

# **Glycosyltransferasen zur Herstellung neuartiger Zucker/-derivate**

**Aktenzeichen: 13066**

**Verfasser: H. Koslik, Dr. S. Lutz-Wahl, Prof. Dr. L. Fischer**

**Universität Hohenheim  
Institut für Lebensmitteltechnologie  
Lehrstuhl für Biotechnologie**

**Projektbeginn: 01.01.2002**

**Laufzeit: 2 Jahre**

**Stuttgart, 2004**



# Glycosyltransferasen zur Herstellung neuartiger Zucker/-derivate

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>2</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>1. ANLASS UND ZIELSETZUNG</b>	<b>10</b>
<b>2. VERWENDETE METHODEN</b>	<b>12</b>
2.1. BIOREAKTORKULTIVIERUNG VON <i>RAHNELLA AQUATILIS</i> :	12
2.2. BIOREAKTORKULTIVIERUNG VON <i>GLUCONOBACTER CERINUS</i>	13
2.3. BESTIMMUNG DER KULTIVIERUNGSPARAMETER	15
2.4. ZELLAUFSCHLÜSSE VON <i>RAHNELLA AQUATILIS</i>	15
2.5. PARTIELLE AUFREINIGUNG DER LEVANSUCRASE AUS <i>RAHNELLA AQUATILIS</i>	16
2.6. ZUCKERBESTIMMUNGEN	16
2.7. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	17
2.8. OPTIMIERUNG DER FRUCTANHYDROLYSE IM SCREENING-ASSAY MITTELS $\beta$ -FRUCTO- SIDASE-BEHANDLUNG	17
2.9. SCREENING-ASSAY	18
2.10. KLONIERUNG UND HETEROLOGE EXPRESSION DER LEVANSUCRASE AUS <i>RAHNELLA</i> <i>AQUATILIS</i> IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	18
2.11. DNA-ISOLIERUNG FÜR DIE 16S rDNA-SEQUENZIERUNG NEUER FRUCTOSYLTRANS- FERASE-PRODUZENTEN	19

---

<b><u>3.</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>20</u></b>
<b>3.1.</b>	<b>HERSTELLUNG DES REFERENZENZYMS AUS <i>RAHNELLA AQUATILIS</i></b>	<b>20</b>
3.1.1.	BIOREAKTORKULTIVIERUNG VON <i>RAHNELLA AQUATILIS</i> IM 10 L-MAßSTAB	20
3.1.2.	VERSUCHE ZUR VERBESSERUNG DER BIOMASSEABTRENNUNG VOM MEDIUM	22
3.1.3.	OPTIMIERUNG DES ZELLAUFSCHLUSSVERFAHRENS VON <i>RAHNELLA AQUATILIS</i>	23
3.1.4.	PARTIELLE AUFREINIGUNG DER NATIVEN LEVANSUCRASE AUS <i>RAHNELLA AQUATILIS</i>	24
3.1.5.	HETEROLOGE EXPRESSION DER LEVANSUCRASE AUS <i>RAHNELLA AQUATILIS</i> IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> UND AUFREINIGUNG DES ENZYMS	25
<b>3.2.</b>	<b>BIOTRANSFORMATIONEN MIT DER HETEROLOG EXPRIMIERTEN LEVANSUCRASE AUS <i>RAHNELLA AQUATILIS</i></b>	<b>27</b>
<b>3.3.</b>	<b>ENTWICKLUNG EINES SCREENINGS NACH NICHT-LELOIR-FRUCTOSYLTRANSFERASEN</b>	<b>30</b>
3.3.1.	ÜBERLEGUNGEN ZUM FRUCTOSYLTRANSFERASE-NACHWEIS	30
3.3.2.	IMMOBILISIERUNG DES AKZEPTORS SACCHAROSE	31
3.3.3.	SCREENING AUF LEVAN- UND INULINBILDUNG	31
<b>3.4.</b>	<b>SCREENING NACH FRUCTOSYLTRANSFERASE-PRODUZENTEN</b>	<b>33</b>
<b>3.5.</b>	<b>GEWINNUNG DER LEVANSUCRASE AUS <i>GLUCONOBACTER CERINUS</i></b>	<b>35</b>
<b><u>4.</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>38</u></b>
<b>4.1.</b>	<b>GEWINNUNG DES VERGLEICHSENZYMS AUS <i>RAHNELLA AQUATILIS</i></b>	<b>38</b>
<b>4.2.</b>	<b>SCREENING NACH NEUEN MIKROBIOELLEN FRUCTOSYLTRANSFERASEPRODUZENTEN</b>	<b>40</b>
<b>4.3.</b>	<b>GEWINNUNG DER LEVANSUCRASE AUS <i>GLUCONOBACTER CERINUS</i></b>	<b>40</b>
<b><u>5.</u></b>	<b><u>FAZIT</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b><u>6.</u></b>	<b><u>ÖFFENTLICHKEITSARBEIT</u></b>	<b><u>44</u></b>
<b><u>7.</u></b>	<b><u>LITERATUR</u></b>	<b><u>45</u></b>
<b><u>8.</u></b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>47</u></b>

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Darstellung des Kultivierungsverlaufes von *Rahnella aquatilis* im Bioreaktor
- Abb. 2: Einfluss verschiedener Zusätze auf die spezifische gesamthydrolytische Aktivität nach dem Zellaufschluss
- Abb. 3: Verlauf der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pLysEpET20b-LsrA zur heterologen Expression der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis*
- Abb. 4: Verlauf der Biotransformation von Saccharose mit der rekombinanten Levansucrase
- Abb. 5: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Biotransformationsproben einer Umsetzung von Saccharose mit der rekombinanten Levansucrase
- Abb. 6: Beispielchromatogramm einer HPLC-Untersuchung einer Biotransformationsprobe mit Xylose als Akzeptor
- Abb. 7: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen einer Biotransformation mit Lactose als Akzeptor
- Abb. 8: Neuer Lösungsansatz zum Nachweis von Fructosyltransferase-Aktivität
- Abb. 9: Ergebnis des Screenings nach mikrobiellen Fructosyltransferaseproduzenten

---

## TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Zusammensetzung des verwendeten Mediums der Bioreaktorkultivierung von *Rahnella aquatilis*
- Tab. 2: Zusammensetzung der Medien der Bioreaktorkultivierungen von *Gluconobacter cerinus*
- Tab. 3: Parameter der *Gluconobacter cerinus*-Kultivierungen
- Tab. 4: Ergebnisse der partiellen Aufreinigung der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis*
- Tab. 5: Zuckergehalte nach  $\beta$ -Fructosidasebehandlung von Zellmasse der Referenzorganismen
- Tab. 6: Vergleich der Bioreaktorkultivierungen von *Gluconobacter cerinus*

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

app.	apparent
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
OD	Optische Dichte

# Glycosyltransferasen zur Herstellung neuartiger Zucker/-derivate

## ZUSAMMENFASSUNG

Zur Gewinnung einer Levansucrase, als Referenzenzym und zur Einschätzung der Schwierigkeiten bei der Kultivierung polysaccharidschleim-bildender Mikroorganismen und der nachfolgenden Aufreinigung, wurde der als Referenzorganismus gewählte Stamm *Rahnella aquatilis* ATCC 33071 (DSM 4594) im 10 L-Maßstab kultiviert. Nach Optimierung des Mediums wurden 895 g levanenthaltende Biofeuchtmasse, entsprechend 63,4 g levanenthaltende Biotrockenmasse, erhalten. Bei der Kultivierung wurde eine durch das fest an den Zellen haftende Levan verursachte Viskositätszunahme beobachtet. Aufgrund dieses Polysaccharidschleimes gestaltete sich die Abtrennung der Biomasse schwierig. Ein geeigneter Hilfsstoff zur Verbesserung der Zentrifugierbarkeit konnte nicht gefunden werden. Die gesamthydrolytische Aktivität (nach Zellaufschluss im Rohextrakt) wurde zu 425 nkat/mg levanenthaltende Biotrockenmasse bestimmt. Eine nachfolgende Aufreinigung (fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustauscherchromatographie) war aufgrund des enthaltenen Levans nicht erfolgreich.

Es erschien daher sinnvoller, das Levansucrasegen aus *Rahnella aquatilis* heterolog in *Escherichia coli* zu exprimieren. Dabei wurden 44 µkat gesamthydrolytische Aktivität/g Biotrockenmasse (nach Zellaufschluss) erhalten, entsprechend 128 µkat gesamthydrolytische Aktivität/mg Protein. Die Aufreinigung erfolgte über Nickelaffinitätschromatographie, wobei 2,7 µkat gesamthydrolytische Aktivität/mg Protein erhalten wurden. Dies entsprach 1,9 µkat Fructosyltransferaseaktivität/mg Protein.

Zur Entwicklung eines High-Throughput-Screenings war zuerst geplant, das Substrat Saccharose kovalent an einen Träger gebunden vorzulegen, um dann gebildete Oligo- und Polysaccharide ebenfalls kovalent gebunden zu erhalten. Bei keinem der getesteten Trägermaterialien (Glas, modifiziertes Polystyrol, Eupergit C 250 L) konn-

te jedoch ausreichend Saccharose gebunden werden. Daher wurde ein neuer Ansatz entwickelt.

Levan, das – wie bei der Kultivierung von *Rahnella aquatilis* beobachtet – fest an den Zellen haftet, ist nach Vigants [Vigants, *et al.*, 2003] durch  $\beta$ -Fructosidasen hydrolysierbar. Bei levanbildenden Organismen ist deshalb nach  $\beta$ -Fructosidasebehandlung der Zellen freie Fructose im Überstand nachweisbar. Diese Überlegung führte zur Entwicklung des neuen Screening-Ansatzes, bei dem die Zellmasse der zu untersuchenden Mikroorganismen mit  $\beta$ -Fructosidase behandelt und der Fructosegehalt des Überstandes enzymatisch, halbautomatisch im Mikrotiterplattenmaßstab bestimmt wurde.

Bislang wurden 323 Stämme aus verschiedenen Habitaten erhalten, auf HTSS-Agar kultiviert und dem Screening unterzogen. Dabei wurden 27 Fructosyltransferaseproduzenten gefunden. Aus diesen wurde *Gluconobacter cerinus* aufgrund der im Vergleich zu *Rahnella aquatilis* höheren Fructosyltransferaseaktivität im Zellextrakt für weitere Untersuchungen ausgewählt und im 4 L-Maßstab kultiviert. Hier wurden mit 50 g Mannit/L und 2 g Saccharose/L 220  $\mu$ kat Fructosyltransferaseaktivität (46 % extrazellulär und 54 % zellgebunden) erhalten.

Es wurde eine erste qualitative Untersuchung zum Vergleich des Produktspektrums der Umsetzung von Saccharose mit den Rohextrakten von *Rahnella aquatilis* und *Gluconobacter cerinus* durchgeführt. In beiden Fällen wurden Glucose, Fructose und die Akzeptorprodukte Kestose, Nystose und Fructosylnystose sowie ein Polyfructan detektiert. Fructoside verschiedener Kettenlänge sind wegen ihrer präbiotischen Eigenschaften interessant [Yun, 1996]. Zusätzlich wird berichtet, dass Levan im Tierversuch antikanzerogen und hypocholesterämisch wirkte [Calazans, *et al.*, 1997, Yamamoto, *et al.*, 1999].

Bei Biotransformationen mit der rekombinanten Levansucrase aus *Rahnella aquatilis* mit Saccharose als Substrat und Xylose bzw. Lactose als Akzeptor konnten in beiden Fällen Akzeptorprodukte detektiert werden. Die bei der Biotransformation mit Xylose entstandenen Fructosylxyloside sind von besonderem Interesse, da sie nach Nam *et al.* [Nam, *et al.*, 2000] antikariogen wirken, indem sie die Glucosyltransferase oraler Streptokokken wie *Streptococcus mutans* hemmen. Dadurch kann es nicht zur Plaquebildung und damit auch nicht zu Karies kommen.

In der Weiterführung des Forschungsthemas soll die Fructosyltransferase aus *Gluconobacter cerinus* aufgereinigt und charakterisiert werden. Die Fructosyltransferasen aus *Gluconobacter cerinus* und *Rahnella aquatilis* sollen verglichen werden.

Von zusätzlichem Interesse sind Biotransformationen mit Fettsäurealkoholen als Akzeptoren. Alkylglykoside gehören zu einer besonders milden und hautverträglichen Klasse von Tensiden. Sie sind zudem von sehr geringer Ökotoxizität [Tessmann, *et al.*, 1997].

## 1. ANLASS UND ZIELSETZUNG

Mit steigender Nachfrage des Verbrauchers nach präbiotischen oder synbiotischen, oligosaccharidhaltigen Lebensmitteln ergibt sich der Bedarf zur Entwicklung geeigneter Syntheseverfahren für maßgeschneiderte Oligo- und Polysaccharide.

Die Schwierigkeiten einer zielgerichteten Saccharidsynthese mit rein chemischen Verfahren liegen in der Polyfunktionalität von Zuckern begründet. Um selektive Reaktionen zu ermöglichen, muss bei chemischen Synthesewegen eine aufwändige Schutzgruppenchemie eingesetzt werden. Zudem ist der apparative Aufwand erheblich und die eingesetzten Chemikalien sind häufig toxisch oder kanzerogen, wie z. B. Quecksilbersalzkatalysatoren [Osborn and Khan, 2000, Paulsen, 1996]. Zur Synthese maßgeschneiderter Oligo- und Polysaccharide ist daher, insbesondere im Lebensmittelbereich, enzymatischen Verfahren der Vorzug zu geben.

Im Rahmen dieses Projektes sollte eine Screeningmethode für solche Glykosyltransferasen etabliert werden, die - im Unterschied zu den bereits vielfach beschriebenen Leloir-Typ-Glykosyltransferasen - keine teuren, aktivierten Zuckerderivate wie UDP-Glucose benötigen. Saccharose, ein Disaccharid mit energiereicher glycosidischer Bindung, die thermodynamisch zum Aufbau von Oligo- und Polysacchariden (Glucoside bzw. Fructoside) geeignet ist, sollte als Substrat verwendet werden. Saccharose wird zudem aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen. Insbesondere Glykosyltransferasen, die Oligofructoside und/oder Fructane synthetisieren (Levan- und Inulinsucrasen) sind aufgrund der präbiotischen Wirkung der gebildeten Fructoside von Interesse.

Zur Entwicklung des Screening-Verfahrens und als Referenzenzym sollte die Levanucrase aus *Rahnella aquatilis* ATCC 33071 (DSM 4594) verwendet werden.

Weiterhin sollte aus den neu gefundenen Fructosyltransferase-Produzenten ein Stamm mit möglichst hoher Fructosyltransferase-Aktivität oder mit variablem Produktspektrum ausgewählt werden. Der ausgewählte Stamm sollte im Bioreaktor an-

gezogen werden, um die Fructosyltransferase für weitere Untersuchungen verfügbar zu machen.

## 2. VERWENDETE METHODEN

### 2.1. BIOREAKTORKULTIVIERUNG VON *RAHNELLA AQUATILIS*:

Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 1 angegeben.

**Tab. 1: Zusammensetzung des verwendeten Mediums der Bioreaktorkultivierung von *Rahnella aquatilis***

Medienkomponente	Einwaage pro Liter
Glucose	25 g
Saccharose	2 g
Ammoniumsulfat	8 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	8 g
Hefeextrakt	1 g
<b>Makroelemente</b>	
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	200 mg
Calciumchlorid-Dihydrat	10 mg
Natriumchlorid	5 mg
<b>Spurenelemente</b>	
Kobalt(II)chlorid-Hexahydrat	200 µg
Mangan(II)chlorid-Dihydrat	100 µg
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	100 µg
Zink(II)chlorid	70 µg
Natriummolybdat-Dihydrat	50 µg
Natriumselenit-Pentahydrat	26 µg
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	20 µg
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	10 mg

Die Kultivierung wurde im Fermenter Biostat® E (Braun, Melsungen, BRD), Nennvolumen 23 L, 10 L-Ansatz, unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Temperatur: 30 °C, Rührergeschwindigkeit: 400 - 1000 rpm, Gasvolumenstrom: 0,5 vvm, pH konstant bei 7,0 durch Zudosage von 2 N Natronlauge, bei 4 h wurden 125 g Glucose und 10 g Saccharose zugegeben.

## 2.2. BIOREAKTORKULTIVIERUNG VON *GLUCONOBACTER CERINUS*

Die Medienzusammensetzungen und die Kultivierungsbedingungen sind in Tab. 2 und 3 wiedergegeben.

**Tab. 2: Zusammensetzung der Medien der Bioreaktorkultivierungen von *Gluconobacter cerinus***

Medienkomponente	Kultivierung 1 <sup>1</sup> Einwaage pro Liter	Kultivierung 2 Einwaage pro Liter	Kultivierung 3 Einwaage pro Liter
Glucose	25 g	-	-
Mannit	-	50 g	50 g
Saccharose	2 g	2 g	20 g
Ammoniumsulfat	2 g	5 g	5 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	20,3 g	-	-
Dikaliumhydrogenphosphat	-	19,7 g	19,7 g
Citronensäure	8,26 g	8,26 g	8,26 g
Hefextrakt	1 g	-	-
<b>Makroelemente</b>			
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	200 mg	200 mg	200 mg
Calciumchlorid-Dihydrat	10 mg	10 mg	10 mg
Natriumchlorid	-	5 mg	5 mg
<b>Spurenelemente</b>			
Kobalt(II)chlorid-Hexahydrat	200 µg	200 µg	200 µg
Mangan(II)chlorid-Dihydrat	100 µg	100 µg	100 µg
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	100 µg	100 µg	100 µg
Zink(II)chlorid	70 µg	70 µg	70 µg
Natriummolybdat-Dihydrat	50 µg	50 µg	50 µg
Natriumselenit-Pentahydrat	26 µg	26 µg	26 µg

Fortsetzung von Tab. 2

Medienkomponente	Kultivierung 1 <sup>1</sup> Einwaage pro Liter	Kultivierung 2 Einwaage pro Liter	Kultivierung 3 Einwaage pro Liter
Kupfer(II)chlorid- Dihydrat	20 µg	20 µg	20 µg
Eisen(II)sulfat- Heptahydrat	10 mg	10 mg	10 mg
<b>Vitamine</b>	nach Schlegel [Schlegel, 1992]	modifiziert nach Ameyama und Adachi und Schlegel [Ameyama und Adachi, 1986, Schlegel, 1992]	
Pyridoxin (Vit. B6)	50 µg	50 µg	50 µg
Cyanocobalamin (Vit. B12)	20 µg	20 µg	20 µg
Nicotinsäure	20 µg	400 µg	400 µg
p-Aminobenzoessäure	10 µg	100 µg	100 µg
Thiaminhydrochlorid (Vit. B1)	10 µg	400 µg	400 µg
Riboflavin (Vit. B2)	6,7 µg	6,7 µg	6,7 µg
Calciumpantothenat	5 µg	400 µg	400 µg
Biotin	2 µg	2 µg	2 µg
Folsäure	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg

<sup>1</sup>Nach 12,83 h wurden 25 g/L Glucose und 2 g/L Saccharose, Spurenelemente und Vitamine zugegeben.

- : Die Substanz wurde nicht zugegeben.

**Tab. 3: Parameter der *Gluconobacter cerinus*-Kultivierungen**

Parameter	Kultivierung 1	Kultivierung 2	Kultivierung 3
Fermenter	Biostat® E (Braun, Melsungen, BRD)	Biostat® E (Braun, Melsungen, BRD)	Biostat® E (Braun, Melsungen, BRD)
Nennvolumen	6,4 L	6,4 L	6,4 L
Kulturvolumen	4,5 L	4 L	4 L
Temperatur	28 °C	30 °C	30 °C
Gasvolumenstrom	0,5 vvm	1 vvm	1 vvm
Rührergeschwindigkeit	200 – 500 rpm	400 – 1000 rpm	400 – 800 rpm
pH-Wert konstant	5,5	5,5	5,5
pH-Korrektur	525 mL 3 N NaOH	97,5 mL 4 N NaOH	145 mL 4 N NaOH

### 2.3. BESTIMMUNG DER KULTIVIERUNGSPARAMETER

Bei allen Kultivierungen wurden in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer nachfolgend genannte Parameter bestimmt: Glucose (Granutest®-Testkit, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, BRD), Glucose, Fructose, Saccharose, Kestose, Levan (dünnschichtchromatographisch, HPLC), Mannit (HPLC), Ammonium (Spektroquant®-Testkit, Merck Eurolab GmbH), Optische Dichte (Absorption bei 540 nm), Biofeucht- und Biotrockenmasse (gravimetrisch), Sauerstoffpartialdruck (Sauerstoffelektrode).

### 2.4. ZELLAUFSCHLÜSSE VON *RAHNELLA AQUATILIS*

Der Ultraschallaufschluss bei *Rahnella aquatilis* erfolgte wie bei Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] beschrieben.

Die Nassvermahlungen einer 20 % w/w Biofeuchtmassesuspension unter Verwendung verschiedener Zusätze wurde mit Glasperlen von einem Durchmesser von 0,25

bis 0,5 mm durchgeführt. Der Aufschluss erfolgte mit 80 % (v/v) Glasperlen in einer Schwingmühle (Retsch, Haan, BRD) für 30 min bei 4 °C und einer Frequenz von 30 Hz.

Die Nassvermahlung der *Rahnella aquatilis*-Biomasse zur Gewinnung des Rohextraktes für die Aufreinigung wurde mit einer 20 %igen Zellsuspension (unter Zusatz von 1 mM EDTA und 10 % Glycerin) in der Dyno-mill KDL A (Bachofen, Basel, Schweiz) mit 80 % Glasperlen (v/v) für 1 min und 3000 rpm unter Kühlung (-10 °C) durchgeführt.

## **2.5. PARTIELLE AUFREINIGUNG DER LEVANSUCRASE AUS *RAHNELLA AQUATILIS***

Zur Aufkonzentrierung der Levansucrase aus dem Rohextrakt von *Rahnella aquatilis* wurde zunächst eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt.

Um die Levansucrase aufzureinigen, wurde die levansucrasehaltige Ammoniumsulfatfällungsfraction nach Entsalzung (mittels Größenausschlusschromatographie) einer Anionenaustauscherchromatographie unterzogen (Säule: DEAE Sepharose FF 16mmD/150mmL 30,159 mL, Puffer: 50 mM TRIS, pH 6,5 Flussrate: 6 mL/min, Elution: stufenweiser NaCl-Gradient (0 - 1.5 M), Detektion: UV (210 nm) und Leitfähigkeit).

## **2.6. ZUCKERBESTIMMUNGEN**

### **HPLC**

Die Bestimmung von Glucose, Fructose, Kestose, Nystose, Fructosylnystose, Levan, Xylose, Lactose und von Mannit mittels HPLC wurde nach Festphasenextraktion (Strata X 8B-S008-HBJ, Phenomenex, Aschaffenburg, BRD) mit einer Ca<sup>2+</sup>-Rezex-Säule, 300x7,8 mm, Phenomenex (Aschaffenburg, BRD) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Fließmittel: bidestilliertes Wasser, Flussrate: 0,8 mL/min, Temperatur: 85 °C, Detektion: RI-Detektor (50 °C).

## DC

Die dünnenschichtchromatographische Bestimmung von Glucose, Fructose, Saccharose, Kestose, Nystose, Fructosylnystose, Levan, Xylose und Lactose erfolgte unter Verwendung von Kieselgel-Platten 60 F<sub>254</sub> als stationäre Phase und 2-Propanol, Eisessig, 0,5 % wässrige Borsäurelösung (60 : 3 : 10, v/v) als Fließmittel. Zur Detektion wurden die Platten mit ethanolischen Lösungen von Diphenylamin (4%), Anilin (4%) und konzentrierter Phosphorsäure (10 : 10 : 3, v/v) besprüht und bis zur Entwicklung farbiger Flecken auf 105 °C erhitzt.

## **2.7. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG**

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in 100 µL Gesamtvolumen in Mikrotiterplatten bei 30 °C mit 10 %iger Saccharoselösung in McIlvaine-Puffer pH 6,0. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 10 µL 0,5 M NaOH zu den Ansätzen hinzugefügt. Die Ermittlung der Fructosyltransferaseaktivität sowie der gesamthydrolytischen Aktivität erfolgte über die enzymatische Bestimmung der freigesetzten Glucose und Fructose mittels eines Glucose/Fructose-Testkits im Mikrotiterplattenmaßstab (r-biopharm, Darmstadt, BRD).

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (Roti®-Quant, Roth, Karlsruhe, BRD).

## **2.8. OPTIMIERUNG DER FRUCTANHYDROLYSE IM SCREENING-ASSAY MITTELS $\beta$ -FRUCTOSIDASE-BEHANDLUNG**

Für die Optimierung der Levan- bzw. Inulinhydrolyse im Bereich pH 3 – 7 und 30 – 90 °C wurde eine kommerziell erhältliche  $\beta$ -Fructosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Roche, Darmstadt, BRD) verwendet. Die freigesetzten Zucker wurden mittels eines Glucose/Fructose-Testkits im Mikrotiterplattenmaßstab (r-biopharm, Darmstadt, BRD) quantifiziert.

## 2.9. SCREENING-ASSAY

Die Isolierung der potenziellen Fructosyltransferaseproduzenten aus pflanzlichem Material und die Kultivierung zur Gewinnung von Biomasse für das Screening erfolgte bei 30 °C auf HTSS-Agar (Hefeextrakt, Trypton, Sojapepton 2 g/L, Saccharose 10 g/L). Als Merkmal für das mögliche Vorhandensein einer Fructosyltransferase wurde die Bildung schleimiger Kolonien herangezogen. Von diesen Kolonien wurden 50 mg potentiell fructanhaltige Biomasse entnommen und in 100 µL  $\beta$ -Fructosidase-Lösung (3000 U/mL, Fructosidaseaktivität nach Herstellerangaben bezogen auf Saccharose, in 0,32 M Natriumcitratpuffer pH 4,6) 14 h bei 60 °C inkubiert. Die Zucker im Überstand wurden mittels des an Mikrotiterplattenformat angepassten Glucose/Fructose-Testkits automatisiert (Pipettierautomat MultiPROBE IIex, Packard BioScience GmbH, Dreieich, BRD) bestimmt.

## 2.10. KLONIERUNG UND HETEROLOGE EXPRESSION DER LEVANSUCRASE AUS *RAHNELLA AQUATILIS* IN *ESCHERICHIA COLI*

Die heterologe Expression des Levansucrasegens erfolgte über Klonierung des Zielgens über die NdeI und XhoI Restriktionsschnittstellen in den pET20b(+)-Vektor (Novogen, Darmstadt, BRD) und Transformation in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Das Expressionssystem ermöglicht die Überproduktion eines C-terminalen Histidin-Hexapeptid-Fusionsproteins (His-Tag) unter Kontrolle eines T7-Promotors. Die Kultivierung wurde in 2 x YT-Medium durchgeführt (Trypton 16 g/L, Hefeextrakt 10 g/L, Natriumchlorid 5 g/L, Ampicillin 100 mg/L, pH 7,0), bei 37 °C und 160 rpm (HT Infors Schüttelinkubator). Zur Induktion des Enzyms wurde bei Erreichen einer Optischen Dichte bei 578 nm von 0,6 - 0,9 IPTG (Endkonzentration 0,4 mM) zugegeben.

Der Zellaufschluss wurde durch Ultraschallbehandlung wie folgt durchgeführt: Eine 20 %ige Zellsuspension in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) mit 5 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Imidazol und 300 mM Natriumchlorid wurde für 6 x 10 s

(Amplitude: 95 %, Cycle: 0,4, UP 200, dr. hielscher, Teltow, BRD) unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt.

Die Aufreinigung des Rohextraktes wurde mittels Nickelaffinitätschromatographie (Ni-NTA Superflow, Qiagen, Hilden, BRD, 10 mL Säulenvolumen), wie vom Hersteller für native Proteine angegeben, durchgeführt.

## **2.11. DNA-ISOLIERUNG FÜR DIE 16S rDNA-SEQUENZIERUNG NEUER FRUCTOSYLTRANSFERASE-PRODUZENTEN**

Die DNA-Isolierung zur Identifizierung der neu gefundenen Fructosyltransferaseproduzenten mittels 16S rDNA-Sequenzierung wurde mit dem DNeasy Tissue Kit von Qiagen (Hilden, BRD), wie vom Hersteller für gramnegative bzw. grampositive Bakterien angegeben, durchgeführt. Die PCR wurde mit dem Triple master PCR-Kit von Eppendorf (Hamburg, BRD) ausgeführt, die Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen, Hilden, BRD). Die 16 S rDNA-Sequenzierung nach Sanger wurde freundlicherweise vom Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie und -mikrobiologie der Universität Hohenheim durchgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

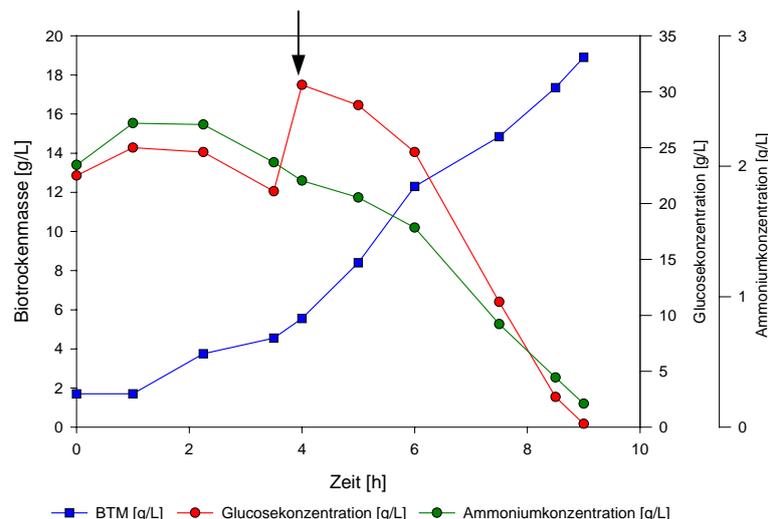
#### 3.1. HERSTELLUNG DES REFERENZENZYMS AUS *RAHNELLA AQUATILIS*

##### 3.1.1. Bioreaktorkultivierung von *Rahnella aquatilis* im 10 L-Maßstab

Zur Gewinnung einer Levansucrase als Vergleichsenzym wurde *Rahnella aquatilis* ATCC 33071 (DSM 4594) im 10 L-Maßstab kultiviert. Als Ausgangspunkt wurde ein definiertes Medium gewählt, das bei Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] 13,4 g Biofeuchtmasse aus 5 L (2,68 g/L) ergeben hatte. Zur Steigerung der Biofeuchtmassenausbeute wurden die in einer Medienoptimierung im Mikrotiterplattenmaßstab ermittelten Makro- und Spurenelemente zugegeben (Daten hier nicht dargestellt). Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tab. 1 (siehe Kap. 2.1) dargestellt.

##### Gewinnung von Biomasse

Aus der Bioreaktorkultivierung wurden 895 g Biofeuchtmasse, die Levan enthält, entsprechend 63,4 g Biotrockenmasse erhalten. Abb. 1 zeigt den Verlauf von Biotrockenmasse, Glucosekonzentration, Ammoniumkonzentration während der Bioreaktorkultivierung. Die maximale Wachstumsrate wurde zu  $\mu_{\max} = 0,6 \text{ h}^{-1}$  bestimmt, der apparente Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S \text{ app.}}$  zu 0,55 g Biotrockenmasse/g Glucose.



**Abb. 1:** Darstellung des Kultivierungsverlaufes von *Rahnella aquatilis* im Bioreaktor. 10 L-Ansatz, Temperatur: 30 °C, C-Quelle: Glucose (25 g/L), N-Quelle: Ammoniumsulfat (8 g/L), Induktion: Saccharose (2 g/L), Pfeil: 125 g Glucose und 10 g Saccharose zugegeben.

Die Gesamtausbeute von 63,4 g Biotrockenmasse ist deutlich geringer, als Abb. 1 erwarten lässt. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass die gravimetrische

Bestimmung der levanhaltigen Biotrockenmasse im 1 mL-Maßstab erfolgte. Für diese Ansatzgröße stehen im Arbeitskreis Zentrifugen mit höherer g-Zahl zur Verfügung. Mit den Zentrifugen die für die Zentrifugation von 10 L geeignet sind, konnte keine ausreichende Separation der Zellmasse vom Medium erreicht werden. In den stark trüben Zentrifugationsüberständen wurden sowohl Levan (mittels Dünnschichtchromatographie) als auch Zellen (mikroskopisch) nachgewiesen. Die Bildung eines Polysaccharidschleimes (Levan) führte zu einer Erhöhung der Viskosität der Kultur, so dass für die Zentrifugation kein ausreichender Dichteunterschied zwischen Zellen und dem umgebenden Medium bestand. Die Schwierigkeiten bei der Abtrennung der Biomasse sind demnach auf die Bildung des Polysaccharidschleimes zurückzuführen.

### **Gewinnung der Levansucrase**

Die Fructosyltransferaseaktivität wurde anhand des bei der Saccharoseumsetzung resultierenden molaren Verhältnisses von freier Glucose zu Fructose ermittelt. Glucose wird durch die Fructosyltransferaseaktivität freigesetzt, Fructose hingegen auf Akzeptorsaccharide transferiert. 1 nkat Fructosyltransferaseaktivität ist definiert als Stoffmengendifferenz aus der während der Biotransformation freigesetzten Glucose minus der freigesetzten Fructose in nmol pro Sekunde.

Im zellfreien Extrakt nach Ultraschallbehandlung war eine spezifische Fructosyltransferaseaktivität von 1,0 nkat/mg Protein, entsprechend einer Fructosyltransferaseaktivität von 354 nkat/g Biotrockenmasse festgestellt worden. Die Gesamtausbeute betrug daher bei 63,4 g Biotrockenmasse 22,4 µkat.

In der Literatur z. B. bei Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] wird Levansucraseaktivität ausschließlich als gesamthydrolytische Aktivität angegeben. Dabei entspricht 1 nkat der Freisetzung von 1 nmol Glucose aus Saccharose in 1 Sekunde. Zur Charakterisierung der Syntheseleistung einer Fructosyltransferase ist diese Angabe jedoch nicht geeignet.

Um die im Rahmen dieses Projektes ermittelten Daten jedoch auch mit den Angaben in der Literatur vergleichen zu können, wurde zusätzlich zur korrekten Fructosyltransferaseaktivität die gesamthydrolytische Aktivität ermittelt.

Die spezifische gesamthydrolytische Aktivität wurde zu 1,2 nkat/mg Protein (nach Bradford) bestimmt, die Aktivität bezogen auf Biotrockenmasse zu 425 nkat/g Biotrockenmasse bzw. 30 nkat/g Biofeuchtmasse. Bei 63,4 g Biotrockenmasse ergibt sich damit eine Gesamtausbeute von 27  $\mu$ kat. Die Zunahme des Volumens gegenüber dem Anfangsvolumen von 10 L war auf das Nachlegen von Glucose und Saccharose und die pH-Korrektur durch Zugabe von Natronlauge zurückzuführen.

Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] hatten im zellfreien Extrakt nach Ultraschallbehandlung eine spezifische Aktivität von 23,8 nkat/mg Protein (nach Lowry) erhalten. Ein direkter Vergleich der Daten kann nur unter Vorbehalt erfolgen, da verschiedene Verfahren zur Proteinbestimmung angewandt wurden. Die gesamthydrolytische Aktivität bezogen auf Biomasse wurde bei Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] zu 3000 nkat/g Biofeuchtmasse bestimmt. Insgesamt waren 40,1  $\mu$ kat gesamthydrolytische Aktivität aus 5 L Kultur erhalten worden.

### 3.1.2. *Versuche zur Verbesserung der Biomasseabtrennung vom Medium*

Aufgrund der festgestellten „Schleimbildung“ (siehe 3.1.1), die zu einer Erhöhung der Viskosität der Kultur und damit auch zu den Schwierigkeiten bei der Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation führte, sollte geprüft werden, ob durch die Zugabe verschiedener Hilfsstoffe eine Präzipitation der Zellmasse erreicht werden kann.

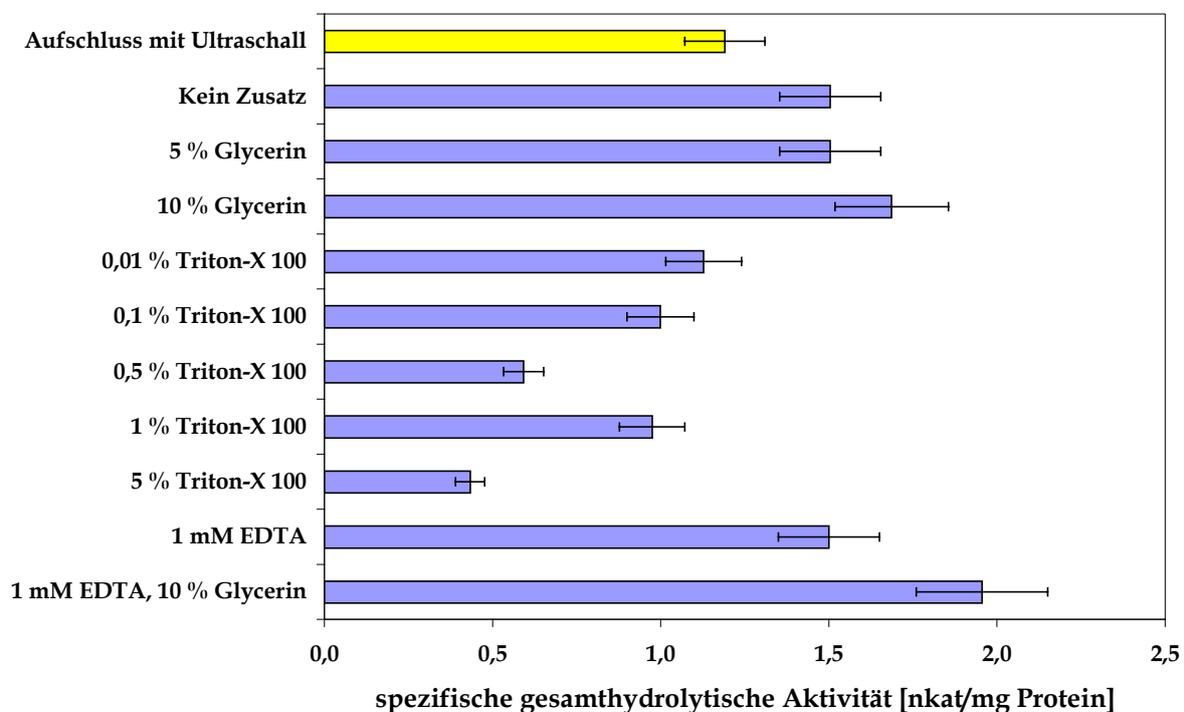
Verschiedene Zusätze (Ethanol, Ammoniumsulfat, Polyethylenglykol 2000 und 6000, Polypropylenglykol 400 und 1200, Harnstoff, Tetramethylharnstoff und Guanidinhydrochlorid) wurden zu einer Kultur von *Rahmella aquatilis* in HTSS-Flüssigmedium gegeben und nach dem Abzentrifugieren wurde die optische Dichte im Überstand bestimmt. Bei der Zugabe von Tetramethylharnstoff und Guanidinhydrochlorid konnte ab 2 mol/kg bzw. 1 mol/kg eine Abnahme der optischen Dichte beobachtet werden. Beide Substanzen wirken chaotrop und können nach Mayer *et al.* [Mayer, *et al.*, 1999] zur Ausfällung neutraler Exopolysaccharide verwendet werden. Gleichzeitig wirken sie jedoch auch denaturierend auf Proteine und sind daher nur bedingt für einen Einsatz als Zentrifugationshilfsstoff geeignet.

Da durch Zugabe der chaotropen Reagenzien dennoch keine befriedigende Präzipitation der Zellen erreicht werden konnte und bei den verwendeten Konzentrationen

bereits mit einer Denaturierung von Proteinen zu rechnen ist, erschien dieses Verfahren nicht geeignet, um die Schwierigkeiten bei der Abtrennung der Biomasse vom Medium zu überwinden.

### 3.1.3. Optimierung des Zellaufschlussverfahrens von *Rahnella aquatilis*

Da die ermittelte gesamthydrolytische Aktivität im Rohextrakt der Zellen aus der Bioreaktorkultivierung von *Rahnella aquatilis* im Vergleich zu der von Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] dargestellten so gering ausfiel (5 %) wurde versucht, das Aufschlussverfahren zu verbessern. Es wurden verschiedene Zusätze zum Aufschlusspuffer hinzugefügt, um die Aktivitätsausbeute zu steigern (siehe Abb.2).



**Abb.2: Einfluss verschiedener Zusätze auf die spezifische gesamthydrolytische Aktivität nach dem Zellaufschluss.** Dargestellt sind die spezifischen gesamthydrolytischen Aktivitäten nach Ultraschallaufschluss (gelb) und Nassvermahlung (blau). Die Ermittlung der gesamthydrolytischen Aktivität erfolgte über die enzymatische Bestimmung der freigesetzten Glucose. 1 nkat entspricht der Freisetzung von 1 nmol Glucose pro Sekunde. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford.

Die spezifische gesamthydrolytische Aktivität konnte bei Zusatz von 1 mM EDTA und 10 % Glycerin auf 1,95 nkat/mg Protein erhöht werden. Sie ist damit immer noch um den Faktor 12 niedriger als die von Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] an-

gegebene. Insgesamt bleibt abschließend festzustellen, dass die Ergebnisse von Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] nicht reproduziert werden konnten.

### 3.1.4. Partielle Aufreinigung der nativen Levansucrase aus *Rahnella aquatilis*

In Tab. 4 sind die Ergebnisse der in Kap. 2.5 beschriebenen Aufreinigung der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis* dargestellt.

**Tab. 4: Ergebnisse der partiellen Aufreinigung der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis***

	Protein- gehalt [mg/L]	gesamthydrolytische Aktivität			Aus- beute [%]	Auf- reinigungs- faktor
		abs. [nkat]	vol. [nkat/L]	spez. [nkat/mg Protein]		
Rohextrakt	6700	1990	10400	1,5	100	1
Ammonium- sulfatfällung 30-50 % Sät- tigung	6900	1990	29400	4,2	100	2,8
Entsalzen	4700	1400	14800	3,1	70	2,1
WAX	34	800	1100	31	40	21

abs.: absolut

vol.: volumetrisch

spez.: spezifisch

WAX: Anionenaustauscherchromatographie

Zur Konzentrierung der Levansucrase wurde zunächst eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die Levansucrase wurde vollständig in der 30-50% Sättigungsfraction gefällt (Ausbeute 100%). Bei der Entsalzung mittels Größenausschlusschromatographie und der anschließenden Anionenaustauscherchromatographie sank die Aktivitätsausbeute auf 40 % (gesamthydrolytische Aktivität). Der Aufreinigungsfaktor betrug 21. Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] hatten bei einem Aufreinigungsfaktor von ebenfalls 21 nach der ersten Anionenaustauscherchromatographie jedoch eine Ausbeute von 70 % erhalten.

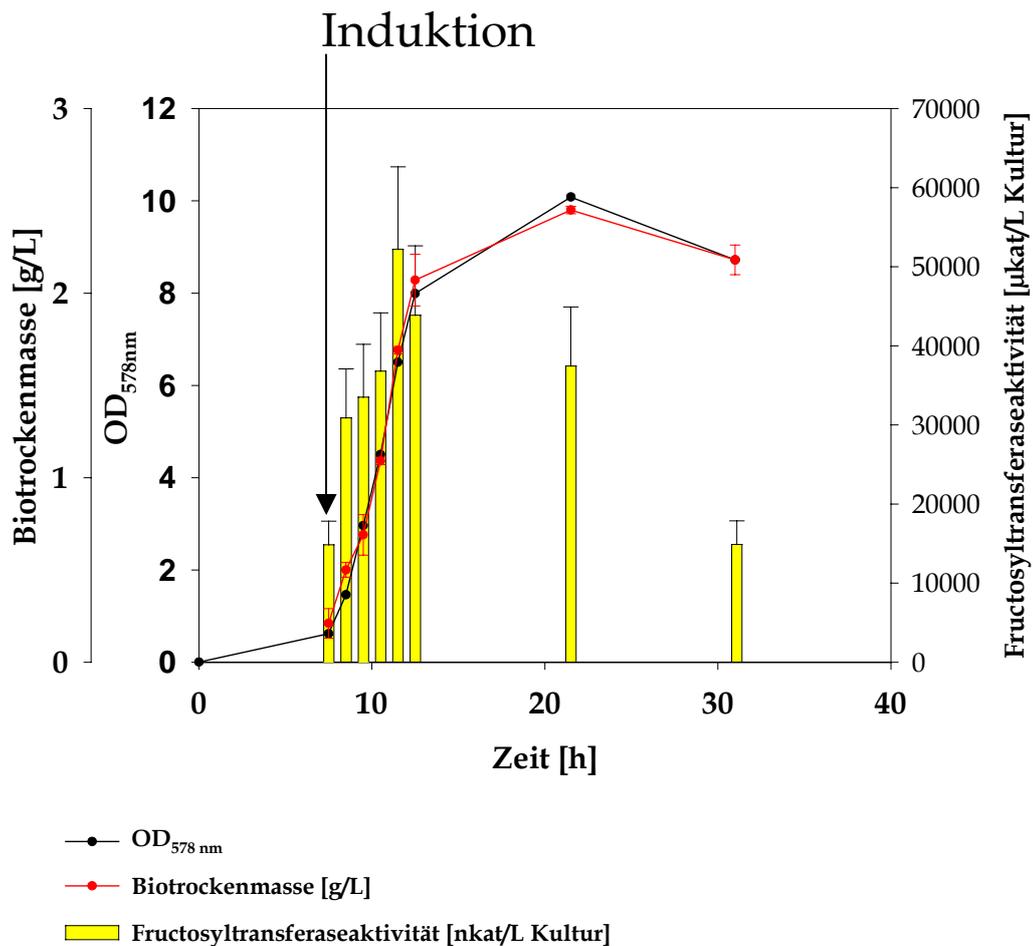
Wie in Kap. 3.1.1 beschrieben war keine vollständige Separation von Biomasse und Medium erreicht worden. Die stark trüben Zentrifugationsüberstände waren daher ebenfalls auf Fructosyltransferaseaktivität hin getestet worden. Die gesamthydrolytische Aktivität des Überstandes war um den Faktor 1,8 größer als die der durch Zentrifugation abtrennbaren Biomasse. Diese Aktivität im Überstand war jedoch mit dem unter 2.5 beschriebenen Aufreinigungsverfahren nicht zugänglich. Die im Polysaccharidschleim der Zentrifugationsüberstände enthaltenen Zellen ließen sich durch Nassvermahlung nicht aufschließen. Der Schleim verhinderte ebenfalls eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des erhaltenen Rohextraktes.

Daher wurde dieses Verfahren zur Gewinnung des Referenzenzym nicht weiter verfolgt.

### ***3.1.5. Heterologe Expression der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis* in *Escherichia coli* und Aufreinigung des Enzyms***

Um die Probleme bei der Produktion der Levansucrase mit ihrem natürlichen Wirt zu überwinden und das Enzym in großer Menge leicht zugänglich zu machen, sollte die Levansucrase heterolog in *Escherichia coli* exprimiert werden. Hierzu wurde das Levansucrasegen aus *Rahnella aquatilis* nach Song *et al.* [Song, *et al.*, 1998] in den Vektor pET-20b(+) (C-terminaler His-Tag, T7-Promotor) kloniert und in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE transformiert.

In Abb. 3 ist der Verlauf der Kultivierung des transformierten *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysEpET20b-LsrA dargestellt. Es wird deutlich, dass bereits vor der Induktion mit IPTG Levansucrase gebildet wurde.



**Abb. 3:** Verlauf der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)pLysEpET20b-LsrA zur heterologen Expression der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis*. Die Induktion erfolgte bei 7,5 h. Die Aktivitätsbestimmung bei 7,5 h wurde vor der Induktion durchgeführt.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, liegt der optimale Erntezeitpunkt bei 11,5 h, entsprechend 4 h nach der Induktion. Die Fructosyltransferaseaktivität pro Biotrockenmasse nimmt zwar von Beginn an ab, die Biotrockenmassekonzentration steigt aber bis 21 h an und damit ist die Gesamtaktivität nach 11,5 h am höchsten (52 µkat aus 1,7 g BTM).

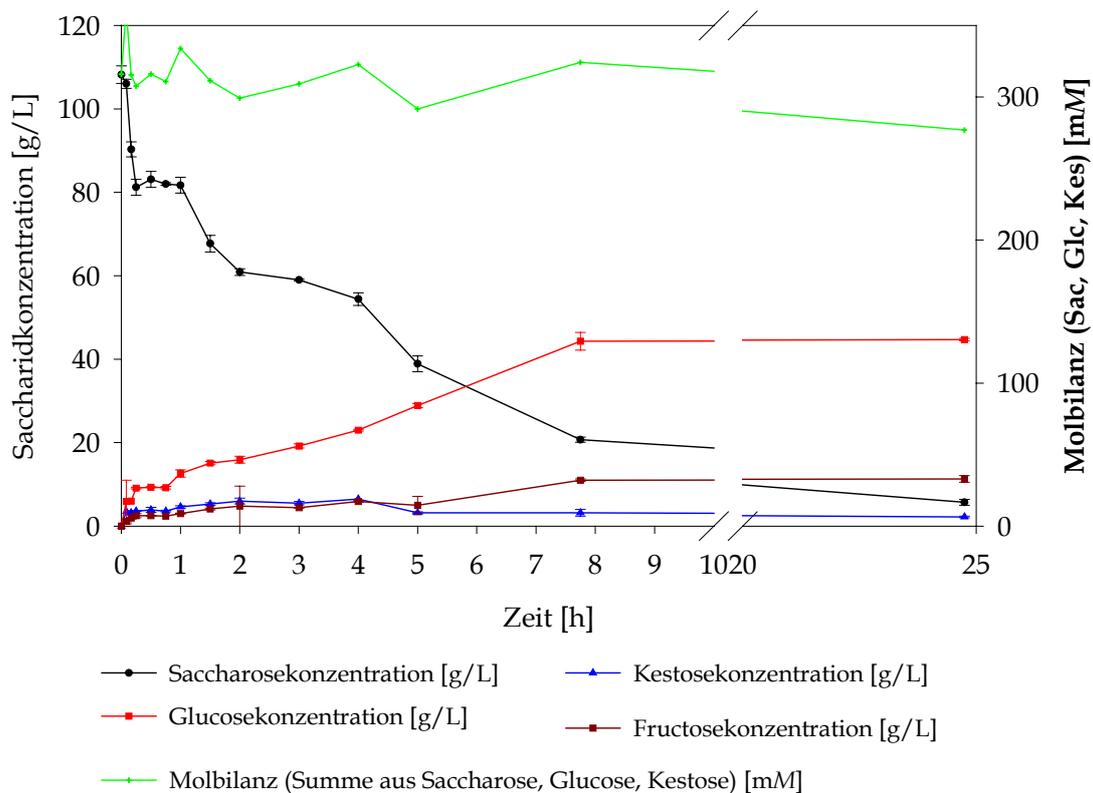
Eine Induktion konnte nicht in erwartetem Maße festgestellt werden. Eine Überexpression konnte nur bei einer von sieben Kultivierungen beobachtet werden (Daten hier nicht dargestellt).

Die Aufreinigung der Levansucrase aus dem Rohextrakt erfolgte über Nickelchelatfinitätschromatographie (Kap. 2.10). Die Aktivitätsausbeute (Fructosyltransfera-

seaktivität) lag bei 90 %. Der Reinigungsfaktor betrug 21. Das erhaltene Enzympräparat wies eine spezifische Fructosyltransferaseaktivität von 1,9  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  Protein auf. Damit steht das Referenzenzym in ausreichender Menge und Reinheit für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

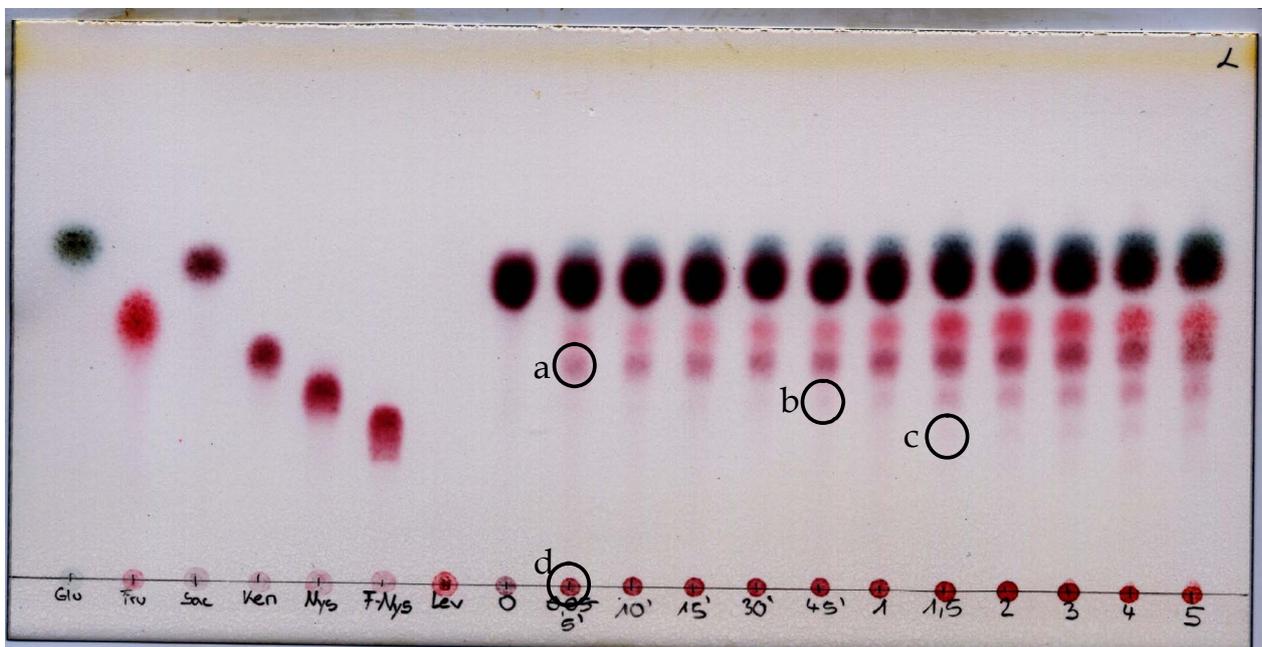
### 3.2. BIOTRANSFORMATIONEN MIT DER HETEROLOG EXPRIMIERTEN LEVANSUCRASE AUS *RAHNELLA AQUATILIS*

Mit der rekombinanten Levansucrase wurden Biotransformationsversuche analog denen von Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] und Kim *et al.* [Kim, *et al.*, 1998] durchgeführt, da die Levansucrase zur Herstellung von Fructooligosacchariden eingesetzt werden soll.



**Abb. 4: Verlauf der Biotransformation von Saccharose mit der rekombinanten Levansucrase.** (100 g/L Saccharose, pH 6,0, 30 °C, Fructosyltransferaseaktivität: 67 nkat/mL, 10 mL-Maßstab). Die Zuckerbestimmung erfolgte mittels HPLC.

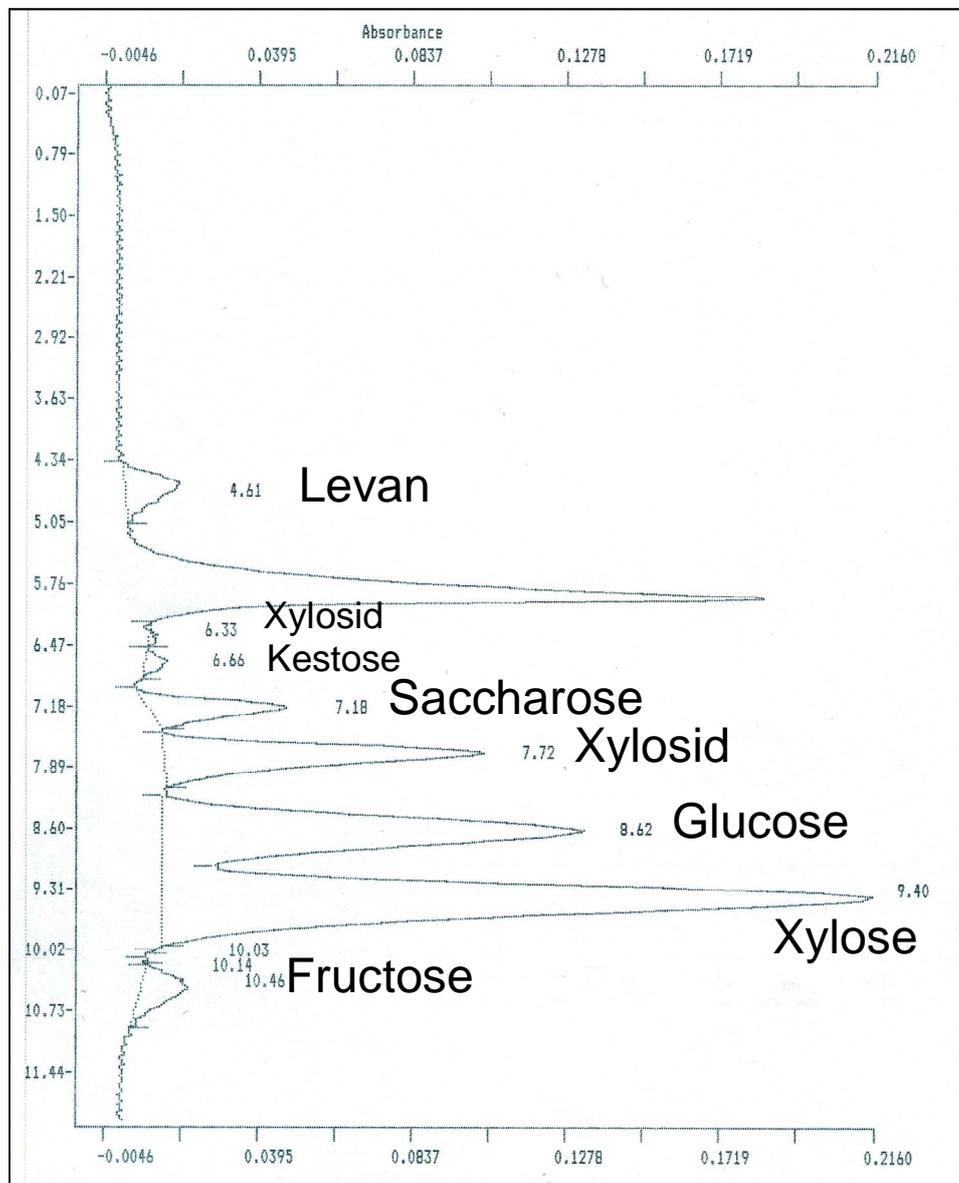
Abb. 4 zeigt, dass Saccharose nach 24,75 h zu 95 % umgesetzt ist. Die Glucosekonzentration erreicht ein Sättigungslevel bei 45 g/L. Die Kestosekonzentration durchläuft bei 2-4 h ein Maximum und nimmt dann wieder ab. Die Fructosekonzentration nimmt stetig zu. Die Abnahme der Kestosekonzentration ist auf zwei Effekte zurückzuführen. Zunächst entstehen durch Übertragung weiterer Fructoseeinheiten höhermolekulare Saccharide. Mit abnehmender Saccharosekonzentration kommt es zur Hydrolyse der gebildeten Fructane. Dies ist zusätzlich an der stetig zunehmenden Fructosekonzentration zu erkennen.



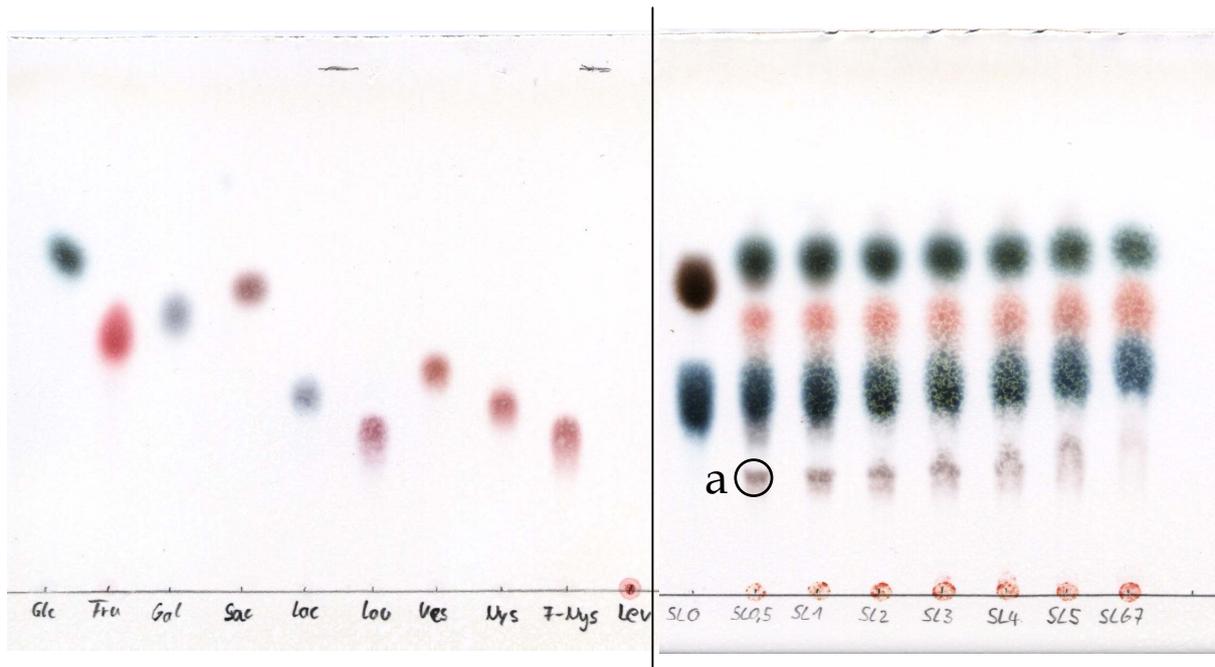
**Abb. 5: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Biotransformationsproben einer Umsetzung von Saccharose mit der rekombinanten Levansucrase.** (100 g/L Saccharose, pH 6,0, 30 °C, Fructosyltransferaseaktivität: 67 nkat/mL, 10 mL-Maßstab). Glc: Glucose, Fru: Fructose, Sac: Saccharose, Kes: 1-Kestose, Nys: 1-Nystose, F-Nys: 1-Fructosylnystose, Lev: Levan; 0, 5', 10', 15', 30', 45', 1, 2, 3, 4, 5 Probe nach 0, 5, 10, 15, 30, 45 min und nach 1, 2, 3, 4, 5 Stunden, a: Kestose (Trisaccharid), b: Nystose (Tetrasaccharid), c: Fructosylnystose (Pentasaccharid), d: Levan.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Proben zeigten, dass bereits nach 5 min Reaktionsdauer Levan gebildet wurde (siehe Abb. 5, d). Kestose wurde ebenfalls detektiert (siehe Abb. 5, a). Die Bildung von Nystose konnte nach 45 min, die Bildung von Fructosylnystose war nach 1,5 h zu beobachten (siehe Abb. 5, b bzw. c).

Zusätzlich wurden Biotransformationen mit den Akzeptoren Xylose bzw. Lactose unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Es wurden je 100 g/L Saccharose und 100 g/L Akzeptor eingesetzt.



**Abb 6: Beispielchromatogramm einer HPLC-Untersuchung einer Biotransformationsprobe mit Xylose als Akzeptor.** (100 g/L Saccharose, 100 g/L Xylose, pH 6,0, 30 °C, Fructosyltransferaseaktivität: 67 nkat/mL, 10 mL-Maßstab). Die Probe wurde nach 15 min entnommen.



**Abb. 7: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen einer Biotransformation mit Lactose als Akzeptor.** (100 g/L Saccharose, 100 g/L Lactose, pH 6,0, 30 °C, Fructosyltransferaseaktivität: 67 nkat/mL, 10 mL-Maßstab). Auf der linken Seite sind zum Vergleich ein Standardchromatogramm dargestellt. Glc: Glucose, Fru: Fructose, Gal: Galactose, Sac: Saccharose, Lac: Lactose, Lau: Lactulose, Kes: 1-Kestose, Nys: 1-Nystose, F-Nys: 1-Fructosylnystose, Lev: Levan; SL0, SL0,5, SL1, SL2, SL3, SL4, SL5, SL6,7 Probe nach 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 Stunden; a: Akzeptorprodukt.

In beiden Fällen konnte die Übertragung einer Fructoseeinheit auf Xylose (siehe Abb. 6) bzw. Lactose (siehe Abb. 7, a) mittels HPLC und dünnschichtchromatographisch detektiert werden. Eine seriöse Quantifizierung der gebildeten Saccharide war nicht möglich, da diese Substanzen als Referenzen nicht verfügbar waren.

### 3.3. ENTWICKLUNG EINES SCREENINGS NACH NICHT-LELOIR-FRUCTOSYLTRANSFERASEN

#### 3.3.1. Überlegungen zum Fructosyltransferase-Nachweis

Die bislang angewandten Methoden zur Bestimmung von Glycosyltransferaseaktivität beruhten auf der Quantifizierung des bei der Reaktion aus Saccharose freigesetzten Monosaccharidbausteins (Glucose oder Fructose). Aufgrund der bei einer Kultivierung oder in Zellaufschlusslösungen parallel ablaufenden Hydrolyse von Saccha-

rose durch Glycosidasen führt dieses Vorgehen zu fehlerhaften Aktivitätswerten. Um eine klare Abgrenzung zu Mikroorganismen mit ausschließlich hydrolytischer Aktivität zu ermöglichen, sollten die gebildeten Oligo- und Polysaccharide unmittelbar nachgewiesen werden. Dazu sollte Saccharose, die sowohl Fructosyldonor als auch Akzeptor ist, direkt kovalent an einen Träger gebunden werden. Bei einer nachfolgend ausgeführten Kultivierung der zu potenziellen Fructosyltransferaseproduzenten in einem saccharosehaltigen Medium in Gegenwart dieses Trägers sollten die gebildeten Oligo- und Polysaccharide partiell ebenfalls kovalent an den Träger gebunden vorliegen und damit leicht isolierbar und direkt nachweisbar sein.

### 3.3.2. Immobilisierung des Akzeptors Saccharose

Da es sich bei Saccharose um ein nicht-reduzierendes Disaccharid handelt, stehen für eine zerstörungsfreie, kovalente Bindung an ein Trägermaterial nur Hydroxygruppen zur Verfügung. Hierzu eignen sich als funktionelle Gruppen Epoxide oder Divinylsulfon [Hermanson, *et al.*, 1992].

Vorversuche mit dem kommerziell erhältlichen, epoxidierten Acryl-Polymer Eupergit C 250 L (Röhm GmbH), sowie mit Glas bzw. aktiviertem Polystyrol (Mikrotiterplatten von Corning GmbH) zeigten, dass eine Immobilisierung von Saccharose nicht in ausreichendem Maße für eine sichere Detektion eventuell gebildeter Produkte möglich war.

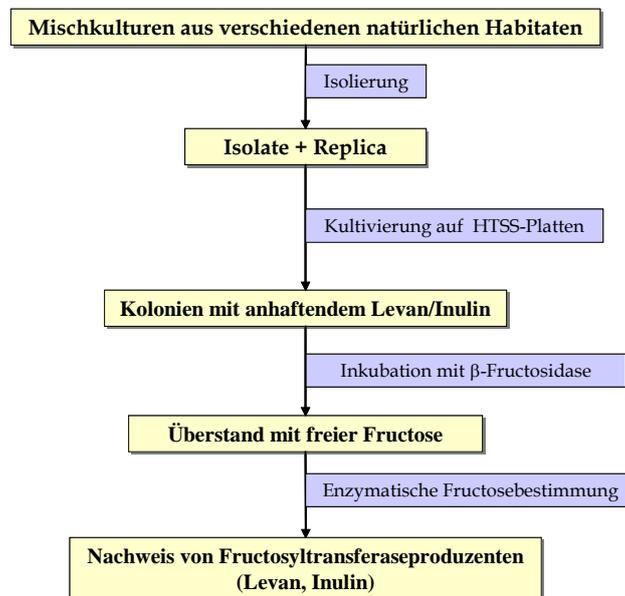
Aufgrund der Ergebnisse dieser sachlich kurz gefassten, aber doch sehr zeitintensiven, Vorversuche wurde die ursprünglich angedachte Strategie nicht weiter verfolgt und nach alternativen Ansätzen gesucht (siehe 3.3.3).

### 3.3.3. Screening auf Levan- und Inulinbildung

Die bei der Bioreaktorkultivierung (siehe 3.1.1) beobachtete Eigenschaft, dass das im Verlauf der Kultivierung gebildete Levan fest an den Zellen haftet und die von Vigants *et al.* [Vigants, *et al.*, 2003] vorgestellte enzymatische Levanhydrolyse zur Freisetzung der Zellen einer *Zymomonas mobilis*-Kultivierung, führten zur Entwicklung des in Abb. 8 dargestellten neuen Lösungsansatzes.

Für den gewünschten spezifischen Nachweis von Fructosiden werden die Zellen mit den anhaftenden Sacchariden mit einer  $\beta$ -Fructosidase behandelt. Durch eine derar-

tige Behandlung lassen sich Oligo- und Polysaccharide sowohl vom Inulin- als auch vom Levantyp hydrolysieren. Wenn im Überstand der  $\beta$ -Fructosidasebehandlung Fructose nachgewiesen werden kann, deutet das auf das Vorhandensein einer Fructosyltransferaseaktivität hin.



**Abb. 8: Neuer Lösungsansatz zum Nachweis von Fructosyltransferase-Aktivität**

Die Bestimmung der durch Hydrolyse freigesetzten Zucker erfolgte enzymatisch mit einem an das Mikrotiterplattenformat angepassten Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase/Phosphoglucose-isomerase-Verfahren (Testkit von r-biopharm).

Nach Vandamme und Derycke [Vandamme and Derycke, 1983] sind verschiedene Fructosidasen aus Hefen bekannt, die Inulin spalten. Für verschiedene  $\beta$ -Fructosidasen wurde beschrieben, dass die pH- und Temperaturoptima für die Spaltung von Inulin nicht identisch mit den Optima für die Hydrolyse von Saccharose sind. Daher wurden für die Verwendung einer  $\beta$ -Fructosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* geeignete Reaktionsbedingungen (pH-, Temperaturoptimum, Temperaturstabilität) ermittelt.

Aus den ermittelten Daten wurden die Reaktionsbedingungen für die Verifizierung des Assay-Verfahrens mit den Referenzorganismen *Rahnella aquatilis*, *Acetobacter diazotrophicus* – als Positivproben – und *Escherichia coli* DH 5 $\alpha$  – als Negativprobe zu pH 4,6, 60 °C und 14 h festgelegt.

Zur Bestätigung der in Abb. 8 dargelegten Strategie wurden zwei fructosyltransferaseproduzierende Mikroorganismen und ein fructosyltransferase-negativer Stamm dem Screening-Verfahren unterzogen.

**Tab. 5: Zuckergehalte nach  $\beta$ -Fructosidasebehandlung von Zellmasse der Referenzorganismen**

	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	<i>Escherichia coli</i> DH 5 $\alpha$
<b>mg Glucose/ g Biotrockenmasse</b>	n.n.	n.n.	< 1
<b>mg Fructose/ g Biotrockenmasse</b>	69	31	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Bei den levansucrase-positiven Stämmen *Rahnella aquatilis* und *Acetobacter diazotrophicus* konnte nach  $\beta$ -Fructosidasebehandlung nur Fructose und keine Glucose nachgewiesen werden. Bei *Escherichia coli* DH 5 $\alpha$  war keine Fructose detektierbar (siehe Tab.5).

Dies bedeutet, dass der in Abb. 8 dargestellte Screening-Assay für das Screening nach neuen Fructosyltransferaseproduzenten eingesetzt werden kann.

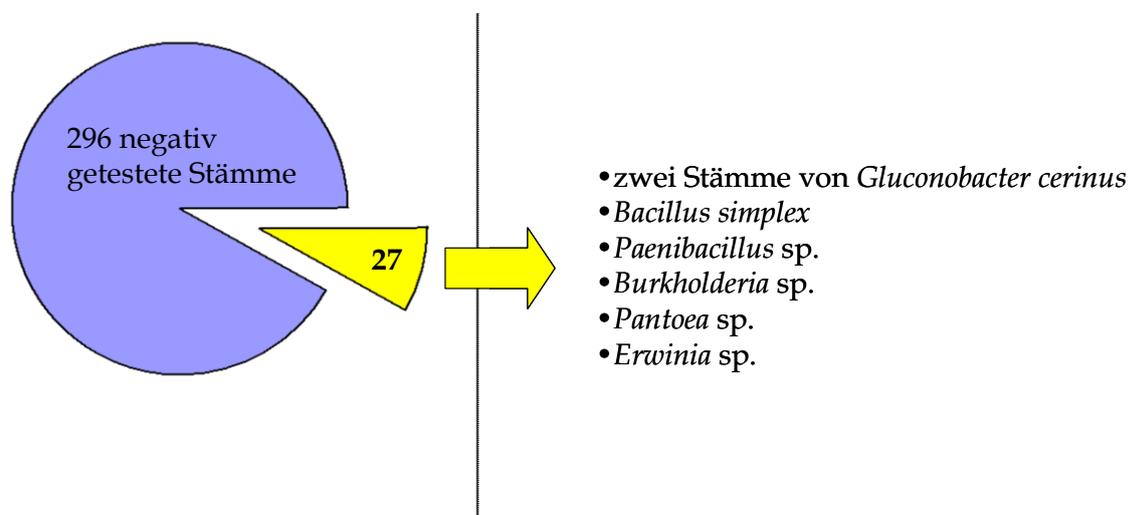
### 3.4. SCREENING NACH FRUCTOSYLTRANSFERASE-PRODUZENTEN

Es wurde eine Stammsammlung (Glycerinkulturen) von insgesamt 323 Stämmen, die aus verschiedenen Habitaten (saccharosehaltigen Pflanzenteilen, aus Bodenproben und aus fermentierten Lebensmitteln) erhalten wurden, angelegt. Die Isolate wurden mittels des in Abb. 8 dargestellten Screening-Assays auf Fructosyltransferaseaktivität hin untersucht.

Bei 27 Stämmen wurde Fructosyltransferaseaktivität festgestellt (siehe Abb. 9).

Mittels Sequenzierung der 16S rDNA wurden 14 Isolate folgenden Gattungen zugeordnet:

zwei Stämme von *Gluconobacter cerinus* (1471 bzw. 1474 Basenpaare, 99 % Übereinstimmung), *Bacillus simplex* (1538 Basenpaare, 99 % Übereinstimmung), *Paenibacillus* sp. (1030 Basenpaare, 94 % Übereinstimmung), *Burkholderia* sp. (1035 Basenpaare, 97 % Übereinstimmung), *Pantoea* sp. (1044 Basenpaare, 97 % Übereinstimmung) und *Erwinia* sp. (1200 Basenpaare, 96 % Übereinstimmung).



**Abb. 9: Ergebnis des Screenings nach mikrobiellen Fructosyltransferaseproduzenten.** Insgesamt wurden 323 Isolate untersucht, davon waren 27 fructosyltransferasepositiv (gelb).

Von denjenigen Stämmen, die bis März 2003 im Verlauf des Screenings als Fructosyltransferase-Produzenten identifiziert worden waren, wurden neun zur Verifizierung der Screeningergebnisse in HTSS-Flüssigkultur angezogen. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der mit zellfreien Extrakten durchgeführten Bio-transformationsversuche zeigte in allen Fällen die Bildung von Levan und bei drei der untersuchten Proben konnte Fructooligosaccharidbildung bis zu einem Polymerisierungsgrad von fünf (Kestose, Nystose, Fructosylnystose) festgestellt werden. Das *Bacillus simplex*-Isolat wies ein abweichendes Produktspektrum auf. Hier waren Kestose, Nystose und Fructosylnystose nicht erkennbar. Es konnte nur anhand der Färbung der Substanzflecken festgestellt werden, dass es sich bei den gebildeten Produkten um Fructoside handelt.

Zur Auswahl desjenigen Isolates, dessen Fructosyltransferase näher untersucht werden sollte, wurden drei Beurteilungskriterien herangezogen: die spezifische Fructosyltransferase-Aktivität in den zellfreien Extrakten, das Produktspektrum und die Sicherheitseinstufung des Mikroorganismus.

Die Quantifizierung der Fructosyltransferaseaktivitäten in den zellfreien Extrakten ergab für einen der *Gluconobacter cerinus*-Stämme eine höhere spezifische Fructosyltransferaseaktivität (1,7 nkat/mg Protein) als für den Vergleichstamm *Rahnella aquatilis* (1,2 nkat/mg Protein). Daher wurde dieser Stamm für weitere Untersuchungen ausgewählt, obwohl die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Biotransformationsprodukte vorerst keine Besonderheit aufwies.

Ein weiterer Grund für Auswahl von *Gluconobacter cerinus* ist dessen Einstufung in die Risikogruppe L1.

### 3.5. GEWINNUNG DER LEVANSUCRASE AUS *GLUCONOBACTER CERINUS*

Zur Gewinnung der Fructosyltransferase aus *Gluconobacter cerinus* sollte der Organismus im 4 L-Maßstab kultiviert werden.

Vorversuche in Schüttelkolben hatten gezeigt, dass die Fructosyltransferase aus *Gluconobacter cerinus* zwar in geringem Maße immer gebildet wird, dass sie jedoch durch das Vorhandensein ihres Substrates Saccharose zusätzlich induziert werden kann (Daten hier nicht dargestellt.).

Glucose und Mannit wurden in den von der DSMZ für die Kultivierung von *Gluconobacter cerinus* empfohlenen Medien als Kohlenstoffquelle vorgeschlagen. Daher wurden diese Substanzen in Bioreaktorkultivierungen im 4 L-Maßstab als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

**Tab. 6: Vergleich der Bioreaktorkultivierungen von *Gluconobacter cerinus*. Die Kultivierungsbedingungen sind in Kap. 2.2 beschrieben.**

	Kultivierung 1 <sup>1</sup> : 50 g Glucose/L, 2 g Saccharose/L	Kultivierung 2: 50 g Mannit/L, 2 g Saccharose/L	Kultivierung 3: 50 g Mannit/L, 20 g Saccharose/L
Wachstumsrate [h <sup>-1</sup> ]	0,18	0,31	0,21
Ausbeutekoeffizient [g BTM/g Kohlenstoffquelle]	0,005	0,11	0,07
Biotrockenmasse- konzentration [g BTM/L]	0,26	5,6	4,9
Fructosyltransfera- seaktivität [nkat/g BTM]	13 500	7 000	1 600
Fructosyltransfera- seaktivität [nkat/L Kulturüberstand]	n.n.	34 000	30 000
Anteil extrazelluläre Fructosyltransferase [%]	0 %	47 %	79 %
Fructosyltransferase Absolut [μkat]	12 (aus 3,5 L)	220 (aus 3 L)	114 (aus 3 L)

<sup>1</sup>: Es wurden nach 12,8 h nochmals 50 g/L Glucose und 2 g/L Saccharose zugegeben.

n.n.: nicht nachweisbar.

Wie aus Tab. 6 ersichtlich ist, wurde in Kultivierung 1 die höchste zellgebundene Aktivität erhalten. Die Biomasseausbeute ist mit  $Y_{X/S}$  deutlich niedriger als der Wert, der für eine Kultivierung mit Glucose als Kohlenstoffquelle zu erwarten gewesen wäre (0,5 g Biotrockenmasse/g Glucose [Crueger and Crueger, 1989]).

Daher wurde Mannit als alternative Kohlenstoffquelle gewählt. Bei einer Saccharosekonzentration von 2 g/L wurde eine höhere Gesamtfructosyltransferaseaktivität von 220 μkat erhalten (Tab. 6). Der Anteil an extrazellulärer Aktivität war bei einer Saccharosekonzentration von 20 g/L um den Faktor 1,7 höher.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Kultivierung (geringe Ausbeutekoeffizienten) und des zeitlichen Aufwandes zur Medienoptimierung wurden diese Ergebnisse erst

vor kurzem erhalten. Daher konnte eine weitergehende Charakterisierung der erhaltenen Fructosyltransferase bisher noch nicht durchgeführt werden.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. GEWINNUNG DES VERGLEICHSENZYMS AUS *RAHNELLA AQUATILIS*

#### Biomassegewinnung:

Mit der Bioreaktorkultivierung konnte die Biofeuchtmassenausbeute im Vergleich zu Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] um den Faktor 30 gesteigert werden. Auf Grund der Bildung von Levan war die Abtrennung der Biomasse vom Medium erschwert, so dass lediglich 63,4 g levanenthaltende Biotrockenmasse erhalten wurde. Für die schlechte Trennung von Biomasse und Medium ist die Bildung des Polysaccharides Levan verantwortlich, da die Bildung dieses „Schleimes“ zu einer Viskositätserhöhung führte, welche die Zentrifugation störte. Verschiedene Salze, chaotrope Reagenzien und organische Lösungsmittel wurden auf ihre Eignung hin geprüft, die Zentrifugierbarkeit zu erleichtern. Nach Mayer *et al.* [Mayer, *et al.*, 1999] können ungeladene Polysaccharide, zu denen auch Levan gehört, nicht durch Salze präzipitiert werden. Chaotrope Reagenzien wie Guanidinhydrochlorid hingegen verringern die Viskosität und erleichtern damit die Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation. Dabei ist zu bedenken, dass bei den einzusetzenden Konzentrationen ( $> 1$  mol/kg Kultur) bereits Proteine denaturiert werden können.

#### Gewinnung der Levansucrase:

Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] hatten im zellfreien Extrakt nach Ultraschallbehandlung eine spezifische Aktivität von 24,3 nkat/mg Protein (nach Lowry) erhalten. Bei der hier durchgeführten Bestimmung wurden nur 1,2 nkat/mg Protein (nach Bradford) erzielt. Ein direkter Vergleich der Daten kann nur unter Vorbehalt erfolgen, da u.a. verschiedene Verfahren zur Proteinbestimmung angewandt wurden. Zur Erhöhung der Ausbeute an Levansucraseaktivität wurde die Verwendung eines anderen Aufschlussverfahrens (Kugelmühle), sowie der Zusatz stabilisierender Substanzen zum Aufschlusspuffer untersucht. Bei einem Aufschluss mit der Kugelmühle unter Zusatz von 1 mM EDTA und 10 % Glycerin wurde die spezifische gesamthydrolytische Aktivität zwar auf 1,95 nkat/mg Protein gesteigert. Dies ent-

spricht dennoch nur 5 % der von Ohtsuka *et al.* [Ohtsuka, *et al.*, 1992] erzielten Aktivität.

Die Ammoniumsulfatfällung und anschließende Anionenaustauscherchromatographie führten nicht zu einer befriedigenden Aufreinigung (maximaler Aufreinigungsfaktor 21) und Ausbeute (maximal 40 %).

Eine Erklärung dafür, dass die Zellen durch Nassvermahlung nicht aufzuschließen waren und dass eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung nicht möglich war, ist nach Mayer *et al.* [Mayer, *et al.*, 1999] darin zu sehen, dass Polysaccharide Zellen vor Scherkräften schützen und ungeladene Polysaccharide wie Levan zudem durch Salze nicht präzipitiert werden können.

Zur Überwindung dieser Hindernisse gibt es zwei unterschiedliche Ansätze.

Eine Möglichkeit stellt die enzymatische Hydrolyse des Levans dar, wie von Vigants *et al.* [Vigants, *et al.*, 2003] gezeigt. Die Autoren verwendeten ein  $\beta$ -Fructosidase-Präparat zur Hydrolyse des Levans bei einer Kultivierung von *Zymomonas mobilis*.

Die andere Alternative ist die heterologe Expression des Levansucrasegens in einem Wirtsorganismus, so dass Saccharose nicht zur Induktion des Enzyms erforderlich ist und somit die Schleimbildung während der Kultivierung nicht auftritt.

Im vorliegenden Projekt wurde eine heterologe Expression des Levansucrasegens aus *Rahnella aquatilis* in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE durchgeführt. Dies ergab eine spezifische Fructosyltransferaseaktivität von 90 nkat/mg Protein im Rohextrakt. Dies entspricht einer gesamthydrolytischen Aktivität von 128 nkat/mg Protein. Im Falle der Kultivierung von *Rahnella aquatilis* wurden nach Aufschlussoptimierung im Vergleich dazu nur 1,95 nkat/mg Protein erreicht. Auch die Aufreinigung des rekombinanten Enzyms war deutlich effizienter (Aufreinigungsfaktor 21, bei einer Ausbeute von 90 %) und aufgrund des angefügten His-Tags erheblich einfacher (nur ein Aufreinigungsschritt).

Kim *et al.* [Kim, *et al.*, 1998] hatten das Levansucrasegen aus *Rahnella aquatilis* ATCC 33071 in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  exprimiert, jedoch keine Angaben über die gefundene Aktivität im Rohextrakt gemacht. Zum Vergleich soll die von Kim *et al.* [Kim, *et al.*, 2003] vorgestellte heterologe Expression des Levansucrasegens aus *Rahnella aquatilis*

ATCC 15552 herangezogen werden. Die Autoren hatten 16 nkat gesamthydrolytische Aktivität/mg Protein im Rohextrakt erhalten.

#### **4.2. SCREENING NACH NEUEN MIKROBIOELLEN FRUCTOSYLTRANSFERASE-PRODUZENTEN**

Die erste Lösungsstrategie - das Vorlegen einer immobilisierten Saccharose (als Fructosylakzeptor), um auf diesem Weg immobilisierte Saccharide zu erhalten - war nicht realisierbar, da u.a. kein Trägermaterial gefunden wurde, auf dem Saccharose in ausreichendem Maße kovalent gebunden werden konnte. Daher wurde aus den Erfahrungen mit den Kulturen von *Rahnella aquatilis* die unter 3.3.3 beschriebene neue Strategie - enzymatische Hydrolyse der an den Zellen haftenden Polyfructoside und enzymatischer Nachweis freigesetzter Zucker im Überstand - entwickelt.

Von 323 untersuchten Isolaten wurden 27 als Fructosyltransferaseproduzenten identifiziert. Dies entspricht 8,4 %. Die Überprüfung der Isolate mittels dünnschichtchromatographischer Untersuchung der Saccharoseumsetzungsprodukte zeigte, dass es sich bei den positiv getesteten Stämmen tatsächlich um Fructosyltransferaseproduzenten handelte. Die unter 3.3.3 beschriebene neue Screeningstrategie ist daher als erfolgreich anzusehen und das Screening wurde nach der Auswahl von *Gluconobacter cerinus* abgeschlossen.

Eine weitergehende Diskussion der Screeningergebnisse ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sinnvoll, da bislang kein vergleichbares Screeningverfahren beschrieben wurde. Zudem liegen noch keine ausreichenden Daten über die Charakterisierung der Fructosyltransferasen der neu gefundenen Fructosyltransferaseproduzenten vor.

#### **4.3. GEWINNUNG DER LEVANSUCRASE AUS *GLUCONOBACTER CERINUS***

*Gluconobacter* sp. werden schon lange für biotechnologische Prozesse verwendet, z. B. zur Herstellung von Sorbit [Macauley, et al., 2001]. Die Kultivierung zum Erhalt ho-

her Biotrockenmassekonzentrationen bereitet jedoch insbesondere in chemisch-definierten Medien Schwierigkeiten [Wethmar and Deckwer, 1999]. Dies zeigten auch die geringen Ausbeutekoeffizienten bei der Kultivierung von *Gluconobacter cerinus* (siehe Tab. 6). Nach Deppenmeier *et al.* [Deppenmeier, *et al.*, 2002] können *Gluconobacter* sp. eine Vielzahl von Kohlenhydraten und verwandten Substanzklassen als Kohlenstoffquelle nutzen. Die Oxidation ist jedoch unvollständig und die Produkte werden ins Medium abgegeben.

*Gluconobacter cerinus* wurde bislang nicht als Fructosyltransferaseproduzent beschrieben. Eliashvili [Eliashvili, 1981] hatte bei einer Kultivierung eines *Gluconobacter oxydans*-Stammes nach Medienoptimierung mit Mannit als Kohlenstoffquelle eine gesamthydrolytische Aktivität von 74  $\mu\text{kat/L}$  im Kulturüberstand erzielt.

Derartig hohe gesamthydrolytische Aktivitäten konnten im Rahmen dieses Projektes bei der Kultivierung von *Gluconobacter cerinus* bisher nicht erzielt werden (maximal 13  $\mu\text{kat/g}$  BTM und 34  $\mu\text{kat/L}$  bei Kultivierung mit 50 g Mannit/L und 2 g Saccharose/L). Bei der Kultivierung von *Rahnella aquatilis* waren sogar nur 1,7  $\mu\text{kat}$  gesamthydrolytische Aktivität/g BTM erhalten worden.

Ein Vergleich der gesamthydrolytischen Aktivitäten hat aber wie unter 3.1.1 beschrieben zur Charakterisierung der Syntheseleistung wenig Aussagekraft.

Mit 73  $\mu\text{kat/L}$  Fructosyltransferaseaktivität von *Gluconobacter cerinus* (50 g Mannit/L und 2 g Saccharose/L) bzw. 38  $\mu\text{kat/L}$  Fructosyltransferaseaktivität aus 3 L Kultur (50 g Mannit/L und 20 g Saccharose/L), wobei 79 % extrazellulär vorliegen, steht ausreichend Enzym für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Bei der unter 3.1.1 beschriebenen Kultivierung von *Rahnella aquatilis* waren 2,2  $\mu\text{kat}$  aus 10 L erhalten worden. Bei der rekombinanten Produktion der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis* in *Escherichia coli* wurden 130  $\mu\text{kat/L}$  Fructosyltransferaseaktivität erhalten. Dementsprechend wird klar, dass die Kultivierung von *Gluconobacter cerinus* eine um den Faktor 33 höhere Aktivitätsausbeute ergab als bei der Kultivierung des Wildstammes von *Rahnella aquatilis*. Bei der rekombinanten Produktion der Levansucrase aus *Rahnella aquatilis* in *Escherichia coli* konnte eine annähernd doppelt so hohe Aktivitätsausbeute wie bei der Kultivierung von *Gluconobacter cerinus* erzielt werden.

## 5. FAZIT

Die Bioreaktorkultivierung des Referenz-Fructosyltransferaseproduzenten von *Rahnella aquatilis* war hinsichtlich des Wachstums erfolgreich, um ausreichend Biomasse für die Aufreinigung der Levansucrase zu erhalten. Problematisch stellte sich die Abtrennung der Biomasse vom Medium dar, was auf die Bildung eines Polysaccharidschleimes zurückzuführen war. Es zeigte sich, dass das gebildete Levan so fest an den Zellen haftete, dass es beim Waschen der Zellen nicht ohne weiteres entfernt werden konnte. Die nachfolgende Aufreinigung wurde dadurch gleichermaßen erschwert. Die heterologe Expression des Levansucrasegens in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE gewährleistete, dass das Referenzenzym in ausreichender Menge und Reinheit für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht.

Der erste Lösungsansatz der Screening-Entwicklung, das Vorlegen einer immobilisierten Saccharose, um auf diesem Weg immobilisierte Produkte zu erhalten, war nicht realisierbar, da u. a. kein Trägermaterial gefunden wurde, auf dem Saccharose in ausreichendem Maße kovalent gebunden werden konnte. Aus den Erfahrungen mit den Kulturen von *Rahnella aquatilis* wurde die unter 3.3.3 beschriebene neue Strategie - enzymatische Hydrolyse der an den Zellen haftenden Polyfructoside und enzymatischer Nachweis freigesetzter Zucker im Überstand - entwickelt. Mit der Anwendung des Screening-Assays auf die fructosyltransferase-positiven Stämme *Rahnella aquatilis* und *Acetobacter diazotrophicus* sowie den fructosyltransferase-negativen Stamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Assay zur Detektion von Fructosyltransferaseproduzenten geeignet ist. Es wurden im Screening 323 Stämme auf Fructosyltransferaseaktivität hin getestet und dabei waren 27 fructosyltransferase-positive Stämme gefunden worden.

Aus den 27 Isolaten war *Gluconobacter cerinus* für weitere Untersuchungen aufgrund seiner im Vergleich zum Referenzenzym aus *Rahnella aquatilis* hohen Fructosyltransferaseaktivität ausgewählt worden. Problematisch gestaltete sich zunächst die Kultivierung zur Gewinnung einer für weitere Untersuchungen ausreichenden aktiven

Biomasse bzw. Fructosyltransferaseaktivität, so dass mit der Aufreinigung und Charakterisierung bisher noch nicht begonnen werden konnte.

Das Forschungsthema wird hinsichtlich der Aufreinigung und Charakterisierung der Fructosyltransferase aus *Gluconobacter cerinus* weitergeführt.

## 6. ÖFFENTLICHKEITSARBEIT

Teile der Ergebnisse, die im Rahmen dieses Projektes erhalten wurden, sind als Tagungsbeiträge (Poster) veröffentlicht worden:

Koslik, H.; Fischer, L.: New glycosyltransferases for food technological applications.

In: Chemie Ingenieur Technik (Posters. B1.10). S. 672, (74(5)) DECHEMA-Tagung, Wiesbaden, 11.06.-13.06.2002

Koslik, H., Lutz-Wahl, S., Fischer, L.: New fructosyltransferases for potential industrial applications.

In: Tagungsband. 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Olomouc, Tschechien, 28.06.-03.07.2003.

Kopien der Poster befinden sich im Anhang.

Publikationen in Peer-Review Journalen (in Vorbereitung):

- 1) Semi-automated screening for new microbial fructosyltransferase producers
- 2) Production and partial characterization of a new fructosyltransferase from *Gluconobacter cerinus*

Die Summe der Ergebnisse dieses Projektes soll im Rahmen einer Dissertation veröffentlicht werden.

## 7. LITERATUR

- Ameyama, M. und O. Adachi (1986) Cell growth promoting agent. Ep patent 174155.
- Calazans, G. M. T., C. E. Lopoos, R. M. O. C. Lima and F. P. de Franca (1997) Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters* **19** (1), 19-21.
- Crueger, W. und A. Crueger (1989) *Biotechnologie: Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*, 3. Aufl. Oldenbourg, München, BRD.
- Deppenmeier, U., M. Hoffmeister und C. Prust (2002) Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60** (3), 233-242.
- Elisashvili, V. I. (1981) Investigation of pathways for regulation of levansucrase biosynthesis in *Gluconobacter oxydans*. *Mikrobiologiya* **50** (1), 96-101.
- Hermanson, G. T., A. Krishna Mallia und P. K. Smith (1992) *Immobilized affinity ligand techniques*, 1. Aufl. Academic Press, San Diego, USA.
- Kim, H., H.-E. Park, M.-J. Kim, H. G. Lee, J.-Y. Yang und J. Cha (2003) Enzymatic characterization of a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis* ATCC 15552. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **13** (2), 230-235.
- Kim, M. G., J. W. Seo, K.-B. Song, C.-H. Kim, B. H. Chung und S.-K. Rhee (1998) Levansucrase and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Biotechnology Letters* **20** (4), 333-336.
- Macauley, S., B. McNeil und L. M. Harvey (2001) The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* **21** (1), 1-25.
- Mayer, C., R. Moritz, C. Kirschner, W. Borchard, R. Maibaum, J. Wingender und H. C. Flemming (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules* **26** (1), 3-16.
- Nam, S.-W., H.-J. Yun, J.-H. Ahn, K.-H. Kim und B.-W. Kim (2000) Production of fructosylxyloside by the new fructosyltransferase from *Bacillus macerans* EG-6. *Biotechnology Letters* **22** (15), 1243-1246.
- Ohtsuka, K., S. Hino, T. Fukushima, O. Ozawa, T. Kanematsu und T. Uchida (1992) Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56** (9), 1373-1377.
- Osborn, H. und T. Khan (2000) *Oligosaccharides Their synthesis and biological roles*. Oxford University Press, Oxford, Großbritannien.

Paulsen, H. (1996) Twenty five years of carbohydrate chemistry; an overview of oligosaccharide synthesis. *Frontiers in Natural Product Research* **1** (Modern Methods in Carbohydrate Synthesis), 1-19.

Schlegel, H. G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Aufl. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, BRD.

Song, K.-B., J.-W. Seo, M.-G. Kim und S.-K. Rhee (1998) Levansucrase of *Rahnella aquatilis* ATCC33071: gene cloning, expression, and levan formation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **864** (Enzyme Engineering XIV), 506-511.

Tesmann, H., J. Kahre, H. Hensen und B. A. Salka (1997) Alkyl Polyglycosides in Personal Care Products, p. 71-98. In K. Hill, W. von Rybinski, G. Stoll (Hrsg.), *Alkyl Polyglycosides Technology, Properties and Applications*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, BRD.

Vandamme, E. J. und D. G. Derycke (1983) Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* **29**, 139-176.

Vigants, A., S. P. Marx, R. Linde, S. Ore, M. Bekers, I. Vina und H.-G. Hicke (2003) A novel and simple method for the purification of extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Current Microbiology* **47** (3), 198-202.

Wethmar, M. und W. D. Deckwer (1999) Semisynthetic culture medium for growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Techniques* **13** (4), 283-287.

Yamamoto, Y., Y. Takahashi, M. Kawano, M. Lizuka, T. Matsumoto, S. Saeki und H. Yamaguchi (1999) In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **10** (1), 13-18.

Yun, J. W. (1996) Fructooligosaccharides-occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology* **19** (2), 107-117.

## **8. ANHANG**

Anhang 1: Koslik, H.; Fischer, L.: New glycosyltransferases for food technological applications.

In: Chemie Ingenieur Technik (Posters. B1.10). S. 672, (74(5)) DECHEMA-Tagung, Wiesbaden, 11.06.-13.06.2002

Anhang 2: Koslik, H., Lutz-Wahl, S., Fischer, L.: New fructosyltransferases for potential industrial applications.

In: Tagungsband. 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Olomouc, Tschechien, 28.06.-03.07.2003.