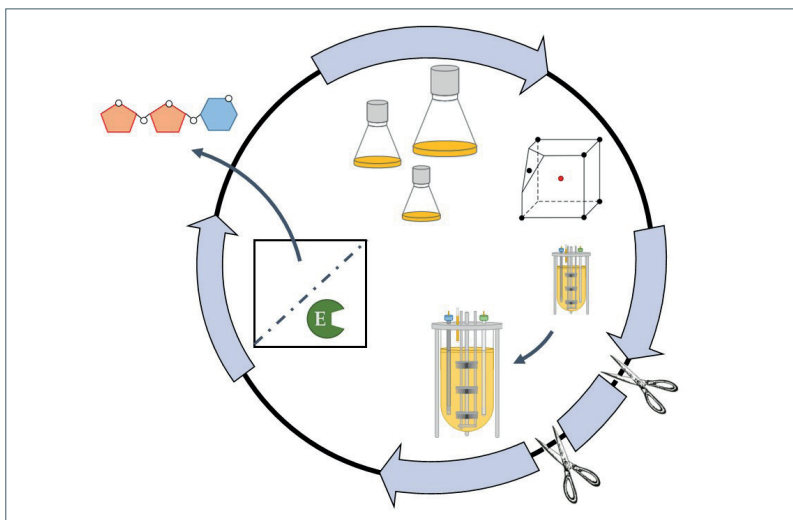


Jan Philipp Burghardt

Produktion langkettiger präbiotischer Oligosaccharide am Beispiel von Neo-Fructooligosacchariden



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische
Technologie | Band 20

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak



**PRODUKTION LANGKETTIGER
PRÄBIOTISCHER OLIGOSACCHARIDE
AM BEISPIEL VON
NEO-FRUCTOOLIGOSACCHARIDEN**

Dem Fachbereich Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen zur Erlangung des
Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation von
Jan Philipp Burghardt
geboren am 01.03.1988 in Hamburg

Gießen, 2021

Dekan: Prof. Dr. Thomas Wilke

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

Zweitgutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 20

Jan Philipp Burghardt

**Produktion langkettiger präbiotischer
Oligosaccharide am Beispiel von
Neo-Fructooligosacchariden**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Düren 2021

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2021

Copyright Shaker Verlag 2021

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-8187-9

ISSN 2198-5731

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

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

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

*"Even the most stupid of men, by some instinct of nature,
is convinced that the more observations [n] have been made,
the less danger there is of wandering from one's goal."*

Jacob Bernoulli, 1654 - 1705

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat. Ich stimme zu, dass die vorliegende Arbeit mit einer Anti-Plagiatsoftware überprüft werden darf.

Datum, Ort

Unterschrift

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Gesamtprozess zur enzymatischen Herstellung von Fruktooligosacchariden (FOS) beschrieben werden. Hierzu wurde zunächst die heterologe Expression einer *Aspergillus terreus* Fructosyltransferase in *Kluyveromyces lactis* verbessert. Im Rahmen von Satzreaktor-Fermentationen im Schüttelkolbenmaßstab wurde ein chemisch definiertes Fermentationsmedium speziell für die Anforderungen von *K. lactis* zur Erhöhung der Biotrockenmasse entwickelt. Diese Entwicklung schuf die Grundlage für eine Skalierung des Prozesses von 0,5 auf 7 L. Die Kohlenstoffquelle wurde optimiert, indem Glucose als Hauptkohlenstoffquelle und Inhibitor der Invertasebildung sowie Galactose als sekundäre Kohlenstoffquelle und Induktor der Enzymexpression verwendet wurde. Eine Erhöhung der Kohlenstoffkonzentration führte zunächst zu einer Sauerstofflimitierung. Die kritische Sauerstofftransportrate (OTR) wurde daher für die Maßstabsübertragung verwendet. Hieraus folgte eine geometrisch ähnliche Maßstabsübertragung mit identischer OTR. Dies führte zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf Biomasse, Proteinkonzentration und Transferaktivität sowie gelöster Sauerstoff (DO) und Online-OTR. Die Transferaktivität wurde eingeführt, um zwischen der erwünschten Enzymaktivität zum FOS Aufbau und einer unerwünschten Hydrolyseaktivität zu Unterscheiden. Eine Einheit der Transferaktivität ist nachstehend als Menge an Fructose definiert, die für die Synthese von FOS pro Zeiteinheit verwendet wurde. Die OTR wurde erhöht, um die Bedingung $DO > 50 \%$ beizubehalten. Diese Veränderung spiegelte sich in einer 169%igen Erhöhung der Transferaktivität des Standardprozesses mit 30 g L^{-1} Glucose und $7,5 \text{ g L}^{-1}$ Galactose wider. Die Deletion des nativen Invertase-Gens in *K. lactis* führte zu einer weiteren Steigerung der Transferaktivität um 66,9 % in einem Zulaufverfahren. Zur enzymatischen FOS Herstellung wurde im zweiten Schritt ein Enzymmembranreaktorsystem für die kontinuierliche FOS-Produktion als Funktion der Verweilzeit ausgelegt. Das Reaktorsystem wurde durch die Verbesserung des Permeatflusses mittels eines D-optimalen Versuchsplanes etabliert, das auch den Verlust an Enzymaktivität reduzierte. Innerhalb des Versuchsraumes konnte ein Arbeitspunkt in Abhängigkeit des Transmembrandruckes (0,5 bar) und der Überströmungsgeschwindigkeit ($0,6 \text{ m s}^{-1}$) identifiziert werden. Im dritten Abschnitt wurde eine selektive Fermentation durch *Bacillus subtilis* betrachtet, wodurch die Monosaccharide aus einer enzymatisch hergestellten FOS Lösung selektiv entfernt werden konnten. Als weiterführende Fallstudie wurde eine 2-Enzym-Kaskade betrachtet, um die Wertigkeit der FOS Lösung zu erhöhen. Hierzu wurde native Fructosyltransferase aus *Xanthophyllomyces dendrorhous* eingesetzt, um Neokestose aus Saccharose herzustellen. Im zweiten Prozessschritt wurde die Kettenlänge von Neokestose verlängert, sodass putative neoFOS mit bis zu fünf zugesetzten Fructoseeinheiten (GF₅) hergestellt werden konnten.

Abstract

The present work describes an overall process for an enzymatic production of fructooligosaccharides (FOS). For this purpose, the heterologous expression of an *Aspergillus terreus* fructosyltransferase in *Kluyveromyces lactis* was improved first. A chemically defined fermentation medium was developed specifically for the requirements of *K. lactis* to increase the biomass in shake flask-scale fermentations. This advancement formed the basis for scaling up the process from 0.5 L to reactor fermentations in 7 L format. The optimized carbon profile in the medium was generated by using glucose as the main carbon source and inhibitor of invertase formation. Galactose functions as secondary carbon source and furthermore induces the fructosyltransferase. Increasing the concentration of carbon sources initially led to an oxygen limitation during the fermentation process. Therefore the critical oxygen transfer rate (OTR) was used for the scale transfer. This, in turn, led to similar results in terms of biomass, protein concentration, and transfer activity, as well as dissolved oxygen (DO) and online OTR. The transfer activity was introduced here to distinguish between the desired enzyme activity for FOS assembly and the hydrolysis activity. A unit of transfer activity is defined as the amount of fructose used to synthesize FOS per unit time. The OTR was increased to maintain the DO > 50 % condition. This improvement was reflected in a 169 % increase in transfer activity of the standard process with 30 g L⁻¹ glucose and 7.5 g L⁻¹ galactose. The deletion of the native invertase gene in *K. lactis* resulted in a further 66.9 % increase in transfer activity in a feed process. For the enzymatic FOS production, the second step was to design an enzyme membrane reactor system for a continuous FOS production as a function of residence times. This was established by improving the permeate flux using a D-optimal experimental design, which also reduced the loss of enzyme activity. Within the experimental space, a process point could be identified as the function of transmembrane pressure (0.5 bar) and crossflow velocity (0.6 m s⁻¹). In the third section, a selective fermentation by *Bacillus subtilis* was considered, by which monosaccharides could be selectively removed from an enzymatically produced FOS solution. As a further case study, a 2-enzyme cascade was considered to increase the valence of the FOS solution. For this purpose, native fructosyltransferase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* was used to produce neokestose from sucrose. In a second process step, the fructosyltransferase, heterologously expressed in *K. lactis*, was immobilized on enzyme carriers and the chain length of neokestose was extended, so that putative neoFOS with up to five added fructose units (GF₅) could be produced.

Publikationsliste

Peer-Reviewed Artikel

Fan, R.; Burghardt, J.P.; Huang, J.; Xiong, T.; Czermak, P.: “*Purification of crude fructo-oligosaccharide preparations using probiotic bacteria for the selective fermentation of monosaccharide byproducts*” *Front. Microbiol.*, 2021, doi:10.3389/fmicb.2020.620626

Fan, R.; Burghardt, J.P.; Czermak, P.: “*Process Design fundamentals for the production of prebiotic oligosaccharides using membrane integrated reactor systems*” *Chemie Ingenieur Technik*, 2021, doi:10.1002/cite.202000160

Burghardt, J.P.; Fan, R.; Baas, M.; Eckhardt, D.; Gerlach, D.; Czermak P.: “*Enhancing the heterologous fructosyltransferase activity of kluyveromyces lactis: developing a scaled-up process and abolishing invertase by CRISPR/Cas9 genome editing.*”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020. doi:10.3389/fbioe.2020.607507

Fan, R.; Burghardt, J.P.; Prell, F.; Zorn, H.; Czermak, P.: “*Production and purification of fructo-oligosaccharide using an enzyme membrane bioreactor and subsequent fermentation with probiotic Bacillus coagulans*”, *Separation and Purification Technology*, 2020, doi:10.1016/j.seppur.2020.117291

Fan, R.; Burghardt, J.P.; Xiong, T.; Czermak, P.: “*Removal of Small-Molecular By-products from Crude Fructo-Oligosaccharide Preparations by Fermentation Using the Endospore-Forming Probiotic Bacillus coagulans*”, *Fermentation*, 2020, doi: 10.3390/fermentation6010006

Burghardt, J.P.; Coletta, L.A.; van der Bolt, R.; Ebrahimi, M.; Gerlach, D.; Czermak, P.: “*Development and Characterization of an Enzyme Membrane Reactor for Fructo-Oligosaccharide Production.*”, *Membranes*, 2019, doi:10.3390/membranes9110148

Burghardt, J.P.; Baas, M.; Gerlach, D.; Czermak, P. “*Two-step production of neofructo-Oligosaccharides Using immobilized heterologous Aspergillus terreus 1F-Fructosyltransferase Expressed in Kluyveromyces lactis and Native Xanthophyllomyces dendrorhous G6-Fructosyltransferase.*”, *Catalysts*, 2019, doi:10.3390/catal9080673

Burghardt, J.P.; Oestreich, A.M.; Weidner, T.; Gerlach, D. and Peter Czermak, “*Development of a Chemically Defined Fermentation Medium for the Production of a New Recombinant Fructosyltransferase.*”, *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 2018. doi:10.18178/ijpmbs.7.4.71-77

Proceedings Paper

Burghardt, J.P.; Gerlach, D.; Czermak, P.; “*Production of short-chain fructooligosaccharides with a recombinant produced and immobilized fructosyltransferase*”, New Biotechnology 44, 2018, doi: 10.1016/j.nbt.2018.05.095

Konferenzbeiträge - Vorträge

Burghardt, J.P.; Ur Rehman, A.; Ebrahimi, M.; Gerlach, D.; Czermak, P.; “*Production of short chain fructooligosaccharides in enzyme membrane reactor systems*”, Euromembrane, 9.-13. Juli 2018, Valencia, Spanien

Burghardt, J.P., Gerlach, D.; Czermak, P.: “*Production of short-chain fructooligosaccharides with a recombinant produced and immobilized fructosyltransferase*”, European Congress on Biotechnology, 1.-4. Juli 2018, Genf, Schweiz

Burghardt, J.P.; Ebrahimi, M.; Gerlach, D.; Czermak, P.; “*Use of a Aspergillus terreus fructosyltransferase expressed within Kluyveromyces lactis for the production of short-chain fructooligosaccharides*”, IACHEMA Congress, 14.-18.- Juni 2018, Frankfurt, Deutschland

Burghardt, J.P., Oestreich, A.M.; Weidner, T.; Gerlach, D.; Czermak, P.: “*Development of a chemically defined fermentation medium for the production of a new recombinant fructosyltransferase*”, 9th International Conference on Biotechnology and Food Science, 9.-11. April 2018, Kopenhagen, Dänemark

Burghardt, J.P., Gerlach, D.; Czermak, P.: “*Fructooligosaccharide production by recombinant fructosyltransferase expressed in Kluyveromyces lactis*”, Summer School: Current Topics in Food Biotechnology 28.-30. August 2017, Rauschholzhausen, Deutschland

Konferenzbeiträge - Poster

Burghardt, J.P.; van der Bolt, R.; Loewe, D.; Ebrahimi, M.; Gerlach, D.; Czermak, P.; “*Development and characterization of an enzyme membrane reactor (EMR) for fructooligosaccharide production*”, Engineering with Membranes, 8.-10. April 2019, Bastad, Sweden

Burghardt, J.P.; Akinti, H.B.; Gerlach, D.; Czermak, P.; *“Production of short-chain fructooligosaccharides with a new recombinant fructosyltransferase in batch and packed -bed enzyme reactors”*, Himmelfahrtstagung 2018, 7.-9. Mai 2018, Magdeburg, Deutschland

Burghardt, J.P.; Ebrahimi, M.; Gerlach, D. P Czermak: *“New approaches for production of prebiotic fructo-oligosaccharides with a new recombinant fructosyltransferase”*, ProcessNet Jahrestagung, 13.-17. Februar 2017, Bruchsal, Deutschland

Erlaubnis zum Copyright

Die bei MDPI und Frontiers publizierten Arbeiten wurden unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License veröffentlicht und dürfen in dieser Arbeit weiterverteilt werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak für die vielfältige Ideengebung. Ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Ansporn empfunden.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Holger Zorn, Herrn Prof. Dr. Bernd Smarsly und Herrn Prof. Dr. Thomas Wilke für die wissenschaftliche Begutachtung dieser Dissertation und damit einhergehend auch für die entgegengebrachte Mühe und Zeit.

Nicht weniger Dank gebührt sowohl meinen Kollegen für den regen fachlichen Austausch während und außerhalb der Arbeitszeit als auch meinen Freunden und Familie für die moralische Unterstützung.

Besonders danken möchte ich den von mir betreuten Studenten, die mich im Rahmen von Abschlussarbeiten und Forschungsprojekten unterstützt haben. In diesem Zusammenhang sind die Beiträge von Arne Michael Oestreich und Johannes Schäfer zur Medienentwicklung, von Hande Buket Tras (geb. Akinti) und Markus Baas zur Etablierung der Enzymkatalyse sowie der Maßstabsvergrößerung und von Ramona van der Bolt sowie Luca Coletta für die Entwicklung und Charakterisierung des Enzymmembranreaktors, gure hervorzuheben. Für die Bearbeitung des abschließenden Aufreinigungsschrittes möchte ich Josephine Dresler danken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Lektoren Markus Baas, Luca Coletta, Johannes Kreuzer, Ole Meinderink, André Meyer, Andreas Rosenauer, Kaltrinë Shabani, Merlinda Ilire Suli und Kristina Wagner für die sprachliche und fachliche Revision dieser Dissertation.

Abkürzungsverzeichnis

1-FFT	Fructan:Fructan 1-Fructosyltransferase
1-SST	Saccharose:Saccharose 1-Fructosyltransferase
6-SFT	Saccharose:Fructan 6-Fructosyltransferase
amdS	Acetamidase
ANOVA	engl. <i>Analysis of Variance</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BTM	Biotrockenmasse [g L^{-1}]
c	Konzentration [g L^{-1}] bzw. [mol L^{-1}]
Cas9	Endonuklease CRISPR-assoziierte Protein 9
CFV	Tangentialüberströmungsgeschwindigkeit [m s^{-1}] (engl. <i>Cross flow velocity</i>)
CRISPR	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
D	Durchmesser [-]
DO	Gelöster Sauerstoff [%] (engl. <i>Dissolved oxygen</i>)
DoE	Statistische Versuchsplanung (engl. <i>Design of Experiments</i>)
E	Enzym
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
EMR	Enzymmembranreaktor
ERAD	Endoplasmatische Retikulum-assoziierte Proteindegradation
ES	Enzym-Substrat Komplex
F	Fructose
FDA	engl. <i>US food and drug administration</i>
FFase	β -Fructofuranosidasen
FOS	Fructo-Oligosaccharide
Fr	Froude-Zahl
FTase	Fructosyltransferase
G	Glucose
G ⁶ -FFT	Fructan:Fructan G ⁶ -Fructosyltransferase
GF ₂	1-Kestose
GF ₃	Nystose
GF ₄	1F-Fructofranosylnystose
GF _i	FOS Oligomer mit <i>i</i> Fructoseeinheiten
GOS	Galacto-Oligosaccharide
GRAS	engl. <i>generally recognized as safe</i>
gRNA	Guide-RNA Molekül
H	Höhe [m]
H _i	Löslichkeitskonstante der Komponente <i>i</i>

I	Inhibitor
IMOS	Isomalto-Oligosaccharide
J	Permeatfluss [$\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$]
J_0	Anfangsfluss [$\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$]
J_{ss}	Stationärer Fluss [$\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$]
k	Foulingabhängiger Koeffizient [-]
$k_L a$	Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient [min^{-1}] (in Abwesenheit von Mikroorganismen)
$K_L a$	Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient [min^{-1}] (in Anwesenheit von Mikroorganismen)
k_m	Michaelis-Menten-Konstante [mM]
MWCO	Ausschlussgrenze [Da] (eng. <i>Molecular weight cut-off</i>)
n	Modellkonstante [-]
NF	Nanofiltration
neoFOS	FOS der Neoserie
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm [-]
OFAT	engl. <i>One-factor-at-a-time</i>
OTR	Sauerstofftransportrate [$\text{g L}^{-2} \text{h}^{-1}$] (engl. <i>oxygen transfer rate</i>)
ΔP	Druckdifferenz [Pa]
PEG	Polyethylenglykol
R_a	Adsorptionswiderstand [m^{-1}]
R_{cp}	Konzentrationspolarisationswiderstand [m^{-1}]
R_g	Gelschichtwiderstand [m^{-1}]
R_m	Membranwiderstand [m^{-1}] (eng. <i>cross flow velocity</i>)
R_{total}	Gesamtwiderstand [m^{-1}]
Re	Reynolds-Zahl [-]
SMB	engl. <i>simulated moving-bed</i>
t	Zeit [s]
TMP	Transmembrandruck [bar]
UF	Ultrafiltration
v	Reaktionsgeschwindigkeit [$\text{mmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$]
XOS	Xylo-Oligosaccharide
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient von Biomassezuwachs zu Substratverbrauch [-]
YPD	Hefeextrakt Pepton Dextrose (engl. <i>yeast extract peptone dextrose</i>)
α	Bunsenkoeffizient
η	Dynamische Viskosität [Pa s]
μ	Wachstumsrate [h^{-1}]

Inhaltsverzeichnis

Eigenständigkeitserklärung	iv
Zusammenfassung	v
Abstract	vi
Publikationsliste	vii
Abkürzungsverzeichnis	xi
Inhaltsverzeichnis	xiii
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Stand des Wissens	2
2.1 Zuckerersatzstoffe	3
2.1.1 Fructooligosaccharide (FOS)	4
2.1.2 FOS Herstellung	7
2.1.3 FOS Aufreinigung	10
2.2 Expressionssystem	11
2.3 Enzymkinetische Modelle	15
2.4 Membranfiltration	18
2.4.1 Enzymmembranreaktor	19
2.4.2 Stofftransport	20
2.5 Statistische Versuchsplanung (DoE)	24
3 Material und Methoden	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Stämme und Plasmide	27
3.1.2 Fermentationsmedium	28
3.2 Gentechnische Methoden	28
3.2.1 Gentechnische Herstellung der putativen <i>K. lactis</i> GG799 G ⁶ -FFT Mutante	28
3.2.2 CRISPR/Cas9 zur Invertase Deletion in der <i>K. lactis</i> GG799 1-FFT Produktionsmutante	30
3.2.3 Sequenzierung von genomischer DNA aus <i>K. lactis</i> . . .	31
3.3 Enzymproduktion: Upstream	31
3.3.1 Enzymproduktion in chemisch undefinierten Kulturmedien	31
3.3.2 Medienentwicklung	32

3.3.3	Kultivierung im Bioreaktor	32
3.3.3.1	Gastransport im Bioreaktorsystem	34
3.3.3.2	Theoretische Abschätzung der Sauerstofflöslichkeit	34
3.3.3.3	Experimentelle Bestimmung der Sauerstofflöslichkeit	35
3.3.4	Optimierung der Kohlenstoffquelle	36
3.3.4.1	Vergleich der Kohlenstoffquelle	36
3.3.4.2	Induktor-Vergleich im Reaktor-Maßstab . . .	36
3.3.4.3	Optimierung der Induktion	37
3.4	Enzymkatalyse	37
3.4.1	Aufkonzentrierung der 6-SFT- und G ⁶ -FFT-Lösungen . .	38
3.4.2	Enzymimmobilisierung der in <i>K. lactis</i> exprimierten 1-FFT	38
3.4.2.1	Modifikation der Epoxid-Träger	39
3.4.3	Konsequente 2-Enzym Katalyse zur Herstellung von neoFOS	39
3.4.3.1	Fallstudie: 2-Enzym Katalyse mit immobilisierter 1-FFT	39
3.5	Filtration	40
3.5.1	Bestimmung der Wasserwerte und Reinigung der Membran	40
3.5.2	Statistische Versuchsplanung zur Auslegung des Enzymmembranreaktors	41
3.5.3	Kontinuierliche FOS-Produktion im Enzymmembranreaktor	42
3.5.4	Analyse der Enzymstabilität	42
3.6	FOS Aufreinigung	43
3.6.1	Nanofiltration	43
3.6.2	Biotechnologische FOS Aufreinigung	43
3.7	Analytik	44
3.7.1	SDS-Gelelektrophorese	44
3.7.2	Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmasse	44
3.7.3	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	45
3.7.3.1	Bradford-Methode	45
3.7.3.2	Bicinchoninsäure-Methode	45
3.7.4	Kohlenhydratanalyse (UHPLC)	45
3.7.5	Metaboliten-Analyse (HPLC)	45
3.7.6	Analytische Größenausschlusschromatographie (HPLC) .	46
3.7.7	Präparative Größenausschlusschromatographie (FPLC) .	46
3.7.8	Dichtebestimmung und Viskositätsmessung	46
4	Ergebnisse & Diskussion	47
4.1	Gentechnische Arbeiten	47
4.1.1	Expression der G ⁶ -FFT aus <i>X. dendrorhous</i> in <i>K. lactis</i> . .	47

4.1.2	Deletion der 6-SFT (Invertase) in <i>K. lactis</i> 1-FFT Produktionsmutante	48
4.2	Enzymproduktion: <i>Upstream processing</i>	49
4.2.1	Entwicklung eines Fermentationsmediums in <i>K. lactis</i> als Modellprozess	50
4.2.1.1	Vitaminscreening	50
4.2.1.2	Anpassung anorganischer Salze	51
4.2.1.3	Screening Kohlenstoffquelle	52
4.2.2	Reaktor Kultivierungen	52
4.2.2.1	Produktion im Komplexmedium	52
4.2.2.2	Theoretische Auslegung eines Reaktorsystems unter Verwendung kinetischer Daten für <i>K. lactis</i>	53
4.2.2.3	Messung des volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten	55
4.2.2.4	Induktionsscreening	56
4.2.2.5	Induktionsoptimierung	57
4.2.2.6	Erhöhung der Konzentration der Kohlenstoffquellen	58
4.2.2.7	Auslegung der Maßstabsvergrößerung in den 5L Reaktor	60
4.2.2.8	Experimentelle Bestimmung der Sauerstofflöslichkeit	61
4.2.2.9	Charakterisierung des übertragenen Prozesses	65
4.2.2.10	Bewertung der Maßstabsvergrößerung	66
4.2.2.11	Charakterisierung des übertragenen Prozesses mit erhöhter OTR	68
4.2.2.12	Vergleich der <i>K. lactis</i> Produktions- und Δ Inv Mutanten in Satz- und Zulauf-Prozessen	70
4.2.3	Bewertung des <i>Upstream-Processing</i>	73
4.3	Enzymkatalyse	73
4.3.1	Katalyseprodukte der eingesetzten Enzyme	74
4.3.2	Charakterisierung der eingesetzten Enzyme	75
4.3.2.1	1-FFT aus <i>A. terreus</i> exprimiert in <i>K. lactis</i>	76
4.3.2.2	Native Invertase (6-SFT) aus <i>K. lactis</i>	76
4.3.2.3	G ⁶ -FFT aus <i>X. dendrorhous</i>	78
4.3.3	Kinetische Beschreibung der 1-FFT	80
4.3.3.1	Bestimmung der Kinetik	80
4.3.3.2	Einfluss der Viskosität auf die Enzymkatalyse	86
4.3.3.3	Thermostabilität	87
4.3.3.4	Physikalische Eigenschaften der 1-FFT	88

4.3.3.5	Einfluss der 1-FFT Konzentration auf die FOS-Bildung	89
4.3.3.6	Mathematische Modellierung der 1-FFT Katalyse	91
4.3.4	Immobilisierung der 1-FFT	96
4.3.4.1	Trägerscreening	96
4.3.4.2	Optimierung der Immobilisierung	98
4.3.5	Vergleich FOS-Produktion mit freier und immobilisierter 1-FFT	99
4.3.6	Konsekutive 2-Enzym-Katalyse zur Herstellung von neoFOS	101
4.3.6.1	Fallstudie: 2-Enzym Katalyse mit immobilisierter 1-FFT	102
4.3.7	Bewertung der Enzymkatalyse	104
4.4	Enzymmembranreaktor	105
4.4.1	Einfluss des TMP auf den Permeatfluss	105
4.4.2	Parameteranpassung mittels statistischer Versuchsplanung	106
4.4.3	Entwicklung einer Reinigungsstrategie	108
4.4.4	Analyse der Filtrationswiderstände	109
4.4.4.1	<i>Resistance-in-series</i> -Modell	109
4.4.4.2	Einfluss der Maillard-Reaktion auf die Filtrationsleistung	111
4.4.4.3	Adsorptionphänomene	112
4.4.5	Modellierung des Permeatflusses	113
4.4.6	Enzymstabilität	115
4.4.7	Siebkurve	117
4.4.8	Untersuchung der Gelschicht	118
4.4.9	Bewertung der Foulingphänomene	120
4.4.10	Kontinuierliche FOS-Produktion	122
4.4.11	Bewertung des Enzymmembranreaktors	123
4.5	FOS-Aufreinigung	123
4.5.1	Nanofiltration	124
4.5.2	Biotechnologische Aufreinigung	125
4.5.3	FOS-Anreicherung	128
4.6	Gesamtprozess	129
5	Fazit und Ausblick	131
6	Anhang	134
	Literatur	144