und ist direkt abhängig von der Aktivität der Glycerinaldehyd 3-phosphatdehydrogenase und deren

Regulation (Garrigues et al. 1997). Ein Ausweichen auf die gemischte Säuregärung kann allerdings auch durch einen Defekt in der Lactatdehydrogenase provoziert werden (Neves et al. 2000).

Die Bildung von D-Mannit erfolgt im homofermentativen Stoffwechsel auf der Basis von Fructose 6-phosphat. Letzteres wird zunächst durch die D-Mannit 1-phosphatdehydrogenase zu D-Mannit 1-phosphat reduziert bevor durch die D-Mannit 1-phosphatase der freie Zuckeralkohol gebildet wird, welcher die Zelle anschließend verlässt.



**Abbildung 3.12** Darstellung des homofermentativen Stoffwechselweges bei Milchsäurebakterien. Das zentrale Enzym dieses Stoffwechsels ist die Fructose 1,6-diphosphataldolase (9) und deren Substrat Fructose 1,6-diphosphat. (1-3) PTS-abhängige Zuckertransporter, (4) Phosphoglucoseisomerase, (5) Mannit 1-phosphatdehydrogenase, (6), Mannit 1-phosphatase, (7) 6-Phosphofruktokinase, (8) Fructosediphosphatase, (9) Fructose 1,6-diphosphataldolase, (10) Triosephosphatisomerase, (11) Glycerinaldehyd 3-phosphatdehydrogenase, (12) Phosphoglyceromutase, (13) Pyruvatkinase, (14) Lactatdehydrogenase, (15) Pyruvat-Formiatlyase, (16) Alkoholdehydrogenase, (17) Pyruvatdehydrogenase, (18) Acetatkinase. (Nach Wisselink et al. 2002).

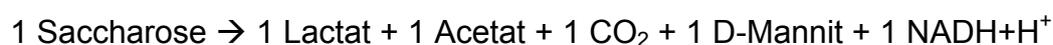
### 3.4.5 Heterofermentativer Zuckerstoffwechsel

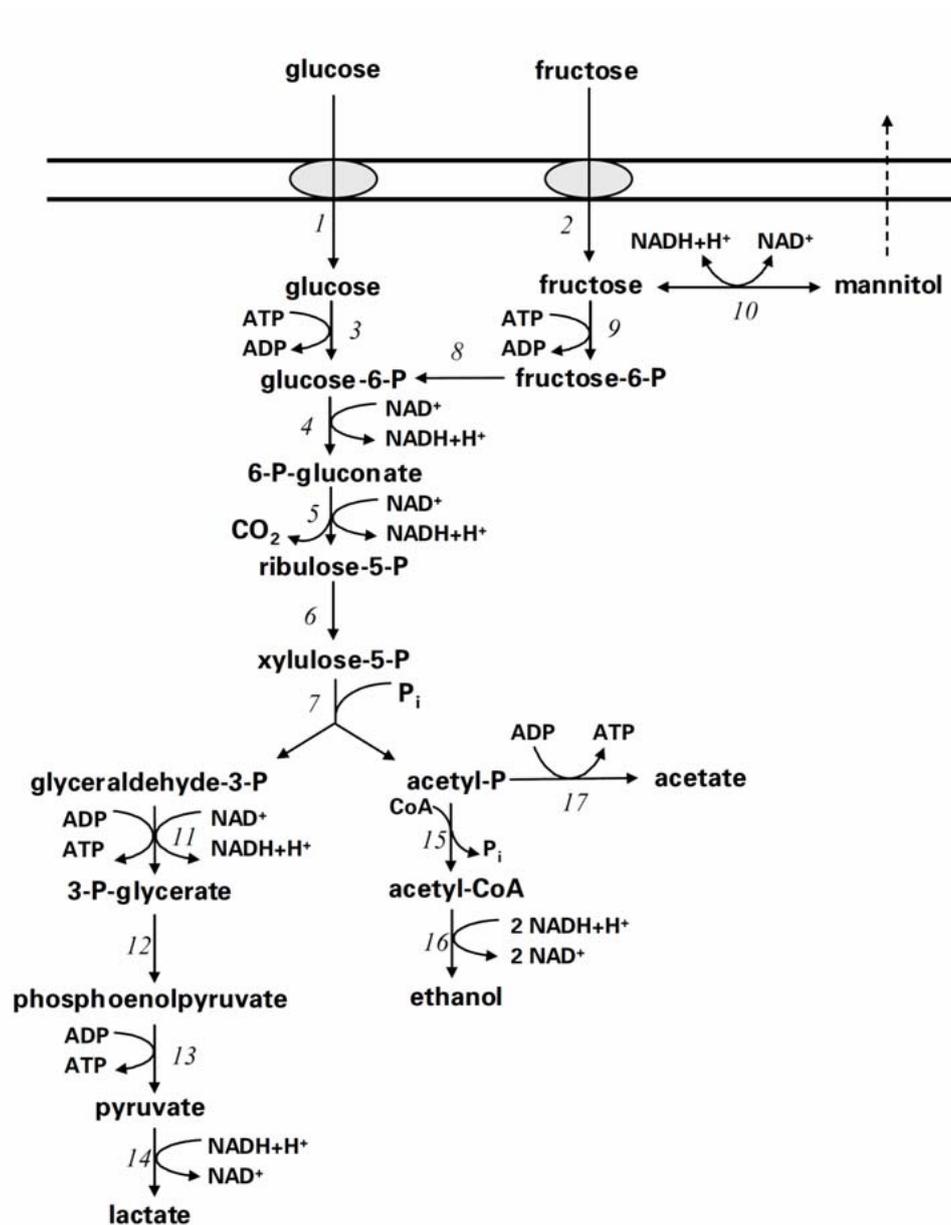
Im Gegensatz zu den homofermentativen Milchsäurebakterien, erfolgt die Zuckeraufnahme bei den heterofermentativen Milchsäurebakterien zumeist über Permeasen, also unspezifische Membrantransportproteine (siehe 3.4.6). Endprodukte dieses Stoffwechselweges, auch bezeichnet als Phosphoketolase-Weg, sind Lactat, Acetat sowie Ethanol. Wichtigstes Zwischenprodukt in der Verwertung von Hexosen ist Xylulose 5-phosphat welches durch eine Phosphoketolase in Glycerinaldehyd 3-phosphat und Acetylphosphat gespalten wird. Im Phosphoketolase-Stoffwechselweg werden somit aus 1 Mol Glucose lediglich 1 Mol ATP gebildet. Abbildung 3.13 zeigt den schematischen Ablauf der Glucose- und Fructoseverwertung sowie die D-Mannitbildung. Um ein zusätzliches Mol ATP zu gewinnen, verwenden die Zellen externe Elektronenakzeptoren wie zum Beispiel Citrat, Malat, Fumarat oder auch Fructose (Stolz et al. 1995, Axelsson et al. 2004). Hierdurch wird die Phosphatabspaltung bei der Bildung von Acetyl-CoA ebenso wie die Ethanolbildung umgangen. Mittels Acetatkinase wird Acetylphosphat zu Acetat dephosphoryliert. Es wird zusätzlich ATP gebildet. Hinzu kommt die Regeneration der Redoxäquivalente durch die Reduktion des externen Elektronenakzeptors. Als Produkte entstehen dadurch D-Mannit, Succinat oder Lactat. Bei Fructose als alleinigem Substrat liegt die Mannitausbeute bei  $0,67 \text{ mol mol}^{-1}$  (siehe Gleichung 3.12). Die Verwendung von Saccharose als Substrat führt zu der in Gleichung 3.13 dargestellten Bilanz wobei die Reduktionsäquivalente nicht vollständig regeneriert werden. Die D-Mannitbildung wird von einer Mannitdehydrogenase umgesetzt.

#### Gleichung 3.12



#### Gleichung 3.13





**Abbildung 3.13** Darstellung des heterofermentativen Stoffwechselweges bei Milchsäurebakterien. Das zentrale Enzym dieses Stoffwechselweges ist eine Phosphoketolase (7). Weitere Enzyme: (1+2) Permeasen für die Aufnahme von Glucose und Fructose, (3) Glucokinase, (4) Glucose 6-phosphatdehydrogenase, (5) 6-Phosphogluconatdehydrogenase, (6) Epimerase, (7) Phosphoketolase, (8) Glucosephosphatisomerase, (9) Fructokinase, (10) D-Mannitdehydrogenase, (11) Glycerinaldehyd 3-phosphatdehydrogenase, (12) Phosphoglyceromutase, (13) Pyruvatkinase, (14) Lactatdehydrogenase, (15) Phosphatacetyltransferase, (16) Alkoholdehydrogenase, (17) Acetatkinase. (Nach Wisselink et al. 2002).

### 3.4.6 Zuckertransport in Milchsäurebakterien

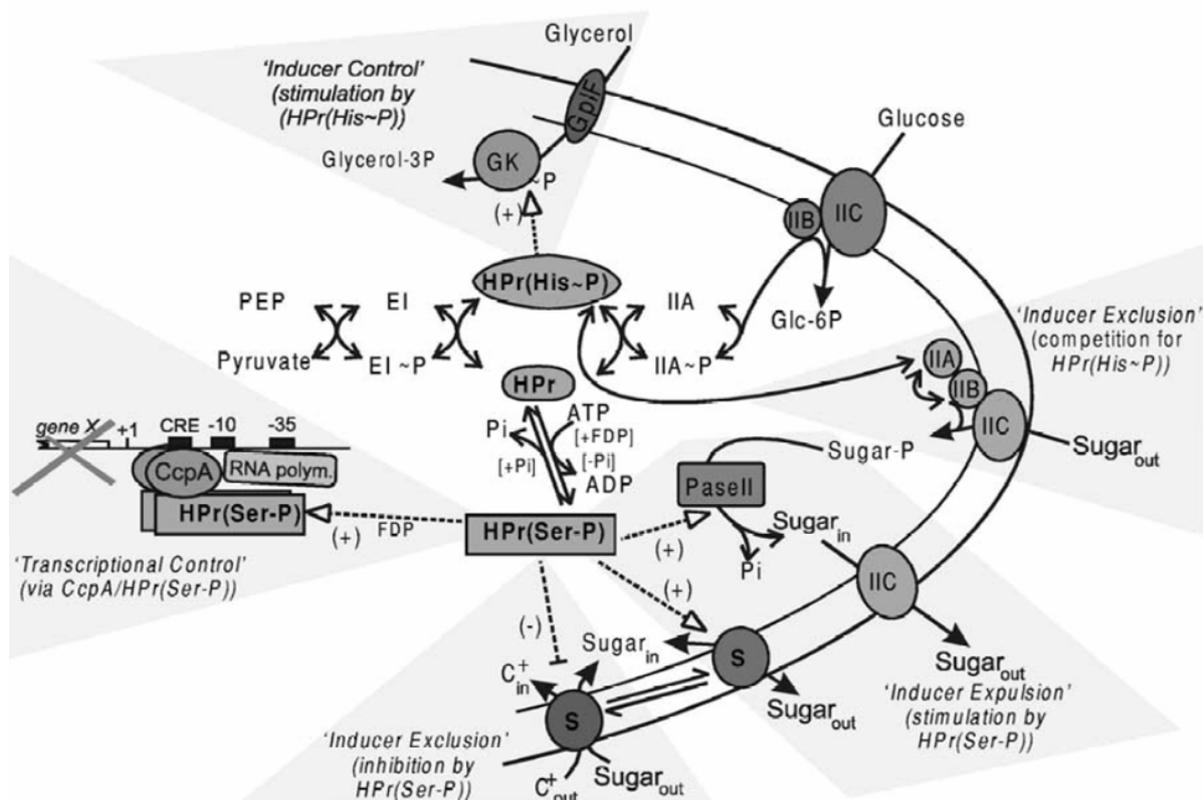
Milchsäurebakterien besitzen im Allgemeinen drei verschiedene Transportsysteme für die Zuckeraufnahme (Axelsson 2004): primärer Transport, sekundärer Transport und das PEP:PT-System (Phosphoenolpyruvat:Phosphotransferasesystem) (Romano et al. 1979).

Der primäre Transport, beziehungsweise die ABC-Transportsysteme (ABC: *ATP Binding Cassette*) sind durch eine ATP-Hydrolyse mittels ATPase gekennzeichnet. Es findet somit ein aktiver Transport von Zuckern und Zuckeralkoholen unter Energieverbrauch statt. Sowohl die Aufnahme als auch die Sekretion von Stoffen werden über dieses Transportsystem gesteuert. Vor allem bei der Sekretion von zytotoxischen Stoffen spielen die ABC-Transporter eine wesentliche Rolle (Konings et al. 1997).

Der sekundäre Transport hingegen ist energieunabhängig. Es werden Konzentrationsgradienten einzelner Stoffe (zum Beispiel Protonen oder Natriumionen) für den Transport ausgenutzt, wobei Permeasen eine Überwindung der Membran ermöglichen. Innerhalb des sekundären Transportes gibt es die Unterteilung in Uniport, Symport und Antiport. Der Uniport ist in diesem Zusammenhang die einfachste Variante, da der zu transportierende Stoff seinen eigenen Konzentrationsgradienten ausnutzt um in die Zelle zu gelangen. Beim Symport macht sich die Zelle einen anderen Konzentrationsgradienten zunutze ( $H^+$ ,  $Na^+$ ) um einen oder mehrere weitere Stoffe in die Zelle zu transportieren. Der Antiport hingegen koppelt den Transport eines Stoffes in die Zelle an den Export eines weiteren Stoffes. Da für den sekundären Transport Konzentrationsgradienten einzelner Stoffe ausgenutzt werden, muss keine Energie direkt aufgewendet werden. Aufgabe der Zelle beim sekundären Transport ist es, einen Protonengradienten oder Gradienten anderer Stoffe zwischen dem Medium und dem Intrazellularraum aufrecht zu halten. Dieser Protonengradient (*Proton Motive Force*, PMF) kann nur unter ATP-Hydrolyse aufrechterhalten werden, wobei durch die Spaltung der energiereichen Phosphatbindung Protonen nach außen transportiert werden.

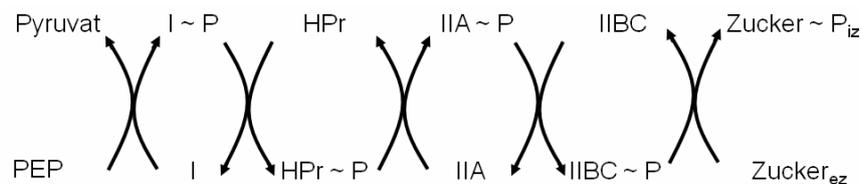
Eine weitere Transportmöglichkeit stellt das Phosphotransferasesystem (PTS) dar, welches auf den Transport von Zuckern und Zuckeralkoholen beschränkt ist (Postma et al. 1993). Es besteht aus einem Multienzymkomplex welches sowohl

membrangebundene als auch zytosolische Proteine umfasst und eine sehr genaue Regulierung des Stoffwechsels, sowie eine hierarchische Zuckerverwertung ermöglicht (Titgemeyer und Hillen 2002). Wichtigste Stellgrößen in diesem Prozess sind unter anderem das cytosolische Protein HPr (*Histidin-Phosphocarrier Protein*) sowie das Verhältnis von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat (Thompson 1988). In Anwesenheit von mehreren Substraten gewährleisten sie unter anderem eine hierarchische Kontrolle und Autoregulation (Poolman 2002), wobei von der Zelle bevorzugte Substrate zuerst aufgenommen und verstoffwechselt werden. Die Zucker selber werden bei dem Transport über die Membran phosphoryliert. Phosphoenolpyruvat, ein zentrales Substrat dieses Transportweges, wird hierbei zu Pyruvat umgewandelt. Die Energie für den Transport entstammt der Hydrolyse der Phosphatbindung (siehe Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14** Übersicht über das Phosphotransferasesystem PTS und den wichtigsten Stellgliedern Pyruvat:Phosphoenolpyruvat sowie dem *Histidin-Phosphocarrier Protein* HPr. (Nach Poolman 2002).

Eine vereinfachte Darstellung für die Zuckeraufnahme zeigt Abbildung 3.15 (nach Saier et al. 1996). Neben dem Energiebedarf für den Transport hat die Übertragung der Phosphatgruppe auf das Substrat noch die zusätzliche Funktion, Zucker in der Zelle zu halten, da der Zucker durch die negative Ladung der Phosphatgruppe die Membran nicht überwinden kann.



**Abbildung 3.15** Vereinfachte Darstellung der Phosphatgruppenübertragung im Phosphotransferasesystem. (Nach Saier et al. 1996).

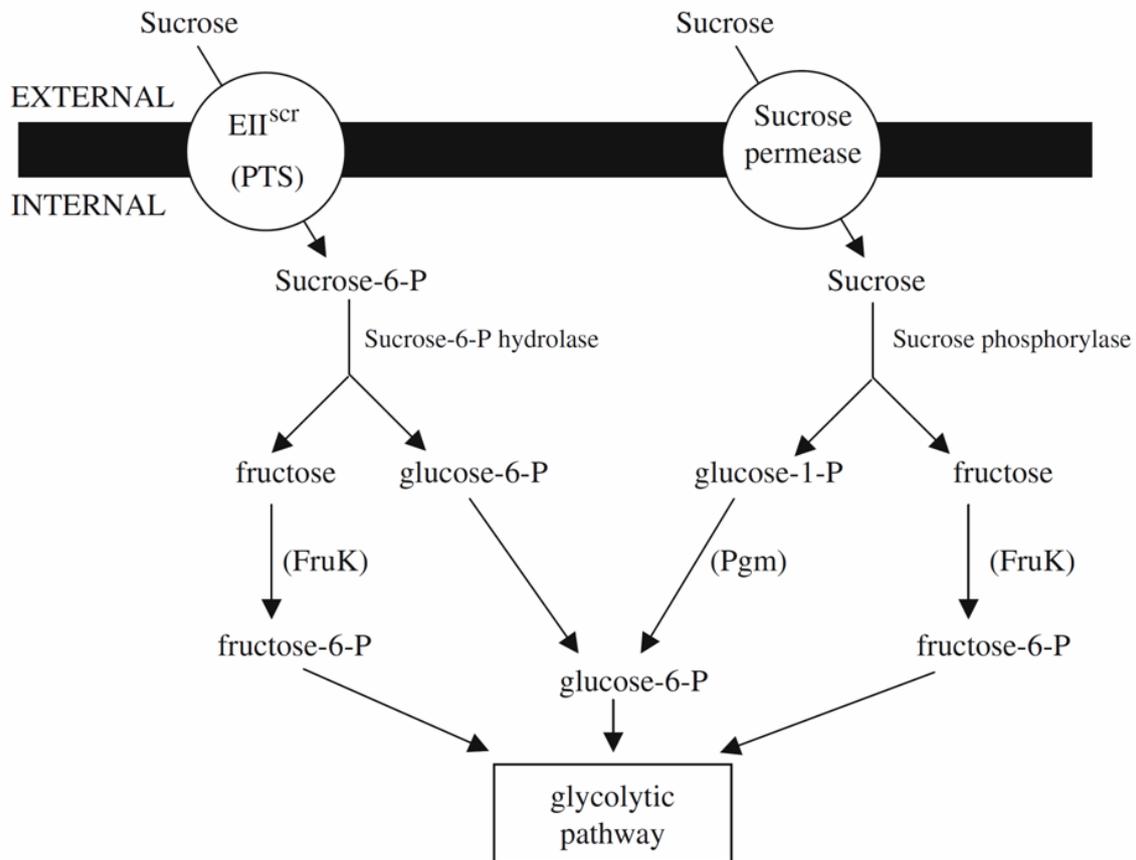
Generell zeigen Milchsäurebakterien eine klare Trennung bezüglich des Zuckertransportes: homofermentative Milchsäurebakterien verwenden primär das Phosphotransferasesystem, heterofermentative Milchsäurebakterien hingegen schleusen Zucker über Permeasen in die Zelle. Die Ursache hierfür kann mit einem Blick auf die Stöchiometrie erklärt werden. Homofermentative Milchsäurebakterien können pro Mol Glucose zwei Mol Phosphoenolpyruvat (PEP) bilden (3.4.4). Hiervon wird 1 Mol PEP für das PT-System eingesetzt, das zweite Mol kann für den Zellstoffwechsel, wie zum Beispiel Zellwandbiosynthese verwendet werden. Heterofermentative Milchsäurebakterien bilden hingegen pro Mol Glucose nur ein Mol PEP (3.4.5). Wird dieses Mol nun bei dem Zuckertransport verbraucht, steht es keinen weiteren Reaktionen zur Verfügung (Romano et al. 1979, Saier et al. 1996, Taranto et al. 1999, Poolman 2002). Aus diesem Grund verwenden heterofermentative Milchsäurebakterien hauptsächlich Permeasen für den Transport in und aus der Zelle heraus (Romano et al. 1986). Dass Permeasen generell eine große Bedeutung für den Zuckertransport bei Bakterien besitzen kann bereits an ihrer großen Anzahl abgeschätzt werden. Bei der Sequenzierung des Genoms von *Bifidobacterium longum* NCC2705 wurden 19 Permeasegene identifiziert (Parche et

al. 2007) welche für Genprodukte codieren, die für die Aufnahme von Kohlenhydraten verantwortlich sind.

### 3.4.7 Saccharosetransport und Verwertung bei Milchsäurebakterien

Ebenso wie Monosaccharide wird auch Saccharose bei heterofermentativen Milchsäurebakterien über Permeasen aufgenommen. Die Aufnahme von Saccharose erfolgt hierbei über Proteine der „*Major Facilitator Superfamily*“ (MFS). Diese Permeasen ermöglichen einen Transport entlang des Protonengradienten und werden deshalb einer OHS-Gruppe (Oligosaccharid:H<sup>+</sup>-Symporter Familie) zugeteilt (Pao et al. 1998, Saier et al. 1999). Ein entsprechendes Operon wurde bei *Bifidobacterium longum* NCC2705 identifiziert (*cscABR*) und umfasst neben einer Permease (*cscB*) und einer Hydrolase (*cscA*) auch ein Regulatorprotein (*cscR*). Ein entsprechendes Operon wurde auch bei anderen Mikroorganismen, unter anderem *E. coli*, identifiziert (Bockmann et al. 1992). In *Bifidobacterium lactis* wird der Saccharosestoffwechsel über das Zusammenspiel einer Saccharosephosphorylase (ScrP), eines Transkriptionsregulators (ScrR) und einen Saccharosetransporter (ScrT) reguliert (Trindade et al. 2003).

Für Saccharose ergeben sich sowohl bezüglich des Transportes als auch hinsichtlich der intrazellulären Verwertung unterschiedliche Möglichkeiten (Thompson 1987, Reid und Abratt 2005, siehe Abbildung 3.16). Wird das Disaccharid über ein PT-System in die Zelle aufgenommen, erfolgt eine Phosphorylierung zu Saccharose 6-Phosphat. Durch eine Saccharose 6-Phosphat-Hydrolase wird der Zucker gespalten und es entstehen Glucose 6-Phosphat und Fructose. Beide Substrate können über die Glykolyse verstoffwechselt werden. Gelangt die Saccharose über eine Permease in die Zelle, wird diese erst intrazellulär durch eine Saccharosephosphorylase phosphoryliert (Dols et al. 1997). Nach einer Spaltung und Umwandlung entstehen wiederum die Intermediate Glucose-, beziehungsweise Fructose 6-Phosphat. Diese können entweder der Glykolyse zugeführt werden (homofermentativer Abbau) oder es erfolgt eine Reduktion zu 6-Phosphogluconat und ein weiterer Abbau entsprechend dem heterofermentativen Metabolismus.



**Abbildung 3.16** Übersicht über die möglichen Wege zur Saccharoseaufnahme und Stoffwechslung in Milchsäurebakterien. (Nach Reid 2005).

Eine strikte Trennung bezüglich der Zuckeraufnahme und dem dazugehörigen Stoffwechsel ist allerdings nicht möglich, da gleichwohl heterofermentative Milchsäurebakterien Zucker auch über das Phosphotransferasesystem aufnehmen (Saier et al. 1996, Taranto et al. 1999).

### 3.4.8 Verwendung von Fructose als Elektronenakzeptor

Im Gegensatz zu strikt aeroben Mikroorganismen, welche ausschließlich Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor verwenden, können fakultativ anaerobe Bakterien je nach Sauerstoffgehalt ihren Stoffwechsel umstellen. Im Fall von *Lactobacillus frumenti* wird Fructose als terminaler Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen reduziert. Hierdurch können die Redoxäquivalente  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$  bei gleichzeitiger D-Mannitbildung regeneriert werden. Die Reduktion erfolgt durch das

Enzym D-Mannitdehydrogenase. Darüber hinaus ermöglicht die Fructose-Reduktion die Bildung von einem zusätzlichen Mol ATP, wobei Acetylphosphat zu Acetat dephosphoryliert wird. Ebenso wie *Lactobacillus frumenti* verwenden auch weitere Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 (Arskold et al. 2008), *Lactobacillus brevis* (Behr et al. 2006) und *Lactobacillus sanfranciscensis* (Paramithiotis et al. 2007) Fructose als Elektronenakzeptor. Darüber hinaus kommen Substrate wie Fumarat, Malat, Citrat und Pyruvat als Elektronenakzeptoren in Frage (Stolz et al. 1995, Zaunmuller et al. 2006).

### **3.5 *Lactobacillus frumenti***

*Lactobacillus frumenti*, isoliert aus einer Sauerteigfermentation mit Roggenkleie, ist Gram-positiv und hat die Form eines länglichen Stäbchens. Charakterisiert wurde es zunächst von Mueller et al. (2000). Nach einer Kultivierung auf Agarplatten zeigt es helle, weiße Kolonien mit einem klaren und gleichmäßigen Rand. Bezüglich des Stoffwechsels ist *Lactobacillus frumenti* obligat heterofermentativ (Corsetti und Settanni 2007). Meroth et al. (2003) konnten *Lactobacillus frumenti* in Typ II Sauerteig mittels PCR-DGGE (Polymerase Kettenreaktion in Verbindung mit denaturierender Gradienten Gelelektrophorese) nachweisen. Typ II Sauerteig zeichnet sich vor allem durch die Verwendung von höheren Temperaturen und längeren Fermentationszeiten aus und begünstigt dadurch das Wachstum spezifischer Kulturen (Tieking et al. 2003). Gemäß Tieking et al. (Tieking und Gänzle 2005 a) verfügt *Lactobacillus frumenti* über die Fähigkeit zur Exopolysaccharidbildung (EPS). Exopolysaccharide werden häufig von *Lactobacillus*-Stämmen nach Wachstum auf Saccharose gebildet und sekretiert.

### 3.6 $\beta$ -Fructofuranosidase (BfrA)

Invertasen (E.C. 3.2.1.26), auch bekannt als  $\beta$ -Fructofuranosidasen oder Saccharasen zählen zu den am längsten bekannten und beschriebenen Enzymen (O'Sullivan et al. 1890). Die Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Saccharose in die beiden Zuckermonomere Glucose und Fructose, was zu einer Invertzuckerlösung führt und auch für die Namensgebung verantwortlich war. Die weltweite Verbreitung von Saccharose führte bisher auch zu einem breitem Spektrum an Organismen, aus denen das Enzym isoliert und charakterisiert wurde: *Arthrobacter spec K-1* (Fujita et al. 1990), *Arthrobacter globiformis* (Isono et al. 2004), *Aspergillus niger* (Rubio und Maldonado 1995), *Bifidobacterium infantis* (Imamura et al. 1994), *Bifidobacterium infantis* ATCC15697 (Warchol et al. 2002), *Bifidobacterium lactis* (Ehrmann et al. 2003, Janer et al. 2004), *Bifidobacterium adolescentis* G1 (Omori et al. 2010), *Escherichia coli* (Sahin-Toth et al. 1999), *Azotobacter chroococcum* (Vega et al. 1991), *Streptococcus mutans* (Kuramitsu 1973), *Neurospora* (Metzenberg 1963), *Fusarium oxysporum* (Nishizawa und Maruyama 1979, Nishizawa et al. 1980), *Zymomonas mobilis* (O'Mullan et al. 1992), *Ricinus communis* (Prado et al. 1985), *Thermotoga maritima* (Alberto et al. 2004), *Saccharomyces cerevisiae* (Carlson et al. 1983). Abgesehen von der Saccharosespaltung können diese Enzyme auch die Hydrolyse von Oligosacchariden, wie zum Beispiel Fructooligosaccharide (FOS) oder Inulin katalysieren.

Die Zusammensetzung des Enzyms ist sehr vielfältig. Selbst heptamere Komplexe wurden isoliert und charakterisiert (Prado et al. 1985). In Abhängigkeit vom Organismus erfolgt die Hydrolyse sowohl extrazellulär oder nach dem Zuckertransport auch intrazellulär. Selbst Membrangebundene Enzyme kommen häufig vor. Der Abbau der Oligozucker erfolgt in den meisten Fällen an dem endständigen Zuckerrest (Exo-Typ).

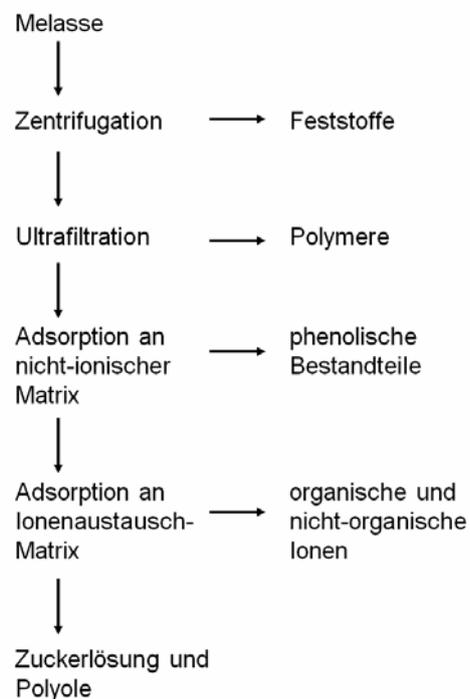
### **3.7 *Isolierung von D-Mannit aus Fermentationslösungen***

Um D-Mannit aus Fermentationslösungen zu isolieren macht man sich vor allem dessen Eigenschaft der geringen Löslichkeit von circa  $180 \text{ g L}^{-1}$  bei  $25 \text{ °C}$  zu Nutze (Schiweck et al. 2002). Im Gegensatz zur industriell durchgeführten katalytischen Hydrierung stehen vor allem die „Verunreinigungen“ durch weitere Metabolite in der Fermentationslösung, wie zum Beispiel Lactat und Acetat, bei der Aufreinigung im Vordergrund. Unabhängig von der Prozessführung werden für die Produktisolierung zunächst die Zellen vollständig abgetrennt. Hierbei wird entweder die Zentrifugation oder die Querstromfiltration eingesetzt. Ist die D-Mannitkonzentration in der Fermentationslösung oberhalb der Löslichkeitsgrenze kann direkt mit einer Kühlungskristallisation (Saha 2005) begonnen werden. Durch die Temperaturabsenkung bilden sich D-Mannitkristalle welche aus dem Medium durch Filtration entfernt werden können. Von Weymarn (2002 c) zeigte zusätzlich, dass eine langsamere Abkühlung (circa  $2 \text{ °C h}^{-1}$ ) der Fermentationslösung zu einer erhöhten Reinheit der Kristalle führt. Die Ausbeute wird dabei allerdings nicht beeinflusst. Bei geringeren Produktkonzentrationen wird zunächst eine Volumenreduktion durch Vakuumtrocknung, Verdampfen oder reverse Osmose (Kulbe et al. 1987 b) durchgeführt um die kritische Löslichkeitsgrenze zu erreichen. Darüber hinaus können weitere Metabolite wie Lactat und Acetat entweder durch eine Anionenaustauschchromatographie oder durch Calciumhydroxidfällung (Itoh et al. 1997) aus dem Medium entfernt werden. Liegt eine inhomogene Produktlösung mit D-Mannit, Fructose und Glucose vor eignet sich eine fraktionierte Kristallisation (Kulbe et al. 1987 b).

### **3.8 *Aufarbeitung und Reinigung von Melassehaltigen Medien***

Im Gegensatz zu einer Aufreinigung von D-Mannit aus herkömmlichen Fermentationslösungen stellen Melassehaltige Medien aufgrund ihrer Zusammensetzung veränderte Ansprüche. Generell wird bei Melasseprodukten zwischen der Zucker- und Nicht-Zuckerfraktion unterschieden. Letztere umfasst neben den unlöslichen Bestandteilen vor allem Proteine. Großtechnisch werden

bereits etliche Anstrengungen unternommen um die Hauptbestandteile Saccharose und Proteine aus der Melasse zu gewinnen und zu verwerten, um eine höhere Wertschöpfung zu erzielen (Ulber et al. 2000). Das Mittel der Wahl sind hierbei chromatographische Trennverfahren, wie zum Beispiel Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie (Kearney et al. 1995). Im Labormaßstab kann eine unvollständige Aufreinigung von Melasse auch durch eine Behandlung mit Aktivkohle erfolgen. Die Aufkonzentrierung erfolgt zumeist durch Gefriertrocknung (Atiyeh und Duvnjak 2005). Als Alternative zur Aktivkohle können Ultrafiltrationsmembranen verwendet werden. Sowohl die Aktivkohlebehandlung, als auch die Filtration führen vor allem zu einer Reduktion der schwarz-braunen Verfärbung der Melasse von bis zu 97 %. Weitere Aufarbeitungsschritte können daran anschließen. In Anlehnung an die D-Mannitisolierung aus Fermentationslösungen schlagen Grohmann et al. (1999) ein ähnliches Protokoll für die Aufarbeitung für Melasse vor (siehe Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.17** Darstellung einer mehrstufigen Aufreinigung von Melasse zur Gewinnung der Zuckerfraktion. (Nach Grohmann et al. 1999).

Neben den genannten Verfahrensschritten ist auch eine mehrstufige Entfernung der Nicht-Zuckerbestandteile sowie der Farbstoffe durch Calciumoxid und  $\text{CO}_2$ , verbunden mit einer Aufkonzentrierung, anwendbar (Clarke 1995). Von der Linde et al. (1969) konnte hierdurch 98,9 % Zuckerreinheit, ausgehend von Zuckerrohrmelasse, erzielen. Eine vollständige Entfernung der Farbstoffe wurde allerdings nicht erzielt. Aufgrund einer Mehrzahl an notwendigen Verfahrensschritten wird dieser Ablauf in der Regel nicht mehr praktiziert.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Material**

Die verwendeten Laborgeräte und Chemikalien sind in Kapitel 9.1 aufgelistet und näher beschrieben.

### **4.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurde das peqGold Plasmid Miniprep Kit I von peqLab (peqLab Biotechnology GmbH, Erlangen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Isolierung chromosomaler DNA aus *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 wurde den Herstellerangaben entsprechend nach dem Protokoll des E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Bacterial DNA Vacuum Protocol durchgeführt (Omega Bio-tek, Inc). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Lactobacillus frumenti* wurde mit dem E.Z.N.A.<sup>R</sup> Plasmid Midi Kit (Omega Bio-tek, Inc) durchgeführt. Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers.

### 4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasenkettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine etablierte Methode zur Vervielfältigung von Genfragmenten. Die einzelnen Teilschritte führen der Reihe nach zu einem Aufschmelzen der vorgelegten DNA, zu einem anschließenden Binden der Oligonukleotide (Primer) und zu einer Vervollständigung des „Mutterstranges“ durch eine Polymerase. Dieser Zyklus wird immer wieder fortlaufend wiederholt wobei es zu einer exponentiellen Zunahme der Ziel-DNA kommt. Die Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile sah wie folgt aus: 1  $\mu$ L genomische oder Plasmid-DNA, 20 pmol je Primer, 0,2 mM der dNTPs (Desoxynukleotid-Triphosphate), 2,5 U *KOD*-Polymerase beziehungsweise 2,5 U *Taq*-Polymerase. Das Temperaturprogramm beziehungsweise die Dauer der einzelnen Teilschritte richtete sich nach den Angaben der Hersteller der Polymerasen und nach den verwendeten Primern. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte auf Agarosegelen (4.2.4).

### 4.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA wurde im Fall von Plasmid pGKV259 mit den Enzymen PstI und HindIII durchgeführt. Das Plasmid pMG36e wurde entsprechend mit den Restriktionsenzymen XbaI und HindIII geschnitten. Das DNA-Fragment mit dem Gen der  $\beta$ -Fructosidase wurde dem Zielvektor entsprechend mit den analogen Enzymen verdaut. Der Verdau der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

### 4.2.4 Verwendung von Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente für analytische und präparative Zwecke aufzutrennen wurden Agarosegele verwendet (0,9 – 1,1 % (w/v)). Die DNA-Proben wurden zunächst mit 1/5 Volumen eines Probenpuffers (5-fach konzentriert) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei konstant 110 V. Als Größenstandard diente der Lambda DNA/EcoRI HindIII-Marker (Fermentas). Um die DNA-Banden anzufärben wurden die Gele anschließend in einer Ethidiumbromidlösung ( $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ ) für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Gele in einem Wasserbad gewaschen. Zur Visualisierung wurden die Gele auf einem Phototisch mit UV-Licht

(320 nm) bestrahlt. Durch die Verwendung einer Kamera und der Intas<sup>R</sup> GSD-Software konnten die Gelbilder am Rechner weiter bearbeitet und gespeichert werden.

#### **4.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das peqGold Gel Extraction Kit von peqLab Biotechnology GmbH verwendet. Die Durchführung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Der Erfolg der DNA-Isolierung aus dem Gel und die Bestimmung der Konzentration erfolgten mit einem weiteren Agarosegel.

#### **4.2.6 Modifizierung von DNA mit alkalischer Phosphatase**

Um die Religation eines geschnittenen und damit linearisierten Vektors auszuschließen wurden vor der Ligation die 5'-Phosphatreste mit der alkalischen Phosphatase SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) entfernt. Die Anwendung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

#### **4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Ligationen wurde das Fragment in dreifachem Überschuss gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt. Zuvor wurde die mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase (siehe 4.2.6) behandelt und präparativ über ein Agarosegel aufgereinigt und daraus isoliert (siehe 4.2.5). Die Ligationen erfolgten mittels T4 DNA-Ligase (Anwendung gemäß Hersteller, Fermentas GmbH) und wurden über Nacht bei 16 °C im Wasserbad durchgeführt. Im direkten Anschluss an die Ligation erfolgte entweder die Hitzeschock-Transformation von *E. coli* (siehe 4.2.9) oder die Elektroporation von *Lactobacillus frumenti* (siehe 4.2.10).

#### **4.2.8 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* und *L. frumenti***

Für die Herstellung kompetenter Zellen von *Escherichia coli* wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,3 – 0,5 bei 37 °C und 200 min<sup>-1</sup> inkubiert. Sobald die entsprechende Zellkonzentration erreicht war, wurde die Zellsuspension in vorgekühlte 50 mL

Sarstedt-Gefäße umgefüllt und pelletiert (4 °C, 15 min, 13000 min<sup>-1</sup>). Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 30 mL gekühltem TF1-Medium (Transformationspuffer 1) resuspendiert (siehe Tabelle 9.6). Es folgte eine Inkubation auf Eis für 15 Minuten. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert und das Pellet in 4 mL TF2-Medium (siehe Tabelle 9.7) resuspendiert. Die somit hergestellten kompetenten Zellen wurden entweder direkt für eine Transformation eingesetzt oder in 200 µL-Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren.

Für die Herstellung kompetenter Zellen von *Lactobacillus frumenti* wurden 200 mL mMRS4-Medium (supplementiert mit 1 % Glycin (w/v)) in einer Kulturflasche mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 130 min<sup>-1</sup> inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD<sub>660</sub>) von circa 0,3 – 0,5 wurde die Zellsuspension in Sarstedt-Gefäße überführt und pelletiert (4 °C, 15 min, 5000 min<sup>-1</sup>). Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 40 mL eiskalter Magnesiumchloridlösung (10 mM). Anschließend wurden die Zellen je einmal in eiskalter Glycerinlösung (10 % (v/v)) und Glycerin-Saccharoselösung (10 % (v/v), 0,5 M) gewaschen. Abschließend wurde die Zellsuspension in 1 mL der Glycerin-Saccharoselösung aufgenommen und zu je 100 µL aliquotiert. Die Aliquots wurden entweder direkt verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

#### **4.2.9 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli***

Für die Hitzeschock-Transformation wurde ein Aliquot der eingefrorenen kompetenten Zellen zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut beziehungsweise direkt aus dem Vorbereitungsablauf übernommen und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,1 µg Plasmid-DNA und eine weitere Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Nach dem Hitzeschock für 90 Sekunden im 42 °C-Wasserbad folgte ein direktes Abkühlen auf Eis für zwei Minuten. Es folgte eine Zugabe von 800 µL SOC-Medium wonach die transformierten Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurden. Abschließend wurde die Zellsuspension pelletiert (Raumtemperatur (RT), 10 min, 10.000 min<sup>-1</sup>), in 100 µL SOC-Medium resuspendiert und auf Antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen sowie über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

#### **4.2.10 Elektroporation von *Lactobacillus frumenti***

Zu 100 µL der kompetenten Zellen wurde circa 1 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und der Ansatz für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde danach in gekühlte Elektroporationsküvetten überführt und elektroporiert (1,2 kV, 1,0 kΩ, 25 µF). Direkt im Anschluss wurden 900 µL mMRS-Medium hinzugefügt und die Zellen danach bei 37 °C für vier bis fünf Stunden regeneriert. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (RT, 10 min, 10.000 min<sup>-1</sup>), in 100 µL mMRS-Medium resuspendiert und auf Antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für zwei bis drei Tage bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen.

#### **4.2.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Kontrolle der Proteinexpression beziehungsweise um Proteinlösungen aufzutrennen wurde die Methode der SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*) mit einem Trenn- und einem Sammelgel angewendet. Die Zusammensetzung der Pufferlösung ist in Tabelle 9.9 dargestellt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Lämmli-puffer (5-fach) versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Zur Größenkontrolle wurden geeignete Proteinstandards eingesetzt, die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie-Färbung (siehe 4.2.12).

#### **4.2.12 Coomassie-Färbung**

Um Proteinbanden aus Polyacrylamidgelen nachzuweisen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Fairbanks et al. (1971) angewendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele nacheinander in die drei Wasch- beziehungsweise Entfärbelösungen getaucht und für kurze Zeit in der Mikrowelle aufgeköcht. Zwischen dem Wechsel der Lösungen, beziehungsweise vor dem Aufkochen wurden die Gele noch für fünf Minuten darin geschwenkt. Um den Entfärbevorgang zu erleichtern und um den restlichen Coomassie-Farbstoff zu entfernen wurde ein Stück Zellstoff auf das Gel gelegt. Tabelle 9.12 zeigt die Zusammenstellung der entsprechenden Lösungen für die Coomassie-Färbung.

#### **4.2.13 Kolonie-Polymerasekettenreaktion**

Für eine schnelle Kontrolle des Erfolgs einer Transformation von *E. coli* oder auch *L. frumenti* wurde die Methode der Kolonie-Polymerasekettenreaktion (Kolonie-PCR) angewendet. Hierfür wurde Zellmaterial von Kolonien direkt von den Agarplatten mit sterilen Zahnstochern in PCR-Gefäße überführt. Das Zellmaterial wurde zunächst für circa 10 Minuten in den Gefäßen getrocknet bevor der vorbereitete PCR-Ansatz mit den entsprechenden Primern dazugegeben wurde. Als Primer wurden Vektorprimer verwendet welche außerhalb des inserierten Genfragmentes an die DNA banden. Hierdurch konnte, basierend auf den entstandenen PCR-Produkten, eine direkte Abschätzung des Erfolges der Ligation erfolgen (siehe 4.5.4). Die positiven Klone wurden anschließend sowohl auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen als auch in eine Flüssigkultur überführt. Von letzterer wurden die Zellen nach einer entsprechenden Kultivierungsdauer abgetrennt, das Plasmid zur Kontrolle isoliert und abschließend sequenziert.

### **4.3 Mikrobiologische Methoden**

Im Folgenden werden allgemeine Labormethoden, sowie Labormethoden aus der Molekularbiologie beschrieben.

#### **4.3.1 pH-Messung**

Die pH-Messung wässriger Lösungen wurde mit den Sonden der Fa. Schott durchgeführt. Vor jeder Messung wurde eine Zweipunktkalibrierung der pH-Elektrode bei pH 4,01 und 7,00 durchgeführt.

#### **4.3.2 Bestimmung der optischen Dichte**

Die Bestimmung der optischen Dichte von Zellsuspensionen erfolgte mit einem Einstrahlphotometer. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 660 nm durchgeführt. Der experimentell ermittelte Korrelationsfaktor  $f_x$  betrug für *Lactobacillus frumenti* 0,505. Gleichung 4.1 beschreibt die Umrechnung der optischen Dichte in die entsprechende Biotrockenmassekonzentration.

**Gleichung 4.1**  $c_x = OD \cdot f_x$

$c_x$	Konzentration der Biotrockenmasse, g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>
$OD$	optische Dichte bei einer spezifischen Wellenlänge, -
$f_x$	vom Photometer abhängiger Korrelationsfaktor, g L <sup>-1</sup> OD <sup>-1</sup>

### 4.3.3 Bestimmung der spezifischen Biotrockenmasse

Die experimentelle Bestimmung der spezifischen Biotrockenmasse erfolgte mittels Gravimetrie. Hierfür wurde eine Zellsuspension mit zuvor bestimmter optischer Dichte in zuvor getrockneten Probengefäßen (1,5 mL) pelletiert (13000 min<sup>-1</sup>, 5 min). Die Zellen wurden anschließend in Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 6,2) gewaschen und erneut pelletiert. Abschließend wurden die Proben bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet. Die Berechnung der Biotrockenmasse erfolgt nach Gleichung 4.2.

**Gleichung 4.2**  $c_x = (m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}}) \cdot V^{-1}$

$c_x$	Konzentration der Biotrockenmasse, g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>
$m_{\text{voll}}$	Probengefäß mit Zellen nach Trocknung, g
$m_{\text{leer}}$	Probengefäß ohne Zellen nach Trocknung, g
$V$	Volumen der vorgelegten Zellsuspension, L

### 4.3.4 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels Bradford-Assay

Der Proteingehalt einer Lösung wurde kolorimetrisch mit dem Bradford-Assay ermittelt. Hierfür wurden 5 µL Probe mit 250 µL Bradford-Reagenz in der Mikrotiterplatte vermischt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens fünf Minuten wurde der Farbumschlag bei 595 nm gemessen. Zur Bestimmung der

Proteinkonzentration in der Probe wurde eine entsprechende Standardgerade verwendet. Als Referenzprotein diente Bovine Serum Albumin (BSA).

#### 4.3.5 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss von *Lactobacillus frumenti* wurden die folgenden methodischen Ansätze gewählt: zum einen erfolgte der Zellaufschluss enzymatisch mittels Lysozym und anschließendem mechanischem Aufschluss durch die Schwingmühle. Zum anderen wurden die Zellen ausschließlich mechanisch durch die Anwendung von Ultraschall aufgeschlossen. Für den Aufschluss wurden 10 mL Probe genommen und nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 4500 min<sup>-1</sup>) mit Puffer gewaschen (0,1 M Tris-HCl, pH 6,2).

Für den enzymatischen Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 1 mL Lysozymlösung (100 mg mL<sup>-1</sup>) resuspendiert. Die Probe wurde anschließend für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und danach in der Schwingmühle mechanisch aufgeschlossen (1800 min<sup>-1</sup>, 6 min). Hierfür wurden in einem 2 mL Reaktionsgefäß circa 500 µL Glasperlen vorgelegt (0,18 – 0,2 mm Durchmesser) und 500 µL Probe hinzugegeben. Das Gefäß und die Glasperlen wurden vor dem Versuch gekühlt um ein zu starkes Aufwärmen der Probe zu verhindern. Um den Rohextrakt mit den Proteinen der Zelle zu gewinnen wurde die Probe abschließend zentrifugiert (4 °C, 15 min, 13000 min<sup>-1</sup>) und der Überstand für die weiteren Enzymtests eingesetzt.

Für den Zellaufschluss mit Ultraschall wurden die Zellen ebenfalls gewaschen und pelletiert. Der Zellaufschluss erfolgte aber direkt im Anschluss in mehreren Zyklen (5 x 30 Sekunden, 70 % Zyklus, 90 % Leistung) wobei die Zellprobe durchgehend auf Eis gehalten wurde. Es folgte eine abschließende Zentrifugation (4 °C, 15 min, 13000 min<sup>-1</sup>) um den Überstand abzunehmen.

Für den Zellaufschluss von *E. coli* wurden ebenfalls 10 mL Probe verwendet. Die Proben wurden abzentrifugiert (10 min, 4500 min<sup>-1</sup>) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Tris-HCl-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte ausschließlich mit der Schwingmühle. 500 µL Glasperlen wurden in einem 2,0 mL-Reaktionsgefäß vorgelegt und 500 µL Zellen hinzugegeben. Der Aufschluss erfolgte für 3 Minuten bei 1800 min<sup>-1</sup>. Der Reaktionsansatz wurde abschließend

abzentrifugiert (4 °C, 15 min, 13000 min<sup>-1</sup>) und der Überstand für Expressionsanalysen und für die SDS-PAGE eingesetzt.

#### **4.3.6 Ermittlung der Saccharose-spaltenden Aktivität**

Für die Ermittlung der enzymatischen Aktivität wurden in zellfreiem Milieu 100 µL des gewonnenen Rohextraktes nach dem Zellaufschluss mit 1,2 mL Saccharosehaltigem Puffer vermischt (50 mM Saccharose, 0,1 M Tris-HCl, pH 6,2). Der Versuch wurde im 37 °C-Wasserbad durchgeführt. Nach jeder Probennahme erfolgte ein thermisches Abstoppen der enzymatischen Reaktion im Thermoblock (10 min, 90 °C). Abschließend wurden die denaturierten Proteine abzentrifugiert (RT, 15 min, 13000 min<sup>-1</sup>) und der Überstand mittels Enzymtest auf die freigewordene Glucose hin untersucht (siehe 4.10). Die Glucosekonzentration wurde mit der Proteinkonzentration im Rohextrakt (ermittelt durch Bradford-Assay, 4.3.4) verrechnet.

### **4.4 Kultivierung von *Lactobacillus frumenti***

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Verfahren beruhen auf der Verwendung zweier Stämme von *Lactobacillus frumenti*: *Lactobacillus frumenti* (wt, Wildtyp) und *Lactobacillus frumenti BfrA*. Beide Stämme sind in den Stammsammlungen der Lehrstühle für Technische Mikrobiologie und Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München hinterlegt. Gemäß der Nomenklatur des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie tragen die Stämme darüber hinaus die Isolatnummerierung TMW 1.660 (*Lactobacillus frumenti*) und TMW 1.1489 (*Lactobacillus frumenti BfrA*).

#### **4.4.1 Stamm und Stammhaltung**

Alle verwendeten Stämme von *Lactobacillus frumenti* wurden ausgehend von der Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München verwendet. Um eine eigene Dauerkultur der Stämme anzulegen wurden 15 mL Saccharosemedium (Tabelle 9.13) in einem Sarstedt-Röhrchen mit

einer Impföse direkt aus der Dauerkultur angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 2 % (v/v) dieser Vorkultur wurden 50 mL Saccharosemedium angeimpft. Die Kultivierung erfolgte erneut bei 37 °C. Nach etwa 9 Stunden wurden die Zellen bei 4 °C (10 min, 5000 min<sup>-1</sup>) abzentrifugiert und in 1 mL Saccharosemedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurde eine 30 % (v/v) Glycerinkultur angelegt und in 1,5 mL Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren.

#### **4.4.2 Kultivierung von *L. frumenti* auf Agarplatten**

Um *Lactobacillus frumenti* auf Agarplatten zu kultivieren wurde Saccharosemedium hergestellt und mit 2 % (w/v) Agar versetzt. Die Zellen wurden entweder aus einer Dauerkultur heraus oder aber aus einer Vorkultur mit einer Impföse auf dem Agar ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend im Anaerocult-System anaerob bei 37 °C für zwei bis drei Tage kultiviert.

#### **4.4.3 Kultivierung in 50 – 250 mL Kulturflaschen**

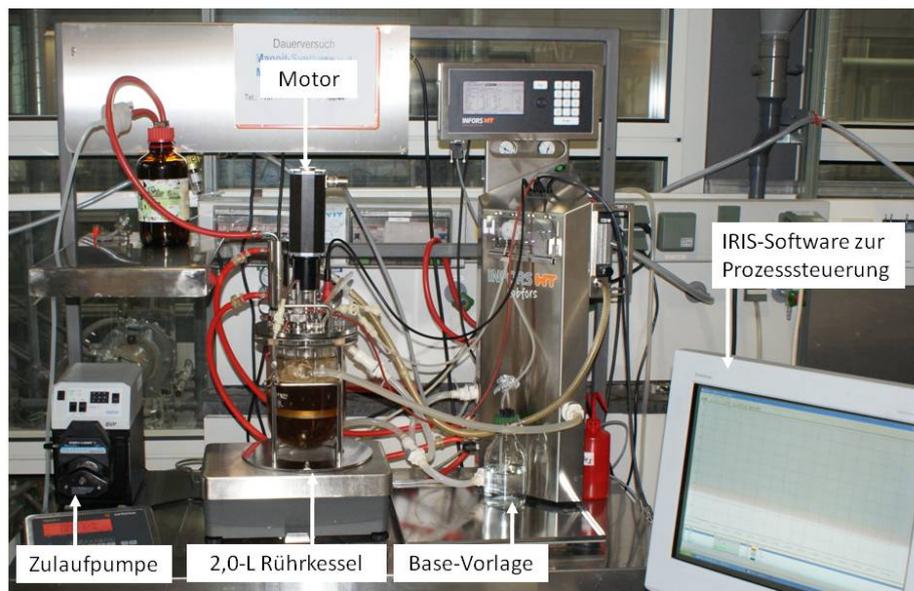
Die Kultivierung in 50 – 250 mL-Kulturflaschen erfolgte primär für die Herstellung von Vorkulturen für den Rührkesselreaktor beziehungsweise für Wachstumsversuche oder Biotransformationen ohne pH-Kontrolle. Die Flaschen wurden mit dem Nominalvolumen befüllt. Alle Kulturflaschen enthielten Kreuzmagnetrührer für eine bessere Durchmischung der Zellsuspension. Als Kultivierungsbedingungen wurden 37 °C und 300 min<sup>-1</sup> gewählt. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubationsschrank. Die Probennahme wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Proben wurden zur Bestimmung des pH, der Metabolitkonzentrationen (HPLC) und der Biotrockenmassekonzentration genommen. Vor dem erneuten Verschließen der Kulturflaschen wurde die Zellsuspension mit Stickstoff begast, um eine anaerobe Atmosphäre wiederherzustellen. Der zugeführte Stickstoff wurde über einen 0,2 µm-Filter keimfrei gehalten. Für die Durchmischung wurde eine Mehrfachrührplatte verwendet (Darstellung der Mehrfachrührplatte sowie von 50 mL-Kulturflaschen siehe Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1** Mehrfachrührplatte mit zwei 50 mL-Kulturflaschen: befüllt mit Melassemedium und leer.

#### 4.4.4 Kultivierung im 2,0 L-Rührkesselreaktor

Die Kultivierungen von *Lactobacillus frumenti* im 1-L Maßstab wurden im 2,0 L-Rührkesselreaktor „Labfors“ (Infors HT, Bottmingen) durchgeführt. Abbildung 4.2 zeigt einen typischen Aufbau an der Labfors-Einheit.



**Abbildung 4.2** Aufbau des 2,0 L-Rührkesselreaktors

Der Rührkesselreaktor wurde zunächst nur mit bidestilliertem Wasser autoklaviert. Das Medium wurde mittels externer Pumpe aus autoklavierten Vorlagenflaschen in den Behälter gepumpt. Die Vitaminlösung, beziehungsweise die Mangan- und Magnesiumlösung wurden über ein Septum sterilfiltriert in das Medium hinzugegeben. Als Standardkultivierungsbedingungen wurden 37 °C und 300 min<sup>-1</sup> gewählt. Der pH wurde mit 4 N NaOH auf den Wert 6,2 geregelt. Die Begasung mit Stickstoff zur Gewährleistung einer anaeroben Atmosphäre erfolgte in Abhängigkeit von der nachgeschalteten Abgasanalytik entweder mit 0,15 L min<sup>-1</sup> oder mit 1,0 L min<sup>-1</sup>. Über eine Probennahmeverrichtung wurden während der Prozessdauer Proben für die Bestimmung der Biotrockenmasse, der enzymatischen Aktivität und der Metabolitkonzentrationen genommen. Nach Bedarf wurde dem Medium Clerol FBA als Antischaummittel hinzugegeben.

#### **4.4.5 Kultivierung im 7,5 L-Rührkesselreaktor**

Für Kultivierungen mit 3 bis 5 L Medium wurde ein 7,5 L-Rührkesselreaktor (Infors HT, Bottmingen) verwendet. Die Kultivierungsbedingungen wurden analog zum 2,0 L-Rührkesselreaktor gewählt.

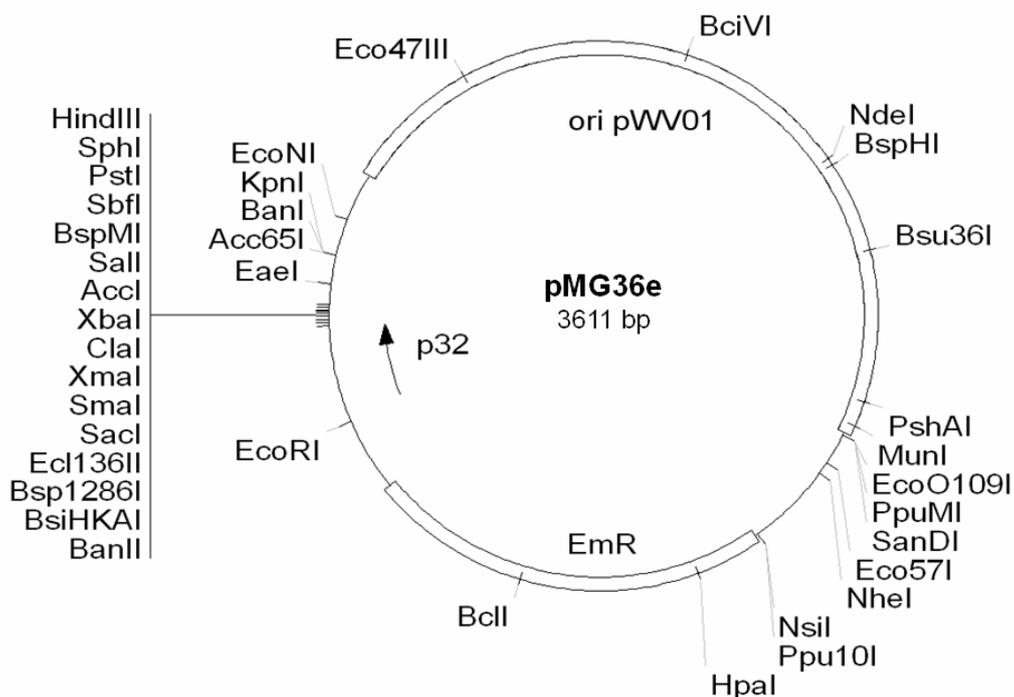
### **4.5 Klonierung der $\beta$ -Fructofuranosidase aus *Bifidobacterium lactis* DSM 10140**

Für die Klonierung der  $\beta$ -Fructosidase wurden die beiden Vektoren pMG36e und pGKV259 ausgewählt. Beide Vektoren sind als sogenannte Shuttle-Vektoren einsetzbar und können somit bei einer Transformation des Zwischenwirtes *E. coli* eingesetzt werden. Im Folgenden werden beide Vektoren näher charakterisiert und beschrieben.

#### **4.5.1 Shuttle-Vektor pMG36e**

Der Shuttle-Vektor pMG36e (van de Guchte et al. 1989, Xiang et al. 2000, Brurberg et al. 1994) hat eine Größe von 3611 Basenpaaren (bp). Er besitzt eine Resistenzkassette für Erythromycin und eine „Multiple Cloning Site“ (MCS) von 46 bp

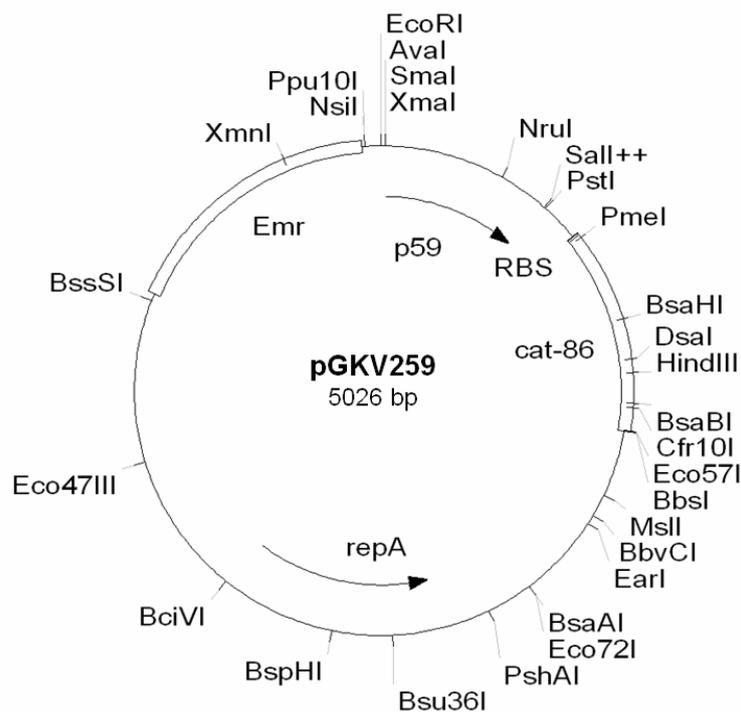
Länge. Die MCS beinhaltet eine Vielzahl von Schnittstellen für Restriktionsenzyme um eine Klonierung zu erleichtern. Für die Klonierung des Genfragmentes wurden die beiden Restriktionsenzyme XbaI (TCT AGA) und HindIII (AAG CTT) ausgewählt. Beide Enzyme schneiden den Vektor jeweils einmal wodurch bei einem Doppelverdau ein Sequenzelement von 24 bp Länge entfernt wird. Beide Schnittstellen liegen in der MCS. Der Vektor pMG36e trägt einen P32-Promotor welcher aus *Lactococcus lactis* stammt und konstitutiv exprimiert wird. Der Replikationsstartpunkt repA entstammt dem Vektor pWV01 und eignet sich sowohl für eine Verwendung in *E. coli* als auch in *Lactobacillus spec.* (Kok et al. 1984, Perez-Arellano et al. 2001, Leenhouts et al. 1991, del Solar et al. 1998). Abbildung 4.3 zeigt den beschriebenen Vektor.



**Abbildung 4.3** Darstellung des Shuttle-Vektors pMG36e. Der Vektor trägt einen konstitutiven Promotor (P32), einen Replikationsursprung (enthalten in ori PWV01) und eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker gegen das Macrolidantibiotikum Erythromycin. Die Größe des Vektors umfasst 3,6 kb, wobei zusätzlich eine mehrfache Klonierungsstelle (MCS) in der Sequenz enthalten ist.

#### 4.5.2 Shuttle-Vektor pGKV259

Der Shuttle-Vektor pGKV259 (Leenhouts et al. 1995, van der Vossen et al. 1987, van der Vossen et al. 1992, Brurberg et al. 1994) umfasst 5026 bp und trägt ebenfalls wie pGM36e eine Erythromycinresistenz. Der Vektor trägt keine eindeutige MCS, wird allerdings noch durch das zusätzliche Sequenzelement einer Chloramphenicol-acetyltransferase ergänzt. Der konstitutive Promotor P59 entstammt ebenfalls *Lactococcus lactis*. Der Replikationsorigin *repA* des Vektors läuft entgegen der Leserichtung. Für die Klonierung der  $\beta$ -Fructosidase werden die beiden Restriktionsenzyme *HindIII* (AAG CTT) und *PstI* (CTG CAG) verwendet. Beide Enzyme schneiden innerhalb des Vektors je einmal und entfernen im Doppelverdau ein Sequenzelement mit einer Länge von 616 bp. Abbildung 4.4 zeigt den beschriebenen Vektor.



**Abbildung 4.4** Darstellung des Shuttle-Vektors pGKV259. Der Vektor trägt einen konstitutiven Promotor (P59), einen Replikationsursprung *repA*, eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker gegen das Macrolidantibiotikum Erythromycin sowie das Gen für eine Chloramphenicolacetyltransferase. Die Größe des Vektors umfasst 5,0 kb.

### 4.5.3 Modifizierung des Genfragmentes der $\beta$ -Fructofuranosidase

Um das Zielgen der  $\beta$ -Fructofuranosidase in die Zielvektoren klonieren zu können wurde sowohl das 5' als auch das 3'-Ende der Gensequenz mittels PCR modifiziert. Für die Veränderung wurden Primer mit „Überhang“ synthetisiert, welche eine Amplifikation des Gens von der genomischen DNA von *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 ermöglichten (siehe Abbildung 4.5). Die synthetischen forward-Primer (BfrA\_Pst\_f2 und BfrA\_Xba\_f2) enthielten einen Überhang für das Restriktionsenzym sowie eine komplementäre Schnittstelle für die Restriktionsenzyme PstI beziehungsweise XbaI. Darüber hinaus enthielten sie ein Sequenzelement welches als Ribosomenbindestelle (RBS) fungierte und einen angeschlossenen Spacer, auf welchen das Startcodon ATG folgte. Die überbleibende Sequenz diente der Bindung an die komplementäre Zielsequenz an der genomischen DNA von *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. Der Überhang des reverse-Primers (BfrA\_HindIII\_r2) war für beide Vektoren identisch und enthielt neben der Bindesequenz für die genomische DNA ein Stop-Codon und eine Bindestelle sowie einen Überhang für das Restriktionsenzym HindIII.

Für die Gestaltung der Ribosomenbindestelle in den forward-Primern wurden verschiedene RBS bei Milchsäurebakterien aus der Literatur miteinander verglichen und daraus eine Sequenz abgeleitet. Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht über die Länge verschiedener Ribosomenbindestellen bei Milchsäurebakterien.

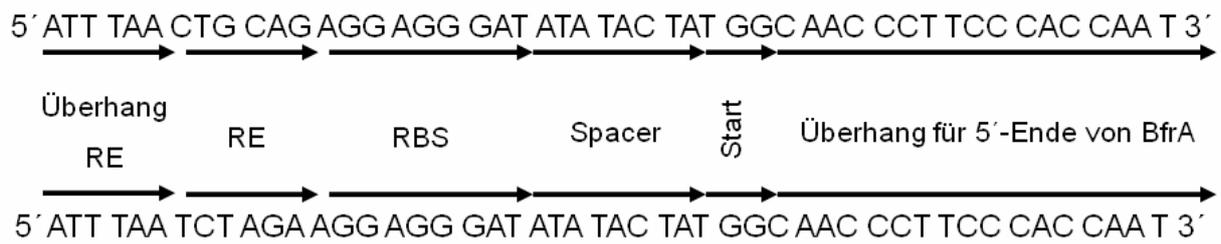
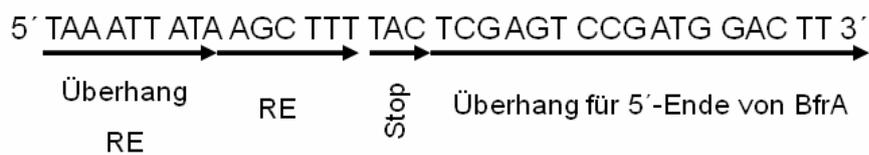
**Tabelle 4.1** Übersicht über den Aufbau verschiedener Ribosomenbindestellen bei Milchsäurebakterien

X	1	2	3	4	5	6	7	8	Anzahl der Gene	Mikroorganismus	Quelle
	G	G	A	G	G	A			1 <sup>a</sup>	<i>L. sanfranciscensis</i>	1)
	G	G	A	G	G				6	<i>L. acidophilus</i>	2)
A	G	G	A						6	<i>L. bulgaricus</i>	2)
A	G	G	A	G	G				17	<i>L. casei</i>	2)
A	G	G	A	G					7	<i>L. helveticus</i>	2)
	G	G	A	G	G				9	<i>L. pentosus</i>	2)
	G	G	A	G	G				11	<i>L. plantarum</i>	2)
	G	A	A	A	G	G	A	G	32	<i>L. delbrueckii</i>	3)
	G	G	A	G	G				1 <sup>b</sup>	<i>L. casei</i>	4)

<sup>a</sup> *cobQ*, <sup>b</sup> *estB*

1) Pavlovic 2006, 2) Pouwels und Leer 1993, 3) Mikkonen et al. 1994, 4) Fenster et al. 2003

Aus den vorliegenden Daten wurde für die Ribosomenbindestelle die Konsensussequenz AGG AGG GA ausgewählt. Zusätzlich wurde an das 3'-Ende der Ribosomenbindestelle ein Spacer mit 8 Nukleotiden Länge angefügt. Abbildung 4.5 zeigt eine Übersicht über die Zusammenstellung und den Aufbau der Primer.

*BfrA\_PstI\_f2**BfrA\_Xba\_f2**BfrA\_HindIII\_r2*

**Abbildung 4.5** Übersicht über den Aufbau der verwendeten Primer zur Klonierung der  $\beta$ -Fructosidase in die Zielvektoren pGKV259 und pMG36e. Die forward-Primer enthalten einen Überhang für das Restriktionsenzym sowie eine entsprechende Schnittstellensequenz. Darüber hinaus eine Ribosomenbindestelle, eine Überbrückungssequenz sowie das Startcodon. Die Reverse-Primer tragen ebenfalls eine Überhangsequenz für das Restriktionsenzym sowie eine Stopsequenz.

Die Amplifikation des  $\beta$ -Fructosidasegens erfolgte in Abhängigkeit der gewählten Primer. Als Polymerase wurde die *KOD*-Polymerase von Novagen eingesetzt.

#### 4.5.4 Oligonukleotidsequenzen

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide und ihre Sequenzen zur Amplifikation der Zielsequenz aus dem Genom von *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Eine genaue Beschreibung befindet sich in Kapitel 4.5.3.

**Tabelle 4.2** Oligonukleotidsequenzen

BfrA\_PstI\_f2 (forward-Primer für Zielvektor pGKV259)

5' ATT TAA CTG CAG AGG AGG GAT ATA TAC TAT GGC AAC CCT TCC CAC CAA T 3'

BfrA\_Xba\_f2 (forward-Primer für Zielvektor pMG36e)

5' ATT TAA TCT AGA AGG AGG GAT ATA TAC TAT GGC AAC CCT TCC CAC CAA T 3'

BfrA\_HindIII\_r2 (reverse-Primer für die Zielvektoren pGKV259 und pMG36e)

5' TAA ATT ATA AGC TTT TAC TCG AGT CCG ATG GAC TT 3'

Tabelle 4.3 zeigt eine Übersicht über die eingesetzten Vektorprimer. Die Vektorprimer wurden vor allem bei Kolonie-PCR Reaktionen eingesetzt um die Insertion der Zielsequenz (BfrA) im Anschluss an die Ligation in den Vektor zu überprüfen.

**Tabelle 4.3** Sequenzen der Vektorprimer

pGKV6052\_for

5' CGA CAA GCT AGA CCA TTG AAA AC 3'

pGKV6052\_rev

5' CAT ATT GAC CGG CAT GAT AGC C 3'

pMG36\_bfrA\_for

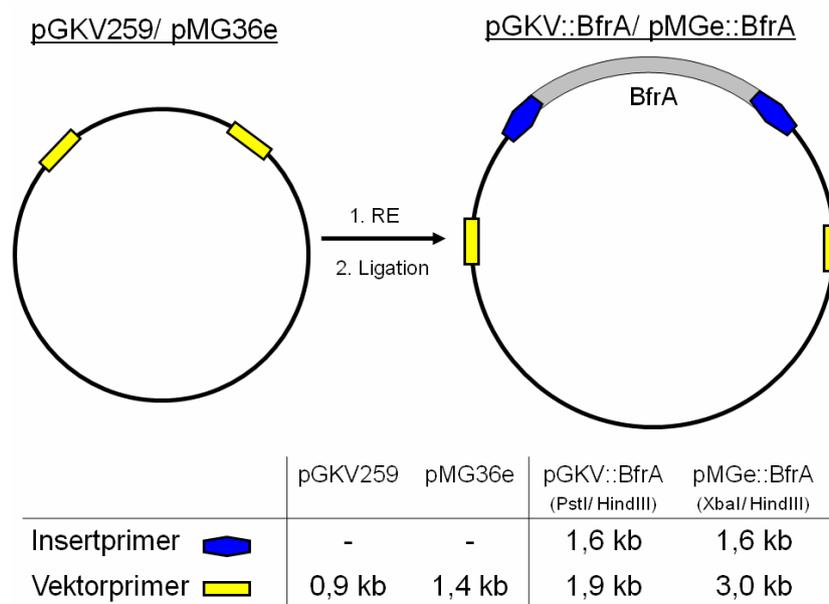
5' CAA GGG TAA AAT GGC CTT TTC CTG 3'

pMG36\_bfrA\_rev

5' GAG CCA GTT GGG ATA GAG CG 3'

Zur Kontrolle der Klonierung wurden alle rekombinanten Vektoren sequenziert. Als Primer für die Sequenzierung wurden sowohl die Vektor- als auch Insertprimer eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte über die Firma GATC-Biotech. Auswertung und Kontrolle der erzielten Basensequenz wurden mit der Software GATCViewer der Firma GATC-Biotech und dem “*Basic Local Alignment Search Tool*” (Blast) durchgeführt. Letzteres ist sowohl geeignet um Gen- als auch Proteinsequenzen zu vergleichen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hierfür kann auch auf Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken zugegriffen werden.

Die Abbildung 4.6 gibt eine Übersicht über die zu erwartenden PCR-Produkte in Abhängigkeit der gewählten Primerpaare.



**Abbildung 4.6** Übersicht über die Größen der zu erwartenden DNA-Fragmente bei Verwendung von Insert- und Vektorprimern für die nativen und rekombinanten Vektoren pGKV259/ pGKV::BfrA sowie pMG36e/ pMGe::BfrA.

#### 4.5.5 Verifizierung von *Lactobacillus frumenti* mittels 16S-PCR

Um eine Verunreinigung der *Lactobacillus*-Kultur nach der Elektroporation auszuschließen wurde zusätzlich eine PCR mit 16S-Oligonukleotiden durchgeführt. Die Primersequenzen sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Sequenzen der ribosomalen RNA werden in der Molekularbiologie seit langer Zeit als molekulare Marker eingesetzt. Durch die Verteilung von konservierten und variablen Motiven sind sie spezifisch für jeden Organismus und ermöglichen eine genaue Stammanalyse.

**Tabelle 4.4** 16S-Primer

616V

5' AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG 3'

609R

5' ACT ACY VGG GTA TCT AAK CC 3'

Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend mit den identischen Primern sequenziert. Abschließend wurde ein Abgleich mit einer öffentlichen Datenbank durchgeführt und die Sequenz mit hinterlegten 16S-Sequenzen verglichen.

## 4.6 *Ganzzell-Biotransformation*

### 4.6.1 Herstellung des Biokatalysators für die Ganzzell-Biotransformation

Für die Ganzzell-Biotransformation wurden die Zellen entweder im Satz- oder Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor hergestellt. Im Satzverfahren erfolgte die Kultivierung der Zellen meist mit 100 g L<sup>-1</sup> Saccharose (Saccharosemedium). Vor dem Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen aus dem Reaktor steril entnommen und anschließend abzentrifugiert (4 °C, 4500 min<sup>-1</sup>, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,1 M Tris-HCl (pH 6,2)

resuspendiert. Die somit gewaschenen Zellen wurden erneut zentrifugiert und anschließend für die Ganzzell-Biotransformation eingesetzt.

#### **4.6.2 Ganzzell-Biotransformation im 50 – 200 mL-Maßstab**

Für Ganzzell-Biotransformationen im mL-Maßstab wurden die Zellen zunächst wie beschrieben vorbereitet (4.6.1). Das gewaschene und abzentrifugierte Pellet wurde direkt in Melassemedium resuspendiert, wobei die gewünschte Biotrockenmassenkonzentration bereits vor dem Waschschrift eingestellt werden musste. Direkt nach dem Resuspendieren wurde eine Probe zur Bestimmung des Ausgangszustandes genommen. Nach jeder Probennahme unter der Sterilbank wurden die Kulturflaschen mit Stickstoff begast um ein sauerstofffreies Milieu zu erzeugen.

#### **4.6.3 Ganzzell-Biotransformation im Liter-Maßstab**

Für die Ganzzell-Biotransformation im Liter-Maßstab wurden sowohl der 2,0 L- als auch der 7,5 L-Rührkesselreaktor eingesetzt. Die Zellen wurden wie beschrieben (4.6.1) vorbereitet und über eine Vorlageflasche in den Rührkesselreaktor gepumpt. Die Versuchsbedingungen entsprachen den Einstellungen während der Vorkultivierung:  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ,  $T = 37 \text{ °C}$ , pH 6,2. Zur pH-Regelung wurde eine 4 N Natronlauge verwendet. Um die verschiedenen Instrumente zur Abgasanalytik zu versorgen erfolgte eine Begasung mit Stickstoff entweder mit  $0,15$  oder  $1,0 \text{ L min}^{-1}$ . In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus dem Rührkesselreaktor entnommen, um die Biotrockenmassenkonzentration und die Zuckermetabolite mittels HPLC zu bestimmen. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Zellen während des Versuches wurden mindestens 10 mL Probe entnommen.

## **4.7 Zuckerrübenmelasse**

### **4.7.1 Gewinnung von Zuckerrübenmelasse**

Die angelieferten Zuckerrüben werden zunächst gereinigt und zerkleinert, bevor im nächsten Schritt der Zucker durch heißes Wasser aus der Rübe herausgelöst wird. Der Zuckergehalt beträgt in etwa 17 % (w/w). Aus dem dabei entstandenen „Dünnsaft“ werden vor einer weiteren Aufkonzentrierung zum „Dicksaft“ durch Kalk und Kohlensäure die „Nicht-Zuckerbestandteile“ abgetrennt. Um aus dem Dicksaft Zuckerkristalle zu gewinnen, wird dieser aufgekocht und dadurch zusätzlich Feuchtigkeit entzogen. Durch die Zugabe von Impfkristallen, sowie durch eine Temperaturabsenkung wird die Kristallisation des Zuckers erleichtert. Es entsteht eine sogenannte Kochmasse, bestehend zu je 50 % aus Zuckerkristallen und Sirup. In darauf folgenden Zentrifugationen werden die Zuckerkristalle von der Kochmasse abgetrennt, wobei als Endprodukt die Zuckerrübenmelasse übrig bleibt. Da eine weitere Kristallisation nicht möglich ist, beträgt der Zuckergehalt je nach Qualität der Zuckerrüben immer noch in etwa 40 - 50 %. Als Futterergänzungsmittel für die Milchviehwirtschaft hatte Melasse bereits seit langer Zeit einen hohen Stellenwert. Als Ausgangssubstrat für Fermentationszwecke, vor allem für Ethanol- und Milchsäurebildung, erfährt Zuckerrübenmelasse einen stetig zunehmenden Zuspruch (Dumbrepatil et al. 2008, Park und Baratti 1991, Atiyeh H. und Duvnjak 2002, Aksu et al. 1986). Aufgrund des hohen Restzuckergehaltes werden zusätzliche Anstrengungen unternommen, um beispielsweise durch Ionenausschlusschromatographie den Zucker oder aber auch Aminosäuren von der Melasse abzutrennen (Ulber et al. 2000).

### **4.7.2 Zusammensetzung und Eigenschaften von Zuckerrübenmelasse**

Aufgrund der saisonalen und örtlichen Unterschiede, hauptsächlich hervorgerufen durch unterschiedliche Witterungsbedingungen und Bodenarten, kommt es zu Schwankungen in der Zusammensetzung zwischen verschiedenen Chargen von Zuckerrübenmelasse. Tabelle 4.5 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Bestandteile und Konzentrationen gemäß den Angaben der Deutschen Melasse Handelsgesellschaft ([www.deutsche-melasse.de](http://www.deutsche-melasse.de)).

**Tabelle 4.5** Übersicht über die Bestandteile und Konzentrationen in Zuckerrübenmelasse (Deutsche Melasse Handelsgesellschaft)

Gesamtzucker	42 – 50 %	Natrium	1,00 %
Feuchtigkeit	20 – 25 %	Chlorid	1,20 %
Asche	8 – 11 %	Kalium	3,50 %
Betain	4 – 5 %	Selen	0,01 mg kg <sup>-1</sup>
Stickstoff, total	1,6 - 2,0 %	Kobalt	4,0 mg kg <sup>-1</sup>
Magnesium	0,05 %	Bor	3,0 mg kg <sup>-1</sup>
Nitrat	0,30 %	Kupfer	2,0 mg kg <sup>-1</sup>
Schwefel	0,35 %	Mangan	1,0 mg kg <sup>-1</sup>
Phosphor	0,04 %	Eisen	0,01 mg kg <sup>-1</sup>
Calcium	0,40 %	Zink	0,02 mg kg <sup>-1</sup>

Der pH der verwendeten Zuckerrübenmelasse liegt im alkalischen Bereich (~ pH 8). Die Dichte von Melasse wurde mit 1,4 g cm<sup>-3</sup> ermittelt (Deutsche Melasse Handelsgesellschaft mbH). Der Saccharosegehalt in der verwendeten Melassecharge von Südzucker wurde sowohl mittels HPLC (44,8 % ± 1,5) als auch enzymatisch (44,6 % ± 4,9) bestimmt.

#### **4.8 Aufarbeitung von Fermentationslösungen zur Produktisolierung**

Für die Aufarbeitung von Melassehaltigen Fermentationslösungen wurde in einem ersten Schritt zunächst die Biomasse mittels Zentrifugation abgetrennt. In einem weiteren Schritt erfolgte die Abtrennung der Farbstoffe durch Aktivkohle. Darüber hinaus sollte durch einen Rotationsverdampfer das Volumen der Fermentationslösung reduziert werden, um dadurch eine Aufkonzentrierung von D-Mannit in der Lösung zu ermöglichen.

## 4.9 Flüssigchromatographische Analytik von Edukten und Produkten

Die Probenanalytik mittels HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) erfolgte, in Abhängigkeit der zu analysierenden Stoffe, mit verschiedenen HPLC-Säulen und Laufbedingungen (siehe Tabelle 4.6). Zur Vorbereitung wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend für 15 Minuten bei 13000 min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Der Überstand wurde darüber hinaus mit einem 0,2 µm Filter filtriert. Zum Schutz der Hauptsäulen wurden handelsübliche und empfohlene Vorsäulen verwendet. Zur Detektion der aufgetrennten Zucker und Zuckeralkohole wurde ein RI-Detektor (Brechungsindex-Detektor) verwendet.

**Tabelle 4.6** Übersicht über die verwendeten HPLC-Säulen und die entsprechenden Laufbedingungen

Säule	<b>Asahipak NH2P-50</b> (Shodex)
Laufmittel	Acetonitril, 75 % (v/v)
Säulentemperatur	25 °C
Flussrate	1 mL min <sup>-1</sup>
Probenlaufzeit	40 min
Säule	<b>MetaCarb87P</b> (Varian)
Laufmittel	bidest. Wasser
Säulentemperatur	85 °C
Flussrate	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Probenlaufzeit	30 min

Säule	<b>OAKC</b> (Merck)
Laumittel	Schwefelsäure (5 mM)
Säulentemperatur	75 °C
Flussrate	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Probenlaufzeit	30 min

Säule	<b>Aminex HPX-87H</b> (BioRad)
Laufmittel	Schwefelsäure (5 mM)
Säulentemperatur	35 °C
Flussrate	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Probenlaufzeit	26 min

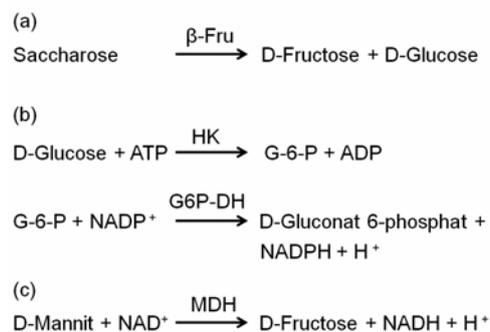
Mit den HPLC-Säulen Shodex NH2P-50 und MetaCarb 87P wurden die Zucker Saccharose, Fructose und Glucose sowie der Zuckeralkohol D-Mannit nachgewiesen. Mit den HPLC-Säulen OAKC und Aminex HPX-87H wurden hingegen die organischen Säuren Lactat und Acetat sowie auch Ethanol nachgewiesen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Standardproben mit bekannten Konzentrationen eingesetzt.

#### **4.10 Enzymatische Analytik von Saccharose, D-Mannit und D-Glucose**

Für die enzymatische Auswertung von Fermentationsproben hinsichtlich Saccharose und D-Mannitkonzentration wurden kommerziell erhältliche Enzymkits (K-SUFRG 12/05 für Saccharose, K-MANOL 01/05 für D-Mannit) der Firma Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd.) verwendet. Die Tests wurden in 96-Well Mikrotiterplatten und bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei für den Saccharose- und D-Mannit-Assay jeweils nur 1/10 der vorgegebenen Volumina eingesetzt wurde. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte über Standardgeraden (maximale

Substratkonzentration für Saccharose und D-Mannit jeweils  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ). Es wurden jeweils Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Die bei der Analyse der Saccharosespaltung freigewordene Glucose wurde mit einem Enzymtest der Firma R-Biopharm analysiert (D-Glucose, 10716251035). Abbildung 4.7 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Enzymreaktionen (Saccharose (a) und (b), Glucose (b), D-Mannit (c)). Tabelle 4.7 zeigt das entsprechende Pipettierschema für den Glucose-Assay. Lösung 2 wurde für den Test 1:20 mit Lösung 1 verdünnt.



**Abbildung 4.7** Ablauf der einzelnen Enzymreaktionen unter Verwendung eines kommerziellen Enzymkits zur Bestimmung der D-Mannitkonzentration.  $\beta$ -Fru,  $\beta$ -Fructosidase; HK, Hexokinase; G6P-DH, Glucose 6-phosphatdehydrogenase; MDH, D-Mannitdehydrogenase.

**Tabelle 4.7** Pipettierschema zum enzymatischen Nachweis von D-Glucose bei 340 nm

	Leerwert	Probe
Lösung 1 (Puffer)	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Probe	-	20 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	80 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$
Mischen der Probe und Messung von $E_1$ bei 340 nm nach einer Inkubation von etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur		
Lösung 2	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
Mischen der Probe und Messung von $E_2$ bei 340 nm nach Ablauf der Reaktion		

Tabelle 4.8 und Tabelle 4.9 zeigen eine Übersicht über das Pipettierschema zur enzymatischen Bestimmung von Saccharose und D-Mannit.

**Tabelle 4.8** Saccharose-Assay

	<b>Leerwert</b>	<b>Probe</b>
Lösung 6 ( $\beta$ -Fructosidase)	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Probe	-	10 $\mu$ L
Mischen der Probe und Inkubation für mindestens 5 Minuten bei 37 °C.		
ddH <sub>2</sub> O	200 $\mu$ L	190 $\mu$ L
Lösung 1 (Imidazol-Puffer)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Lösung 2 (NADP <sup>+</sup> / ATP)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Mischen der Probe und Messung von <b>E<sub>1</sub></b> bei 340 nm nach etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur		
Lösung 3 (HK/ G6P-DH)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Mischen der Probe und Messung von <b>E<sub>2</sub></b> nach Ablauf der Reaktion		

**Tabelle 4.9** D-Mannit-Assay

	<b>Leerwert</b>	<b>Probe</b>
ddH <sub>2</sub> O	210 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Probe	-	10 $\mu$ L
Lösung 1 (TrisHCl-Puffer)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Lösung 2 (NAD <sup>+</sup> )	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Mischen der Proben und Messung von <b>E<sub>1</sub></b> nach etwa 2 Minuten		
Lösung 3 (MDH)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Mischen der Proben und Messung von <b>E<sub>2</sub></b> nach Ablauf der Reaktion bei Raumtemperatur		

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse und Vergleiche beruhen auf der Verwendung zweier Stämme von *Lactobacillus frumenti*: *Lactobacillus frumenti* (Wildtyp) und *Lactobacillus frumenti BfrA*.

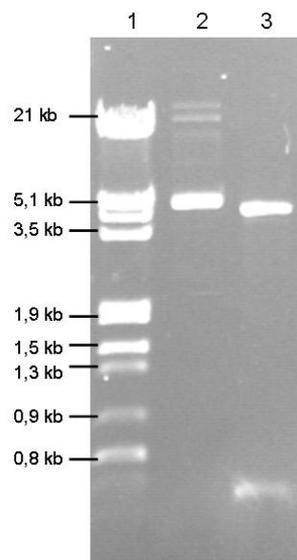
### 5.1 Klonierung der $\beta$ -Fructofuranosidase aus *Bifidobacterium lactis* DSM 10140

#### 5.1.1 Modifizierung und Amplifikation der $\beta$ -Fructosidase mittels PCR

Um das Gen der  $\beta$ -Fructosidase für die Klonierung vorzubereiten, erfolgte zunächst eine Amplifikation des Zielgens mittels PCR (Agarosegel nicht gezeigt) um die Sequenz mit den synthetisierten Überhängen zu versehen und um sie an den Zielvektor anzupassen (siehe 4.5.3). Mit Hilfe des Größenstandards wurden die DNA-Banden der PCR-Produkte auf etwa 1600 bp bestimmt. Als DNA-Vorlage diente genomische DNA von *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. Im weiteren Verlauf wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel isoliert (siehe 4.2.5), mit den Restriktionsenzymen PstI und HindIII beziehungsweise XbaI und HindIII geschnitten (siehe 4.2.3) und erneut zur Aufreinigung auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Konzentration wurde mit Hilfe des Größenstandards ermittelt.

### 5.1.2 Restriktionsverdau der Shuttle-Vektoren pGKV259 und pMG36e

Um die Vektoren für die Klonierung vorzubereiten wurde der Vektor pGKV259 zunächst mit PstI und HindIII, sowie pMG36e mit XbaI und HindIII geschnitten. Durch den Restriktionsverdau im Doppelansatz wurde aus dem Vektor pGKV259 ein 600 Basenpaar-Fragment entfernt. Bei pMG36e führte der Doppelverdau zu einem Fragmentverlust mit der Größe von 24 bp. Letzteres kann aufgrund seiner Größe auf einem Agarosegel nicht nachgewiesen werden. Abbildung 5.1 zeigt das Ergebnis eines zweifachen Restriktionsverdaus bei dem Vektor pGKV259. Aufgrund der geringen Größe von 600 bp ist das herausgeschnittene Fragment auf dem Agarosegel nur schwer erkennbar.



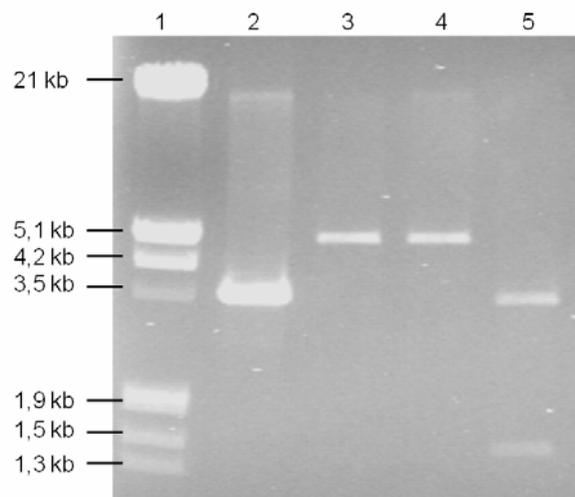
**Abbildung 5.1** Durch den zweifachen Restriktionsverdau mit PstI und HindIII wurde der Vektor pGKV259 (5,0 kb) für die Insertion der  $\beta$ -Fructosidase vorbereitet. Der geschnittene Vektor umfasst 4,6 kb. 1: Größenstandard, 2: nativer Vektor pGKV259, 3: pGKV259 nach Restriktionsverdau mit PstI und HindIII.

Das Auftreten von mehreren Banden (siehe Abbildung 5.1, Bahn 2) bei einem nativen beziehungsweise ungeschnittenen Vektor beruht auf der Tatsache, dass Plasmide in mehreren Konformationen auftreten können. Um die genaue Größe bestimmen zu können empfiehlt sich ein Restriktionsverdau, woraus eine lineare Konformation resultiert. Das kleinere PCR-Produkt mit der Größe von 0,6 kb ist das Ergebnis des Doppelverdaus von pGKV259 durch PstI und HindIII. Der ursprüngliche

Vektor mit einer Größe von circa 5 kb wurde somit in zwei Fragmente mit 0,6 kb und 4,4 kb zerteilt. Um den geschnittenen Vektor für die Ligation mit dem PCR-Produkt vorzubereiten, erfolgte eine Dephosphorylierung mit einer alkalischen Phosphatase (siehe 4.2.6) und eine abschließende Aufreinigung über ein Agarosegel.

### 5.1.3 pMGe::*BfrA*

Für die Ligation von dem Vektor pMG36e mit dem Zielgen der  $\beta$ -Fructosidase wurden das geschnittene PCR-Produkt und der dephosphorylierte Vektor eingesetzt. Die Transformation erfolgte anschließend in den Zwischenwirt *E. coli* BHB2600. Nach einer zweitägigen Kultivierung wurden Klone gepickt und eine Plasmidisolierung durchgeführt. Abbildung 5.2 zeigt sowohl das Ergebnis der Plasmidisolierung als auch das Resultat eines anschließenden Doppelverdau des rekombinanten Vektors pMGe::*BfrA*. Durch die Aktivität der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Hind*III konnte das Gen der  $\beta$ -Fructosidase als Kontrolle wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden (Bahn 5).

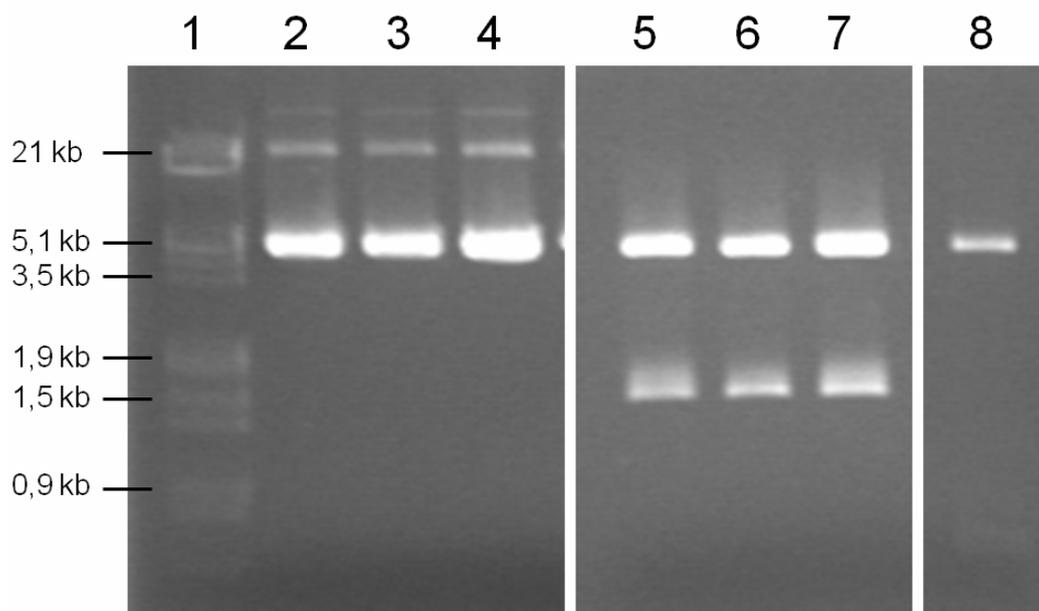


**Abbildung 5.2** Restriktionsverdau von pMGe::*BfrA* im Einzel- und Doppelansatz nach erfolgreicher Klonierung und Plasmidisolierung aus *E. coli* BHB2600. 1: Größenstandard, 2: pMGe::*BfrA* (ungeschnitten), 3 und 4: pMGe::*BfrA* nach Einzelverdau mit *Xba*I und *Hind*III, 5: pMGe::*BfrA* nach Doppelverdau mit *Xba*I und *Hind*III.

### 5.1.4 pGKV::BfrA

Für die Identifizierung positiver Klone nach einer Transformation von *E. coli* BHB2600 mit dem Vektor pGKV::BfrA wurde zunächst die Methode der Kolonie-PCR gewählt. Nach einer zweitägigen Inkubation auf Erythromycinhaltigen Agarplatten wurden die gewachsenen Kolonien gepickt und direkt für eine Kolonie-PCR mit Insert- und Vektorprimer (siehe 4.5.4) verwendet (Agarosegel nicht gezeigt).

Positive Klone wurden daraufhin in LB-Medium kultiviert und der rekombinante Vektor aus den Zellen isoliert. Abbildung 5.3 zeigt sowohl das Ergebnis der Plasmidisolierung aus drei Klonen ebenso wie den anschließenden Doppelverdau durch die Restriktionsenzyme PstI und HindIII.

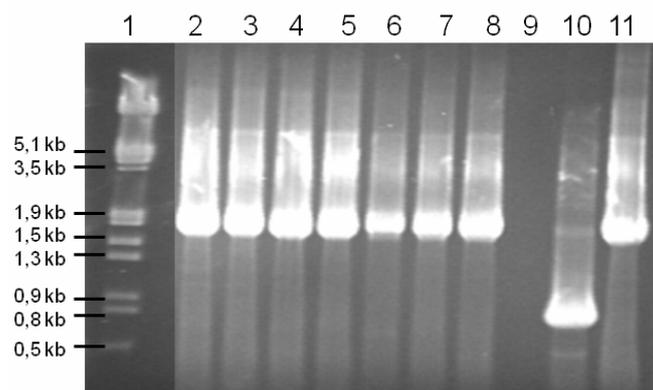


**Abbildung 5.3** Plasmidisolierung dreier Klone nach Transformation von *E. coli* BHB2600 mit pGKV::BfrA. Die Plasmide wurden direkt für einen Kontrollverdau mit PstI und HindIII eingesetzt um die korrekte Insertion des Gens zu überprüfen. 1: Größenstandard; 2 - 4: native Plasmide (pGKV::BfrA), isoliert aus 3 verschiedenen Klonen; 5 - 7: Doppelverdau der isolierten Plasmide mit PstI und HindIII; 8: Kontrollverdau des Leervektors pGKV259.

Wie auf dem Agarosegel zu sehen ist (Bahn 5 – 7) konnte aus allen drei Klonen das Insert erfolgreich durch einen Doppelverdau mit PstI und HindIII entfernt werden.

### 5.1.5 Transformation von *Lactobacillus frumenti* mit pGKV::BfrA

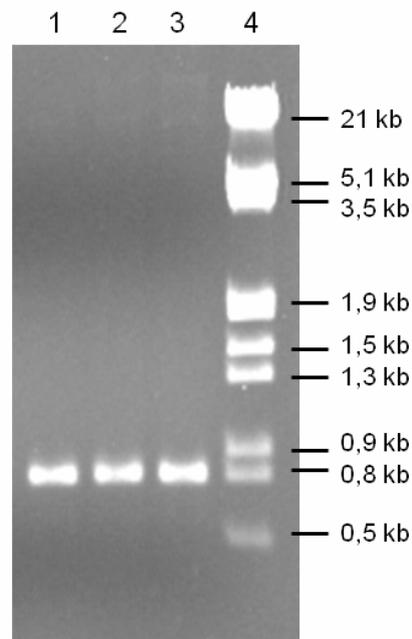
Der aus *E. coli* BHB2600 isolierte rekombinante Vektor wurde direkt für eine Transformation von *Lactobacillus frumenti* eingesetzt. Nach einer dreitägigen Inkubation unter sauerstofffreien Bedingungen wurden mehrere Kolonien gepickt und für eine Kolonie-PCR mit Vektorprimern eingesetzt. Abbildung 5.4 zeigt ein Agarosegel nach Auftragung der PCR-Produkte. Alle verwendeten Klone zeigen ein 1,9 kb großes PCR-Produkt, was auf eine erfolgreiche Elektroporation hinweist.



**Abbildung 5.4** Kolonie-PCR mit Vektorprimern nach Elektroporation von *Lactobacillus frumenti* mit dem rekombinanten Vektor pGKV::BfrA. 1: Größenstandard; 2 - 8: verschiedene Klone; 9: H<sub>2</sub>O; 10: Negativprobe (pGKV259); 11: Positivprobe (pGKV::BfrA).

### 5.1.6 Kontroll-PCR mit vergleichender 16S-Sequenzierung

Um eine Verunreinigung der eingesetzten *Lactobacillus*-Kultur nach der Elektroporation und nach dem Überimpfen in neues Medium auszuschließen wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, wobei Primer verwendet wurden welche spezifisch an die 16S rRNA binden (siehe Abbildung 5.5). Die PCR-Produkte wurden mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt und mit Hilfe der eingesetzten 16S-Primer sequenziert.



**Abbildung 5.5** PCR-Produkte einer Kolonie-PCR, durchgeführt mit 16S-Primern zur Verifizierung der Probenreinheit. Verwendet wurden diverse Klone die bereits positiv auf das Vorhandensein von Vektor pGKV::BfrA getestet wurden. 1 – 3: Klon #25, #23, #4; 4: Größenstandard.

Die gewonnenen Sequenzen wurden abschließend mit Hilfe einer Online-Datenbank (Blast-Tool) abgeglichen. Es wurde eine zweifelsfreie Übereinstimmung mit der hinterlegten Sequenz von *Lactobacillus frumenti* (Isolat TMW 1.666) gefunden. Für die weiteren Versuche wurde Klon Nummer 4 in die Stammsammlung der Lehrstühle für Technische Mikrobiologie und Bioverfahrenstechnik aufgenommen. Entsprechend der Nomenklatur des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie trägt der verwendete Klon die Isolatnummer TMW 1.1489.

In den folgenden Darstellungen wird der rekombinante Stamm mit der Bezeichnung *Lactobacillus frumenti BfrA* aufgeführt.

### 5.1.7 Diskussion

Die Auswahl der Vektoren pMG36e und pGKV259 als Expressionsvektoren stützte sich auf ihre Bewertung als geeignete Shuttle- und Expressionsvektoren in Gram-positiven Keimen (Gaeng et al. 2000, Brurberg et al. 1994, Xiang et al. 2000).

Erst durch eine Verlängerung der Überhänge an dem PCR-Produkt der  $\beta$ -Fructosidase für die Restriktionsenzyme konnte eine erfolgreiche Klonierung des Gens in die Shuttle-Vektoren pMG36e und pGKV259 gewährleistet werden. Durch die Insertion in die Empfängerplasmide entstanden die rekombinanten Vektoren pMGe::*BfrA* und pGKV::*BfrA*. Beide Plasmide tragen konstitutiv exprimierte Promotoren (P32 und P59) weshalb die Genexpression nicht induzierbar ist. Eine Transformation der rekombinanten Plasmide erfolgte zunächst in *E. coli* BHB2600. Für die Auswahl positiver Klone wurde eine Selektion hinsichtlich der Plasmid-kodierten Resistenz gegen das Antibiotikum Erythromycin ausgenutzt. Durch die Verwendung von *E. coli* als Zwischenwirt konnte eine Plasmidkontrolle nach erfolgter Plasmidisolierung wesentlich erleichtert werden. Die Korrektheit der Sequenz ausgewählter Klone wurde durch eine vergleichende Sequenzierung bestätigt. Basierend auf den positiven Sequenzanalysen wurden die Plasmide in *Lactobacillus frumenti* elektroporiert. Positive Klone konnten hierbei nur mit dem Vektor pGKV::*BfrA* erzielt werden. Die Reinheit der Kultur von *Lactobacillus frumenti* wurde mittels 16S-Sequenzierung bestätigt. Die eingesetzten Erythromyckonzentrationen für eine dauerhafte Selektion betragen für *Escherichia coli* 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  und für *Lactobacillus frumenti BfrA* 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 5.2 Expressionsanalyse der $\beta$ -Fructosidase

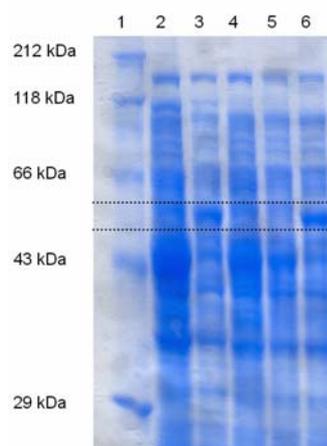
Für die Expressionsanalyse wurden die Zellen aus einer Vorkultivierung heraus abzentrifugiert. Der Zeitpunkt der Probenahme war Versuchsabhängig. Sollte die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Wachstumsphase bestimmt werden, wurden die Proben während der Verzögerungsphase, der exponentiellen Wachstumsphase und der stationären Phase genommen. Bei Versuchen auf der Basis von Satz- oder Zulaufverfahren erfolgten die Probennahmen in regelmäßigen Zeitabständen.

Die Kontrolle der Genexpression mittels SDS-PAGE erfolgte mit einem Rohextrakt von *E. coli* Rosetta und *E. coli* Tuner. Die Zellen waren mit den Plasmiden pGKV259 und pGKV::*BfrA* transformiert worden.

### 5.2.1 Kontrolle der Genexpression mittels SDS-PAGE

Zur Kontrolle der Genexpression wurde der Rohextrakt (aus Zellen isolierte Proteinfraction) aus Wildtyp- und transformierten Stämmen von *E. coli* Rosetta und *E. coli* Tuner eingesetzt. Die Zellen wurden ebenfalls wie *E. coli* BHB2600 als Zwischenwirte eingesetzt und aufgrund ihrer verbesserten Expressionsleistung ausgewählt.

Abbildung 5.6 zeigt eine SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Als Kontrollproben wurden Rohextrakte von *E. coli* Rosetta (wt) und *E. coli* Tuner (wt) auf das Gel aufgetragen. Darüber hinaus wurden Rohextrakte von den folgenden Stämmen verwendet: *E. coli* Rosetta pGKV::BfrA, *E. coli* Tuner pGKV259 und *E. coli* Tuner pGKV::BfrA. Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde bei zwei Stämmen eine stärkere Proteinbande (circa 60 kDa) nachgewiesen. Bei den beiden Proben handelt es sich um die Rohextrakte von *E. coli* Rosetta pGKV::BfrA und *E. coli* Tuner pGKV::BfrA. Sowohl die Wildtyp-Stämme als auch *E. coli* Tuner pGKV259 zeigen keine deutliche Expressionsleistung bei entsprechenden Proteingrößen. Das Ergebnis dieser SDS-PAGE kann als Beleg für die Expression der  $\beta$ -Fructosidase in den *E. coli*-Zwischenwirten, als auch als Beweis für die Funktionalität des genetischen Konstruktes herangezogen werden.

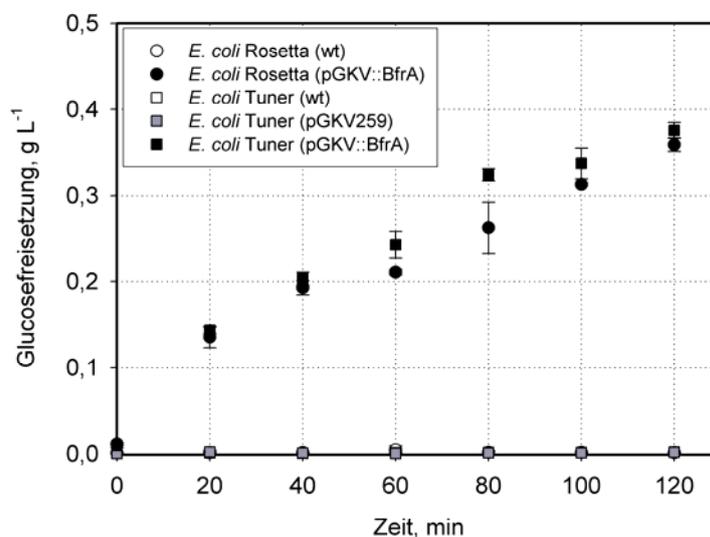


**Abbildung 5.6** SDS-PAGE mit Rohextrakten aus transformierten Stämmen von *E. coli*. 1: Größenstandard, 2: *E. coli* Rosetta (wt); 3: *E. coli* Rosetta pGKV::BfrA; 4: *E. coli* Tuner (wt); 5: *E. coli* Tuner pGKV259; 6: *E. coli* Tuner pGKV::BfrA. Die Linien markieren die zu erwartende Laufhöhe des exprimierten Proteins.

### 5.2.2 Enzymatische Aktivität im Zellaufschluss

Neben dem Nachweis der Genexpression mittels SDS-PAGE wurden Versuche zur Überprüfung der direkten enzymatischen Aktivität durchgeführt. Ziel der Versuche war der Nachweis von enzymatischer Saccharosespaltung im Rohextrakt von *E. coli* spec. und der Nachweis einer verbesserten Saccharosespaltung des rekombinanten Stammes *Lactobacillus frumenti* BfrA gegenüber dem Wildtyp *Lactobacillus frumenti*. Die Versuche wurden entsprechend den Kapiteln 4.3.4 und 4.3.6. durchgeführt.

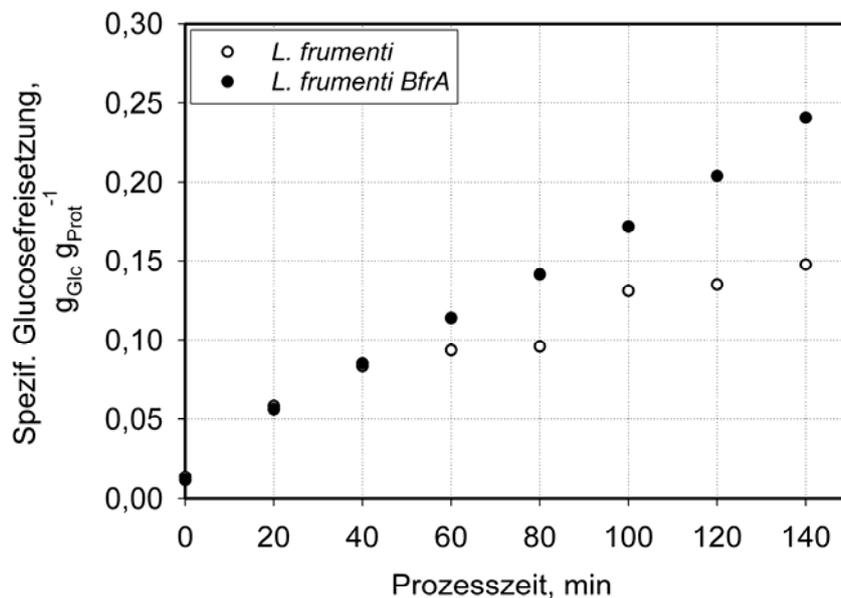
Abbildung 5.7 zeigt das Ergebnis einer enzymatischen Saccharosespaltung im Rohextrakt von *E. coli* Rosetta und *E. coli* Tuner, jeweils transformiert mit dem rekombinanten Plasmid pGKV::BfrA. Gegenüber den transformierten Zellen konnte bei den Rohextrakten von *E. coli* Rosetta und Tuner (jeweils Wildtyp) und *E. coli* Tuner pGKV259 keine Saccharosespaltung und damit Glucosefreisetzung festgestellt werden.



**Abbildung 5.7** Glucosefreisetzung im Rohextrakt von *E. coli* Rosetta und *E. coli* Tuner, jeweils transformiert mit dem Plasmid pGKV::BfrA. Als Kontrolle diente der Rohextrakt von *E. coli* Rosetta/ Tuner (wt, Wildtyp) und *E. coli* Tuner pGKV259. Aufgetragen ist die freigesetzte Glucosemenge als Funktion der Prozesszeit.

Die Glucosefreisetzung im Reaktionsansatz mit Rohextrakten von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* wurde auf die Proteinkonzentration bezogen (siehe Abbildung 5.8).

Nach einer Reaktionszeit von 100 Minuten konnten von *Lactobacillus frumenti* 0,11  $\text{g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{Prot}}^{-1}$  gebildet werden (absolut), wohingegen *Lactobacillus frumenti BfrA* 0,16  $\text{g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{Prot}}^{-1}$  in demselben Zeitraum freisetzen konnte. Nach einer Versuchsdauer von 140 Minuten betrug die gebildete Glucosemenge sogar 0,23  $\text{g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{Prot}}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti BfrA*) gegenüber 0,13  $\text{g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{Prot}}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti*).



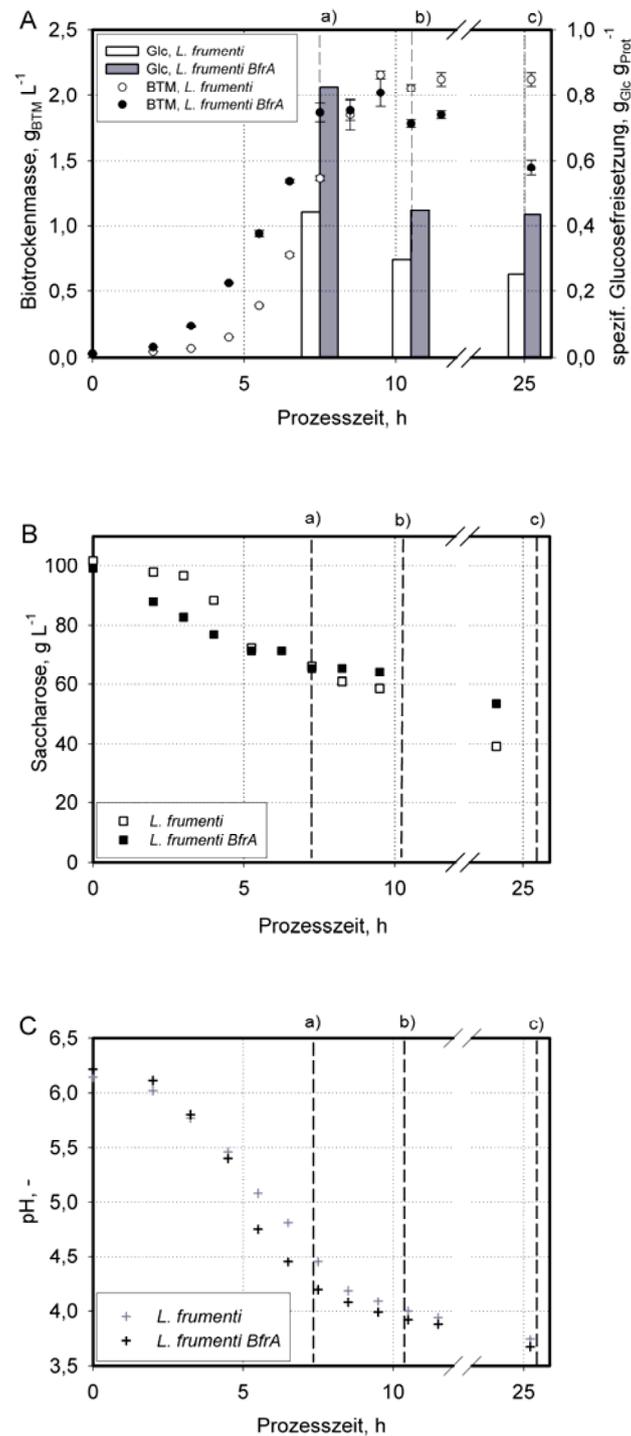
**Abbildung 5.8** Spezifische Glucosefreisetzung im Rohextrakt von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA*. Aufgetragen ist die freigesetzte Glucose nach enzymatischer Saccharosespaltung in zeitlicher Abhängigkeit. Die Glucosekonzentration wurde mit der entsprechenden Proteinkonzentration im Rohextrakt verrechnet.

Die Glucosefreisetzung im Rohextrakt des Wildtyps kann durch die Aktivität einer Saccharose 6-phosphatthylase oder Saccharosephosphorylase erklärt werden.

### 5.2.3 Enzymatische Saccharosespaltung während verschiedener Prozessphasen

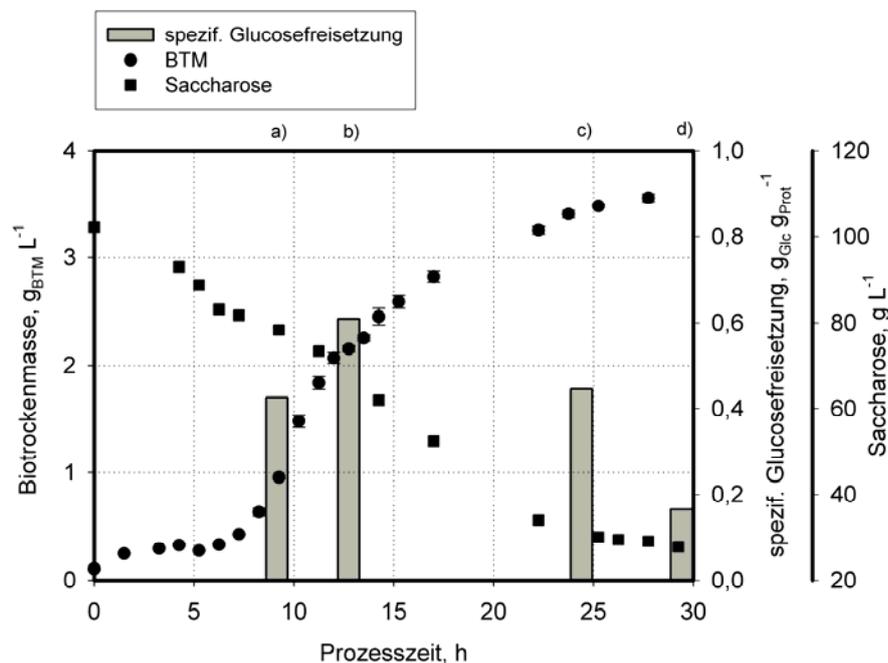
Da die Expression der  $\beta$ -Fructosidase durch den Promotor P59 in *Lactobacillus frumenti* *BfrA* konstitutiv erfolgt, sollte die Expression als Funktion der Wachstumsrate ermittelt werden. Aufgrund dessen wurden sowohl im Satz- als auch im Zulaufverfahren zu verschiedenen Zeitpunkten Proben zur Bestimmung der Saccharose-spaltenden Aktivität genommen. Für eine Quantifizierung der Enzymaktivität in Abhängigkeit der Wachstumsphase wurden bei einer Satzkultivierung in Saccharosemedium (modifiziert nach de Man et al. 1960, siehe 9.3, Tabelle 9.13) während der exponentiellen Wachstumsphase (nach 7,5 Stunden) und zu Beginn der stationären Phase (10,5 Stunden) Proben genommen. Eine letzte Probennahme erfolgte bei Versuchsabbruch nach etwa 25 Stunden. Der Versuch wurde ohne pH-Kontrolle durchgeführt.

Abbildung 5.9 zeigt bei beiden Stämmen von *Lactobacillus frumenti*, sowohl *Lactobacillus frumenti* als auch *Lactobacillus frumenti BfrA*, eine zeitliche Veränderung der Enzymaktivität. Während der Kultivierung in Saccharosemedium ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) kommt es im Rohextrakt aus der exponentiellen Wachstumsphase zu einer relativ hohen spezifischen Glucosefreisetzung. Von *Lactobacillus frumenti* werden nach 100 Minuten  $0,66 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  im Rohextrakt nachgewiesen, bei *Lactobacillus frumenti BfrA* beträgt die Konzentration  $0,83 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$ . Erreichen die Zellen die stationäre Wachstumsphase nach einer Kultivierungsdauer von 10 Stunden ist bereits ein starker Rückgang der spezifischen Glucosefreisetzung im Rohextrakt zu verzeichnen ( $0,44 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  für beide Stämme). Im weiteren Verlauf stagniert die spezifische Glucosefreisetzung (Rohextrakt aus der stationären Phase) bei *Lactobacillus frumenti BfrA* ( $0,43 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$ ) und nimmt bei *Lactobacillus frumenti* weiter ab ( $0,38 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$ ).



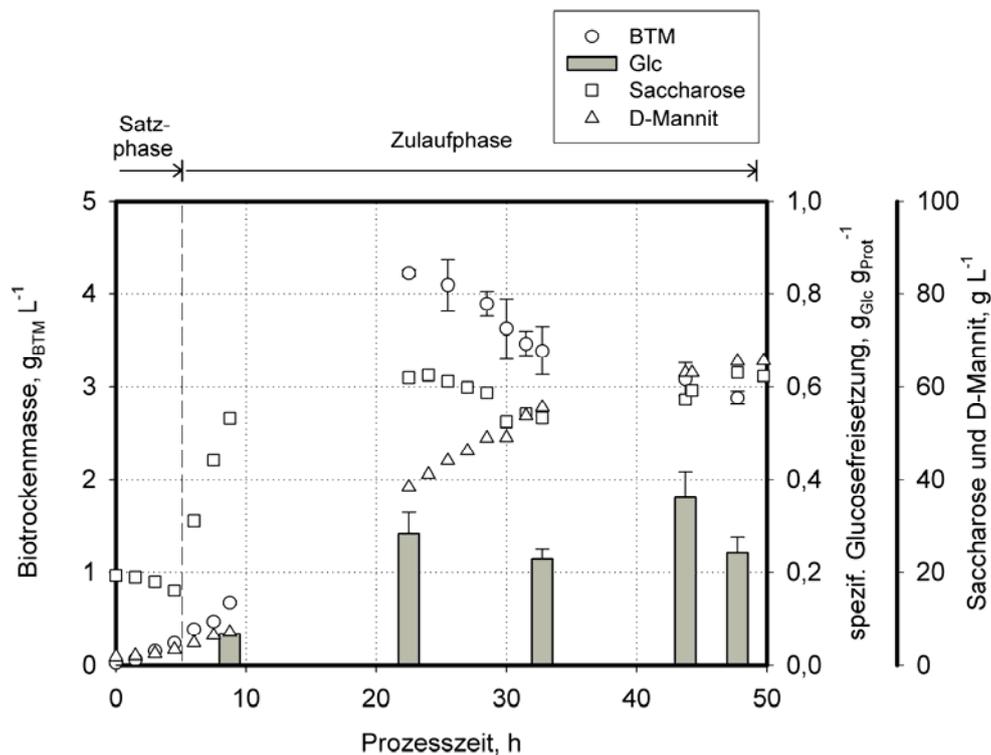
**Abbildung 5.9** Darstellung der spezifischen Glucosefreisetzung (A) nach 120 Minuten im Rohextrakt von *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* während unterschiedlicher Wachstumsphasen. Die Probenahme erfolgte nach 7,5 h (a), 10,5 h (b) und 25 h (c). (B) Substratkonzentration; (C) pH-Verlauf. Die Kultivierung erfolgte in Saccharosemedium ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) ohne pH-Kontrolle. ( $V = 0,1 \text{ L}$ ;  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ).

Die spezifische Glucosefreisetzung im Rohextrakt während einer Kultivierung von *Lactobacillus frumenti* BfrA im Satzverfahren mit pH-Kontrolle ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Wie bereits in Versuchen ohne pH-Kontrolle gezeigt, ist eine starke Zunahme der Enzymaktivität während der Wachstumsphase zu beobachten. Die Zeitpunkte der Probenahmen sind ebenfalls in Abbildung 5.10 markiert. Mit zunehmender Versuchsdauer kommt es, ebenso wie im Satzverfahren ohne pH-Kontrolle zunächst zu einer Zunahme der spezifischen Glucosefreisetzung. Die höchste Glucosefreisetzung wurde hierbei im Rohextrakt der Probe aus der späten exponentiellen Wachstumsphase gemessen ( $0,61 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$ ). Im weiteren Verlauf kam es erneut zu einem Rückgang der Saccharose-spaltenden Aktivität ( $0,44 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  beziehungsweise  $0,17 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  nach 24 und 30 Stunden).

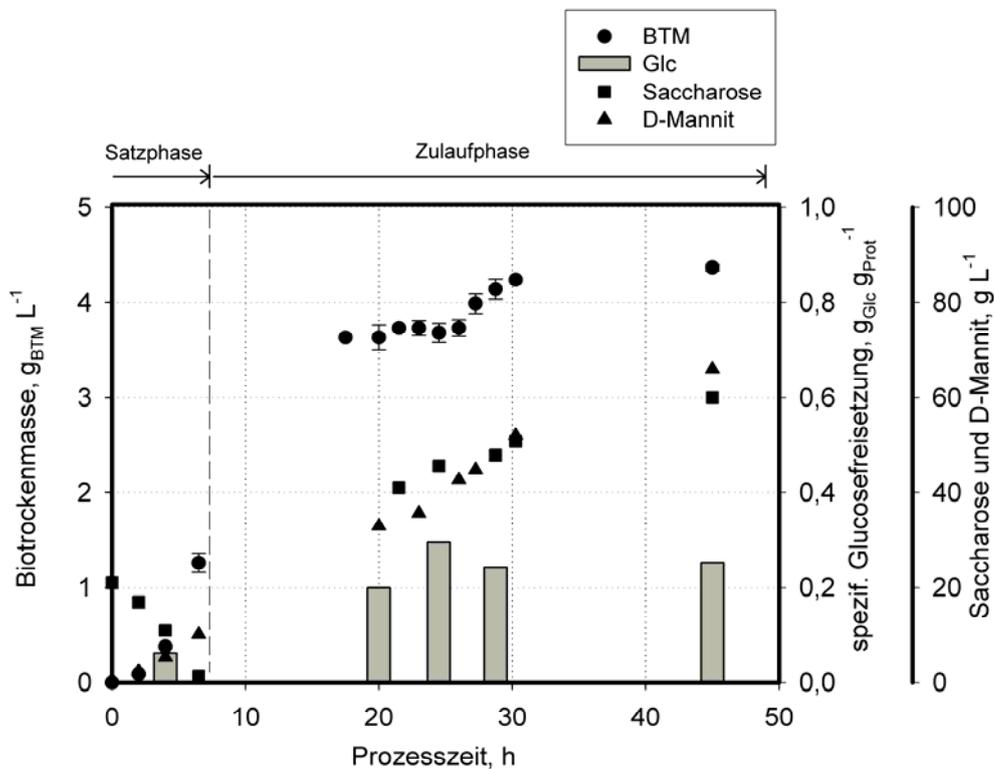


**Abbildung 5.10** Kultivierung von *Lactobacillus frumenti* BfrA in Saccharosemedium ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) mit pH-Kontrolle. Während unterschiedlicher Wachstumsphasen (a – d) erfolgte eine Probenahme zur Ermittlung der spezifischen Glucosefreisetzung. ( $V = 3,0 \text{ L}$ ;  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ).

Auf der Grundlage der Versuche im Satzverfahren mit und ohne pH-Kontrolle erfolgte ebenfalls eine Bestimmung der spezifischen Glucosefreisetzung im Zulaufverfahren mit Saccharosemedium unter kontrollierten pH-Bedingungen, dargestellt für *Lactobacillus frumenti* (Abbildung 5.11) und *Lactobacillus frumenti BfrA* (Abbildung 5.12). Die Substratkonzentration im Zulaufmedium betrug  $300 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose bei einer Flussrate von  $0,1 \text{ L h}^{-1}$ .



**Abbildung 5.11** Wachstumsverlauf von *Lactobacillus frumenti* im Zulaufverfahren mit Saccharosemedium unter pH-kontrollierten Bedingungen und Messung der spezifischen Glucosefreisetzung im Rohextrakt. Die Substratkonzentration im Zulaufmedium betrug  $300 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose. ( $V_0 = 2,0 \text{ L}$ ;  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ;  $F = 0,1 \text{ L h}^{-1}$ ).



**Abbildung 5.12** Wachstumsverlauf von *Lactobacillus frumenti BfrA* im Zulaufverfahren mit Saccharosemedium unter pH-kontrollierten Bedingungen und Messung der spezifischen Glucosefreisetzung im Rohextrakt. Die Substratkonzentration im Zulaufmedium betrug  $300 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose. ( $V_0 = 2,0 \text{ L}$ ;  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ;  $F = 0,1 \text{ L h}^{-1}$ ).

Sowohl *Lactobacillus frumenti*, als auch *Lactobacillus frumenti BfrA* erreichten im Zulaufverfahren maximale Biotrockenmassekonzentrationen von  $4,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ , wobei für den Wildtyp ab einer Prozesszeit von 25 Stunden ein Rückgang der Biotrockenmassekonzentration zu beobachten war. Die D-Mannitkonzentration im Medium betrug nach einer Versuchsdauer von etwa 50 Stunden  $65,5 \text{ g L}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti*) beziehungsweise  $66,1 \text{ g L}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti BfrA*) nach 45 Stunden. Die spezifische Glucosefreisetzung nach 24 Stunden (*Lactobacillus frumenti BfrA*) beziehungsweise 22,5 Stunden (*Lactobacillus frumenti*) Prozesszeit erreichte im Rohextrakt nach einer Reaktionszeit von 120 Minuten  $0,30$

$\text{g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{Prot}}^{-1}$  und  $0,28 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{Prot}}^{-1}$ . Bei Prozessende betrug die spezifische Glucosefreisetzung für beide Stämme  $0,24 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{g}_{\text{Prot}}^{-1}$ .

#### 5.2.4 Diskussion

Da ein Nachweis der Proteinexpression im Rohextrakt von *E. coli* BHB2600 mit dem Vektor pGKV::BfrA nicht möglich war, wurden die beiden Expressionsstämme *E. coli* Rosetta und *E. coli* Tuner als Zwischenwirte für eine Transformation mit dem Vektor ausgewählt. Bei beiden Stämmen konnte eine stärker exprimierte Proteinbande mit der Größe von etwa 60 kDa festgestellt werden. Diese Größe entspricht dem publizierten Wert (59,4 kDa) der isolierten und aufgereinigten  $\beta$ -Fructosidase aus *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 (Ehrmann et al. 2003). Zur Kontrolle wurde darüber hinaus der Rohextrakt von *E. coli* Rosetta (Wildtyp) und *E. coli* Tuner (Wildtyp) eingesetzt. Als weitere Kontrolle diente der Rohextrakt von *E. coli* Tuner, transformiert mit dem Leervektor pGKV259. Bei allen drei Stämmen konnte keine vergleichbare Proteinbande identifiziert werden.

Im Rohextrakt von *Lactobacillus frumenti* BfrA (transformiert mit dem Vektor pGKV::BfrA) konnte keine stärker exprimierte Proteinbande mit der Größe von 60 kDa nachgewiesen werden obwohl die Kontrolle auf Sequenzebene (Nachweis durch Kolonie-PCR und Sequenzierung) positiv war. Dieser Umstand kann auf einem schlechteren Zellaufschluss gegenüber *E. coli* oder auf einer schwächeren Expressionsleistung durch die Zellen beruhen. Dass eine gute Proteinexpression und somit eine Kontrolle mittels SDS-PAGE durch den Promotor P59 des Vektors pGKV259 möglich ist, zeigten Gaeng et al. (2000), wobei sie auch darauf hinwiesen, dass der Promotor P32 des Vektors pMG36e eine stärkere Expressionsleistung aufweist. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die neu synthetisierte Ribosomenbindestelle (siehe 4.5.3) keine optimale Proteinexpression ausgehend von der Gensequenz ermöglicht.

Eine weitere Bestätigung der Funktionalität des Vektors pGKV::BfrA erfolgte durch den Nachweis der Saccharose-spaltenden Aktivität im isolierten Rohextrakt der Zellen.  $0,31 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  Glucose beziehungsweise  $0,34 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  Glucose wurden nach 100 Minuten im Rohextrakt von *E. coli* Rosetta und *E. coli* Tuner, beide transformiert mit pGKV::BfrA, gemessen. Für die Rohextrakte von *E. coli* Rosetta und

*E. coli* Tuner (jeweils Wildtyp) und *E. coli* Tuner pGKV259 konnte keine Glucosefreisetzung nachgewiesen werden. Diese klare Trennung bezüglich vorhandener und fehlender Saccharosespaltung entspricht dem Phenotyp von *E. coli* Rosetta und *E. coli* Tuner. Beide Stämme besitzen keine Enzyme für eine Verwertung von Saccharose.

Da *Lactobacillus frumenti* bereits natürlicherweise über Saccharosespaltende Enzyme verfügt, ist auch beim Wildtyp bei Vorlage von Saccharose eine Zunahme der frei gesetzten Glucose zu verzeichnen. In einem Satzversuch ohne pH-Kontrolle betrug die freigesetzte Glucosekonzentration nach 120 Minuten  $0,66 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  beziehungsweise  $0,83 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  für den Wildtyp und den rekombinanten Stamm. Die Probenahme erfolgte während der Wachstumsphase (7,5 Stunden). Erfolgte die Probenahme während der stationären Wachstumsphase nach 25 Stunden Prozesszeit konnte nur noch etwa halb so viel freie Glucose nachgewiesen werden ( $0,38 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  beziehungsweise  $0,43 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$ ). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei einer Kultivierung von *Lactobacillus frumenti BfrA* mit pH-Kontrolle ( $0,40 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  und  $0,21 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  nach 24 beziehungsweise 30 Stunden Prozessdauer).

Im pH-kontrollierten Zulaufverfahren mit Saccharosemedium zeigten beide Stämme im Prozessintervall von 20 bis 48 Stunden eine nahezu gleich bleibende Glucosefreisetzung im Rohextrakt. *L. frumenti* bildete  $0,28 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  und  $0,24 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  (nach 22,5 und 48 Stunden), wohingegen für *L. frumenti BfrA*  $0,20 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  und  $0,25 \text{ g}_{\text{Glc}} \text{ g}_{\text{Prot}}^{-1}$  (nach 20 und 45 Stunden) gemessen wurden. Es fand zwar somit eine gleichbleibende Glucosefreisetzung im Rohextrakt der Proben über eine Prozesszeit von 25 Stunden statt, wenngleich bei einer Probennahme während der exponentiellen Wachstumsphase ein Vielfaches an Glucose frei gesetzt wurde. Im Vergleich von Satz- und Zulaufverfahren ist somit für beide Stämme eine starke Abhängigkeit der spezifischen Glucosefreisetzung von der Wachstumsphase der Zellen zu beobachten. Vor allem während der exponentiellen Wachstumsphase im Satzverfahren wird eine hohe Glucosemenge im Rohextrakt frei gesetzt. Den Einfluss von längeren Prozessphasen zeigen die Ergebnisse des Zulaufverfahrens. Bei einer stagnierenden oder abnehmenden Zellkonzentration sind nur noch geringe Änderungen der freigesetzten Glucosemenge im Rohextrakt zu beobachten.

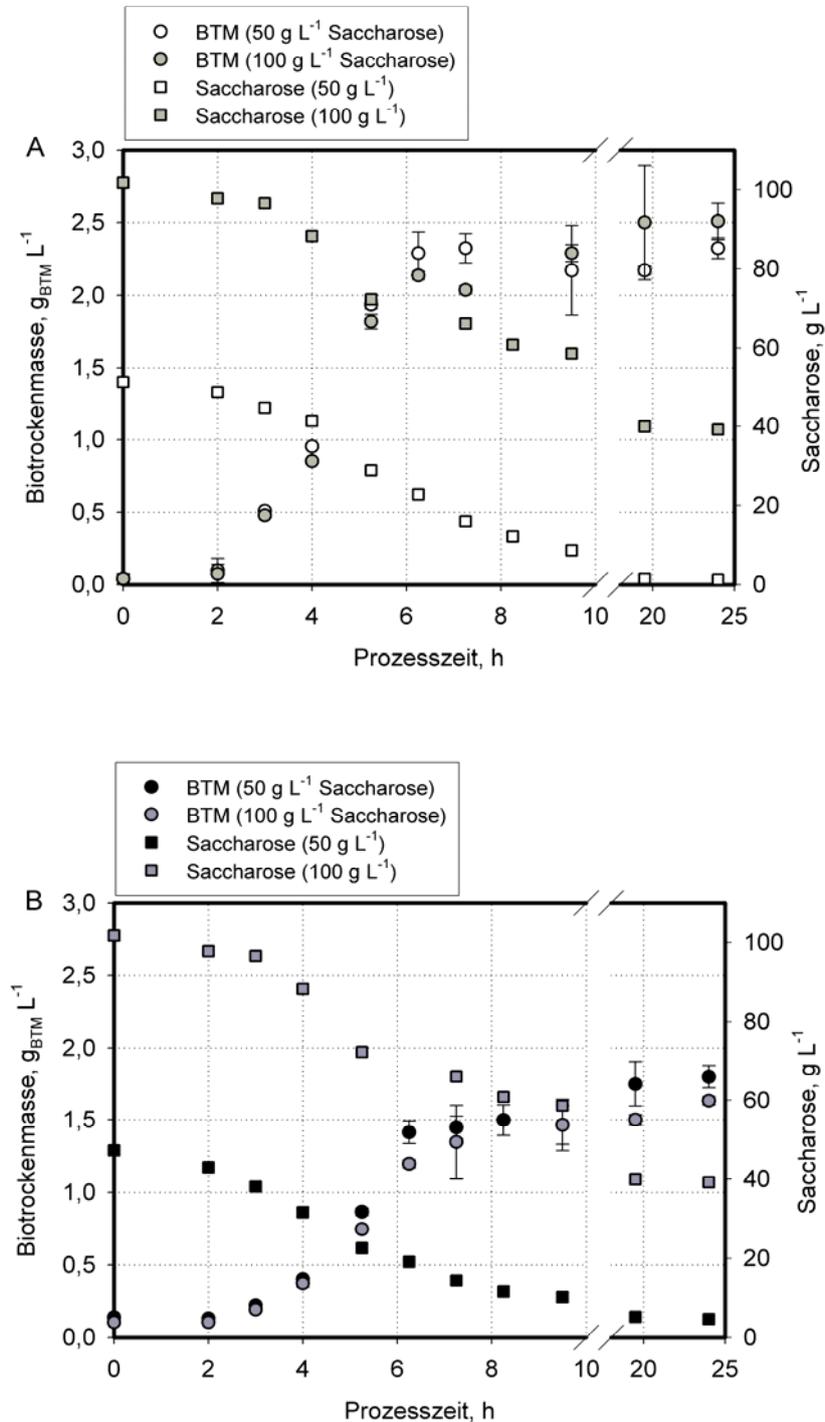
Die vorliegenden Ergebnisse waren zu erwarten, da eine konstitutive Genexpression durch den Promotor P59 des Vektors pGKV::BfrA vorliegt. Erreichen die Zellen eine stationäre Wachstumsphase wird die Genexpression reduziert und es kommt zu einer Stagnation beziehungsweise zu einem Rückgang der enzymatischen Aktivität der Zellen. Die Möglichkeit einer verbesserten Genexpression und daraus folgend einer schnelleren Glucosefreisetzung im Rohextrakt der Zellen kann aber auch durch eine Veränderung in der Sequenz der Ribosomenbindestelle erfolgen.

### **5.3 Wachstumsanalyse von *L. frumenti* in Saccharose- und Melassemedium**

Für Wachstumsanalysen mit Melassemedium wurde die Melasse auf die erforderliche Saccharosekonzentration verdünnt und der pH auf 6,2 eingestellt. Wachstumsversuche in Saccharosemedium (modifiziert nach de Man et al. 1960, siehe 9.3, Tabelle 9.13) dienen hierbei als Referenz zu Kultivierungen von *Lactobacillus frumenti* in Melasse.

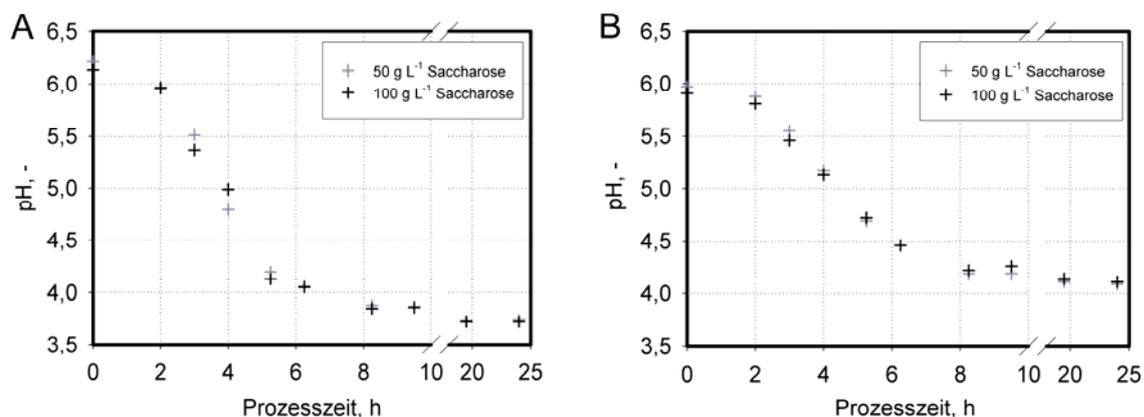
#### **5.3.1 Satzverfahren ohne pH-Kontrolle**

Während Kultivierungen in Saccharosemedium zeigten beide Stämme von *Lactobacillus frumenti* eine Verzögerungsphase von drei bis fünf Stunden wenn sie aus der Wachstumsphase heraus überimpft wurden. Hatten die Zellen in der Vorkultur bereits die stationäre Phase erreicht, wurden anschließend Verzögerungsphasen von bis zu zehn Stunden beobachtet. Die exponentielle Wachstumsphase dauerte im Satzverfahren rund vier Stunden, wenn  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose vorgelegt wurden. Es folgten die stationäre Phase und die Absterbephase. Die Substratkonzentration hatte während der frühen Wachstumsphase keinen Einfluss auf das Wachstum. Abbildung 5.13 zeigt das Wachstum beider Stämme in Saccharosemedium mit einer Substratkonzentration von  $50 \text{ g L}^{-1}$  und  $100 \text{ g L}^{-1}$ .



**Abbildung 5.13** Wachstum von *Lactobacillus frumenti* (A) und *Lactobacillus frumenti* BfrA (B) in Saccharosemedium mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen (50 g L<sup>-1</sup>, 100 g L<sup>-1</sup>) und unter nicht pH-kontrollierten Bedingungen. (V = 50 mL, T = 37 °C; n = 300 min<sup>-1</sup>).

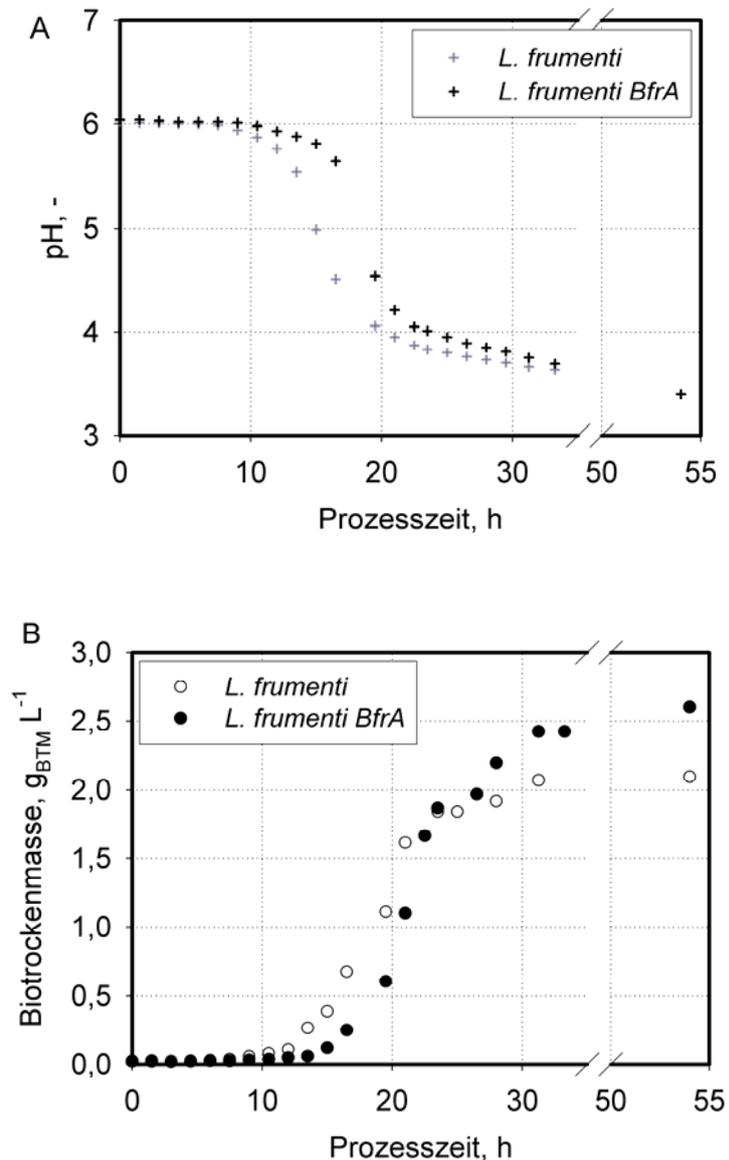
Die maximalen Wachstumsraten ( $\mu_{max}$ ) betragen bei einer Kultivierung in Saccharosemedium, unabhängig von der Substratkonzentration, für beide Stämme 0,9 - 1,0  $h^{-1}$ . In Übereinstimmung mit dem bakteriellen Wachstum kommt es während der exponentiellen Wachstumsphase zu einem starken Absinken des pH von 6,2 auf bis zu 3,7. Eine länger dauernde Prozessführung resultiert in keinem weiteren Absinken (siehe Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14** pH als Funktion der Prozesszeit während einer Kultivierung von *Lactobacillus frumenti* (A) und *Lactobacillus frumenti BfrA* (B) in Saccharosemedium (50 g L<sup>-1</sup>, 100 g L<sup>-1</sup>). (V = 50 mL, T = 37 °C; n = 300 min<sup>-1</sup>).

*L. frumenti* bildete während der 24 Stunden Prozesszeit 25,6 g L<sup>-1</sup> beziehungsweise 29,9 g L<sup>-1</sup> D-Mannit in Komplexmedium mit 50 g L<sup>-1</sup> und 100 g L<sup>-1</sup> Saccharose. Die gebildeten Mengen an Lactat und Acetat betragen 14,4 g L<sup>-1</sup> und 11,6 g L<sup>-1</sup> beziehungsweise 4,7 g L<sup>-1</sup> und 5,7 g L<sup>-1</sup>. Die D-Mannitausbeute betrug 0,96 mol mol<sup>-1</sup> (50 g L<sup>-1</sup> Saccharose) und 0,90 mol mol<sup>-1</sup> (100 g L<sup>-1</sup>). *L. frumenti BfrA* erreichte zwar geringere Produktkonzentrationen, allerdings lag die Biotrockenmassekonzentration nach 24 Stunden auch nur bei 1,72 ± 0,2 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (50 g L<sup>-1</sup> Saccharose) und 1,63 ± 0,1 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (100 g L<sup>-1</sup> Saccharose). Die gebildeten Mengen an D-Mannit, Lactat und Acetat bei einer Substratkonzentration von 50 g L<sup>-1</sup> Saccharose betragen 20,3 g L<sup>-1</sup>, 7,6 g L<sup>-1</sup>, 2,5 g L<sup>-1</sup>. Ähnliche Konzentrationen wurden im Saccharosemedium mit 100 g L<sup>-1</sup> erreicht: 21,2 g L<sup>-1</sup> D-Mannit, 7,5 g L<sup>-1</sup> Lactat und 2,8 g L<sup>-1</sup> Acetat. Die D-Mannitausbeute für *L. frumenti BfrA* betrug bei beiden Ansätzen jeweils 0,89 mol mol<sup>-1</sup>.

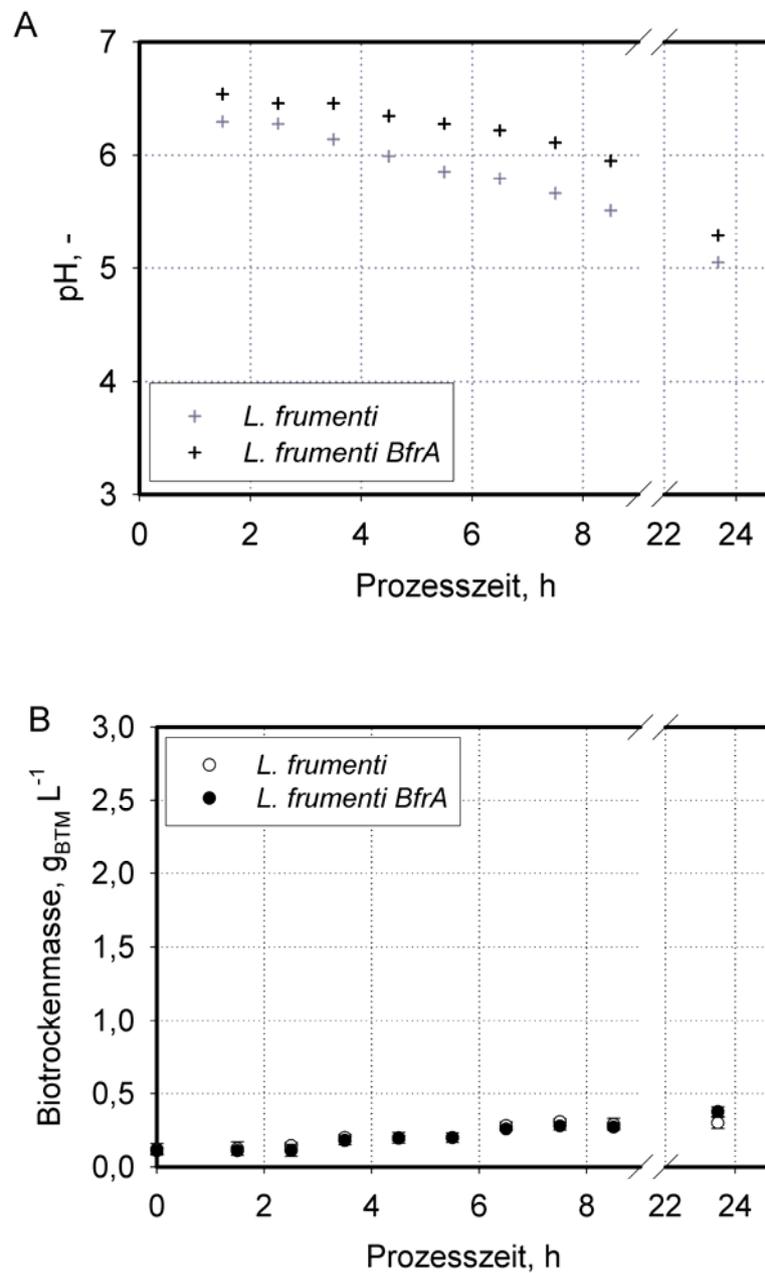
Im Gegensatz zu Kultivierungen in Kulturflaschen und im Rührkesselreaktor (mit und ohne pH-Kontrolle) erreichten sowohl *Lactobacillus frumenti* als auch *Lactobacillus frumenti BfrA* in Schüttelkolbenkulturen mit vergleichbarer Substratkonzentration lediglich Biomassekonzentrationen von circa 0,5 - 0,9 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5.15** Verlauf von pH (A) und Biotrockenmasse (B) von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* während einer Satzkultivierung in Saccharosemedium (100 g L<sup>-1</sup>) unter nicht kontrollierten pH-Bedingungen. (V = 0,5 L; T = 37 °C; n = 300 min<sup>-1</sup>).

Bei allen Fermentationen zeigte *Lactobacillus frumenti BfrA* eine verlängerte Verzögerungsphase (Ausnahme Abbildung 5.9, Kultivierung im Satzverfahren ohne pH-Kontrolle), was auf die Zugabe des Antibiotikums Erythromycin zurückzuführen ist (siehe Abbildung 5.15). Diese Wachstumsverzögerung ist vor allem mit einem späteren Absinken des pH verbunden. In Übereinstimmung mit dem pH-Verlauf kommt es auch zu einem späteren Anwachsen des rekombinanten Stammes von *Lactobacillus frumenti BfrA*. Während der in Abbildung 5.15 gezeigten Kultivierung erreichte der Wildtyp nach 30 Stunden eine Biotrockenmassekonzentration von  $2,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ , für *Lactobacillus frumenti BfrA* wurden  $2,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  ermittelt.

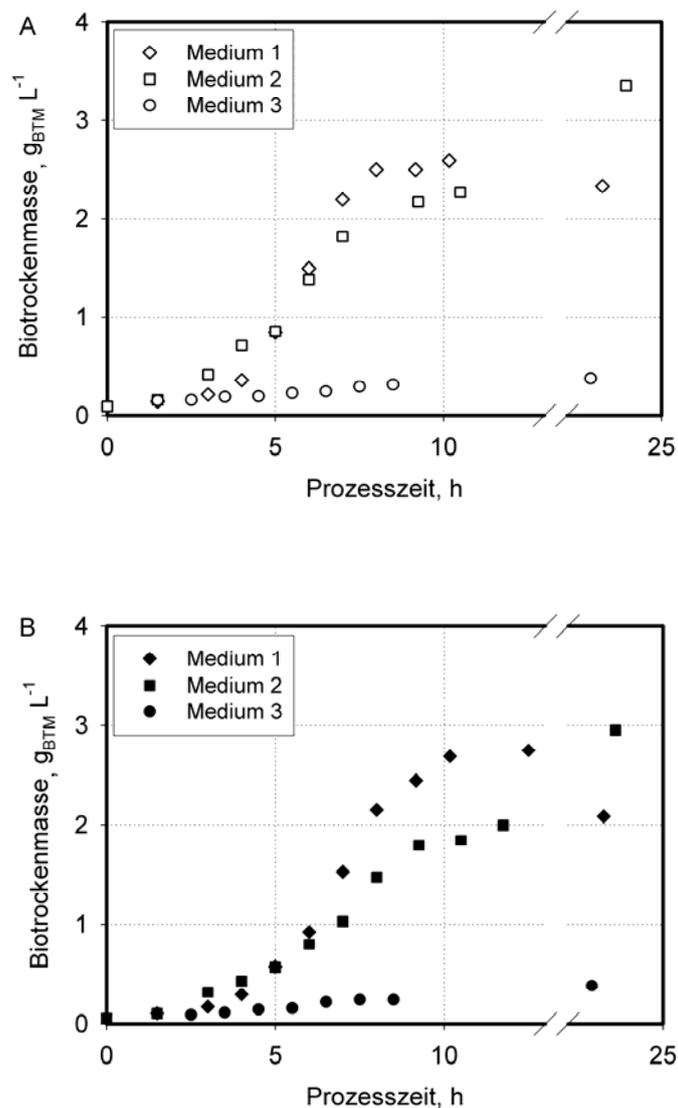
Wachstumsversuche in Melassemedium führten bei Saccharosekonzentrationen von  $50 \text{ g L}^{-1}$ ,  $75 \text{ g L}^{-1}$ ,  $100 \text{ g L}^{-1}$  innerhalb der ersten 10 Stunden zu nur geringfügigem Wachstum. Bei einer Saccharosekonzentration von  $150 \text{ g L}^{-1}$  kam es sogar zu einer vollständigen Inhibierung des Wachstums. Die Zellen erreichten während der Kultivierung maximale Biomassekonzentrationen von bis zu  $0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . Abbildung 5.16 zeigt beispielhaft den pH- und Wachstumsverlauf von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* in Melassemedium mit einer Saccharosekonzentration von  $100 \text{ g L}^{-1}$ . Die maximalen Wachstumsraten bei Saccharosekonzentrationen von 50 bis  $100 \text{ g L}^{-1}$  in der Melasse betragen  $\mu_{\text{max}} = 0,04 - 0,06 \text{ h}^{-1}$ .



**Abbildung 5.16** Zeitliche Darstellung des pH (A) und der Biotrockenmassekonzentration (B) während einer Kultivierung von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* in Melassemedium mit einer Saccharosekonzentration von 100 g L<sup>-1</sup> unter nicht pH-kontrollierten Bedingungen. (V = 50 mL; T = 37 °C; n = 300 min<sup>-1</sup>).

Im Gegensatz zu den Kultivierungen in Saccharosemedium ermöglicht ein einfaches Melassemedium kein deutliches Wachstum. Aufgrund der hohen Ansprüche der Milchsäurebakterien an das Medium reichen die Zugabe einer Vitaminlösung

beziehungsweise Mangansulfat, Magnesiumsulfat und Tween80 nicht aus. Trotz des eingeschränkten Wachstums ist im Verlauf der Kultivierung jedoch eine Abnahme des pH zu verzeichnen (siehe Abbildung 5.16). Ausgehend von pH 6,4 sinkt der pH auf 5,5 (*Lactobacillus frumenti*) und 5,9 (*Lactobacillus frumenti BfrA*) nach 9 Stunden Kultivierungszeit beziehungsweise pH 5,1 - 5,3 nach rund 24 Stunden.



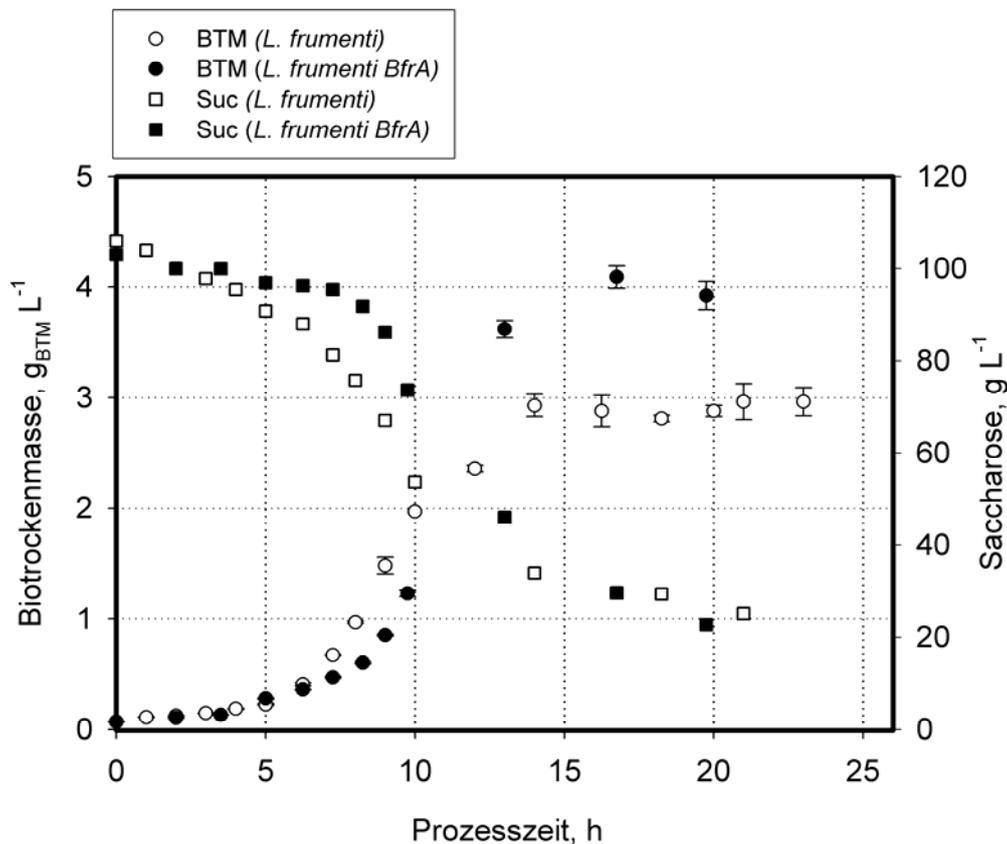
**Abbildung 5.17** Vergleichende Wachstumsstudie mit *Lactobacillus frumenti* (A) und *Lactobacillus frumenti BfrA* (B) in verschiedenen Medien ohne pH-Kontrolle: Medium 1: Saccharosemedium (75 g L<sup>-1</sup>); Medium 2: Saccharosemedium mit 75 g L<sup>-1</sup> Saccharose aus Melasse; Medium 3: Melassemedium mit 75 g L<sup>-1</sup> Saccharose. (V = 50 mL; T = 37 °C; Start-pH: 6,2; n = 300 min<sup>-1</sup>).

Durch eine Kombination von Komplexmedium ohne Saccharose und einer entsprechenden Konzentration an Zuckerrübenmelasse konnte Wachstum der Zellen ermöglicht werden. Abbildung 5.17 zeigt vergleichende Kultivierungen in Saccharose- beziehungsweise Melassemedium und dem kombinierten Medium (75 g L<sup>-1</sup> Saccharose in Melasse).

Wird die Zuckerfraktion des Saccharosemediums, das Pepton und Hefeextrakt enthält, durch einen äquivalenten Anteil an Saccharose aus Melasse ersetzt erreicht *L. frumenti* nach 24 Stunden 3,3 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> beziehungsweise *L. frumenti BfrA* 2,9 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> im Satzverfahren, und damit eine höhere Biotrockenmassekonzentration wie im reinen Saccharosemedium beobachtet wurde.

### 5.3.2 Satzverfahren mit pH-Kontrolle

Kultivierungen im Satzverfahren mit pH-Kontrolle wurden sowohl im 2,0 L-, als auch im 7,5 L-Rührkesselreaktor durchgeführt. Für die pH-Kontrolle wurde 4 N NaOH eingesetzt. Nach einer Verzögerungsphase von etwa drei bis vier Stunden kam es bei beiden Stämmen zu einer verlängerten exponentiellen Wachstumsphase. Im Vergleich zu einer Kultivierung ohne pH-Kontrolle kam *Lactobacillus frumenti* hierbei auf eine maximale Biotrockenmassekonzentration von  $2,9 \pm 0,1$  g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>, *Lactobacillus frumenti BfrA* erreichte  $3,9 \pm 0,1$  g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>, ausgehend von einem Saccharosemedium mit einer Substratkonzentration von 100 g L<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 5.18).



**Abbildung 5.18** Satz kultivierung von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* im Saccharosemedium ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) mit pH-Kontrolle. Dargestellt ist der Verlauf der Biotrockenmasse- und der Saccharosekonzentration. ( $V = 3,0 \text{ L}$ ;  $\text{pH } 6,2$ ;  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ; Suc = Saccharose).

Vergleichbar zu früheren Fermentationen erreichen beide Stämme von *L. frumenti*, unabhängig von der Substratkonzentration im Medium nach etwa 10 Stunden die stationäre Phase. Dieser Wachstumsverlauf ist sowohl in pH-geregelten Fermentationen, als auch in solchen ohne pH-Kontrolle feststellbar.

Kultivierungen in Melassemedium mit pH-Kontrolle führten zu keinen Änderungen im Wachstumsverhalten gegenüber den Satzverfahren ohne pH-Kontrolle und werden in diesem Zusammenhang auch nicht weiter dargestellt.

### 5.3.3 Diskussion

Kultivierungen von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* in Saccharosemedium ohne pH-Kontrolle führten, unabhängig von der Substratkonzentration sowohl zu identischen Wachstumsraten als auch Biotrockenmassekonzentrationen. Bei einer Vorlage von  $100 \text{ g L}^{-1}$  im Saccharosemedium konnten beide Stämme bis zu  $2,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreichen. Sowohl für den Wildtyp, als auch den rekombinanten Stamm wurde die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$  mit  $0,9 - 1,0 \text{ h}^{-1}$  bestimmt und entspricht somit den Wachstumsraten anderer Milchsäurebakterien (Dols et al 1997). Kultivierungen im Schüttelkolben erzielten lediglich maximale Biotrockenmassekonzentrationen von  $0,9 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . Eine Kultivierung beider Stämme von *Lactobacillus frumenti* in Melassemedium führte zu nur geringfügigem Wachstum der Zellen. Die Zugabe einer Vitaminlösung sowie Mangansulfat, Magnesiumsulfat und Tween80 reichte nicht aus um Wachstum zu ermöglichen. Konzentrationen von  $150 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose in Melasse führten zu einer vollständigen Inhibierung des zellulären Wachstums. Durch eine Kombination von Saccharosemedium und Melasse (Ersatz der Saccharose durch eine entsprechende Menge an Zuckerrübenmelasse) konnte Wachstum der Zellen beobachtet werden. Bei einer vorgelegten Melassekonzentration von  $50 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose konnten die Zellen eine maximale Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$  von  $0,6 \text{ h}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti BfrA*) bzw.  $0,7 \text{ h}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti*) erreichen. Zu Beginn einer Kultivierung benötigten die Zellen eine circa fünfstündige Verzögerungsphase. Bei *Lactobacillus frumenti BfrA* kommt es zu einer weiteren Verzögerung, verursacht durch das Antibiotikum Erythromycin, welches als Selektionsmarker eingesetzt wird. Bei einer Vorlage von  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose erreichen beide Stämme nach etwa 10 Stunden Fermentationsdauer die stationäre Phase, unabhängig von der verbliebenen Substratkonzentration im Medium. Dieses Verhalten wurde sowohl unter pH-kontrollierten Bedingungen, als auch während Fermentationen ohne pH-Regelung beobachtet. Die höchsten Konzentrationen an Lactat und Acetat betragen hierbei jedoch nur  $14,4 \text{ g L}^{-1}$  und  $11,6 \text{ g L}^{-1}$ . Eine Hemmung durch zu hohe Nebenproduktkonzentrationen ist somit nicht die Ursache.

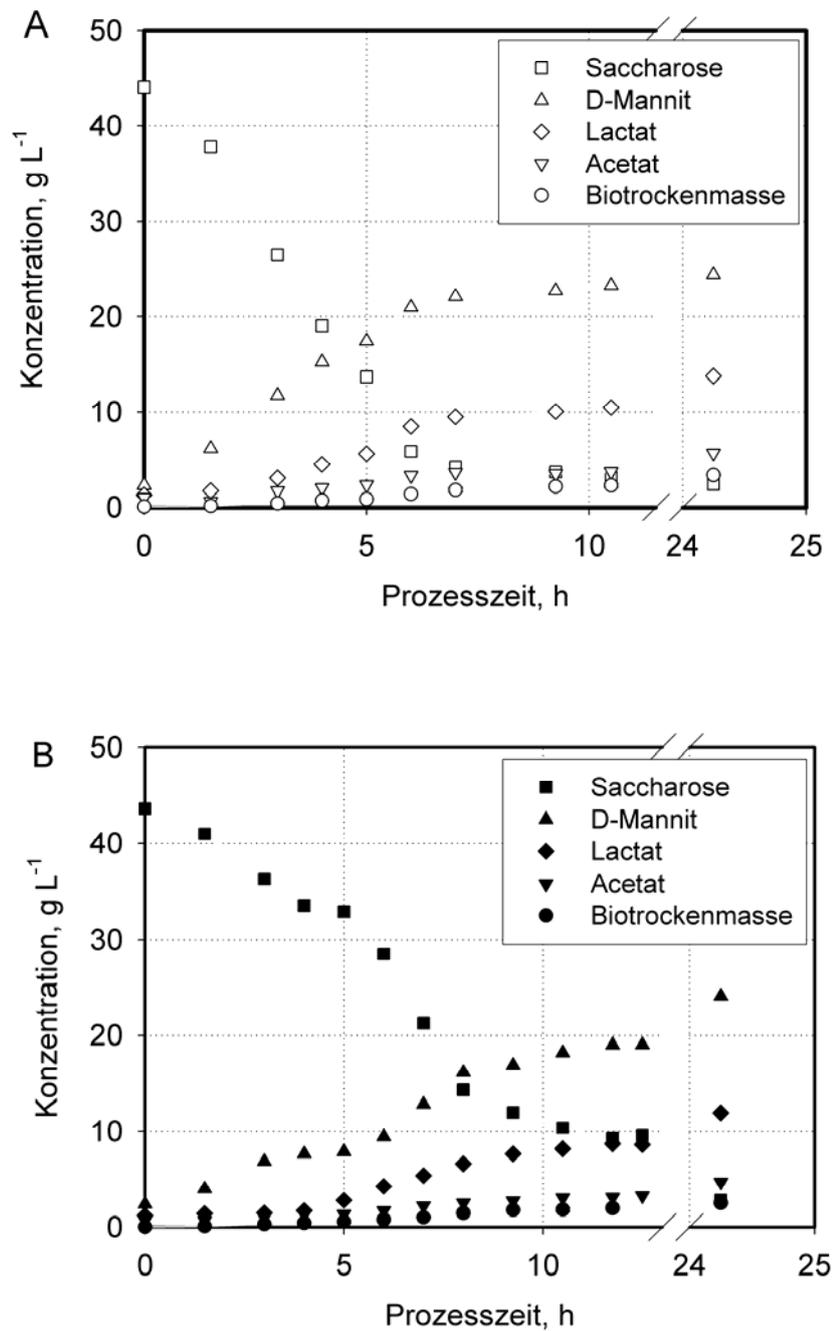
## 5.4 D-Mannitbildung mit wachsenden Zellen

Die folgenden Auswertungen beziehen sich auf Versuche mit wachsenden Zellen von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA*. Die Formulierung „wachsende Zellen“ weist darauf hin, dass Zellen entweder in Melassemedium kultiviert oder aber in einem Zulaufverfahren mit Melassemedium eingesetzt wurden.

### 5.4.1 D-Mannitbildung mit Melasse im Satzverfahren

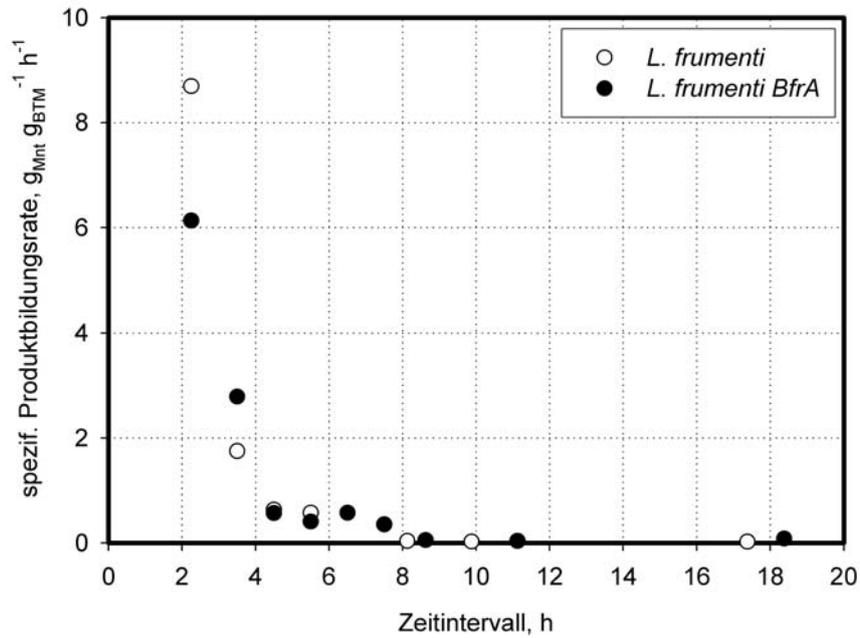
In Übereinstimmung mit den Wachstumsversuchen in Zuckerrübenmelasse (Vgl. Kapitel 5.3.1, Abbildung 5.16) konnte nur eine geringfügige Produktbildung durch die Zellen in Satzverfahren über 23 Stunden festgestellt werden. Während der Kultivierungsdauer kam es für *L. frumenti* zu einer Substratabnahme von  $4 \text{ g L}^{-1}$ , für *L. frumenti BfrA* wurden  $9 \text{ g L}^{-1}$  Saccharoseverbrauch ermittelt. Die damit verbundenen D-Mannitkonzentrationen betragen  $1,9 \text{ g L}^{-1}$  (*L. frumenti*) beziehungsweise  $4,1 \text{ g L}^{-1}$  (*L. frumenti BfrA*).

Im Gegensatz zum Wachstumsverhalten auf reinem Melassemedium konnte durch die Kombination von Saccharosemedium und einer Ergänzung der Saccharosefraktion durch eine entsprechende Menge an Melasse Wachstum der Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 5.19).



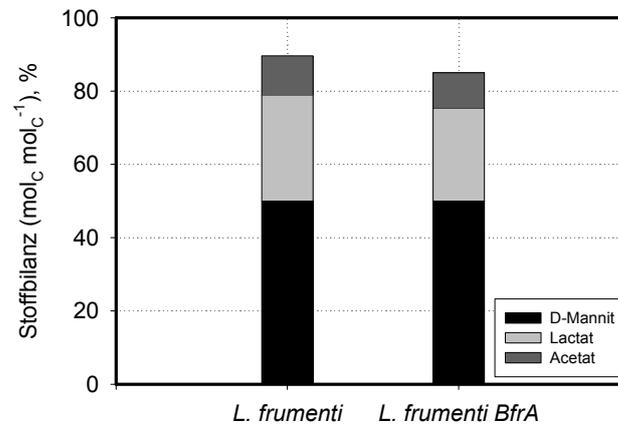
**Abbildung 5.19** Substratverbrauch und Produktbildung in Satzverfahren ohne pH-Kontrolle mit *Lactobacillus frumenti* (A) und *Lactobacillus frumenti BfrA* (B). Die Saccharosefraktion (45 g L<sup>-1</sup>) des verwendeten Komplexmediums wurde durch eine entsprechende Menge an Melasse ersetzt. (V = 0,5 L; T = 37 °C, pH = 6,2; n = 300 min<sup>-1</sup>).

Bereits nach einer Kultivierungsdauer von 7 Stunden hatte der Wildtyp *Lactobacillus frumenti* die vorgelegte Saccharose nahezu vollständig verbraucht. Der gentechnisch veränderte Stamm *Lactobacillus frumenti BfrA* zeigte ein verzögertes Wachstum und hatte nach etwa 10 Stunden nur  $35 \text{ g L}^{-1}$  der vorgelegten Saccharose verbraucht. Nach 24 Stunden hatten beide Stämme identische Produktkonzentrationen erreicht. In Übereinstimmung mit Kultivierungen in Saccharosemedium erreichten die Zellen  $3,3 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti*) beziehungsweise  $3,0 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti BfrA*). In Analogie zum schnelleren Wachstum von *L. frumenti* während der ersten Prozessstunden ist für den Wildtyp innerhalb der ersten drei Stunden ein Rückgang der Saccharosekonzentration um  $17,6 \text{ g L}^{-1}$  zu verzeichnen. Für *L. frumenti BfrA* beträgt der Rückgang lediglich  $7,3 \text{ g L}^{-1}$ . Die erzielte Raum-Zeit-Ausbeute beträgt für *L. frumenti* nach 24 Stunden Prozesszeit  $0,91 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , für *L. frumenti BfrA*  $0,90 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Abbildung 5.20 zeigt für die dargestellten Satzverfahren die spezifischen Produktbildungsrate einzelner Messintervalle. Vergleichbar der hohen Substratabnahme zu Beginn der Fermentation kommt es auch zu einer hohen spezifischen Produktbildungsrate. Ab dem Messintervall der achten Prozessstunde betrug für beide Stämme die spezifische Produktbildungsrate nur noch etwa  $0,04 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Diese Beobachtung entspricht den Konzentrationsverläufen der Biotrockenmasse, der Saccharose sowie den weiteren Nebenprodukten.



**Abbildung 5.20** Darstellung der spezifischen Produktbildungsraten von *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* innerhalb einzelner Messintervalle während einer Satzkultivierung ohne pH-Kontrolle. Die Saccharosefraktion des Mediums wurde durch eine entsprechende Menge an Melasse ersetzt ( $45 \text{ g L}^{-1}$ ).

Abbildung 5.21 zeigt eine Übersicht über die Stoffbilanz beider Stämme nach einer Kultivierung in Saccharosemedium mit ergänzter Melasse nach einer Prozesszeit von 24 Stunden.



**Abbildung 5.21** Stoffbilanz von *L. frumentii* und *L. frumentii BfrA* für die Produkte D-Mannit, Lactat und Acetat im Verhältnis zur verbrauchten Saccharose. Die Konzentrationen wurden nach einer Prozesszeit von 24 Stunden ermittelt.

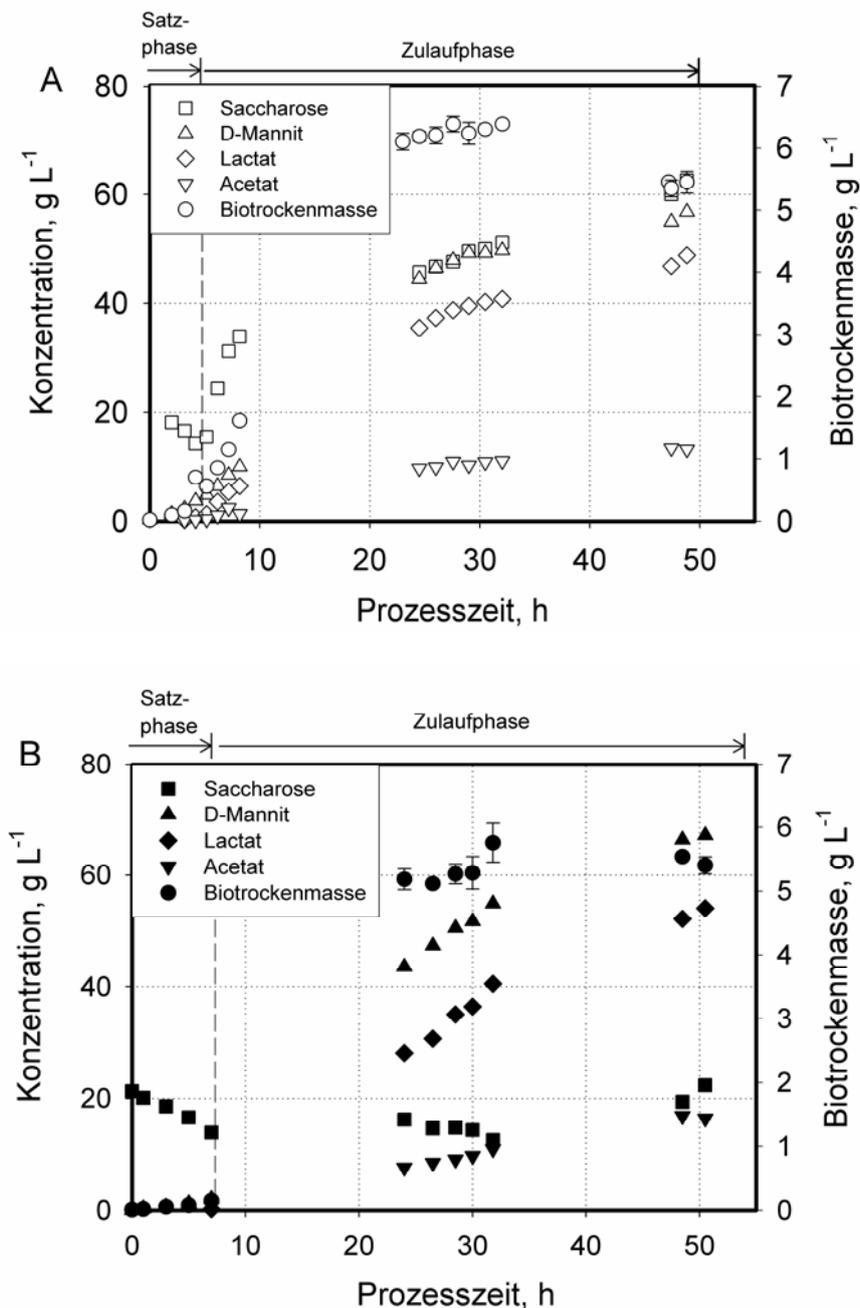
Für das primäre Produkt D-Mannit konnte bei beiden Stämmen eine äquimolare Umsetzung auf der Grundlage der verbrauchten Saccharose festgestellt werden. Für Lactat ergab die Auswertung der Stoffbilanz  $0,28 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  (*L. frumentii*) beziehungsweise  $0,25 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  (*L. frumentii BfrA*). Hinsichtlich der Stoffbilanz für Acetat konnte bei beiden Stämmen die Bilanz nicht geschlossen werden. Diese Angaben beruhen auf der Annahme, dass durch einen alleinigen Saccharoseverbrauch theoretisch  $0,17 \text{ mol Acetat mol}^{-1}$  Saccharose entstehen. Gemessen wurden allerdings lediglich  $0,11$  beziehungsweise  $0,10 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  für *L. frumentii* und *L. frumentii BfrA* (entspricht  $4,7$  beziehungsweise  $4,1 \text{ g L}^{-1}$  Acetat).

Die Bildung von  $\text{CO}_2$  beziehungsweise der Einfluss des Substratverbrauches für die Biomassebildung wurden in der Darstellung nicht berücksichtigt. Bezogen auf das verbrauchte Substrat ergibt die Gesamtbilanz somit für *L. frumentii*  $0,89 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  und für *L. frumentii BfrA*  $0,85 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$ .

#### 5.4.2 D-Mannitbildung mit Melasse im Zulaufverfahren

Für die D-Mannitsynthese mit wachsenden Zellen im Zulaufverfahren wurden beide Stämme von *Lactobacillus frumentii* zunächst in Saccharosemedium kultiviert. Sobald beide Stämme in der Übergangsphase zur exponentiellen Wachstumsphase waren,

wurde der Zulauf des Melassemediums gestartet (Abbildung 5.22). Da kein Medienwechsel vor dem Zulauf stattfand, konnten die Zellen auch in einer späteren Prozessphase auf die Komplexbestandteile des Saccharosemediums, wie zum Beispiel Pepton und Hefeextrakt zurückgreifen.

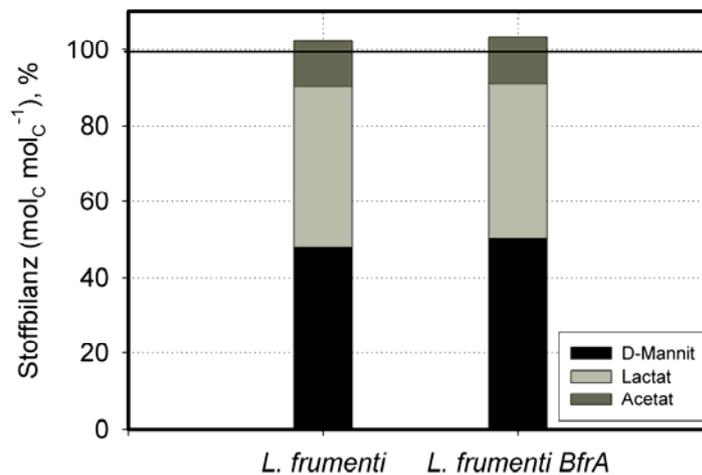


**Abbildung 5.22** Verlauf von Substrat- und Produktkonzentrationen während eines Zulaufverfahrens mit Melasse (300 g L<sup>-1</sup> Saccharose) unter pH-kontrollierten Bedingungen im Rührkesselreaktor ( $V = 4,0$  L;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $T = 37$  °C;  $F = 0,04$  L h<sup>-1</sup>;  $n = 300$  min<sup>-1</sup>; A = *L. frumenti*; B = *L. frumenti BfrA*).

Während der Kultivierung von *L. frumenti* im Zulaufverfahren mit Melassemedium ( $300 \text{ g L}^{-1}$ ) bildete der Wildtyp nach 49 Stunden  $57,0 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit bei gleichzeitiger Akkumulation von  $60,0 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose. Für *L. frumenti BfrA* wurden nach Prozessende  $66,5 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit und  $27,2 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose ermittelt.

Die stärkere Anhäufung von Substrat im Medium bei *L. frumenti* basiert auf einer geringeren Produktbildung bei gleichzeitig konstanter Zudosierung von Saccharose. Die maximalen Biotrockenmasskonzentrationen wurden mit  $6,4 \pm 0,13 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*L. frumenti*) beziehungsweise mit  $5,8 \pm 0,31 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*L. frumenti BfrA*) bestimmt.

Die D-Mannit ausbeute betrug für *L. frumenti*  $0,96 \text{ mol mol}^{-1}$ , für *L. frumenti BfrA* wurde eine vollständige molare Ausbeute ermittelt. Abbildung 5.23 zeigt eine Stoffbilanz für die Produkte D-Mannit, Lactat und Acetat beider Stämme nach einer Gesamtprozesszeit von rund 50 Stunden. Im Gegensatz zum Satzversuch kommt es im Zulaufverfahren für das Nebenprodukt Lactat zu einer Überschussproduktion. Beide Stämme bildeten nach Prozessende  $0,42 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  (*L. frumenti*) beziehungsweise  $0,40 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  (*L. frumenti BfrA*) gegenüber einer theoretischen Ausbeute von  $0,25 \text{ mol Lactat mol}^{-1}$  Saccharose. Acetat wird hingegen nur zu jeweils  $0,12 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  von beiden Stämmen gebildet (entspricht  $12,1$  und  $15,9 \text{ g L}^{-1}$  Acetat für *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA*) und weist somit einen Mangel an 25 mol % auf. Wie bereits auch im Satzverfahren beruht die Aufstellung der Gesamtbilanz auf einer theoretischen Ausbeute von  $0,25 \text{ mol Lactat mol}^{-1}$  Saccharose. Für Acetat wurden  $0,17 \text{ mol mol}^{-1}$  Saccharose zugrunde gelegt. Weitere in der Melasse enthaltene Kohlenstoffquellen wurden nicht berücksichtigt.



**Abbildung 5.23** Stoffbilanz von *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* für die Produkte D-Mannit, Lactat und Acetat im Verhältnis zur verbrauchten Saccharose im Zulaufverfahren mit Melassemedium (300 g L<sup>-1</sup> Saccharose). Die Konzentrationen wurden nach einer Prozesszeit von etwa 50 Stunden ermittelt.

### 5.4.3 Diskussion

Versuche zur D-Mannitbildung mit wachsenden Zellen im Satzverfahren führten wie erwartet mit Melasse zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Da die Zellen in diesem Medium nicht oder nur geringfügig wachsen können kam es auch nur zu einer marginalen Produktbildung. Innerhalb einer Kultivierungsdauer von 11 Stunden erreichten die Zellen lediglich eine maximale Produktkonzentration von 4 g L<sup>-1</sup> D-Mannit. Nur durch die Kombination von Saccharosemedium mit Melasse konnte eine signifikante Produktbildung der Zellen erreicht werden, wobei erneut eine Verzögerung im Wachstum von *L. frumenti BfrA* beobachtet werden konnte. Aufgrund der kürzeren Verzögerungsphase kam es für *Lactobacillus frumenti* während der ersten drei Prozessstunden zu einem Saccharoseverbrauch von 17,6 g L<sup>-1</sup>, wohingegen für *L. frumenti BfrA* die Saccharosekonzentration nur um 7,3 g L<sup>-1</sup> abnahm. Entsprechend dem Verlauf der Substratkonzentration betrug die spezifische Produktbildung, bei konstanter Biotrockenmasse, ab einer Prozesszeit von acht Stunden für beide Stämme nur noch etwa 0,04 g<sub>Mnt</sub> g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Im Vergleich zu Satzverfahren mit Saccharosemedium erreichten beide Stämme ähnliche

Biotrockenmassekonzentrationen:  $3,3 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*L. frumenti*) beziehungsweise  $3,0 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  für *L. frumenti BfrA*. Die Zellen wiesen eine volumetrische Produktivität von jeweils  $0,90 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  auf.

Im Zulaufverfahren mit Melassmedium ( $300 \text{ g L}^{-1}$ ) bildete *L. frumenti*  $57,0 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit wohingegen bei *L. frumenti BfrA*  $66,5 \text{ g L}^{-1}$  gemessen wurden. Die entsprechenden volumetrischen Produktivitäten betragen  $1,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*L. frumenti*) und  $1,28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*L. frumenti BfrA*). Die ermittelte Ausbeute für D-Mannit auf der Grundlage der freigesetzten Fructose betrug  $0,96 \text{ mol mol}^{-1}$  für *L. frumenti*. *L. frumenti BfrA* erzielte hingegen eine vollständige molare Ausbeute. Die gemessenen Konzentrationen der Produkte Lactat und Acetat konnten nicht mit der Stoffbilanz in Einklang gebracht werden, da ein Überschuss an Lactat von beiden Stämmen gebildet wurde (62 und 69 mol %), wohingegen für Acetat ebenfalls für beide Stämme ein Defizit von circa 25 mol % ermittelt wurde. Eine zu geringe Acetatkonzentration ist nur dann möglich, wenn Acetylphosphat durch die Zellen zu Ethanol umgesetzt wird. Die Zellen bilden somit zwar weniger ATP (entsteht bei der Dephosphorylierung von Acetylphosphat zu Acetat), gleichzeitig können aber 2 Mol  $\text{NADH} + \text{H}^+$  regeneriert werden. Es bleibt aber fraglich, ob die Zellen diesen Weg beschritten haben, da in der Fermentationslösung kein Ethanol gemessen wurde. Die Aufstellung der Stoffbilanz erfolgte auf der Grundlage der theoretisch erzielbaren Konzentrationen an D-Mannit, Lactat und Acetat bezogen auf das Substrat Saccharose. Zusätzliche Kohlenstoffquellen im Melassemedium wurden nicht berücksichtigt.

Im Gegensatz zu Kultivierungen mit verdünnten Melassemedien stellen Versuche mit kombinierten Medien oder auch Versuche im Zulaufverfahren vielversprechende Ansätze dar (Saha 2006 b). In beiden Fällen ermöglicht die Anwesenheit von komplexen Medienbestandteilen wie Pepton und Hefeextrakt sowohl ein verbessertes Wachstum der Zellen als auch eine Produktbildung. Eine weitere Verbesserung der D-Mannitbildung oder auch des zellulären Wachstums im Zulaufverfahren kann eine Ergänzung des Zulaufmediums mit Hefeextrakt oder auch Pepton darstellen. In dem gezeigten Versuch enthielt lediglich das Medium für die Vorkultivierung Komplexbestandteile. Durch den Zulauf mit Melassemedium wurden diese im Laufe des Versuches allerdings zunehmend verdünnt.

Die Verwendung von wachsenden Zellen zur D-Mannitbildung ist weit verbreitet, da die Reduktion von Fructose zu D-Mannit und eine daraus resultierende Regeneration des Cofaktors  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$  in den meisten Fällen direkt mit dem Zentralstoffwechsel der Zellen, der Glykolyse, verbunden ist. Von Weymarn et al. (2002 b) beschreibt die Bildung von  $83 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit mit *Lactobacillus fermentum* basierend auf einer Glucose-Fructose-Mischung mit einer Produktivität von  $7,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und einer Selektivität von  $0,90 \text{ mol mol}^{-1}$ . Saha et al. (2006) verwendete Maisquellwasser sowie  $300 \text{ g L}^{-1}$  Fructose als Substrat für Fermentationen mit *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. Die Zellen bildeten in einem Satzverfahren  $200 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $2,99 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . In einem Zulaufverfahren erreichte *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 auf der Basis von Maisquellwasser und Glucose  $176 \text{ g L}^{-1}$  mit einer volumetrischen Produktivität von  $5,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Die maximale Biotrockenmassekonzentration betrug  $4,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  nach 17 Stunden Prozesszeit. Vor allem hinsichtlich der volumetrischen Produktivität zeigen die Versuche mit Melassemedium erhebliche Nachteile. Obwohl die Zellen von *L. frumenti* eine hohe Ausbeute von D-Mannit zeigen, erreichen sie nicht in entsprechenden Prozesszeiten vergleichbar hohe Produktkonzentrationen. Letzteres beruht vor allem auf dem bereits gezeigten Rückgang der spezifischen Produktbildungsrate.

## 5.5 D-Mannitbildung mit ruhenden Zellen

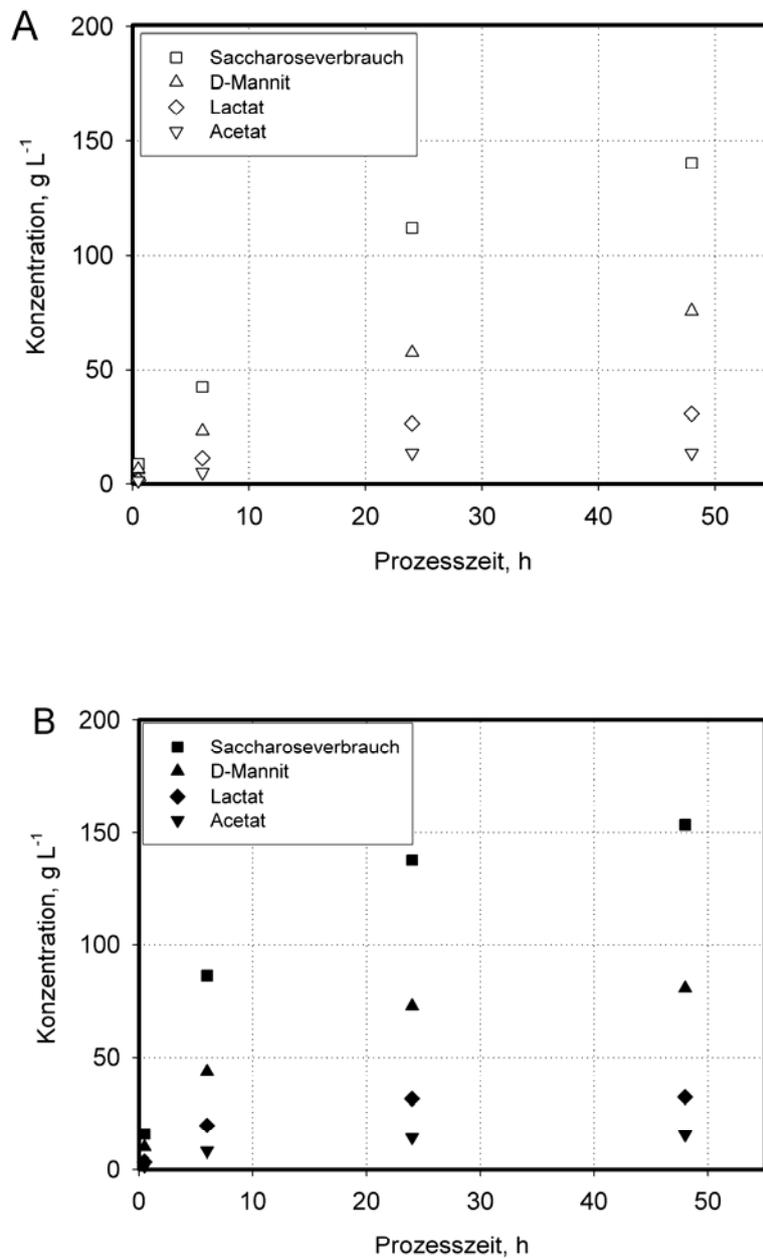
Für die reaktionstechnischen Untersuchungen zur D-Mannitbildung mit ruhenden Zellen ist es von großer Bedeutung, wann die Zellen für die Ganzzell-Biotransformation geerntet werden. Vorangegangene Versuche haben gezeigt, dass eine klare Abhängigkeit zwischen Saccharose-spaltender Aktivität und der Wachstumsphase besteht (siehe 5.2.3). Werden die Zellen zu spät aus der Vorkultivierung entnommen, kann bereits eine starke Abnahme der enzymatischen Aktivität beobachtet werden. Die folgenden Versuche wurden sowohl mit als auch ohne pH-Kontrolle durchgeführt. Die Vorkultivierung der Zellen erfolgte stets in Saccharosemedium. Die Zellen wurden aus der Vorkultur heraus abzentrifugiert und

in Puffer gewaschen. Die Versuche wurden mit Melasse im Satz- beziehungsweise Zulaufverfahren durchgeführt.

### 5.5.1 D-Mannitbildung mit Melasse im Satzverfahren

Die folgenden Versuche zur D-Mannitbildung im Satzverfahren wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt. Abbildung 5.24 zeigt eine Biotransformation im Satzverfahren, wobei für beide Stämme von *L. frumenti*  $8,3 \pm 0,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  eingesetzt wurden. Die Saccharosekonzentration im Melassemedium betrug  $180 \text{ g L}^{-1}$  bei einer Melassekonzentration von rund  $400 \text{ g L}^{-1}$ . Abgesehen von einer Vitaminlösung, von Mangan- und Magnesiumsulfat sowie Tween80 wurden der eingesetzten Melasse keine weiteren Komponenten hinzugefügt.

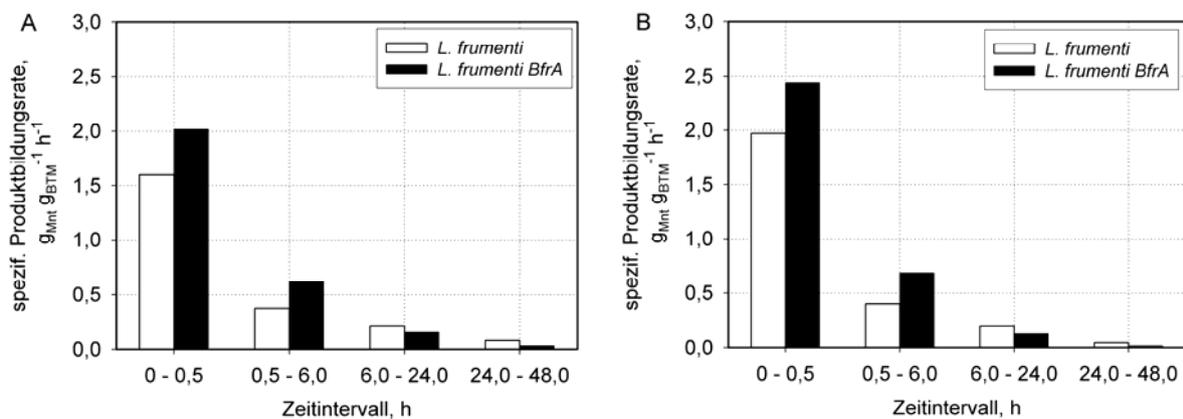
In allen Versuchsansätzen ist eine starke Produktbildung innerhalb der ersten 10 Stunden erkennbar (Versuch mit  $320 \text{ g L}^{-1}$  Melasse beziehungsweise  $140 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose nicht gezeigt). Mit fortschreitender Prozessdauer nimmt die Produktivität allerdings ab, obwohl noch Substrat im Medium vorhanden ist. Nach einer Prozesszeit von 48 Stunden bildete *L. frumenti*  $75,8$  beziehungsweise  $60,9 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit (Vorlage von  $180$  oder  $140 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose in  $400 \text{ g L}^{-1}$  beziehungsweise  $320 \text{ g L}^{-1}$  Melasse). Bei *L. frumenti BfrA* wurden  $80,5$  beziehungsweise  $70,0 \text{ g L}^{-1}$  gemessen. Es ist zu beobachten, dass der gentechnisch veränderte Stamm *Lactobacillus frumenti BfrA* während der frühen Prozessphase bei gleicher Biotrockenmassekonzentration eine schnellere Produktbildung aufweist.



**Abbildung 5.24** Biotransformation in Kulturflaschen mit *L. frumenti* (A) und *L. frumenti BfrA* (B) im Melassemedium mit 400 g L<sup>-1</sup> Melasse. Während des Versuches fand keine pH-Kontrolle statt. Die eingesetzte Biotrockenmassekonzentration betrug 8,3 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (V = 50 mL; Start-pH = 6,2; T = 37 °C; n = 300 min<sup>-1</sup>).

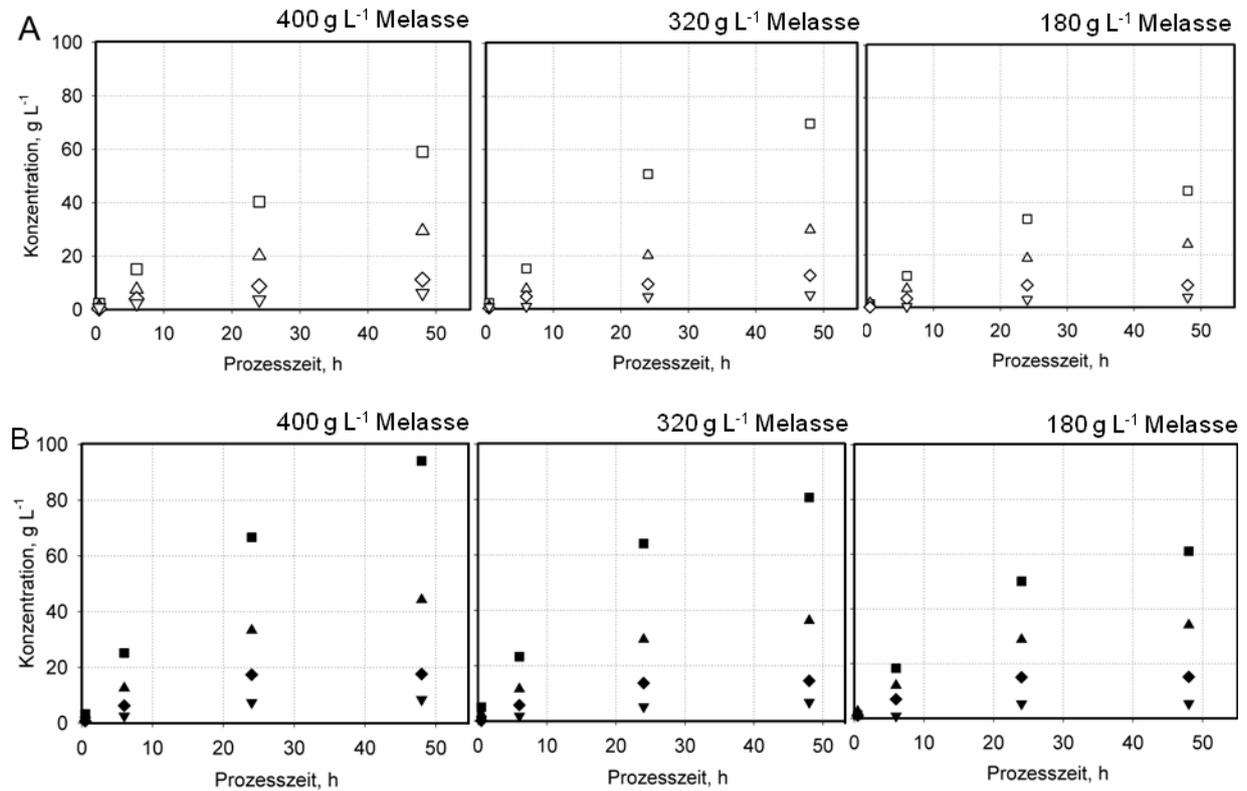
In Ergänzung zu den gezeigten Konzentrationsverläufen von D-Mannit sind in Abbildung 5.25 die entsprechenden Raum-Zeit-Ausbeuten für einzelne Messintervalle aufgetragen. In Übereinstimmung mit einer hohen Produktbildung

während der frühen Versuchsphase erreicht *Lactobacillus frumenti* volumetrische Produktivitäten von  $12,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bis  $13,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Melassekonzentration  $400 \text{ g L}^{-1}$  und  $320 \text{ g L}^{-1}$ ) innerhalb der ersten halben Stunde und circa  $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bei beiden Ansätzen im Messintervall von 0,5 bis 6 Stunden Prozesszeit. Für *Lactobacillus frumenti BfrA* betragen die Raum-Zeit-Ausbeuten  $19,7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  bis  $22,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise jeweils  $6,1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  im folgenden Messintervall. Obwohl zum Zeitpunkt der letzten Messung nach 48 Stunden noch Substrat im Medium vorhanden war, sank die spezifische Produktbildung der Zellen auf unter  $0,08 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Zu Beginn der Biotransformation wurden dagegen spezifische Produktbildungsraten von  $2,0 - 2,4 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für den rekombinanten Stamm und  $1,5 - 1,9 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für *L. frumenti* gemessen. Die erzielten D-Mannit ausbeuten nach 48 Stunden betragen für *L. frumenti*  $0,96 \text{ mol mol}^{-1}$  und  $0,92 \text{ mol mol}^{-1}$  beziehungsweise für *L. frumenti BfrA*  $0,96 \text{ mol mol}^{-1}$  und  $0,94 \text{ mol mol}^{-1}$ . Die Angaben zu den Ausbeuten beziehen sich auf Biotransformationen in  $400 \text{ g L}^{-1}$  und  $320 \text{ g L}^{-1}$  Melassemedium.



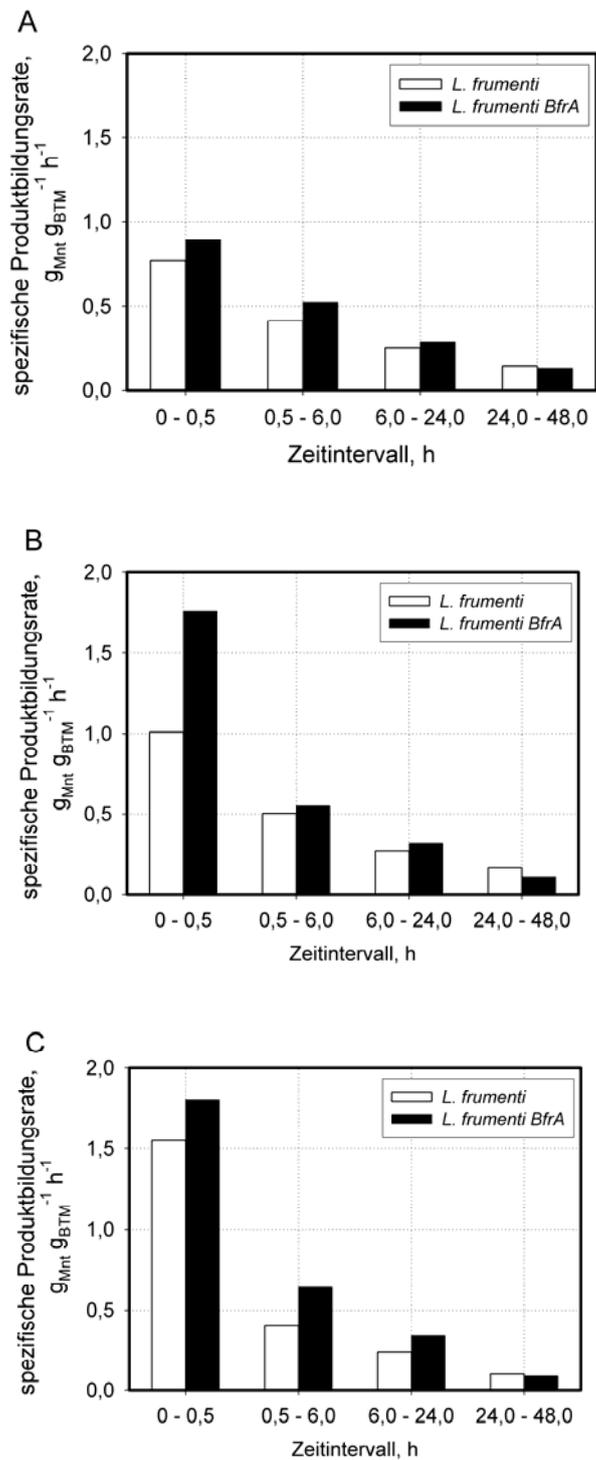
**Abbildung 5.25** Spezifische Produktbildungsrate von D-Mannit für *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* bei Melassekonzentrationen von  $400 \text{ g L}^{-1}$  (A) beziehungsweise  $320 \text{ g L}^{-1}$  (B) im Satzverfahren.

In Analogie zur Biotransformation mit  $8,3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  zeigt Abbildung 5.26 eine Biotransformation mit einer eingesetzten Biotrockenmassekonzentration von  $2,6 \pm 0,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ .



**Abbildung 5.26** Biotransformation mit *L. frumenti* (A) und *L. frumenti BfrA* (B) in Melassemedium mit 180, 140 und 80 g L<sup>-1</sup> Saccharose (entspricht 400, 320 und 180 g L<sup>-1</sup> Melasse). Während des Versuches fand keine pH-Kontrolle statt. Die Biotrockenmassekonzentration betrug  $2,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . ( $V = 50 \text{ mL}$ ;  $T = 37 \text{ °C}$ ; Start-pH = 6,2;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ; □/■ Saccharoseverbrauch; Δ/▲ D-Mannit; ◇/◆ Lactat; ▽/▼).

*Lactobacillus frumenti* erreicht nach 48 Stunden bei variabler Melassekonzentration maximal  $29,8 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit ( $320 \text{ g L}^{-1}$  Melasse). Für den rekombinanten Stamm wurden maximal  $44,3 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit ermittelt ( $400 \text{ g L}^{-1}$  Melasse). Die entsprechenden spezifischen Produktbildungsrate während einzelner Messintervalle sind in Abbildung 5.27 dargestellt.



**Abbildung 5.27** Spezifische Produktbildungsrate von D-Mannit für *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* bei Melassekonzentrationen von 400 g L<sup>-1</sup> (A), 320 g L<sup>-1</sup> (B) beziehungsweise 180 g L<sup>-1</sup> (C) während einzelner Messintervalle (entspricht 180, 140 und 80 g L<sup>-1</sup> Saccharose). Die eingesetzte Biotrockenmassekonzentration betrug 2,6 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>.

Die dargestellten Versuche der Biotransformationen in Melassemedium mit  $2,6 \pm 0,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  zeigen ebenfalls eine verbesserte D-Mannitsynthese durch den rekombinanten Stamm *Lactobacillus frumenti BfrA* gegenüber dem Wildtyp *Lactobacillus frumenti*. Darüber hinaus ist für beide Stämme jedoch auch ein starker Rückgang der Produktivität zu verzeichnen (Abbildung 5.27). Dies basiert allerdings nicht auf einem Mangel an Substrat da der Rückgang bereits während der ersten Prozessstunden auftritt. Ein Einfluss der Melassekonzentration bei identischer Biomassekonzentration ist nicht eindeutig feststellbar, da der Rückgang der spezifischen Produktivität bei allen Versuchsansätzen übereinstimmend ist.

Abbildung 5.28 zeigt zu den dargestellten Biotransformationen mit  $2,6 \pm 0,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  die entsprechenden Stoffbilanzen. Für alle dargestellten Stoffbilanzen der Biotransformation mit  $2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  kann keine vollständige Bilanzierung durchgeführt werden. Im Biotransformationsansatz mit  $180 \text{ g L}^{-1}$  Melasse und *L. frumenti* betrug die D-Mannitausbeute  $0,97 \text{ mol mol}^{-1}$  und mit *L. frumenti BfrA*  $0,99 \text{ mol mol}^{-1}$ . In allen weiteren Ansätzen betrug die Umsetzung maximal  $0,94 \text{ mol mol}^{-1}$ . Die erzielten Ausbeuten entsprechen den Werten der Biotransformation mit  $8,3 \pm 0,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ . Grundlage der Stoffbilanz war in allen Fällen die theoretische Bildung von Lactat ( $0,25 \text{ mol}_{\text{C}} \text{ mol}_{\text{C}}^{-1}$ ) und Acetat ( $0,17 \text{ mol}_{\text{C}} \text{ mol}_{\text{C}}^{-1}$ ), ausgehend von Saccharose als alleinigem Substrat. Ermittelt wurden allerdings für Lactat und beide Stämme  $0,18 \pm 0,01 \text{ mol}_{\text{C}} \text{ mol}_{\text{C}}^{-1}$  sowie  $0,20 \pm 0,03 \text{ mol}_{\text{C}} \text{ mol}_{\text{C}}^{-1}$ . Bezüglich Acetat betrug die fehlende Produktkonzentration circa 50 % ( $0,09 \pm 0,02 \text{ mol}_{\text{C}} \text{ mol}_{\text{C}}^{-1}$ , sowie  $0,08 \pm 0,00 \text{ mol}_{\text{C}} \text{ mol}_{\text{C}}^{-1}$  für *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA*).

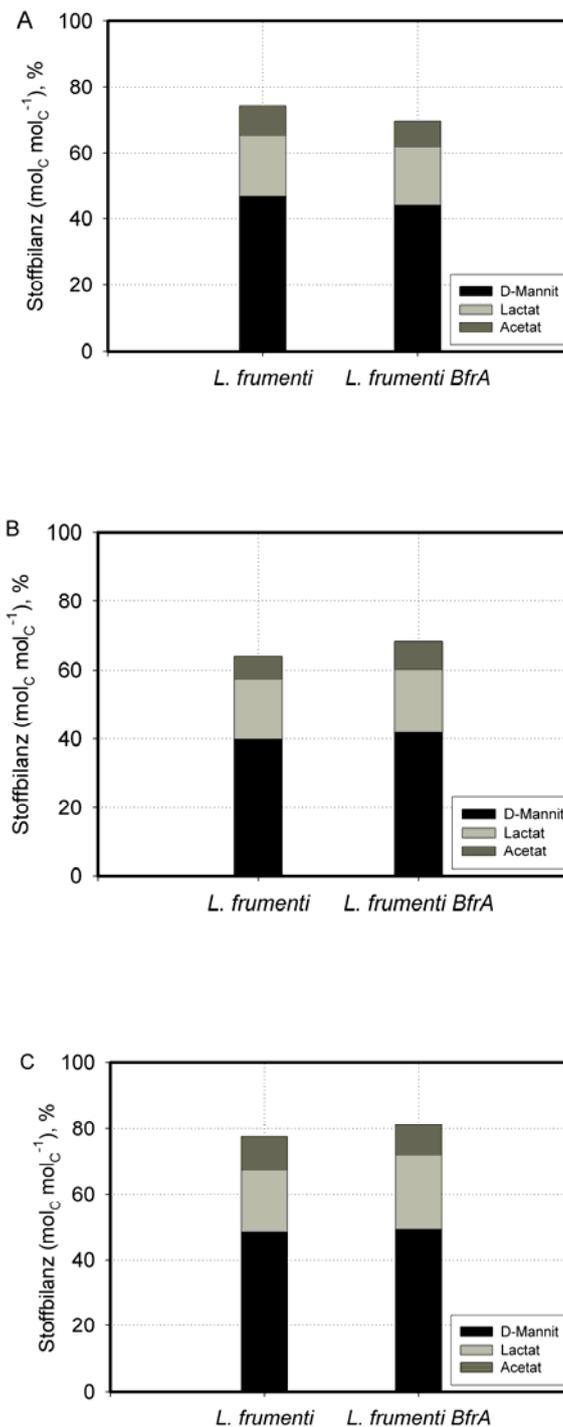
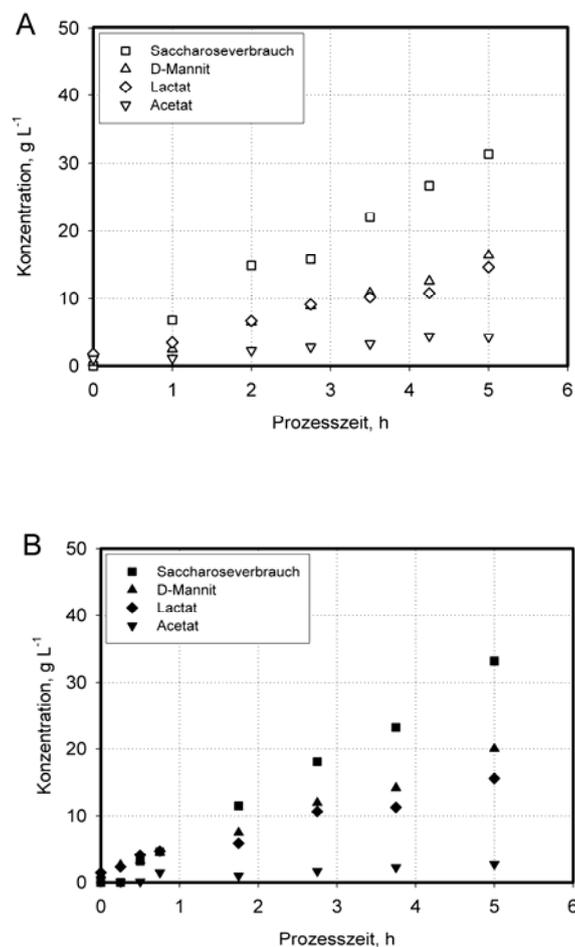


Abbildung 5.28 Stoffbilanz von *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* für die Produkte D-Mannit, Lactat und Acetat im Verhältnis zur verbrauchten Saccharose im Satzverfahren mit Melassemedium. (A) 400 g L<sup>-1</sup> Melasse; (B) 320 g L<sup>-1</sup> Melasse; (C) 180 g L<sup>-1</sup> Melasse. Die Konzentrationen wurden nach einer Prozesszeit von etwa 50 Stunden ermittelt.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen bietet sich eine Verkürzung der Prozesszeit an, da trotz vorliegendem Substrat die zellspezifische Produktivität einen starken Rückgang erfährt. Dies trifft ebenso für die Nebenprodukte Lactat und Acetat zu (siehe Abbildung 5.26), wobei ab einer Prozesszeit von 24 Stunden keine deutlichen Konzentrationsänderungen zu beobachten waren.

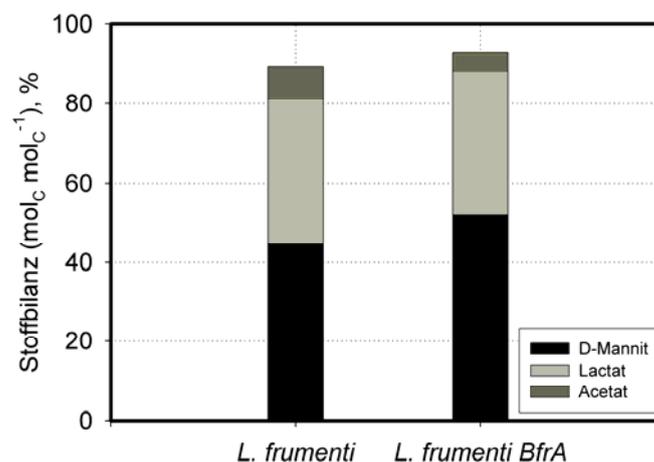
Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen wurde eine Biotransformation mit ruhenden Zellen von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* mit  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose in Melassemedium unter pH-kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug fünf Stunden (siehe Abbildung 5.29).



**Abbildung 5.29** Biotransformation mit *Lactobacillus frumenti* (A) und *Lactobacillus frumenti BfrA* (B). Die im Rührkesselreaktor eingesetzte Biotrockenmassekonzentration betrug  $5,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti*) und  $4,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti BfrA*). Es wurden  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose (Melassemedium) eingesetzt und der pH mit 4 N NaOH auf 6,2 geregelt. ( $V = 1,0 \text{ L}$ ;  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ).

Während der Biotransformation mit *L. frumenti* wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und eine spezifische Produktbildungsrate von  $0,55 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht. Sowohl der Saccharoseverbrauch als auch die Produktbildung erfolgte über eine Prozessdauer von 6 Stunden linear. Für den rekombinanten Stamm wurde eine volumetrische Produktivität von  $3,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ermittelt, die spezifische Produktbildungsrate betrug  $0,86 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Im Gegensatz zur vorangegangenen Biotransformation konnte in diesem Fall die Stoffbilanz in der Summe zwar nahezu geschlossen werden, wenngleich es auch in diesem Fall eine Konzentrationsverschiebung zwischen Lactat und Acetat gab. Gegenüber einer theoretischen Ausbeute von  $0,25 \text{ mol Lactat mol}^{-1}$  Substrat, bei alleiniger Verstoffwechslung von Saccharose, wurden für *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA*  $0,36 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  ermittelt. Für Acetat hingegen ergab die Berechnung statt  $0,17 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  für *L. frumenti*  $0,08 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$  sowie für *L. frumenti BfrA* lediglich  $0,05 \text{ mol}_C \text{ mol}_C^{-1}$ .

Der Überschuss an gebildetem Lactat betrug somit für beide Stämme nahezu 45 %. Für Acetat ergab sich hingegen ein Defizit von 50 % für *L. frumenti* beziehungsweise 72 % für *L. frumenti BfrA*.



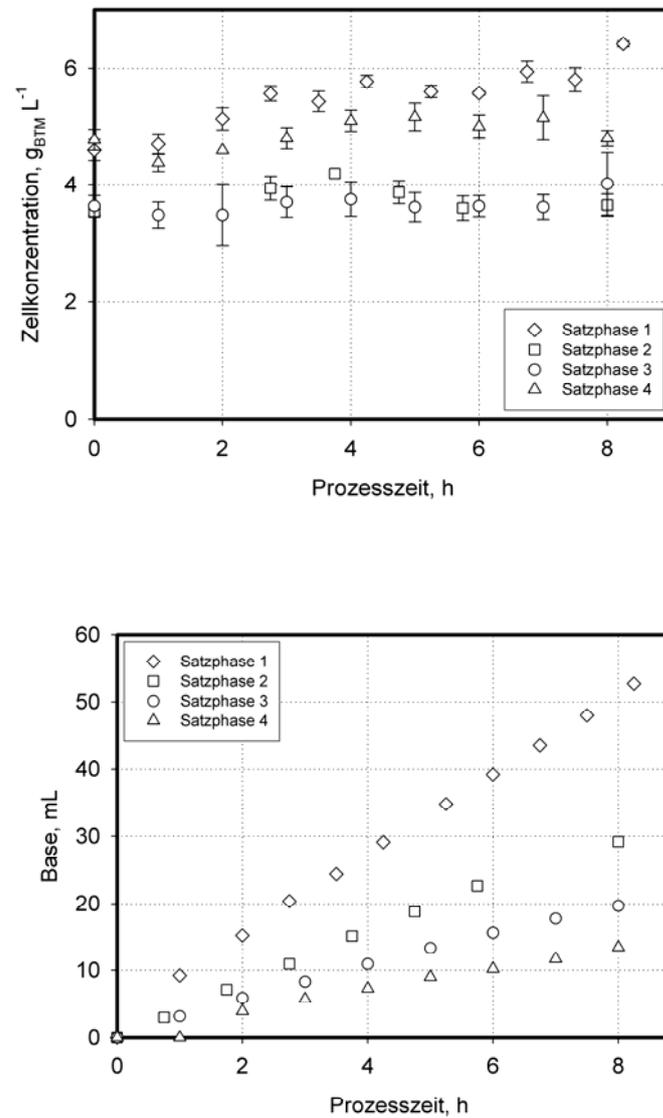
**Abbildung 5.30** Stoffbilanz von *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* für die Produkte D-Mannit, Lactat und Acetat im Verhältnis zur verbrauchten Saccharose im Satzverfahren mit Melassemedium ( $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose) und pH-Kontrolle. Die Konzentrationen wurden nach einer Prozesszeit von 5 Stunden ermittelt.

### 5.5.2 D-Mannitbildung mit Melasse im wiederholten Satzverfahren

Versuche zur D-Mannitbildung mit ruhenden Zellen im Satzverfahren ohne pH-Kontrolle haben gezeigt, dass es unabhängig von der Melassekonzentration und der Zellkonzentration zu einer Abnahme der zellspezifischen Produktivität im Prozessverlauf kommt. Bereits nach sechs Stunden kam es sowohl für *Lactobacillus frumenti* als auch *Lactobacillus frumenti BfrA* zu einer Abnahme von circa 60 %. Nach 48 Stunden betrug die zellspezifische Produktivität nur noch etwa 10 % des Ausgangswertes. Im wiederholten Satzverfahren mit pH-Kontrolle soll nun überprüft werden, inwieweit ein mehrfacher Medienwechsel eine Reduktion der zellspezifischen Produktivität verhindern könnte da ein Anhäufen von Stoffwechselendprodukten wie Lactat und Acetat umgangen wird.

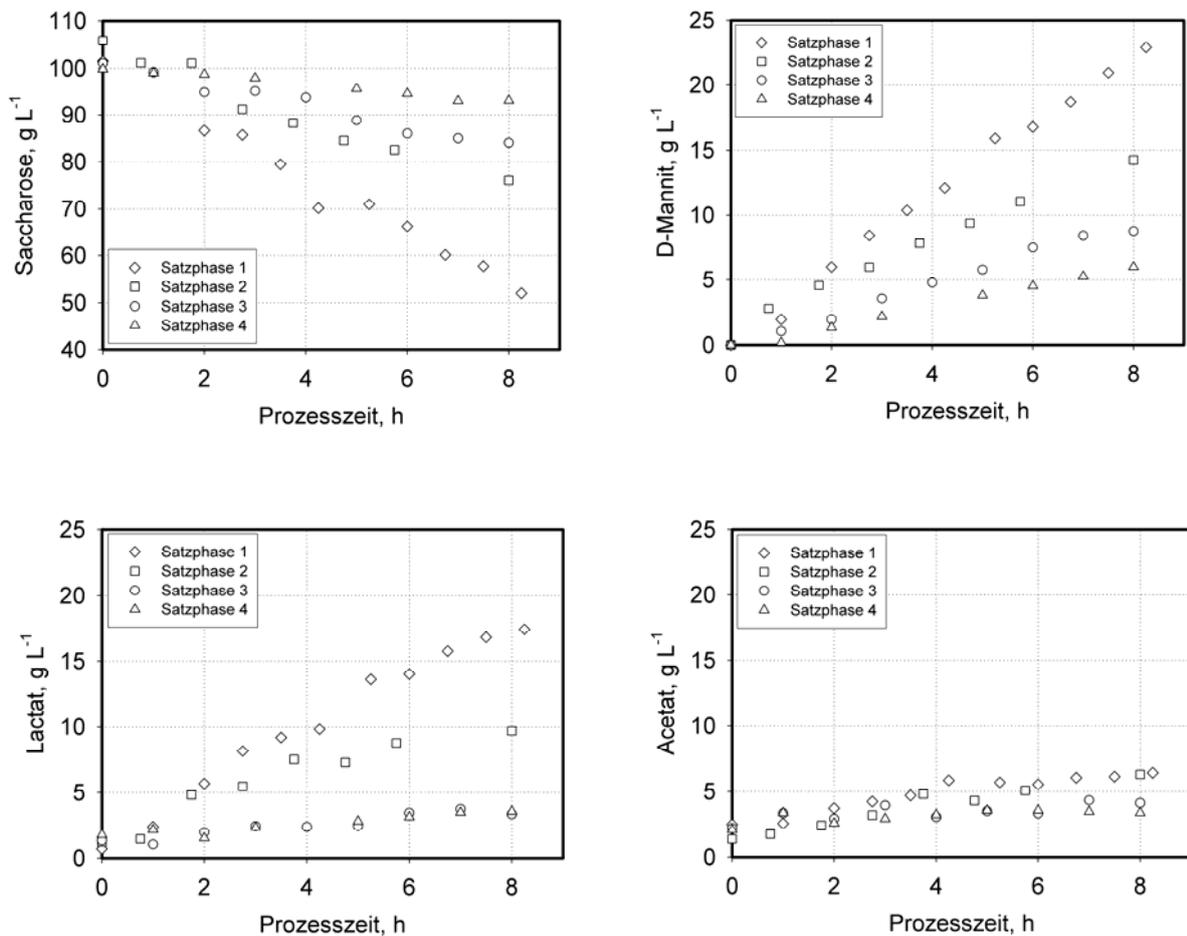
Die Dauer der einzelnen Prozessphasen im wiederholten Satzverfahren betragen jeweils 7 bis 8 Stunden, wobei jeweils vier Wiederholungen durchgeführt wurden. Nach Ablauf eines Teilprozesses wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und in neuem Medium resuspendiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität genommen.

Die folgenden Abbildungen zeigen eine Übersicht über die beiden wiederholten Satzverfahren.



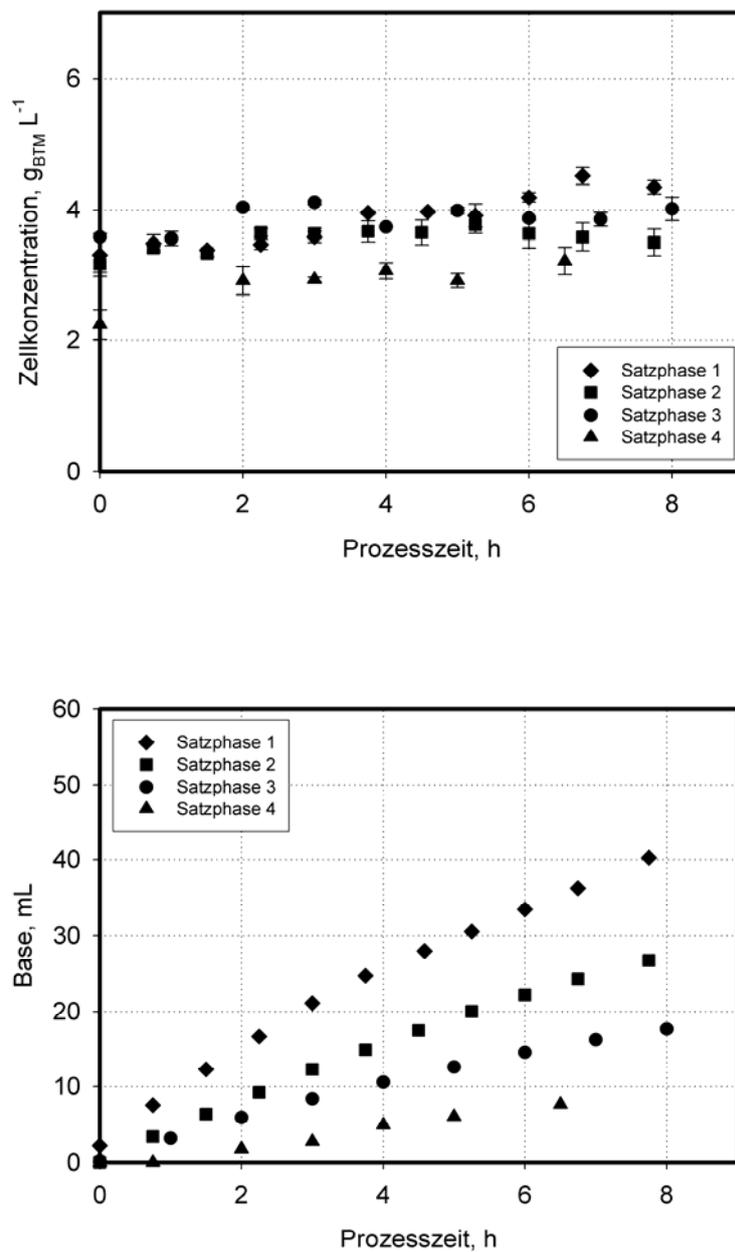
**Abbildung 5.31** Vierfach wiederholter Satzversuch (#1 - #4) mit *Lactobacillus frumenti*. Es wurde ein Melassemedium mit 100 g L<sup>-1</sup> Saccharose eingesetzt. (V = 1,0 L; T = 37 °C; pH = 6,2; n = 300 min<sup>-1</sup>).

Abbildung 5.32 zeigt die Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen für einen viermalig wiederholten Satzversuch mit *Lactobacillus frumenti*.

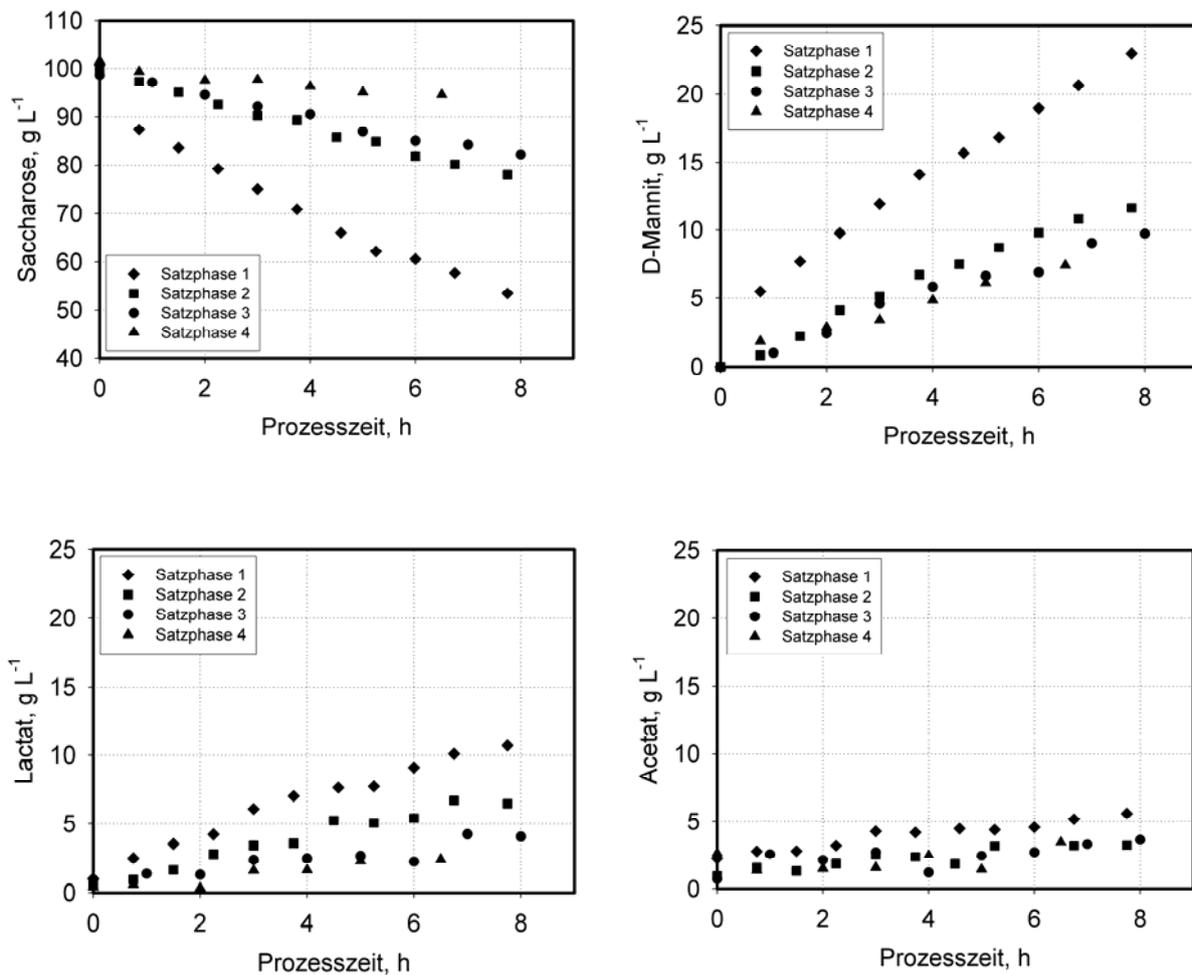


**Abbildung 5.32** Übersicht über die Substrat- und Produktkonzentrationen in vier wiederholten Satzversuchen mit *Lactobacillus frumenti* bei einer Substratkonzentration von  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose in einem Melassemedium. ( $V = 1,0 \text{ L}$ ;  $T = 37 \text{ °C}$ ;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ).

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration und der Basezudosierung für einen entsprechenden Versuch mit *Lactobacillus frumenti* BfrA.

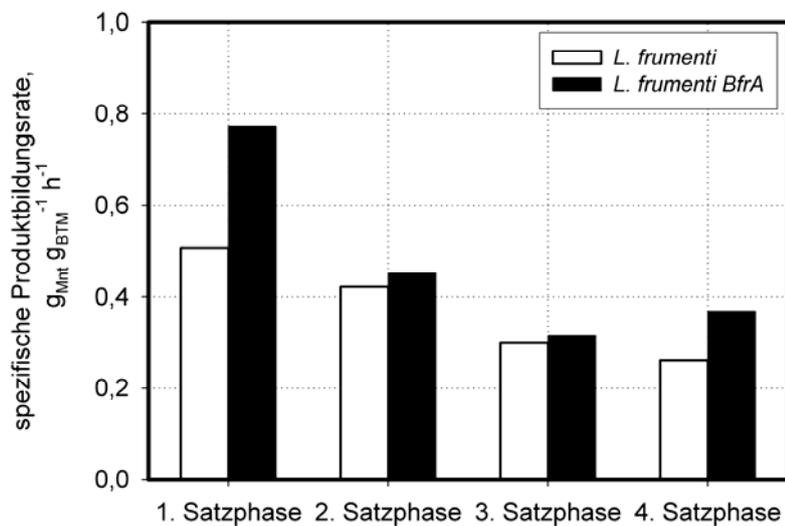


**Abbildung 5.33** Vierfach wiederholter Satzversuch mit *Lactobacillus frumenti* BfrA. Es wurde ein Melassemedium mit 100 g L<sup>-1</sup> Saccharose eingesetzt. (V = 1,0 L; T = 37 °C; pH = 6,2; n = 300 min<sup>-1</sup>).



**Abbildung 5.34** Übersicht über die Substrat- und Produktkonzentrationen in vier wiederholten Satzversuchen mit *Lactobacillus frumenti BfrA* bei einer Substratkonzentration von  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose in Melassemedium.

Für beide Stämme kommt es während der gesamten Prozesszeit der einzelnen Satzverfahren zu einer konstanten Bildung von D-Mannit, Lactat und Acetat, wengleich bei einer nahezu konstanten Biotrockenmassekonzentration für beide Stämme von *Lactobacillus frumenti* eine Abnahme der Produktivität zu beobachten ist. Eine Zunahme der Biotrockenmassekonzentration von 24 % (*L. frumenti*) beziehungsweise 28 % (*L. frumenti BfrA*) ist lediglich im ersten Satzversuch zu beobachten. Abbildung 5.35 zeigt vergleichend die spezifischen Produktbildungs-raten der einzelnen Satzverfahren.



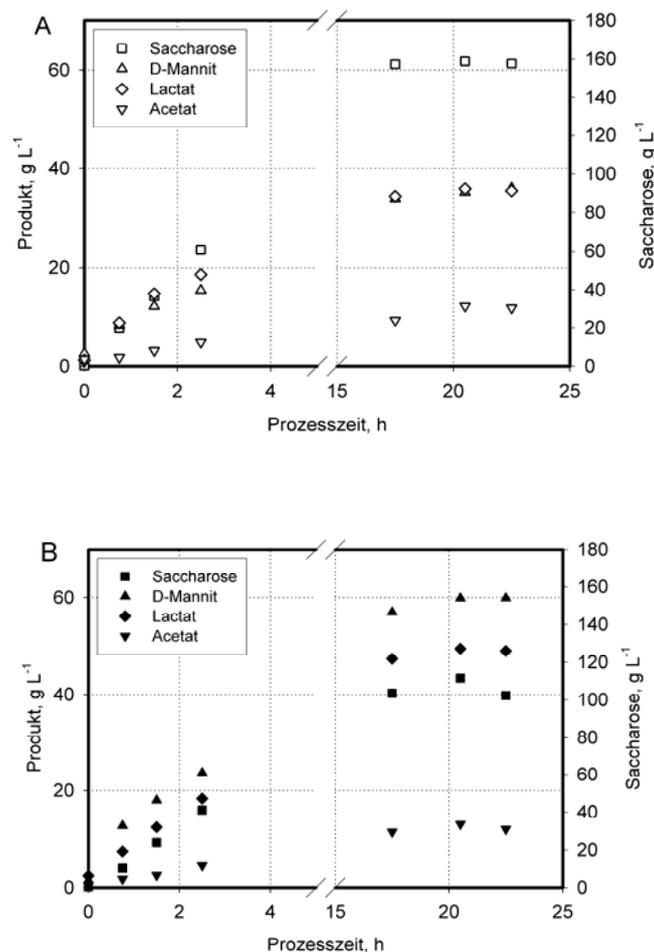
**Abbildung 5.35** Gegenüberstellung der zellspezifischen Produktbildungsrate von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* in den einzelnen wiederholten Satzverfahren (#1 - #4) während einer Prozessdauer von 7 - 8 Stunden. Die Substratkonzentration in der Melasse betrug  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose.

Ebenso wie im einfachen Satzversuch ohne pH-Kontrolle wurde auch im wiederholten Satzverfahren eine Abnahme der Produktivität beobachtet. Für beide Stämme betrug der Rückgang zwischen dem ersten und dem vierten Satzversuch 50 %, wobei *Lactobacillus frumenti* während des ersten Satzversuches noch eine zellspezifische Produktivität von  $0,51 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  über einen Zeitraum von 8 Stunden aufwies und *Lactobacillus frumenti BfrA*  $0,77 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (volumetrische Produktivität von  $2,77 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $2,96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

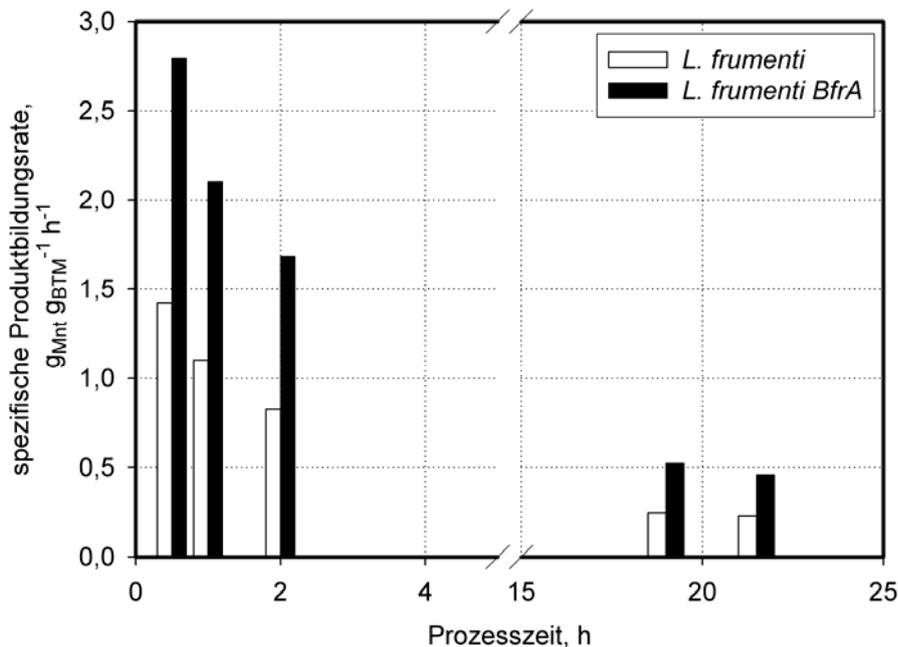
### 5.5.3 D-Mannitbildung mit Melasse im Zulaufverfahren

Für die Versuche zur D-Mannitbildung mit ruhenden Zellen im Zulaufverfahren wurden die Zellen zunächst in Saccharosemedium kultiviert, um Biomasse zu gewinnen. Die Zellen wurden anschließend geerntet, abzentrifugiert und in Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde wieder dem Rührkesselreaktor zugeführt und der Melassezulauf ( $F = 0,1 \text{ L h}^{-1}$ ) umgehend gestartet.

Ab dem Beginn des Zulaufverfahrens blieb die Biotrockenmassekonzentration für beide Stämme von *Lactobacillus frumenti* über 24 Stunden nahezu konstant, wobei *Lactobacillus frumenti* mit  $6,9 \pm 0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ , und *Lactobacillus frumenti BfrA* mit  $5,6 \pm 0,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  vorgelegt wurde. Nach einer Zulaufphase von 24 Stunden wurden für *Lactobacillus frumenti*  $36,0 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit,  $35,5 \text{ g L}^{-1}$  Lactat und  $11,9 \text{ g L}^{-1}$  Acetat gemessen. Für den rekombinanten Stamm *Lactobacillus frumenti BfrA* betragen die Konzentrationen  $59,9 \text{ g L}^{-1}$  (D-Mannit),  $49,0 \text{ g L}^{-1}$  (Lactat) beziehungsweise  $12,0 \text{ g L}^{-1}$  (Acetat). Die Biotrockenmassekonzentrationen wurden nach 24 Stunden mit  $6,7 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  für *L. frumenti* und  $5,8 \pm 0,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  für *L. frumenti BfrA* bestimmt. Eine Übersicht über den Verlauf der Produktbildung zeigt Abbildung 5.36.



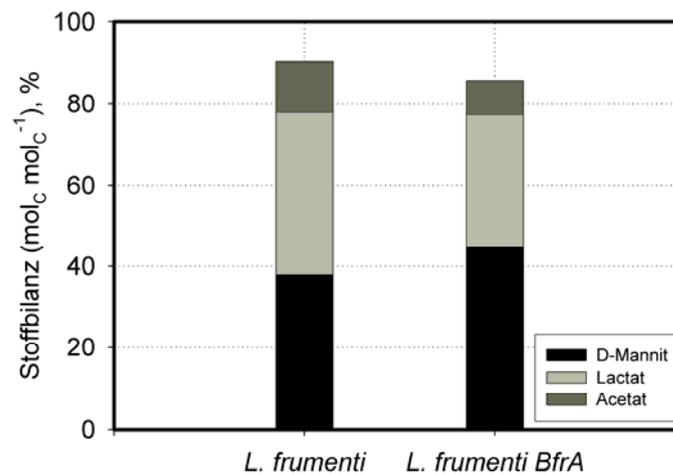
**Abbildung 5.36** Vergleichende Produktbildung von *Lactobacillus frumenti* (A) und *Lactobacillus frumenti BfrA* (B) während eines Zulaufverfahrens mit Melasse ( $300 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose ( $V = 2,0 \text{ L}$ ;  $T = 37 \text{ °C}$ ;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $n = 300 \text{ min}^{-1}$ ;  $F = 0,1 \text{ L h}^{-1}$ ).



**Abbildung 5.37** Spezifische Produktbildungsrate für D-Mannit in einem Zulaufverfahren mit *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* während einzelner Messintervalle.

Für die Raum-Zeit-Ausbeute ergaben sich über einen Prozessverlauf von 24 Stunden  $1,49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für *Lactobacillus frumenti* beziehungsweise  $2,60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für *Lactobacillus frumenti BfrA*. Die spezifischen Produktbildungsrate während einzelner Messintervalle des Zulaufverfahrens sind in Abbildung 5.37 dargestellt.

Wie bereits in vorangegangenen Versuchen gezeigt, unterliegt die zellspezifische Produktivität einer starken zeitlichen Abnahme. Innerhalb der ersten beiden Stunden nach Beginn des Zulaufs kommt es zu einer Reduktion der zellspezifischen Produktbildungsrate um 48 % beziehungsweise 60 % für *Lactobacillus frumenti*. Bei dem rekombinanten Stamm *Lactobacillus frumenti BfrA* beträgt der Rückgang 45 % beziehungsweise 67 %. Die molare Ausbeute für das Produkt D-Mannit beträgt für *L. frumenti*  $0,77 \text{ mol mol}^{-1}$  und für *L. frumenti BfrA*  $0,89 \text{ mol mol}^{-1}$ . Eine gesamte Stoffbilanz für die Produkte D-Mannit, Lactat und Acetat ist in Abbildung 5.38 dargestellt.



**Abbildung 5.38** Stoffbilanz von *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* für die Produkte D-Mannit, Lactat und Acetat im Verhältnis zur verbrauchten Saccharose im Zulaufverfahren mit Melassemedium (300 g L<sup>-1</sup> Saccharose). Die Konzentrationen wurden nach einer Prozesszeit von 24 Stunden ermittelt.

Wie auch schon bei früheren Versuchen beobachtet, kann für die beiden Nebenprodukte Lactat und Acetat die Stoffbilanz nicht geschlossen werden. Gegenüber einer theoretischen Ausbeute von 0,25 mol<sub>C</sub> mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> für Lactat, bezogen auf das alleinige Substrat Saccharose, wurden für *L. frumenti* 0,59 mol<sub>C</sub> mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> und für *L. frumenti BfrA* 0,30 mol<sub>C</sub> mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> ermittelt. Ebenso wie in vorangegangenen Stoffbilanzen betrug die Bilanz für Acetat nur 0,12 mol<sub>C</sub> mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> (*L. frumenti*) beziehungsweise 0,08 mol<sub>C</sub> mol<sub>C</sub><sup>-1</sup> (*L. frumenti BfrA*) gegenüber einer theoretischen Ausbeute von 0,17 mol<sub>C</sub> mol<sub>C</sub><sup>-1</sup>.

#### 5.5.4 Diskussion

Primäre Produktbildungsphase ist der Zeitraum direkt nach dem Start der Biotransformation mit Melassemedium. Innerhalb kurzer Zeit erreicht *Lactobacillus frumenti BfrA* volumetrische Produktivitäten von bis zu 22,0 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> gegenüber 13,9 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> durch den Wildtyp. Diese hohe Produktivität ist allerdings nur auf die erste halbe Stunde des Versuches beschränkt. Eine länger dauernde Biotransformation führt, wie auch bei wachsenden Zellen, zu einer fortwährenden Abnahme der

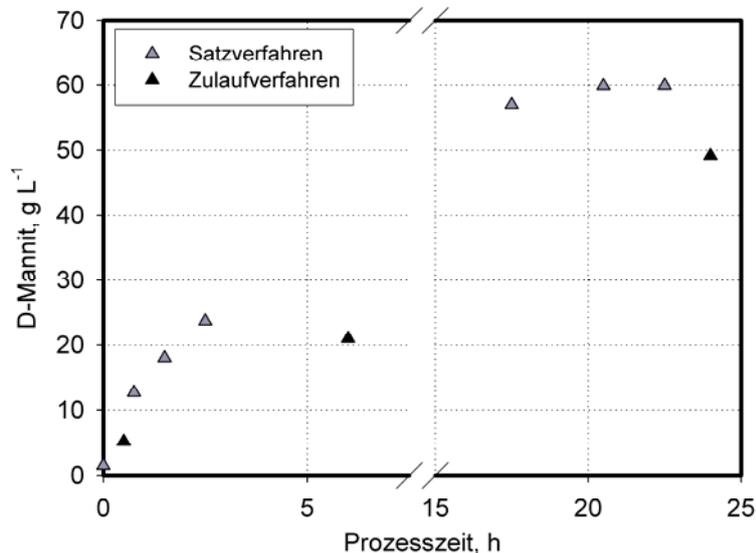
spezifischen Produktbildung. In Satzverfahren mit Melasse ( $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose), bei gleichzeitiger pH-Kontrolle erreichten die Zellen über eine Prozesszeit von 6 Stunden volumetrische Produktivitäten von  $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $3,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Die entsprechenden zellspezifischen Produktbildungsraten betragen für *L. frumenti*  $0,55 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,86 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für *L. frumenti BfrA*.

Die wiederholten Satzverfahren haben für beide Stämme von *Lactobacillus frumenti* deutliche Limitierungen aufgezeigt. Gegenüber  $0,51 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*L. frumenti*,  $5,5 \pm 0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ ) und  $0,77 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*Lactobacillus frumenti BfrA*,  $3,8 \pm 0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ ) im ersten Satzversuch (volumetrische Produktivität von  $2,72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $2,96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) wurden im vierten Satzverfahren nur noch  $0,26$  beziehungsweise  $0,36 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* erreicht (volumetrische Produktivität von  $1,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $1,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Im Gegensatz dazu konnte von Weymarn et al. (2002 b) mit dem Stamm *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135 ein Satzverfahren bis zu 14 Mal wiederholen, wobei zellspezifische Produktbildungsraten von bis zu  $1,7 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  erreicht wurden. Die Produktkonzentration erreichte in einem Medium mit Glucose und Fructose, ausgehend von einer Biotrockenmassekonzentration von  $15 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  circa  $100 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit.

Im Zulaufverfahren mit ruhenden Zellen konnten volumetrische Produktivitäten von  $1,49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*L. frumenti*) und  $2,60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*L. frumenti BfrA*) erreicht werden. Ebenso wie im Satzverfahren erreichten die Zellen zwar während der frühen Zulaufphase hohe zellspezifische Produktivitäten (*L. frumenti*:  $1,42 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; *L. frumenti BfrA*:  $2,79 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), bezogen auf die gesamte Zulaufphase betragen die zellspezifischen Produktivitäten aber nur  $0,23 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,46 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Eine Gegenüberstellung von Biotransformationen mit ruhenden Zellen von *L. frumenti BfrA* unter verschiedenen Prozessbedingungen ist in Abbildung 5.39 dargestellt. Für einen Vergleich wurden die Daten aus einer Biotransformation im Satzverfahren mit  $5,1 \pm 0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  und einer Substratkonzentration von  $180 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose, sowie einem Zulaufverfahren mit  $5,4 \pm 0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  und einer Saccharosekonzentration im Zulaufmedium von  $300 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose gegenübergestellt. In dem betrachteten Zeitraum bestand bei beiden Biotransformationen keine Substratlimitierung. Die Werte der Biotransformation im

Satzverfahren zeigen nicht den gesamten ursprünglichen Verlauf, da die Prozesszeit 48 Stunden betrug.



**Abbildung 5.39** Vergleichende Darstellung einer Biotransformation mit ruhenden Zellen von *L. frumenti BfrA* im Satz- und Zulaufverfahren.

Bei Vorlage einer identischen Biotrockenmassekonzentration kommt es im Zulaufverfahren über die gesamte Prozesszeit zu einer höheren Produktbildung. Die Produktkonzentrationen betragen im Satzverfahren  $49,1 \text{ g L}^{-1}$  und im Zulaufverfahren  $59,9 \text{ g L}^{-1}$ . Der schnellere Anstieg der D-Mannitkonzentration im Zulaufverfahren basiert vermutlich auf der langsamen Zudosierung des Substrates. Hohe und kritische Substratkonzentrationen wie im Satzverfahren werden dadurch vermieden, die Belastung für die Zellen reduziert. Wie bereits beschrieben kommt es dennoch in beiden Fällen zu einer starken Abnahme der spezifischen Produktivität. Die D-Mannit ausbeuten wurden in beiden Verfahren mit  $0,89 \text{ mol mol}^{-1}$  sowie  $0,92 \text{ mol mol}^{-1}$  ermittelt. Die Prozessführung scheint somit keinen Einfluss auf die Ausbeute zu haben, wengleich in weiteren Satzverfahren auch Ausbeuten größer gleich  $0,98 \text{ mol mol}^{-1}$  beobachtet wurden.

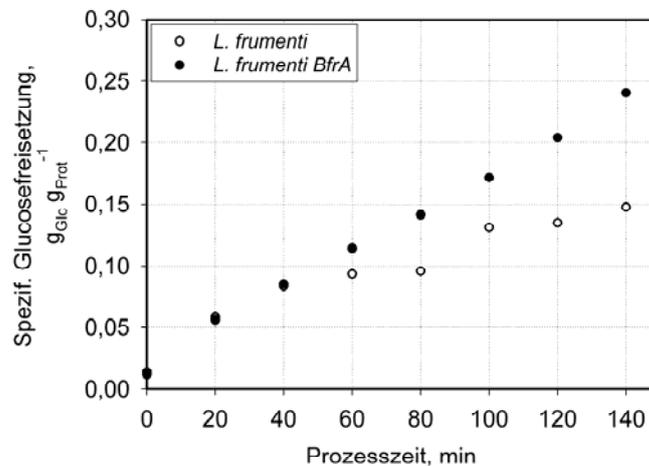
Vor allem die niedrigeren Produktivitäten und erzielten Produktkonzentrationen durch *L. frumenti BfrA* scheinen im Vergleich zu publizierten Verfahren der bakteriellen D-Mannitsynthese nachteilig zu sein. Diese Nachteile werden allerdings dadurch relativiert, dass durch die Verwendung von reinen Melasselösungen auf teurere

Ausgangssubstrate wie Fructose verzichtet wird und eine höhere Wertschöpfung erzielt werden kann.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Melasse besitzt zwar einen hohen Restzuckeranteil, kann aufgrund seiner Verunreinigungen aber beispielsweise nicht für katalytische Verfahren zur D-Mannitsynthese eingesetzt werden. Milchsäurebakterien, wie *Lactobacillus frumenti*, können ausgehend von Saccharose D-Mannit bilden und weisen darüber hinaus eine hohe Osmo- und pH-Toleranz auf. Um eine verbesserte Verfügbarkeit von Fructose für die D-Mannitsynthese auf der Grundlage von Melasse zu gewährleisten, wurde eine  $\beta$ -Fructosidase aus *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 in *Lactobacillus frumenti* kloniert. Für eine Evaluierung zur möglichen industriellen Nutzung des rekombinanten Stammes *Lactobacillus frumenti BfrA* wurden die Stoffwechselleistungen im Vergleich zum Wildtyp zur Melasseverwertung reaktionstechnisch untersucht und charakterisiert.

Durch die Klonierung des Enzyms konnte zunächst eine erhöhte Saccharose-spaltung im Rohextrakt von *Lactobacillus frumenti BfrA* festgestellt werden (siehe Abbildung 6.1).



**Abbildung 6.1** Spezifische Glucosefreisetzung im Rohextrakt von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA*. Aufgetragen ist die freigesetzte Glucose nach enzymatischer Saccharosespaltung. Die Glucosekonzentration wurde auf die Proteinkonzentration im Rohextrakt bezogen

Darüber hinaus wurden beide Stämme von *Lactobacillus frumenti* sowohl in Wachstumsversuchen als auch unter verschiedenen Prozessbedingungen als ruhende Zellen miteinander verglichen.

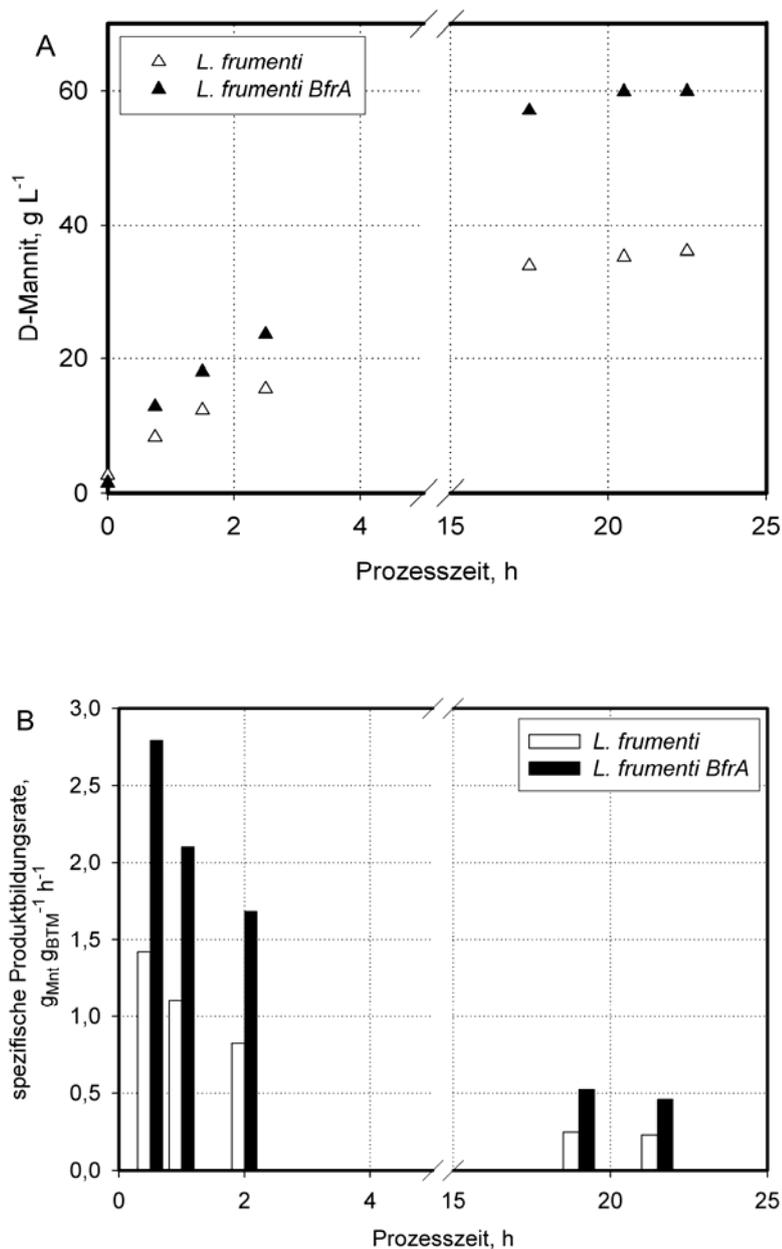
Ein direkter Einsatz von verdünnter Melasse ermöglicht nur geringes Wachstum und Produktbildung von *Lactobacillus frumenti* (maximale Wachstumsraten ( $\mu_{max}$ ) von  $0,04 - 0,06 h^{-1}$  bei einer Saccharosekonzentration von bis zu  $100 g L^{-1}$  in der Melasse). Die maximale D-Mannitkonzentration betrug nur  $4 g L^{-1}$  nach einer Prozesszeit von 24 Stunden im Satzverfahren. Melasse mit einer Konzentration von  $150 g L^{-1}$  Saccharose führte zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums von *L. frumenti*. Erst die Ergänzung der verdünnten Zuckerrübenmelasse mit einem komplexen Saccharosemedium ermöglichte sowohl Wachstum von *L. frumenti* als auch D-Mannitbildung. *Lactobacillus frumenti* erreichte in diesem ergänzten Medium im Satzverfahren Biotrockenmassekonzentrationen von  $3,3 \pm 0,7 g_{BTM} L^{-1}$ , *Lactobacillus frumenti BfrA*  $3,0 \pm 0,7 g_{BTM} L^{-1}$ . Aufgrund der Zugabe des Selektionsmarkers Erythromycin kommt es für den rekombinanten Stamm zu Verzögerungen im Wachstum und der Produktbildung. Bezogen auf die verbrauchte Menge an Saccharose erfolgte für beide Stämme eine äquimolare Umsetzung der freigesetzten Fructose zu D-Mannit.

Im Zulaufverfahren mit wachsenden Zellen wurde im Prozessverlauf eine Akkumulation von  $59,3 \text{ g L}^{-1}$  (*L. frumenti*) beziehungsweise  $66,4 \text{ g L}^{-1}$  (*L. frumenti BfrA*) D-Mannit nach 48 Stunden erreicht. Auch im Zulaufverfahren konnte eine nahezu vollständige Umsetzung des Fructoseanteils von Saccharose zu D-Mannit nachgewiesen werden ( $0,96 \text{ mol mol}^{-1}$  für *L. frumenti* und  $1,0 \text{ mol mol}^{-1}$  für *L. frumenti BfrA*).

Bei der Verwendung von ruhenden Zellen in Biotransformationen wurde mit beiden Stämmen bereits nach wenigen Stunden ein starker Rückgang in der spezifischen und volumetrischen Produktivität beobachtet. Die mittlere zellspezifische Produktivität bei Melassekonzentrationen von  $400 \text{ g L}^{-1}$  und  $320 \text{ g L}^{-1}$  betrug in den ersten 6 Stunden für *L. frumenti*  $0,39 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  beziehungsweise  $0,65 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  für *L. frumenti BfrA*. Obwohl zum Zeitpunkt der letzten Messung nach 48 Stunden noch Substrat im Medium vorhanden war, sank die spezifische Produktbildung der Zellen auf unter  $0,08 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Versuche zur D-Mannitsynthese in einem wiederholten Satzverfahren mit  $100 \text{ g L}^{-1}$  Saccharose in einem Melassemedium führten ebenfalls zu einem starken Rückgang in der spezifischen Produktivität. Für beide Stämme betrug der Rückgang zwischen dem ersten und dem vierten Satzversuch 50 %, wobei *Lactobacillus frumenti* während des ersten Satzversuches noch eine zellspezifische Produktivität von  $0,51 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  über einen Zeitraum von 8 Stunden aufwies und *Lactobacillus frumenti BfrA*  $0,77 \text{ g}_{\text{Mnt}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Bei der Verwendung von ruhenden Zellen in einem Zulaufverfahren mit  $6,9 \pm 0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*L. frumenti*) und  $5,6 \pm 0,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (*L. frumenti BfrA*) bildete der Wildtyp  $36,0 \text{ g L}^{-1}$  D-Mannit,  $35,5 \text{ g L}^{-1}$  Lactat und  $11,9 \text{ g L}^{-1}$  Acetat. Der rekombinante Stamm erreichte  $59,9 \text{ g L}^{-1}$  (D-Mannit),  $49,0 \text{ g L}^{-1}$  (Lactat) beziehungsweise  $12,0 \text{ g L}^{-1}$  (Acetat). Abbildung 6.2 zeigt sowohl die Konzentrationsverläufe der gebildeten Produkte, als auch die spezifische Produktbildungsrate der Zellen im Vergleich.



**Abbildung 6.2** Vergleichende Produktbildung von *Lactobacillus frumenti* und *Lactobacillus frumenti BfrA* (A) während eines Zulaufverfahrens mit Melasse (300 g L<sup>-1</sup> Saccharose), sowie die spezifische Produktbildungsrate für D-Mannit während einzelner Messintervalle (B). ( $V = 2,0$  L;  $T = 37$  °C;  $\text{pH} = 6,2$ ;  $n = 300$  min<sup>-1</sup>;  $F = 0,1$  L h<sup>-1</sup>).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass mit dem genetisch veränderten Stamm eine effizientere D-Mannitproduktion aus Zuckerrübenmelasse möglich ist.

## *Ausblick*

Neben dem rekombinanten Vektor pGKV::BfrA entstand auch der Vektor pMGe::BfrA während den molekularbiologischen Arbeiten. Dieser kann ebenfalls in *Lactobacillus frumenti* kloniert und als weiterer Vergleich für eine verbesserte D-Mannitsynthese herangezogen werden. Darüber hinaus ist eine weitere Stammentwicklung durch die Klonierung eines induzierbaren Promotors möglich.

Die Ergebnisse aus der Prozessentwicklung haben sowohl gezeigt, dass eine effizientere D-Mannitsynthese durch die Klonierung einer  $\beta$ -Fructosidase als auch die Verwendung von Zuckerrübenmelasse als Nährstoffquelle möglich ist.

Allerdings haben die Versuche auch gezeigt, dass vor allem während Biotransformationen mit ruhenden Zellen ein starker Rückgang der zellspezifischen Produktivität zu verzeichnen war. Es bleibt zu klären, inwieweit diese Verringerung verhindert werden kann, beispielsweise durch die Zugabe weiterer Medienbestandteile, da sie erheblichen Einfluss auf die dauerhafte Verwendung von *L. frumenti* und *L. frumenti BfrA* als Biokatalysatoren zur D-Mannitsynthese nimmt.

D-Mannit kann aus Fermentationslösungen beispielweise mittels Kühlungs-kristallisation und Anionenaustauscherchromatographie gewonnen und aufgereinigt werden. In weiterführenden Versuchen sollte geklärt werden, inwieweit sich diese Verfahrensschritte auch auf Melassehaltige Lösungen übertragen lassen, da diese durch zusätzliche Verunreinigungen gegenüber Standardmedien veränderte Verfahrensansprüche stellen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Aarnikunnas J**, Ronnholm K, Palva A. (2002): The mannitol dehydrogenase gene (mdh) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial mdh genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 665-671.

**Adachi O**, Toyama H, Matsushita K. (1999): Crystalline NADP-dependent D-mannitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* 63: 402-407.

**Aksu Z**, Kutsal T. (1986). Lactic acid production from molasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together. *Biotechnol. Letters* 8(3): 157-160

**Albert R**, Strätz A, Vollheim G. (1980): Die katalytische Herstellung von Zuckeralkoholen und deren Verwendung. *Chemie Ingenieur Technik* 52: 582-587.

**Alberto F**, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M. (2004): The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem* 279: 18903-18910.

**Arskold E**, Lohmeier-Vogel E, Cao R, Roos S, Radstrom P, van Niel EW. (2008): Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *J Bacteriol* 190: 206-212.

**Atiyeh H**, Duvnjak Z. (2002): Production of fructose and ethanol from sugar beet molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. *Biotechnol Prog* 18: 234-239.

**Atiyeh H**, Duvnjak. (2005): Purification of Fructose Syrups Produced from Cane Molasses Media Using Ultrafiltration Membranes and Activated Carbon. *Separation Science and Technology* 39: 341-362.

**Axelsson L** (1998): Lactic acid bacteria: Classification and physiology. Ed. Salminen S, von Wright A. Marcel Dekker Verlag New York, Basel, Hong Kong 1-72

- Baek H**, Song KH, Park SM, Kim SY, Hyun HH. (2003): Role of glucose in the bioconversion of fructose into mannitol by *Candida magnoliae*. *Biotechnol Lett* 25: 761-765.
- Baumchen C**, Roth AH, Biedendieck R, Malten M, Follmann M, Sahn H, Bringer-Meyer S, Jahn D. (2007 a): D-mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol J* 2: 1408-1416.
- Baumchen C**, Bringer-Meyer S. (2007 b): Expression of *glf* Z.m. increases D-mannitol formation in whole cell biotransformation with resting cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 545-552.
- Baumchen C**, Krings E, Bringer S, Eggeling L, Sahn H. (2009): Myo-inositol facilitators *lolT1* and *lolT2* enhance D-mannitol formation from D-fructose in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 290: 227-235.
- Becker T**, Breithaupt D, Doelle HW, Fiechter A, Griensven M, Kasper C, Lütz S, Pörtner R, Schlegel HG, Sell D, Shimizu S, Stahl F, Suck K, Ulmer R, Wegener J, Würges J, Yamada H, Zorn H (2007): *Biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim 1-153
- Behr J**, Ganzle MG, Vogel RF. (2006): Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl Environ Microbiol* 72: 6483-6492.
- Berlec A**, Strukelj B (2010) Novel applications of recombinant lactic acid bacteria in therapy and in metabolic engineering. *Rec Pat Biotechnol* 3(2): 77-87
- Bockmann J**, Heuel H, Lengeler JW. (1992): Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132. *Mol Gen Genet* 235: 22-32.
- Bolotin A**, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malmme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. (2001): The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11: 731-753.
- Brandner J**, Wright L. (1967): Production of mannitol and sorbitol by hydrogenating sugars under neutral, then alkaline and finally acidic conditions. Patent US3329729
- Brunker P**, Altenbuchner J, Kulbe KD, Mattes R. (1997): Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1351: 157-167.
- Brurberg MB**, Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, Venema G, Nes IF. (1994): Expression of a chitinase gene from *Serratia marcescens* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: 108-115.
- Caplice E**, Fitzgerald GF. (1999): Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* 50: 131-149.
- Carlson M**, Taussig R, Kustu S, Botstein D. (1983): The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol Cell Biol* 3: 439-447.
- Chaturvedi V**, Flynn T, Niehaus WG, Wong B. (1996): Stress tolerance and pathogenic potential of a mannitol mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 142 : 937-943.

- Clarke S.** (1995): Softening and purification of molasses or syrup. Patent 5454875
- Conde C,** Silva P, Agasse A, Lemoine R, Delrot S, Tavares R, Geros H (2007): Utilization and Transport of manitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance. *Plant Cell Physiol* 48(1) 42-53
- Corsetti A,** Settanni L. (2007): Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* 40: 539-558.
- Costenoble R,** Adler L, Niklasson C, Liden G. (2003): Engineering of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic production of mannitol. *FEMS Yeast Res* 3: 17-25.
- de Vos W,** Hugenholtz J. (2004): Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol* 22: 72-79.
- Deberardinis A,** Kruse W. (1981): High mannitol process (alkaline hydrogenation in presence of alkali metal carbonate). Patent 4292451
- del Solar G,** Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. (1998): Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 434-464.
- de Man JC,** Rogosa M, Sharpe ME. (1960): A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bact.* 23(1): 130-135
- Devos F.** (1995): Process for the manufacture of mannitol. Patent 5466795
- Dewing J,** Ruddlesden J, Stewart A, Thompson D. (1980): Process for the reduction of sugars to sugar alcohols. Patent EP0006313
- Dols M,** Chraibi W, Remaud-Simeon M, Lindley ND, Monsan PF. (1997): Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl Environ Microbiol* 63: 2159-2165.
- Domelsmith L,** Klich MA, Goynes WR. (1988): Production of Mannitol by Fungi from Cotton Dust. *Appl Environ Microbiol* 54: 1784-1790.
- Dumbrepatil A,** Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. (2008): Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl Environ Microbiol* 74: 333-335.
- Dutsch G,** Rast D. (1969): Biosynthesis of mannitol in *Agaricus bisporus*. *Arch Mikrobiol* 65: 195-207.
- Dworkin M,** Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E. (2006): The Prokaryotes: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30741-9>
- Efiuwewwere B,** Gorris L, Smid E, Kets E. (1999): Mannitol-enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 100-104.
- Ehrmann MA,** Korakli M, Vogel RF. (2003): Identification of the gene for beta-fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140(T) and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 46: 391-397.
- Endo T,** Koizumi S. (2001): Microbial conversion with cofactor regeneration using genetically engineered bacteria. *Adv. Synth. Catal.* 343: 521-526.

- Fairbanks G**, Steck TL, Wallach DF. (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10: 2606-2617.
- Fenster KM**, Parkin KL, Steele JL. (2003): Nucleotide sequencing, purification, and biochemical properties of an arylesterase from *Lactobacillus casei* LILA. *J Dairy Sci* 86: 2547-2557.
- Fontes C**, Honorato TL, Rabelo MC, Rodrigues S. (2009): Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. *Bioprocess Biosyst Eng* 32: 493-499.
- Fujita K**, Hara K, Hashimoto H, Kitahata S. (1990): Purification and some properties of beta-fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agric Biol Chem* 54: 913-919.
- Gaeng S**, Scherer S, Neve H, Loessner MJ. (2000): Gene Cloning and Expression and Secretion of *Listeria monocytogenes* Bacteriophage-Lytic Enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 66(7): 2951-2958
- Garrigues C**, Loubiere P, Lindley N, Coccagn-Bousquet M. (1997): Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant role of the NADH/NAD(+) ratio. *J. Bacteriol.* 179: 5282-5287.
- Gaspar P**, Neves AR, Ramos A, Gasson MJ, Shearman CA, Santos H. (2004): Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: high yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system. *Appl Environ Microbiol* 70: 1466-1474.
- Grobben GJ**, Peters SW, Wisselink HW, Weusthuis RA, Hoefnagel MH, Hugenholtz J, Eggink G. (2001): Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. *Appl Environ Microbiol* 67: 2867-2870.
- Grohmann K**, Manthey JA, Cameron RG, Buslig BS. (1999): Purification of citrus peel juice and molasses. *J Agric Food Chem* 47: 4859-4867.
- Hahn G**, Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H. (2003): A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Arch Microbiol* 179: 101-107.
- Haltrich D**, Nidetzky B, Miemietz G, Gollhofer D, Lutz S, Stolz P, Kulbe K. (1996): Simultaneous enzymatic synthesis of mannitol and gluconic acid .1. Characterization of the enzyme system. *Biocatal. Biotransform.* 14: 31-45.
- Hattori K**, Suzuki T. (1974): Large-Scale production of erythritol and its conversion to D-mannitol production by n-alkane-grown *Candida zeylanoides*. *Agric. Biol. Chem.* 38: 1203-1208.
- Hayes C**. (2001): The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence. *J Dent Educ* 65: 1106-1109.
- Heinen A**, Peters J, van Bekkum H. (2000): Hydrogenation of fructose on Ru/C catalysts. *Carbohydr. Res.* 328: 449-457.
- Heinen A**, Peters JA, van Bekkum H. (2001): The combined hydrolysis and hydrogenation of inulin catalyzed by bifunctional Ru/C. *Carbohydr. Res.* 330: 381-390.

- Horer S**, Stoop J, Mooibroek H, Baumann U, Sassoon J. (2001): The crystallographic structure of the mannitol 2-dehydrogenase NADP<sup>+</sup> binary complex from *Agaricus bisporus*. *J Biol Chem* 276: 27555-27561.
- Hult K**, Veide A, Gatenbeck S. (1980): The distribution of the NADPH-Regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch. Microbiol.* 128: 253-255.
- Ikawa T**, Watanabe T, Nisizawa K. (1972): Enzymes involved in last steps of biosynthesis of mannitol in brown algae. *Plant and Cell Physiol.* 13: 1017-1029.
- Imamura L**, Hisamitsu K, Kobashi K. (1994): Purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biol Pharm Bull* 17: 596-602.
- Isono N**, Tochihara T, Kusnadi Y, Win TT, Watanabe K, Obae K, Ito H, Matsui H. (2004): Cloning and heterologous expression of a beta-fructofuranosidase gene from *Arthrobacter globiformis* IFO 3062, and site-directed mutagenesis of the essential aspartic acid and glutamic acid of the active site. *J Biosci Bioeng* 97: 244-249.
- Itoh Y**, Tanaka A, Araya H. (1997): Method of separating and purifying mannitol. Patent EP0683152
- Iwamoto K**, Shiraiwa Y. (2005): Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Mar Biotechnol (NY)* 7: 407-415.
- Janer C**, Rohr LM, Pelaez C, Laloi M, Cleusix V, Requena T, Meile L. (2004): Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Syst Appl Microbiol* 27: 279-285.
- Kandler O.** (1983): Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49: 209-224.
- Karsten U**, Barrow K, Nixdorf O, West J, King R. (1997): Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J Agardh. *Planta* 201: 173-178.
- Kasehagen L**, Luskin M. (1956): Hexitols by hydrogenation of sucrose. Patent 2759024
- Kaup B**, Bringer-Meyer S, Sahm H. (2004): Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 333-339.
- Kaup B**, Bringer-Meyer S, Sahm H. (2005): D: -Mannitol formation from D: -glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 397-403.
- Kearney M**, Kochergin V, Peterson K, Velasquez L. (1995): Sugar beet juice purification process. Patent 5466294
- Keller F**, Matile P. (1989): Storage of sugars and mannitol in petioles of celery leaves. *New Phytol.* 113: 291-299.
- Kets EP**, Galinski EA, de Wit M, de Bont JA, Heipieper HJ. (1996): Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J Bacteriol* 178: 6665-6670.
- Kleerebezem M**, et al. (2003): Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci* 100: 1990-1995.

- Kok J**, van der Vossen JM, Venema G. (1984): Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 48: 726-731.
- Konings WN**, Kok J, Kuipers OP, Poolman B. (2000): Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr Opin Microbiol* 3: 276-282.
- Konings WN**, Lolkema JS, Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, Driessen AJ. (1997): The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71: 117-128.
- Korakli M**, Schwarz E, Wolf G, Hammes WP. (2000): Production of mannitol by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Adv in Food Sci* 22: 1-4.
- Korakli M**, Vogel RF. (2003): Purification and characterisation of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *FEMS Microbiol Lett* 220: 281-286.
- Kruse W**. (1977): Process for preparing mannitol from glucose. Patent 4029878
- Kulbe KD**, Schwab U, Howaldt M. (1987 a):. Conjugated NADH-dependent Dehydrogenases for the continuous production of mannitol and gluconic acid from Glucose-Fructoses mixtures in a membrane reactor. Pages 216-223. Laskin, A. I., Et Al.
- Kulbe K**, Schwab U, Gudernatsch W. (1987 b): Enzyme-catalyzed production of mannitol and gluconic acid. Product recovery by various procedures. *Ann N Y Acad Sci* 506: 552-568.
- Kuramitsu HK**. (1973): Characterization of invertase activity from cariogenic *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 115: 1003-1010.
- Kuusisto J**, Mikkola J, Casal P, Karhu H, Väyrynen J, Salmi T. (2005): Kinetics of the catalytic hydrogenation of d-fructose over a CuO-ZnO catalyst. *Chem. Eng. J.* 115: 93-102.
- Leenhouts KJ**, Kok J, Venema G. (1991): Lactococcal plasmid pWV01 as an integration vector for lactococci. *Appl Environ Microbiol* 57: 2562-2567.
- Leenhouts KJ**, Bolhuis A, Ledebøer A, Venema G, Kok J. (1995): Production of secreted guar alpha-galactosidase by *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:75-80
- Lewis D**, Smith D. (1967): Sugar alcohols (Polyols) in Fungi and Green Plants I. Distribution Physiology and Metabolism. *New Phytol.* 66: 143-&.
- Linde H**, Haberich W. (1969): Molasses purification. Patent 3481783
- Livesey G**. (2003): Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutr. Res. Rev.* 16: 163-191.
- Loescher W**. (1987): Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plant.* 70: 553-557.
- Loescher WH**, Tyson RH, Everard JD, Redgwell RJ, Bielecki RL. (1992): Mannitol Synthesis in Higher Plants : Evidence for the Role and Characterization of a NADPH-Dependent Mannose 6-Phosphate Reductase. *Plant Physiol* 98: 1396-1402.

- Madigan M**, Martinko J, Parker J, Brock T. (2000):. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Makkee M**, Kieboom A, van Bekkum H. (1980): Combined action of an enzyme and a metal catalyst on the conversion of D-glucose D-fructose mixtures into D-mannitol. *Carbohydr Res* 138: 237-245.
- Makkee M**, Kieboom A, van Bekkum H. (1985): Hydrogenation of D-fructose and D-fructose D-glucose mixtures. *Carbohydr Res* 138: 225-236.
- Martinez G**, Barker H, Horecker B. (1963): A specific mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *J. Biol. Chem.* 238: 1598-1603.
- Meroth C**, Walter J, Hertel C, Brandt M, Hammes W. (2003): Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 475-482.
- Metzenberg RL**. (1963): The purification and properties of invertase of *Neurospora*. *Arch Biochem Biophys* 100: 503-511.
- Mikkonen M**, Vuoristo J, Alatossava T. (1994): Ribosome binding site consensus sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H. *FEMS Microbiol Lett* 116: 315-320.
- Mohr T**, Schwarz E, Mackert P. (2003): Method for producing mannitol. Patent 6649754
- Monedero V**, Perez-Martinez G, Yebra MJ. (2010): Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1003-1015.
- Muller MR**, Ehrmann MA, Vogel RF. (2000): *Lactobacillus frumenti* sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from rye-bran fermentations with a long fermentation period. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 6: 2127-2133.
- Neves A**, Ramos A, Shearman C, Gasson M, Almeida J, Santos H. (2000): Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo C-13-NMR. *Eur. J. Biochem.* 267: 3859-3868.
- Neves AR**, Pool WA, Kok J, Kuipers OP, Santos H. (2005): Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol Rev* 29: 531-554.
- Nidetzky B**, Haltrich D, Schmidt K, Schmidt H, Weber A, Kulbe K. (1996): Simultaneous enzymatic synthesis of mannitol and gluconic acid .2. Development of a continuous process for a coupled NAD(H)-dependent enzyme system. *Biocatal. Biotransform.* 14: 47-65.
- Niehaus WG**, Dilts R. (1982): Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *J Bacteriol* 151: 243-250.
- Niehaus WG**, Flynn T. (1994): Regulation of mannitol biosynthesis and degradation by *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 176: 651-655.
- Nishizawa M**, Maruyama Y. (1979): Developmental regulation of invertase isozymes in *Fusarium oxysporum*. *J Bacteriol* 139: 657-660.

- Nishizawa M**, Maruyama Y, Nakamura M. (1980): Purification and characterization of invertase isozymes from *Fusarium oxysporum*. *Agric Biol Chem* 44(3): 489-498
- O'Mullan P**, Chase T, Eveleigh D. (1992): Purification and some properties of extracellular invertase B from *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 341-346.
- O'Sullivan C**, Tompson FW (1890): Invertase: a contribution to the history of an Enzyme or unorganised Ferment. 834-931
- Oddo E**, Saiano F, Alonzo G, Bellini E. (2002): An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the oleaceae growing in northern Sicily. *Ann Bot* 90: 239-243.
- Omori T**, Ueno K, Muramatsu K, Kikuchi M, Onodera S, Shiomi N. (2010): Characterization of recombinant beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Chem Cent J* 4: 9.
- Onishi H**, Suzuki T. (1968): Production of D-mannitol and glycerol by yeasts. *Appl Microbiol* 16: 1847-1852.
- Onishi H**, Suzuki T. (1969): *Torulopsis mannitofaciens* sp. n. isolated from soy-sauce mash. *Antonie Van Leeuwenhoek* 35: 258-260.
- Onishi H**, Suzuki T. (1970): Microbial production of D-mannitol and D-fructose from glycerol. *Biotechnol Bioeng* 12: 913-920.
- Pao SS**, Paulsen IT, Saier MH, Jr. (1998): Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1-34.
- Paramithiotis S**, Sofou A, Tsakalidou E, Kalantzopoulos G. (2007): Flour carbohydrate catabolism and metabolite production by sourdough lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1417-1423.
- Parche S**, et al. (2007): Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12: 9-19.
- Park SC**, Baratti J. (1991): Batch fermentation kinetics of sugar beet molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Bioeng* 38: 304-313.
- Patra F**, Tomar SK, Arora S. (2009): Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *J Food Sci* 74: R16-23.
- Peltier J**, Marigo D, Marigo G. (1997): Involvement of malate and mannitol in the diurnal regulation of the water status in members of Oleaceae. *Trees - Structure and Function.* 12: 27-34.
- Perez-Arellano I**, Zuniga M, Perez-Martinez G. (2001): Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmid* 46: 106-116.
- Pfeiler EA**, Klaenhammer TR. (2007): The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol* 15: 546-553.
- Pijnenburg H**, Kuster B, Vanderbaan H. (1978): Kinetics of hydrogenation of fructose with Raney-nickel. *Starch* 30: 352-355.
- Poolman B**. (2002): Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 147-164.

- Postma PW**, Lengeler JW, Jacobson GR. (1993): Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57: 543-594.
- Pouwels PH**, Leer RJ. (1993): Genetics of lactobacilli: plasmids and gene expression. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64: 85-107.
- Power J.** (1942): Hydrogenation of invertible saccharides. Patent 2280975
- Prado FE**, Vattuone MA, Fleischmacher OL, Sampietro AR. (1985): Purification and characterization of *Ricinus communis* invertase. *J Biol Chem* 260: 4952-4957.
- Racine F**, Saha B. (2007): Production of mannitol by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 in fed-batch and continuous cell-recycle fermentations. *Process Biochem.* 42: 1609-1613.
- Reid SJ**, Abratt VR. (2005): Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 312-321.
- Romano AH**, Trifone JD, Brustolon M. (1979): Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *J Bacteriol* 139: 93-97.
- Romano AH** (1986): Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends in Biotechnol* 4(3): 207-213
- Rubio M**, Maldonado M. (1995): Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Curr. Microbiol* 31: 80-83.
- Ruffner H**, Rast D, Tobler H, Karesch H. (1978): Purification and Properties of mannitol Dehydrogenase from *Agaricus bisporus* sporocarps. *Phytochem* 17: 865-868.
- Ruijter GJ**, Bax M, Patel H, Flitter SJ, van de Vondervoort PJ, de Vries RP, vanKuyk PA, Visser J. (2003): Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryot Cell* 2: 690-698.
- Rumpho ME**, Edwards GE, Loescher WH. (1983): A Pathway for Photosynthetic Carbon Flow to Mannitol in Celery Leaves: Activity and Localization of Key Enzymes. *Plant Physiol* 73: 869-873.
- Saha B.** (2004): Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus intermedius*. *Biotechnol Prog* 20: 537-542.
- Saha B.** (2005): Bio-based method for making mannitol. Patent 20050079590
- Saha B.** (2006 a): Effect of salt nutrients on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 887-890.
- Saha B.** (2006 b): A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72:676-680
- Sahin-Toth M**, Lengyel Z, Tsunekawa H. (1999): Cloning, sequencing, and expression of *cscA* invertase from *Escherichia coli* B-62. *Can J Microbiol* 45: 418-422.
- Saier MH, Jr.**, Ye JJ, Klinke S, Nino E. (1996). Identification of an anaerobically induced phosphoenolpyruvate-dependent fructose-specific phosphotransferase

system and evidence for the Embden-Meyerhof glycolytic pathway in the heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol* 178: 314-316.

**Saier MH, Jr.**, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WHM, Huang SC, Jack DL, Jähn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS (1999): The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 257-279.

**Sakai S**, Yamanaka K. (1968): Crystalline D-mannitol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochim Biophys Acta* 151: 684-686.

**Schiweck H**, Bär A, Vogel R, Schwarz E, Kunz M (2002): Sugar alcohols. Wiley-VCH, Weinheim, 1-27

**Schlegel H**, Zaborosch C. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme.

**Shen B**, Jensen R, Bohnert H. (1997 a): Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol* 115: 527-532.

**Shen B**, Jensen RG, Bohnert HJ. (1997 b): Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113: 1177-1183.

**Siezen R**, van Enckevort F, Kleerebezem M, Teusink B. (2004). Genome data mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics. *Curr Opin Biotechnol* 15: 105-115.

**Srivella S**, Gielchinsky I, Parsonnet V. (2000). Mannitol, furosemide, and dopamine infusion in postoperative renal failure complicating cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 69: 501-506.

**Slatner M**, Nidetzky B, Kulbe KD. (1999): Kinetic study of the catalytic mechanism of mannitol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochemistry* 38: 10489-10498.

**Slatner M**, Nagl G, Haltrich D, Kulbe K, Nidetzky B. (1998 a): Enzymatic production of pure D-mannitol at high productivity. *Biocatal. Biotransform.* 16: 351-363.

**Slatner M**, Nagl G, Haltrich D, Kulbe KD, Nidetzky B. (1998 b): Enzymatic synthesis of mannitol. Reaction engineering for a recombinant mannitol dehydrogenase. *Ann N Y Acad Sci* 864: 450-453.

**Smiley K**, Cadmus M, Liepins P. (1967): Biosynthesis of D-mannitol from D-glucose by *Aspergillus candidus*. *Biotechnol Bioeng* 9: 365-374

**Soetaert W**, Vanhooren PT, Vandamme EJ. (1999): The production of mannitol by fermentation. Pages 261-275 in Bucke C, ed. Carbohydr Biotechnol Protoc, vol. 10. Totowa: Humana Press Inc.

**Song K**, Lee J, Song J, Hong S, Baek H, Kim S, Hyun H. (2002): Production of mannitol by a novel strain of *Candida magnoliae*. *Biotechnol Lett* 24: 9-12.

**Song S**, Vieille C. (2009): Recent advances in the biological production of mannitol. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 55-62.

**Stankovic L**, Bilik V, Matulova M. (1989): Production of D-mannitol from D-Aldopentoses by the yeast *Rhodotorula minuta*. *Folia Microbiol* 34: 511-514.

- Steidler L**, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. (2000): Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10. *Science* 289: 1352-1355.
- Stolz P**, Bocker G, Hammes W, Vogel R. (1995): Utilization of electron-acceptors by Lactobacilli isolated from sourdough. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -forschung* 201: 91-96.
- Stoop JM**, Mooibroek H. (1998): Cloning and characterization of NADP-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom, *Agaricus bisporus*, and its expression in response to NaCl stress. *Appl Environ Microbiol* 64: 4689-4696.
- Sybesma W**, Hugenholtz J, de Vos W, Smid E. (2006): Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electron. J. Biotechnol.* 9: 424-448.
- Takemura M**, Iijima M, Tateno Y, Osada Y, Maruyama H. (1978): Process for preparing D-mannitol. Patent US4083881
- Taranto MP**, Font de Valdez G, Perez-Martinez G. (1999): Evidence of a glucose proton motive force-dependent permease and a fructose phosphoenolpyruvate:phosphotransferase transport system in *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. *FEMS Microbiol Lett* 181: 109-112.
- Tarczynski MC**, Jensen RG, Bohnert HJ. (1993): Stress Protection of Transgenic Tobacco by Production of the Osmolyte Mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Teusink B**, Smid EJ. (2006): Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 4: 46-56.
- Thompson J**. (1987). Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 46: 221-231.
- Thompson J**. (1988): Lactic acid bacteria: model systems for in vivo studies of sugar transport and metabolism in gram-positive organisms. *Biochimie* 70: 325-336.
- Tieking M**, Korakli M, Ehrmann MA, Ganzle MG, Vogel RF. (2003): In situ production of exopolysaccharides during Sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69: 945-952.
- Tieking M**, Ganzle M. (2005): Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 79-84.
- Titgemeyer F**, Hillen W. (2002): Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 59-71.
- Toukoniitty B**, Kuusisto J, Mikkola J, Salmi T, Murzin D. (2005): Effect of ultrasound on catalytic hydrogenation of D-fructose to D-mannitol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44: 9370-9375.
- Trindade MI**, Abratt VR, Reid SJ. (2003): Induction of sucrose utilization genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Appl Environ Microbiol* 69: 24-32.
- Ulber R**, Faurie R, Sosnizza P, Fischer L, Stark E, Harbeck C, Scheper T. (2000): Monitoring and control of industrial downstream processing of sugar beet molasses. *J Chromatogr A* 882: 329-334.

- van de Guchte M**, van der Vossen JM, Kok J, Venema G. (1989): Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 55: 224-228.
- van der Vossen JM**, van der Lelie D, Venema G. (1987): Isolation and characterization of *Streptococcus cremoris* Wg2-specific promoters. *Appl Environ Microbiol* 53: 2452-2457.
- van der Vossen JM**, Kodde J, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J. (1992): Characterization of transcription initiation and termination signals of the proteinase genes of *Lactococcus lactis* Wg2 and enhancement of proteolysis in *L. lactis*. *Appl Environ Microbiol* 58: 3142-3149.
- van Loveren C.** (2004): Sugar alcohols: What is the evidence for caries-preventive and caries-therapeutic effects? *Caries Res* 38: 286-293.
- Vega Mdl**, Cejudo F, Paneque A. (1991): Purification and properties of an extracellular invertase from *Azotobacter chroococcum*. *Enzyme and Microbial Technology* 13: 267-271.
- von Rymon-Lipinski GW** (2005): Sweeteners. Wiley-VCH, Weinheim, 1-23
- von Weymarn N**, Hujanen M, Leisola M. (2002 a): Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem.* 37: 1207-1213.
- von Weymarn N**, Kiviharju K, Leisola M. (2002 b): High-level production of D-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29: 44-49.
- von Weymarn** (2002): Process development for mannitol production by lactic acid bacteria. *Dissertation an der University of Technology*
- von Weymarn N**, Kiviharju KJ, Jaaskelainen ST, Leisola MS. (2003): Scale-up of a new bacterial mannitol production process. *Biotechnol Prog* 19: 815-821.
- Wang SY**, Le Tourneau D. (1972): Mannitol biosynthesis in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Arch Mikrobiol* 81: 91-99.
- Warchol M**, Perrin S, Grill JP, Schneider F. (2002): Characterization of a purified beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Lett Appl Microbiol* 35: 462-467.
- Wichmann R**, Vasic-Racki D. (2005): Cofactor regeneration at the lab scale. Technology transfer in Biotechnology: From lab to industry to production. p. 225-260.
- Wichmann R**, Wandrey C, Buckmann A, Kula M. (2000): Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnol Bioeng* 67: 791-804.
- Wisselink HW**, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J, Grobben GJ (2002): Mannitol production by lactic acid bacteria. *Intern Dairy J* 151-161
- Wisselink HW**, Moers AP, Mars AE, Hoefnagel MH, de Vos WM, Hugenholtz J. (2005): Overproduction of heterologous mannitol 1-phosphatase: a key factor for engineering mannitol production by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1507-1514.
- Wood B.** (1995): The Genera of lactic acid bacteria. London: Blackie Acad. & Prof.

**Xiang H**, Wei W, Zhang Y, Tan H. (2000): Human glutathione-S-transferase: cloning and expression in *Lactococcus lactis*. *Biomol Eng* 16: 207-209.

**Yamanaka K.** (1975): D-mannitol dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Methods Enzymol* 41: 138-142.

**Yamanaka K**, Izawa K, Tenmizu K. (1977): Physicochemical properties of crystalline D-Mannitol dehydrogenase of *Leuconostoc mesenteroides*. *Agric Biol Chem* 41: 1695-1699.

**Yun J**, Kang S, Song S. (1996): Microbial transformation of fructose to mannitol by *Lactobacillus* sp KY-107. *Biotechnol Lett* 18: 35-40.

**Zaunmuller T**, Eichert M, Richter H, Uden G. (2006): Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 421-429

**zuChem** (2009): <http://zuchem.com/>.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 8.1** Abkürzungen chemischer Formeln und Namen

Abkürzung	Begriff
A	Adenin (Purinbase)
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BfrA	$\beta$ -Fructofuranosidase
Bis-Tris	2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C	Cytosin (Pyrimidinbase)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dd H <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )
EC	<i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

EPS	Exopolysaccharid
FDH	Formiatdehydrogenase
Frc	D-Fructose
G	Guanin (Purinbase)
G6P-DH	Glucose 6-phosphatdehydrogenase
GDH	Glucosedehydrogenase
Glc	D-Glucose
GRAS	<i>“Generally recognized as safe”</i>
HCl	Salzsäure
HK	Hexokinase
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Luria broth
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MDH	Mannitehydrogenase
mMRS	Medium nach de Man, Rogosa und Sharpe (modifiziert)
Mnt	D-Mannit
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht ( <i>Molecular Weight</i> )
N <sub>2</sub>	Molekularer Stickstoff
NAD(P) <sup>+</sup>	Nikotinadenindinukleotid(phosphat), oxidierte Form
NAD(P)H	Nikotinadenindinukleotid(phosphat), reduzierte Form
NaOH	Natronlauge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PEP	Phosphoenolpyruvat
RT	Raumtemperatur
Scr	Saccharose

SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
T	Thymin (Pyrimidinbase)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
Wt	Wildtyp
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent (auf Volumen bezogen)
% (w/w)	Gewichtsprozent

**Tabelle 8.2 Prozessgrößen der Bioverfahrenstechnik und der Mikrobiologie**

Abkürzung	Einheit	Begriff
A	-	Absorption
BTM	$g_{BTM} L^{-1}$	Biotrockenmasse
c	$g L^{-1}$	Konzentration
(EA)	$\mu mol s^{-1}$	Enzymaktivität
$f_x$	$g_{BTM} L^{-1} OD^{-1}$	Korrelationsfaktor
F	$L h^{-1}$	Zuflussvolumen
m	g	Masse
M	$mol L^{-1}$	Molarität
n	-	Zellzahl
OD	-	Optische Dichte
RZA	$g L^{-1} h^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute
t	h	Zeit
V	L	Volumen
$\mu$	$h^{-1}$	spezifische Wachstumsrate



## 9 Anhang

### 9.1 Geräte, Chemikalien

#### 9.1.1 Geräte

**Tabelle 9.1 Laborgerätschaften und Verbrauchsgegenstände**

Name	Hersteller
Anaerocult	Technolab GmbH
BIORAD Pulse Controller Plus	BioRAD
CO <sub>2</sub> -Messsensor	BlueSense
Inkubationsschrank	Binder
Gel Jet Imager	Intas GDS
Kreuzmagnetührer	VWR
Mikrotiterplattenphotometer EL808	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
PCR-Cycler	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Schott
Spartan 0,2 µm HPLC-Filter	VWR
Thermoblock	VWR
Ultraschallsonde Bandelin UW 2200	Hielscher
Einstrahlphotospektrometer Spectronic Genesys 20	Thermo, Dreieich
Analytische Waage Explorer (0,01 – 210 g)	Ohaus, Gießen
Analytische Waage Explorer (5 g – 32 kg)	Ohaus, Gießen

Glasperlen (0,25 – 0,5 mm)	Roth
Kühlzentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus, Tuttlingen
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Mehrfachrührplatte (15x)	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Schwingarmmühle MM200	Retsch, Haan
Standzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 9.2**      **Rührkesselreaktor „Labfors“**

7,5 L-Rührkesselreaktor (Infors, Einsbach)	5 L Arbeitsvolumen
	Temperierbar über Doppelglasmantel
	3 Sechsstabtrührer (Typ Rushton)
	Mechanische Gleitringdichtung
	Antrieb über den Deckel
	Schikanenkorb mit 4 Strömungsbrechern
	Begasungsrohr (11 Öffnungen)
	Begasung mittels Massendurchflussmeter (regelbar)
Reaktorgewichtsmessung mittels Waage, online	
2,0 L-Rührkesselreaktor (Infors, Einsbach)	1,2 L Arbeitsvolumen
	Temperierbar über Doppelglasmantel (5 – 70 °C)
	Pt-100 Temperaturfühler
	2 Sechsstabtrührer (Typ Rushton)
	Mechanische Gleitringdichtung
	Antrieb über den Deckel (50 – 1500 min <sup>-1</sup> )
	Schikanenkorb mit 4 Strömungsbrechern
	Begasungsrohr (8 Öffnungen)
	Begasung mittels Massendurchflussmeter (bis max. 5 L min <sup>-1</sup> )
Reaktorgewichtsmessung mittels Waage, online	

Software, Iris v5 Control Software XDDC	Infors, Einsbach
pH-Elektrode PG13,5	Mettler Toledo, Gießen
Abgasanalytik Easy Line (O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> )	ABB, Frankfurt
CO <sub>2</sub> -Messsensor	BlueSens, Herten
Zulaufpumpe BVP	Ismatech, Wertheim-Mondfeld
Zulaufmittelwaage	Sartorius, Göttingen

**Tabelle 9.3 HPLC-Anlage und periphere Gerätschaften**

Säule	Hersteller
Aminex HPX 87H	BioRAD
MetaCarb 87P	Varian
Ashapiak NH2P50	Shodex
OAKC	Merck
RIDetektor	Agilent Technologies 1200 Series
Autosampler	Agilent Technologies 1100 Series
Säulenofen	Sicarius Spark Holland, Mistral

## 9.1.2 Chemikalien

**Tabelle 9.4 Allgemeine Chemikalien**

Name	Reinheit	Hersteller	Artikelnummer
Acetonitril	≥ 99,9 %	Roth	8825
AgarAgar	unb.	Roth	5210.2
Agarose NEEO Ultra-Quaität	unb.	Roth	2267.2
Ammoniumchlorid	≥ 99 %	Roth	5470.1
Bromphenolblau	unb.	Roth	A512
Calciumchlorid Dihydrat	≥ 99,0 %	Merck	102382
Calcium-(D+)-panthethonat	≥ 98,0 %	Roth	3812.1

---

Clerol	unb.	Cognis	FBA 3107
Coomassie Brilliant Blau R 250	unb.	Roth	3862.1
L-Cystein-Hydrochlorid	≥ 99,0 %	Fluka	31030
EDTA	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich	E5513
Essigsäure, 100 %	≥ 99,8 %	Merck	100063
Erythromycin Base	≥ 93,0 %	Serva	21208
Ethanol	≥ 99,8 %	Merck	100983
Fleischextrakt, granuliert	unb.	Merck	103979
Folsäure	≥ 96,0 %	Roth	T912.1
D(-)-Fructose	≥ 99,5 %	Roth	4981.2
D(+)-Glucose Monohydrat	≥ 99,5 %	Merck	108342
Glycerin	≥ 99,5 %	Roth	3782.2
Glycin	≥ 99,0 %	Roth	3908
Hefeextrakt, granuliert	unb.	Merck	103753
Isopropanol	≥ 99,5 %	Roth	CP41.4
Kaliumacetat	≥ 99,0 %	Roth	4986
di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	≥ 99,0 %	Roth	5873.1
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99,0 %	Roth	3904.1
Lysozym	78643 U mg <sup>-1</sup>	Fluka	62971
Magnesiumsulfat Heptahydrat	≥ 99,0 %	Roth	P027.2
D(+)-Maltose Monohydrat	≥ 95,0 %	Roth	8951.3
Mangansulfat Monohydrat	≥ 99,0 %	Merck	105941
D(-)-Mannit	≥ 98,0 %	Roth	4175.1
MOPS	≥ 99,0 %	Roth	6979.4
Natriumchlorid	≥ 99,5 %	Roth	3957.2
Natriumhydroxid	≥ 99,0 %	Roth	6771.2
Nikotinsäure	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich	N-4126
Pepton aus Casein	unb.	Roth	8986.2
Pyridoxalphosphat	≥ 99,0 %	Roth	T914.2

Rubidiumchlorid	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich	R2252
D(+)-Saccharose	≥ 99,5 %	Roth	4621
Schwefelsäure	95-97 %	Merck	100731
SDS	≥ 85,0 %	Merck	817034
Stickstoff		Air Liquide	P1709L50R2R001
TAE	≥ 99,8 %	Merck	108387
TEA	≥ 99,5 %	Merck	T1502
TEMED	≥ 98,5 %	Roth	2367
Thiamin	≥ 99,0 %	Fluka	95160
Tris-Hydrochlorid	≥ 99,0 %	Roth	9090
Tween80	unb.	Merck	817061
Vitamin B <sub>12</sub> (Cyanocobalamin)	≥ 96,0 %	Roth	T915.1

## 9.2 Enzyme und (Puffer-) Lösungen

### 9.2.1 Enzyme

**Tabelle 9.5** Enzyme und Marker

Name	Hersteller	Artikelnummer
CIAP	Fermentas	Nicht mehr im Sortiment
HindIII	Fermentas	ER0501
KOD-Polymerase	VWR International	71086-3
Lambda DNA/ EcoRI + HindIII	Fermentas	SM0191
PstI	Fermentas	ER0611
RotiMark	Roth	T851
SAP	Fermentas	EF0511
T4 DNA-Ligase	Fermentas	EL0011
Taq DNA-Polymerase	Fermentas	EP0401
XbaI	Fermentas	ER0681

## 9.2.2 Puffer

**Tabelle 9.6 Transformationspuffer TF1**

---

Rubidiumchlorid	100 mM
Manganchlorid Tetrahydrat	50 mM
Kaliumacetat	30 mM
Calciumchlorid	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Sämtliche Pufferkomponenten wurden in 80 % des Endvolumens gelöst. Der pH wurde mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 eingestellt, das Volumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und die Lösung steril filtriert.

**Tabelle 9.7 Transformationspuffer TF2**

---

MOPS	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
Calciumchlorid	75 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Sämtliche Pufferkomponenten wurden in 80 % des Endvolumens gelöst. Der pH wurde mit 1,0 M Natronlauge auf 6,8 eingestellt, das Volumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und die Lösung steril filtriert.

**Tabelle 9.8 TAE-Puffer (50-fach konzentriert)**

---

EDTA	37,22 g L <sup>-1</sup>
Tris	242,20 g L <sup>-1</sup>
Essigsäure (100 %)	40 mL

Alle Pufferbestandteile wurden in 80 % des Endvolumens gelöst. Der pH wurde auf 8,2 eingestellt bevor das gewünschte Volumen mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt und die Lösung autoklaviert wurde.

**Tabelle 9.9** Zusammensetzung eines Sammelgel- und Trenngelpuffers zur Durchführung einer SDS-PAGE

<b>Sammelgel (2x)</b>		<b>Trenngel (4x)</b>	
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,8 % (w/v)
TrisHCl	0,25 M	TrisHCl	1,5 M
pH	6,8	pH	8,8

**Tabelle 9.10** Laufpuffer und Auftragspuffer (Lämmli) zur Durchführung einer SDS-PAGE

**Laufpuffer (10x)**

TrisHCl	0,25 M
Glycin	2 M
SDS	1 % (w/v)
pH	8,8

**Auftragspuffer (5x)**

SDS	10% (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)
TrisHCl	0,3 M
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
pH	6,8

**Tabelle 9.11** Volumenverhältnisse für ein 3 %-iges Sammelgel und ein 10 %-iges Trenngel

	<b>Sammelgel (3 %)</b>	<b>Trenngel (10%)</b>
AA, 40 % (w/v)*	0,625 mL	2,5 mL
Sammelgelpuffer (2x)	-	2,5 mL
Trenngelpuffer (4x)	2,5 mL	-
H <sub>2</sub> O	1,77 mL	4,8 mL

\* Acrylamid/ Bisacrylamid (38:2)

Zum Start der Polymerisation wurden jeweils 100 µL Ammoniumpersulfatlösung (10 % (w/v)) und 10 µL TEMED sowohl dem Sammelgel als auch dem Trenngel hinzugefügt. Die Agarosekonzentration in beiden Gelen betrug 1 % (w/v).

### 9.2.3 Lösungen

**Tabelle 9.12** Coomassie-Färbelösungen (nach Fairbanks)

#### Lösung A

Isopropanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R250	0,05 % (w/v)

#### Lösung B

Isopropanol	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R250	0,05 % (w/v)

#### Lösung C

Essigsäure	10 % (v/v)
------------	------------

### 9.3 Kultivierungsmedien und Medienbestandteile

Alle Medien und Medienbestandteile wurde entweder für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert oder mit Hilfe eines 0,2 µm-Filters steril filtriert. Die jeweiligen Komponenten wurden abschließend unter der Sterilbank zusammengefügt.

**Tabelle 9.13 Saccharosemedium (modifiziertes MRS-Medium)**

Pepton aus Casein	10,0 g L <sup>-1</sup>	
Fleischextrakt, granuliert	5,0 g L <sup>-1</sup>	
Hefeextrakt, granuliert	5,0 g L <sup>-1</sup>	
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	2,6 g L <sup>-1</sup>	
Kaliumdihydrogenphosphat	4,0 g L <sup>-1</sup>	
Ammoniumchlorid	3,0 g L <sup>-1</sup>	
Cystein-Hydrochlorid	0,5 g L <sup>-1</sup>	
Mangan/ Magnesiumlösung	1,0 mL L <sup>-1</sup>	(Siehe Tabelle 9.14)
Vitaminlösung	1,0 mL L <sup>-1</sup>	(Siehe Tabelle 9.15)
Tween80	1,0 mL L <sup>-1</sup>	
Saccharose	100 g L <sup>-1</sup>	

Sowohl die Komplexbestandteile des Mediums wie auch die Saccharose wurden in 40 % des Endvolumens gelöst. Der pH des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf 6,2 eingestellt. Beide Lösungen wurden unter der Sterilbank vereinigt. Die Vitaminlösung und die Magnesium/ Manganlösung wurden über einen Sterilfilter hinzugefügt. Abschließend wurde das Volumen mit sterilem Wasser auf das entsprechende Zielvolumen aufgefüllt. Die Zugabe von Antibiotikum erfolgte in Abhängigkeit des verwendeten Stammes von *Lactobacillus frumenti*.

**Tabelle 9.14 Mangan- und Magnesiumlösung (50-fach konzentriert)**

Magnesiumsulfat Heptahydrat	100 g L <sup>-1</sup>
Mangansulfat Tetrahydrat	50 g L <sup>-1</sup>

Für die Mangan/ Magnesiumlösung wurden beide Chemikalien in 80 % des Endvolumens gelöst. Der pH wurde auf pH 6,2 eingestellt und die Lösung abschließend steril filtriert.

**Tabelle 9.15 Vitaminlösung (50-fach konzentriert)**

---

Thiamin	0,2 g L <sup>-1</sup>
Nikotinsäure	0,2 g L <sup>-1</sup>
Folsäure	0,2 g L <sup>-1</sup>
Pyridoxalphosphat	0,2 g L <sup>-1</sup>
Pathothensäure	0,2 g L <sup>-1</sup>
Cobalamin B <sub>12</sub>	0,2 g L <sup>-1</sup>

Für die Vitaminlösung wurden alle Chemikalien in 80 % des Endvolumens gelöst. Der pH wurde auf pH 6,2 eingestellt und die Lösung abschließend steril filtriert.

Für Biotransformationen wurde in der Regel ein einfaches Melassemedium eingesetzt. Die Melasse wurde zunächst eingewogen und anschließend in 80 % des Endvolumens mit ddH<sub>2</sub>O gelöst, sowie pH 6,2 eingestellt. Vor dem Autoklavieren wurde zusätzlich Tween80 dem Medium zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Melassemedium durch die Zugabe einer Vitaminlösung und einer Mangan- und Magnesiumlösung unter der Sterilbank vervollständigt. Die Zugabe von Antibiotikum (Erythromycin) erfolgte in Abhängigkeit des verwendeten Stammes von *Lactobacillus frumenti*. Die Zusammenstellung des einfachen Melassemediums ist in Tabelle 9.16 dargestellt.

**Tabelle 9.16 Melassemedium (einfach)**

Melasse	Variabel	(in Abhängigkeit der gewünschten Saccharosekonzentration)
TrisHCl (0,1 M)	15,7 g L <sup>-1</sup>	
Vitaminlösung	1 mL L <sup>-1</sup>	(siehe Tabelle 9.12)
Mangan/ Magnesiumlösung	1 mL L <sup>-1</sup>	(siehe Tabelle 9.8)
Tween80	1 mL L <sup>-1</sup>	

Für die Kultivierung sämtlicher Stämme von *Escherichia coli* wurde ein LB-Medium verwendet (siehe Tabelle 9.17)

**Tabelle 9.17 LB-Medium**

Pepton aus Casein	10 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt, granuliert	5 g L <sup>-1</sup>
Natriumchlorid	5 g L <sup>-1</sup>
Glukose Monohydrat	6 g L <sup>-1</sup>

Die Komplexbestandteile des Mediums sowie die Glukose wurden jeweils in 40 % des Endvolumens gelöst. Vor dem Autoklavieren wurde der pH auf 6,8 eingestellt und die Medienbestandteile abschließend unter der Sterilbank vereinigt. In Abhängigkeit der verwendeten Stämme wurde dem Medium noch das Antibiotikum Erythromycin in mit einer Endkonzentration von 200 mg L<sup>-1</sup> hinzugefügt und mit ddH<sub>2</sub>O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt.

Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 2 % (w/v) Agar beigefügt. Das Antibiotikum wurde in diesem Fall erst hinzugefügt als die Medientemperatur nach dem Autoklavieren 40°C unterschritten hatte und der Agar noch nicht erstarrt war.

Nach der Hitzeschocktransformation von *Escherichia coli* wurden die Zellen für eine Stunde in SOC-Medium kultiviert. Das SOC-Medium ist speziell für Kultivierungen in

Nährstoffreichen Medien geeignet und leitet sich vom SOB-Medium (*Super Optimal Broth*) ab.

**Tabelle 9.18 SOC-Medium**

Trypton	20 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt, granuliert	5 g L <sup>-1</sup>
Natriumchlorid	0,6 g L <sup>-1</sup>
Kaliumchlorid	0,19 g L <sup>-1</sup>
Magnesiumchlorid	0,95 g L <sup>-1</sup>
Glukose Monohydrat	3,6 g L <sup>-1</sup>

Die Komplexbestandteile des Mediums sowie die Glukose wurden jeweils in 40 % des Endvolumens gelöst. Vor dem Autoklavieren wurde der pH auf 6,8 eingestellt und die Medienbestandteile abschließend unter der Sterilbank vereinigt. In Abhängigkeit der verwendeten Stämme wurde dem Medium noch das Antibiotikum Erythromycin in mit einer Endkonzentration von 200 mg L<sup>-1</sup> hinzugefügt und mit ddH<sub>2</sub>O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt.

## 9.4 Enzymkits

**Tabelle 9.19 Enzymkits**

Name	Hersteller	Artikelnummer
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	peqLab	12-6943
peqGold Gel Extraction Kit	peqLab	12-2501
E.Z.N.A. <sup>TM</sup> Plasmid Midi Kit	Omega Bio-Tek	D6904
E.Z.N.A. <sup>TM</sup> Bacterial DNA Kit	Omega Bio-Tek	D3350
Pure Yield <sup>TM</sup> PLasmi Miniprep	Promega	A2492
Sucrose/ Fructose/ Glucose Enzyme Kit	Megazyme	K-SUFRG



361... AAAAAAAGAT AAAGATACAT GGAATAGTAGTGATGTTATACGAAATGGAAAAGCACTATAA  
421... AAAACCACAC TATCACGTTA TATATATTGCACGAAATCCTGTAACAATAGAAAAGCGTTAG  
481... GAACAAGATT AAGCGAAAAT TGGGGAATAGTTCAGTTGCTCATGTTGAGATACTTGATTA  
541... TATCAAAGGT TCATATGAAT ATTTGACTCATGAATCAAAGGACGCTATTGCTAAGAATAA  
601... ACATATATAC GACAAAAAAG ATATTTTGAACATTAATGATTTTGGATTTGACCGCTATAT  
661... AACACTTGAT GAAAGCCAAA AAAGAGAATTGAAGAATTTACTTTTAGATATAGTGGATGA  
721... CTATAATTTG GTAAATACAA AAGATTTAATGGCTTTTATTTCGCCCTTAGGGGAGCGGAGTT  
781... TGGAATTTTA AATACGAATG ATGTAAAAGATATTGTTTCAACAAACTCTAGCGCCTTTAG  
841... ATTATGGTTT GAGGGCAATT ATCAGTGTGGATATAGAGCAAGTTATGCAAAGGTTCTTGA  
901... TGCTGAAACG GGGGAAATAA AATGACAAACAAAGAAAAAGAGTTATTTGCTGAAAATGAG  
961... GAATTAATAA AAGAAATTAA GGACTTAAAAGAGCGTATTGAAAGATACAGAGAAAATGGAA  
1021.. GTTGAATTAA GTACAACAAT AGATTTATTGAGAGGAGGGATTATTGAATAAATAAAAAGCC  
1081.. CCCTGACGAA AGTCGAAGGG GGTTTTTATTTTGGTTTGATGTTGCGATTAATAGCAATAC  
1141.. AATTGCAATA AACAAAATGA TCGACCTCGGGACCCCTATCTAGCGAACTTTTAGAAAAGA  
1201.. TATAAACAT CAGAGTATGG ACAGTTGCGGATGTACTTCAGAAAAGATTAGATGTCTAAA  
1261.. AAGCTAGCTT TTTAGACATC TAAATCTAGGTACTAAAACAATTCATCCAGTAAAATATAA  
1321.. TATTTTATTT TCTCCCAATC AGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACATAC  
1381.. TGTTCTTCCC CGATCGACCC GATTACAAAAAATAGGCACACGAAAAACAAGTTAAGGGA  
1441.. TGCAGTTTAT GCATCCCTTA ACTTACTTATTAATAATTTATAGCTATTGAAAAGAGATA  
1501.. AGAATTGTTC AAAGCTAATA TTGTTTAAATCGTCAATTCCTGCATGTTTTAAGGAATTGT  
1561.. TAAATTGATT TTTTGTAAT ATTTTCTTGTATTCTTTGTTAACCCATTTTCATAACGAAAT  
1621.. AATTATACTT TTGTTTATCT TTGTGTGATATTCTTGATTTTTTTTCTACTTAATCTGATAA  
1681.. GTGAGCTATT CACTTTAGGT TTAGGATGAAAATATTCTCTTGGAACCATACTTAATATAG  
1741.. AAATATCAAC TTCTGCCATT AAAAGTAATGCCAATGAGCGTTTTGTATTTAATAATCTTT  
1801.. TAGCAAACCC GTATTCCACG ATTAATAAATCTCATTAGCTATACTATCAAAAAACAATTT  
1861.. TCGGTATTAT ATCCGTAATT ATGTTATAAGGTATATTACCATATATTTTATAGGATTGGT  
1921.. TTTTAGGAAA TTTAAACTGC AATATATCCTTGTTTAAACTTGGAATTATCGTGATCAA  
1981.. CAAGTTTATT TTCTGTAGTT TTGCATAATTTATGGTCTATTTCAATGGCAGTTACGAAAT  
2041.. TACACCTCTT TACTAATTCA AGGGTAAAATGGCCTTTTCTGAGCCGATTTCAAAGATAT

2101.. TATCATGTTT ATTTAATCTT ATATTTTGTCAATTATTTTATCTATATTATGTTTTGAAAGTAA  
2161.. TAAAGTTTTG ACTGTGTTTT ATATTTTTCTCGTTCATTATAACCCTCTTTAATTTGGTTA  
2221.. TATGAATTTT GCTTATTAAC GATTCATTATAACCACTTATTTTTTTGTTTGGTTGATAATG  
2281.. AACTGTGCTG ATTACAAAAA TACTAAAAATGCCCATATTTTTTCTCCTTATAAAAATTAG  
2941.. TATAATTATA GCACGGTCGA TCTTCTATATAAAAAGATATATTATCTTATCAGTATTGTCA  
3001.. ATATATTCAA GGCAATCTGC CTCCTCATCCTCTTCATCCTCTTCGTCTTGGTAGCTTTTTT  
3061.. AAATATGGGT CGATCGAATT CGGTCTCGGGATATGATAAGATTAATAGTTTTTAGCTATT  
3121.. AATCTTTTTT TATTTTTATT TAAGAATGGCTTAATAAAGCGGTTACTTTGGATTTTTGTG  
3181.. AGCTTGGACT AGAAAAAAC TTCACAAAATGCTATACTAGGTAGGTAAAAAATATTCGG  
3241.. AGGAATTTT AAATGGCAAT CGTTTCAGCAGAAAAATTCGTAATTCGAGCTCGCCCGGGG  
3301.. ATCGATCCTC TAGAGTCGAC CTGCAGAGGAGGGATATATACTATGGCAACCCCTCCCACC  
3361.. AATATTCCCG CCAACGGCAT TCTGACCCCGACCCGGCGCTCGACCCTGTGCTCACGCCG  
3421.. ATCTCGGACC ATGCCGAGCA GCTGTCACTCGCCGAAGCAGGCGTGTGGCACTGGAAACC  
3481.. ACCCGCAACG ACCGCTGGTA CCCGAAGTTCCACATTGCCTCCAATGGCGGGTGGATCAAC  
3541.. GACCCGAACG GCCTGTGCCG CTACAACGGACGCTGGCACGTGTTCTACCAGCTGCATCCC  
3601.. CACGGCACAC AGTGGGGCCC GATGCATTGGGGCCACGTCTCCTCCGACAACATGGTCGAC  
3661.. TGGCACC GCG AACCATCGC CTTGCGCCAAGCCTCGAACAGGAACGCCACGGTGTGTTT  
3721.. TCCGTTCCG CCGTGATTGG CGACGACGGCAAGCCGTGGATTTTTCTACACCGGCCACCGC  
3781.. TGGGCCAACG GCAAGGACAA CACCGGAGGCGACTGGCAGGTGCAGATGCTCGCCAAGCCG  
3841.. AACGACGACG AACTGAAGAC CTTACGAAGGAGGGCATGATCATCGACTGCCCCACCGAC  
3901.. GAGGTGGACC ACCACTTCCG CGACCCGAAGGTGTGGAAGACCGGTGACACCTGGTATATG  
3961.. ACCTTCGGTG TCTCGTCGAA GGAGCATCGTGGCCAGATGTGGCTGTACACGTGAGCGAC  
4021.. ATGGTGC ACT GGAGCTTCGA TCGGGTGTGTTGAGCATCCGGATCCGAACGTGTTTCATG  
4081.. CTTGAATGCC CCGATTTCTT CCCGATCCGCGATGCGCGGGCAACGAGAAAATGGGTCATC  
4141.. GGCTTCTCCG CGATGGGTGC CAAGCCAAATGGCTTCATGAACCGCAACGTGAACAATGCC  
4201.. GGCTACATGG TGGGCACATG GAAGCCAGGCGAGAGCTTCAAGCCGAGACCGAGTTCCGC  
4261.. CTGTGGGACG AAGGCCATAA CTTCTATGCACCACAGTCGTTCAACACCGAAGGGCGCCAG  
4321.. ATCATGTACG GCTGGATGAG CCCGTTGTCGCCCCCATCCCGATGGAGGAGGACGGCTGG  
4381.. TGCGGCAACC TCACCCTCCC CCGCGAGATCACGCTGGGCGATGACGGTGACCTGGTCACC

4441.. GCCCCACCA TCGAAATGGA GGGGCTGCGCGAGAATACCATAGGCTTCGACTCGCTCGAC  
4501.. CTTGGTACGA ACCAGACCTC CACGATCCTCGACGATGACGGCGGGCCCTGGAAATCGAG  
4561.. ATGAGACTCG ATCTGAACAA AACCACCGCCGAACGCGCCGGACTGCATGTGCATGCCACA  
4621.. AGCGACGGCC ACTACACGGC AATCGTATTTCGACGCGCAGATCGGCGGGCTCGTCATCGAC  
4681.. CGGCAGAACG TGGCGAACGG AGACAAAGGCTACCGGGTGGCCAAGCTCAGCGACACCGAG  
4741.. CTCGCAGCCG ATACGCTTGA CTTGCGCGTGTTCATCGACCGCGGATGCGTCGAGGTCTAC  
4801.. GTCGACGGCG GCAAGCATGC GATGAGCTCGTACTCGTTCCCTGGCGATGGCGCACGCGCC  
4861.. GTCGAACTCG TGAGCGAATC CGGCACCACGCACATCGACACCCTCACCATGCACTCGCTC  
4921.. AAGTCCATCG GACTCGAGCA TCACCATCACCATCACTAAAAGCTTGCAAAGTCTGAAAAC  
4981.. GAAGGTGGCA GCTGCCGTTG AAGCGGCCAAGACAGTTGGTAAAGGCGACGGTACAACCGG  
5041.. TACTAGCGAC AAAGGCGGCG GTCAAGGTACCCCGGCGCTACGATATTTGGAGTTGAGGTT  
5101.. CAAAGTCAAA TGGTACTGAT GACCGGTAAAATTTAATATTTTGAACCTTGCTTAGGCAGC  
5161.. TGACTTCACA TTGTTGAGAT CAGCTGCCTTTTGTCTTATAGTTCATTGAGTAGAAAACGGTT  
5221.. CTGTTGCGAA GTTTGAAAAT CAAACGCAAGCTCGATTTTTTTATTA AAAACGTCTCAAAAATC  
5281.. GTTTCTGAGA CGTTTTAGCG TTTATTTTCGTTTAGTTATCGGCATAATCGTTAAAAACAGGC  
5341.. GTTATCGTAG CGTAAAAGCC CTTGAGCGTAGCGTGGCTTTGCAGCGAAGATGTTGTCTGT  
5401.. TAGATTATGA AAGCCGATGA CTGAATGAAATAATAAGCGCAGCGCCCTTCTATTTCCGGTT  
5461.. GGAGGAGGCT CAAGGGAGTA TGAGGGAATGAAATTCCCTCATGGGTTTGATTTTAAAAAT  
5521.. TGCTTGCAAT TTTGCCGAGC GGTAGCGCTGGAAAATTTTTGAAAAAATTTGGAATTTGG  
5581.. AAAAAAATGG GGGGAAAGGA AGCGAATTTTGTCTCCGTACTACGACCCCCATTAAGTGC  
5641.. CGAGTGCCAA TTTTTGTGCC AAAAACGCTCTATCCCAACTGGCTCAAGGGTTTAAGGGGT  
5701.. TTTTCAATCG CCAACGAATC GCCAACGTTTTTCGCCAACGTTTTTTATAAATCTATATTTA  
5761.. AGTAGCTTTA TTGTTGTTTT TATGATTACAAAGTGATACACTAACTTTATAAAAATTATTT  
5821.. GATTGGAGTT TTTTAAAT

## 9.5.2 pGKV::BfrA



961... AACAGGAACGCCACGGTGTGTTCTCCGGTTCGCCCGTGATTGGCGACGACGGCAAGCCGT  
1021.. GGATTTTCTACACCGGCCACCGCTGGGCCAACGGCAAGGACAACACCGGAGGCGACTGGC  
1081.. AGGTGCAGATGCTCGCCAAGCCGAACGACGACGAACTGAAGACCTTCACGAAGGAGGGCA  
1141.. TGATCATCGACTGCCCCACCGACGAGGTGGACCACCACTTCCGCGACCCGAAGGTGTGGA  
1201.. AGACCGGTGACACCTGGTATATGACCTTCGGTGTCTCGTGAAGGAGCATCGTGGCCAGA  
1261.. TGTGGCTGTACACGTGAGCGACATGGTGCCTGGAGCTTCGATCGGGTGCTGTTTCGAGC  
1321.. ATCCGGATCCGAACGTGTTTCATGCTTGAATGCCCCGATTTCTTCCCGATCCGCGATGCGC  
1381.. GGGGCAACGAGAAATGGGTTCATCGGCTTCTCCGCGATGGGTGCCAAGCCAAATGGCTTCA  
1441.. TGAACCGCAACGTGAACAATGCCGGCTACATGGTGGGCACATGGAAGCCAGGCGAGAGCT  
1501.. TCAAGCCGGAGACCGAGTTCCGCCTGTGGGACGAAGGCCATAACTTCTATGCACCACAGT  
1561.. CGTTCAACACCGAAGGGCGCCAGATCATGTACGGCTGGATGAGCCCGTTTCGTCGCCCCCA  
1621.. TCCCGATGGAGGAGGACGGCTGGTGC GGCAACCTCACCTCCCCCGGAGATCACGCTGG  
1681.. GCGATGACGGTGACCTGGTCCACCGCCCCACCATCGAAATGGAGGGGCTGCGCGAGAATA  
1741.. CCATAGGCTTCGACTCGCTCGACCTTGGTACGAACCAGACCTCCACGATCCTCGACGATG  
1801.. ACGGCGGCGCCCTGGAAATCGAGATGAGACTCGATCTGAACAAAACCACCGCCGAACGCG  
1861.. CCGGACTGCATGTGCATGCCACAAGCGACGGCCACTACACGGCAATCGTATTCGACGCGC  
1921.. AGATCGGCGGCGTTCGTTCATCGACCGGCAGAACGTGGCGAACGGAGACAAAGGCTACCGGG  
1981.. TGGCCAAGCTCAGCGACACCGAGCTCGCAGCCGATACGCTTGACTTGCGCGTGTTCATCG  
2041.. ACCGCGGATGCGTTCGAGGTCTACGTGACGGCGGCAAGCATGCGATGAGCTCGTACTCGT  
2101.. TCCCTGGCGATGGCGCACGCGCCGTGCAACTCGTGAGCGAATCCGGCACACGCACATCG  
2161.. ACACCCTCACCATGCACTCGCTCAAGTCCATCGGACTCGAGTAAAAGCTTATTTACTGCC  
2221.. TATATTTACGATAGGCAAATTTAAGGTGGAAGAAGGAAAAATCATTTTGCCCGTTGCCAT  
2281.. ACAAGTACATCATGCTGTTTGTGATGGCTATCATGCCGGTCAATATGTTGAATATTTGAG  
2941.. GTGGCTTATTGAACATTGTGACGAGTGGTTAAATGATTCATTGCATATTACCTGAAGACA  
3001.. AAAGGTGCTCCCATGAAAATCTAGAAGATGAAGGCAGACTGAAATGAGTCTGCCTTTTTTG  
3061.. TTTTGTAATGATAATGTGCCAAAGGTTTATTGATGTAACAATTGTTCTTTTTTGCGGTTTC  
3121.. TTTTCGGTGCTTTGTAAATTCTATATGTGATAATAAATGTAATATAAGGGAAATTAGTGG  
3181.. AAGGGGAATAAGGGATGGAGAAAGTCTTTCTTCACATGTAGGTGTGAAAATAAATGAATG  
3241.. GTATAAAATGATTCGGCAATTCAGTGTACCCGACGCAGAGATTTTGAAAGCTGAGGTAGA

3301.. ACAAGAAATTGAACGAATGGAAGAGGATCAAGATTTACTCATTTATTATCAATTGATGTG  
3361.. CTTTCGACATCAAATCATGTTAGATTACATTAACCTGTAGACTTTAATAAAAAATAGACC  
3421.. AACCATTTTCATCCCTCTTAGATCCAGTTGCTCAAAAAAATCTCGGTCAGATGTTACTAGC  
3481.. AACTCATTTACAAGAACAGCATCTTTCTCCGTTTTTTCTTGTACCTGTTTTTTGTGATTC  
3541.. AATAATTTCTTTGACACGTTTCGTTGTAATCAATATTTTTATCATTTTTTCAAATCATAATT  
3601.. TTCACGTGTTTCGCTCATGGTCAATATCATCATTTCGTTCTACTTTTTTCGCTCTCTTTGATT  
3661.. ATGAAATTGCATGCCTTTTAGTCCAGCGATCATTTTTGTTTATTGCAATTGTATTGCTATT  
3721.. AATCGCAACATCAAACCAAATAAAAAACCCCTTCGACTTTTCGTCAGGGGGCTTTTTATTT  
3781.. ATTCAATAATCCCTCCTCTCAATAAATCTATTGTTGTACTTAATTCAACTTCCATTTCTC  
3841.. TGTATCTTTCAATACGCTCTTTTAAGTCCTTAATTTCTTTTTTTAATTCCCTCATTTTCAG  
3901.. CAAATAACTCTTTTTCTTTGTTTGTCAATTTATTTCCCCCGTTTCAGCATCAAGAACCTT  
3961.. TGCATAACTTGCTCTATATCCACACTGATAATTGCCCTCAAACCATAATCTAAAGGCGCT  
4021.. AGAGTTTGTGAAACAATATCTTTTACATCATTTCGTATTTAAAATTCCAAACTCCGCTCC  
4081.. CCTAAGGCGAATAAAAGCCATTAAATCTTTTGTATTTACCAAATTATAGTCATCCACTAT  
4141.. ATCTAAAAGTAAATTCTTCAATTCTTTTTTTGGCTTTCATCAAGTGTATATAGCGGTC  
4201.. AATATCAAATCATTAAATGTTCAAATATCTTTTTTTGTCGTATATATGTTTATTCTTAGC  
4261.. AATAGCGTCCTTTGATTCATGAGTCAAATATTCATATGAACCTTTGATATAATCAAGTAT  
4321.. CTCAACATGAGCAACTGAACTATTCCCAATTTTTCGCTTAATCTTGTTCCTAACGCTTTC  
4381.. TATTGTTACAGGATTTTCGTGCAATATATAACGTGATAGTGTGGTTTTTTTATAGTGCTT  
4441.. TCCATTTTCGTATAACATCACTACTATTCCATGTATCTTTATCTTTTTTTTTTCGTCCATATC  
4501.. GTGTAAAGGACTGACAGCCATAGATACGCCCAAACCTCTCTAATTTTTCTTTCCAATCATT  
4561.. AGGAATTGAGTCAGGATATAATAAAAAATCCAAATTTCTAGCTTTAGTATTTTTAATAGC  
4621.. CATGATATAATTACCTTATCAAAAACAAGTAGCGAAAACCTCGTATCCTTCTAAAAACGCG  
4681.. AGCTTTTCGCTTATTTTTTTTTGTTCTGATTCTTTCTTGCATATTCTTCTATAGCTAACGC  
4741.. CGCAACCGCAGATTTTGAAAAACCTTTTTGTTTCGCCATATCTGTTAATTTTTTATCTTG  
4801.. CTCTTTTGTGAGAGAAATCATAACTCTTTTTTTTCGATTCTGAAATCACCATTTAAAAAAC  
4861.. TCCAATCAAATAATTTTATAAAGTTAGTGTATCACTTTGTAATCATAAAAAACAACAATAA  
4921.. AGCTACTTAAATATAGATTTATAAAAAACGTTGGCGAAAACGTTGGCGATTTCGTTGGCGA  
4981.. TTGAAAAACCCCTTAAACCCTTGAGCCAGTTGGGATAGAGCGTTTTTTGGCACAAAAATTG

5041.. GCACTCGGCACTTAATGGGGGGTCGTAGTACGGAAGCAAAATTCGCTTCCTTTCCCCCA  
5101.. TTTTTTCCAAATTCCAAATTTTTTCAAAAATTTTCCAGCGCTACCGCTCGGCAAAATF  
5161.. GCAAGCAATTTTTAAAATCAAACCCATGAGGGAATTTTCATTCCCTCATACTCCCTTGAGC  
5221.. CTCCTCCAACCGAAATAGAAGGGCGCTGCGCTTATTATTTTCATTCAGTCATCGGCTTTCA  
5281.. TAATCTAACAGACAACATCTTCGCTGCAAAGCCACGCTACGCTCAAGGGCTTTTACGCTA  
5341.. CGATAACGCCTGTTTTAACGATTATGCCGATAACTAAACGAAATAAACGCTAAAACGTCT  
5401.. CAGAAACGATTTTGGAGACGTTTTAATAAAAAATCGGATAATAAATATATATAAACGTATA  
5461.. TAGATTTCATAAAGTCTAACACACTAGACTTATTTACTTCGTAATTAAGTCGTTAAACCG  
5521.. TGTGCTCTACGACCAAAACTATAAAACCTTTAAGAACTTTCTTTTTTTTACAAGAAAAAAG  
5581.. AAATTAGATAAATCTCTCATATCTTTTATTCAATAATCGCATCCGATTGCAGTATAAATF  
5641.. TAACGATCACTCATCATGTTTCATATTTATCAGAGCTCGTGCTATAATTATACTAATTTTA  
5701.. TAAGGAGGAAAAAATATGGGCATTTTTAGTATTTTTGTAATCAGCACAGTTCATTATCAA  
5761.. CCAAACAAAAAATAAGTGGTTATAATGAATCGTTAATAAGCAAAATTCATATAACCAAAT  
5821.. TAAAGAGGGTTATAATGAACGAGAAAAATATAAAACACAGTCAAAACTTTTACTTCAA  
5881.. AACATAATATAGATAAAATAATGACAAATATAAGATTAATGAACATGATAATATCTTTG  
5941.. AAATCGGCTCAGGAAAAGGCCATTTTACCCTTGAATTAGTAAAGAGGTGTAATTTCTGTA  
6001.. CTGCCATTGAAATAGACCATAAATTATGCAAAACTACAGAAAATAAACTTGTGATCAGC  
6061.. ATAATTTCCAAGTTTTAAACAAGGATATAATGCAGTTTTAAATTTCTAAAAACCAATCCT  
6121.. ATAAAATATATGGTAATATACCTTATAACATAAGTACGGATATAATACGCAAAATTTGTTT  
6181.. TTGATAGTATAGCTAATGAGATTTATTTAATCGTGGAATACGGGTTTGCTAAAAGATTAT  
6241.. TAAATACAAAACGCTCATTGGCATTACTTTTAAATGGCAGAAGTTGATATTTCTATATTAA  
6301.. GTATGGTTCCAAGAGAATATTTTCATCCTAAACCTAAAGTGAATAGCTCACTTATCAGAT  
6361.. TAAGTAGAAAAAATCAAGAATATCACACAAAGATAAAACAAAAGTATAATTATTTCTGTTA  
6421.. TGAAATGGGTTAACAAAGAATACAAGAAAATATTTACAAAAAATCAATTTAAACAATTCCT  
6481.. TAAAACATGCAGGAATTGACGATTTAAACAATATTAGCTTTGAACAATTCTTATCTCTTT  
6541.. TCAATAGCTATAAATTATTTAATAAGTAAGTTAAGGGATGCATAAACTGCATCCCTTAAC  
6601.. TTGTTTTTTCGTGTGCCTATTTTTTGTGAATC

### 9.5.3 $\beta$ -Fructosidase (BfrA)

```

1      ATGGCAACCC TTCCCACCAA TATTCCCGCC AACGGCATTG TGACCCCCGA CCCGGCGCTC
61     GACCCTGTGC TCACGCCGAT CTCGGACCAT GCCGAGCAGC TGTCACTCGC CGAAGCAGGC
121    GTGTCGGCAC TGGAAACCAC CCGCAACGAC CGCTGGTACC CGAAGTTCCA CATTGCCTCC
182    AATGGCGGGT GGATCAACGA CCCGAACGGC CTGTGCCGCT ACAACGGACG CTGGCACGTG
241    TTCTACCAGC TGCATCCCCA CGGCACACAG TGGGGCCCCG TGCATTGGGG CCACGTCTCC
301    TCCGACAACA TGGTCGACTG GCACCGCGAA CCCATCGCCT TCGCGCCAAG CCTCGAACAG
361    GAACGCCACG GTGTGTTCTC CGGTTCCGCC GTGATTGGCG ACGACGGCAA GCCGTGGATT
421    TTCTACACCG GCCACCGCTG GGCCAACGGC AAGGACAACA CCGGAGGCCG CTGGCAGGTG
481    CAGATGCTCG CCAAGCCGAA CGACGACGAA CTGAAGACCT TCACGAAGGA GGGCATGATC
541    ATCGACTGCC CCACCGACGA GGTGGACCAC CACTTCCGCG ACCCGAAGGT GTGGAAGACC
601    GGTGACACCT GGTATATGAC CTTCCGGTGT TCGTCGAAGG AGCATCGTGG CCAGATGTGG
661    CTGTACACGT CGAGCGACAT GGTGCACTGG AGCTTCGATC GGGTGCTGTT CGAGCATCCG
721    GATCCGAACG TGTTTCATGCT TGAATGCCCC GATTTCTTCC CGATCCGCGA TGC GCGGGG
781    AACGAGAAAT GGGTCATCGG CTTCTCCGCG ATGGGTGCCA AGCCAAATGG CTTTCATGAAC
841    CGCAACGTGA ACAATGCCGG CTACATGGTG GGCACATGGA AGCCAGGCCG GAGCTTCAAG
901    CCGGAGACCG AGTTCCGCCT GTGGGACGAA GGCCATAACT TCTATGCACC ACAGTCGTTC
961    AACACCGAAG GGCGCCAGAT CATGTACGGC TGGATGAGCC CGTTCGTGCG CCCCATCCCC
1021   ATGGAGGAGG ACGGCTGGTG CGGCAACCTC ACCCTCCCCC GCGAGATCAC GCTGGGCGAT
1081   GACGGTGACC TGGTCACCGC CCCCACCATC GAAATGGAGG GGCTGCGCGA GAATACCATA
1141   GGCTTCGACT CGCTCGACCT TGGTACGAAC CAGACCTCCA CGATCCTCGA CGATGACGGC
1201   GGCGCCCTGG AAATCGAGAT GAGACTCGAT CTGAACAAAA CCACCGCCGA ACGCGCCGGA
1261   CTGCATGTGC ATGCCACAAG CGACGGCCAC TACACGGCAA TCGTATTCTGA CGCGCAGATC
1321   GGCGGCGTCG TCATCGACCG GCAGAACGTG GCGAACGGAG ACAAAGGCTA CCGGGTGGCC
1381   AAGCTCAGCG ACACCGAGCT CGCAGCCGAT ACGCTTGACT TGCGCGTGTG CATCGACCGC
1441   GGATGCGTCG AGGTCTACGT CGACGGCGGC AAGCATGCGA TGAGCTCGTA CTCGTTCCCT
1501   GGCGATGGCG CACGCGCCGT CGAACTCGTG AGCGAATCCG GCACCACGCA CATCGACACC
1561   CTCACCATGC ACTCGCTCAA GTCCATCGGA CTCGAGTGA

```

