

Produktion funktioneller Weizenspeicherproteine in transgenen Stämmen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

vorgelegt von
Dipl. Ing. Ingo Bauer
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozeßwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. D. Knorr

1. Bericht: Prof. Dr. Dr. e.h. F. Meuser

2. Bericht: Prof. Dr.-Ing. U. Stahl

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 22.09.2005

Berlin 2006

D83

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. e.h. Friedrich Meuser für die Betreuung und Förderung dieser Arbeit und für die wertvollen Berufserfahrungen, die ich während meiner Zeit am Institut für Getreidetechnologie erwerben konnte.

Herrn Prof. Dietrich Knorr danke ich für die Übernahme des Vorsitzes und Herrn Prof. Ulf Stahl für die Bereitschaft als Gutachter im Promotionsausschuß mitzuwirken.

Ich danke den Mitarbeitern der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in Garching Herrn Dr. Herbert Wieser und Herrn Dr. Rolf Kiefer sowie Frau Dr. Erika Hinzmann vom Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Berlin für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Analysen und der Mikrobackversuche.

Bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Getreidetechnologie möchte ich mich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dipl. Braumeister Philipp Brokamp für die hervorragende Arbeit die er als technischer Assistent bei der Durchführung der Arbeiten geleistet hat und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während unserer gemeinsamen Zeit am Institut für Getreidetechnologie.

Ebenfalls danke ich den ehemaligen Diplomanden Frau Dipl. Ing. Nikola Arends und Herrn Dipl. Ing. Ralf Hoffmann für die durchgeführten Arbeiten deren Ergebnisse teilweise in diese Arbeit einfließen und zudem für die nette Zeit am Institut.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich schon immer so selbstverständlich bei allem unterstützt hat.

Ingo Bauer

Berlin, September 2005

Abstract

In dem vom BMBF geförderten Projekt „Entwicklung von Weizen-, Roggen- und Gerstenproteinen ohne Zöliakietoxizität und deren Verwendung zur Herstellung von Lebensmitteln“ (Förderkennzeichen 0312246C) wurde von der Hypothese ausgegangen, daß nur die Gliadine des Weizens, nicht aber die Glutenine zöliakietoxisch sind. Der Beweis dafür sollte u.a. über die transgene Expression von Gluteninen in Hefe geführt werden. Damit sollte es ermöglicht werden, an reine Proteinfractionen für die notwendigen Toxizitätstests zu gelangen. Dazu wurden Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in einem Teilprojekt entsprechend gentechnisch modifiziert.

Die vorgelegte Dissertation wurde im Rahmen des Teilprojekts „Expression und Produktion von Weizenspeicherproteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“ erstellt, wobei eine Aufgabe darin bestand, diese Hefen zu propagieren und aus ihnen die exprimierten Glutenine zu extrahieren sowie aufzureinigen. Die in den dafür entwickelten Prozeßschritten erhaltenen Gluteninpräparate wurden in anderen Teilprojekten weiter aufgereinigt und anschließend für Toxizitätstests eingesetzt. Eine weitere Aufgabe bestand darin zu beweisen, daß diese Glutenine viskoelastische Eigenschaften besitzen und demzufolge backtechnisch funktionell sind. Damit würde sich ein von der Vermehrung von Getreide unabhängiger Weg eröffnen, Kleberprotein ohne Zöliakietoxizität herzustellen, so daß Lebensmittel mit sensorischen Eigenschaften hergestellt werden könnten, die sonst nur Produkten auf Weizenbasis eigen sind.

Es ist gelungen, die gentechnisch modifizierten Hefestämme erfolgreich zu vermehren. Auf dieser Grundlage war es möglich, über die Entwicklung eines Aufarbeitungs- und Anreicherungsprozesses ausreichende Mengen gluteninhaltiger Präparate herzustellen, die einen Gluteningehalt von bis zu 68% aufwiesen. Durch die Produktion von Weizenspeicherproteinen in Hefe gelang es, einzelne Speicherproteine und Kombinationen von einzelnen Speicherproteinen in Form von angereicherten Präparaten zu gewinnen. Diese wurden sowohl für Toxizitäts- als auch für Funktionalitätstests eingesetzt. Mit dem Ergebnis der durchgeführten Funktionalitätstests wurde bewiesen, daß die hergestellten angereicherten

Gluteninpräparate die für das Backen erforderlichen funktionalen Eigenschaften besitzen und sich als Zusatzstoff zur Herstellung von Gebäcken eignen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Stand des Wissens und der Technik	4
2.1 Proteinfractionen des Weizens	4
2.2 Löslichkeit und Fraktionierbarkeit von Weizenproteinen	6
2.3 Rheologie und Backeigenschaften	8
2.4 Charakterisierung der Eigenschaften von Weizenteigen	10
2.4.1 Knetversuch	10
2.4.1.1 Dehnungsmessungen	11
2.4.2 Rheometrie und Backversuche im Mikromaßstab	12
2.5 Expression von Gluten-Proteinen in transgenem Weizen	13
2.6 Expression von Gluten-Proteinen in transgener Hefe	14
2.7 Fermentationstechnik	15
2.7.1 Geschichtliche Entwicklung	16
2.7.2 Fermentationsorganismen	17
2.7.3 Fermentationsarten	18
2.7.3.1 Batch-Fermentation	18
2.7.3.2 Fed-Batch-Fermentation (Zulaufverfahren)	20
2.7.3.3 Kontinuierliche Fermentation	21
2.8 Einführung in die Technik der Backhefeherstellung	21
2.8.1 Pasteur Effekt	22
2.8.1.1 Crabtree- Effekt	22
2.9 Aufbereitungstechnik	23
2.9.1 Extraktion	23
2.9.2 Präzipitations-Methoden	24
2.9.2.1 Löslichkeit von Proteinen bei niedrigen Salzkonzentrationen	24
2.9.2.2 Proteinfällung durch Aussalzen bei hohen Salzkonzentrationen	25
2.9.2.3 Proteinfällung durch organische Lösungsmittel	26

2.9.2.4	Proteinfällung durch Denaturierung; Hitzefällung	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Hefen, Nährmedium und Propagation	27
3.1.1	Verwendete Hefen.....	27
3.1.2	Herstellung des Fermentationssubstrates/ Medienvorbereitung.....	29
3.1.3	Herstellung des Inokulums, Anzucht der Hefestämme	31
3.1.4	Beschreibung der Propagationsanlage A	32
3.1.5	Beschreibung der Propagationsanlage B	34
3.2	Beschreibung und Betrieb des Tellerseparators.....	37
3.3	Beschreibung und Betrieb der Ringspaltkugelmühle (CoBall-Mill)	38
3.4	Beschreibung und Betrieb der Extraktionsanlage.....	40
3.5	Beschreibung der Proteinpräzipitation zu Herstellung der WSP- Rohpräparate	41
3.6	Beschreibung der Sprühtrocknungsanlage	48
3.7	Beschreibung der Ultrafiltrationsanlage.....	49
3.8	Analysenmethoden.....	50
3.8.1	Photometrische Bestimmung der Zell- und Hefekonzentration.....	50
3.8.2	Bestimmung des Aufschlußgrades nach der Zelldesintegration.....	50
3.8.3	Bestimmung des Gehalts an Wasser und verdampfbaren Substanzen	51
3.8.4	Bestimmung des Rohproteingehalts.....	51
3.8.5	Bestimmung des Gehalts an WSP-Untereinheiten	51
3.8.6	Bestimmung der Asche	51
3.8.7	Bestimmung des α -Amino-Stickstoffs (FAN)	52
3.8.8	Bestimmung des Ammoniumstickstoffs	52
3.8.9	Bestimmung des Gebäckvolumens	53
3.8.10	BRABENDER-Farinograph.....	53
3.8.11	Bestimmung des Mannosegehalts mittels HPLC.....	53
3.8.12	Bestimmung des Mercaptoethanolgehalts.....	54
3.9	Material und Methoden zur Aufreinigung der WSP-Rohpräparate	55
3.9.1	WSP-Rohpräparate	55
3.9.2	Verwendete Geräte	56
3.9.3	Anreicherungsverfahren	56
3.9.3.1	Waschung der Rohpräparate und Extraktion der WSP	57
3.9.3.2	Präzipitation der gelösten WSP	58
3.10	Material und Methoden zur Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von angereicherten WSP-Präparaten im Mikromaßstab.....	61
3.10.1	Material.....	62
3.10.2	Herstellung von glutenfreiem Weizenmehl	63
3.10.3	Isolierung von Gliadin und Glutenin.....	63
3.10.4	Vermahlen der Fraktionen	64

3.10.5	Backversuche	64
3.10.6	Untersuchung rheologischer Eigenschaften	65
3.10.6.1	Herstellung der Proben für die Zugversuche	65
3.10.6.2	Zugversuche	65
4	Ergebnisse und Diskussion	66
4.1	Beschreibung des Prozesses zur Produktion von Weizenspeicherproteinen aus transgenen Hefen	66
4.2	Propagationen	68
4.2.1	Propagation von Bäckerhefe: Versuch Nr. 1	71
4.2.2	Propagationen mit dem Hefetransformanten A: Versuche Nr. 2 - 5	73
4.2.3	Propagationen mit dem Transformanten B: Versuche Nr. 6 - 8	76
4.2.4	Propagationen mit dem Transformanten C: Versuche Nr. 10 - 14	80
4.2.5	Propagationen mit dem Transformanten D: Versuche Nr. 15 - 17	83
4.2.6	Propagationen mit dem Transformanten E: Versuche Nr. 18 - 20	86
4.2.7	Propagationen mit dem Transformanten F: Versuche Nr. 21 - 24	89
4.2.8	Propagationen mit dem Transformanten G: Versuche Nr. 25 - 27	92
4.2.9	Propagation mit dem nicht transgenen Bäckerhefestamm Typ 2.200: Versuch Nr. 28	95
4.2.10	Propagation mit dem Transformanten H: Versuch Nr. 29	97
4.2.11	Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Propagationen: Versuche Nr. 2 - 29	99
4.3	Hefeernte	103
4.4	Desintegration der Hefezellen	107
4.5	Fällungsschritt	109
4.6	Extraktion	113
4.7	Proteinpräzipitation zur Herstellung der WSP-haltigen Rohpräparate	118
4.8	Trockensubstanz- und Rohproteinbilanzierung	128
4.9	Charakterisierung der Glutenin-Untereinheiten	132
4.9.1	Erste Funktionalitätsprüfung der HMW-1Dx5-Untereinheiten	132
4.9.1.1	Anreicherungsversuch	132
4.9.1.2	Teig- und Backversuch	134
4.9.2	Weitere Funktionalitätsprüfungen verschiedener Glutenin-Untereinheiten im Mikromaßstab	136
4.9.2.1	Ergebnisse des Anreicherungsverfahrens	136
4.9.2.2	Backversuche mit angereicherten WSP-Präparaten aus Hefe	139
4.9.2.3	Rheometrie	143
5	Nebenergebnisse	146
5.1	Untersuchungen zur Verwertbarkeit von Nebenfraktionen	146
5.1.1	Vorversuche zur Anreicherung der Zellwandbestandteile aus der Nebenfraktion 4	147

5.1.2	Versuchsdurchführung der Proteinabreicherung aus einer Nebenfraktion	150
5.1.3	Backversuch	155
5.1.3.1	Rezeptur und Teigherstellung	155
5.1.3.2	Ergebnisse der Backversuch mit dem sprühgetrockneten Nebenprodukt	156
5.2	Versuche zur Substitution von 2-Mercaptoethanol im Extraktionsprozeß bei der Aufarbeitung der Hefebiomasse	158
5.2.1	Versuchsdurchführung	159
5.2.2	Ergebnisse	160
5.2.3	Versuch im Technikumsmaßstab	162
6	Zusammenfassung.....	163
7	Literatur.....	174

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Gewebeschnitt durch eine Dünndarmschleimhaut bei 60 x Vergrößerung.....	1
Abb. 2: Farinogramm mit wichtigen Parametern.....	11
Abb. 3: Extensogramm mit wichtigen Parametern.....	12
Abb. 4: Vereinfachtes Schema eines Fermentationsprozesses	16
Abb. 5: Typischer Verlauf des Batch-Verfahrens.....	19
Abb. 6: Letzte Phase der Inokulumanzucht in einer 10 L Steilwandflasche	31
Abb. 7: Aufbau der Propagationsanlage A	33
Abb. 8: Neue Propagationsanlage im Technikummaßstab	35
Abb. 9: Ansicht des selbstaustragender Tellerseparators mit Funktionsschnittbild ..	37
Abb. 10: Ansicht der Ringspaltkugelmühle mit Funktionsschnittbild	38
Abb. 11: Extraktionsanlage mit den Prozeßeinheiten	40
Abb. 12: Verbrauch an Ammoniumsulfat zur Sättigung von 2-Propanol-Wasser- Gemischen bei verschiedenen Temperaturen	43
Abb. 13: Volumenverhältnisse der Oberphase bei Sättigung von 2-Propanol- Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen.....	43
Abb. 14: Dichte der Oberphase bei Sättigung von 2-Propanol-Wasser- Gemischen bei verschiedenen Temperaturen	44
Abb. 15: 2-Propanolkonzentration der Unterphase bei Sättigung von 2-Propanol- Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen.....	45
Abb. 16: Verdichtetes Präzipitat nach der Trennung in einer Becherzentrifuge	45
Abb. 17: Prozentuale Propanolmenge in der Unterphase bei Sättigung von 2- Propanol-Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen	46
Abb. 18: Sprühtrocknungsanlage	48
Abb. 19: Ultrafiltrationsanlage mit den Prozeßeinheiten.....	49
Abb. 20: Konzentration an HMW-1Dy10- und LMW-a3-Untereinheiten in den Präzipitaten 1-4	61
Abb. 21: Verfahrensfließbild zur Herstellung WSP-haltiger Rohpräparate	67
Abb. 22: Verlauf der Propagation Nr. 11 im Technikumsfermenter	69
Abb. 23: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmasse der Propagationen mit dem Transformanten A.....	75
Abb. 24: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten A.....	75
Abb. 25: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten B.....	78
Abb. 26: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten B.....	79
Abb. 27: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten C.....	82

Abb. 28: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten C.....	82
Abb. 29: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten D.....	84
Abb. 30: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten D.....	85
Abb. 31: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten E.....	88
Abb. 32: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten E.....	88
Abb. 33: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten F.....	91
Abb. 34: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten F.....	91
Abb. 35: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten G.....	94
Abb. 36: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten G.....	94
Abb. 37: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit den Transformanten und der Bäckerhefe.....	100
Abb. 38: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit den Transformanten und der Bäckerhefe.....	101
Abb. 39: Ertragskoeffizient als Funktion der Wachstumsgeschwindigkeit während der Batch-Phasen.....	101
Abb. 40: Mikroskopische Aufnahme der Hefe a) vor und b) nach der Beanspruchung in der Kugelmühle bei 1000 x Vergrößerung.....	108
Abb. 41: Reduzierte spez. Rohpräparatemengen vs. Dichte der AMS-haltigen Unterphasen.....	121
Abb. 42: Mittlerer Ertrag an WSP-Untereinheiten der Transformanten A-G.....	125
Abb. 43: Mittlerer Produktausbeutekoeffizient der Transformanten A-G.....	126
Abb. 44: Ertrag an WSP vs. Produktausbeutekoeffizienten.....	126
Abb. 45: Verteilung der Trockensubstanz und des Proteins in den Teilprozessen der Aufarbeitung der transgenen Hefen.....	129
Abb. 46: Abnahme der Masse an Trockensubstanz und Protein während der im Aufarbeitung der transgenen Hefen.....	131
Abb. 47: Farinogramm des Anteilversuches.....	135
Abb. 48: Backergebnis im Schnitt.....	136
Abb. 49: Gebäcke aus HMW-1Dx5-Präparaten und glutenfreiem Mehl.....	140
Abb. 50: Gebäck aus WSP-Präparat 5B (7,8 % HMW-1Dx5) und glutenfreiem Mehl.....	141
Abb. 51: Gebäck aus WSP-Präparat 4B (11,9 % HMW-1Dy10) und glutenfreiem Mehl.....	141
Abb. 52: Gebäck aus WSP-Präparat 3B (33,2 % HMW-1Dx5 + 9,8 % HMW-1Dy10) und glutenfreiem Mehl.....	142
Abb. 53: Dehnversuch mit dem Präparat 6B (46,7 % HMW-1Dx5).....	145
Abb. 54: Verlauf des FAN-Gehalts bei der enzymatischer Proteinhydrolyse.....	149

Abb. 55: Schema der Aufarbeitung der Nebenfraktion 4 zum mannanhaltigen Präparat.....	153
Abb. 56: Glucose- und Mannoseanteil des Gesamt-Monosaccharidgehaltes im Produktstrom des Anreicherungsversuches	154
Abb. 57: Brötchen mit Anteilen des sprühgetrockneten Zwischenprodukts	156
Abb. 58: Horizontalschnitte der Versuchsbrötchen.....	157
Abb. 59: Gesamtproteingehalt im Verlauf der pH-Wertabsenkung	160
Abb. 60: Netto-Intensität im Verlauf der pH-Wertabsenkung	161

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Fraktionierung von Proteinen nach Osborne.	4
Tab. 2: Entwicklung der Fermentationstechnik.	17
Tab. 3: Codierung der eingesetzten Hefetransformanten.	27
Tab. 4: Zusammensetzung des DS-Mediums für die Hefepropagation im Batch- und Fed-Batch-Verfahren.	29
Tab. 5: Zusammensetzung der Vitamin- und Spurenelementlösung.	30
Tab. 6: Zugabemengen der Vitamin-, Spurenelemente- und Eisensulfatlösung.	30
Tab. 7: Merkmale und Parameter der verwendeten Ringspaltkugelmühle (Fryma, CoBall-Mill, Type MS 12).	39
Tab. 8: Spezifikationen der für die Aufreinigung verwendeten WSP- Rohpräparate.	56
Tab. 9: WSP-Gehalt und Menge der Präzipitate.	60
Tab. 10: Spezifikationen der verwendeten angereicherten WSP-Präparate.	62
Tab. 11: Spezifikation des Weizenmehls T 550 und der daraus gewonnenen Fraktionen.	63
Tab. 12: Spezifikationen des isolierten Gliadins und Glutenins.	64
Tab. 13: Rezepturen Backversuche mit WSP-Präparat-Zusatz.	64
Tab. 14: Konstante Prozeßparameter der Propagationen.	68
Tab. 15: Zellkonzentrationen und Zellwachstum: Versuch Nr. 1.	72
Tab. 16: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten A.	73
Tab. 17: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten A.	73
Tab. 18: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten A.	74
Tab. 19: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten B.	76
Tab. 20: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten B.	76
Tab. 21: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten B.	77
Tab. 22: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten C.	80
Tab. 23: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten C.	80
Tab. 24: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten C.	81
Tab. 25: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten D.	83

Tab. 26: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten D.....	83
Tab. 27: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten D.....	84
Tab. 28: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten E.....	86
Tab. 29: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten E.....	86
Tab. 30: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten E.....	87
Tab. 31: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten F.....	89
Tab. 32: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten F.....	89
Tab. 33: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten F.....	90
Tab. 34: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten G.....	92
Tab. 35: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten G.....	92
Tab. 36: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten G.....	93
Tab. 37: Eckdaten der Vermehrungsschritte der Propagation mit dem Bäckerhefestamm Typ 2.200.....	95
Tab. 38: Wachstumsgeschwindigkeit und Ertragskoeffizient der Propagation mit dem Bäckerhefestamm Typ 2.200.....	96
Tab. 39: Eckdaten der Vermehrungsschritte der Propagation mit dem Transformanten H.....	97
Tab. 40: Wachstumsgeschwindigkeiten und Ertragskoeffizienten der Propagation mit dem Transformanten H.....	98
Tab. 41: Unberücksichtigte Ergebnisse bei den Mittelwertberechnungen der Wachstumsgeschwindigkeit und des Ertragskoeffizienten.....	99
Tab. 42: Parameter des Tellerseparatorbetriebes.....	103
Tab. 43: Eckdaten der Hefeernte nach der Separation im Tellerseparator.....	104
Tab. 44: Eckdaten der Hefeernte durch Zentrifugation.....	106
Tab. 45: Eckdaten der Fällung und der Zentrifugation.....	110
Tab. 46: Analysenergebnisse der Phasen nach der Zentrifugation in einer Becherzentrifuge.....	111
Tab. 47: Eckdaten der Extraktion der WSP mit den Hefetransformanten.....	114
Tab. 48: Analysen nach der Extraktion der WSP und Zentrifugation des Gemisches erhaltenen Phasen: Hefetransformanten D–G.....	116
Tab. 49: Eckdaten der Präzipitation der WSP mit 2-Propanol für die Versuche Nr. 2 - 12 mit den Hefetransformanten A-C.....	118
Tab. 50: Analysen der Phasen nach der Trennung durch Zentrifugation und Ausbeute an WSP-Rohpräparat: Hefetransformanten D-G.....	120

Tab. 51: Zusammensetzung der gefriergetrockneten WSP-Rohpräparate: Versuche Nr. 15–27.....	122
Tab. 52: WSP-Gehalt der Rohpräparate und Ertrag an WSP für die Versuche mit den Hefetransformanten A–G.....	123
Tab. 53: Verwendeten Abkürzungen für die in Abb. 45 dargestellte Massenbilanzierung.....	130
Tab. 54: Ergebnisse der Anreicherungsversuche verschiedener WSP- Rohpräparate.....	137
Tab. 55: Angereicherte WSP-Präparate und damit erreichten Gebäckvolumina. ...	139
Tab. 56: Vergleich der Dehnungseigenschaften der angereicherten WSP- Präparate und Trockenkleber (TK).	143
Tab. 57: Nebenfraktionen des Anreicherungsprozesses.	146
Tab. 58: Auswahl der verwendeten Enzympräparate.	148
Tab. 59: Zusätze zum Mehl bzw. zur Backmischung.	155
Tab. 60: Beurteilungen der Gebäckstücke des Backversuches.....	156

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AMS	Ammoniumsulfat
CO ₂	Kohlendioxid
dest.	destilliert
DIN	Deutsches Institut für Normung
DS Medium	Sporulationsmedium nach DUNCAN und STRONG
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-dinitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreit
DZG	Deutsche Zöliakie Gesellschaft
EDTA-Na ₂	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
FAN	Freier-Amino-Stickstoff
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMW	High molecular weight
ICC	International Association for Cereal Science and Technology
ISO	International Organization for Standardization
l	liquid
LMW	Low molecular weight
M	Molarität [mol/L]
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
PBS	Phosphate Buffer Solution
PE	Polyethylen
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid
PS	Polystyrol
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
s	solid

SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate – Polyacrylamidgel – Electrophorese
Tab.	Tabelle
TK	Trockenkleber
TS	Trockensubstanz
UF	Ultrafiltration
WSP	Weizenspeicherproteine

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Proteine der Getreide kann man aufgrund ihrer Löslichkeit in die Fraktionen Albumine, Globuline, Prolamine und Gluteline aufteilen, wobei man weiß, daß die Prolamine die Auslöser der Zöliakie sind. Zöliakie ist eine Erkrankung der Dünndarmschleimhaut. Die in vielen Getreidearten vorkommenden Prolamine (Gliadin als Fraktion des Kleberproteins Gluten im Weizen, Hordein in Gerste, Secalin in Roggen) mit ihren pathogenetisch bedeutsamen glutamin- und prolinreichen Fraktionen führt aufgrund einer immunologischen Reaktion (Antikörperbildung) zu schweren Veränderungen der Dünndarmschleimhaut, bis zur Zottenatrophie. Patienten mit einer Zöliakie entwickeln Antikörper gegen Gliadin. Der Mangel an schleimhautgebundenen Verdauungsenzymen und die Reduktion der Dünndarmoberfläche führt zum Verlust der digestiven und adsorptiven Funktion des Dünndarms für Nährstoffe, einschließlich Mineralien und Vitaminen [1].

Zöliakie kann mit Hilfe eines Bluttests diagnostiziert werden. Die beste Möglichkeit der Diagnose ist jedoch die Entnahme einer Gewebeprobe von der Dünndarmwand zur mikroskopischen Untersuchung. Die Struktur der Darmschleimhaut ist im gesunden Zustand sehr charakteristisch, bei einer Schädigung durch Gluten wird sie flach und dünn. Die Abb. 1 zeigt Gewebeschnitte der Dünndarmschleimhaut.

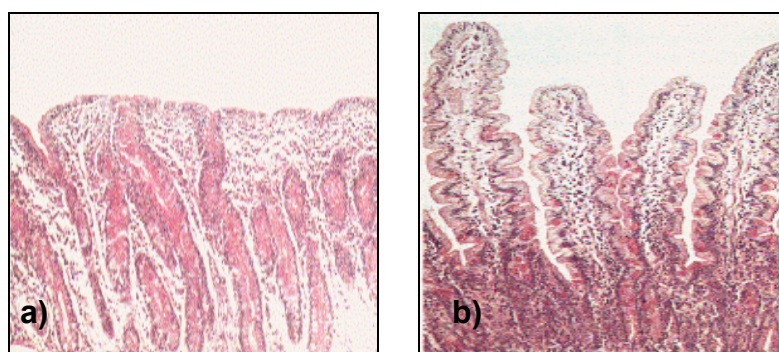


Abb. 1: Gewebeschnitt durch eine Dünndarmschleimhaut bei 60 x Vergrößerung [9]

Bei der Abb. 1a) handelt es sich um einen Gewebeschnitt durch eine geschädigte zottenlose Dünndarmschleimhaut. Die Abb. 1 b) zeigt Aufnahmen der intakten Dünndarmschleimhaut. Im gesunden Zustand sind die Darmzotten deutlich zu erkennen.

Allen Patienten mit einer nachgewiesenen Zöliakie wird eine strenge lebenslange glutenfreie Diät nachdrücklich angeraten. Es muß primär jede bewußte Zufuhr von getreidehaltigen Produkten aus Weizen, Triticale, Roggen, Dinkel, Gerste, Grünkern und Hafer vermieden werden. Die höchste nachgewiesene, nicht toxische Dosis für eine erwachsene Person liegt bei 2,4 mg Gliadin pro Tag [2]. Zur Behandlung der Zöliakie sind keine medikamentösen Therapieformen verfügbar: Durch eine glutenfreie Diät bilden sich die Dünndarmveränderungen jedoch zurück. Bei dieser Diät sind Produkte aus Reis, Mais, Kartoffeln, Buchweizen, Amarant, Johannisbrot und Hirse erlaubt [3].

Aktuelle Studien in Italien, Schweden und den USA ergaben Prävalenz-Zahlen um 1:200. Es gibt jedoch auch Studien, die eine Prävalenz von 1:100 in Italien oder 1:20 bei Sahauris (Nordwestafrika) vermuten lassen. In Mitteleuropa leiden durchschnittlich 0,1% und in Irland 0,3% der Kinder an Zöliakie [4, 5, 6, 7].

Diese Angaben erscheinen zunächst recht hoch. Das liegt vor allem daran, daß durch neue Screeningprogramme und immer sensiblere Labortests auch bei Patienten, die noch keine typischen Symptome aufweisen, Zöliakie diagnostiziert wurde. Nur bei ca. 40 % der Patienten fällt eine typische Symptomatik auf, die beim Antikörper-Screening positiv reagieren. Deshalb muß von einer so genannten „stummen“ Zöliakie ausgegangen werden [3]. Die Krankheit kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten. Am häufigsten tritt eine Ersterkrankung jedoch einerseits im Kindesalter bis zum 8. Lebensjahr, und dann wieder im Erwachsenenalter zwischen dem 20. und dem 50. Lebensjahr auf. Das Verhältnis von positiv diagnostizierten Männern und Frauen liegt bei 1:2. Das mittlere Diagnosealter liegt bei ca. 33 Jahren [8]. In Deutschland liegt die Häufigkeit der Zöliakieerkrankungen nach aktuellen Angaben der Deutschen Zöliakie Gesellschaft (DZG) bei 330 000 Betroffenen. Das entspricht einer Prävalenz von 1:250 [9].

In der Getreide- und Backindustrie sind die Weizenproteine unverzichtbar. Zur Herstellung von Backwaren wird bei der Zugabe von Wasser zu Mehl der Teig aufgebaut. Gluten entsteht durch die Verbindung der im Weizenmehl enthaltenen Proteine Gluteline (Glutenin) und Prolamin (Gliadin) mit Wasser [19]. Durch den Knetprozeß werden die Kleberproteine (Gluten) gedehnt und es bilden sich Proteinfilme und Stränge aus. Nur mit Weizenmehl kann durch Zugabe von Wasser und unter Wirkung von Knetenergie ein viskoelastischer Teig gebildet werden. Die

Viskoelastizität ist auf die Ausbildung des Klebergerüsts zurückzuführen, das zu 90 % aus Fraktionen der Gliadine und Glutenine, zu 8 % aus Lipiden und zu 2 % aus Kohlenhydraten besteht. Das Klebergerüst verleiht dem Teig Gashaltevermögen, so daß durch Gasbildung im Teig eine Schaumstruktur entsteht, die durch Backen zur Krume und Kruste verfestigt werden kann [10,19].

Die Erforschung der die Zöliakie auslösenden Proteine ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten, darunter auch in dem vom BMBF geförderten Leitprojekt „Verbundprojekt Zöliakie“. In diesem Projekt wurde von der Hypothese ausgegangen, daß nur die Gliadine des Weizens, nicht aber die Glutenine die Erkrankung auslösen. Der Beweis dafür sollte u.a. über die transgene Expression nieder- (LMW) und hochmolekularer (HMW) Glutenine in Hefe geführt werden. Die transgene Expression von Glutenin-Untereinheiten würde es ermöglichen an reine Proteinfractionen für notwendige Toxizitätstests zu gelangen. Diese Reinheit ist unbedingt erforderlich, da bereits geringe Kontaminationen mit zöliakieauslösenden Proteinen in den Toxizitätstests zu positiven Reaktionen führen würden. Die Isolation reiner Proteinfractionen aus Weizen ist mit proteinchemischen Methoden offenbar nicht möglich, da diese im Klebereiweiß häufig mit den Gliadinen kovalent verbunden vorliegen.

Dazu wurden Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in einem Projektteil (Arbeitsgruppe Stahl/Hinzmann) entsprechend gentechnisch modifiziert [11]. Die Aufgabe unseres Projektteils (Arbeitsgruppe Meuser), in dessen Rahmen diese Dissertation erstellt wurde, bestand darin, diese Hefen zu propagieren und aus ihr die exprimierten Glutenine zu extrahieren sowie aufzureinigen. Die in diesem Prozeß erhaltenen Gluteninpräparate sollten der Arbeitsgruppe Wieser zur weiteren Bearbeitung für anschließende Toxizitätstests (Arbeitsgruppe Ciclitira) zur Verfügung gestellt werden. Außerdem sollte bewiesen werden, daß diese Glutenine viskoelastische Eigenschaften besitzen und demzufolge backtechnisch funktionell sind.

Somit würde sich ein von der Vermehrung von Getreide unabhängiger Weg eröffnen, Kleberprotein ohne Zöliakietoxizität zu gewinnen. Mit diesem könnten Lebensmittel mit sensorischen Eigenschaften hergestellt werden, die sonst nur Produkten auf Weizenbasis eigen sind.

2 Stand des Wissens und der Technik

Die vielseitigen und umfangreichen Projektaufgaben haben es erforderlich gemacht, den Stand des Wissens und der Technik zum Verständnis der experimentellen Durchführung des Projektes auf die zugehörigen wissenschaftlichen Grundlagen zurückzuführen. Dies dient gleichzeitig der Einordnung und Hinführung auf die Lösung der Aufgabenstellung. Deshalb werden hier zum Thema der Hefepropagation Ausführungen zur allgemeinen Fermentationstechnik und Technik der Backhefeproduktion gemacht. Die Thematik der Anreicherung und Isolation von Proteinen wird unter Bezugnahme auf Proteineigenschaften und Aufbereitungstechniken abgehandelt und die Thematik der Charakterisierung der wichtigsten funktionellen Eigenschaften von Weizenspeicherproteinen wird unter Berücksichtigung ihrer Teig- und Backeigenschaften beschrieben.

2.1 Proteinfraktionen des Weizens

Die Proteine des Weizens können anhand ihrer Löslichkeit in unterschiedlichen Lösungsmitteln nach der von Osborne beschriebenen Methode in vier Proteinfraktionen unterteilt werden (Tab. 1). In der mittleren Tabellenspalte sind die Bezeichnungen der Proteinfraktionen nach Osborne speziell für Weizen aufgeführt. Die mengenmäßige Verteilung der Fraktionen im Weizenprotein ist in der rechten Tabellenspalte angegeben. Jedes dieser Proteine besteht aus noch weiteren Untereinheiten [12, 13].

Tab. 1: Fraktionierung von Proteinen nach Osborne [19].

Proteinfraktionen	Osborne-Fraktionen des Weizens	Anteil im Weizen
Albumine	Leukosin	14,7 %
Globuline	Edestin	7,0 %
Prolamine	Gliadin	32,6 %
Gluteline	Glutenin	45,7 %

Der Anteil von Albuminen und Globulinen an den Weizenproteinen liegt etwa bei 22% (Tab. 1). Sie kommen besonders reichlich in den Randschichten des Weizenkorns vor und stammen wahrscheinlich in erster Linie aus Resten des Cytoplasmas und anderen subzellulären Fraktionen [4]. Albumin ist in Wasser und Globulin in wäßriger Salzlösung löslich. Albumine haben ein Molekulargewicht von ca. 12.000 D und Globuline eines von ca. 25.000 D [14, 15]. Teile dieser Proteinfractionen besitzen als Enzyme eine biologische Funktion. Durch sie wird die Proteolyse der Speicherproteine und die Hydrolyse von Stärke bei der Keimung erst möglich. Albumine und Globuline haben keine wesentliche Bedeutung für die Backqualität eines Weizenmehls. Albumine und Globuline leisten jedoch durch ihren gegenüber den anderen Proteinfractionen erhöhten Gehalt an der essentiellen Aminosäuren Lysin, Methionin und Tryptophan einen entsprechend höheren Beitrag zum Nährwert [16, 17].

Prolamine und Gluteline machen etwa 80 % der Weizenproteine aus (Tab. 1). Die Prolamine des Weizens werden als Gliadin und die Gluteline als Glutenin bezeichnet. Es handelt sich um Reserveproteine, die im Endosperm des Kornes gebildet werden. Die Gliadine und Glutenine haben eine ähnliche Aminosäurenverteilung. Sie sind reich an Prolin und Glutamin und arm an basischen Aminosäuren [8].

Prolamin (Gliadin) ist in Ethanol löslich. Diese Fraktion ist aus monomeren Proteineinheiten aufgebaut, wobei die Proteineinheiten durch intramolekulare Disulfidbrücken verknüpft sind [5]. Prolamine weisen ein Molekulargewicht zwischen 10.000 und 70.000 D auf. Die Prolamine werden ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit im unteren pH-Bereich und ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz in α -, β -, γ - und ω -Gliadine unterteilt [18, 12]. Die einzelnen Gliadineinheiten lassen sich in weitere Untereinheiten aufspalten: α in zwei, β in vier, γ in drei und ω in acht Untereinheiten.

Glutenin ist teilweise in verdünnter Essigsäure löslich. Nach Dialyse des gelösten Anteils verbleibt eine Fraktion, die als unlösliches Glutenin bezeichnet wird. Die Gluteninfractionen werden nach Beweglichkeit ihrer Komponenten in SDS-PAGE in niedermolekulargewichtige (LMW) und hochmolekulargewichtige (HMW) Einheiten aufgeteilt [19]. Sie liegen im Weizen in einem Verhältnis von ca. 2:1 vor [20]. Laut GRAVELAND weisen sie Molekulargewichte von 10.000 bis 130.000 auf [21]. Nach WIESER haben LMW-Glutenine Molekulargewichte von 28.000 bis 39.000, HMW-

Gluteline dagegen von 90.000 bis 124.000 [22]. Auch die Glutelinfraktionen lassen sich in weitere Untereinheiten aufspalten. LMW-Gluteline werden weiterhin unterteilt in A-, B-, C- und D-Untereinheiten [18].

2.2 Löslichkeit und Fraktionierbarkeit von Weizenproteinen

Es ist bekannt, daß Weizenproteine nur sehr schwer in gewöhnlichen Lösungsmitteln, z.B. Essigsäure, Harnstoff, SDS usw., löslich sind. Durch Verwendung von z.B. reduzierenden Substanzen ist es möglich, nahezu alle Proteine des Kornes zu lösen. Die Wahl geeigneter Extraktionsbedingungen ist von entscheidender Bedeutung für die Menge des extrahierbaren Proteins. Verschiedene Rührverfahren beeinflussen die Extraktion in einem sehr hohen Maße. Die Menge des extrahierten Proteins (in 0,5 M NaCl-Lösung) hängt von der Rührzeit und von dem Rührertyp ab. Am wirksamsten ist die Extraktion mit einem Homogenisator. Weniger geeignet dagegen ist beispielsweise die alleinige Verwendung eines Magnetrührers. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß durch die Hochgeschwindigkeitshomogenisierung bestimmte Bestandteile mit höheren Molekulargewichten zerstört und in kleinere Fraktionen zerlegt werden, auch wenn sich im elektrophoretischen Verhalten keinerlei Unterschiede fanden. Wie die Untersuchungen weiterhin zeigten, gewinnt man bereits mit dem ersten Extraktionsschritt mehr als 80 % des extrahierten Proteins. Ein dritter Extraktionsschritt sei folglich vernachlässigbar [23].

In Patentschriften und wissenschaftlichen Arbeiten wurden bereits einige Methoden beschrieben, Weizengluten in gliadin- und glutelinreiche Fraktionen aufzutrennen [24, 25, 26, 27, 28].

Unter den für die Lebensmittelverarbeitung zugelassenen Lösungsmitteln wurden wäßrige Alkohol- und Essigsäurelösungen im Labormaßstab auf ihre Eignung hin Proteinfractionen zu trennen, untersucht. Mit diesen Extraktionsmethoden können Fraktionen mit einem Gehalt an Gliadin von 80% und mehr erhalten werden [24].

Da der Gebrauch von leicht entflammaren Lösungsmitteln zusätzlicher Sicherheitsmaßnahmen bedarf, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, auf solche Lösungsmittel zu verzichten.

Ein lösungsmittelfreier Prozeß ist in [25] beschrieben. Diese Anwendung beschreibt eine Methode, Weizengluten zu fraktionieren. Zuerst wird Weizengluten bei einem ersten sauren pH-Wert in einem wäßrigen Medium dispergiert. Das Ganze findet in

Gegenwart eines Reduktionsmittels statt, um Disulfidbindungen zu reduzieren. Im nächsten Schritt wird der pH-Wert des sauren Extraktes angehoben, um Glutenine auszufällen, während Gliadine in Lösung verbleiben. Glutenin und Gliadin lassen sich anschließend leicht voneinander trennen. Die Patentschrift [26] befaßt sich mit einer Extraktionsmethode, bei der eine verdünnte wäßrige Lösung mindestens einer organischen Säure von $\text{pH} \leq 4,5$ verwendet wird. Neben den organischen Säuren wie z.B. Zitronen-, Milch- und Essigsäure wurde auch Phosphorsäure verwendet.

BEROT [27] beschreibt einen Technikumsversuch unter Verwendung von essigsaurigen Lösungen für die Fraktionierung von Gluten. Gemäß dieser Publikation wird Weizengluten in einer verdünnten Säurelösung durch einen Ultra-Turrax für zwei Minuten einer hohen Scherkraft ausgesetzt und anschließend 30 Minuten kontinuierlich gerührt. Das Verhältnis von wäßriger Lösung zu Gluten variierte zwischen 7:1 und 16:1 (v/w). Die lösliche, gliadinreiche Fraktion wurde mittels einer Dekantierzentrifuge abgetrennt. Der Rückstand wurde erneut in Wasser bzw. verdünnter Säure suspendiert und in einem zweiten Schritt erneut zentrifugiert. Dies ergab eine gluteninreiche und eine so genannte Zwischenfraktion. Die charakteristischen Eigenschaften dieser Zwischenfraktion ähnelten denen von Weizengluten. Bezüglich der Gesamtausbeute wird diese Zwischenfraktion als nachteilig gesehen [27].

In einer weiteren Patentschrift ist ein Verfahren beschrieben, welches als Ziel hat, eine Methode für die Gewinnung von gliadin- und gluteninreichen Fraktionen aus Gluten in einem wäßrigen Medium in der Gegenwart von Säure zu liefern ohne den Nachteil einer Zwischenfraktion zu beinhalten.

Dieses Ziel wurde folgendermaßen erreicht: Gluten wird in ein wäßriges Medium in Gegenwart einer Säure, vorzugsweise Phosphorsäure, bis zu einem Trockensubstanzgehalt zwischen 10 und 15 % dispergiert. Der pH-Wert liegt um 4,6. Die Dispersion wird für 30 Minuten Scherhandlungen ausgesetzt, nach denen die Dispersion in gliadin- und gluteninreiche Fraktionen aufgeteilt werden kann. Nach Zentrifugation finden sich Gliadine im Überstand und Glutenine im Rückstand wieder. Dadurch erhält man gliadinreiche Fraktionen mit einem Verhältnis Gliadin zu Glutenin von mindestens 2,5 und gluteninreiche Fraktionen mit einem Verhältnis Gliadin/Glutenin von weniger als 0,8. In Weizengluten liegt das Gliadin/Glutenin-Verhältnis üblicherweise zwischen 1 und 1,3 [28].

2.3 Rheologie und Backeigenschaften

Bei der Herstellung von Teigen aus Weizenmehlen und Wasser kommt es durch den Knetprozeß zum Abbau intramolekularer und zum Aufbau intermolekularer Disulfidbrücken zwischen Subeinheiten des Gliadins und des Glutenins. Dadurch entsteht ein Riesenmolekül, bestehend aus Fibrillen, das raumnetzartig den gesamten Teig durchzieht und in das die Stärkekörner mehr oder weniger eingelagert sind [5]. Die Glutenineinheiten verleihen dieser Netzstruktur Festigkeit und Elastizität. Gliadine besitzen im Allgemeinen eine niedrigere Molekularmasse und eine geringere Elastizität als Glutenine, dafür jedoch eine höhere Dehnbarkeit als diese [16]. Wechselwirkungen zwischen Gliadin- und Glutenineinheiten sollen einen weiteren Effekt auf die Brotqualität haben: Gliadin läßt den Teig plastischer werden, indem sich Untereinheiten bspw. über Wasserstoffbrücken verbinden und mit den Gluteninen über kovalente Bindungen ein Netzwerk aufbauen. Weiterhin sind die Gliadine für die Stabilität des Teiges bei Gasbildung wichtig. Gliadin Zugaben zum Teig haben einen ausgeprägt positiven Einfluß auf das Brotvolumen [10].

Die Klebereiweiße (Gluten) geben dem Teig in Verbindung mit Lipiden seine Kohäsivität und das viskoelastische Verhalten. Diese rheologischen Eigenschaften ermöglichen beim Backen die Bildung eines porösen, lockeren Gebäcks mit elastischer Krume. Hefen oder Backpulver bilden Kohlendioxid und sind für die schaumige, elastische Textur des Teiges verantwortlich. Der Backvorgang führt dazu, daß das Glutennetz durch Kohlendioxid gestreckt wird. Auf diese Weise bekommt das Gebäck eine feine Porung und wird gelockert. Dabei verleihen ihm die feinen Proteinstränge der Klebermatrix Festigkeit, Elastizität sowie guten Stand. Sie verhindern, daß es zu einem flachen Fladen ausfließt. Das Aussehen und die sensorischen Eigenschaften von Gebäck werden positiv beeinflusst [29].

Bei niedrigem Gluten Gehalten fehlen dem Gebäck die strukturgebende Funktionen des Proteins und das Backvolumen wird reduziert. Die Zusammensetzung des Klebers ist wichtig. Besondere backtechnologische Effizienz wird den HMW-, kaum dagegen den LMW-Gluteninen, zugeschrieben [30, 31]. Versuche von SCHROPP und WIESER [32] bestätigten die backtechnologische Bedeutung der HMW-Glutenine, indem sie zeigten, daß deren Zusatz den maximalen Dehnwiderstand des Klebers steigerte. In der Literatur existieren allerdings auch Beispiele, wonach das

LMW-Glutenin in gleich starker Beziehung wie das HMW-Glutenin zu den Zugfestigkeiten von Teig und Klebern steht [33].

2.4 Charakterisierung der Eigenschaften von Weizenteigen

Üblicherweise werden die physikalischen Eigenschaften eines Weizenteiges mit rheologischen Messinstrumenten festgestellt. Es werden damit die viskoelastischen Eigenschaften der Teige beschrieben. Diese treten in Abhängigkeit von der Beanspruchungsart und den -bedingungen als Stoffeigenschaft in Erscheinung [34].

Die Charakterisierung der rheologischen Eigenschaften von Weizenteigen wird u.a. durch Knet- und Dehnungsversuche mit Farinographen und Extensographen ermöglicht. Die zugehörigen praxisbezogenen Meßmethoden liefern ausreichend genaue Hinweise auf den Verarbeitungswert eines Weizenteiges und sind daher sehr verbreitet. Vom Meßprinzip her wenden sie äußere Kräfte an, welche die Eigenschaften und die Struktur der Stoffe während der Messung beeinflussen. Die Meßmethoden nehmen den Charakter einer Ein-Punkt-Messung ein, da sie die Messung nur unter einer Meßbedingung (einer konstanten Knetgeschwindigkeit, einer konstanten Dehnungsgeschwindigkeit) vornehmen.

2.4.1 Knetversuch

Mit dem BRABENDER-Farinograph werden im Laboratoriumsmaßstab aus Weizenmehl und Wasser Teige hergestellt, die von gleicher Konsistenz sind wie die Teige in der Praxis der Brotherstellung. Mit diesem Knetter werden darüber hinaus über die Messung des Drehmoments die eingebrachte Energie und die Veränderung der Konsistenz des Teiges kontinuierlich registriert. Ein so aufgezeichnetes Zeit-Kraft-Diagramm (Abb. 2) beschreibt die Entwicklung eines Teiges in Abhängigkeit von den Mehleigenschaften durch den Eintrag der mechanischen Energie sowie weitere Reaktionen als Funktion der Knetdauer bei einer konstanten Knetgeschwindigkeit [35, 36]. Die wichtigsten Merkmale der Farinogramme sind die Wasseraufnahme, die zur Erreichung einer Teigkonsistenz entsprechend Farinogramm-Einheiten (FE) erforderlich ist, Teigentwicklungszeit, Stabilität und Teigerweichung (Abb. 2).

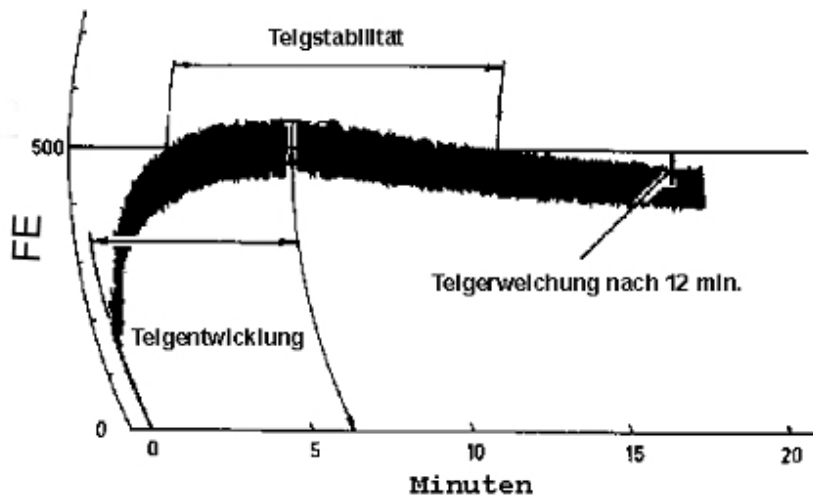


Abb. 2: Farinogramm mit wichtigen Parametern [37]

2.4.1.1 Dehnungsmessungen

Die viskoelastischen Eigenschaften von Weizenteigen können durch Dehnungsversuche mit dem BRABENDER-Extensograph oder dem CHOPIN-Alveograph beschrieben werden. Hierbei wird ein in einem externen Knetter hergestellter Teig einem Zug-Dehnungs-Versuch unterzogen und seine viskoelastischen Eigenschaften in einem Spannungs-Dehnungs-Diagramm, Extensogramm bzw. Alveogramm, wiedergegeben [35]. Die Anwendung der Methoden mit diesen Geräten ist in den ICC Standards 114/1 und 121 beschrieben. Theorie und Praxis dieser Methoden sind in Handbüchern, aber auch in zahlreichen Veröffentlichungen mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen diskutiert [38, 39].

Im Wesentlichen unterscheiden sich beide Methoden (Extensograph, Alveograph) durch die Teigbereitung: konstante Konsistenz beim Extensographen und konstante Wasserzugußmenge beim Alveographen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied besteht in der Anzahl möglicher Messungen mit einem Teig. Während mit dem Extensograph drei Messungen (nach 45, 90 und 135 min Ruhezeit) an einem Teig möglich sind, gestattet der Alveograph lediglich eine Messung (nach 28 min vom An-teigen).

Da die Methode der Dehnungsmessung mit dem Alveographen in dieser Arbeit keine Rolle spielte, soll auf diese Methode nicht weiter eingegangen werden.

Die Deformation der Teige im Extensograph erfolgt durch eine uniaxiale Dehnung eines Teigstranges. Als Messergebnis wird eine Dehnungskurve erhalten (Abb. 3).

Der maximale Dehnwiderstand (DW max) beschreibt die Festigkeit des Teiges und kann als elastische Komponente seiner viskoelastischen Eigenschaft angesehen werden. Die Dehnbarkeit (DB) des Teiges entspricht der Länge bis zu der sich der Teig dehnen läßt, bevor er zerreißt. Demzufolge wird das viskoelastische Verhalten des Teiges am deutlichsten mit der Verhältniszahl DW / DB angezeigt. Die Deformationsarbeit wird aus der Fläche unter der Kurve errechnet und als Indikator für das Gashaltevermögen eines Teiges angesehen. Eine gute Mehqualität wird im Allgemeinen durch hohe Werte für Energie bei optimalen Verhältniszahlen beschrieben.

In Veröffentlichungen wurde berichtet, daß die viskoelastischen Eigenschaften von Teigen sowohl von Typ und Menge der Glutenin-Untereinheiten, als auch von Typ und Menge der Gliadine abhängen [40, 41, 42, 43].

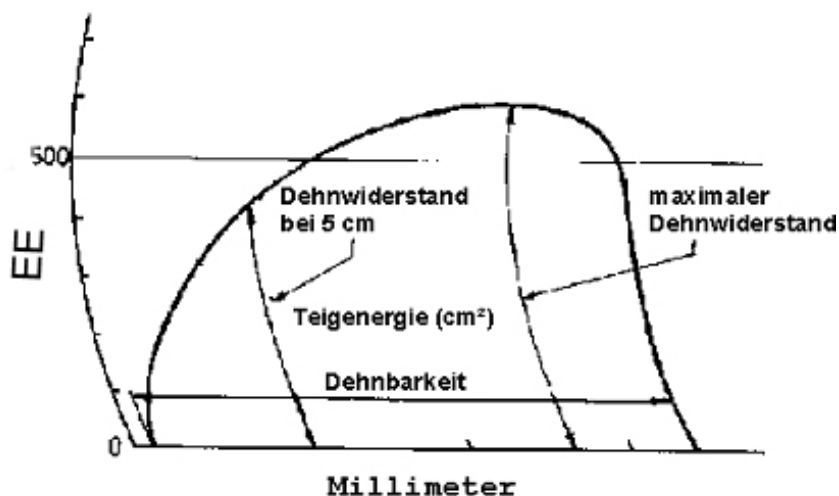


Abb. 3: Extensogramm mit wichtigen Parametern [38]

2.4.2 Rheometrie und Backversuche im Mikromaßstab

Damit auch kleine Mengen Mehl und die daraus hergestellten Teige rheologisch beurteilt werden können, wurde dafür ein Verfahren im Mikromaßstab entwickelt. Diese Methode ermöglicht es, mit 10 g Mehl 6-8 Messungen durchzuführen. Sie kann eingesetzt werden bei der Beurteilung von Neuzüchtungen von Weizen oder bei der

Charakterisierung der rheologischen Einflüsse von Mehlinhaltsstoffen oder Zusatzstoffen, die nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehen.

Hierzu wird aus 10 g Mehl unter Zugabe von Wasser im Mikrofarinographen der Teig bis zum Knetoptimum geknetet. Mit Hilfe einer speziellen Meßvorrichtung lassen sich daraus mit einem Texture Analyser sehr gut reproduzierbare Extensogramme gewinnen [44].

KIEFFER et al. haben ein Verfahren entwickelt und Zugversuche beschrieben, die für Kleber ähnliche Kraft-Weg-Diagramme liefern, wie sie für Teig bekannt sind. Für diese Zugversuche mit Kleber findet die gleiche Meßvorrichtung Anwendung, wie sie bei Teigen eingesetzt wird [45].

Die Einstufung der deutschen Weizensorten in Backqualitätsgruppen erfolgt nach den beim Rapid-Mix-Test erzielten Gebäckvolumina [46]. Aus apparativen Gründen müssen pro Versuch 1000 g Mehl eingesetzt werden [47]. Aus dem Wunsch heraus, für Weizenzüchtung und wissenschaftliche Zwecke mit kleineren Mehlmengen arbeiten zu können, wurde eine Mikrovariante des Rapid-Mix-Testes entwickelt, die mit 10 g Mehl pro Versuchsansatz Ergebnisse liefert, die eng mit den Ergebnissen des Rapid-Mix-Testes korrelieren [48].

2.5 Expression von Gluten-Proteinen in transgenem Weizen

Verschiedene Autoren haben Versuche mit transgenem Weizen unternommen [49, 50], um die Auswirkungen einer veränderten Protein-Zusammensetzung des Glutens im Weizen auf die funktionellen Eigenschaften der Mehle beziehungsweise der daraus hergestellten Teige beurteilen zu können. ROOKE et al. [49] haben in transgenem Weizen den Gehalt an HMW-1Dx5 im Vergleich zum Kontrollversuch um ca. 4x erhöht (10,7 % in transgenem Weizen vergleichend zu 2,7 % im Kontrollversuch). Anschließend wurden die Verarbeitungseigenschaften des Mehles untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle erforderte der Teig des transgenen Weizens eine stärkere Knetarbeit und zeigte anschließend deutlich erhöhte Stabilität. Diese Erkenntnisse führten zu dem Schluß, daß Mehle aus diesem transgenen Weizen für das Backen nicht geeignet sind, aber eventuell als Zusatz zur Anreicherung schwacher Mehle oder anderer Lebensmittel, bei denen eine hohe Viskoelastizität gefordert wird, verwendet werden können.

BUTOW et al. [50] hatten ebenfalls Versuche mit transgenem Weizen mit einem erhöhten HMW-1Dx5-Gehalt durchgeführt. Die Angaben zu dem durch die Überexpression erreichten Gehalt an HMW-1Dx5-Untereinheiten im Weizen waren nicht eindeutig. So wurden Angaben zur *relativen Überexpression an 1Dx5-Untereinheiten pro Gramm Gesamtprotein* gemacht, welche sich im Wertebereich von 1,0 bis 6,47 bewegten. Die dazugehörigen Proteingehalte in den Weizenproben bewegten sich im Bereich von 8,8 bis 15,9 %. Gegenstand der Untersuchungen war die Wirkung des Mengenverhältnisses der Glutenin-Untereinheiten 1Dx5 zu 1Dy10 auf die Teigeigenschaften. Durch Zusatz von aus Weizen isolierten 1Dy10-Untereinheiten zu den aus transgenem Weizen hergestellten Mehlen wurde das Verhältnis 1Dx5 zu 1Dy10 reduziert. Als Folge des geringeren Dx:Dy-Verhältnisses war die Teigstärke schwächer, der Dehnwiderstand geringer. Die Ergebnisse stimmten mit der Hypothese überein, daß für eine gute Teig-Hydratation und Dehnbarkeit ein geeignetes Verhältnis von Dx:Dy benötigt wird.

Andere Autoren [51] berichten über die Überexpression von 1Dx5-Untereinheiten, wobei durch die Überexpression ein Gesamtproteingehalt von bis zu 22% im Weizen erreicht wurde.

2.6 Expression von Gluten-Proteinen in transgener Hefe

Die Übertragung von Weizenglutengenen in Hefen war bereits im Vorfeld des Projektes für Gliadine gelungen [52, 53]. Die Zielsetzung in diesen Arbeiten war darauf gerichtet, durch die Exprimierung des Weizengliadins die Möglichkeit zu schaffen, mit dem aus der Hefe extrahierten Gliadin Funktions-Eigenschafts-Beziehungen untersuchen zu können. Dabei ging es aus analytischen Interesse im wesentlichen darum, Hinweise auf die Abhängigkeit der physikalischen Eigenschaften des außerhalb der Pflanze exprimierten Gliadins von dessen chemischer Struktur zu erhalten. Die dabei erhaltenen Erträge an Weizengliadinen bewegten sich im Bereich von mehreren 100 mg α -Gliadin/L Hefepellet [52] bzw. 1-2 % γ -Gliadin bezogen auf Hefezellprotein [53].

2.7 Fermentationstechnik

Die Entwicklung und Nutzung industrieller Verfahren zur Erzeugung oder Umwandlung von Stoffen mit Hilfe biologischer Prozesse werden als Bioverfahrenstechnik bezeichnet. Sie unterteilt sich, je nach Art der eingesetzten biologischen Verfahren, in die Enzymtechnik oder Biochemische Verfahrenstechnik und die Fermentationstechnik. Die Fermentationstechnik hat die Nutzung der biochemischen Reaktionen von lebenden Zellen zur Bildung oder Umwandlung von Stoffen im Rahmen industrieller Produktionen und technischer Verfahren zum Ziel [58].

In der Fermentationstechnik haben lebende Zellen als Biokatalysatoren eine zentrale Bedeutung. Ihre Eigenschaften, Wachstumscharakteristiken und Stoffwechselvorgänge bestimmen die anzuwendenden Verfahren und Prozeßbedingungen. Im Vergleich zu herkömmlichen (chemischen Katalysatoren) sind die Biokatalysatoren jedoch temperatur-, druck-, strömungs- und pH-empfindlicher. Oftmals sind auch die Produkte wenig stabil. Im allgemeinen sind die Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu chemischen Katalysatoren niedrig, so daß mit großen Reaktoren und langen Reaktionszeiten gearbeitet werden muß [54].

Im Grunde beschreibt dieser einfache Zusammenhang einen Fermentationsprozeß:



Bei jeder Fermentation entsteht neben den Umwandlungsprodukten des Substrates neues Zellmaterial (Biomasse). Bei jedem Verfahren sollen mit einem Maximum an Sicherheit für den Prozeß und einem Minimum an Investitionen und Betriebskosten Bioprodukte hergestellt werden [54].

Die Abb. 4 zeigt das Schema eines Fermentationsprozesses. Aus Nährstoffen für die Mikroorganismen wird das Fermentationsmedium zusammengestellt. Eine Reinkultur der Produktionsorganismen wird zur Impfkultur (Inokulum) vermehrt und zur Beimpfung des sterilisierten Mediums eingesetzt. Die Mikroorganismen wachsen und vermehren sich im Medium und führen die gewünschten Umsetzungen aus. Je nach Prozeßziel wird am Ende der Fermentation die Biomasse abgetrennt und es werden evtl. die im Medium gelöste Produkte isoliert. Stellt die Biomasse das Produkt des Prozesses dar, so wird üblicherweise von einer **Propagation** gesprochen.

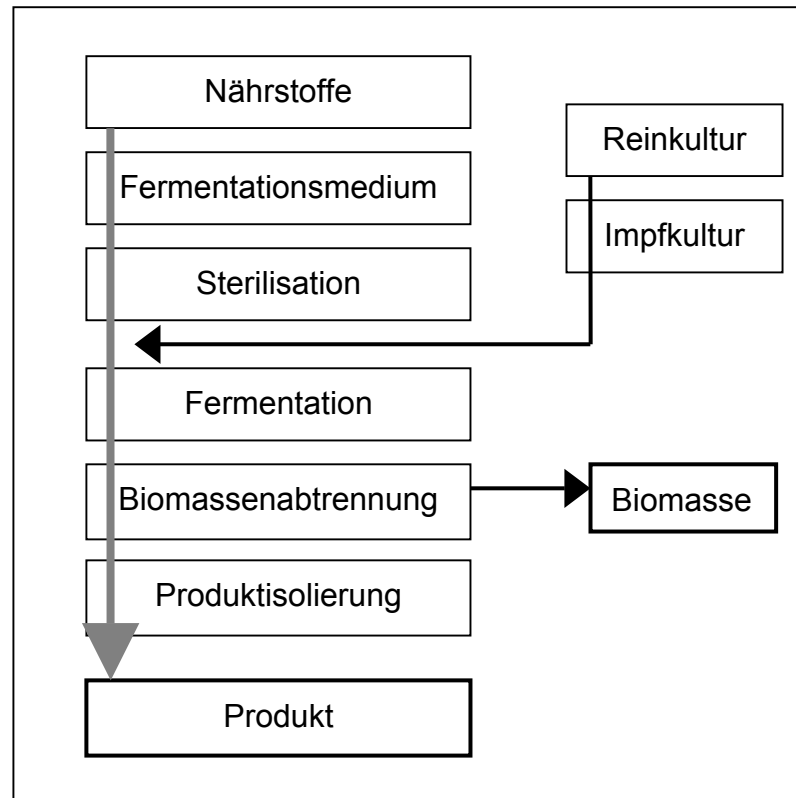


Abb. 4:. Vereinfachtes Schema eines Fermentationsprozesses

2.7.1 Geschichtliche Entwicklung

Die Entwicklung der Fermentationstechnik kann grob in fünf sich überlappende Phasen eingeteilt werden (vergl. Tab. 2). Obwohl Bier schon im alten Ägypten gebraut wurde, entstanden die großen Brauereien erst nach 1700. Um 1860 wurde die Rolle der Mikroorganismen bei der Gärung durch Pasteur erkannt. Dies führte zum Einsatz von Reinkulturen und damit zu einer wesentlichen Verbesserung der Ausbeute, Produktqualität und Beherrschbarkeit der Prozesse. Aseptische Arbeitsweisen wurden relativ spät eingeführt. Die Anwendung von Prinzipien der chemischen Verfahrenstechnik fiel zeitlich zusammen mit der Entwicklung der Gentechnik, die zu einer Renaissance der gesamten Biotechnologie führte. Seitdem hat sich die Entwicklung der Fermentationstechnik stabilisiert [54].

Tab. 2: Entwicklung der Fermentationstechnik [54].

Periode	Produkt	Fermenter	Mikroorganismus
< 1900	Alkohol, Essig	Batch, Holz, später Kupfer	wilde Stämme, Rezirkulation
> 1900	Zitronensäure, Hefe, Butanol	Fed-Batch bis 200m ³ , Rührer, Belüftung	Reinkulturen
> 1940	Penicillin	Aseptik, pH-Wert- und O ₂ -Regelung	Stammentwicklung durch Mutation
> 1960	Einzellerprotein	Einsatz der chem. Verfahrenstechnik	Anfänge des genetic engineering
> 1980	Insulin, Interferon	Computereinsatz	Einsatz von rDNA Stämmen

Der Einsatz von genetisch veränderten Mikroorganismen verursachte keine besonderen technischen Schwierigkeiten, der Entwicklungsschwerpunkt der letzten Jahre liegt bei der Prozeßoptimierung u. a. durch Einsatz von Computern zur Prozeßsteuerung.

2.7.2 Fermentationsorganismen

Die für die Fermentation wichtigsten Organismen sind Bakterien, Hefen und Schimmelpilze. Sie zählen alle zum Pflanzenreich, obwohl sie kein Chlorophyll besitzen. Hefezellen haben Abmessungen von 5-12 µm, sie sind rund oder oval. Sie vermehren sich durch Sprossung und Teilung. Die Zellen leben einzeln oder in kleinen Gruppen. Sie können aerob und anaerob wachsen, auch auf einfachsten Substraten (z. B. Zucker, Kohlenwasserstoffe plus Stickstoffquelle). Sie gedeihen auch bei sehr hohen osmotischen Drücken und können dadurch den Verderb zuckerhaltiger Produkte verursachen. Hefen wachsen auch noch bei niedrigen pH-Werten, wo Bakterien wenig Konkurrenz für sie darstellen. Hefen können jedoch wenig mehr als Zellmaterial erzeugen. Hefezellen werden für die Umsetzung von Zucker zu Alkohol eingesetzt und in großen Mengen für Bäckereizwecke und Tierfutter erzeugt. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist z. B. für die industrielle Produktion von Backhefe,

Bier, Wein, Ethanol und Invertase im Einsatz. Hefen dienen außerdem als Gastorganismen für genetisch veränderte DNA zur Erzeugung von spezifischen Metaboliten.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein wichtiger Modellorganismus für zellbiologische Forschung. Er war der erste eukaryontische Organismus dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Viele menschliche Krankheitsgene haben Homologien in der Hefe. Aufgrund weitestgehender Übereinstimmung der Stoffwechselfunktion ist Hefe für zellbiologische Studien hervorragend geeignet [55, 56].

2.7.3 Fermentationsarten

Bioreaktoren werden bezüglich ihrer Betriebsführung in drei Verfahren unterschieden. Der Batch Betrieb wird als geschlossenes, der kontinuierliche Betrieb als offenes und das Zulaufverfahren als teiloffenes System beschrieben [57].

2.7.3.1 Batch-Fermentation

Es handelt sich bei dieser Fermentationsart um ein geschlossenes System. Dem System wird nach Beimpfen mit einer bestimmten Menge Inokulum außer Sauerstoff, Antischaummittel, Säuren und Laugen (zur pH-Wert-Regulation) nichts hinzugefügt und nichts entzogen. Batch-Verfahren zeichnen sich daher meist durch einen geringen apparativen Aufwand aus. Durch den Stoffwechsel der Zellen ändern sich jedoch ständig die Nährbodenzusammensetzung, die Biomasse und die Metabolitenkonzentration bis eine Limitierung z.B. durch das Substrat, ein Spurenelement oder die Sauerstoffkonzentration einsetzt und das Wachstum begrenzt. Daneben kann auch die Inhibierung durch ein gebildetes toxisches Produkt zu einer Verringerung oder zum Stillstand des Zellwachstums führen. Batch-Verfahren können typischerweise durch die in Abb. 5 dargestellte Wachstumskurve charakterisiert werden [58].

In der **lag-Phase** werden Zellen von einem Medium in ein anderes überführt, sie benötigen in aller Regel Zeit, um sich den neuen Kulturbedingungen anzupassen. In dieser Phase findet kein Zellwachstum statt. Die Wachstumsbedingungen, welche sich für die Mikroorganismen bei der Überimpfung ändern können, sind z. B. der pH-Wert des Mediums, das Nährstoffangebot (Kohlenstoff- und Stickstoffquelle) und die Temperatur.

Nach der Adaption an die Kulturbedingungen beginnt das Zellwachstum in der **Zwischenphase**. Da nicht alle Zellen der Population gleichzeitig mit dem Wachstum beginnen und nicht sofort mit der maximalen Geschwindigkeit wachsen, resultiert

daraus die ansteigende Form der Funktion in Richtung der exponentiellen Wachstumsphase.

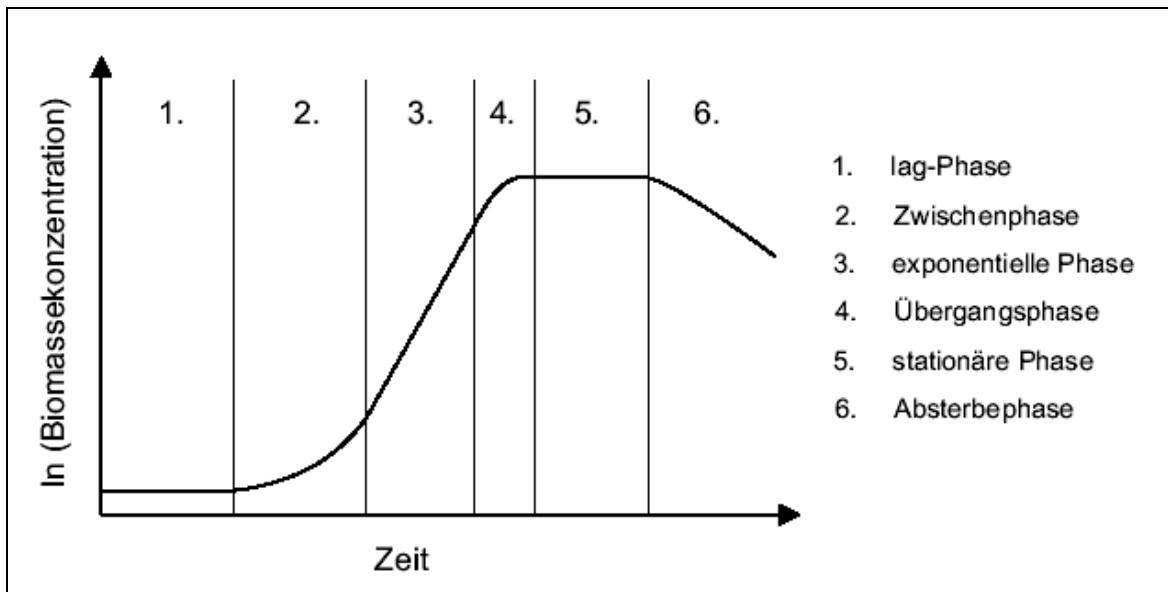


Abb. 5: Typischer Verlauf des Batch-Verfahrens [58]

In der **exponentiellen Phase** sind die Zellen an die Kulturbedingungen optimal angepasst und wachsen mit maximaler Geschwindigkeit. Das Zellwachstum wird in dieser Phase nur durch zellinterne Faktoren begrenzt und folgt einer Kinetik 1. Ordnung, auf die in Gl. 2 eingegangen wird. Der Wert für $\mu_{\max}$ entspricht der Geradensteigung im Bereich der exponentiellen Phase bei einer halblogarithmischen Auftragung (vergl. Abb. 5).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} x \quad (\text{Gl. 1})$$

$\mu_{\max}$: maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]

x : Biomassekonzentration [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]

t : Zeit [h]

Da die Wachstumsgeschwindigkeit eine Funktion der Substratkonzentration ist, tritt schon vor dem vollständigen Verbrauch des Substrats in der **Übergangsphase** eine Verlangsamung des Zellwachstums ein. Das heißt, die Gerade aus dem Bereich des

exponentiellen Wachstums flacht in Richtung $\mu = 0$ ab (Abb. 5). Unter der Annahme, daß die Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleistet ist und nur eine Substanz das Wachstum limitiert, kann die so genannte Monod–Gleichung als Hilfsmittel zur Beschreibung der Übergangsphase verwendet werden [59].

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_l}{S_l + K_s} \quad (\text{Gl.2})$$

$\mu_{\max}$: maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]

μ : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]

K_s : Sättigungskonstante des limitierenden Substrats [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]

S_l : Konzentration des limitierenden Substrats [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]

Ist $S_l > K_s$, folgt aus der Monod–Gleichung, daß μ gegen $\mu_{\max}$ strebt und das Wachstum nur durch zellinterne Faktoren limitiert und daher exponentiell ist. Für $S_l = K_s$ folgt aus Gleichung 2, daß die Substratlimitierung die Wachstumsgeschwindigkeit halbiert und das Wachstum nun durch einen externen Faktor kontrolliert wird. Besonders für Substrate mit kleinen K_s –Werten, wie bei Glukose, ist die Übergangsphase sehr kurz.

Sobald das Hauptsubstrat verbraucht ist oder ein anderer Faktor limitierend wirkt, setzt die **stationäre Phase** ein. In der Phase findet kein Wachstum der Population mehr statt. Die Energie für den Erhaltungsstoffwechsel wird durch Verbrauch von intrazellulären Speicherstoffen erhalten. Lysierte Zellen dienen als Substrat für die verbleibenden Zellen, wodurch die Überlebensfähigkeit der Gesamtpopulation erhöht wird.

In der **Absterbephase** sind die Energieressourcen der Biomasse aufgebraucht. Analog zur exponentiellen Wachstumsphase ist das Sterben der Zellen als Gerade in der halblogarithmischen Auftragung zu erkennen.

2.7.3.2 Fed-Batch-Fermentation (Zulaufverfahren)

Das Fed-Batch-Verfahren ist eine Weiterentwicklung der geschlossenen Batch-Verfahren. Beim Fed-Batch-Verfahren werden die kritischen Nährlösungsbestandteile zunächst in geringeren Konzentrationen als im Batch-Ansatz vorgelegt. Während der Produktionsphase wird dann frisches steriles Substrat kontinuierlich zugegeben.

Es können ein oder mehrere Medienbestandteile während der Fermentation zudosiert werden. Durch die Zudosage kann die Phase des Wachstums verlängert werden. Die Phase des optimalen Wachstums liegt im letzten Drittel der exponentiellen Phase (vergl. Abb. 5). Es kommt durch die Wachstumsverlängerung zu einer höheren Biomassekonzentration im Reaktor, und dadurch kann eine höhere Produktbildungsrate erwartet werden. Der Übergang in die stationäre Phase setzt kontrolliert, durch Unterbrechung der Substratzufuhr, am Fermentationsende ein. Das Zulaufverfahren bietet also die Möglichkeit, den Fermentationsprozeß länger unter Optimalbedingungen zu betreiben und damit die biosynthetische Gesamtleistung der Biomasse zu erhöhen bzw. so weit wie möglich auszuschöpfen [54, 58].

2.7.3.3 Kontinuierliche Fermentation

Diese Art der Fermentation ist eine Modifikation des Fed-Batch-Verfahrens. Es handelt sich um ein offenes System, bei dem sterile Nährlösung kontinuierlich dem Bioreaktor zugegeben und gleichzeitig die gleiche Menge umgesetzte Nährlösung mit Mikroorganismen dem System entnommen wird. Es gibt eine Vielzahl unterschiedliche Typen von kontinuierlicher Fermentation [54, 58].

2.8 Einführung in die Technik der Backhefeproduktion

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* vergärt unter anaeroben bzw. sauerstofflimitierten Bedingungen Zucker (Glucose, Fructose, Maltose, Saccharose) zu Alkohol und Kohlendioxid. Bei der Vergärung von Zuckern wird CO_2 gebildet, als Nebenprodukt entsteht immer Ethanol. Die Hefe soll den Teig durch ihre Kohlendioxidproduktion auftreiben.

Hefebiomasse wird in Fermentationsanlagen vermehrt (propagiert). Durch Variationen von Belüftung und Zuckerzufuhr läßt sich die relative Ausbeute an Hefe und Alkohol verändern. Unter anaeroben Bedingungen gärt Hefe sehr intensiv, wächst aber kaum. Bei Belüftung geht die Gärung zugunsten der Atmung zurück und somit nimmt die Zellvermehrung zu. Diese Eigenschaften von Hefezellen, sich unter aeroben Bedingungen zu vermehren (Pasteur-Effekt) sowie ab einer Zuckerkonzentration von $>100\text{mg/L}$ trotz aerober Bedingungen Ethanol zu bilden (Crabtree-Effekt), müssen zur Erreichung eines schnellen Zellzuwachses und einer optimalen Rohstoffausnutzung während der Backhefeproduktion berücksichtigt werden. So läßt sich durch eine intensive Belüftung der Fermentationslösung bei einer geregelten,

limitierten Zuckerzufuhr die Ausbeute an Backhefe maximieren. Der Ausbeutekoeffizient bei Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle kann einen maximalen Wert von 0,54 erreichen. Das entspricht einer Hefetrockenmasse von 0,54 kg pro kg Glucose [60].

2.8.1 Pasteur Effekt

Louis Pasteur fand 1861 heraus, daß Hefe unter anaeroben Bedingungen mehr Glucose assimiliert als unter aeroben Bedingungen in der gleichen Zeiteinheit. Dagegen bildet Hefe aus einer vorgegebenen Menge Zucker unter aeroben Bedingungen etwa 20 mal mehr Hefebiomasse als unter anaeroben Bedingungen [60]. Bei einigen Hefen läßt sich die Gärung durch kräftige Belüftung fast völlig unterdrücken. Die Gärung ist ein alternativer Stoffwechselweg, der manchen Organismen hilft, lebensfeindliche Zeiten zu überstehen, obwohl dies energetisch ungünstig ist. Steht der Zelle Sauerstoff zur Verfügung, so besteht die Möglichkeit, NAD^+ in einer ausgedehnten Reaktionsfolge (Glykolyse-Citratzyklus-Atmungskette) zu regenerieren und dies bei fast zwanzigfacher Energie- (ATP-) Ausbeute. Am Beispiel der Hefe ließ sich bei Sauerstoffzufuhr die Umstellung von anaerobem auf aeroben Stoffwechsel beobachten. Dies ist ein Phänomen, das als "Pasteur-Effekt" in die Literatur eingegangen ist.

2.8.1.1 Crabtree- Effekt

Der „Crabtree-Effekt“ kann als Sonderfall, bzw. Erweiterung des Pasteur Effekts gesehen werden. Er ist im Katabolismus der Hefe eine Art "Überlaufreaktion" bei der auch unter Anwesenheit von Sauerstoff (aerob) Ethanol produziert werden kann.

Eine wichtige stoffwechselphysiologische Eigenschaft der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht in ihrer Fähigkeit plötzlich von vollständiger Veratmung des Substrates (ohne Alkoholbildung) auf Gärung umzuschalten. Dieser Effekt wird nach dem Entdecker als „Crabtree-Effekt“ bezeichnet. Das plötzliche Umschalten erfolgt nach Erhöhung der Glukosekonzentration $> 100 \text{ mg/L}$ in glukose-limitierter Prozeßführung unter aeroben Bedingungen. Bei der aeroben Produktion von Backhefe ist die Alkoholbildung unerwünscht, da sie zu einer Verminderung des Ausbeutekoeffizienten führt. Die Zuckerkonzentration im Medium muß aus diesem Grund immer unter der für die Alkoholbildung erforderlichen kritischen Konzentration liegen. Für eine schnelle Vermehrung der Hefebiomasse wird zusätzlich die maximale Wachstumsrate angestrebt bei der gerade keine Alkoholbildung auftritt. Dieses Ziel kann

dadurch erreicht werden, daß das Substrat nicht vorgelegt, sondern dem Fermenter kontinuierlich gemäß dem Fed-Batch Verfahren zudosiert wird [61, 62].

2.9 Aufbereitungstechnik

Nach der Fermentation folgt in der Regel die Aufbereitungstechnik. Die gewünschten Fermentationsprodukte müssen durch geeignete Trennverfahren aus der Fermentationsmasse isoliert werden. Dieses so genannte "Downstream-Processing", die Aufarbeitung und Entsorgung, ist Teil der Bioverfahrenstechnik.

2.9.1 Extraktion

Unter Extrahieren ist das Trennen einer fest-flüssigen Phase oder zweier ineinander unlöslicher flüssiger Phasen durch selektives Herauslösen einer oder mehrerer Komponenten mit Hilfe eines Extraktionsmittels (Lösungsmittels) zu verstehen. Das Prozeßziel besteht in der Abtrennung bestimmter Komponenten [63].

Die Einteilung von Extraktionsmethoden erfolgt zunächst über den Aggregatzustand des Extraktionsmittels: Ist es eine Flüssigkeit so wird von z. B. von Flüssigextraktionsverfahren gesprochen. Als weiteres wird der Aggregatzustand der Probe angegeben, so daß man für feste Proben von Flüssig-Festextraktion und für flüssige Proben von Flüssig-Flüssigextraktion spricht. Die beiden Phasen der Probe können fest und flüssig, unmischbare Flüssigkeiten, unmischbare flüssige Phasen oder fest und gasförmig sein. Die Trennprozesse umfassen jeweils zwei Stufen. Die Extraktion macht sich die physikalischen Phänomene Diffusion, Löslichkeit und Gleichgewicht zu nutzen. Bei der Flüssig-Fest-Extraktion muß das Lösungsmittel in die feste Phase diffundieren. Der zu lösende Stoff geht in das Lösungsmittel über. Er muß aus dem mit Lösungsmittel gesättigten Feststoff in die äußere Lösungsmittelphase diffundieren. Die Diffusionsgeschwindigkeit bestimmt die Zeit, die zum Einstellen eines Gleichgewichtes zwischen den Phasen nötig ist [64].

In einem Endextrakt aus einer Extraktionsanlage entspricht die Sättigungskonzentration der höchstmöglichen Konzentration an gelösten Stoffen. Das Verhältnis von Lösungsmitteln zu Feststoff muß hoch genug sein, damit die Zufuhr von frischem Lösungsmittel zu frischem Feststoff die sich bildende Lösung ein Gleichgewicht unterhalb der Sättigungskonzentration für den gelösten Stoff ausbildet. In Anlagen, in denen Feststoffe wiederholt mit rezykliertem Lösungsmittel extrahiert werden redu-

ziert eine hohe Löslichkeit die Zahl der Lösungsmittelumläufe, die zum gewünschten Entzug der zu lösenden Stoffe nötig ist [64].

2.9.2 Präzipitations-Methoden

In den frühen Tagen der Proteinreinigung waren Präzipitationsmethoden von Proteinen, basierend auf Veränderung der Lösungsmittleigenschaften die einzig verfügbare Strategie der Anreicherung. Dies zeigt sich bis heute in einigen ursprünglichen Proteinbezeichnungen (z. B. Globuline, Albumine, Prolamine).

Die Löslichkeit eines Proteins in einem Lösungsmittel wird u. a. von der Verteilung hydrophiler und hydrophober Strukturmerkmale auf seiner Oberfläche bestimmt. Obwohl hydrophobe Strukturelemente bevorzugt im Inneren des Proteins vorliegen, befindet sich (je nach Proteintyp) eine nicht unbedeutende Menge von ihnen auf der Oberfläche und geraten in Kontakt mit dem Lösungsmittel. Das Lösungsmittel der Präzipitationsmethoden ist in den meisten Fällen Wasser. Die Lösungseigenschaften von Proteinen können durch Änderungen der Ionenstärke, des pH-Wertes, der Temperatur, durch Zugabe wasserlöslicher organischer Lösungsmittel, organischer Polymere oder einer Kombination verschiedener Faktoren verändert werden. Am gebräuchlichsten ist dabei die Verwendung neutraler Salze [67].

2.9.2.1 Löslichkeit von Proteinen bei niedrigen Salzkonzentrationen

Die meisten Proteine liegen im Zellinneren in gelöster Form vor. Das Cytoplasma beinhaltet dabei eine hohe Konzentration verschiedenster Proteine, unter physiologischen Bedingungen (Ionenstärke 0,15 – 0,2 M, neutraler pH-Wert). Durch Extraktion des Zellinhaltes können die Bedingungen verändert werden. Die Löslichkeit eines Proteins ist das Resultat mehrerer Effekte:

- ⇒ polarer Wechselwirkungen geladener Strukturelemente mit dem Lösungsmittel
- ⇒ ionischer Wechselwirkungen mit gelöstem Salz
- ⇒ abstoßender elektrostatischer Kräfte zwischen gleichgeladenen Molekülen

Einige Proteine (z. B. Globuline) bilden bereits Präzipitate, wenn die Ionenstärke des Mediums zwischen 0 und dem physiologischen Wert liegt. Dies kann zwei Ursachen haben. Zum einen vermindern große hydrophobe Oberflächenanteile polare und ionische Wechselwirkungen mit Lösungsmittel bzw. Salz. Zum anderen minimiert

eine Nettoladung von Null (isoelektrischer Punkt) elektrostatische Abstoßung und begünstigt hydrophobe Wechselwirkungen untereinander.

Proteine besitzen ihre geringste Löslichkeit im Bereich des isoelektrischen Punktes und lassen sich (ausreichend niedrige Löslichkeit vorausgesetzt) durch entsprechende pH-Änderung präzipitieren [67].

2.9.2.2 Proteinfällung durch Aussalzen bei hohen Salzkonzentrationen

Der Effekt dieser Technik beruht primär auf dem Vorhandensein hydrophober Oberflächenstrukturen. Ein geeignetes Modell zur Veranschaulichung ist folgendes: Wassermoleküle orientieren sich in direkter Nachbarschaft einer hydrophoben Oberfläche und bilden geordnete Hydrathüllen. Dadurch wird die Annäherung und Assoziation zweier solcher hydrophober Oberflächen verhindert. In dem Maße wie nun Salz einem solchen System zugefügt wird, werden die Wassermoleküle zur Hydratisierung der wesentlich polarerer Ionen benötigt und zunehmend von der Proteinhülle abgezogen. Die freien hydrophoben Flächen können nun aggregieren, das Protein fällt aus. Proteine mit einem hohen Anteil hydrophober Oberflächenstrukturen aggregieren bei steigender Salzkonzentration entsprechend früh. Die Art der Ionen spielt beim Aussalzen eine große Rolle. Günstig sind Salze aus mehrwertigen Anionen (Sulfat, Phosphat) und einem, zum Protein chemisch unwirksamen, Kationen (Ammonium, Kalium, Natrium). Ammoniumsulfat ist aus mehreren Gründen das am häufigsten benutzte ionische Fällungsmittel:

- ⇒ ausreichend gut wasserlöslich (bis 4 M)
- ⇒ keine signifikante Lösungswärme
- ⇒ günstige Dichte (zum Abzentrifugieren wichtig)
- ⇒ stabilisiert Enzymaktivitäten
- ⇒ verhindert mikrobielles Wachstum

Für das Aussalzen von Proteinen existieren verschiedene Methoden. Ist das Volumen der Proteinlösung groß, empfiehlt sich die Fällung mit festem Salz. Es wird in fein pulverisierter Form unter Rühren des gekühlten Fällungsansatzes portionsweise zugegeben, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist. Nach ausreichender Äquilibrierung wird Präzipitat und Lösung durch Zentrifugation getrennt [67].

2.9.2.3 Proteinfällung durch organische Lösungsmittel

Die Fällung von Proteinen durch wasserlösliche organische Lösungsmittel (z. B. Ethanol, Aceton, Methanol, Propanol) findet vergleichsweise geringe Anwendung. Da diese Art der Fällung auf anderen Phänomenen beruht als die Fällung durch Aussalzen, stellt sie eine zusätzliche Möglichkeit zur Anreicherung dar. Ein Vorteil von Wasser/Lösungsmittel-Gemischen ist die Möglichkeit des Arbeitens bei Temperaturen unter 0 °C, was notwendig wird, falls bei Temperaturen oberhalb 10 °C Denaturierungseffekte auftreten [67].

2.9.2.4 Proteinfällung durch Denaturierung; Hitzefällung

Besitzt das aufzureinigende Protein eine überdurchschnittliche Hitzestabilität ($\geq 50^{\circ}\text{C}$), ist die Hitzefällung eine außerordentlich einfache Möglichkeit der Anreicherung. Proteine, die durch die Hitzeeinwirkung koagulieren, können leicht abgetrennt werden [65, 66, 67].

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden ausschließlich allgemeingültige Verfahrensweisen und Versuchsbedingungen beschrieben. Detaillierten Beschreibungen der Versuchsdurchführungen erfolgen im nachfolgendem Kapitel, wobei variierende Versuchsbedingungen gleichzeitig mit den Ergebnissen diskutiert werden.

3.1 Hefen, Nährmedium und Propagation

3.1.1 Verwendete Hefen

Als Ausgangsmaterial für die durchgeführten Versuche dienten transgene Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Hefetransformanten wurden von der Arbeitsgruppe Stahl/ Hinzmann zur Verfügung gestellt. Für die Versuche Nr. 1 und Nr. 28 wurde käufliche Bäckerhefe vom Typ 2.200 verwendet.

Tab. 3: Codierung der eingesetzten Hefetransformanten.

Transformant (Code)	Expression von (Glutenin-Untereinheit)	Bezeichnung	Spenderorganismus	Empfängerorganismus
A	HMW-1Dx5	YpADH-HMW Dx5 leu2d/URA3	Triticum aestivum (Cheyenne)	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3Δpmt1
B	LMW-a3	YpADH-LMW6ΔPst1	Triticum aestivum (Cheyenne)	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3
C	HMW-1Dx5	YpADH-HMW ml-HMW Dx5 leu2d	Triticum aestivum (Cheyenne)	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3Δpmt1
D	LMW-a3	YpADH-D1-γ-LMW6 leu2d	Triticum aestivum (Cheyenne)	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3Δpmt1Δprb1
E	HMW-1Dx5 + HMW-1Dy10	YpADH-HMW ml-HMW Dx5 leu2d Dy10 in die Delta Sequenzen genomisch integriert	Triticum aestivum (Cheyenne)	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3Δpmt1
F	LMW-a3 + HMW-1Dy10	YpADH-D1-γ-LMW6 leu2d Dy10 in die Delta Sequenzen genomisch integriert	Triticum aestivum (Cheyenne)	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3Δpmt1
G	HMW-1Dy10	YpADH-HMW ml-HMW Dy10 leu2d	Triticum aestivum (Cheyenne)	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3Δpmt1
H	-	pYex-Bx	-	Saccharomyces cerevisiae AH22ura3Δpmt1

Zur Vereinfachung der weiteren Betrachtungen wurden den verschiedenen Hefetransformanten ein entsprechender Code in alphabetischer Reihenfolge zugewiesen. Die genauen Bezeichnungen und Details sind in Tab. 3 aufgelistet.

3.1.2 Herstellung des Fermentationssubstrates/ Medienvorbereitung

Alle Versuchshefen wurden mit DS-Medium propagiert. Die Nährstoffzusammensetzung des DS-Mediums, welches für die Batch- und die Fed-Batch-Propagation eingesetzt wurde, ist in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammensetzung des DS-Mediums für die Hefepropagation im Batch- und Fed-Batch-Verfahren.

Nährstoffe	Batch-Substrat [g/L]	Fed-Batch-Substrat [g/L]
Saccharose	50	100
Ammoniumsulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	5	7,0
Natriumglutamat (Monohydrat)	10	20
Ammoniumdihydrogenphosphat $[(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4]$	3,2	1,9
Kaliumchlorid $[\text{KCl}]$	1,5	-
Magnesiumsulfat $[\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}]$	0,75	1,0
Calciumchlorid $[\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}]$	0,1	-
Myo-Inositol	0,1	0,2
N-Z-AMINE A (Sigma)	5,0	10,0

Die Nährstoffe des DS-Mediums wurden in Leitungswasser gelöst und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die anschließende Sterilisation des Batch-Substrates erfolgte im Fermenter. Hierfür wurde die vorbereitete Substratlösung in den Fermenter überführt und dieser im Sterilisationsmodus betrieben. Während der Sterilisationszeit wurden gleichzeitig der Zu- und Abluftfilter sowie die Peripherie des Substratzulaufes vom Dampf durchströmt und dadurch sterilisiert. Im Anschluß wurde der Fermenterinhalt auf die voreingestellte Propagationstemperatur abgekühlt. Die Sterilisation des Fed-Batch-Substrates erfolgte außerhalb des Fermenters. Dazu wurde die vorbereitete Substratlösung in ein handelsübliches Edelstahlbierfaß mit 50 L Fassungsvermögen überführt und dieses im Autoklaven sterilisiert. Im Anschluß wurde das Faß bis auf Raumtemperatur im Autoklaven abgekühlt. Die anschließende Zugabe von Vitamin-,

Spurenelemente- und Eisensulfatlösung ($2 \text{ g/L FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) zum DS-Medium erfolgte erst nach Abkühlung auf Raumtemperatur. Die vorbereiteten Lösungen wurden durch Filtration über einen Sterilfilterspritzenaufsatz (Sartorius Minisart SM 16534 mit $0,2 \mu\text{m}$ Trennungsschärfe) entkeimt und direkt in den Fermenter bzw. in das Bierfaß zum sterilen, abgekühlten DS-Medium zugegeben. Die Tab. 5 gibt eine Übersicht zu den Komponenten und Nährstoffmengen der Vitamin- und Spurenelementlösung.

Tab. 5: Zusammensetzung der Vitamin- und Spurenelementlösung.

Nährstoffe	Vitaminlösung [g/L]	Spurenelementlösung [g/L]
Biotin	0,0115	
Kalzium-D-Pantotenat	2,0	
Pyridoxin	2,0	
Thiaminhydrochlorid	2,0	
Nicotinsäure	2,0	
Zinksulfat [$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$]		7,0
Kupfersulfat [$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$]		0,4
Natriummolybdat [$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$]		0,4
Mangansulfat [$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$]		7,0

Die benötigten Lösungsmengen waren für das Batch- und das Fed-Batch-Substrat verschieden. Tab. 6 zeigt die zugegebenen Mengen der Vitamin-, Spurenelemente- und Eisensulfatlösung pro Liter DS-Medium.

Tab. 6: Zugabemengen der Vitamin-, Spurenelemente- und Eisensulfatlösung.

Lösung	Batch-Substrat [mL/L]	Fed-Batch-Substrat [mL/L]
Vitaminlösung	4	8
Spurenelementlösung	4	8
Eisensulfatlösung	1	2

3.1.3 Herstellung des Inokulums, Anzucht der Hefestämme

Bei allen Versuchen erfolgte die Anzucht des Inokulums in drei Stufen. Ausgehend vom Plattenabstrich der Versuchshefe mittels Impföse wurden 10 mL steriles Batch-Substrat im Erlenmeyerkolben beimpft. Nach 24 h Schütteln bei Raumtemperatur wurde der Kolbeninhalt in einen mit 250 mL sterilem Batch-Substrat vorbereiteten Erlenmeyerkolben übergeimpft. Nach 24stündigen Schütteln bei Raumtemperatur wurde bei den einzelnen Versuchen differenziert vorgegangen.

Bei den Versuchen 1 bis 5 wurde der Kolbeninhalt in einen mit 2500 mL sterilem Batch-Substrat vorbereiteten Erlenmeyerkolben übergeimpft und anschließend weitere 48 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Bei den Versuchen 6 bis 8 wurde der Kolbeninhalt in einen mit 3000 mL sterilem Batch-Substrat vorbereiteten Erlenmeyerkolben übergeimpft und anschließend weitere 48 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Bei den Versuchen 9 bis 29 erfolgte das Überimpfen in eine mit 5 Liter sterilem Batch-Substrat vorbereitete 10 Liter Steilwandflasche (Abb. 6) mit Belüftungsrohr. Im Anschluß wurde 60 h bei Raumtemperatur unter steriler Belüftung inkubiert.



Abb. 6: Letzte Phase der Inokulumanzucht in einer 10 L Steilwandflasche

Die Herstellung des Inokulums wurde im Parallelansatz durchgeführt, so daß zur Beimpfung des Fermenters 6, 7 bzw. 10 Liter zur Verfügung standen.

3.1.4 Beschreibung der Propagationsanlage A

Zu Beginn der Projektarbeit wurden vier Propagationsversuche in einer bereits in einem früheren Projekt entwickelten und für das Verfahren modifizierten Fermentationsanlage durchgeführt. Die Propagationsanlage ist in der Abb. 7 dargestellt. Der dazu gehörige Fermenter bestand aus einem Doppelmantelbehälter aus Edelstahl. Er hatte ein Durchmesser-Höhenverhältnis von 1:5. Das Nutzvolumen betrug ca. 50 Liter. In der Kopfplatte war ein Rührwerk mit einer doppelten, kondensatgeschmierten Gleitringdichtung eingebaut. Als Rührorgane dienten drei achtblättrige Scheibenrührer. Der Fermenter wurde mit atmosphärischem Dampf sterilisiert. Der Fermenterinhalt wurde über den Doppelmantel des Kessels mit Wasser über einen Thermostaten temperiert.

Die Sauerstoffversorgung wurde durch Einblasen von Druckluft realisiert. Die Keimfreiheit der Luft wurde durch einen Sterilluftfilter (CPM Ecofiltersystem Typ: PSF-8206) gewährleistet. Die Einführung der Luft in den Fermenterinhalt wurde durch eine Edelstahl-Sinterplatte im Bodenbereich des Kessel (unterhalb der unteren Rührwerksscheibe) realisiert. Dabei erfolgte die Einstellung der zugeführten Luftmenge manuell.

Der gelöste Sauerstoffgehalt in der Fermentationsflüssigkeit wurde laufend mit einem Sensor (YOKOGAWA SM31) erfaßt.

Das Substrat wurde über sterilisierbare Membran-Kolbenpumpen (Jesco: ML 75) zugeführt. Zum Schaumabbau wurde dem Fermenter eine Entschäumerlösung mit einer Schlauchpumpe (Masterflex: 7518-10) zugeführt.

Die Aufnahme des pH-Werts erfolgte durch eine Elektrode (Mettler Toledo: InPro 3000). Der Ethanolgehalt wurde mit einem Widerstandsmeßsystem (Kempe: Silicon-Tubing-Sonde) erfaßt. Der Füllstand des Fermenters wurde indirekt über die Bestimmung des Gewichtes des Fermenters ermittelt. Dazu war am Fuß des Fermentationsbehälters eine Druckmeßdose (Schenk: Ecocont) angebracht. Schaumentwicklung wurde durch eine am Schauglas des Abluftrohres angebrachte Lichtschranke (Eigenbau) festgestellt. Über eine Steuerung (HP VEE) wurde dann bei Bedarf Entschäumer zugegeben.



Abb. 7: Aufbau der Propagationsanlage A

Der Substratzufluß wurde mit einem PC (HP: Vectra 500) gesteuert. Außerdem wurden alle Meßgrößen vom PC aufgenommen und weiterverarbeitet. Dazu wurde als Programmieroberfläche das Programm HP VEE (Hewlett Packard) genutzt. Dieses Programm nahm die Meßwerte über eine A/D-Wandlerkarte in den Rechner auf und sendete die daraus errechneten Regelwerte über eine D/A-Wandler- und eine Relaiskarte an die Fermentationsanlage. Die genannten Karten (Meilhaus) waren im PC bzw. im Schaltschrank eingebaut.

Nachfolgend wird diese Propagationsanlage zur Differenzierung der Propagationsergebnisse gegenüber der mit dem neu angeschafften Propagationsanlage als Fermenter A bezeichnet.

3.1.5 Beschreibung der Propagationsanlage B

Die Fortführung der Projektarbeit erfolgte mit dem neu angeschafften Fermenter (Typ P; Bioengineering AG), der zur Propagation der Hefen als Produktionseinheit eingesetzt wurde. Diese Propagationsanlage wird nachfolgend als Fermenter B bezeichnet. Die Beschaffung der Propagationsanlage B wurde notwendig, da sich deutliche Mängel an der bestehenden Propagationsanlage A bemerkbar machten. Trotz Dampfsterilisierbarkeit der gesamten Anlage A war eine sterile Arbeitsweise während der Hefepropagation nur kurzzeitig möglich. Grund hierfür sind bauliche Mängel der Eigenkonstruktion. Somit ist war kaum möglich, konstante und reproduzierbare Verhältnisse zu schaffen, die für die weitere Optimierung des Vermehrungsprozesses dringend notwendig waren. Zudem begrenzte das geringe Nutzvolumen von 50 Liter sowie eine ungenügende Sauerstoffversorgung durch erwähnten Konstruktionsmangel die Hefeerntemenge auf ca. 1kg Trockensubstanz.

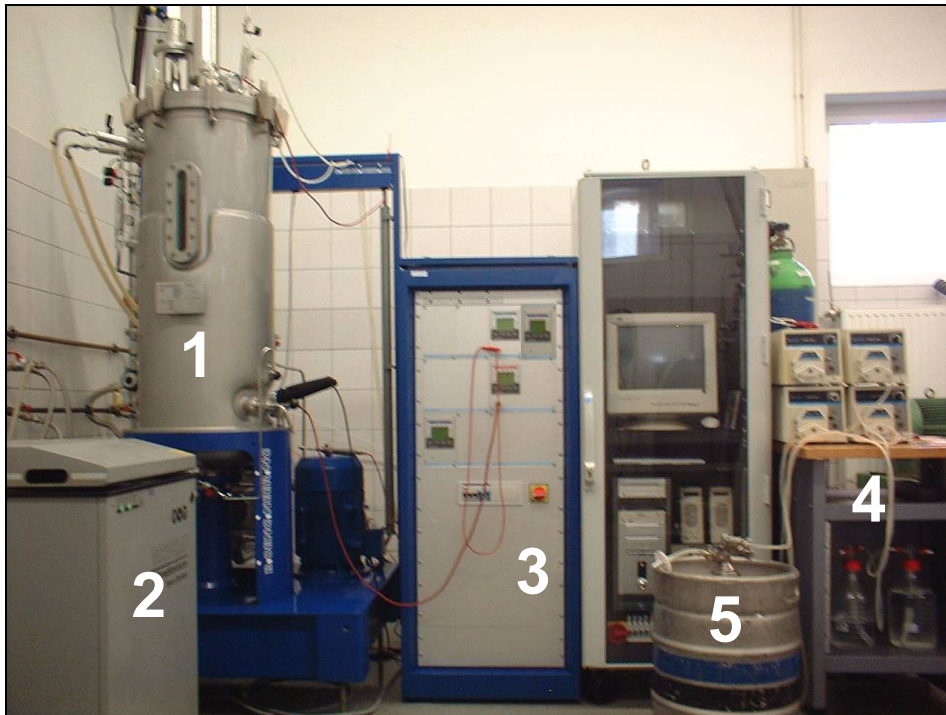
Die Abb. 8 zeigt die wesentlichen Anlagenteile Propagationsanlage B. Zur Anlage gehört ein Meß- und Regelschrank, welcher über die nötige Hard- und Software (HP-VEE) verfügt. Der Fermenterkessel (Doppelmantelbehälter) hat ein Gesamtvolumen von 150 Liter und ist aus säurebeständigem Stahl gefertigt. In den Kesselboden ist ein Rührwerk mit einer doppelten Gleitringdichtung mit Glycerinüberlagerung eingebaut. Die Rührorgane sind zwei sechsblättrige Scheibenrührer.

Die Kesselgeometrie beträgt 3:1 (Höhen-Durchmesserverhältnis). Das Nutzvolumen entsprach 100 Liter. Seitlich am Kessel sind fünf Normstutzen angebracht, diese dienen der Aufnahme der Meßsensoren sowie des Probenahmeventils.

Der Fermenterfüllstand wurde über eine hydrostatische Füllstandsmessung ermittelt.

Der Zudosage von Substrat, Säure, Lauge und Entschäumerlösung wurde über die Software HP VEE (Hewlett Packard) gesteuert. Dieses Programm nimmt die Meßwerte über eine A/D-Wandlerkarte in den Rechner auf und sendet Regelwerte über eine D/A-Wandler- und eine Relaiskarte an die Fermentationsanlage. Die genannten Karten (ME Meilhaus) sind im PC bzw. im Schaltschrank eingebaut. Alle Funktionen, wie z.B. Kalibrierung und Parametrisierung wurden über eine Menüsteuerung am Display realisiert. Das Informationsfenster zeigte den Sollwert und den Istwert sowie den Alarmstatus und die Betriebsart an. Der angeschlossene PC diente als Anzei-

gemodul für die der aufgearbeiteten Meßwerte. Außerdem konnten sämtliche Einstellungen über die PC Steuerung vorgenommen werden.



1 Fermenter; 2 Autoklav, 3 Meß- und Regeleinheit; 4 Dosage für Substrat, Säure, Lauge und Entschäumer; 5 Bierfaß mit sterilisiertem Substrat

Abb. 8: Neue Propagationsanlage im Technikummaßstab

Die Sauerstoffversorgung wurde durch Einblasen von Druckluft realisiert. Die Keimfreiheit der Luft wurde durch den im Fermenter integrierten Autosterilfilter gewährleistet. Die Luft wurde in den Fermenterinhalt durch ein perforiertes ringförmiges Rohr im Bodenbereich des Kessel (unterhalb der unteren Rührwerksscheibe) eingeführt. Dabei erfolgte die Einstellung der zugeführten Luftmenge manuell. Der gelöste Sauerstoffgehalt in der Fermentationsflüssigkeit wurde laufend mit einem Sensor (YOKOGAWA: SM31) erfaßt.

Die Entschäumung wurde über einen speziell konfigurierten IFM- Universalregler geregelt. Dazu wurde das Schaumniveau von einer Sonde gemessen, die mit dem Schaumregler verbunden war, so daß bei Bedarf Entschäumerlösung durch ansteuern einer Schlauchpumpe (Masterflex: 7518-10) zudosiert werden konnte. Die Entschäumerlösung wurde durch eine Membrananschlußtechnik mit Sterilhülse, Stechnadel und Septum in der Kopfplatte des Fermenters zudosiert.

Die Säure bzw. Lauge wurde durch eine Membrananschlußtechnik mit Sterilhülse, Stechnadel und Septum in der Kopfplatte des Fermenters zudosiert.

Zur Messung und Regelung der Temperatur wurde der Temperaturregler der Firma Bioengineering (IFM Regler) eingesetzt. Dieses Gerät besteht aus dem eigentlichen Regler, dem IFM-Modul, und einem dazugehörigen grafikfähigem Display Modul.

Der Fermenterinhalt wurde über den Doppelmantel des Kessels mit Wasser über einen Sekundärkreislauf temperiert. Dieser wurde primär über einen Plattenwärmetauscher mit Leitungswasser und Dampf gekühlt bzw. beheizt.

Die Messung des pH-Wertes erfolgte durch eine Elektrode (Mettler Toledo: InPro 3000). Diese Meßgröße wurde von der Regeleinheit erfaßt und ausgewertet. Somit war es möglich durch Zudosage von Lauge bzw. Säure eine pH-Wertkorrektur durchzuführen. Für die Dosage von Lauge und Säure wurden dazu von der Regeleinheit zwei Schlauchpumpen (Masterflex: 7518-10) getrennt angesteuert.

Ein Widerstandsmeßsystem diente zur Erfassung des Ethanol-Gehalts (Kempe Silicon-Tubing-Sonde). Diese Meßgröße wurde von der Regeleinheit erfaßt und ausgewertet. Somit war es möglich, die Zudosage von sterilem Substrat in Abhängigkeit vom Ethanolgehalt zu regeln. Die Dosage des Substrates erfolgte über die Ansteuerung einer Schlauchpumpe (Masterflex: 7518-10) über das vorhandene Einlaßventil im oberen Teil des Fermenters.

3.2 Beschreibung und Betrieb des Tellerseparators

Zur Aufkonzentrierung der Hefesuspension wurde ein selbstaustragender Tellerseparator (GEA Westfalia Separator AG Nr. 1723 406 Typ SC 6) verwendet (Abb. 9). Bei der Beschaffung der Anlage wurde großes Augenmerk auf die aerosoldichtheit der Konstruktion gelegt. Nur diese Bauart gewährleistete im Betrieb die Einhaltung der S-1 Sicherheitsvorschriften. Der Separator besteht aus einer Antriebseinheit (E-Motor und Getriebe), einer Steuereinheit (Schaltschrank) sowie der Separatoreinheit. Die Separatortrommel erreichte bei einer Arbeitsdrehzahl von 11800 min^{-1} eine Radialbeschleunigung von knapp $15000 \cdot g$ am größten Radius des Trommelinnenraumes. Das Schlammvolumen kann im Trommelinnenraum bis maximal 1,8 Liter betragen.

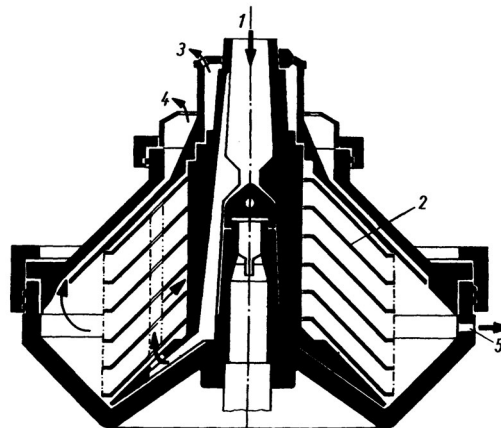


Abb. 9: Ansicht des selbstaustragender Tellerseparators mit Funktionsschnittbild

Die Einstellung des optimalen Teilentleerungsintervalls des Schlammraums und die Entleerungszeit mußten experimentell ermittelt werden. Sie hängen vom Volumenstrom der Suspension, deren Feststoffgehalt sowie dem Sedimentationsverhalten des Feststoffs in der flüssigen Phase ab.

3.3 Beschreibung und Betrieb der Ringspaltkugelmühle (CoBall-Mill)

Der mechanische Aufschluß der Hefezellen erfolgte mit einer Ringspaltkugelmühle (Fryma, CoBall-Mill, Typ MS 12). Die Ringspaltkugelmühle sowie eine graphische Darstellung ihrer Funktion zeigt Abb. 10. Die Mühle besteht aus einem am Maschinengehäuse befestigten, feststehenden Mahlbehälter (Stator), in den der durch einen Elektromotor angetriebene Rotor hineinragt. Stator und Rotor der Ringspaltkugelmühle bilden einen w-förmigen Mahlraum, der bis zu einem gewissen Füllgrad mit Mahlkugeln ausgefüllt und vom in einer Flüssigkeit suspendierten Mahlgut durchströmt wird. Durch die konische Form von Rotor und Stator bildet sich ein Gradient für die Intensität der Mahlwirkung aus, die mit dem Abstand des Mahlspalts von der Drehachse wächst. In dem Mahlspace, der eine Höhe von 6,5 mm besitzt, werden die Mahlkugeln (Material: ZrO_2 ; 0,8 bis 1,0 mm Durchmesser) durch die Rotation des Rotors von innen nach außen radial bewegt. Die kinetische Energie der Mahlkugeln nimmt in der gleichen Richtung wie die Mahlintensität zu. Die unter der Mahlwirkung entstehende Wärme wird über die Wassermantelkühlung abgeführt.

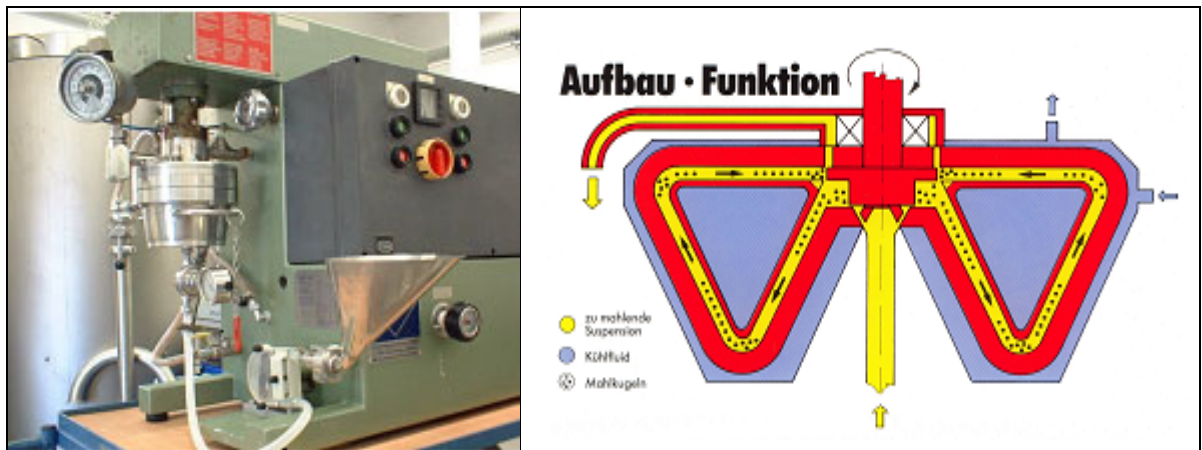


Abb. 10: Ansicht der Ringspaltkugelmühle mit Funktionsschnittbild

Das Mahlgut wird mittels einer in die Mühle integrierten Schlauchpumpe zentral von unten über einen Ringspalt an der Motorachse zugeführt. Es durchströmt den Mahlraum von außen nach innen und verläßt ihn in der Nähe der Rotorachse über ein

Trennsieb, das die Mahlkugeln zurückhält, die durch Rückführkanäle zum Eingang des Mahlraums zurückgeführt werden [68].

Die Kugelschüttung im Mahlraum betrug für den Aufschluß der Hefezellen 280 mL. Die Tab. 7 zeigt eine Übersicht aller Merkmale und Parameter der verwendeten Ringspaltkugelmühle.

Tab. 7: Merkmale und Parameter der verwendeten Ringspaltkugelmühle (Fryma, CoBall-Mill, Type MS 12).

Merkmale und technische Parameter	Spezifikation
Rotor- und Statorwerkstoff	ZrSiO ₄
Mahlkörperwerkstoff	ZrO ₂
Mahlspalt	6,5 mm
effektives Mahlraumvolumen	456 mL
Mahlkugeldurchmesser	0,8– 1,0 mm
Kugelfüllgrad	62 %
maximale Drehzahl	2648 min ⁻¹
maximaler Rotoraußendurchmesser	129,2 mm
maximale Umfangsgeschwindigkeit	17,7 m/s
Produktzufuhr	variabel
Arbeitsmedium	Hefesuspension

3.4 Beschreibung und Betrieb der Extraktionsanlage

Die Extraktionsanlage bestand aus dem Extraktionsbehälter, einem Ultra-Turrax (System Törner mit Zerkleinerungswerkzeug Typ S 50 KR-G 45 M, IKA-Werke) mit Durchflußzelle (Eigenbau) und einem Thermostaten. Der Behälter des Fermenters A diente als Extraktionsgefäß. Das Extraktionsmittel war ein Gemisch aus Wasser und 2-Propanol unter Zusatz von Reduktionsmitteln. Die Beheizung der Extraktionssuspension erfolgte über den Doppelmantel des Fermenters, welcher mit einem Thermostaten bei 60°C temperiert wurde. Die Extraktionssuspension wurde während der zweistündigen Extraktionszeit durch das integrierte Rührwerk homogen gehalten.

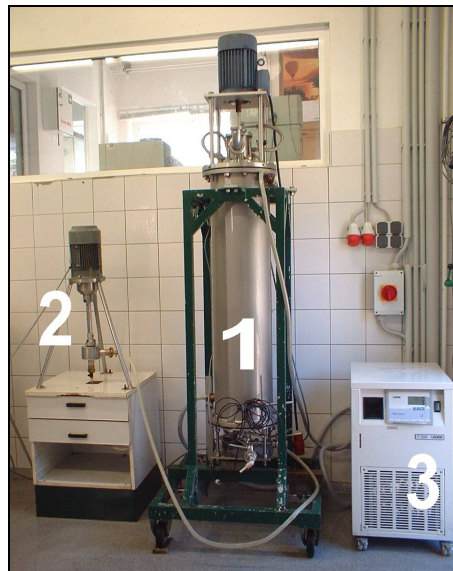


Abb. 11: Extraktionsanlage mit den Prozeßeinheiten: Extraktionsbehälter (1); Ultra-Turrax (2) und Thermostat (3)

Zur Unterstützung der Lösungsvorgänge wurde die gesamte Extraktionssuspension während der Extraktionszeit einer Ultra-Turrax-Behandlung bei 4200 min^{-1} unterzogen. Die Behandlung erfolgte am Teilstrom, wobei der Quotient des Gesamtvolumens zum Volumenstrom ca. 5 min war, d. h. das Gesamtvolumen wurde innerhalb von 5 min einmal einer Ultra-Turrax-Behandlung unterzogen. Nach beendeter Extraktionszeit wurde die Extraktionssuspension auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Hilfe einer Becherzentrifuge (Fassungsvermögen von 4 Bechern = 3 Liter) von ungelösten Feststoffen befreit.

3.5 Beschreibung der Proteinpräzipitation zu Herstellung der WSP- Rohpräparate

Der WSP-haltige, alkoholische Überstand aus dem Extraktionsprozeß wurde in einem Proteinfällungsverfahren weiterverarbeitet, um die darin gelösten WSP als WSP-Rohpräparate zu gewinnen. Ziel war es, die WSP möglichst vollständig zu präzipitieren und aus dem alkoholischen Überstand abzutrennen.

Die Präzipitation erfolgte bei einem Teil der Versuche durch weitere Zugabe von wasserfreien oder 85%igen 2-Propanol zum Extraktionsüberstand bis eine 2-Propanolkonzentration von ≥ 80 Vol% erreicht wurde. Das Mischungsverhältnis vom alkoholischen Überstand mit dem zugegebenen 2-Propanol wurde aus den 2-Propanolkonzentrationen der beiden Mischungspartner ermittelt. Die Präzipitation wurde in PE-Fässern mit einem Fassungsvermögen von ca. 150 Litern durchgeführt. Im Anschluß an die Propanolzugabe wurden die Fässer zur Sedimentation des Präzipitates bei 4°C für 2 Tage in einer Kühlzelle eingelagert. Während dieser Zeit erfolgte eine vollständige Sedimentation des WSP-haltigen Präzipitates. Der Überstand wurde durch Abpumpen vom Sediment dekantiert. Das Sediment wurde durch Zentrifugieren (Becherzentrifuge, 5 min bei $5000 \text{ min}^{-1} = 5500 \cdot g$ am maximalen Radius) verdichtet. Das verdichtete Sediment wurde im 10fachen seines Volumens in Wasser aufgenommen und danach erneut zentrifugiert. Das so aufgereinigte Sediment bildete das feuchte WSP-Rohpräparat, das als Pellet in den Bechern der Zentrifuge anfiel. Die Pellets wurden nach Resuspension im 5fachen ihres Volumens mit Wasser in 1000 mL fassende Rundkolben gefüllt und in einem Kühlbad unter Rotation tiefgefroren. Die in den Kolben tiefgefrorenen Pellets wurden für mindestens 48 h lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Fa. CHRIST: BETA 1-16). Das trockene Pellet wurde durch Zerreiben im Mörser zum WSP-Rohpräparat homogenisiert.

Ein wesentlicher Nachteil dieser Vorgehensweise besteht in der Handhabung der großen Alkoholmengen die benötigt werden, um den 30 bis 40 Vol% 2-Propanol enthaltenden Extraktionsüberstand auf ≥ 80 Vol% 2-Propanol aufzukonzentrieren. Dieser arbeitstechnische Nachteil stellte außerdem ein sicherheitstechnisches Risiko und auch einen erheblichen Kostenfaktor für die Gewinnung des WSP-Rohpräparats dar. Dieser risikobehaftete Nachteil konnte weder auf Dauer der Projektdurchführung getragen werden, noch würde er für die Umsetzung des Pilotmaßstabes in den tech-

nischen Maßstab angenommen werden können. Es mußte deshalb versucht werden, den Nachteil durch die Entwicklung eines für die WSP-Rohpräparatgewinnung geeigneten Verfahrens zu überwinden. Die Überlegungen gingen in die Richtung, ein Präzipitationsverfahren zu entwickeln, das im kleineren Volumenmaßstab realisierbar sein sollte und möglichst ohne weiteren Verbrauch an 2-Propanol durchführbar sein sollte.

Die Verfahrensentwicklung gründeten wir auf die von uns überraschend gemachte Beobachtung, daß Mischungen aus 2-Propanol und Wasser durch die Zugabe von Ammoniumsulfat in zwei Phasen getrennt werden können, die sich so in der Dichte unterscheiden, daß darin präzipitierendes WSP auf der schwereren Phase aufschwimmen und in der leichteren absinken kann.

Es ergeben sich deshalb drei Phasen unterschiedlicher Zusammensetzung, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Dekantation voneinander getrennt werden können. Der erfinderische Gedanke besteht demzufolge darin, den alkoholischen, WSP-haltigen Extraktionsüberstand, in drei unterschiedlich zusammengesetzte und verschieden dichte Phasen durch Anreicherung mit Ammoniumsulfat bis zur Sättigung dergestalt zu entmischen, daß die WSP gefällt werden und in die volumenmäßig kleinste Phase übergehen, deren Dichte kleiner als die der schwersten und größer als die der leichtesten der drei Phasen ist.

Für die Entwicklung des Verfahrens war es ausschlaggebend, daß sich die Lösung aus 2-Propanol, Wasser und Ammoniumsulfat beim Erreichen der vom Wasseranteil der Lösung abhängenden Sättigungskonzentration mit Ammoniumsulfat (Abb. 12) in zwei Phasen entmischt. Der Volumenanteil der leichteren, oberen Phase folgt dabei praktisch linear dem Volumenanteil des 2-Propanols in der Mischung (Abb. 13). Das Gleiche gilt invers für die untere, schwerere Phase. Dabei ist der Temperatureinfluß auf die Volumenanteile der beiden Phasen im Bereich von 20-30°C praktisch vernachlässigbar klein.

Wichtig ist weiter, daß die Löslichkeit von Ammoniumsulfat in der sich beim Entmischen bildenden oberen Phase sehr klein ist. Sie beträgt im Bereich der Volumenkonzentration des 2-Propanols in der Lösung von < 30 bis 70 Vol% bei einer Temperatur zwischen 20-30°C nur 0,5-0,3 g/L der Oberphase. Deshalb stellt sich die 2-Propanolkonzentration in der Oberphase in dem Konzentrationsbereich der Mischung bei Sättigungskonzentration der Lösung mit Ammoniumsulfat im

Temperaturbereich von 20-30°C zwischen 82-84 Vol% ein, was einer Dichte von 0,836-0,833 kg/L entspricht (Abb. 14). Damit ist die Bedingung erfüllt, daß in der Mischung gelöstes WSP ausfallen muß.

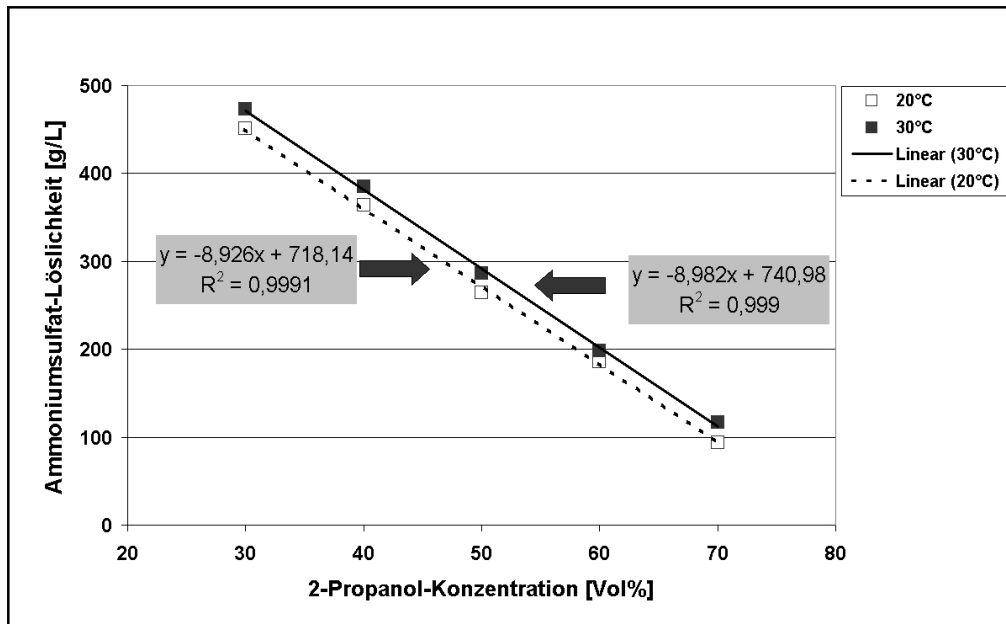


Abb. 12: Verbrauch an Ammoniumsulfat zur Sättigung von 2-Propanol-Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen

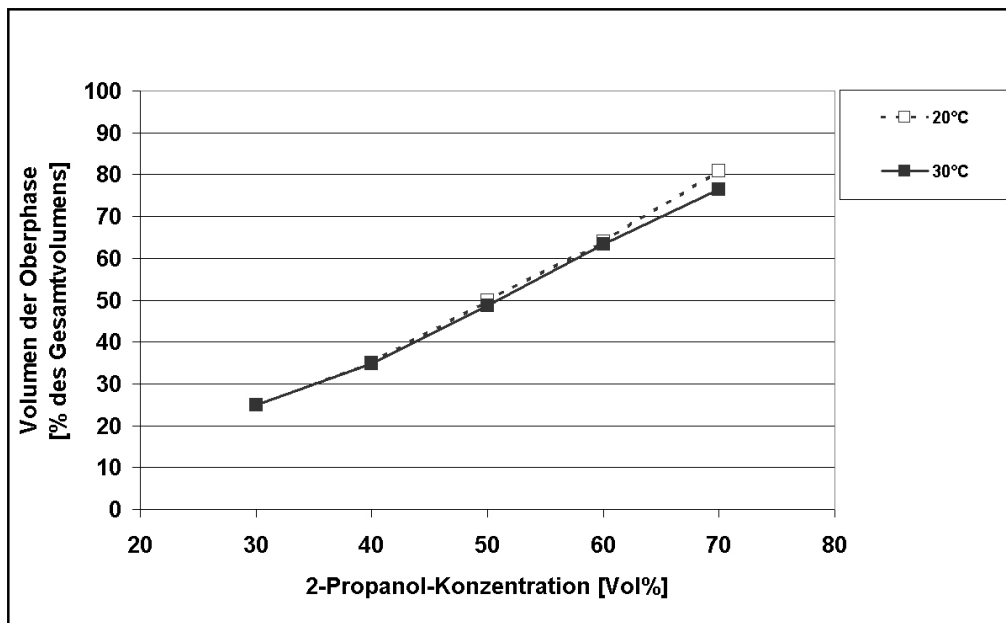


Abb. 13: Volumenverhältnisse der Oberphase bei Sättigung von 2-Propanol-Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen

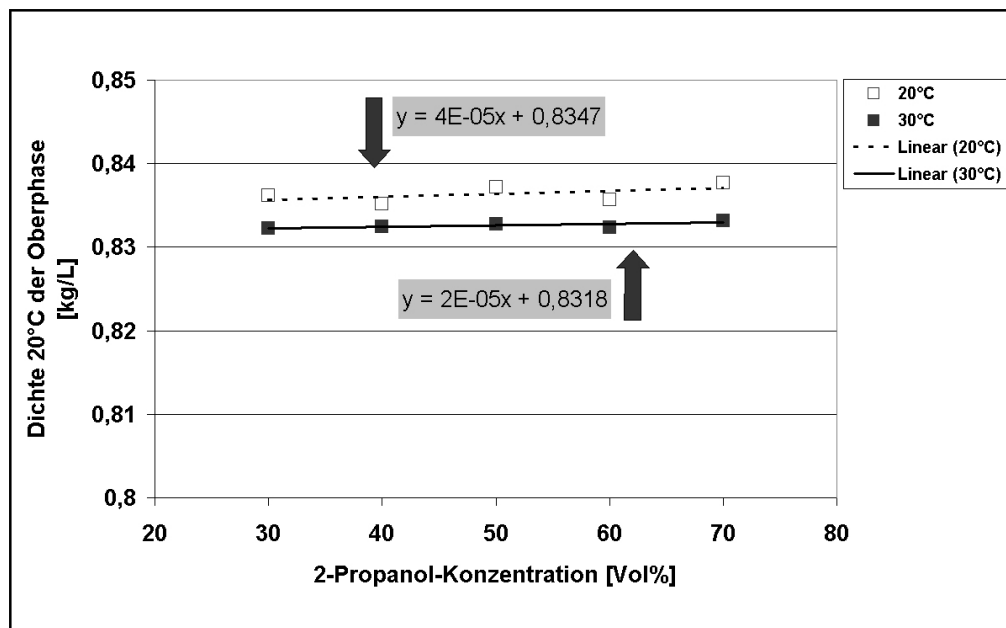


Abb. 14: Dichte der Oberphase bei Sättigung von 2-Propanol-Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen

Gleichzeitig ist in der Unterphase die Ammoniumsulfatkonzentration so groß, daß das in der Mischung gelöste Protein auch ausgesalzt wird. Somit sind in der entmischten Lösung zwei Wirkungsmechanismen für das Präzipitieren des Proteins verantwortlich. Für die Abtrennung von WSP ist es nun entscheidend, daß die untere Phase im Bereich von Lösungen mit 2-Propanolkonzentrationen zwischen 30-50 Vol% nur 10 Vol% 2-Propanol enthält (Abb. 15) und sie aufgrund ihrer großen Wasser- und Ammoniumsulfatkonzentration eine Dichte von $> 1,5$ kg/L hat. Damit ist die Voraussetzung dafür gegeben, daß das präzipitierte WSP aufgrund seiner Dichte von ca. 1,2 kg/L sich an der Trenngrenze zwischen der oberen leichteren und der unteren schwereren Phase als eine dritte Phase anreichert. Diese Phase kann durch Zentrifugalabscheidung so verdichtet werden (Abb. 16), daß das Protein (Glutenin) als verdichtetes Präzipitat gewonnen werden kann, deren Volumenanteil an der Oberphase deutlich $< 10\%$ ausmacht.

Hinsichtlich der Rückgewinnung des 2-Propanols ist dessen Verteilung auf die obere und untere Phase wichtig. Da die untere Phase in dem für das Verfahren besonders interessierenden Bereich der 2-Propanolkonzentration von 30-40 Vol% in den Lö-

sungen gegenüber der oberen Phase das deutlich größere Volumen hat, gehen etwa 20% des 2-Propanols der Lösung in die untere Phase über (Abb. 17).

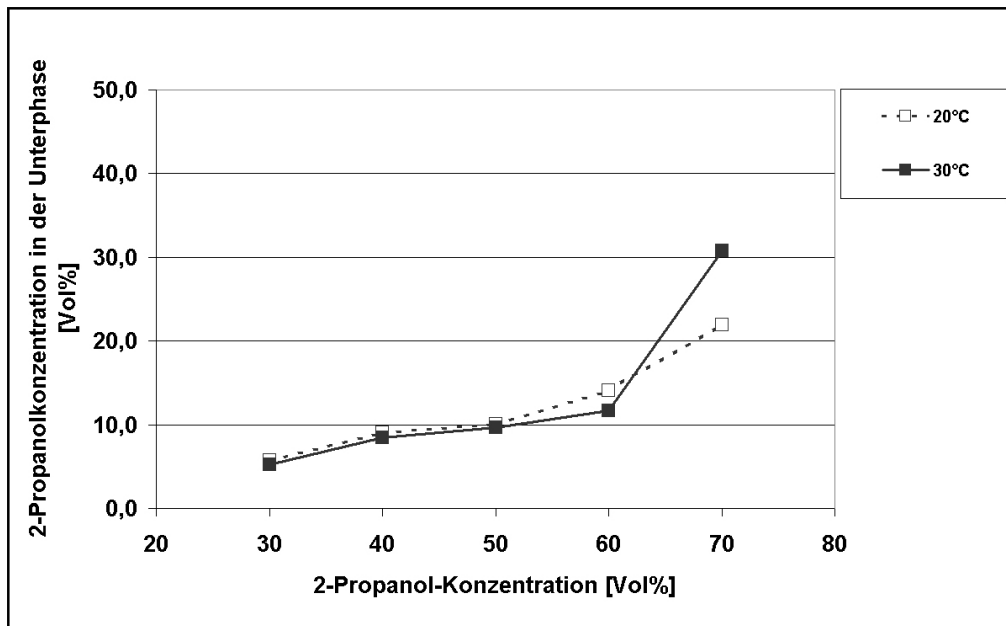


Abb. 15: 2-Propanolkonzentration der Unterphase bei Sättigung von 2-Propanol-Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen



Abb. 16: Verdichtetes Präzipitat nach der Trennung in einer Becherzentrifuge

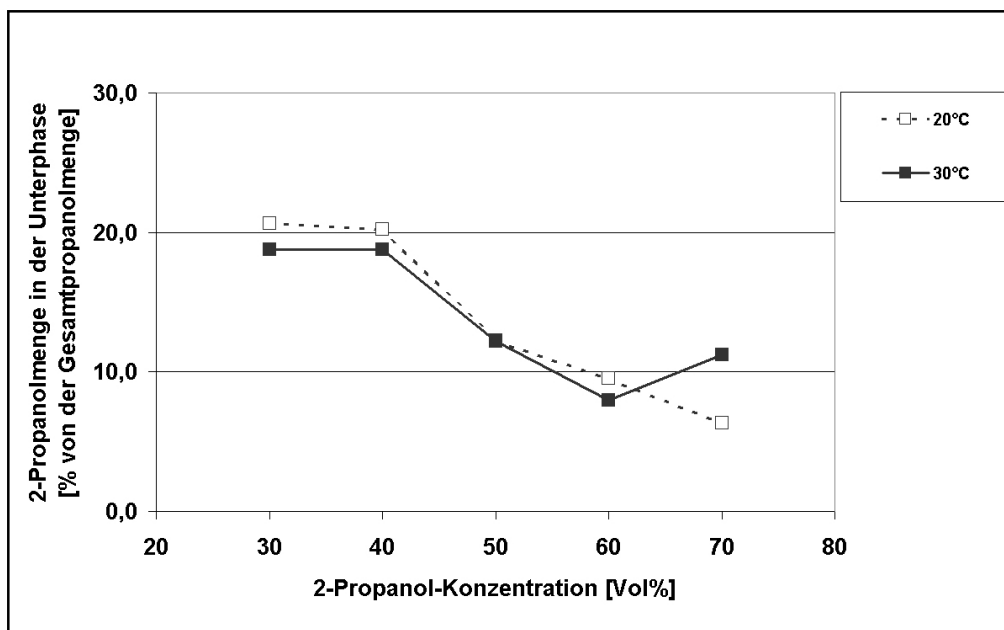


Abb. 17: Prozentuale Propanolmenge in der Unterphase bei Sättigung von 2-Propanol-Wasser-Gemischen bei verschiedenen Temperaturen

Vorteile des Verfahrens:

Der wesentliche Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß in wäßrigem 2-Propanol gelöstes WSP auf einfache Weise aus diesem als Präzipitat durch Entmischen der Lösung gewonnen werden kann. Wir konnten durch SDS-PAGE-Gelanalyse zeigen, daß praktisch das gesamte WSP als Präzipitat in der mittleren Phase anfiel und die obere und untere Phase entsprechend praktisch frei von WSP war.

Das Verfahren ist einfach zu handhaben und besitzt einen wesentlichen wirtschaftlichen Vorteil. Der Materialkostenverbrauch, der im Wesentlichen die Kosten für das Verfahren bestimmt, ist für das neue Verfahren nur etwa halb so groß wie für das bekannte.

Von großer Bedeutung ist es auch, daß dieses Verfahren nicht nur auf die Gewinnung von Gluteninen angewendet werden kann, sondern von ganz allgemeiner Bedeutung für die Gewinnung von Proteinen und anderen in wäßrigen-propanolischen Lösungen löslichen hochpolymeren organischen Verbindungen ist, die bei steigender 2-Propanolkonzentration aus den Lösungen ausfallen. Das Verfahren ist in diesem Sinne als ein „spin-off“ Produkt aus der Durchführung des Projekts zu verstehen.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden ab dem Versuch 13 alle Präzipitationen, die zum WSP-Rohpräparat führten, nach dieser Methode durchgeführt.

Durchführung des Fällungsverfahrens im Technikumsmaßstab:

Dazu wurde der WSP-haltige Extraktionsüberstand mit 400 g Ammoniumsulfat pro Liter in einem ca. 100 Liter fassenden doppelwandigen Edelstahlbehälter mit unterem Auslauf für 15 min verrührt. Währenddessen wurde durch Beheizung mit Dampf eine Temperatur von 30°C eingestellt, um Lösungswärme zuzuführen. Die Ammoniumsulfatsättigung des Gemisches wurde durch die Zugabe des Ammoniumsulfates im Überschuß gewährleistet, d.h. daß sich nach 15minütigen Rühren bei 30°C immer noch Ammoniumsulfatkristalle am Behälterboden sammelten. Löste sich das zugegebene Ammoniumsulfat vollständig, so wurde noch zusätzlich Ammoniumsulfat bis zu Sättigung hinzugegeben.

Im Anschluß wurde das Gemisch für mindestens 24h bei Raumtemperatur äquilibriert. Danach war die Phasentrennung vollständig abgeschlossen und das WSP-haltige Präzipitat vollständig an der Phasengrenze sedimentiert. Die beiden Phasen wurde durch Abpumpen vom Präzipitat dekantiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugieren (Becherzentrifuge, 5 min bei $5000 \text{ min}^{-1} = 5500 \cdot g$ am maximalen Radius) verdichtet (Abb. 16). Das verdichtete Präzipitat wurde im 10fachen seines Volumens in Wasser aufgenommen und danach erneut zentrifugiert. Das so aufgereinigte Präzipitat bildete das feuchte WSP-Rohpräparat, das als Pellet in den Bechern der Zentrifuge anfiel. Die Pellets wurden nach Resuspension im 5fachen ihres Volumens mit Wasser in 1000 mL fassende Rundkolben gefüllt und in einem Kühlbad unter Rotation tiefgefroren. Die in den Kolben tiefgefrorenen Pellets wurden für mindestens 48 h lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Fa. CHRIST: BETA 1-16). Das trockene Pellet wurde durch Zerreiben im Mörser zum WSP-Rohpräparat homogenisiert.

Die hier beschriebene 2-Phasen-Präzipitationsmethode bot eine kostengünstige und einfach zu handhabende Möglichkeit um 2-Propanolkonzentrationen von $\geq 80 \text{ Vol\%}$ an der Phasengrenze zu erreichen. Die WSP-haltigen Fraktionen konnten quantitativ erfaßt werden.

Damit das Verfahren zusätzlich kostengünstiger gestaltet werden konnte, wurden die klaren propanolischen Oberphasen gesammelt, zur Reinigung einer Destillation unterzogen und für den Extraktionsprozeß wiederverwendet. Ebenfalls hätte aus den ammoniumsulfatreichen Unterphasen das Ammoniumsulfat durch Sprühtrocknung

leicht zurückgewonnen werden können. Auf eine derartige Aufarbeitung der Ammoniumsulfatphase wurde jedoch aus arbeitstechnischen Gründen generell verzichtet.

3.6 Beschreibung der Sprühtrocknungsanlage

Zur Trocknung wäßriger Suspensionen aus Versuchen mit Nebenfraktionen wurde ein Sprühtrockner (Niro/GEA Mobile Minor 2000) verwendet (Abb. 18). Die Zuführung des Trockengutes erfolgte über einen pneumatisch betriebenen Zentrifugalzerstäuber. Die Trocknungsluft wurde mit dem elektrischen systemeigenen Lufterhitzer, der eine Leistung von 7,5 kW hat erwärmt. Die maximal erreichbare Zulufttemperatur betrug 180 °C. Die Ablufttemperatur stellte sich in Abhängigkeit des gewählten Volumenstromes des Trockengutes ein.



Abb. 18: Sprühtrocknungsanlage

3.7 Beschreibung der Ultrafiltrationsanlage

Die Ultrafiltration (UF) von wäßrigen Suspensionen aus Versuchen mit Nebenfraktionen wurde mit einem Crossflow-Filtrationsblock (Microdyn CMB 063) durchgeführt. In der UF-Einheit wurde das Retentat mit einer zweistufigen Kreiselpumpe über ein Hohlfasermodul im Kreislauf geführt. Das Hohlfasermodul (Microdyn: MD 063 UP 03N), dessen Hohlfasern aus Polypropylenmembranen bestehen, sind aus 310 Hohlfasern mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm aufgebaut. Die Membran hat eine Porengröße von 0,03 μm was einer Ausschlußgrenze von 50 bis 80 kD entspricht. Die Anströmfläche des Moduls beträgt 4,7 cm^2 und die innere Membranfläche ist 0,9 m^2 groß. Die Membran kann mit einem max. transmembranen Druck von 1,6 bar bei 25 °C und von 1,4 bar bei der maximal zulässigen Temperatur von 40 °C betrieben werden. Die Volumenströme sowie alle permeat- und retentatseitigen Drücke lassen sich über Drosselventile steuern. Bei einem Retentatvolumenstrom von 1700 L/h beträgt die Strömungsgeschwindigkeit in den Hohlfasern 1 m/s.



Abb. 19: Ultrafiltrationsanlage mit den Prozeßeinheiten: Hohlfasermodul (1); Vorlagebehälter mit Retentat (2); Permeatablauf (3); Steuereinheit (4)

3.8 Analysenmethoden

Alle Zwischen- und Endprodukte wurden soweit erforderlich mit chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Methoden analysiert. Dazu wurden überwiegend standardisierte oder in der Literatur beschriebene Methoden angewendet. Die verwendeten Analysemethoden und in modifizierter Form verwendete Analysenmethoden sowie Standardmethoden sind nachfolgend aufgeführt.

3.8.1 Photometrische Bestimmung der Zell- und Hefekonzentration

Die sich während der Fermentation einstellende Zell- und Hefetrockenmassekonzentration wurde indirekt über die optische Dichte der Suspension mittels Photometer bestimmt. Hierfür wurden die Proben mit physiologischer Kochsalzlösung soweit verdünnt, daß ein Ablesen der optischen Dichte im linearen Bereich einer Kalibriergerade erfolgen konnte. Es wurde bei $\lambda = 600$ nm die Absorbanz (OD_{600}) gegen physiologische Kochsalzlösung gemessen. Die Messungen wurden an einem Photometer der Fa. Pharmacia: LKB Ultrospec III durchgeführt. Anhand der im Vorfeld erstellten Kalibriergeraden konnte die jeweilige Biomassekonzentration mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden.

Die Referenzwerte zur Herstellung der Kalibriergeraden für die Zellkonzentration wurden durch Zählen der Hefezellen in einer Thomakammer mit einer Tiefe von 0,1 mm bestimmt. Die Zählungen wurde mindestens einmal mit einer neu gefüllten Kammer wiederholt [69]. Die Referenzwerte zur Herstellung der Kalibriergeraden für die Hefetrockenmassekonzentration erfolgte durch Bestimmung der Trockenmasse von Referenzproben durch Trocknen der Suspensionen gemäß ICC-Standard Nr. 110/1 (siehe 3.8.3).

3.8.2 Bestimmung des Aufschlußgrades nach der Zelldesintegration

Der Aufschlußgrad entspricht dem Verhältnis der Zellkonzentration vor und nach dem Aufschluß. Der Quotient wurde durch Zählen der Hefezellen in einer Thomakammer mit einer Tiefe von 0,1 mm ermittelt. Die deutliche, starke Lichtbrechung von intakten Hefezellen im Hellfeld wurde zur Differenzierung zwischen zerstörten und intakten Zellen herangezogen. Die Zählung wurde mindestens einmal mit einer neu

gefüllten Kammer wiederholt. Aus der Zellanzahl wurde die Zellkonzentration der Hefe in Zellen/mL nach BRONN [70] berechnet und danach der Quotient gemäß der Formel gebildet.

$$\text{Zellaufschlußgrad} = \frac{\text{Zellkonzentration nach Aufschluß}}{\text{Zellkonzentration vor Aufschluß}} * 100 \quad [\%] \quad (\text{Gl. 3})$$

3.8.3 Bestimmung des Gehalts an Wasser und verdampfbaren Substanzen

Die Bestimmung des Gehalts an Wasser und verdampfbaren Substanzen erfolgte gemäß ICC-Standard Nr. 110/1: Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts. Die Bestimmung erfolgte in Abhängigkeit vom Probenmaterial gemäß der dafür gemachten Angaben über den unter definierten Trocknungsbedingungen feststellbaren Gewichtsverlust des Probematerials nach 24 h [71]. Die Trocknungstemperatur betrug 105 °C.

3.8.4 Bestimmung des Rohproteingehalts

Der Rohproteingehalt der Proben wurde über den Stickstoffgehalt nach dem Kjeldahl Verfahren gemäß DIN EN ISO 3188 bestimmt [72]. Zur Umrechnung des Stickstoffgehalts in den Rohproteingehalt wurde der Faktor 6,25 verwendet.

3.8.5 Bestimmung des Gehalts an WSP-Untereinheiten

Die Konzentrationen an HMW- und LMW-Untereinheiten von Glutenin in den Präparaten wurde mittels RP-HPLC nach dem Verfahren von WIESER bestimmt [73]. Diese Bestimmungen wurden von der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, durchgeführt.

3.8.6 Bestimmung der Asche

Der Mineralstoffgehalt wurde gemäß dem ICC-Standard Nr. 104/ 1 (30) indirekt als Asche bestimmt. [74] Dazu wurde das Probenmaterial im Muffelofen verbrannt und der als Asche verbleibende Rückstand wurde gravimetrisch bestimmt und auf die Trockenmasse der Einwaage bezogen. Die Proben wurden in Abweichung zur Standardmethode bei 560 °C verascht, um auch Natriumverbindungen mit zu erfassen, die bei 900°C flüchtig sind.

3.8.7 Bestimmung des α -Amino-Stickstoffs (FAN)

Für die Bestimmung des α -Amino-Stickstoffes wurde die Ninhydrinmethode angewendet. Ninhydrin ergibt mit dem Ammoniak aus desaminierten Aminosäuren eine blauviolette Färbung, die photometrisch bestimmt werden kann. Die Proben wurden spektralphotometrisch bei 570 nm gegen den Blindwert gemessen [75].

3.8.8 Bestimmung des Ammoniumstickstoffs

Da die Proteine teilweise mit Ammoniumsulfat gefällt wurden war es notwendig, die so gefällten WSP-haltigen Fraktionen auf Rückstände von Ammoniumsulfat zu untersuchen. Da bei der Gesamtproteinbestimmung nach Kjeldahl der Ammoniumstickstoff mit erfaßt wurde und dieser somit einen höheren Gesamtproteingehalt vorgetäuscht hatte, wurde die Bestimmung vom Ammoniumstickstoff notwendig. Die dabei ermittelten Ammoniumstickstoffwerte wurden vom Gesamtstickstoff subtrahiert. Dadurch konnte der Proteingehalt unverfälscht durch den Stickstoffgehalt des Ammoniumsulfats errechnet werden.

Das Verfahren wurde nach dem Prinzip der Destillation von Ammoniak nach Kjeldahl gestaltet. Dazu wurde durch Zugabe von Alkali das Ammoniak in freie Form übergeführt, in Wasserdampf abdestilliert und das ammoniakhaltige Destillat einer Vorlage aus Salzsäure aufgefangen. Im Gegensatz zur Proteinbestimmung nach Kjeldahl mußte jedoch die Ammoniakfreisetzung aus dem Ammoniumsulfat „schonend“ erfolgen, um Desaminierungsreaktionen der in den Proben vorhandenen Proteine zu unterbinden. In Anlehnung an die Ammoniumstickstoffbestimmung in Fruchtsäften wurde dazu als schwaches Alkali Magnesiumoxid verwendet sowie die Destillation im Vakuum (10 mbar; 60 °C, im Vakuumrotationsverdampfer) durchgeführt [75].

Bei der Durchführung wurden in einem 250 mL Rundkolben 25 mL 0,1 n HCl vorgelegt. Der Kolben wurde an einen Vakuumrotationsverdampfer als Destillationsvorlage angeschlossen. In einem zweiten 250 mL Rundkolben wurden ca. 1 g Probematerial mit 100 mL dest. Wasser versetzt. Zur Vermeidung von Schaumbildung wurde ein Tropfen Polypropylenglykol 2000 hinzugegeben. Nach der Zugabe von 2 g Magnesiumoxid wurde dieser Kolben unverzüglich an den Vakuumrotationsverdampfer angeschlossen. Die Destillation im Vakuumrotationsverdampfer erfolgte bis zur Trockne des Gemisches (ca. 15 min). Im Anschluß erfolgte die Titration des noch vorhandenen Säureüberschusses im Vorlagekolben mittels 0,1 n Natronlauge bis

zum Farbumschlag nach rosa vom Phenolphthalein. Die Berechnung des Ammoniumstickstoffes erfolgte aus der Differenz des titrierten Laugevolumens vom vorgelegten Säurevolumen.

3.8.9 Bestimmung des Gebäckvolumens

Das Volumen eines Gebäckstückes ist Ausdruck seiner Lockerung. Es wurde für die in den Abschnitten 4.9.1 und 5.1.3 beschriebenen Gebäcke volumimetrisch durch Messen des aus einem Gefäß verdrängten Volumens Rübsamen ermittelt [76]. Das Gebäckvolumen der Gebäcke aus den Mikrobackversuchen (vgl. Abschnitt 4.9.2.2) wurde durch Wasserverdrängung der mit Paraffin überzogenen Gebäcke gemessen [48].

3.8.10 BRABENDER-Farinograph

Zur Bestimmung der Wasserabsorptionsfähigkeit der Backmischung und der Kneteigenschaften des daraus hergestellten Teiges im Abschnitt 4.9.1.2 wurde die Methode mit dem BRABENDER-Farinographen gemäß ICC-Standard Nr. 115 verwendet [77].

3.8.11 Bestimmung des Mannosegehalts mittels HPLC

Für den Aufschluß der Proben wurden jeweils 50 mg der Probe in 1,7 mL 2 M Trifluoressigsäure (TFE, Sigma) 70 min bei 110 °C hydrolysiert (Schraubgläser 2mL mit Teflondichtung, Wheaton, Thermolock-Inkubator: Typ LabLine, Subelco). Nach der Hydrolyse wurden die unlöslichen Bestandteile abfiltriert (Spitzenvorsatzfilter 0,45 µm, Minisart, Sartorius) und die TFE im Stickstoffstrom bei 60 °C verdampft. Die eingetrockneten TFE-Hydrolysate wurden in 2 mL Wasser aufgenommen.

Jeweils 20 µL der wäßrigen TFE-Hydrolysate wurden mittels Autosampler (Basic Marathon, Spark Holland) auf eine Anionenaustauschersäule (Carbopak PA 10 250x4mm I.D., Dionex) injiziert und bei einer Flußrate von 1 mL/min (GP50-2 Gradient Pump, Dionex) mittels eines mehrstufigen Gradienten aus bidestilliertem Wasser (Eluent A), 0,15 M NaOH (Eluent B) und 0,15 M NaOH/ 0,5 M NaOAc (Eluent C) eluiert.

Die Saccharide wurden mittels eines pulsierenden elektrochemischen Detektors (Dionex) detektiert und die Chromatogramme mit Hilfe der Software PeakNet 6.2 (Dionex) aufgezeichnet und ausgewertet. Als Standard Substanzen wurden die Mo-

nosaccharide: Fructose, Arabinose, Rhamnose, Galactose, Glucose, Xylose, Mannose, Ribose, Galacturonsäure und Glucuronsäure in verschiedenen Konzentrationen gemessen.

Bei der Auswertung der Chromatogramme wurde mittels der Flächenmethode aus den einzelnen Peakflächen von der PeakNet-Software der Anteil der Flächen der einzelnen Peaks an der Summe aller Peakflächen ermittelt. Diese Flächenprozent entsprechen bei der verwendeten elektrochemischen Detektion den molaren Anteilen (Mol%) der einzelnen Monosaccharide im gesamten Gemisch. Die Bestimmung der entsprechenden Masse der Monosaccharide erfolgte dann unter Bezugnahme auf die Messungen der Standard Substanzen in verschiedenen Konzentrationen.

3.8.12 Bestimmung des Mercaptoethanolgehalts

Die Quantifizierung von 2-Mercaptoethanol in den Probelösungen erfolgte durch die photometrische Bestimmung der im Mercaptoethanol vorhandenen freier Thiolgruppen nach ELLMAN. Bei der Reaktion der Thiolgruppen mit 5,5'-Dithio-bis-(2-dinitrobenzoesäure) (DTNB) bildet sich ein gemischtes Disulfid aus. Gleichzeitig wird bei dieser Reaktion im stöchiometrischen Verhältnis das gelb gefärbte Thionitrobenzoat-Anion (NTB) freigesetzt, dessen Adsorptionsmaximum bei 412 nm liegt [78].

Der Mercaptoethanolgehalt wurde aus der gemessenen Extinktionen bei 412 nm über eine zuvor erstellte Eichgerade ermittelt.

Herstellung des Ellman's-Reagenz: Es wurden 200 mg des DTNB in 45 mL 0,1 M Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7) gelöst und auf 50 mL aufgefüllt.

Bei der Messung wurden 3 mL der Probelösung in eine 4 mL fassende Küvette mit 1 cm Schichtdicke vorgelegt und 0,1 mL Ellman-Reagenz hinzugefügt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgte die Messung 10 min nach Zugabe vom Reagenz gegen den Leerwert (Wasser). Die Mercaptoethanolkonzentration wurde mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichgeraden ermittelt.

3.9 Material und Methoden zur Aufreinigung der WSP-Rohpräparate

Bei den im Projekt durchgeführten Versuchen mit den verschiedenen Hefetransformanten war eine Vielzahl an WSP-Rohpräparaten angefallen (vgl. Tab. 52). Diese unterschieden sich in der Art der WSP-Untereinheit und dem Gehalt an WSP in den jeweiligen Rohpräparaten. Das Hauptziel der Aufreinigung dieser Rohpräparate bestand darin, WSP-Präparate mit möglichst hohem WSP-Gehalt zu erhalten. Damit wurde die Voraussetzung zur Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von angereicherten WSP-Präparaten im Mikromaßstab geschaffen.

Zur Aufreinigung wurde ein Verfahren entwickelt, welches sich durch hohe Reproduzierbarkeit auszeichnet und universell zur Anreicherung aller WSP-Rohpräparate angewandt werden konnte. Als Methode zur Anreicherung der WSP aus den Rohpräparaten wurde deren hohes Löslichkeitsprodukt bei tiefen pH-Werten genutzt.

In den WSP-Rohpräparaten enthaltene wasserlösliche Verunreinigungen wurden zuvor durch verschiedene Waschschrirte aus diesen entfernt.

3.9.1 WSP-Rohpräparate

Aus den verfügbaren WSP-Rohpräparaten wurde eine Auswahl getroffen, welche WSP-Rohpräparate aufgereinigt werden sollten. Der WSP-Gehalt in den verwendeten WSP-Rohpräparaten variierte zwischen 7,2 % (Propagation Nr. 25) und 34 % (Propagation Nr. 21) (vgl. Tab. 8).

Zur Vereinfachung der weiteren Betrachtungen wurden den verschiedenen Hefetransformanten ein entsprechender Code in alphabetischer Reihenfolge zugewiesen. Die genauen Bezeichnungen und Details sind in Tab. 3 aufgelistet.

Die gewählten neun WSP-Rohpräparate stammten aus insgesamt vier Hefetransformanten und enthielten vier verschiedene Kombinationen an Glutenin-Untereinheiten:

- HMW-1Dx5
- LMW-a3 und HMW-1Dy10
- HMW-1Dx5 und HMW-1Dy10
- HMW-1Dy10

Tab. 8: Spezifikationen der für die Aufreinigung verwendeten WSP-Rohpräparate.

Versuch Nr.	Transformant	Gehalt HMW-1Dx5 [%]	Gehalt LMW-a3 [%]	Gehalt HMW-1Dy10 [%]	Gesamt-WSP-Gehalt [%]
12+13/2*	C	17,8	-	-	17,8
14	C	17,4	-	-	17,4
21	F	-	28,8	5,2	34,0
23	F	-	20,7	4,4	25,1
24	F	-	21,8	7,9	29,7
18	E	15,4	-	5,8	21,2
20	E	16,8	-	4,1	20,9
25	G	-	-	7,2	7,2
27	G	-	-	12,2	12,2

* Präparat, welches durch einen wiederholten Extraktionsprozeß aus den Nebenfraktionen der ersten Extraktion (Feststoffphasen) der Versuche 12 und 13 gewonnen wurde.

3.9.2 Verwendete Geräte

Die für die Aufreinigung verwendeten Geräte sind Standard-Laborgeräte:

- Becherzentrifuge 1: Varifuge 3.2RS, Fassungsvermögen 2,5 L, Zentrifugalbeschleunigung 5.500 * g, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
- Becherzentrifuge 2: Avanti J-25, Fassungsvermögen 1,5 L, Zentrifugalbeschleunigung 24.000 * g, Beckman Coulter, Fullerton
- pH-Meter
- Analysenmühle A10, IKA Labortechnik, Staufen
- Ultra-Turrax T 25 basic, IKA Labortechnik, Staufen
- Rühr- und Heizgeräte
- Gefriertrocknungsanlage LYOVAL GTB, CHRIST, Osterode

3.9.3 Anreicherungsverfahren

Die Aufreinigung der WSP-Rohpräparate wurde in zwei wesentliche Verfahrensschritte unterteilt:

Im ersten Schritt wurden zunächst wasserlösliche Stoffe aus den Rohpräparaten entfernt und anschließend die WSP in einem Lösungsmittel extrahiert. Der zweite Schritt

bestand aus der Präzipitation der durch Extraktion in Lösung gebrachten WSP und der anschließenden Präparation zum hochkonzentrierten Trockenpräparat.

3.9.3.1 Waschung der Rohpräparate und Extraktion der WSP

Die Waschung der WSP-Rohpräparate und die Extraktion der WSP war in folgende Verfahrensschritte unterteilt:

1. Im ersten Schritt erfolgte unter Rühren mit dem Magnetrührer bei 35°C für 20 min eine Waschung der WSP-Rohpräparate in destilliertem Wasser im Verhältnis 1/20 (m/V). Ziel dieses Schrittes war es, wasserlösliche Stoffe zu entfernen.

Anschließend wurde diese Suspension mittels Becherzentrifuge 1 für 12 min bei 5.500 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde für spätere analytische Untersuchungen gefriergetrocknet.

Das erhaltene WSP-haltige Pellet wurde im anschließenden Verfahrensschritt Nr. 2 weiterverarbeitet.

2. Das WSP-haltige Pellet wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax (8000 min⁻¹) in 0,1 M EDTA-Na₂ Lösung unter Zusatz von 1 Vol% 2-Mercaptoethanol suspendiert. Das Verhältnis Pellet/Lösung betrug 1/6 (m/V).

Diese Mischung wurde bei 55°C 20 min mittels eines Magnetrührers gerührt und anschließend erneut mittels Becherzentrifuge 1 bei 5.500 * g für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für spätere analytische Untersuchungen gefriergetrocknet.

Durch diese Behandlung sollten die WSP in eine reduzierte Form übergeführt, über Disulfidbindungen mit den WSP verbundene Fremdproteine gelöst und gleichzeitig eventuell vorhandene, mit den WSP komplexbildende Erdalkali-Ionen unwirksam gemacht werden.

Das erhaltene WSP-haltige Pellet wurde im anschließenden Verfahrensschritt Nr. 3 weiterverarbeitet.

3. Es folgte eine erneute Waschung des Pellets mit destilliertem Wasser nach dem gleichen Schema der Waschung des ersten Schrittes mit anschließender Zentrifugation (Becherzentrifuge 1).

Dadurch wurden Reste der eventuell noch vorhandenen wasserlöslichen Stoffe entfernt.

Der Überstand wurde verworfen, der WSP-haltige Waschrückstand (Pellet) im Verhältnis 1/6 (m/V) mittels eines Ultra-Turrax (8000 min^{-1}) in destilliertem Wasser suspendiert.

4. Unter Zusatz von 1 Vol% 2-Mercaptoethanol wurde durch Zugabe 85 %iger Phosphorsäure der pH-Wert dieser Suspension auf 2,25 herabgesetzt. Zur Gewährleistung einer optimalen Homogenisation und Lösung der WSP erfolgte die Extraktion unter Einwirkung eines Ultra-Turrax (8000 min^{-1}) bei 40° C und dauerte 45 min.

Mit diesem Schritt wurden die WSP gelöst. Unter diesen Bedingungen unlösliche Stoffe verblieben in suspendiertem Zustand.

Die anschließende Trennung erforderte eine stärkere und intensivere Zentrifugationsarbeit, so daß hier Becherzentrifuge 2 ($24.000 \cdot g$) eingesetzt wurde. Die Zentrifugation fand ebenfalls bei 40° C statt und dauerte 30 min.

5. Der erhaltene Extraktionsrückstand (Pellet) wurde anschließend unter gleichen Bedingungen (Schritt Nr. 4) wiederholt extrahiert und anschließend zentrifugiert (Becherzentrifuge 2).

Somit wurde eine möglichst vollständige quantitative Lösung der WSP aus dem Pellet gewährleistet. Die bei beiden Extraktionsschritten angefallenen WSP-haltigen Überstände wurden vereinigt und im nachfolgenden Präzipitationsschritt weiterverarbeitet. Das WSP-abgereicherte Pellets wurde für spätere analytische Untersuchungen gefriergetrocknet.

3.9.3.2 Präzipitation der gelösten WSP

Die zuvor beim Extraktionsschritt in Lösung gebrachten WSP wurden durch eine pH-Werterhöhung, welche zu einer Verringerung des Löslichkeitsproduktes der WSP führte, präzipitiert. Für diesen Schritt gab es zwei Möglichkeiten:

1. Möglichkeit: Neutralisation der Phosphorsäure (vgl. 3.9.3.2.1)
2. Möglichkeit: Entfernung der Phosphorsäure mittels Dialyse

Die Methode der Säureentfernung durch Dialyse wurde in einem Vorversuch überprüft. Im Ergebnis wurden keine höherer WSP-Gehalt in den Präzipitaten als bei der Neutralisationsmethode ermittelt. Zudem war der Material- und Arbeitsaufwand deut-

lich höher, weshalb diese Methode nicht weiter verfolgt wurde. Auf die Darstellung der detaillierten Ergebnisse dieser Versuche wird deshalb verzichtet.

Die jeweils anfallenden WSP-haltigen Präzipitate wurden durch Zentrifugation vom Überstand separiert und gefriergetrocknet.

3.9.3.2.1 Präzipitationsvorversuch: pH-Werterhöhung durch Neutralisation der Säure

In einem Vorversuch durch eine schrittweise Erhöhung des pH-Wertes wurden verschiedene WSP-haltige Fraktionen präzipitiert, um den für die Präzipitation optimalen pH-Wert zu ermitteln. Die ausgefallenen Präzipitate wurden mittels Becherzentrifuge 1 für 12 min abzentrifugiert und anschließend gefriergetrocknet.

Ziel dieses Versuches war es, den pH-Wert bzw. den pH-Wert-Bereich zu finden, bei dem die WSP in großer Menge und/oder hoher Reinheit als Präzipitat anfallen.

Als Probematerial wurden ein Mischpräparat aus den WSP-Rohpräparaten der Versuche 21, 23 und 24 hergestellt (Tab. 8). Nach den Ergebnissen der HPLC-Analyse dieser Rohpräparate betrug der errechnete WSP-Gehalt im Gemisch 28,2 % (4,8 % HMW-1Dy10 und 23,4 % LMW-a3).

Dieses vereinigte Rohpräparat wurde wie oben beschrieben (vgl. 3.9.3.1) verarbeitet. Nachdem die WSP in saurem Milieu extrahiert worden waren (Schritte 4 und 5), wurde der pH-Wert der WSP-haltigen Extraktionslösung durch Zuführen ammoniakhaltiger Luft unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur in einem geschlossenen System schrittweise angehoben: Im ersten Schritt auf pH 2,5, im zweiten auf pH 2,9, im dritten auf pH 4,9 und zuletzt auf pH 6,5.

Das nach jeder pH-Werterhöhung angefallene Präzipitat wurde mittels Becherzentrifuge 1 vom Überstand abzentrifugiert und anschließend gefriergetrocknet. Der verbliebene Überstand der letzten Stufe (pH 6,5) wurde ebenfalls gefriergetrocknet.

Mit diesem Vorversuch wurden folglich 5 gefriergetrocknete Fraktionen gewonnen: 4 gefällte Präzipitate sowie der gefriergetrocknete verbliebene Überstand. Die jeweils angefallenen gefriergetrockneten Mengen sowie die zugehörigen HPLC-Analysen sind in Tab. 9 aufgeführt.

Die Analysenwerte lassen erkennen, daß von den zuvor im sauren Extrakt gelösten WSP insgesamt 3,9 g durch Fällung mittels pH-Werterhöhung und anschließender

Gefriertrocknung als Präzipitate erhalten wurden. Somit wurden durch diese Präzipitationsschritte insgesamt 92 % der zuvor im Extraktionsschritt gelösten WSP als Präzipitate erhalten, 8 % der WSP verblieben im Überstand.

Tab. 9: WSP-Gehalt und Menge der Präzipitate.

Fraktion	Präzipitate				Überstand
	1	2	3	4	5
Fällung bei pH-Wert	2,5	2,9	4,9	6,5	6,5
Menge [g]	0,7	0,5	5,0	4,7	6,5
enthaltenes WSP [g]	0,1	0,1	1,9	1,8	0,4
Gesamtgehalt WSP [%]	17,8	22,5	37,0	37,8	5,4
Gehalt HMW-1Dy10 [%]	3,4	2,7	5,8	15,9	2,6
Gehalt LMW-a3 [%]	14,4	19,8	31,2	21,9	2,8

Der bei pH = 6,5 verbliebene gefriergetrocknete Überstand enthielt im Vergleich zu den 4 Präzipitaten einen deutlich geringeren Gehalt von 5,4 % an WSP-Untereinheiten. Die bei pH 4,9 und anschließend bei pH 6,5 gefällten Fraktionen 3 und 4 wiesen mit 37,0 % bzw. 37,8 % die höchsten Konzentrationen an WSP auf.

Das zeigte, daß erst beim pH-Wert > 2,9 WSP-haltige Fraktionen mit einem höheren WSP-Gehalt als im eingesetzten WSP-Rohpräparat (WSP-Gehalt 28,2 %) präzipitiert wurden.

Auffällig bei den Präzipitaten 3 und 4 war der verschiedene Gehalt an den beiden WSP-Untereinheiten bei annähernd gleichem Gesamt-WSP-Gehalt (vgl. Abb. 20).

Es schien, daß das Löslichkeitsprodukt der LMW-a3-Untereinheit im pH-Bereich von > 2,9-4,9 ein Minimum besitzt. Das Löslichkeitsprodukt der HMW-1Dy10-Untereinheiten zeigte im pH-Bereich von > 4,9-6,5 ein ähnliches Verhalten.

Durch dieses Verhalten ergab sich die Möglichkeit einer gezielten fraktionierten Präzipitation. Nach der Abtrennung einer ersten Fraktion durch pH-Werterhöhung auf pH 3,0 und anschließender Zentrifugation konnte durch die weitere Erhöhung des pH-Wertes ausgehend von pH 3,0 nach pH 6,5 die Hauptmenge an WSP als „Kernpräzipitat“ aus der Extraktionslösung erhalten werden.

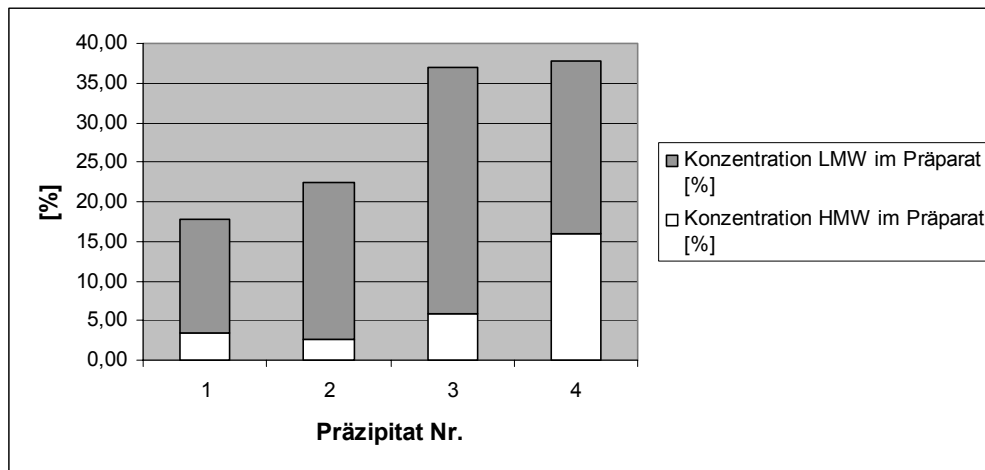


Abb. 20: Konzentration an HMW-1Dy10- und LMW-a3-Untereinheiten in den Präzipitaten 1-4

3.10 Material und Methoden zur Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von angereicherten WSP-Präparaten im Mikromaßstab

Es ist nahe liegend, funktionelle Eigenschaften von Gluteninpräparaten mittels Backversuchen und rheologischen Untersuchungen nachzuweisen und vergleichend zu beurteilen. Allgemein ist anerkannt, daß Glutenin allein nicht backfähig ist. Folglich lassen sich auch aus den hier zu untersuchenden Präparaten allein unter Wasserzugabe und Knetung keine Gebäcke herstellen. Zugabe dieser Präparate zu handelsüblichen, unbehandelten Weizenmehlen und anschließendes Verbacken erschien ebenso kaum dafür geeignet zu sein das Ziel dieses Teils der Arbeit zu erreichen, der im sicheren Nachweis des Vorhandenseins gluteninähnlicher funktioneller Eigenschaften der WSP-haltigen Präparate bestand.

Allerdings hätte es die Möglichkeit gegeben, ein sogenanntes „synthetisches Mehl“ herzustellen, welchem dann jeweils die Präparate in bestimmtem Verhältnis zugemischt hätten werden können. Mit solchen Gemischen hätten sowohl rheologische Messungen als auch Backversuche durchgeführt werden könnten. MEUSER et al. haben auf diese Weise die Viskoelastizität und Backeigenschaft von unterschiedlich getrockneten Weizenklebern untersucht. Sie stellten auf Basis von Maisstärke und Gelatine ein Mehl her, in welches dann die jeweiligen Kleber eingebracht wurden [79]. Solche „synthetischen Mehle“ entsprachen in ihrer Inhaltsstoffzusammenset-

zung jedoch nicht den herkömmlichen Mehlen. Deshalb wurde für die hier durchzuführenden Versuche der Weg beschritten einem Handelsmehl den Kleber durch Auswaschen eines Teigs zu entziehen und alle Bestandteile des Mehl (ohne Kleber) durch Gefriertrocknen in ein Pulver zu verwandeln. Diesem Pulver wurden anschließend die jeweiligen WSP-Präparate zugesetzt, um die erforderlichen Backversuche und rheologische Messungen durchzuführen.

3.10.1 Material

- Weizenmehl des Handels (Weltgold Weizenmehl Backstark T 550, Thüringer Mühlenwerke GmbH, Weickelsdorf) Proteingehalt 11,8 %, Wassergehalt 12,9 %
- Gliadin aus Weizenmehl der Sorte Contra; vgl. Abschnitt 3.10.3
- Aufgereinigte WSP-Präparate (Tab. 10); vgl. Abschnitt 3.9
- Saccharose und NaCl, Haushaltsware
- Trockenhefe Fermipan red; (DSM Bakery Ingredients; NE)

Tab. 10: Spezifikationen der verwendeten angereicherten WSP-Präparate.

Präparat Nr.	1B	2B	3B	4B	5B	6B
Gesamtgehalt an WSP [%]	37,5	27,5	47,0	11,9	7,8	46,7
Gehalt an HMW-1Dx5 [%]	-	27,5	37,2	-	7,8	46,7
Gehalt an HMW-1Dy10 [%]	11,5	-	9,8	11,9	-	-
Gehalt an LMW-a3 [%]	26,0	-	-	-	-	-
Feuchtegehalt [%]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proteingehalt TS [%]	96,2	96,5	91,5	91,6	92,8	93,7

3.10.2 Herstellung von glutenfreiem Weizenmehl

Aus handelsüblichem Mehl (Weltgold Weizenmehl Backstark T 550, Thüringer Mühlenwerke GmbH, Weickelsdorf) wurde ein Teig hergestellt. Durch Auswaschen per Hand wurde der Kleber von den restlichen Mehlbestandteilen getrennt. Es wurden zwei Fraktionen erhalten: Kleber (Gluten), bestehend aus Gliadin, Glutenin, Pentosanen, Feinstärke und Lipiden sowie eine zweite Fraktion, hauptsächlich bestehend aus Stärke, löslichem Protein, Fett, Fasern und Mineralstoffen (Tab. 11). Beide Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Nach der Gefriertrocknung wurde das erhaltene glutenfreie Material gesiebt (Maschenweite 200 µm) und als glutenfreies Mehl verwendet, der Trockenkleber (TK) gemahlen (10 min IKA Labormühle).

Tab. 11: Spezifikation des Weizenmehls T 550 und der daraus gewonnenen Fraktionen.

Produkt	Proteingehalt TS [%]	Feuchtegehalt [%]
WM T 550	11,8	12,9
glutenfreies WM	3,4	6,5
TK	81,9	5,0

3.10.3 Isolierung von Gliadin und Glutenin

Trockenkleber der Sorte CONTRA wurde nacheinander 2 x mit Petrolether (Siedepunkt 60 °C) zur Entfettung extrahiert und der fettfreie Rückstand unter Vakuum getrocknet. 50 g des getrockneten Materials wurden mit 120 mL Ethanol vermischt, mit 80 mL dest. H₂O versetzt, mit einem Ultra-Turrax bei niedriger Umdrehungszahl 10 min gerührt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Rückstand ein zweites Mal mit 200 mL 60 Vol% Ethanol extrahiert. Beide Überstände wurden vereinigt, am Vakuumrotationsverdampfer auf etwa die Hälfte eingengt und in ca. 2 L Eiswasser eingerührt. Das gebildete Präzipitat (Gliadin) wurde abzentrifugiert, gefriergetrocknet und vermahlen. Der Rückstand aus der alkoholischen Extraktion (Glutenin) wurde ebenfalls gefriergetrocknet und vermahlen (Tab. 12).

Tab. 12: Spezifikationen des isolierten Gliadins und Glutenins.

Produkt	Proteingehalt TS [%]	Feuchtegehalt [%]
Gliadin	86	6,0
Glutenin	69	6,5

3.10.4 Vermahlen der Fraktionen

Alle gefriergetrockneten Extrakte und Fraktionen wurden zu einer gleichen Korngrößenverteilung von < 200 µm in der Ultrazentrifugalmühle UZ1 (Retsch, Haan, GER) mit Ringsieb 0,2 mm vermahlen.

3.10.5 Backversuche

Die Rezepturen für die Teige mit Zusatz von angereicherten WSP-Präparaten sind in Tab. 13 zusammengestellt. Die erforderliche Wassermenge wurde durch die Ermittlung der Wasseraufnahme mit 10 g Handelsmehl von 14 % Feuchte bei 22 °C im 10 g Sigmakneter des Mikrofarinographen (Brabender, Duisburg) bei 550 FE bestimmt.

Tab. 13: Rezepturen Backversuche mit WSP-Präparat-Zusatz.

	glutenfreies	Menge/	Saccharose	NaCl	Trockenhefe
Nr.	Mehl [g]	WSP-Präparat Nr.	[g]	[g]	[g]
1	7,3	1,4 g / 1B	0,16	0,16	0,4
2	7,3	1,4 g / 2B	0,16	0,16	0,4
3	7,3	1,4 g / 3B	0,16	0,16	0,4
4	7,3	1,4 g / 4B	0,16	0,16	0,4
5	7,3	1,4 g / 5B	0,16	0,16	0,4
6	7,3	1,4 g / 6B	0,16	0,16	0,4

Für die konstruierten Teige wurde weniger Material, in der Regel 8,7 g (7,3 g glutenfreies Mehl + 1,4 g angereichertes WSP-Präparat) verwendet sowie die Wassermenge entsprechend reduziert. Wegen der geringeren Knetfüllung im Mi-

krofarinographen wurde eine Teigkonsistenz von 280 FE eingestellt. Nach 1 min Anteigen wurde der Knetter für 1 min gestoppt und bis zum Erreichen des Maximums (Knetoptimum), mindestens aber 3 min geknetet. Nach 10 min Teigruhe bei 30 °C wurden die Teiglinge rundgewirkt und für 40 min bei 30 °C auf Gare gestellt. Gebacken wurde 10 min bei 240 °C.

3.10.6 Untersuchung rheologischer Eigenschaften

3.10.6.1 Herstellung der Proben für die Zugversuche

Jeweils 1 g angereichertes WSP-Präparat wurden mit 0,5 g Gliadin gründlich vermengt, mit 4,5 mL Wasser mit einem Spatel verrührt und nach 15 min Hydratisieren in 2 mL Zentrifugenröhrchen 5 min lang bei 20.000 * g sedimentiert. Überschüssiges Wasser wurde im Anschluß dekantiert.

3.10.6.2 Zugversuche

Die Zugversuche mit Feuchtkleber und angereicherten WSP-Präparaten wurden nach Kieffer et al. [44, 45] an einem Texture Analyser TA.XTplus (Stable Micro System, Surrey, UK) mit einem SMS/Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig durchgeführt. Wegen der beschränkten Materialmenge wurden die Proben nicht in den Teflonplatten geformt, sondern in PE Röhrchen gedrückt, die den gleichen Querschnitt hatten, wie die Teflonrillen. Die Relaxationszeit vor der Messung betrug 30 min bei 22 °C. Bestimmt wurden der maximale Dehnwiderstand (DW) und die Dehnbarkeit bei maximalem Dehnwiderstand (DB).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Beschreibung des Prozesses zur Produktion von Weizenspeicherproteinen aus transgenen Hefen

Die Abb. 21 zeigt das Verfahrensfliessbild zur Herstellung WSP-haltiger Rohpräparate ausgehend von der Hefepropagation bis hin zu deren Gefriertrocknung.

Die Propagation der Hefe wurde im Technikumsmaßstab in den zwei beschriebenen Fermentern A und B durchgeführt. Nach beendeter Propagation wurde die Hefezellmasse aus der Fermentationslösung in einem zweistufigen Trennprozeß (Separator → Becherzentrifuge) erhalten.

Die in den transgenen Hefezellen exprimierten Glutenine sind intrazellulär über Disulfidbindungen im Zellinneren verankert. Die Zellmasse mußte deshalb in einer Kugelmühle aufgeschlossen werden, um die Glutenine extrahieren zu können. Die aufgeschlossene Zellmasse wurde anschließend durch Zugabe von 2-Propanol einer Fällung unterzogen. Durch die Fällung wurden bei der nachfolgenden Zentrifugation die in Lösung gebliebenen Zellinhaltsstoffe aus dem Produktstrom mit der flüssigen Phase entfernt.

Danach erfolgte die Extraktion der Glutenine aus der gefällten Zellmasse durch Reduktion der Disulfidbindungen und der damit einhergehenden Lösung der Glutenine in wäßrigem 2-Propanol. Die Extraktionsmischung wurde anschließend zentrifugiert, wobei die unlöslich gebliebene Zellmasse abgetrennt wurde.

Die gelösten Glutenine wurden unter Ausnutzen ihrer spezifischen Löslichkeitseigenschaften durch Präzipitation bei hoher 2-Propanolkonzentration oder durch Zugabe von Ammoniumsulfat aufkonzentriert und durch Gefriertrocknen als Trockenpräparate gewonnen.

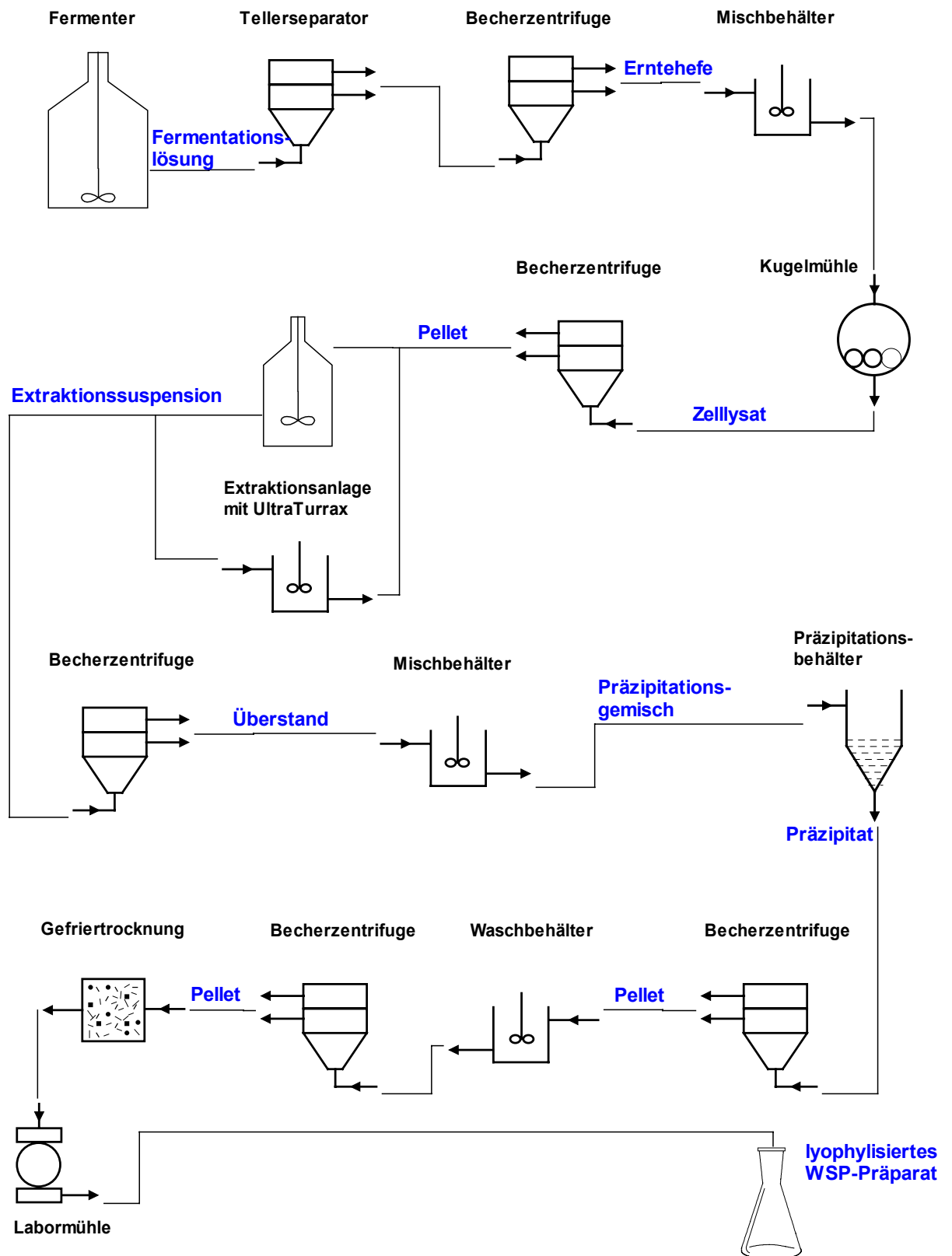


Abb. 21: Verfahrensfliessbild zur Herstellung WSP-haltiger Rohpräparate

4.2 Propagationen

Die Propagationsversuche Nr. 1 bis Nr. 4 wurden in der Propagationsanlage A durchgeführt. Alle weiteren Propagationsversuche erfolgten in der Propagationsanlage B. Der Propagationsversuch Nr. 9 wird in den weiteren Ausführungen nicht berücksichtigt, da zahlreiche technische Probleme bei der Vermehrungsdurchführung eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse mit denen der anderen Vermehrungen ausschließen. Die aus diesem Versuch erhaltene Hefe wurde deshalb verworfen.

Der Propagationsprozeß wurde in zwei aufeinanderfolgende Teilprozesse gegliedert: Der erste Teilprozeß wurde als Batch-Verfahren bei dem die gesamte Menge des vorab hergeführten Inokulums mit der im Fermenter vorgelegten Menge an steriler Substratlösung versetzt wurde. Das gesamte Volumen des Batches wurde für 24 Stunden bei konstanter Temperatur, Luftzufuhr, Rührwerksdrehzahl und bei konstantem pH-Wert inkubiert. Der nachfolgende zweite Teilprozeß wurde als Fed-Batch-Verfahren mit dem Ziel durchgeführt, durch eine definierte Zuführung steriler Substratlösung, das maximale Nutzvolumen des Fermenters in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Die Zulaufgeschwindigkeit der Substratlösung wurde in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration so geregelt, daß der voreingesetzte Grenzwert nicht überschritten wurde. Während der Propagationszeit im Fed-Batch-Verfahren wurden die gleichen Prozeßparameter (Temperatur, Luftzufuhr, Rührwerksdrehzahl, pH-Wert) wie beim Batch-Verfahren eingestellt und konstant gehalten (Tab. 14).

Tab. 14: Konstante Prozeßparameter der Propagationen.

Prozeßparameter	Einheit	Wert
Temperatur	°C	30
Luftversorgung	m ³ /h	5 (Fermenter A) 13 (Fermenter B)
pH-Wert		4,0 - 4,5
Rührwerksgeschwindigkeit	min ⁻¹	700 (Fermenter A) 400 (Fermenter B)
max. Ethanolkonzentration im Fed-Batch	Vol%	0,2

Als Substrat wurde sowohl für das Batch- als auch für das Fed-Batch-Verfahren steriles DS-Medium verwendet. Für das Batch-Verfahren wurde DS-Medium mit normaler Nährstoffkonzentration (50 g Saccharose/L) und für das Fed-Batch-Verfahren DS-Medium mit erhöhter Nährstoffkonzentration (100 g Saccharose/L) benutzt.

Die pH-Wertkorrektur auf den voreingestellten Sollwert erfolgte während des gesamten Propagationsprozesses durch Zudosage von 10 %iger Kalilauge bzw. 10 %iger Schwefelsäure.

Die Schaumbildung während der Fed-Batch-Phase, die zum Überlaufen des Fermenterinhaltess hätte führen können, wurde durch Konstanthalten der Schaumhöhe im Fermenter über die Zudosage von Polypropylenglykol 2000 geregelt. Zusätzlich wurden zu Beginn der Batch-Phase vorbeugend ca. 10 mL Polypropylenglykol 2000 dem Fermenterinhalt zugegeben. Auf Abweichungen zu den genannten Prozeßparametern wird bei der Beschreibung der Propagationen und der mit ihnen erzielten Ergebnisse eingegangen.

Die Abb. 22 zeigt einen typischen Verlauf für eine störungsfreie Propagation gemäß der Durchführung in den Teilprozessen Batch- und Fed-Batch-Propagation.

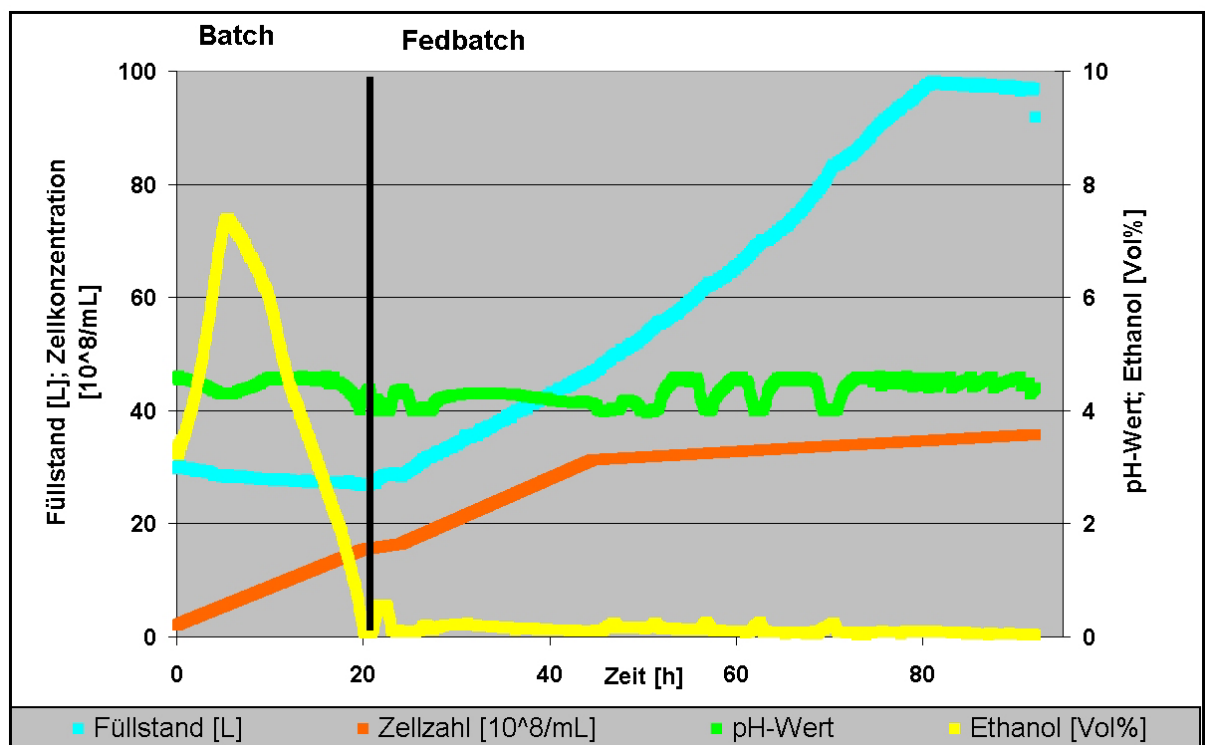


Abb. 22: Verlauf der Propagation Nr. 11 im Technikumsfermenter

Charakteristisch ist der starke Anstieg der Ethanolkonzentration im Batch-Verfahren, der durch Vergärung des Zuckers ab einer Zuckerkonzentration im Bereich von 100-200 mg/L verursacht wurde (Crabtree-Effekt). Dieser katabolische Prozeß ist verantwortlich für die drastische Beschränkung des aeroben Wachstums von Hefe in einer konzentrierten Kohlenhydratlösung und tritt unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Fermentationslösung ein.

Bis zum Ende der Batch-Phase sank der Ethanolgehalt wieder gegen Null. Diese Konzentrationsabnahme war einerseits auf die Assimilation von Ethanol durch die Hefen und andererseits auf einen Gaswäscheeffekt durch die überschüssige Luftversorgung während der Propagationsdauer zurückzuführen. Der Gaswäscheeffekt geht auch aus dem Verlauf des Fermenterfüllstandes hervor, der während der Batch-Phase leicht abgenommen hatte. Der den Fermenter durchlaufende Luftstrom trat wasserdampfgesättigt aus dem Fermenter aus und entzieht dadurch der Fermentationsflüssigkeit kontinuierlich Wasser. Dieser Wasserverlust betrug der Erfahrung entsprechend über die gesamte Propagationsdauer ca. 10 % vom Substratvolumen.

Die Ethanolkonzentration wurde während der Propagation im Fed-Batch-Verfahren durch die Regelung der Zulaufgeschwindigkeit der Substratlösung in ihrem Maximum begrenzt. Somit stellte die Ethanolkonzentration die Regelgröße dar. Es konnten lediglich kurzzeitige Überschreitungen des vorgegebenen maximalen Sollwertes eintreten, die durch die Reaktionsträgheit der Regelstrecke (Fermentationsflüssigkeit, Beschleunigung des Substratzulaufes) bedingt waren. Als Stellgröße wurde die Substratzulaufgeschwindigkeit verwendet. Sank die Ethanolkonzentration unter den maximalen Sollwert, reagierte die Regelung mit einer Erhöhung der Substratzulaufgeschwindigkeit. Die dafür erforderliche Beschleunigung der Pumpleistung wurde aus dem momentanen Fermenterfüllstand errechnet und war zu diesem proportional. Diese Arbeitsweise der Regelung ermöglichte eine maximale Nährstoffversorgung bei minimaler Ethanolbildung.

Die Verzögerung der Substratzulaufgeschwindigkeit, bedingt durch das Erreichen der maximalen Ethanolkonzentration während der Substratzufütterung, war bei den verschiedenen Hefetransformanten unterschiedlich stark ausgeprägt. Dadurch ergaben sich unterschiedliche Propagationszeiten in der Fed-Batch-Phase, d.h. für die Zeit bis das maximale Nutzvolumen des Fermenters erreicht wurde.

Die resultierenden Propagationszeiten drückten sich maßgeblich in der *spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmasse* [$\text{kg}/\text{m}^3\text{h}$] aus. Deshalb werden diese bei den nachfolgenden detaillierten Betrachtungen der einzelnen Propagationen als Vergleichsgröße herangezogen.

Zur Vereinfachung der Darstellung der Ergebnisse wurden den verschiedenen Hefetransformanten in alphabetischer Reihenfolge ein Buchstabe als Code zugewiesen. Die genauen Bezeichnungen und Details sind in der Tab. 3 aufgelistet.

4.2.1 Propagation von Bäckerhefe: Versuch Nr. 1

Im Vordergrund dieses Versuches stand die Prüfung der Funktionsfähigkeit der Ausrüstung sowie das Sammeln von Erfahrungen bei der Handhabung der eingesetzten Maschinen und Anlagen. Dazu wurde ein nicht transgener Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* (käufliche Bäckerhefe) verwendet. Die Propagation erfolgte mit Prozeßparametern, die von allen weiteren Propagationen abwichen. Deshalb konnten die erhaltenen Ergebnisse nicht mit denen aus den anderen Propagationen verglichen werden. Die Durchführung und die Ergebnisse des Versuches 1 sind hier jedoch der Vollständigkeit halber angeführt.

Hefeanzucht zum Inokulum:

Als Substrat diente steriles DS-Medium. Die Anzucht erfolgte in drei Stufen:

Überimpfen auf 2 * 10 mL, 48h Schütteln bei Raumtemperatur (RT)

Überführen auf 2 * 200 mL, 48h Schütteln bei RT

Überführen auf 2 * 3500 mL, 24h Schütteln bei RT

Nach der letzten Stufe im Inokulum wurde eine Zellkonzentration von $3,2 * 10^8$ Zellen/mL erreicht. Während der letzten Vermehrungsstufe flokkulierten die Zellen stark. Das war wahrscheinlich auf eine ungenügende O_2 -Versorgung zurückzuführen.

Propagation:

Die vorhandenen 7 Liter Inokulum wurden vollständig in den Fermenter vorgelegt und dann wurde mit der Substratzufuhr begonnen. Die gesamte Propagation wurde im Fed-Batch-Verfahren durchgeführt. Für die ersten 30 Liter der Substratzufuhr wurde DS-Medium mit normaler Nährstoffkonzentration (50 g Saccharose/L) und für die weitere Substratzufuhr wurde DS-Medium mit erhöhter Nährstoffkonzentration

(100 g Saccharose/L) benutzt. Die maximale Ethanolkonzentration und der pH-Wert wurden abweichend zu den in Tab. 14 angegebenen Prozeßparameter auf 0,5 Vol% Ethanolkonzentration bzw. auf einen pH-Wert von 5,0-5,5 voreingestellt. Mit dem Beginn der Substratzufuhr trat sehr schnell eine Ethanol- und pH-Wertabnahme ein. Die Befüllung der Fermenters war nach 28 h abgeschlossen, so daß die Substratzufuhr zu diesem Zeitpunkt gestoppt wurde. Es wurde dann geprüft, in wieweit sich die Zellkonzentration ohne weitere Substratzufuhr veränderte. Deshalb wurde der Fermenter unter Belüftung bei 30°C noch weitere 15 h (über Nacht) betrieben. Die Ergebnisse der Propagation sind in der Tab. 15 zusammengestellt. Bemerkenswert ist die extrem starke Vermehrung der Hefe nach 24 h. In dieser Phase nahm die Zellkonzentration im Vergleich zu den vorausgehenden 24 Stunden pro Stunde um den Faktor 5 zu. Nach der Beendigung der Substratzufuhr nahm die Zellkonzentration bis zur Hefeernte von $7,7 \cdot 10^8$ auf $7,0 \cdot 10^8$ Zellen/mL ab. Das deutete auf eine beginnende Zellautolyse hin.

Tab. 15: Zellkonzentrationen und Zellwachstum: Versuch Nr. 1.

Zeit	Zeitpunkt	Füllstand	Zellkonz.	Zellanzahl	Zellanzahl	
					Zunahme gesamt	Zunahme pro Stunde
[h]		[L]	[10^8 /mL]	[10^8]	[10^8]	[10^8 /h]
0	Beginn der Substratzufuhr	10,7	3,2	34240		
24		35,6	8,0	284800	250560	10440
27	Ende der Substratzufuhr	58,7	7,7	451990	167190	55730
47	Hefeernte	57,3	7,0	401100	-50890	-2545

Während der Versuchsdurchführung wurde der Fermenter A erprobt und instand gesetzt. Dieses war die Voraussetzung für die nachfolgenden Versuche mit den transgenen Hefestämmen. Schwachstellen an der Anlage wurden erkannt und beseitigt. Durch teilweise ungünstig gewählte Versuchsbedingungen während der Propagation konnte nur eine Trockensubstanzausbeute von 20 g Hefe pro Liter Fermenterfüllung erreicht werden. Zusätzlich wurden erste Anhaltspunkte, zu den zu erwarteten Mengen und ihrer weiteren Verarbeitung erhalten.

4.2.2 Propagationen mit dem Hefetransformanten A: Versuche Nr. 2 - 5

Die Eckdaten der durchgeführten Propagationen mit dem Hefetransformanten A, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in Tab. 16 bis Tab. 18 aufgeführt.

Tab. 16: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten A.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
2*	6	72	1,7	2,1
3*	6	72	1,2	3,2
4*	6	72	2,3	3,1
5**	6	72	2,1	2,7

* Versuche im Fermenter A

** Versuch im Fermenter B

Der Inokulumanzucht führte am Ende der Inkubationszeit zu Zell- und Zellmassekonzentrationen in vergleichbarer Höhe (Tab. 16). Die festgestellten Diskrepanzen zwischen Zellkonzentration und Zellmassekonzentration resultierten aus der Streuung der Analytik. Diese machte sich bei den relativ niedrigen Konzentrationen stärker bemerkbar als es bei höheren der Fall gewesen wäre.

Tab. 17: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten A.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
2*	21	24	6,5	9,0
3*	21	24	4,8	5,9
4*	26	24	6,0	8,3
5**	31	24	3,5	4,9

* Versuche im Fermenter A

** Versuch im Fermenter B

Die Batch-Propagationen führten bei den Versuchen 2-4, die im Fermenter A durchgeführt wurden, bei gleicher Inkubationszeit im Mittel zu einer Zellkonzentration von

$5,8 \cdot 10^8$ Zellen/mL. Die Abweichung nach oben und unten war dabei eine Zehnerpotenz groß. Die Batch-Propagationen erfolgten ab dem Versuch 5 mit dem Fermenter B. Es bleibt bei diesen Versuch unklar, weshalb die erreichte Zell- und Zellmassekonzentration am Ende der Batch-Phase kleiner ausgefallen war, als bei den Versuchen mit dem Fermenter A (Tab. 17). Alle vier Versuche belegen jedoch, daß der Hefetransformant A sich in der Batch-Phase kräftig vermehrte.

Tab. 18: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten A.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10^8 /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
2*	55	27	14,0	19,0
3*	55	44	13,2	18,6
4*	55	23	11,2	18,8
5**	67	25	22,0	23,3

* Versuche im Fermenter A

** Versuch im Fermenter B

Der Hefetransformant A konnte auch in der Fed-Batch-Phase stark vermehrt werden. Die Fed-Batch-Phase des Propagationsversuches Nr. 5 wurde aus zeitlichen Gründen vorzeitig beendet, so daß das maximale Nutzvolumen des Fermenters von 100 Litern nicht erreicht wurde. Dennoch wurde eine wesentlich höhere Zell- und Zellmassekonzentration als bei den vorausgegangenen Versuchen mit dem Transformanten A im Fermenter A erhalten (Tab. 18). Bedingt durch die besseren Propagationsbedingungen im Fermenter B war beim Versuch 5 die Wachstumsgeschwindigkeit im Fed-Batch deutlich erhöht (Abb. 23).

Die besseren Propagationsbedingungen im Fermenter B kamen beim Ertragskoeffizienten des Versuches 5 weniger deutlich zum Ausdruck (Abb. 24).

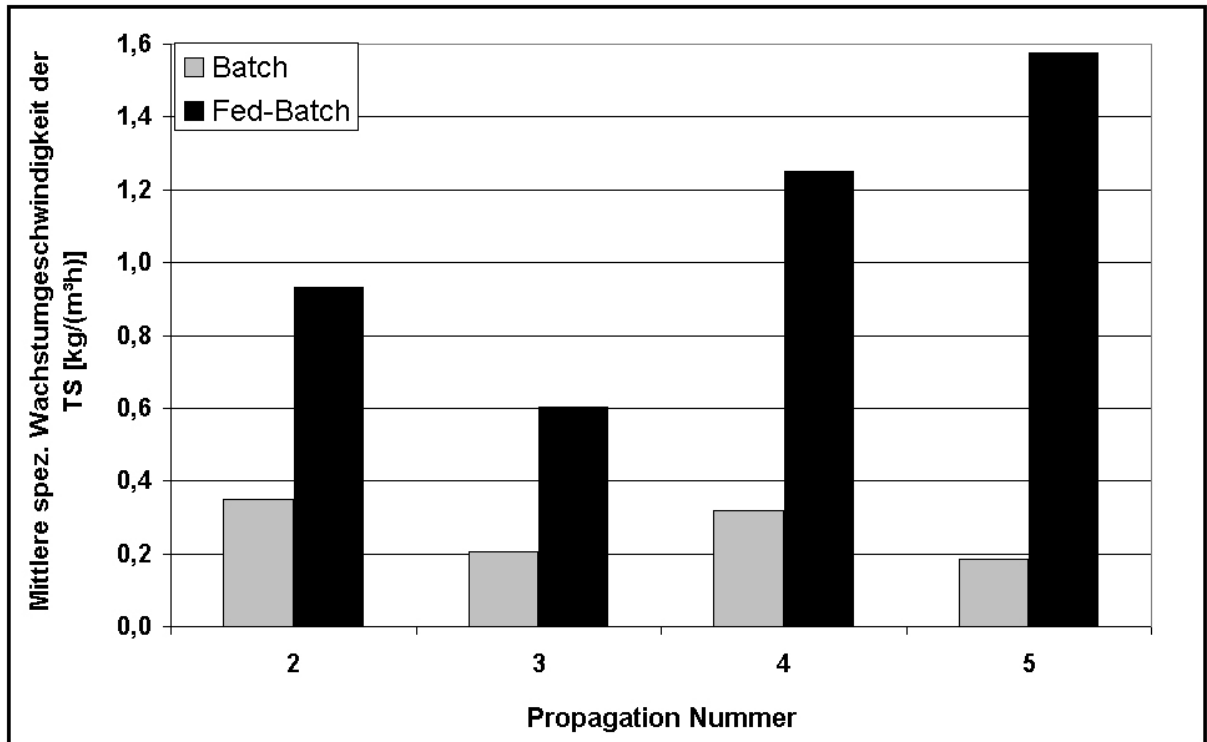


Abb. 23: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmasse der Propagationen mit dem Transformanten A

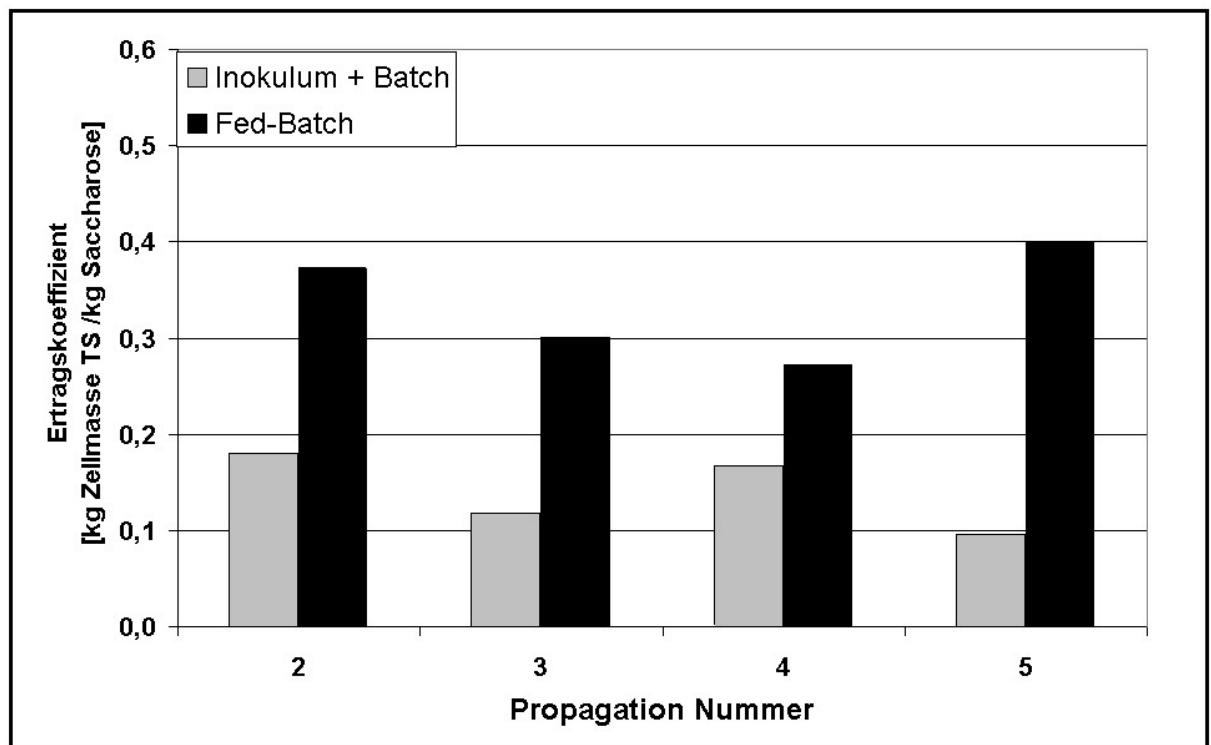


Abb. 24: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten A

4.2.3 Propagationen mit dem Transformanten B: Versuche Nr. 6 - 8

Die Eckdaten der durchgeführten Propagationen mit dem Hefetransformanten B, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in den Tabellen Tab. 19 bis Tab. 21 aufgeführt.

Tab. 19: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten B.

Versuch Nr.	Gesamt- menge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmasse- konzentration [g/L]
6	7	72	3,7	5,2
7	7	72	4,7	6,6
8	7	72	4,9	6,9

Am Ende der Inkubationszeit der Inokulumanzucht zeigten sich nur geringe Unterschiede in der erhaltenen Zell- und Zellmassekonzentration (Tab. 19).

Tab. 20: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten B.

Versuch Nr.	Gesamt- menge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmasse- konzentration [g/L]
6	32	24	8,5	11,6
7	65	24	10,4	14,0
8	32	24	16,0	12,5

Es ist darauf hinzuweisen, daß beim Versuch 6 und 7 aus technischen Gründen abweichend zur standardisierten Arbeitsweise vorgegangen werden mußte. Beim Versuch 7 hatte durch einen Schaltfehler der Substratzulauf schon 6 Stunden nach Beginn der Batch-Phase begonnen. Dabei wurde innerhalb von 3,5 Stunden das Gesamtvolumen der ersten Fed-Batch-Vorlage (35 Liter) zudosiert. Die Phase des Zulaufverfahrens wurde 24 Stunden nach Propagationsbeginn begonnen. Praktisch ergibt sich somit eine Batch-Phase von 24h mit einem Gesamtvolumen von 65 Litern. 28 Stunden nach Beginn des Substratzulaufes wurde ein Füllstand von 97 Litern im Fermenter erreicht. Danach wurde bis zum Ende der Fermentation noch 15 Stunden unter weiterer Luftzufuhr gerührt. Trotz dieser Abweichung von der vorgesehenen

Arbeitsweise wurde am Ende der Batch-Phase eine zu den anderen Versuchen vergleichbar hohe Zell- und Zellmassekonzentration erreicht (Tab. 20).

Tab. 21: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten B.

Versuch Nr.	Gesamt- menge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [$10^8/\text{mL}$]	Zellmasse- konzentration [g/L]
6	135	56	18,1	22,8
7	97	43	23,2	32,2
8	100	65	29,0	32,5

Beim Versuch Nr. 6 war bereits 27 Stunden nach Beginn des Substratzulaufes ein Füllstand von 100 Litern im Fermenter erreicht worden, obwohl nur 35 Liter Substrat in der Vorlage bereit gestellt worden waren. Der verfrühte, unbeabsichtigte Füllstand hatte sich durch ein undichtiges Dampfventil ergeben, wodurch ca. 25 Liter steriles Dampfkondensat in den Fermenter eingedrungen waren. Mit dem Ziel die Propagation weiter zu führen, wurde deshalb eine Teilmenge von 50 Litern des Fermenterinhalt entnommen und daraus die Hefe geerntet. Zu diesem Zeitpunkt war eine Zellkonzentration von $1,75 \cdot 10^9$ Zellen/mL erreicht. Aus dieser Teilmenge wurden 4,42 kg Hefepellet mit 25 % Trockensubstanzgehalt erhalten. Danach wurde die Zulaufphase fortgesetzt, indem die noch im Substratvorlaufbehälter vorhandenen 35 Liter Fed-Batch-Substrat dazu verwendet wurden. Nach weiteren 28,5 Stunden war die vorgelegte Substratmenge verbraucht. Der Fermenterinhalt betrug 85 Liter und die Zellkonzentration war $1,87 \cdot 10^9/\text{mL}$ groß (Tab. 21). Der Versuch wurde zu diesem Zeitpunkt beendet.

Die in Tab. 21 angegebene Zell- und Zellmassekonzentration sowie die in der Abb. 25 und Abb. 26 dargestellte Wachstumsgeschwindigkeit und der Ertragskoeffizient stellen die Mittelwerte aus der Fed-Batch-Phase des Versuches 6 dar. Bedingt durch die Verdünnung der Fermentationsflüssigkeit waren beim Versuch 6 die Zell- und Zellmassekonzentration am Ende der Batch-Phase am kleinsten (Tab. 20).

Die Wachstumsgeschwindigkeit in der Batch- und in der Fed-Batch-Phase des Versuches 6 unterschied sich jedoch kaum. Demgegenüber war die Wachstumsgeschwindigkeit in der Fed-Batch-Phase des Versuches 7 gegenüber der

in der Batch-Phase, bedingt durch die kürzere Inkubationszeit bei vergleichbar hoher Zell- und Zellmassekonzentration, deutlich erhöht (Abb. 25).

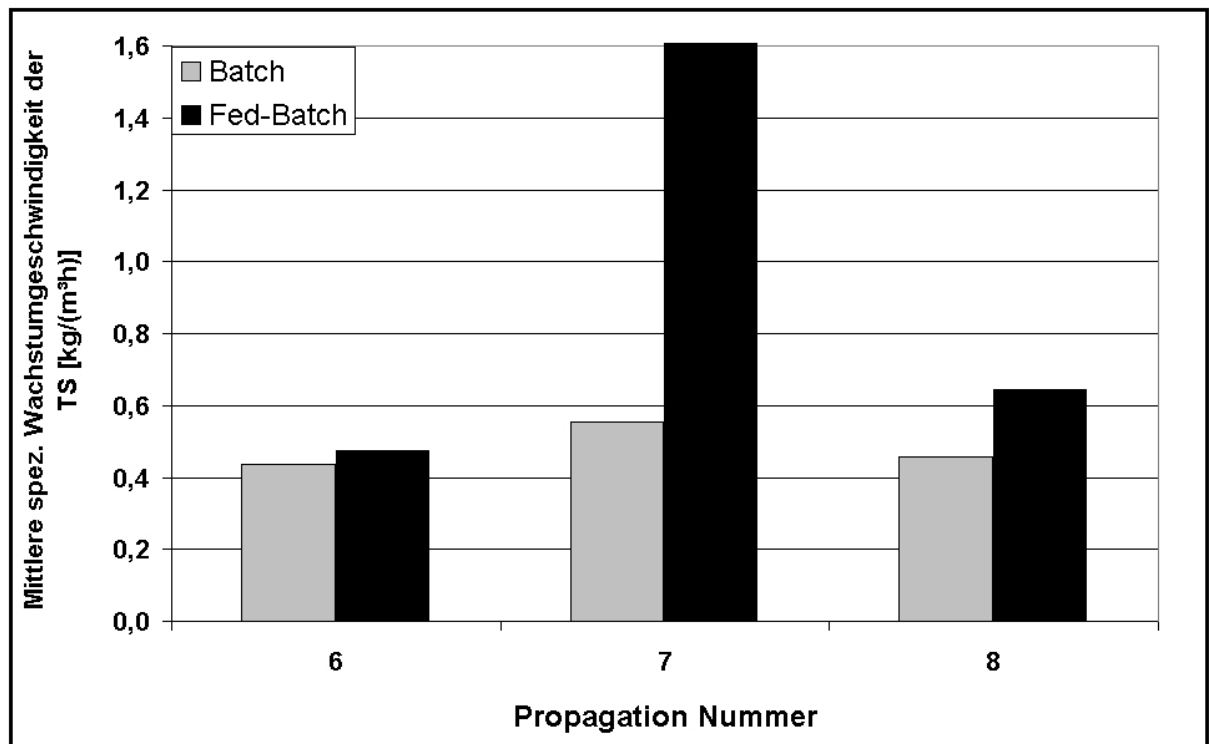


Abb. 25: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten B

Die gegenüber den Normalbedingungen der Propagation des Versuches 8 veränderten Propagationsbedingungen beim Versuch 6 wirkten sich kaum auf den Ertragskoeffizienten aus (Abb. 26). Die Bedingungen des Versuches 7 übten jedoch eine deutliche Wirkung auf den Ertragskoeffizienten der Fed-Batch-Phase aus. Eine Erklärung dafür liefert das größere Batch-Volumen, das nach der Inkubationszeit der Batch-Phase kein assimilierbares Kohlenhydrat mehr enthielt. Die anschließende Substratzufuhr in der Fed-Batch-Phase erfolgte nun auf eine vergleichsweise größere Zellmasse in der Fermentationsflüssigkeit, so daß das Substratzellmasseverhältnis entsprechend kleiner ausfiel. Daraus resultierte eine vollständige Umsetzung der zugesetzten Saccharose.

Erstaunlich war das dabei erreichte Niveau des Ertragskoeffizienten von 0,65 kg Zellmasse TS pro kg Saccharose. Theoretisch liegt der maximale Ertragskoeffizient bei reiner Atmung von Hefe für Glucose bei 0,54 kg Zellmasse TS/kg Glucose. Multipliziert mit dem Faktor 1,052 für die Massezunahme bei der Saccharosehydrolyse zu zwei Glucoseäquivalenten ergibt sich ein maximaler Ertragskoeffizient für Saccharo-

se von 0,57 kg Zellmasse TS/kg Saccharose. Der im Versuch 7 festgestellte Wert von 0,65 kg Zellmasse TS/kg Saccharose lässt sich somit nur durch die Assimilation von weiteren Kohlenstoffquellen erklären, nämlich dem im DS-Medium reichlich enthaltenen Glutamat.

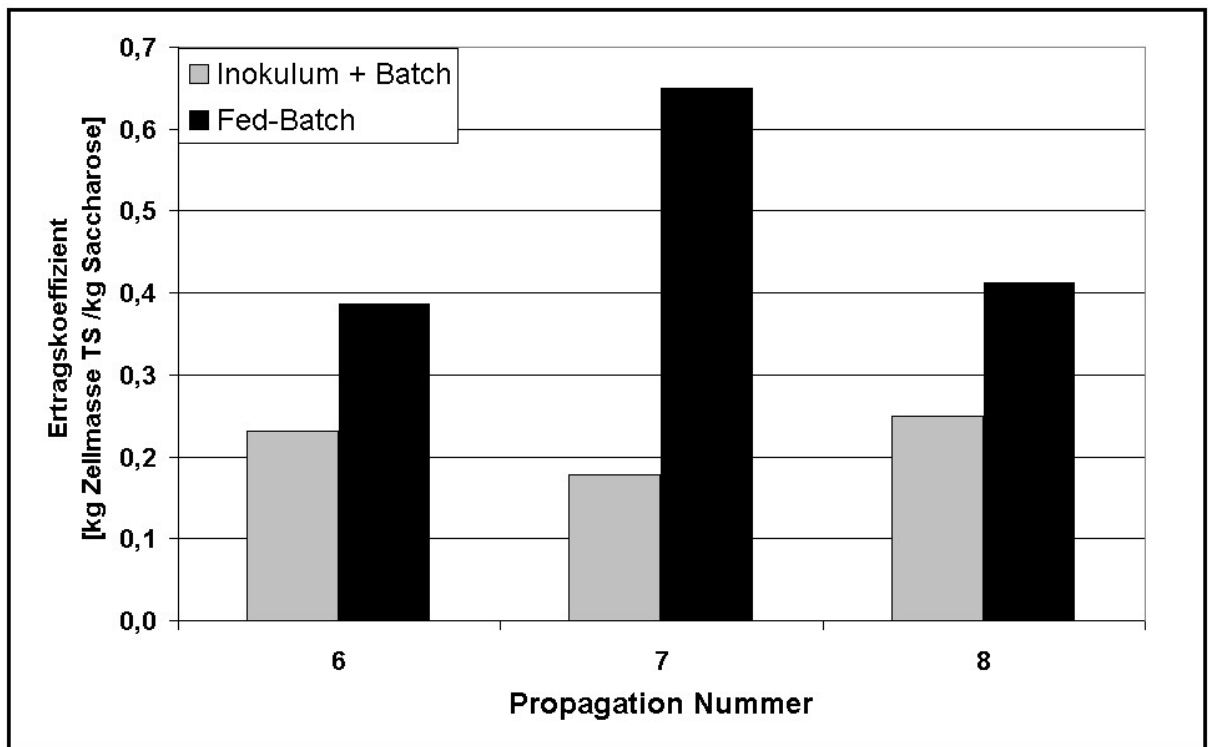


Abb. 26: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten B

4.2.4 Propagationen mit dem Transformanten C: Versuche Nr. 10 - 14

Die Eckdaten der durchgeführten Propagationen mit dem Hefetransformanten C, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in den Tabellen Tab. 22 bis Tab. 24 aufgeführt.

Tab. 22: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten C.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
10	10	120	5,2	7,2
11	10	120	5,0	7,0
12	10	120	4,3	5,9
13	10	120	4,0	5,6
14	10	120	5,2	7,3

Tab. 23: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten C.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
10	30	24	12,0	15,4
11	30	24	15,5	20,0
12	30	24	15,0	19,4
13	30	24	12,6	16,7
14	30	24	14,1	18,4

Die Inokulumanzucht und die Batch-Phasen der Propagationen 10 bis 14 verliefen ohne störende Einflüsse. Deshalb bewegten sich alle ermittelten Zell- und Zellmassekonzentrationen auf gleichem Niveau (Tab. 22 und Tab. 23).

Tab. 24: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten C.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
10	98	65	35,0	39,9
11	98	71	36,0	40,9
12	85	48	34,0	40,7
13	100	51	33,5	40,5
14	90	51	34,9	42,9

Lediglich bei Versuch 12 trat während der Fed-Batch-Phase eine Leckage am Substratzulaufschlauch auf. Das hatte eine kürzere Inkubationszeit und eine kleinere Gesamtmenge am Ende der Fed-Batch-Phase im Fermenter zur Folge. Durch den ansonsten reibungslosen Verlauf der Propagationen während der Fed-Batch-Phase bewegten sich alle ermittelten Zell- und Zellmassekonzentrationen auf gleichem Niveau (Tab. 24).

Die Wachstumsgeschwindigkeit in der Fed-Batch-Phase der Versuche 10 und 11 war, bedingt durch die längere Inkubationszeit bei vergleichbar hoher Zell- und Zellmassekonzentration zu den anderen Versuchen, deutlich kleiner (Abb. 27).

Trotz der längeren Inkubationszeit in der Fed-Batch-Phase, welche durch eine in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration niedrigere Substratzulaufgeschwindigkeit verursacht wurde, wurden bei den Versuchen Nr. 10 und 11 keine höheren Ertragskoeffizienten als bei den Versuchen Nr. 12 bis 14 erreicht (Abb. 28).

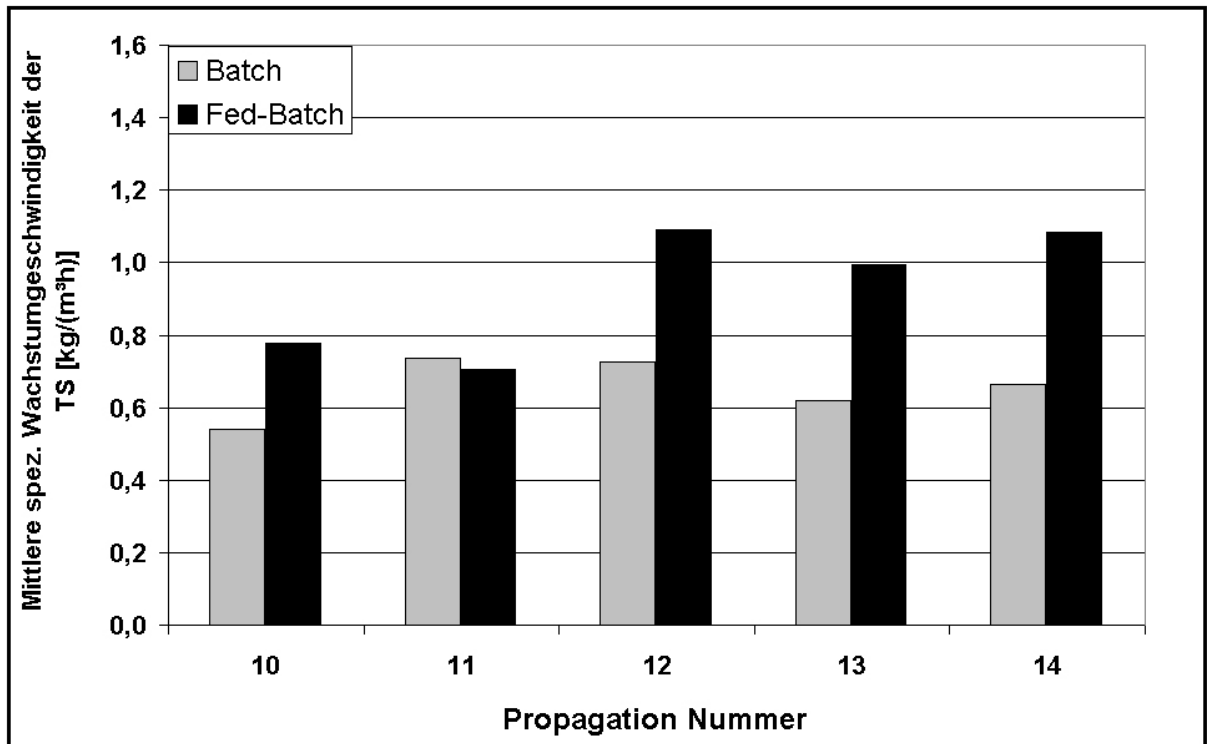


Abb. 27: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten C

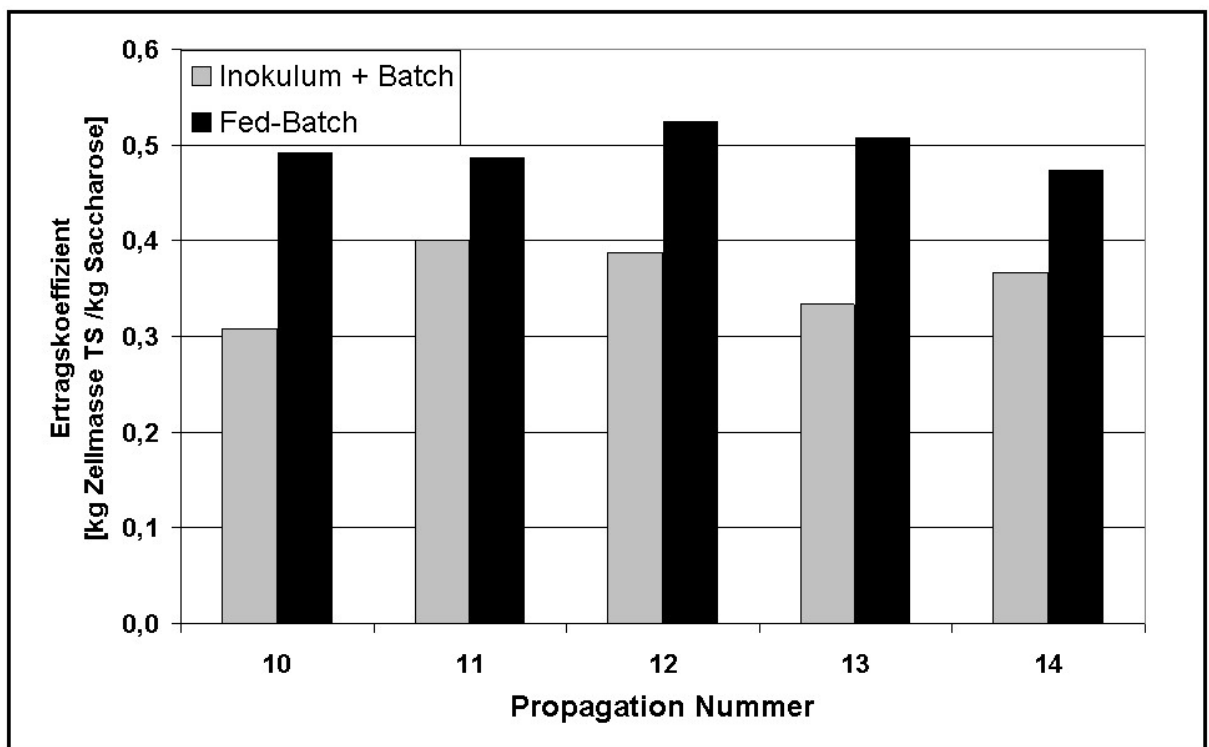


Abb. 28: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten C

4.2.5 Propagationen mit dem Transformanten D: Versuche Nr. 15 - 17

Die Eckdaten der durchgeführten Propagationen mit dem Hefetransformanten D, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in den Tabellen Tab. 25 bis Tab. 27 aufgeführt.

Tab. 25: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten D.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
15	10	120	7,7	10,5
16	10	120	9,7	13,1
17	10	120	8,2	11,2

Tab. 26: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten D.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
15	30	24	16,6	21,3
16	30	24	15,5	19,2
17	30	24	15,9	20,4

Die Inokulumanzucht und die Batch-Phasen der Propagationen Nr. 15 bis 17 verliefen ohne störende Einflüsse. Deshalb bewegten sich alle ermittelten Zell- und Zellmassekonzentrationen auf gleichem Niveau (Tab. 25 und Tab. 26). Die Propagationen verliefen bei allen Versuchen ebenfalls reibungslos. Dennoch ergaben sich am Ende der Fed-Batch-Phase deutliche Differenzen in den ermittelten Zellmassekonzentrationen (Tab. 27). Äquivalent dazu verhielten sich auch die Wachstumsgeschwindigkeit und der Ertragskoeffizient in der Fed-Batch-Phase. Das deutete auf eine verstärkte Gäraktivität während der Fed-Batch-Phase der Versuche 16 und 17

hin (Abb. 29 und Abb. 30). Eine Begründung für diesen Effekt konnte aus den vorhandenen Daten der Propagationsverläufe nicht gefunden werden.

Tab. 27: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten D.

Versuch Nr.	Gesamt- menge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [$10^8/\text{mL}$]	Zellmasse- konzentration [g/L]
15	90	48	36,7	47,8
16	95	48	37,0	41,3
17	98	49	37,3	38,0

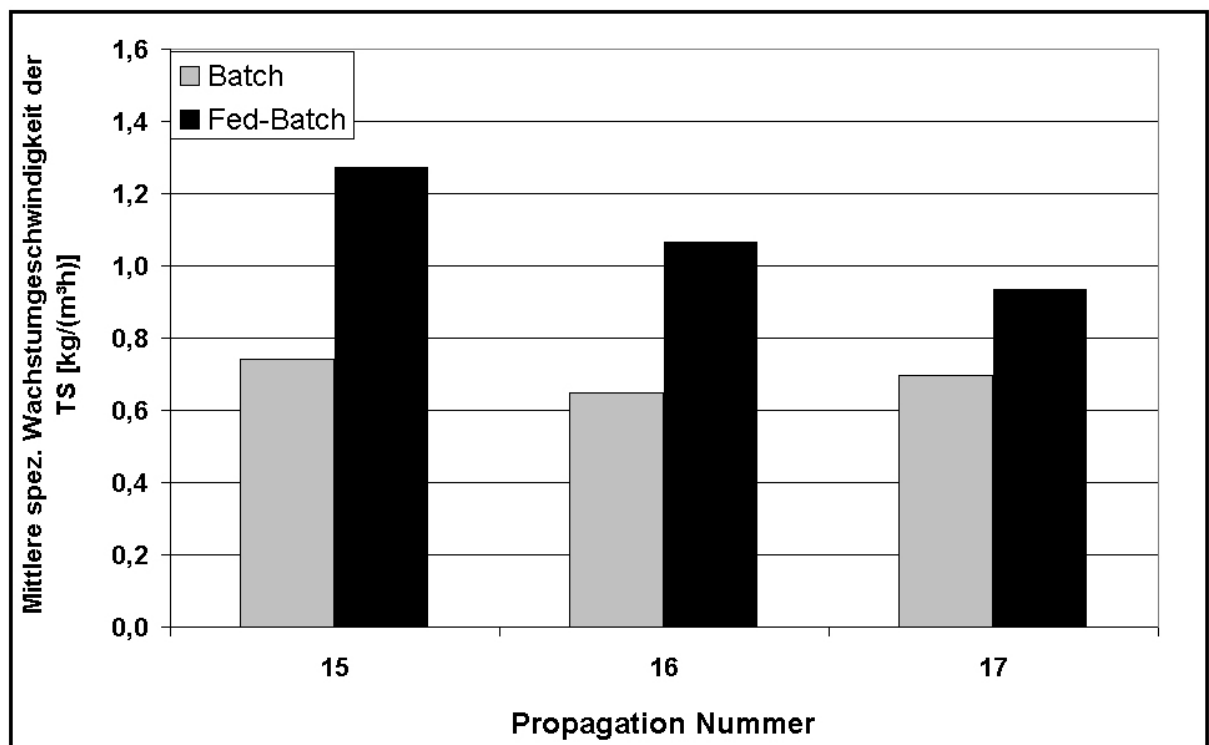


Abb. 29: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten D

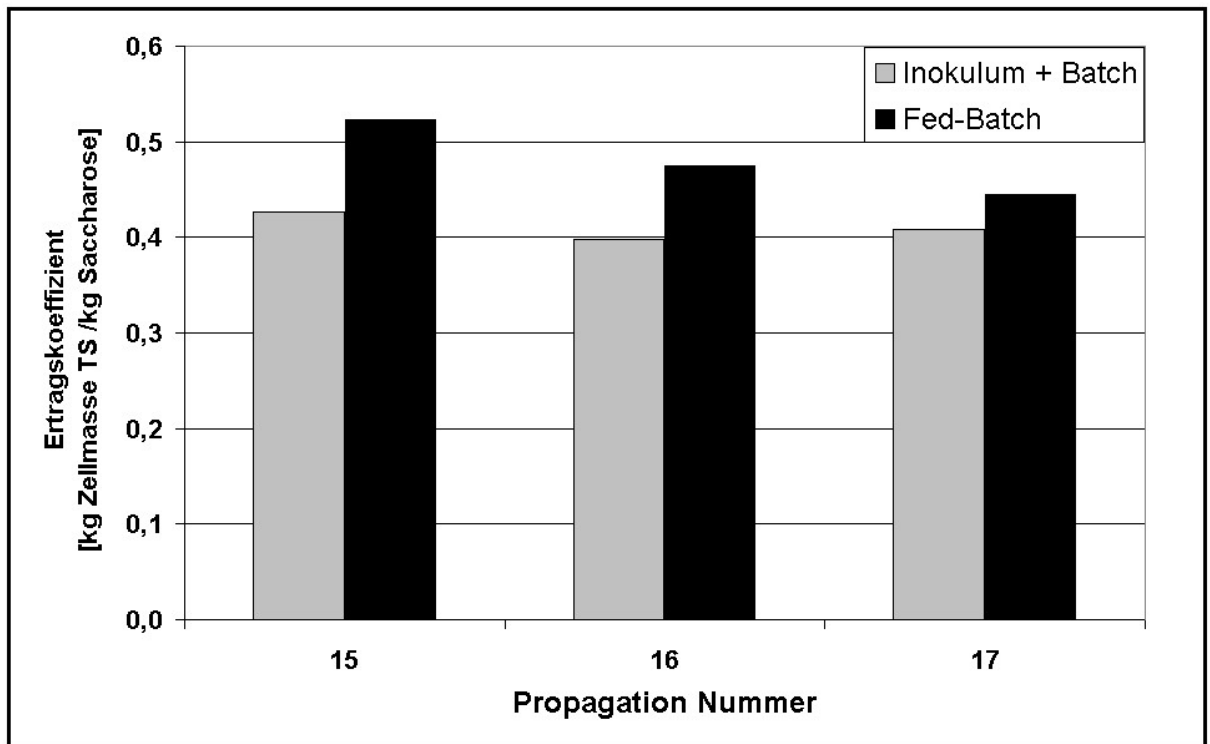


Abb. 30: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten D

4.2.6 Propagationen mit dem Transformanten E: Versuche Nr. 18 - 20

Die Eckdaten der durchgeführten Propagationen mit dem Hefetransformanten E, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in den Tabellen Tab. 28 bis Tab. 30 aufgeführt.

Tab. 28: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten E.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
18	10	120	6,0	8,3
19	10	120	5,4	7,5
20	10	120	5,1	7,2

Tab. 29: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten E.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
18	30	24	15,5	20,0
19	30	24	14,4	18,8
20	30	24	14,7	19,1

Die Inokulumanzucht und die Batch-Phasen der Propagationen Nr. 18 bis 20 verliefen ohne störende Einflüsse. Deshalb bewegten sich alle ermittelten Zell- und Zellmassekonzentrationen auf gleichem Niveau (Tab. 28 und Tab. 29).

Die Fed-Batch-Propagationen verliefen bei allen Versuchen ebenfalls reibungslos. Die kleinere Zellmassekonzentration wurde unter diesen Versuchen mit dem Versuch 19 erhalten (Tab. 30).

Tab. 30: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten E.

Versuch Nr.	Gesamt- menge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmasse- konzentration [g/L]
18	92	49	40,3	45,0
19	95	53	40,3	39,4
20	98	49	36,9	43,8

Die kleinere Zellmassekonzentration in der Fed-Batch-Phase ging beim Versuch 19 mit einer gegenüber den anderen Versuchen kleineren Wachstumsgeschwindigkeit sowie einem niedrigerem Ertragskoeffizienten einher (Abb. 31 und Abb. 32). Dieses Ergebnis läßt auf eine verstärkte Gäraktivität während der Fed-Batch-Phase schließen. Zusätzlich wurde diese Annahme durch die verlängerte Inkubationszeit von 53 Stunden gestützt, welche aus einer in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration verringerten Substratzulaufgeschwindigkeit resultierte. Dieser Effekt konnte jedoch aus den vorhandenen Daten über die Propagationsverläufe nicht begründet werden.

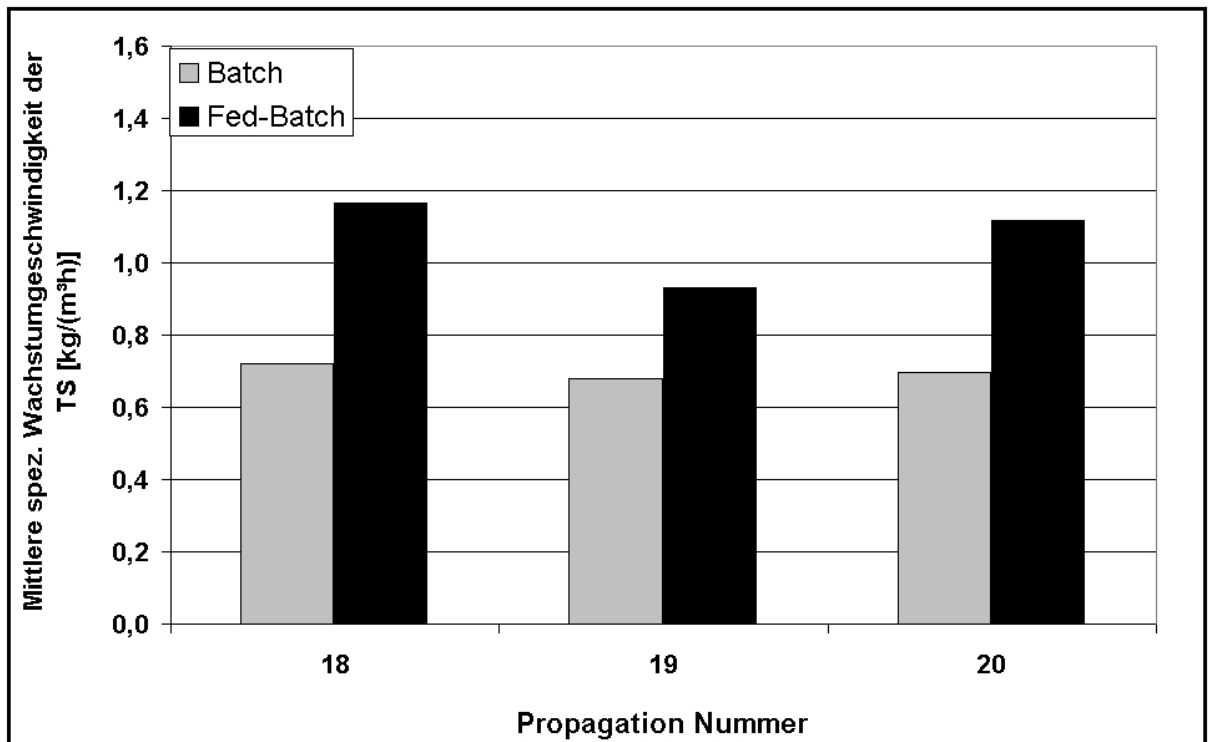


Abb. 31: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten E

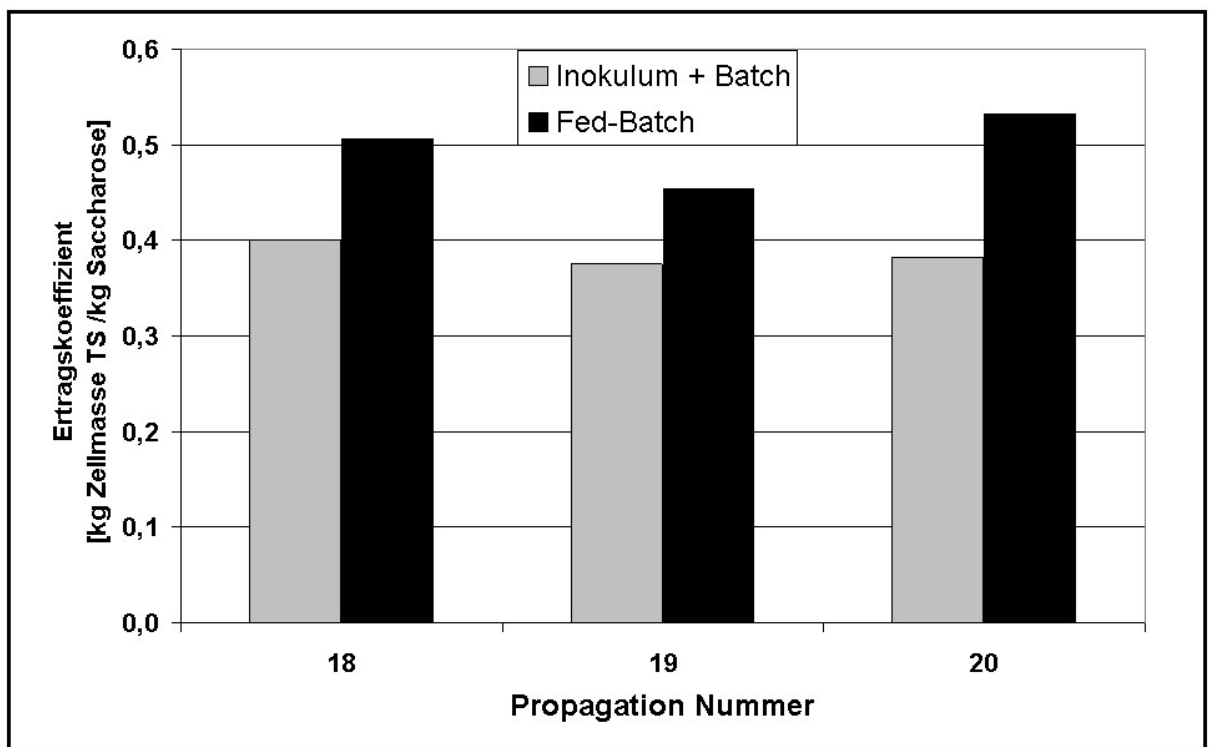


Abb. 32: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten E

4.2.7 Propagationen mit dem Transformanten F: Versuche Nr. 21 - 24

Die Eckdaten der durchgeführten Propagationen mit dem Hefetransformanten F, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in den Tabellen Tab. 31 bis Tab. 33 aufgeführt.

Tab. 31: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten F.

Versuch Nr.	Gesamt- menge	Inkubationszeit	Zellkonzentration	Zellmasse- konzentration
	[L]	[h]	[10 ⁸ /mL]	[g/L]
21	10	120	5,6	7,8
22	10	120	5,4	7,6
23	10	120	3,5	4,9
24	10	120	4,4	6,3

Die Inokulumanzucht verlief außer beim Versuch 23 ohne störende Einflüsse. Deshalb bewegten sich alle ermittelten Zell- und Zellmassekonzentrationen auf gleichem Niveau. Die gegenüber den anderen Versuchen deutlich niedrigere Konzentration an Zellmasse im Inokulum beim Versuch 23 wurde durch einen Ausfall der Luftzufuhr während der letzten Phase der Anzucht verursacht (Tab. 31).

Tab. 32: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten F.

Versuch Nr.	Gesamt- menge	Inkubationszeit	Zellkonzentration	Zellmasse- konzentration
	[L]	[h]	[10 ⁸ /mL]	[g/L]
21	30	24	16,6	21,3
22	30	24	17,1	21,8
23	30	24	16,1	20,7
24	30	24	12,1	16,0

Die Propagation in der Batch-Phase erfolgte außer beim Versuch 24 ebenfalls störungsfrei, weshalb sich alle ermittelten Zell- und Zellmassekonzentrationen für die

Versuche Nr. 21, 22 und 23 auf gleichem Niveau bewegten. Die Zell- und Zellmassekonzentration am Ende der Batch-Phase des Versuches 24 wurde durch einen Ausfall der Luftzufuhr zum Fermenter verursacht (Tab. 32).

Tab. 33: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten F.

Versuch Nr.	Gesamtmenge	Inkubationszeit	Zellkonzentration	Zellmassekonzentration
	[L]	[h]	[10 ⁸ /mL]	[g/L]
21	95	49	39,3	39,8
22	95	49	40,6	44,8
23	95	48	42,4	43,7
24	50	49	34,5	34,7

Der Versuch 24 wurde bedingt durch zusätzlich aufgetretene Probleme während der Fed-Batch-Phase abgebrochen bevor das maximale Nutzvolumen des Fermenters erreicht wurde. Es wurde trotz der technisch bedingten verringerten Substratzulaufgeschwindigkeit eine vergleichbar lange Inkubationszeit wie bei den anderen Versuchen erreicht (Tab. 33).

Die Propagationen Nr. 21 bis 23 verliefen in der Fed-Batch-Phase störungsfrei.

Bedingt durch das kleinere Volumen an Substratzulauf während der Fed-Batch-Phase stellte sich beim Versuch 24 eine gegenüber den anderen Versuchen leicht erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit ein. Die Wachstumsgeschwindigkeit in der Batch-Phase des Versuches 24 war durch den Ausfall der Luftversorgung deutlich kleiner als die der anderen Versuche (Abb. 33). Dieser kleineren Wachstumsgeschwindigkeit entsprach ein deutlich niedriger Ertragskoeffizient, der durch eine erhöhte Gäraktivität in der Batch-Phase verursacht worden war (Abb. 34).

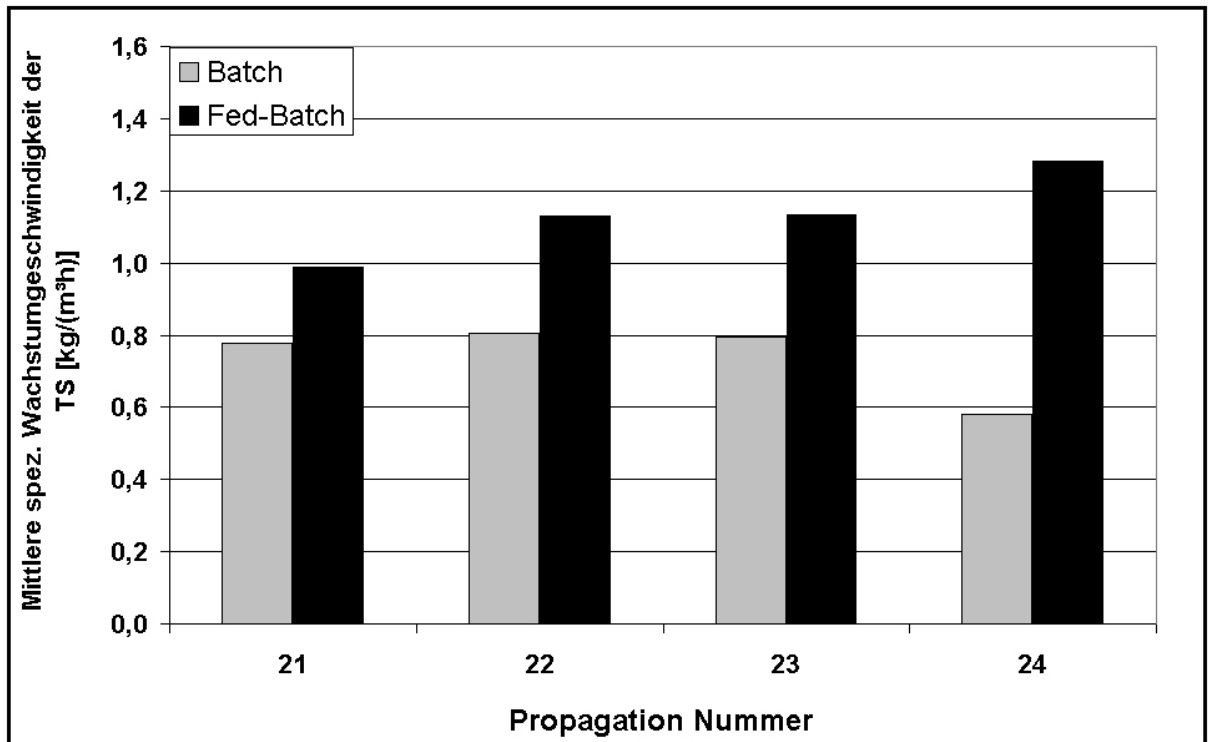


Abb. 33: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten F

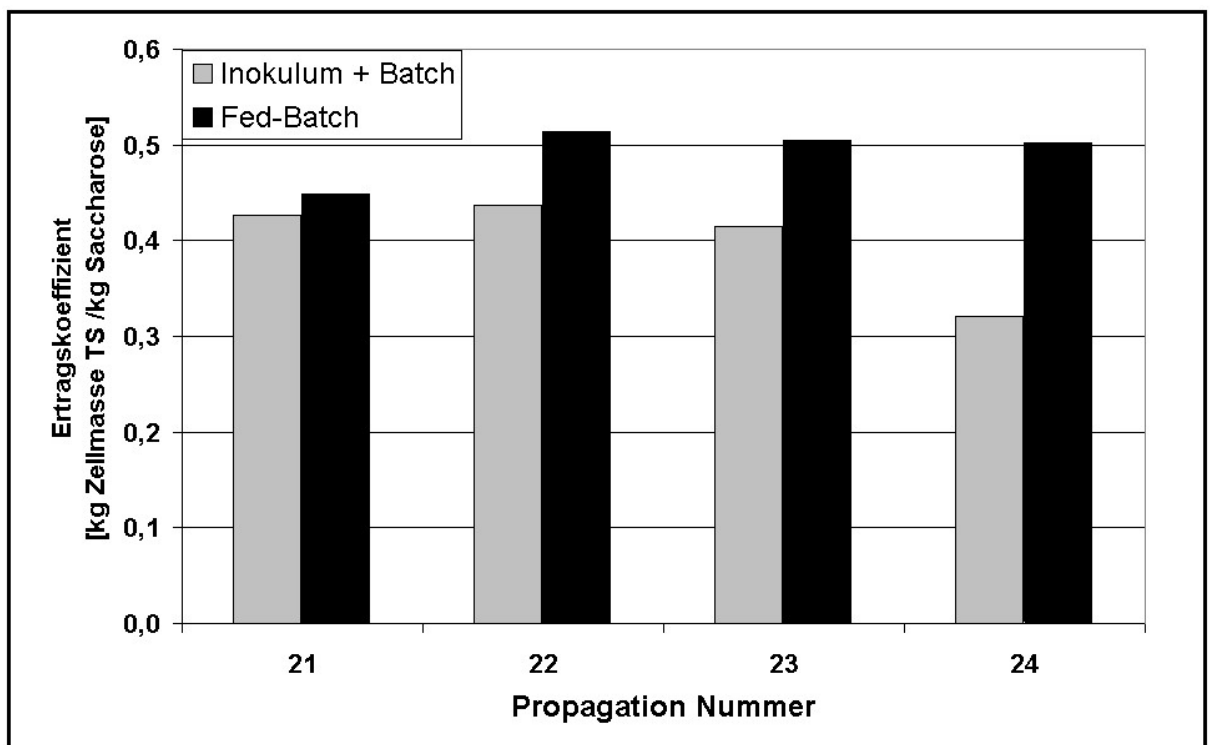


Abb. 34: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten F

4.2.8 Propagationen mit dem Transformanten G: Versuche Nr. 25 - 27

Die Eckdaten der durchgeführten Propagationen mit dem Hefetransformanten G, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in den Tabellen Tab. 34 bis Tab. 36 aufgeführt.

Tab. 34: Eckdaten der Inokulumanzucht der Propagationen mit dem Transformanten G.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
25	10	120	4,7	6,6
26	10	120	6,7	9,3
27	10	120	5,6	7,8

Tab. 35: Eckdaten der Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten G.

Versuch Nr.	Gesamtmenge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmassekonzentration [g/L]
25	30	24	10,6	14,2
26	30	24	10,8	14,5
27	30	24	13,8	18,1

Die Inokulumanzucht und die Batch-Phasen der Propagationen 25 bis 27 verliefen ohne störende Einflüsse. Deshalb bewegten sich alle ermittelten Zell- und Zellmassekonzentrationen auf gleichem Niveau (Tab. 34 und Tab. 35).

Abweichend von den bisher in der Fed-Batch-Phase angewandten Prozeßparametern wurde beim Versuch 26 für die letzten 35 Liter der Substratzufuhr DS-Medium mit dreifach erhöhter Nährstoffkonzentration (150 g Saccharose/L) benutzt. Diese erhöhte Nährstoffkonzentration führte bei gleicher Inkubationszeit am Ende der Fed-Batch-Phase zu einer deutlich erhöhten Zell- und Zellmassekonzentration (Tab. 36).

Dieser Effekt spiegelte sich auch deutlich in der erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber den anderen Versuchen während der Fed-Batch-Phase des Versuches 26 wieder (Abb. 35). Der Ertragskoeffizient der Fed-Batch-Phase des Versuches 26 war leicht größer als der der beiden anderen Versuche (Abb. 36). Dies war ein Indiz dafür, daß bei den anderen Propagationen mit dem Transformanten G die volle „Vermehrungskapazität“ der Hefe in der Fed-Batch-Phase nicht genutzt wurde. Die konstante Beschleunigung des Substratzulaufes, welche aus Erfahrungswerten festgelegt wurde, die aus vorhergehenden Versuchen mit den anderen Transformanten gesammelt worden waren, war somit für die Fed-Batch-Propagation der Versuche Nr. 25 und 27 nicht optimal ausgewählt. Es hätten sich somit bei größerer Beschleunigung kürzere Inkubationszeiten und höhere Wachstumsgeschwindigkeiten im Fed-Batch realisieren lassen.

Tab. 36: Eckdaten der Fed-Batch-Propagation der Propagationen mit dem Transformanten G.

Versuch Nr.	Gesamt- menge	Inkubationszeit	Zellkonzentration	Zellmasse- konzentration
	[L]	[h]	[10 ⁸ /mL]	[g/L]
25	95	49	36,7	42,7
26	95	49	47,7	56,3
27	90	48	36,7	43,0

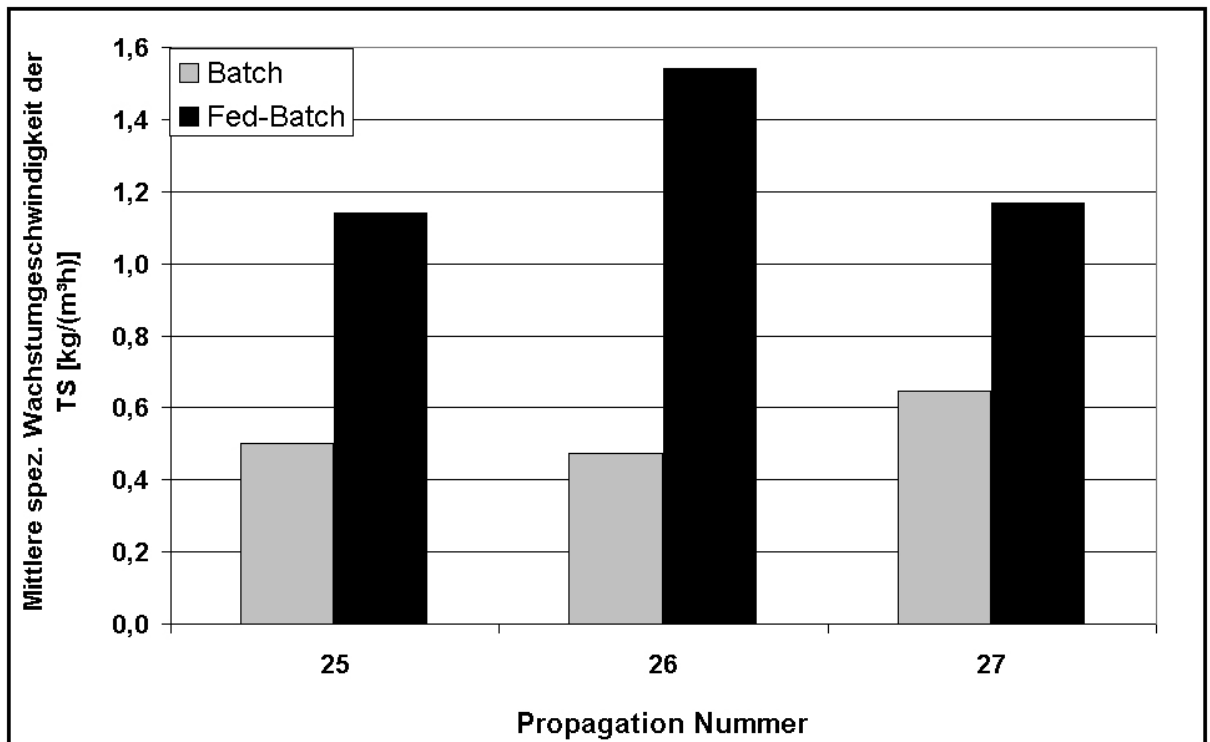


Abb. 35: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit dem Transformanten G

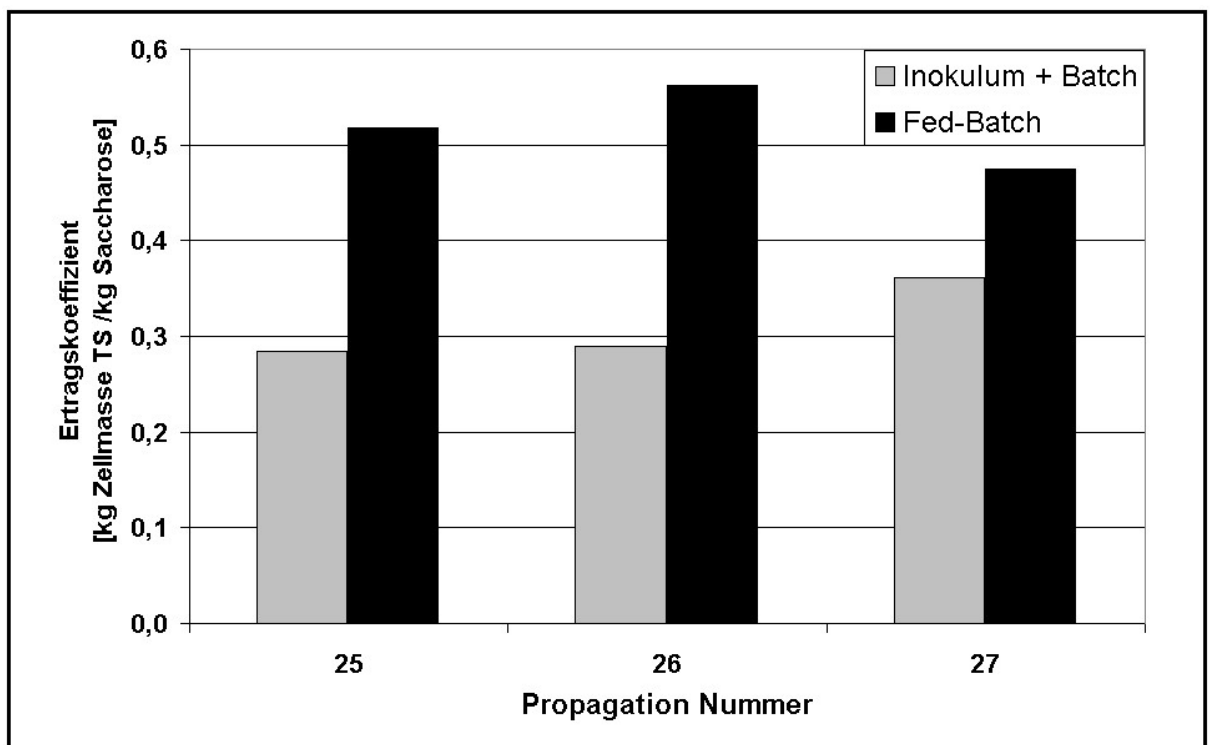


Abb. 36: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit dem Transformanten G

4.2.9 Propagation mit dem nicht transgenen Bäckerhefestamm Typ 2.200: Versuch Nr. 28

Es wurde ein Stamm der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* Typ 2.200 mit dem Ziel, die aus den Versuchen 2 bis 27 erhaltenen Eckdaten der Zellvermehrung mit denen einer Propagation konventioneller Bäckerhefe zu vergleichen im Fermenter B vermehrt. Die Propagationsbedingungen und –parameter waren identisch zu denen der vorausgegangenen Versuche im Fermenter B. Es wurde lediglich die Beschleunigung des Substratzulaufes der Fed-Batch-Phase erhöht.

Die Eckdaten der durchgeführten Propagation mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* Typ 2.200, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in der nachfolgenden Tab. 37 aufgeführt.

Die erreichten Zell- und Zellmassekonzentrationen während der Batch- und Fed-Batch-Phase bewegten sich im oberen Feld der bisher mit den Transformanten A bis G erreichten Konzentrationen (Tab. 37). Dabei wurde bei gleichen Propagationsbedingungen im Vergleich zu den Transformanten A bis G eine wesentlich kürzere Propagationszeit während der Fed-Batch-Phase erreicht. Das geht aus der deutlich größeren Wachstumsgeschwindigkeit von 2,1 kg/(m³h) im Vergleich mit den erreichten Wachstumsgeschwindigkeiten mit den Transformanten A bis G in der Fed-Batch-Phase hervor (Tab. 38). Der bei diesem Versuch ermittelte Ertragskoeffizient von 0,57 kg/kg Saccharose entsprach dem des theoretischen Optimums (vgl. Abschnitt 4.2.3). Er war größer als der aller in den Fed-Batch-Phasen mit den Transformanten A bis G erreichten, mit Ausnahme des im Versuch 7 erreichten.

Tab. 37: Eckdaten der Vermehrungsschritte der Propagation mit dem Bäckerhefestamm Typ 2.200.

Phase	Gesamt- menge	Inkubationszeit	Zellkonzentration	Zellmasse- konzentration
	[L]	[h]	[10 ⁸ /mL]	[g/L]
Inokulum	10	120	3,2	4,5
Batch	30	24	13,6	17,8
Fed-Batch	100	27	38,2	44,9

Tab. 38: Wachstumsgeschwindigkeit und Ertragskoeffizient der Propagation mit dem Bäckerhefestamm Typ 2.200.

Phase	Mittlere spez. Wachstumsge- schwindigkeit TS	Ertragskoeffizient Zellmasse TS
	[kg/(m ³ h)]	[kg/kg Saccharose]
Batch	0,68	-
Fed-Batch	2,09	-
Inokulum + Batch	-	0,36
Fed-Batch	-	0,57

4.2.10 Propagation mit dem Transformanten H: Versuch Nr. 29

Zur Bewertung der mit den transgenen Hefen erzielten Vermehrungsergebnisse wurde ein Transformant des Laborstammes *Saccharomyces cerevisiae* AH 22 *ura3* Δ *pmt1*, welcher lediglich das Kontrollplasmid *pYex-Bx* enthielt, im Fermenter B vermehrt. Dieser Kontrolltransformant stellte die gleichen Nährstoffansprüche an das Substrat wie die Transformanten A bis G, die keinen Bedarf an Leucin und Uracil haben. Ziel dieser Propagation war es zu prüfen, ob die WSP-Produktion der Transformanten A bis G eine Belastung für die Zellvermehrung dieser Hefen darstellte. Die Propagationsbedingungen und –parameter waren identisch zu denen der vorausgegangenen Versuche im Fermenter B. Es wurde lediglich die Beschleunigung des Substratzulaufes der Fed-Batch-Phase erhöht.

Die Eckdaten der durchgeführten Propagation mit dem Transformanten H, d.h. der Inokulumanzucht und der Propagation im Fermenter mittels Batch- und Fed-Batch-Verfahren, sind in der Tab. 39 aufgeführt.

Tab. 39: Eckdaten der Vermehrungsschritte der Propagation mit dem Transformanten H.

Phase	Gesamt- menge [L]	Inkubationszeit [h]	Zellkonzentration [10 ⁸ /mL]	Zellmasse- konzentration [g/L]
Inokulum	10	120	4,6	6,5
Batch	30	24	13,3	17,5
Fed-Batch	100	23	31,3	41,9

Die erreichten Zell- und Zellmassekonzentrationen während der Batch- und Fed-Batch-Phase bewegten sich im oberen Feld der mit den Transformanten A bis G erreichten Konzentrationen (Tab. 39).

Tab. 40: Wachstumsgeschwindigkeiten und Ertragskoeffizienten der Propagation mit dem Transformanten H.

Phase	Mittlere spez. Wachstumsge- schwindigkeit TS	Ertragskoeffizient Zellmasse TS
	[kg/(m ³ h)]	[kg/kg Saccharose]
Batch	0,67	-
Fed-Batch	2,28	-
Inokulum + Batch	-	0,35
Fed-Batch	-	0,52

Bei diesem Versuch wie auch beim Versuch 28 wurde unter gleichen Propagationsbedingungen eine wesentlich verkürzte Propagationszeit im Vergleich zu den Propagationen mit Transformanten A bis G während der Fed-Batch-Phase erreicht. Das belegt die Wachstumsgeschwindigkeit, welche die höchste aller durchgeführten Propagationen war. Der Ertragskoeffizient der Zellmasse während der Fed-Batch-Phase bewegte sich im oberen Feld der mit den Transformanten A bis G erreichten Werte. (Tab. 40)

4.2.11 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Propagationen:

Versuche Nr. 2 - 29

Zur Durchführung einer vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse der Propagationen, die mit den Transformanten und der Bäckerhefe erzielt worden waren, wurden Mittelwertberechnungen für die Wachstumsgeschwindigkeit und den Ertragskoeffizient durchgeführt. Dazu mußten wegen der vereinzelt aufgetretenen Abweichungen in den Propagationsbedingungen vom standardisierten Verfahren (vgl. Abschnitte 4.2.2 bis 4.2.10) einzelne Ergebnisse aus der Berechnung entfernt werden (Tab. 41). Diese Reduktion der Varianzen ermöglichte es, die mit den einzelnen Transformanten und der Bäckerhefe erzielten Ergebnisse untereinander vergleichen zu können.

Tab. 41: Unberücksichtigte Ergebnisse bei den Mittelwertberechnungen der Wachstumsgeschwindigkeit und des Ertragskoeffizienten.

Phase	Mittlere spez. Wachstumsgeschwindigkeit TS (Versuche Nr.)	Ertragskoeffizient Zellmasse TS (Versuche Nr.)
Batch	5, 7, 9, 24	
Fed-Batch	5, 7, 9, 24, 26	
Inokulum + Batch		5, 7, 9, 24
Fed-Batch		5, 7, 9, 24, 26

Der Versuch 5 mit dem Transformanten A wurde trotz gleicher Prozeßparameter ebenfalls nicht berücksichtigt, weil diese Propagation im Unterschied zu den weiteren mit dem Transformanten A durchgeführten Propagationen, im Fermenter B erfolgt war. Somit resultierten die hier dargestellten Mittelwerte der Versuche mit dem Transformanten A auf Propagationen im Fermenter A und sind deshalb nur bedingt direkt mit den im Fermenter B durchgeführten Propagationen vergleichbar.

Die in der Abb. 37 dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit der Bäckerhefe Typ 2.200 und des Transformanten H gegenüber den Transformanten B bis G während der Fed-Batch-Phase. Somit bestätigte sich die Annahme, daß die zusätzliche WSP-Produktion der Transformanten B bis G eine Belastung für deren Zellvermehrung darstellte. Davon kann auch beim Transformanten A ausgegangen werden. Während der Batch-Phase

zeigten die Bäckerhefe und der Transformant H eine Wachstumsgeschwindigkeit, die praktisch dem Mittelwert der Wachstumsgeschwindigkeit der Transformanten B bis G entsprach. Dieses Verhalten ist auf die Inkubationszeit von 24 h zurückzuführen, die bei allen Versuchen konstant gehalten wurde.

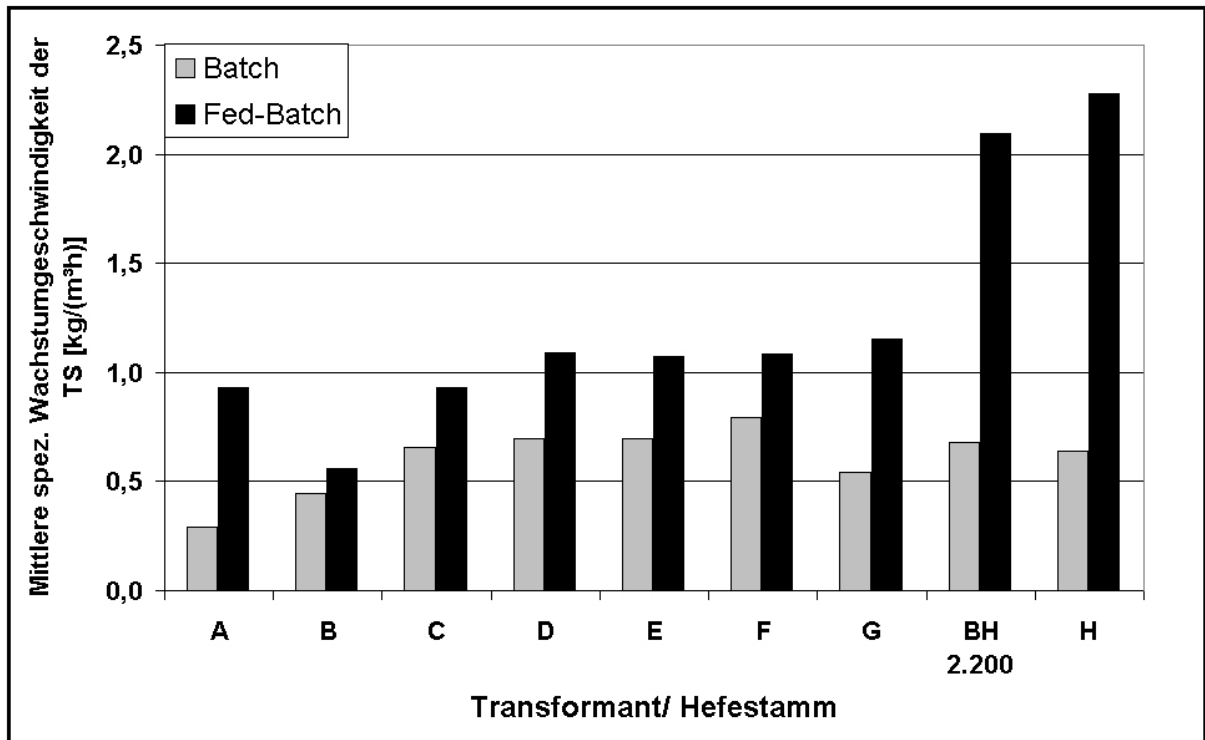


Abb. 37: Mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Trockenmassen der Propagationen mit den Transformanten und der Bäckerhefe

Während der Fed-Batch-Phase war der Ertragskoeffizient der Bäckerhefe (BH 2.200) mit 0,57 kg Hefetrockensubstanz /kg Saccharose größer als der der Transformanten. Der Mittelwert des Ertragskoeffizienten für die Propagationen mit den Transformanten C bis H von ca. 0,5 kg Hefetrockensubstanz /kg Saccharose war jedoch nur wenig kleiner als der Ertragskoeffizient der Bäckerhefe (Abb. 38). Folglich wurde bei den Propagationen der Transformanten während der Fed-Batch-Phase eine annähernd optimale Zuckerumsetzung zu Hefebiomasse erreicht. Der deutlich niedrigere Wert für den Ertragskoeffizienten des Transformanten A waren auf die unzureichenden Propagationsbedingungen im Fermenter A zurückzuführen.

Der Ertragskoeffizienten der sich aus der Inokulumanzucht und der Batch-Phase ergibt, verhielt sich proportional zur Wachstumsgeschwindigkeit in der Batch-Phase (Abb. 39).

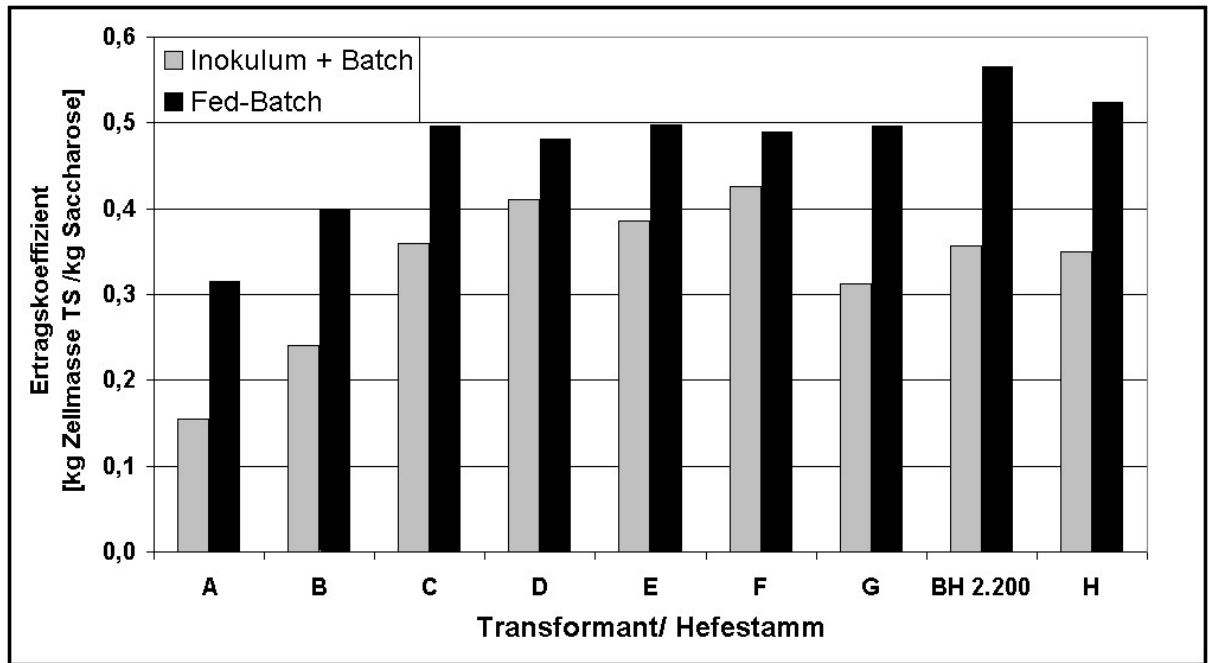


Abb. 38: Ertragskoeffizient der Zellmassen der Propagationen mit den Transformanten und der Bäckerhefe

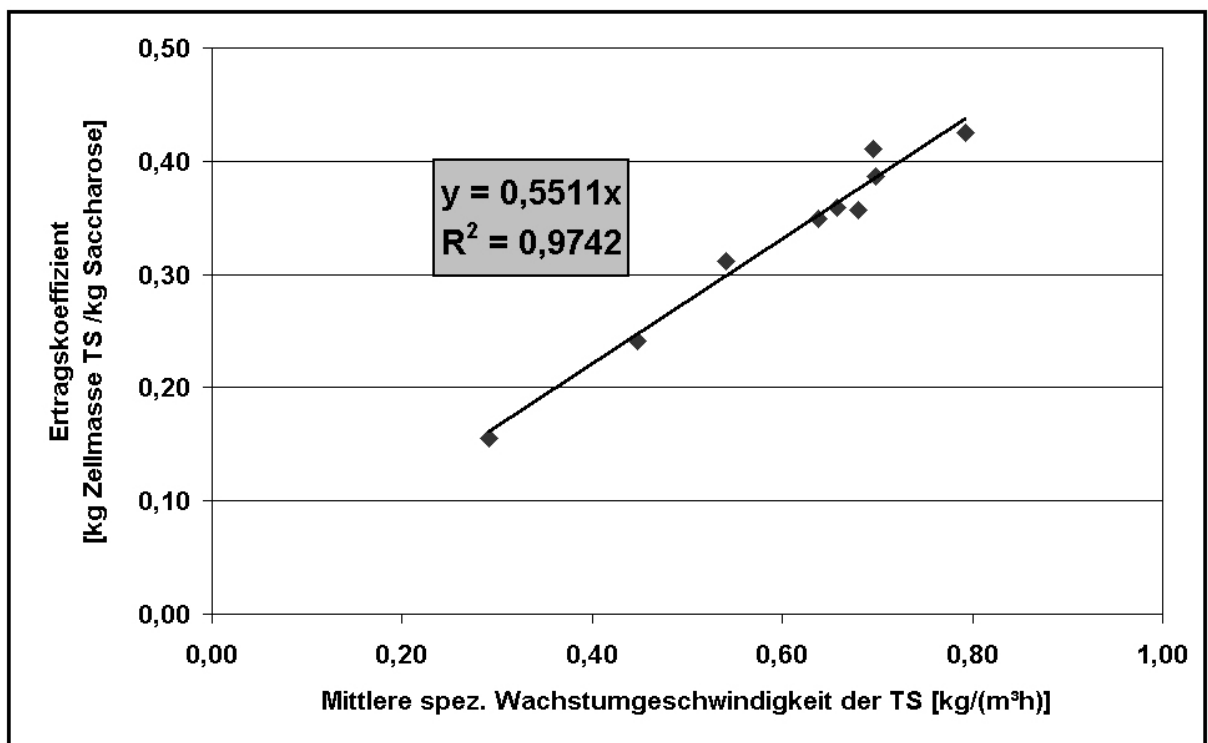


Abb. 39: Ertragskoeffizient als Funktion der Wachstumsgeschwindigkeit während der Batch-Phasen

Während der Fed-Batch-Phasen wurde dieser Zusammenhang nicht deutlich (vergl. Abb. 37 mit Abb. 38).

4.3 Hefeernte

Die Hefeernte aus der Fermentationsflüssigkeit erfolgte durch Separation mit einem selbstaustragenden Tellerseparator (GEA Westfalia Separator Typ SC 6).

Der Separator wurde mit folgenden Einstellungen betrieben:

Tab. 42: Parameter des Tellerseparatorbetriebes.

Zulaufgeschwindigkeit der Fermentationsflüssigkeit	50 bis 80 L/h
Separieren Teilentleerungsintervall	50 bis 60 sec
Separieren Vollentleerungsintervall	15 min
Separieren Teilentleerungszeit	2 sec

Mit diesen Einstellungen wurden die Hefezellen so effizient separiert, daß in der Flüssigphase nur noch eine Zellkonzentration von $\leq 1 \cdot 10^5$ Zellen/mL gefunden wurde. Mit den oben genannten Prozeßparametern wurde eine erste Anreicherung der Zellmasse aus der Fermentationsflüssigkeit um den Faktor $\cong 3$ erreicht, d.h. das Gesamtvolumen der Fermentationsflüssigkeit wurde auf ca. 1/3 des Fermenterinhaltess verringert. Danach war die erhaltene Feststoffphase noch so dünnflüssig, daß diese mit minimalen Verlusten aus dem Separator ausgetragen wurden. Die Flüssigphase wurde nach erfolgter Hitzebehandlung bei 100°C für 30 min verworfen (S1-Sicherheitsvorschrift). Im Anschluß wurde die weitere Aufkonzentrierung der Hefebiomasse in einer Becherzentrifuge mit 2,5 Liter Fassungsvermögen durchgeführt. Dabei war eine Zentrifugationszeit von 5 min bei 5000 min⁻¹ ausreichend (entspr. 5500 * g am maximalen Radius), um die Zellmasse als pastöses Pellet zu erhalten. Auch hierbei war der Trenneffekt so effizient, daß in der Flüssigphase eine Zellkonzentration von $\leq 1 \cdot 10^5$ Zellen/mL gefunden wurde. Die Flüssigphase wurde verworfen. Die pastösen Hefezellmasse wurde bis zur weiteren Verarbeitung tiefgekühlt eingelagert.

Die Eckdaten der Hefeernte und die Analyseergebnisse einzelner Fraktionen sind in den Tabellen Tab. 43 und Tab. 44 zusammengefaßt. Der Trockensubstanz- und der Proteingehalt der beiden Phasen nach der Separation im Tellerseparator wurden ab dem Versuch 15 bestimmt (Tab. 43). Der Trockensubstanzgehalt der Feststoffpha-

sen bewegte sich im Bereich von 10,4 bis 14,9 %. Die Streuung der Werte für den Trockensubstanzgehalt sowie der tendenziell erhöhten Wert beim Transformanten F resultieren aus einer erhöhten Zulaufgeschwindigkeit der Fermentationsflüssigkeit zum Separator bei diesen Versuchen. Ließ sich die Fermentationsflüssigkeit bei einer Zulaufgeschwindigkeit von 50 L/h leicht trennen (subjektive Beobachtung der Trübung), so wurde die Zulaufgeschwindigkeit gegen 80 L/h erhöht. Bei konstant gehaltenem Teilentleerungsintervall erhöhte sich somit der Trockensubstanzgehalt der Feststoffphase.

Tab. 43 Eckdaten der Hefeernte nach der Separation im Tellerseparator.

Versuch Nr./ Transformant	Flüssigphase Separation (Tellerseparator)		Feststoffphase Separation (Tellerseparator)	
	TS [%]	Protein [%]	TS [%]	Protein [%]
15/ D	1,8	35,9	10,8	43,2
16/ D	1,9	34,9	11,0	43,9
17/ D	1,6	35,7	10,5	43,5
Mittelwert	1,7	35,5	10,8	43,5
18/ E	2,1	39,8	14,1	46,1
19/ E	2,1	38,4	11,8	43,6
20/ E	2,0	36,8	10,8	44,6
Mittelwert	2,1	38,3	12,2	44,8
21/ F	2,0	30,6	14,4	46,9
22/ F	2,0	32,6	14,9	44,8
23/ F	1,9	45,2	13,4	43,6
24/ F	2,1	34,3	12,6	43,0
Mittelwert	2,0	36,1	14,2	45,1
25/ G	1,9	31,4	10,4	43,1
26/ G	2,4	38,1	13,4	42,1
27/ G	2,1	36,5	11,9	43,8
Mittelwert	2,1	35,4	11,9	43,0

Die Werte für den Trockensubstanzgehalt der Flüssigphase bewegten sich im Bereich von 1,6 bis 2,4 %. Da die Flüssigphase kaum noch Hefezellen enthielt ($\leq 1 \cdot 10^5$ Zellen/mL) resultieren die gefundenen Werte für den Trockensubstanzgehalt höchstwahrscheinlich aus unverbrauchten Substratnährstoffen (stickstofffreien Mineralstoffen) sowie Hefeautolysationsprodukten. Die kleineren Werte für den Proteingehalt der Trockensubstanz der Flüssigphase im Vergleich zu den Werten für den Proteingehalt der Trockensubstanz der Feststoffphase unterstützt diese Vermutung.

Bei der weiteren Aufkonzentrierung der Hefebiomasse in der Becherzentrifuge bewegte sich der Trockensubstanzgehalt der Erntehefe (Feststoffphasen nach der Zentrifugation in der Becherzentrifuge) außer bei den Versuchen mit dem Transformanten A auf gleichem Niveau (Tab. 44). Beim Transformanten A war der Trockensubstanzgehalt dieser Phase um durchschnittlich 4,3 % kleiner. Dies konnte auch subjektiv anhand der Konsistenz der Feststoffphase beobachtet werden. Ob dieses Ergebnis durch eine Hefeeigenschaft bedingt wurde oder auf die veränderten Propagationsbedingungen im alten Fermenter zurückzuführen war, bleibt unklar.

Bei fast allen Versuchen zeigte die Feststoffphase, welche nach der Zentrifugation in der Becherzentrifuge erhalten wurden, einen tendenziell leicht erhöhten Proteingehalt in ihrer Trockensubstanz im Vergleich zum Proteingehalten in der Trockensubstanz der Feststoffphase nach der Separation (vgl. Tab. 43 mit Tab. 44). Diese Differenz erklärt sich ebenfalls durch die gelösten, unverbrauchten Substratnährstoffe (stickstofffreien Mineralstoffen) sowie Hefeautolysationsprodukte, die in der trockensubstanzärmeren Feststoffphase nach der Separation in größerer Menge vorhanden waren.

Der Proteingehalt der Erntehefe bewegte sich, mit Ausnahme beim Versuch 24, zwischen 43,2 % und 49,7 %. Da der Versuch 24 (Transformant F) wegen unwidriger Umstände während der Propagation abgebrochen wurde, zeigte die erhaltene Erntehefe einen überdurchschnittlich hohen Proteingehalt von 51,6 %. Dennoch ließ sich beim Transformanten F eine tendenziell erhöhte Proteinbildung erkennen, da auch beim Versuch 21 bei standardisierten Propagationsbedingungen, ein Spitzenwert im Proteingehalt von 49,7 % erhalten wurde.

Tab. 44: Eckdaten der Hefeernte durch Zentrifugation.

Versuch Nr./ Transformant	Feststoffphase Zentrifugation (Becherzentrifuge)		
	Menge pastöse Erntehefe [kg]	Trockensubstanzgehalt [%]	Proteingehalt TS [%]
2/ A	5,8	22,4	43,4
3/ A	4,8	21,5	44,1
4/ A	4,9	21,0	45,6
5/ A	7,3	21,3	45,2
Mittelwert		21,6	44,6
6/ B	12,5*	24,7**	45,7**
7/ B	13,0	24,0	45,1
8/ B	13,0	25,0	45,9
Mittelwert		24,6	45,6
10/ C	15,2	25,7	43,2
11/ C	15,4	26,0	44,1
12/ C	14,1	24,5	44,9
13/ C	15,9	25,5	46,0
14/ C	16,1	24,0	45,6
Mittelwert		25,1	44,8
15/ D	16,6	26,0	45,8
16/ D	15,1	25,9	43,4
17/ D	14,5	25,7	45,4
Mittelwert		25,8	44,8
18/ E	15,5	26,7	45,6
19/ E	14,5	25,3	46,3
20/ E	15,6	27,6	46,7
Mittelwert		26,5	46,2
21/ F	15,5	24,4	49,7
22/ F	15,3	27,9	44,9
23/ F	15,2	27,3	45,2
24/ F	7,7	22,6	51,6
Mittelwert		25,6	47,8
25/ G	15,3	26,6	44,4
26/ G	18,9	28,3	42,2
27/ G	14,3	27,0	45,7
Mittelwert		27,3	44,1

(* Summe aus zwei Teilhefernten; ** Mittelwerte aus zwei Teilhefernten)

4.4 Desintegration der Hefezellen

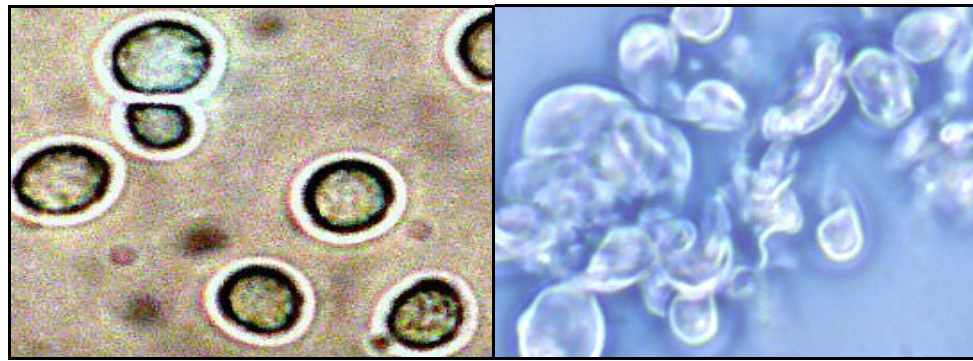
Die aus dem Fermenter geerntete Hefe wurde vor der weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Die tiefgefrorene Hefe mußte deshalb vor Beginn des ersten Schrittes der Aufarbeitung aufgetaut werden. Nach dem Auftauen (über Nacht) wurde die Hefebiomasse in jeweils 1 L PBS-Puffer pro kg Erntegewicht suspendiert. Abweichend davon wurde bei den Versuchen 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, und 11 mit der doppelten Puffermenge gearbeitet. Der Puffer war wie folgt zusammengesetzt:

- 150 mM Natriumchlorid (NaCl)
- 8,4 mM Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
- 1,6 mM Natrium-dihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)

Der Suspension wurden pro kg Erntehefe 10 g Triton X100 (Tensid) sowie 0,35 g Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Proteasehemmstoff) zugegeben, welches zuvor in ca. 10 mL 2-Propanol gelöst wurde. Danach wurden die Hefezellen im Suspensionsmittel, dem Puffer, durch zerreißen der Zellwände aufgeschlossen. Der Zellaufschluß erfolgte mit der beschriebenen Ringspaltkugelmühle. Die Kugelmühle wurde chargenweise betrieben. Dazu wurde die Hefesuspension mittels der integrierten Schlauchpumpe bei einer Geschwindigkeit von 6 L/h zugeführt (Schlauchpumpenstellung 1). Die Rotordrehzahl wurde mit 2000 min^{-1} gewählt. Das entsprach einer Geschwindigkeitseinstellung von 37 am Gerät.

Nach dem ersten Durchlauf der gesamten Hefesuspension wurde ein Aufschlußgrad von ca. 60 % erreicht. Im Anschluß wurde dieser Prozeß wiederholt. Es wurde nach den zwei Durchläufen ein Aufschlußgrad von $\geq 90\%$ erreicht. Während des Aufschlusses wurde durch die Kühlung des Stators der Ringspaltkugelmühle eine Temperatur von 20°C gehalten. Die Abb. 40 zeigt mikroskopische Aufnahmen des Hefetransformanten G aus dem Versuch 26 vor und nach der Beanspruchung in der Rührwerkskugelmühle.

In der Abb. 40 a) sind noch völlig intakte Hefezellen zu sehen. Deren Zellwände trennten sich deutlich durch ihr Lichtbrechungsvermögen vom äußeren Medium ab. Nach der Desintegration (Abb. 40 b) waren die Zellwände zerstört und besaßen kein Lichtbrechungsvermögen mehr.



a)

b)

Abb. 40: Mikroskopische Aufnahme der Hefe a) vor und b) nach der Beanspruchung in der Kugelmühle bei 1000 x Vergrößerung

4.5 Fällungsschritt

Zur Koagulation und Präzipitation des WSP-haltigen Zellmaterials wurde ein erster Fällungsschritt durchgeführt. Die erhaltene Suspension wurde nach dem Zellaufschluß mit 2-Propanol versetzt. Dazu wurde eine berechnete Menge 2-Propanol in 100 oder 85 %iger Konzentration zum gesamten Volumen der Suspension hinzugefügt und bis zur Homogenität mit dieser verrührt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die im Gemisch angestrebte Propanolkonzentration betrug ca. 33 Vol%.

Die 2-Propanolzugabe führte zur Koagulation und anschließender Präzipitation einer unlöslichen WSP-haltigen Fraktion, die sich im wesentlichen aus koagulierten Proteinen und unlöslichen Zellfragmenten (hauptsächlich Zellwandbestandteilen) zusammensetzte. Niedermolekulare Hefeproteine und andere lösliche Zellinhaltsstoffe verblieben in der liquiden Phase des Gemisches.

Der Feststoffanteil im Gemisch ließ sich in einer Becherzentrifuge unterhalb einer Propanolkonzentration von 30 Vol% nicht quantitativ abscheiden, so daß der Überstand noch eine deutliche Trübung zeigte.

Die weitere Aufkonzentrierung der WSP-haltigen Feststoffphase erfolgte in einer Becherzentrifuge mit 2,5 Liter Fassungsvermögen. Dabei war eine Zentrifugationszeit von 8 min bei 5000 min^{-1} ausreichend (entspr. $5500 \cdot g$ am maximalen Radius), um die Feststoffphase quantitativ als pastöses, oberflächlich gelatinöses Pellet zu erhalten.

Die bei den Versuchen erhaltene Flüssigphase war mit Ausnahme vom Versuch 11, klar da hier eine Propanolkonzentration von $< 30 \text{ Vol\%}$ eingestellt worden war (vgl. Tab. 45).

In Tab. 45 sind die Mengen der durch die Zentrifugation erhaltenen Phasen zusammengefaßt. Diese Mengen an Feststoff- und Flüssigphase ergaben sich aufgrund der beschriebenen Vorgehensweise in Abhängigkeit von der aufgearbeiteten Menge an Erntehefe.

Es wurde zusätzlich geprüft, ob auf den hier beschriebenen Präzipitationsschritt verzichtet hätte werden können. Dazu wurde die aufgeschlossene Hefesuspension des Versuches 3 direkt dem anschließenden Extraktionsprozeß unterworfen. Als Ergeb-

nis wurde am Ende des gesamten Aufarbeitungsprozesses ein WSP-Rohpräparat mit deutlich kleinerem WSP-Gehalt gegenüber der Aufarbeitung mit Präzipitationsschritt erhalten (vgl. Tab. 51 in Abs. 4.7).

Tab. 45: Eckdaten der Fällung und der Zentrifugation.

Versuch Nr./ Transformant	Zusammensetzung des Gemisches		Phasen nach Trennung (Becherzentrifuge)	
	Puffermenge aus Zellaufschluß [L]	Propanolgehalt [Vol%]	Feststoffphase [kg]	Flüssigphase [L]
2/ A	11,7	32,0	5,2	20,5
3/ A	4,8	***	***	***
4/ A	9,8	33,3	6,4	15,7
5/ A	14,6	31,6	8,5	23,4
6/ B	24,9*	33,3**	13,9*	42,1*
7/ B	26,0	33,3	9,6	48,9
8/ B	26,0	33,3	12,1	46,4
10/ C	27,0	30,5	16,3	51,9
11/ C	30,8	28,1	17,1	54,1
12/ C	15,0	32,6	13,7	35,5
13/ C	16,0	31,8	15,3	37,6
14/ C	16,1	32,5	18,8	35,4
15/ D	16,5	32,8	17,5	38,6
16/ D	15,0	32,9	15,9	35,2
17/ D	14,5	33,0	15,2	34,2
18/ E	15,5	33,0	18,7	31,3
19/ E	14,5	33,3	17,0	26,5
20/ E	15,6	33,3	17,5	29,3
21/ F	15,5	33,3	17,1	29,4
22/ F	15,2	33,4	18,3	27,6
23/ F	15,2	33,0	18,1	33,6
24/ F	7,7	33,0	8,0	18,2
25/ G	15,3	33,0	16,5	35,6
26/ G	18,9	33,0	21,2	43,2
27/ G	14,3	33,0	16,6	32,2

(* Summe aus zwei Teilaufarbeitungen; ** Mittelwerte aus zwei Teilaufarbeitungen; *** es wurde keine Fällung durchgeführt)

Die Analysenergebnisse der Phasen nach der Zentrifugation des Gemisches sind in Tab. 46 für die Versuche ab Versuch 15 zusammengefaßt.

Der Trockensubstanz- und Proteingehalt der beiden Phasen nach der Zentrifugation in der Becherzentrifuge wurde erst ab dem Versuch 15 bestimmt, als hinreichende Sicherheit in der Reproduzierbarkeit der Versuche gegeben war. Der Trockensubstanzgehalt der Feststoffphase bewegte sich im Bereich von 17,4 bis 22,7 %. Der

tendenziell erhöhte Wert des Trockensubstanzgehalts der Feststoffphase beim Transformanten G mit einem Mittelwert von 21,3 % von drei Versuchen ließ sich nur auf eine besondere Eigenschaft des Transformanten selbst zurückführen, da an der Vorgehensweise dieses Fällungsschrittes keine Modifikationen vorgenommen worden war.

Tab. 46: Analysenergebnisse der Phasen nach der Zentrifugation in einer Becherzentrifuge.

Versuch Nr./ Transformant	Feststoffphase		Flüssigphase	
	Trockensubstanz- gehalt [%]	Proteingehalt TS [%]	Trockensubstanz- gehalt [%]	Proteingehalt TS [%]
15/ D	20,4	45,3	3,4	32,9
16/ D	18,9	45,2	2,7	30,4
17/ D	18,6	46,4	2,5	32,8
Mittelwerte	19,3	45,6	2,8	32,0
18/ E	18,5	45,9	2,8	32,9
19/ E	21,3	46,3	3,2	31,6
20/ E	19,2	47,4	2,9	31,1
Mittelwerte	19,7	46,5	3,0	31,8
21/ F	20,1	47,4	2,7	36,2
22/ F	19,4	47,3	2,5	28,0
23/ F	21,7	45,3	2,9	29,5
24/ F	17,4	53,9	2,8	31,1
Mittelwerte	19,6	48,5	2,7	31,2
25/ G	19,4	45,9	2,4	30,4
26/ G	22,7	42,5	2,5	33,6
27/ G	21,9	42,8	2,4	34,2
Mittelwerte	21,3	43,7	2,4	32,7

Der Trockensubstanzgehalt der Flüssigphase bewegten sich bei den Versuchen 15-27 im Bereich von 2,4 bis 3,4 %. Somit waren praktisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Transformanten zu erkennen.

Der Proteingehalt der Feststoffphase bewegten sich, mit Ausnahme beim Versuch 24, zwischen 42,5 % und 47,4 %. Da der Versuch 24 schon während der Fermentation abgebrochen werden mußte und die erhaltene Erntehefe aufgrund der Umstände, unter denen die Propagation abgelaufen war, einen überdurchschnittlichen Proteingehalt von 51,6 % zeigte, wurde auch in der Feststoffphase nach der Fällung ein relativ zu den anderen Versuchen erhöhter Proteingehalt von 53,9 % gemessen. Beim Vergleich des Proteingehalts der Feststoffphase der Transformanten untereinander fiel auf, daß der Transformant G diesbezüglich einen tendenziell

kleineren Proteingehalt aufwies. Entsprechend dazu zeigte auch die Flüssigphase der Versuche mit dem Transformanten G einen leicht erhöhten Proteingehalt (33,6 %; 34,2 %), was auf einen höheren Anteil löslicher Proteine am Gesamtprotein der Biomasse unter den gegebenen Bedingungen hindeutete. Der Proteingehalt der Flüssigphase der Versuche mit den Transformanten D bis F zeigte tendenziell keine signifikanten Unterschiede und lag im Mittelwert bei 31,7 %.

4.6 Extraktion

Der Zentrifugationsrückstand aus dem Gemisch der aufgeschlossenen Hefesuspension mit 2-Propanol enthielt die WSP, die aus diesem extraktiv gewonnen werden mußten. Dazu wurde das WSP-haltige Pellet in wäßrigem 2-Propanol homogenisiert, wobei pro Kilogramm Erntegewicht mindestens 2 Liter 2-Propanol-Wasser-Gemisch notwendig war, um eine ausreichende Menge an Lösungsmittel für den Extraktionsprozeß zur Verfügung zu stellen. Die Konzentration des 2-Propanol-Wasser-Gemisches wurde so gewählt, daß in der Suspension eine Propanolkonzentration von 33 bis 45 Vol% erreicht wurde. Gemäß den von der AG Hinzmann/ Stahl gemachten Erfahrungen zur Extraktion dieser WSP wurde versucht, die Propanolkonzentration bei der Verarbeitung von HMW-Untereinheiten enthaltenden Pellets auf 40-45 Vol%, bei der Verarbeitung von LMW-Untereinheiten enthaltenden Pellets auf 33-36 Vol% einzustellen. Zur Einstellung der Propanolkonzentration wurde sowohl 100 %iges 2-Propanol als auch 85 %iges 2-Propanol aus Rückdestillation verwendet (vgl. 3.5).

Das Pellet wurde zunächst in Wasser suspendiert. Danach wurde 2-Propanol hinzugegeben. Nach gründlicher Homogenisierung wurden pro Kilogramm Erntegewicht der Hefe 28 g Mercaptoethanol zugegeben und ab dem Versuch 14 eine pH-Wertkorrektur durch Zugabe von Triethanolamin-Base auf ca. pH 7,8 vorgenommen. Bei diesen pH-Bedingungen ($\text{pH} > 7$) besitzt Mercaptoethanol sein größtes Reduktionsvermögen zur Abspaltung der über Disulfidbindungen im Zellmaterial fixierten WSP. Erst nach diesem Reduktionsprozeß und der damit einhergehenden Freisetzung der WSP war deren Löslichkeit im Lösungsmittel (2-Propanol-Wasser) möglich. Der Lösungs- und Extraktionsprozeß erfolgte in einem geschlossenen Kreislauf für 2h bei 60°C.

Eine Ausnahme bildete hier der Extraktionsversuch 26. Bei diesen wurde das Reduktionsmittel Mercaptoethanol durch 26,5 g Natriumhypophosphit Monohydrat pro Kilogramm Erntegewicht der Hefe ersetzt. Nach der pH-Wertkorrektur durch Zugabe von Triethanolamin-Base auf ca. pH 7,8 erfolgte der zweistündige Extraktionsprozeß bei 60°C. Am Ende des Extraktionsprozesses wurde zusätzlich eine pH-Wertabsenkung auf pH 6,4 durch Zugabe von Phosphorsäure durchgeführt. Grund hierfür waren Ergebnisse aus Vorversuchen mit Natriumhypophosphit (vgl. Abschnitt

5.2), die auf einen erhöhten Gehalt an WSP in der liquiden Phase nach der Extraktion durch eine pH-Wertabsenkung hindeuteten. Bedingt durch eine Ausfällung von hefeeigenen Proteinen führte diese pH-Absenkung bei allen Vorversuchen zu einer Verringerung des Gesamtproteingehalts in der liquiden Phase der Extraktionsgemische. Gleichzeitig stieg der absolute Gehalt an WSP im Extraktionsüberstand der Versuche deutlich an. Dieses Phänomen läßt sich durch eine Konkurrenz um das Lösungsmittel erklären. Die Konkurrenz ergibt sich daraus, daß bei einem pH-Wert um 6,0 die WSP gut löslich sind, die hefeeigenen Proteine jedoch ausfallen. Somit steht zusätzliches Lösungsmittel für noch ungelöste WSP im Extraktionsgemisch zur Verfügung. Alle anderen Prozeßparameter blieben identisch zu den Extraktionsversuchen mit Mercaptoethanol.

Tab. 47: Eckdaten der Extraktion der WSP mit den Hefetransformanten.

Versuch Nr./ Transformant	Extraktionsgemisch		Phasen nach Trennung (Becherzentrifuge)	
	Gesamtmenge [L]	Propanolgehalt [Vol%]	Feststoffphase [kg]	Flüssigphase [L]
2/ A	20	43,7	3,4	17,0
3/ A	22	38,2	3,3	19,0
4/ A	24	44,1	4,1	21,3
5/ A	32	43,7	6,2	30,5
6/ B	53	41,7	9,5	46,0
7/ B	37	40,2	6,3	31,5
8/ B	46	43,7	10,0	40,0
10/ C	48	33,0	12,8	40,4
11/ C	48	35,3	11,4	37,7
12/ C	44	37,2	9,0	39,4
13/ C	44	36,4	11,8	33,5
14/ C	48	36,0	14,1	40,0
15/ D	47	36,2	13,1	34,4
16/ D	46	36,6	12,5	31,9
17/ D	46	36,9	11,7	35,5
18/ E	46	34,0	13,5	32,5
19/ E	43	34,4	11,7	32,8
20/ E	50	40,5	12,5	37,9
21/ F	49	40,4	11,7	38,8
22/ F	45	34,1	10,3	30,7
23/ F	47	37,0	12,8	35,1
24/ F	23	42,2	6,1	17,0
25/ G	46	39,0	9,9	35,8
26/ G	49	41,4	16,5	36,0
27/ G	46	41,9	12,2	38,3

Die Wirkung der veränderten Extraktionsbedingungen beim Versuch 26 (Reduktionsmittel, pH-Verschiebung) zeigte sich, im Vergleich zu den Versuchen 25 und 27 mit dem gleichen Transformanten, in einem doppelten Gehalt an HMW-1Dy10-Untereinheiten im WSP-Rohpräparat bei vergleichbar hohem Ertrag an Untereinheiten (vgl. Tab. 52).

Die weitere Abtrennung der WSP-haltigen liquiden Phase erfolgte in einer Becherzentrifuge mit 2,5 Liter Fassungsvermögen. Dabei war eine Zentrifugationszeit von 8 min bei 5000 min^{-1} ausreichend (entspr. $5500 \cdot g$ am maximalen Radius), um das Präzipitat quantitativ als pastöses Pellet zu erhalten. Die bei allen Versuchen erhaltene Flüssigphase waren klar.

Die Tab. 47 zeigt die Eckdaten der Extraktion und der anschließenden Trennung durch Zentrifugation. Die Mengen ergaben sich aufgrund der oben beschriebenen Vorgehensweise in Abhängigkeit von der aufgearbeiteten Menge an Erntehefe. Die WSP-haltigen Feststoffphasen aus den Fällungsschritten der beiden Teilaufarbeitungen des Versuches 6 wurden ab der Extraktion vereinigt und bis zum Ende des Aufarbeitungsprozesses gemeinsam verarbeitet.

Die Einstellung der Propanolkonzentration durch die Zugabe der berechneten Mengen an Wasser und 2-Propanol gestaltete sich schwierig, da bei der Berechnung die vorgegebene Behältergröße, der Propanolgehalt in der WSP-haltigen Feststoffphase aus dem Fällungsschritt sowie der unterschiedliche 2-Propanolgehalt des aus der Rückdestillation gewonnenen 2-Propanols berücksichtigt werden mußte. Dadurch war es unvermeidbar, daß sich Berechnungsfehler einschlichen. Dies führte zu Abweichungen von den erstrebten Sollwerten. Die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen der Propanolkonzentrationen während der Extraktion verhielten sich bei der Verarbeitung der einzelnen Transformanten wie folgt:

- Transformant A Konzentration: $42,4 \pm 2,8 \text{ Vol\%}$
- Transformant B Konzentration: $41,9 \pm 1,8 \text{ Vol\%}$
- Transformant C Konzentration: $35,6 \pm 1,6 \text{ Vol\%}$
- Transformant D Konzentration: $36,6 \pm 0,4 \text{ Vol\%}$
- Transformant E Konzentration: $36,3 \pm 12,9 \text{ Vol\%}$
- Transformant F Konzentration: $38,4 \pm 3,6 \text{ Vol\%}$
- Transformant G Konzentration: $40,8 \pm 1,5 \text{ Vol\%}$

Die Analysenergebnisse der beiden Phasen nach der Zentrifugation des Extraktionsgemisches sind in Tab. 48 zusammengefaßt. Der Trockensubstanz- und Proteingehalt der beiden Phasen nach der Zentrifugation in der Becherzentrifuge wurden, wie bereits erwähnt, erst ab dem Versuch 15 bestimmt, als hinreichende Sicherheit in der Reproduzierbarkeit der Versuche gegeben war.

Tab. 48: Analysen nach der Extraktion der WSP und Zentrifugation des Gemisches erhaltenen Phasen: Hefetransformanten D–G.

Versuch Nr./ Transformant	Feststoffphase		Flüssigphase	
	Trockensubstanz- gehalt [%]	Proteingehalt TS [%]	Trockensubstanz- gehalt [%]	Proteingehalt TS [%]
15/ D	22,8	43,6	2,1	32,7
16/ D	22,4	45,7	1,9	30,5
17/ D	25,2	44,2	1,7	34,1
Mittelwerte	23,5	44,5	1,9	32,4
18/ E	20,5	49,0	2,2	34,3
19/ E	26,4	47,2	2,4	36,9
20/ E	23,7	47,9	2,6	38,2
Mittelwerte	23,5	48,0	2,4	36,4
21/ F	21,5	49,5	1,5	30,7
22/ F	23,3	55,6	2,7	36,9
23/ F	22,0	42,7	2,2	51,8
24/ F	21,3	50,0	2,6	24,0
Mittelwerte	22,3	51,0	2,2	39,8
25/ G	23,4	54,5	2,0	35,3
26/ G	28,1	41,8	2,5	30,2
27/ G	26,0	57,7	2,3	33,8
Mittelwerte	25,8	51,3	2,3	33,1

Der Trockensubstanzgehalt der Feststoffphase der Versuche 15–27 bewegte sich im Bereich von 20,5 bis 28,1 %. Vergleichbar zum Trockensubstanzgehalt der WSP-haltigen Feststoffphase aus dem vorausgegangenen Fällungsschritt zeigten sich auch hier tendenziell erhöhte Werte für den Trockensubstanzgehalt der Feststoffphase bei den Versuchen mit den Transformanten G, die im Mittel der drei Versuche 25,8 % groß war.

Der Trockensubstanzgehalt der zu den Versuchen gehörenden Flüssigphase bewegte sich im Bereich von 1,5 bis 2,7 %, womit praktisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Transformanten zu erkennen waren.

Der Proteingehalt der Feststoffphase der Versuche bewegte sich zwischen 41,8 % und 57,7 %, wobei der tendenziell niedrigste Gehalt in der Feststoffphase des Transformanten D gefunden wurde. Der Proteingehalt der Flüssigphase der Versuche mit den Transformanten D bis G zeigte, mit Ausnahme der Werte für den Transformanten F, keine tendenziellen und keine signifikanten Unterschiede. Der Proteingehalt der Trockenmasse der Flüssigphase lagen im Mittel bei 34,0 % mit einer Standardabweichung von nur $\pm 2,6$ %. Bei den vier Versuchen 21-24 mit dem Transformanten F kam es zu zwei Extremwerten, der eine wies ein Maximum im Proteingehalt mit 51,8 % beim Versuch 23 auf und der andere ein entsprechendes Minimum mit 24,0 % beim Versuch 24. Eine Ursache für den minimalen Wert kann im vorzeitigen Abbruch der Propagation beim Versuch 24 gelegen haben, der zu einem veränderten Hefezustand geführt haben kann. Weshalb beim Versuch 23 eine deutlich erhöhte Proteinlöslichkeit während des Extraktionsprozesses vorkam, welche sich in einem entsprechend minimalen Proteingehalt der Feststoffphase widerspiegelte, blieb allerdings unklar.

4.7 Proteinpräzipitation zur Herstellung der WSP-haltigen Rohpräparate

Der WSP-haltige, propanolische Überstand aus dem Extraktionsprozeß wurde in einem Proteinfällungsverfahren weiterverarbeitet. Dieses Prozeß zielte darauf, die WSP möglichst vollständig zu präzipitieren, um sie in einer Fraktion anzureichern.

Die Präzipitation der WSP-haltigen Fraktion aus dem Extraktionsüberstand der Versuche 2 bis 12 (Versuch 9 ausgenommen) erfolgte durch Zugabe von 2-Propanol. Dazu wurde sowohl 100 %iges 2-Propanol als auch 85 %iges 2-Propanol aus Rückdestillation verwendet. Die dazu erforderlichen Mengen, die nach der Zugabe resultierenden 2-Propanolkonzentrationen und die erhaltenen spezifischen Mengen an WSP-Rohpräparaten sind in Tab. 49 angeführt.

Tab. 49: Eckdaten der Präzipitation der WSP mit 2-Propanol für die Versuche Nr. 2 - 12 mit den Hefetransformanten A-C.

Versuch Nr./ Transformant	Zugabe von 2-Propanol zum Extraktionsüberstand [L]		Präzipitations- konzentration [%]	Spez. Menge WSP- Rohpräparat aus dem Extraktionsüberständen [g/100 L]
	2-Propanol 100%ig	2-Propanol 85%ig		
2/ A	40	-	83,2	21,8
3/ A	43	-	89,5	82,6
4/ A	50	-	83,3	13,1
5/ A	75	-	83,7	24,2
Mittelwerte			83,4*	19,7*
6/ B	108	-	82,0	20,0
7/ B	86	37	83,9	19,0
8/ B	94	-	83,2	18,8
Mittelwerte			83,0	19,3
10/ C	40	50	73,0	71,3
11/ C	80	50	80,6	94,2
12/ C	100	-	81,8	44,9
Mittelwerte			78,5	70,1

* Mittelwerte aus den Versuchen 2, 4 und 5.

Die erhaltene spezifische Menge an WSP-haltigen Rohpräparat hing deutlich vom jeweils aufgearbeiteten Transformanten ab. Im Vergleich zu den Transformanten A und B wurde als Resultat der Aufarbeitung der Hefezellmasse der Versuche mit dem Transformanten C im Mittelwert rund die 3,5fache spezifische Menge an WSP-Rohpräparat erhalten. Versuch 3 wurde für diese Betrachtung nicht gewertet, da im

Laufe des Aufarbeitungsprozesses auf einen Fällungsschritt vor der Extraktion verzichtet worden war. Für die erhöhte spezifische Menge an WSP-Rohpräparat beim Versuch 3 ist somit nicht die Konzentration von 89 Vol% 2-Propanol verantwortlich, die im Präzipitationsgemisch vorlag, sondern der wahrscheinlich erhöhte Proteingehalt im Extraktionsüberstand. Allerdings beeinflusste die 2-Propanolkonzentration die Rohpräparatausbeute dennoch. Der Einfluß der Propanolkonzentration auf die spezifische Menge an WSP-Rohpräparat zeigte sich bei den Versuchen 10 und 11 mit dem Transformanten C. Auf Grund einer fehlerhaften Berechnung hatte sich beim Versuch 10 eine sehr niedrige 2-Propanolkonzentration von nur 73 Vol% ergeben. Die spezifische Menge an WSP-Rohpräparat sank deshalb im Vergleich zu Versuch 11, bei dem mit einer 2-Propanolkonzentration von 81 Vol% gearbeitet worden war, um 25 % (Tab. 49).

Die Präzipitation der WSP-haltigen Fraktion aus dem Extraktionsüberstand der Versuche Nr. 13 bis 27 erfolgte nach der Präzipitationsmethode durch die Zugabe von Ammoniumsulfat zum propanolischen Überstand aus dem Extraktionsprozeß.

In Tab. 50 ist die ermittelte Dichte und der Trockensubstanzgehalt der ammoniumsulfatreichen Unter- und der propanolreichen Oberphase nach der Abtrennung des Präzipitates sowie die spezifische Menge des erhaltenen WSP-Rohpräparats zusammengestellt. Die bei dem Präzipitationsverfahren angefallenen Phasen wurden ab dem Versuch 15 analysiert.

Die ermittelte Dichte der propanolreichen Oberphase bewegten sich zwischen 0,840 und 0,850 g/mL. Dies entsprach nach der Wasser-2-Propanoltablelle einer Propanolkonzentration von rund 81 Vol% bzw. 78 Vol%. Lediglich bei Versuch 18 wurde eine abweichende Dichte von 0,871 ermittelt, was einer 2-Propanolkonzentration von < 75 Vol% entsprach. Ebenso war der TS-Gehalt dieser Phase mit 3,1 % gegenüber den vergleichbaren Phasen deutlich erhöht. Das ließ sich durch den höheren Wassergehalt dieser Phase und somit einer erhöhten Löslichkeit von Feststoffen erklären. Außerdem wurde in der ammoniumsulfatreichen Unterphase dieses Versuches die niedrigste Dichte von 1,2 g/mL ermittelt. Dieser Wert lag deutlich unter den Mittelwert von 1,23 g/mL der übrigen Unterphasen. Diese beim Versuch 18 beobachteten Unterschiede gegenüber den anderen Versuchen hatten sich wahrscheinlich deshalb ergeben, weil trotz ausreichender Zugabe von Ammoniumsulfat keine maximale Sättigung des Präzipitationsgemisches erreicht worden war. Eine ungenügende

Durchmischung oder eine zu niedrige Temperatur des Gemisches dürften die Ursache dafür gewesen sein.

Tab. 50: Analysen der Phasen nach der Trennung durch Zentrifugation und Ausbeute an WSP-Rohpräparat: Hefetransformanten D-G.

Versuch Nr./ Transformant	Ammoniumsulfatreiche Unterphase		Propanolreiche Oberphase		Spez. Menge WSP- Rohpräparat aus dem Extraktionsüberständen
	Dichte [g/mL]	TS-Gehalt [%]	Dichte [g/mL]	TS-Gehalt [%]	[g/100 L]
15/ D	1,228	45,0	0,850	2,3	211,6
16/ D	1,227	45,8	0,850	2,3	143,6
17/ D	1,232	43,5	0,845	1,6	115,2
Mittelwerte	1,229	44,8	0,848	2,1	156,8
18/ E	1,201	43,4	0,871	3,1	224,9
19/ E	1,234	42,5	0,848	2,6	175,3
20/ E	1,230	44,4	0,846	1,9	195,8
Mittelwerte	1,222	43,4	0,855	2,5	198,7
21/ F	1,233	51,3	0,847	1,9	174,2
22/ F	1,235	51,1	0,843	2,5	330,9
23/ F	1,231	42,0	0,848	2,4	202,8
24/ F	1,237	47,2	0,839	1,1	69,4
Mittelwerte	1,234	47,9	0,844	2,0	194,4
25/ G	1,231	45,7	0,848	2,4	110,9
26/ G	1,229	46,9	0,840	2,1	51,1
27/ G	1,225	46,0	0,849	2,4	70,5
Mittelwerte	1,218	46,2	0,845	2,3	77,5

Der TS-Gehalt der ammoniumsulfatreichen Unterphasen der Versuche Nr. 21 und 22 war mit rund 51 % relativ hoch, obgleich sich die Dichte dieser Phasen im normalen Bereich bewegten. Als einzige Erklärung für dieses Ergebnis war ein Analysenfehler anzunehmen.

Es wurde kein Zusammenhang zwischen der spezifischen Menge des erhaltenen WSP-Rohpräparats und den Phaseneigenschaften (Dichte, TS-Gehalt) festgestellt (Tab. 50). Eine Störgröße war allerdings der Ammoniumsulfatgehalt des WSP-haltigen Rohpräparats. Je nach Intensität des Waschvorgangs mit der 5 bis 10fachen Menge Wasser nach dem Präzipitationsschritt schwankten der Ammoniumsulfatgehalt von 2 bis 43 % in den gefriergetrockneten Rohpräparaten (Tab. 51). Beim Vergleich der um den Ammoniumsulfatgehalt reduzierten spezifischen Rohpräparatmenge mit den Phaseneigenschaften war lediglich ein schwacher Zusammenhang mit der Dichte der AMS-haltigen Unterphase zu erkennen (Abb. 41).

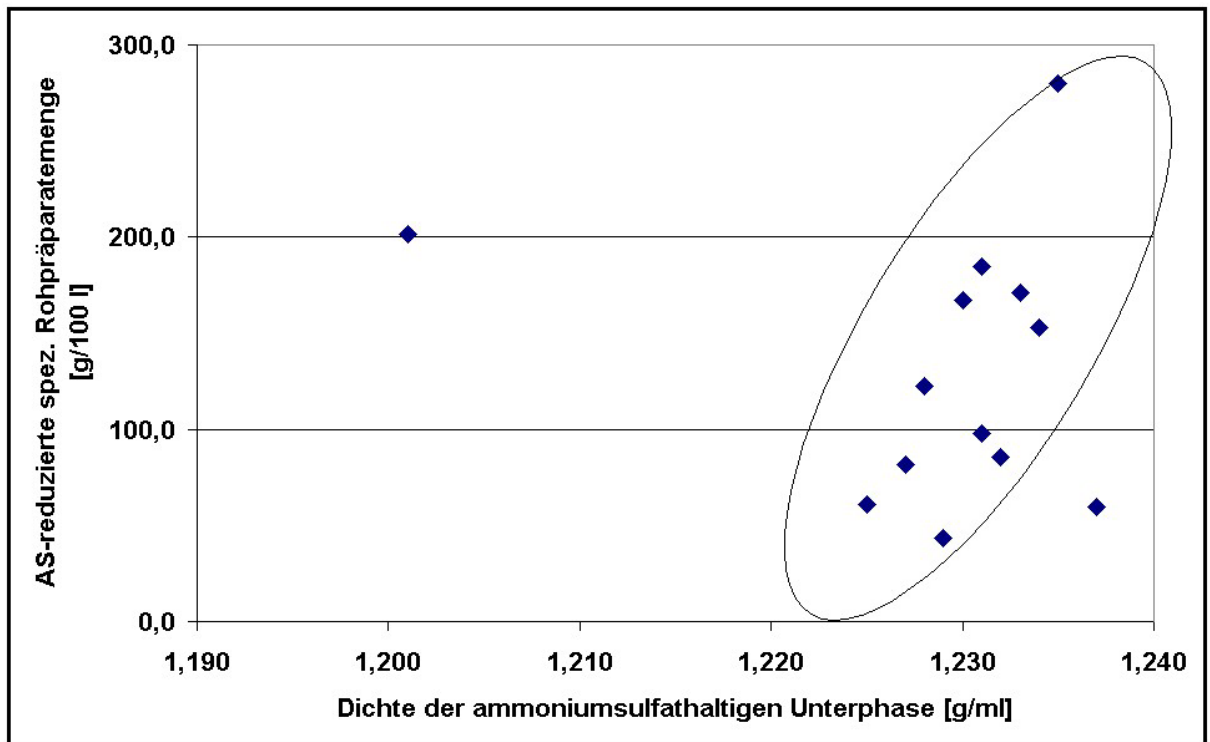


Abb. 41: Reduzierte spez. Rohpräparatmengen vs. Dichte der AMS-haltigen Unterphasen

Da aus allen übrigen Phaseneigenschaften (Dichte der propanolhaltigen Unterphase, Trockensubstanzgehalt) keine eindeutigen Rückschlüsse auf Zusammenhänge zu der um den Ammoniumsulfatgehalt reduzierten spezifischen Rohpräparatmenge gezogen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, daß bei allen Versuchen die gleichen Präzipitationsbedingungen vorlagen. Das läßt sich, mit einzelnen Ausnahmen, an den sehr nahe beieinanderliegenden Analysenwerten der Phasen (Dichte, TS-Gehalt) und somit mit deren geringen Varianz erklären.

In Tab. 51 ist die Zusammensetzung der gefriergetrockneten WSP-Rohpräparate ab dem Versuch 15 aufgeführt. Alle Werte für den Trockensubstanz- und Aschegehalt bewegten sich auf einem gleichen Niveau von 96,5 % (TS) und 1,8 % (Asche) im Mittelwert. Durch den schwankenden Ammoniumsulfatgehalt in den Rohpräparaten zeigte auch deren Proteingehalt eine große Streuung von 39,7 bis 91,0 %. Diese Bandbreite ging erheblich zurück, wenn der Ammoniumsulfatgehalt vom WSP-Rohpräparat rechnerisch abgezogen wurde. Nach dieser Korrekturrechnung ergab sich eine Bandbreite für den Proteingehalt der WSP-Rohpräparate, die offenbar in einer gewissen Abhängigkeit vom Transformanten stand. Der errechnete Proteingehalt der WSP-Rohpräparate betrugen im Mittelwert 79,1 %, 83,3 %, 89,8 % und

90,8 % bei den Versuchen mit den Transformanten D, E, F und G. Aufgrund dieses hohen Proteingehalts wurden, außer der Durchführung eines Extraktionsversuchs zur Prüfung der Löslichkeit des Präparats in Aceton, der keine Hinweise auf das Vorhandensein von Lipiden ergab, keine weiteren Untersuchungen an den Rohpräparaten im Hinblick auf deren qualitative und quantitative Zusammensetzung aus anderen Stoffgruppen als Protein durchgeführt.

Tab. 51: Zusammensetzung der gefriergetrockneten WSP-Rohpräparate: Versuche Nr. 15–27.

Versuch Nr./ Transformant	TS-Gehalt	Asche-Gehalt TS	Protein-Gehalt TS	AMS-Gehalt TS	AMS-reduzierte Menge WSP- Rohpräparat
	[%]	[%]	[%]	[%]	[g]
15/ D	97,6	2,0	39,7	42,0	42,2
16/ D	97,9	1,9	43,2	43,0	26,1
17/ D	97,2	1,4	67,1	25,5	30,5
Mittelwerte	97,6	1,8	50,0	36,8	32,9
18/ E	97,3	2,2	71,6	10,4	65,5
19/ E	95,4	1,8	75,8	12,8	50,2
20/ E	96,2	1,8	71,0	14,5	63,4
Mittelwerte	96,3	1,9	72,8	12,6	59,7
21/ F	97,0	1,6	91,0	1,8	66,4
22/ F	94,5	2,1	66,6	15,4	85,9
23/ F	95,7	1,0	86,0	8,9	64,9
24/ F	95,6	1,8	79,3	14,2	10,1
Mittelwerte	95,7	2,4	80,7	10,1	72,4*
25/ G	96,3	2,1	76,3	11,9	35,0
26/ G	96,6	1,8	80,8	14,8	15,7
27/ G	96,3	1,8	78,8	13,4	23,4
Mittelwerte	96,4	1,9	78,6	13,4	24,7

* Bei der Mittelwertberechnung wurde Versuch 24 nicht berücksichtigt.

In Tab. 51 wurde die um den Ammoniumsulfatgehalt reduzierte WSP-Rohpräparatmenge der besseren Vergleichbarkeit halber angeführt. Daraus zeigte sich, daß die WSP-Rohpräparatmenge deutlich vom Transformanten abhing. So wurde bei den Versuchen mit den Transformanten E und F im Mittel etwa die doppelte Menge an ammoniumsulfatfreien Rohpräparat (59,7 und 72,4 g) gegenüber den Versuchen mit den Transformanten D und G (32,9 und 24,7 g) erhalten. Weshalb der technisch bedingte Fermentationsabbruch beim Versuch 24 zu einer deutlich geringeren Menge an AMS-freiem WSP-Rohpräparat führte als zu erwarten war, ließ sich nur mit einem veränderten Hefezustand zum Erntezeitpunkt erklären.

Tab. 52: WSP-Gehalt der Rohpräparate und Ertrag an WSP für die Versuche mit den Hefetransformanten A–G.

Versuch Nr./ Transformant	Menge Präparat [g]	Gehalt an WSP [%]	Menge an Gesamt-WSP im Präparat [g]	Ertrag an WSP-Untereinheiten [g/kg Hefe-Protein]	Ertrag an Gesamt-WSP [g/kg Hefeprotein]
2/ A	3,7	3,0 (HMW-1Dx5)	0,1	0,2 (HMW-1Dx5)	0,2
3/ A	15,7	0,6 (HMW-1Dx5)	0,1	0,2 (HMW-1Dx5)	0,2
4/ A	2,8	4,6 (HMW-1Dx5)	0,1	0,3 (HMW-1Dx5)	0,3
5/ A	7,4	6,4 (HMW-1Dx5)	0,5	0,7 (HMW-1Dx5)	0,7
Mittelwerte	7,4		0,2		0,3
6/ B	9,2	20,0 (LMW-a3)	1,8	1,3 (LMW-a3)	1,3
7/ B	6,0	12,6 (LMW-a3)	0,8	0,5 (LMW-a3)	0,5
8/ B	7,5	15,4 (LMW-a3)	1,2	0,8 (LMW-a3)	0,8
Mittelwerte	7,6		1,3		0,9
10/ C	28,8	20,2 (HMW-1Dx5)	5,8	3,4 (HMW-1Dx5)	3,4
11/ C	35,5	21,5 (HMW-1Dx5)	7,6	4,3 (HMW-1Dx5)	4,3
12/ C	17,7	28,2 (HMW-1Dx5)	5,0	3,2 (HMW-1Dx5)	3,2
13/ C	17,5	42,3 (HMW-1Dx5)	7,4	4,0 (HMW-1Dx5)	4,0
14/ C	45,7	17,4 (HMW-1Dx5)	8,0	4,5 (HMW-1Dx5)	4,5
Mittelwerte	29,0		6,8		3,9
15/ D	72,8	6,1 (LMW-a3)	4,4	2,3 (LMW-a3)	2,3
16/ D	45,8	8,1 (LMW-a3)	3,7	2,2 (LMW-a3)	2,2
17/ D	40,9	14,6 (LMW-a3)	6,0	3,5 (LMW-a3)	3,5
Mittelwerte	53,2		4,7		2,7
18/ E	73,1	15,4 (HMW-1Dx5) 5,8 (HMW-1Dy10)	15,5	6,1 (HMW-1Dx5) 2,3 (HMW-1Dy10)	8,4
19/ E	57,5	7,8 (HMW-1Dx5) 1,9 (HMW-1Dy10)	5,6	2,6 (HMW-1Dx5) 0,6 (HMW-1Dy10)	3,2
20/ E	74,2	16,8 (HMW-1Dx5) 4,1 (HMW-1Dy10)	15,5	6,2 (HMW-1Dx5) 1,5 (HMW-1Dy10)	7,7
Mittelwerte	68,3		12,2		6,4
21/ F	67,6	28,8 (LMW-a3) 5,2 (HMW-1Dy10)	23,0	10,3 (LMW-a3) 1,9 (HMW-1Dy10)	12,2
22/ F	101,6	13,8 (LMW-a3) 2,9 (HMW-1Dy10)	17,0	7,3 (LMW-a3) 1,5 (HMW-1Dy10)	8,9
23/ F	71,1	20,7 (LMW-a3) 4,4 (HMW-1Dy10)	17,9	7,8 (LMW-a3) 1,7 (HMW-1Dy10)	9,5
24/ F	11,8	21,8 (LMW-a3) 7,9 (HMW-1Dy10)	3,0	2,9 (LMW-a3) 1,0 (HMW-1Dy10)	3,9
Mittelwerte	63,1		15,3		8,6
25/ G	39,7	7,2 (HMW-1Dy10)	2,9	1,6 (HMW-1Dy10)	1,6
26/ G	18,4	23,7 (HMW-1Dy10)	4,4	1,9 (HMW-1Dy10)	1,9
27/ G	27,0	12,2 (HMW-1Dy10)	3,3	1,9 (HMW-1Dy10)	1,9
Mittelwerte	28,4		3,5		1,8
HMW-1Dx5			Σ = 62,8	Ø = 3,0	
HMW-1Dy10			Σ = 29,4	Ø = 1,6	
LMW-a3			Σ = 68,7	Ø = 3,9	

Die Bestimmung des WSP-Gehalts in den WSP-Rohpräparaten (Arbeitsgruppe Wieser) ermöglichte es schließlich, den Ertrag an den einzelnen WSP unter den Arbeitsbedingungen mit den Hefetransformanten zu ermitteln. Aus der Auflistung aller erhaltenen WSP-Rohpräparate, deren Menge, Typ und Gehalt an WSP-

Untereinheiten sowie den auf der Hefeproteinmenge basierenden Ertragskennzahlen (Tab. 52.) geht hervor, daß von den Transformanten ein starker Einfluß auf den Ertrag an den jeweiligen WSP ausging. Vom Transformanten A wurden zu Beginn der Projektdurchführung nur ein sehr niedriger Ertrag von durchschnittlich 0,3 g HMW-1Dx5-Untereinheiten pro kg Hefeprotein erhalten. Allein durch die Optimierung der Propagationsbedingungen im Fermenter B ab dem Versuch 5 stieg der WSP-Ertrag auf 0,7 g/kg Hefeprotein deutlich an. Mit dem Transformanten B konnte unter den optimierten Propagationsbedingungen ein mittlerer Ertrag von 0,9 g LMW-a3-Untereinheiten pro kg Hefeprotein erreicht werden.

Der AG Stahl/Hinzmann gelang es im Verlaufe der Projektdurchführung die Transformanten C und D herzustellen, die eine wesentlich höhere Expressionsrate besaßen als die Transformanten A und B, so daß der mittlere Ertrag an WSP auf 3,9 g HMW-1Dx5-Untereinheiten bzw. 2,3 g LMW-a3-Untereinheiten pro kg Hefeprotein erhöht werden konnte.

Einen weiteren Fortschritt stellten die Transformanten E und F der AG Stahl/Hinzmann dar, die in der Lage waren HMW-1Dx5- und HMW-1Dy10-Untereinheiten bzw. HMW-1Dy10- und LMW-a3-Untereinheiten gleichzeitig zu exprimieren. Dadurch konnte der Ertrag an WSP-Untereinheiten noch einmal deutlich gesteigert werden, im Einzelfall bis zu 12,2 g pro kg Hefeprotein (Versuch 21).

Zusammenfassend kann zur Expression der WSP festgestellt werden, daß der auf den Proteingehalt der Hefe bezogene Ertrag an WSP aus den eingesetzten Transformanten von ca. 0,2 bis 1,2 % betragen hatte. Dieser Ertrag war zwar klein, er war aber groß genug, um die weiteren Zielsetzungen des Projektes verfolgen zu können.

Die Abb. 42 zeigt die Mittelwerte der Erträge an WSP-Untereinheiten aus den Versuchen mit den Transformanten A bis G. Die Ergebnisse aus dem Versuch 24 wurden bei der Mittelwertberechnung der Ergebnisse des Transformanten F nicht berücksichtigt, da technisch bedingt abweichende Propagationsbedingungen vorlagen.

Auffällig war der Ertrag an HMW-1Dy10-Untereinheiten bei den Transformanten E, F und G. Anscheinend führte die genomisch integrierte, zusätzliche 1Dy10 Expression in den Transformanten E und F zu einer additiven Erhöhung des Ertrags an WSP-Untereinheiten, welche dem Betrag des HMW-1Dy10-Ertrags des Transformanten G entsprach (Abb. 42).

Dem kleinen Ertrag stand ein hoher Aufwand an Nährstoffen gegenüber, so daß zusätzlich die Frage nach dem Aufwand/Nutzen-Verhältnis zu stellen war. Eine Kennzahl zur Beschreibung des Aufwand/Nutzen-Verhältnisses ist der Produktausbeutekoeffizient. Dieser beschreibt den Quotienten aus der erhaltenen WSP-Menge und der dafür benötigten Zuckermenge als Komponente des Substrates (Saccharose) während der gesamten Propagation (Inokulumanzucht, Batch- und Fedbatchphase). Für diese Berechnung wurden die Ergebnisse aus dem Versuch 24 nicht berücksichtigt. Aus der Abb. 43 ist zu erkennen, daß der Aufwand für die Erzeugung der exprimierten WSP beträchtlich war. Für die Transformanten mit starker Expression (Ertrag an WSP-Untereinheiten ≥ 4 g WSP/kg Hefeprotein) C, E und F betrug der Produktausbeutekoeffizient (g_{WSP}/kg Saccharose) in der Reihenfolge 0,82, 1,43 und 2,27.

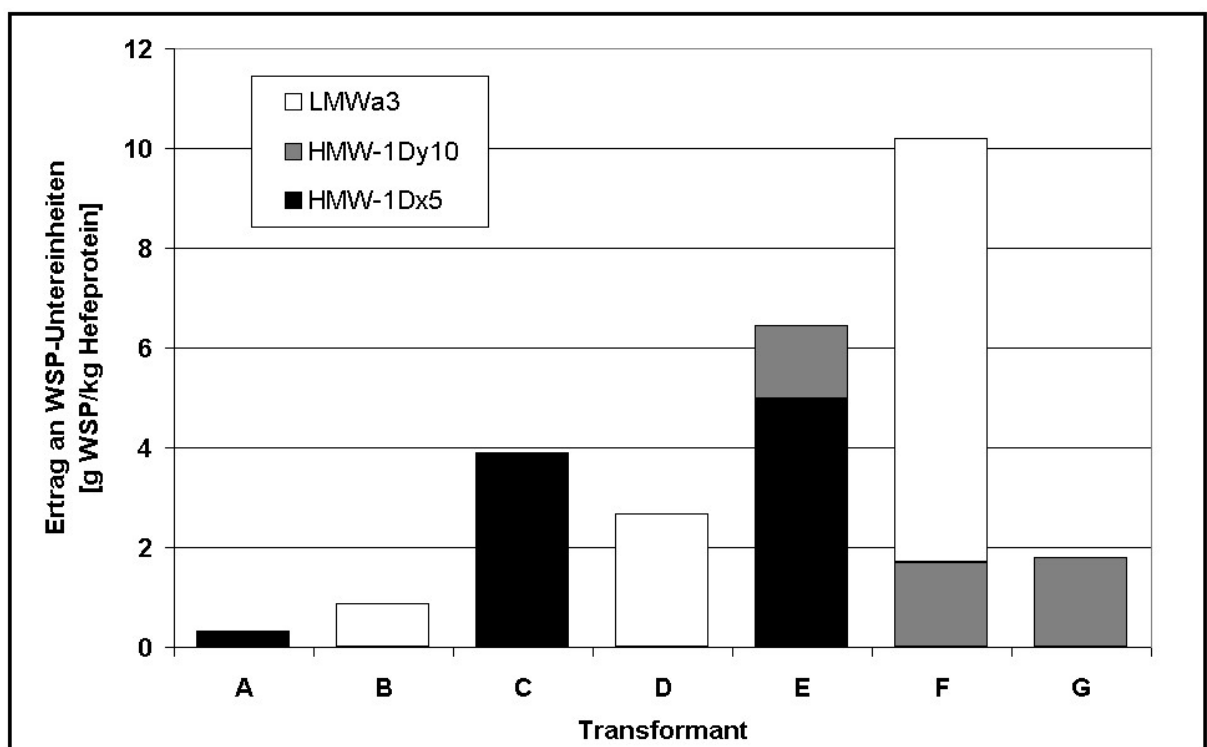


Abb. 42: Mittlerer Ertrag an WSP-Untereinheiten der Transformanten A-G

Im Vergleich zum Ertrag an WSP-Untereinheiten (Abb. 42) verhielten sich der Produktausbeutekoeffizient der Transformanten im Verhältnis erstaunlich proportional (Abb. 43). Da sich beide Größen aus völlig verschiedenen Daten ergaben, wurde

diese Proportionalität näher betrachtet. Dazu wurden beide Größen von allen Versuchen in Abb. 44 gegenübergestellt.

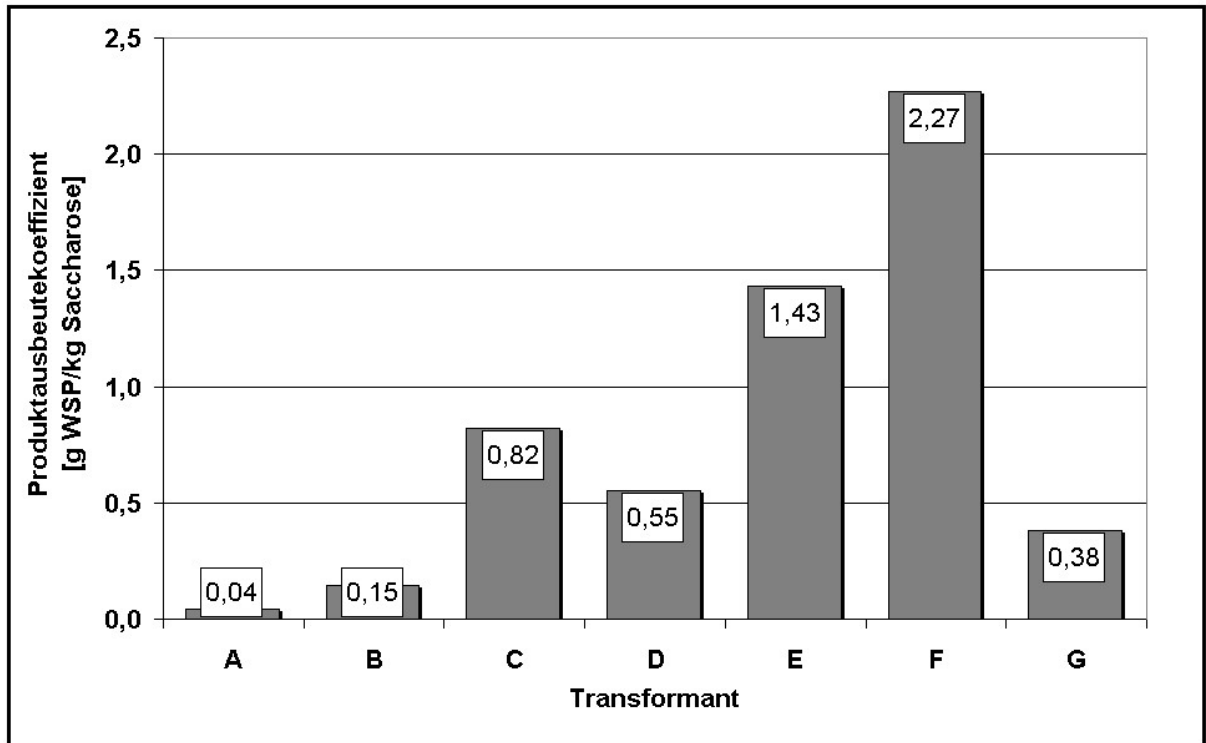


Abb. 43: Mittlerer Produktausbeutekoeffizient der Transformanten A-G

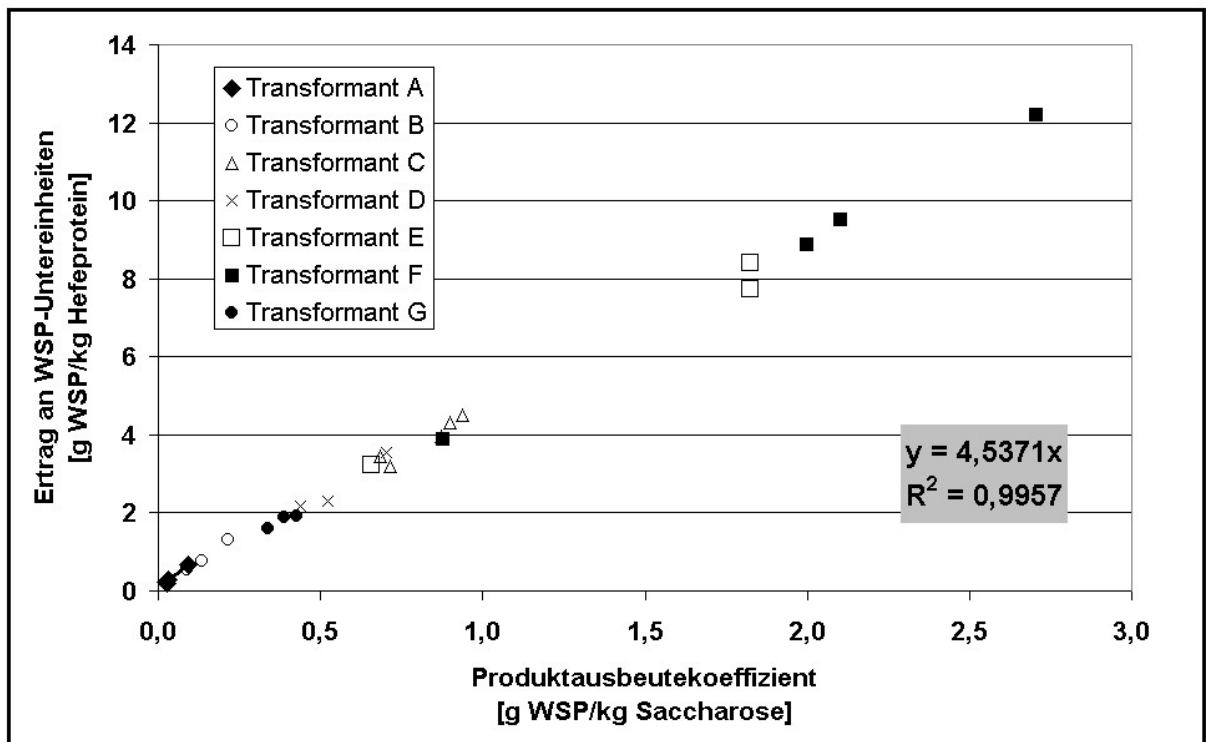


Abb. 44: Ertrag an WSP vs. Produktausbeutekoeffizienten

Grund für diese direkte Proportionalität (Bestimmtheitsmaß 0,99) war der konstante Ausbeutekoeffizient an Hefeprotein, d.h. die Menge an Hefeprotein die pro kg Saccharose während der Propagation erzeugt wurde. Dieser lag bei den Versuchen mit den Transformanten C bis G im Mittel bei 0,21 kg Hefeprotein pro kg Saccharose bei einer Standardabweichung von $\pm 0,01$! Der Ausbeutekoeffizient an Hefeprotein der Versuche mit den Transformanten A und B war etwas verringert und betrug im Mittelwert 0,12 bzw. 0,17 kg Hefeprotein pro kg Saccharose, so daß im Mittelwert aller Versuche ein Ausbeutekoeffizient von 0,19 erreicht wurde. Verursacht durch die optimierten und dadurch konstanten Propagationsbedingungen kann das Verhältnis von Hefeprotein zu verbrauchter Saccharose als konstanter Faktor betrachtet werden.

Somit läßt sich in Abb. 44 die Abszisseneinheit [g WSP/kg Saccharose] durch [g WSP/kg * *Faktor* * kg Hefeprotein] ersetzen wonach beide Achsen die gleichen Einheiten besitzen, was die direkte Proportionalität erklärt.

4.8 Trockensubstanz- und Rohproteinbilanzierung

Im Folgenden wird der Herstellungsprozeß ausgehend von der Fermentationslösung am Ende der Propagation bis zum gefriergetrockneten WSP-Rohpräparat hinsichtlich der Verteilung der Trockensubstanz und des Proteins in den auf die Massenströme im Verfahren bezogenen vier Teilprozesse bilanziert. Die vier Teilprozesse sind: 1. die Hefeernte, 2. die Desintegration der Hefezellen mit dem Fällungsschritt, 3. die Extraktion und 4. die Präzipitation mit der Präparation des WSP-Rohpräparates. Die Bilanzierung wurde auf Grundlage der Ergebnisse der Versuche 15 bis 27 mit den Transformanten D bis G erstellt. Der Versuch 24 mit den Transformanten F wurde nicht berücksichtigt, da durch die abweichenden Propagationsbedingungen keine Vergleichbarkeit gegeben war. Flüchtige Stoffe, wie 2-Propanol und Wasser wurden in der Massenbilanz nicht berücksichtigt.

Aus den in Abb. 45 dargestellten Verfahrensfliessbild geht die Verteilung der Trockensubstanz und des Proteins während der Aufarbeitung der Hefezellmasse ausgehend von der Fermentationslösung am Ende der Propagation bis zum gefriergetrockneten WSP-Rohpräparat hervor. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus den betrachteten Versuchen mit den verschiedenen Transformanten dar. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tab. 53 erläutert.

Aus den Mittelwerten der betrachteten Aufarbeitungsversuche ergab sich das Verhalten der Trockensubstanzmasse wie folgt:

- Im Teilprozeß der Hefeernte wurden von den 5,6 kg TS der Fermentationslösung 4,0 kg TS als Erntehefe erhalten. Mit den flüssigen Phasen (Nebenfraktion 1 und 2) wurde 1,6 kg TS, die hauptsächlich aus nicht umgesetzten Substratnährstoffen, Hefeautolysationsprodukten und geringen Mengen Hefezellen bestand, aus dem Prozeß ausgetragen.
- Im Teilprozeß der Desintegration der Zellmasse mit dem anschließenden Fällungsschritt wurden von den 4,0 kg TS der Erntehefe 3,5 kg TS als WSP-haltiges Pellet erhalten. Mit der flüssigen Phase (Nebenfraktion 3) wurde 0,8 kg TS, die hauptsächlich aus löslichen Zellinhaltsstoffen und den zuvor zugesetzten Hilfsstoffen bestand, aus dem Prozeß ausgetragen.

- Im Teilprozeß der Extraktion wurden von den 3,5 kg TS des WSP-haltigen Pellets 1,2 kg TS als WSP-haltiger Extraktionsüberstand erhalten. Mit der Feststoffphase (Pellet, Nebenfraktion 4) wurde 2,7 kg TS, die hauptsächlich aus Zellwandresten und Hefeprotein bestand, aus dem Prozeß ausgetragen.
- Im Teilprozeß der Präzipitation mit der Präparation des WSP-Rohpräparates wurden von den 1,2 kg TS des WSP-haltigen Extraktionsüberstands 55 g TS als lyophilisiertes WSP-Rohpräparat erhalten. Mit der Flüssigphase (Nebenfraktion 5) wurde 13,6 kg TS, die hauptsächlich aus zuvor zugesetzten Ammoniumsulfat und löslichen Hefeproteinen bestand, aus dem Prozeß ausgetragen.

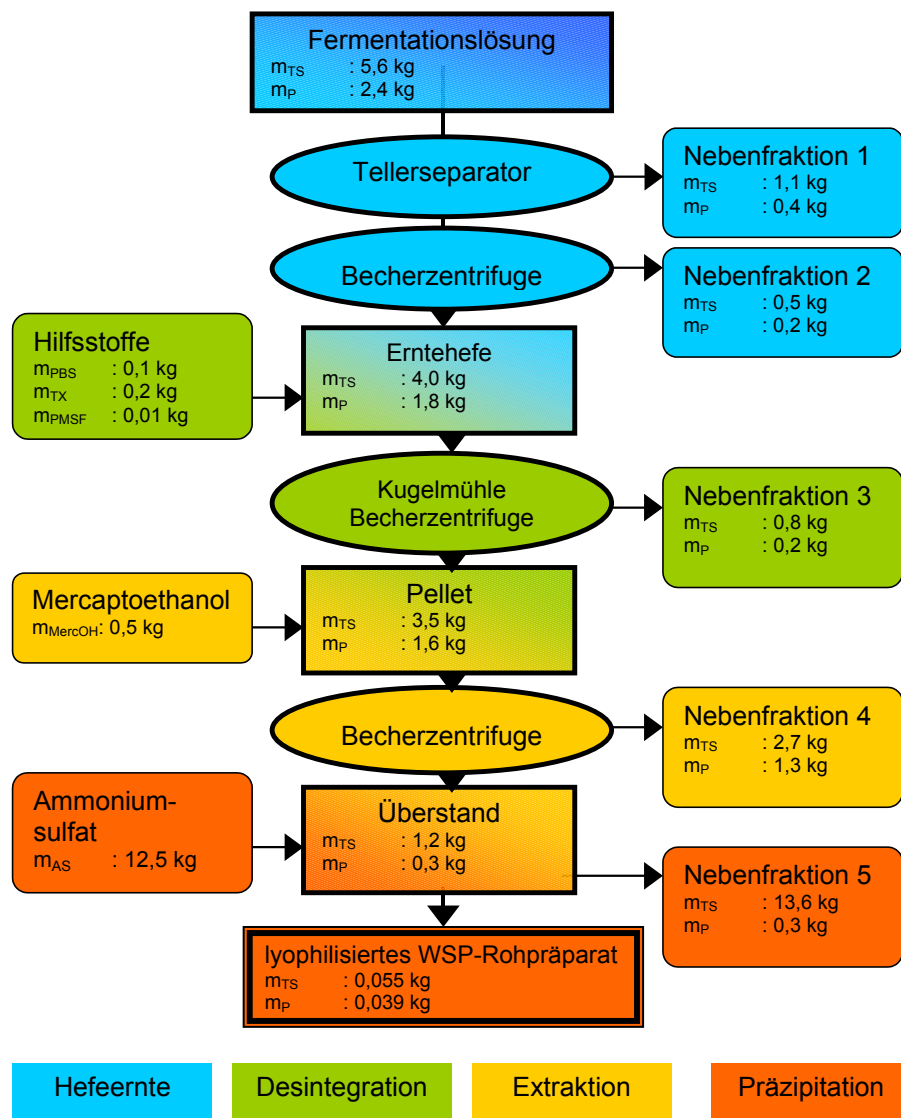


Abb. 45: Verteilung der Trockensubstanz und des Proteins in den Teilprozessen der Aufarbeitung der transgenen Hefen

Tab. 53: Verwendeten Abkürzungen für die in Abb. 45 dargestellte Massenbilanzierung.

Abkürzung	Beschreibung
m_{TS}	Masse der Trockensubstanz
m_P	Masse des Rohproteins
m_{PBS}	Masse der zugegebenen PBS-Puffersalze
m_{TX}	Masse des zugegebenen Detergenz TRITON X 100
m_{PMSF}	Masse des zugegebenen Proteasehemmstoffes PMSF
$m_{MercEtOH}$	Masse des zugegebenen Reduktionsmittels 2-Mercaptoethanol
m_{AMS}	Masse des zugegebenen Präzipitationsmittels Ammoniumsulfat

Die Aufarbeitung der Fermentationslösung am Ende der Propagation zu dem WSP-Rohpräparat ging mit einer Masseabnahme in jedem Teilprozeß einher, die gegenüber der Konzentration an WSP in den transgenen Hefen zu einer starken Anreicherung der WSP in den WSP-Rohpräparaten führte. Der Anreicherungsfaktor betrug bezogen auf den Proteingehalt in der Trockenmasse der Hefe und den Proteingehalt in der Trockenmasse der WSP-Rohpräparate $\cong 35$.

In Abb. 46 ist die Masse an Trockensubstanz und Protein in Relation zu der entsprechenden Masse in der Fermentationslösung am Ende der Propagation aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß sowohl nach der Hefeernte als auch nach der Desintegration/ Fällung eine relativ kleine Abnahme der Proteinmasse im Vergleich zur Trockensubstanzmasse vorgekommen war. Diese Verteilung erklärt sich durch einen kleineren Proteingehalt in der Trockensubstanz der Nebenfraktionen dieser Teilprozesse. Das führte zu einem entsprechend kleineren Proteinaustrag aus dem Produktstrom des zugehörigen Aufarbeitungsprozesses. Die stärkste Abnahme der Masse an Trockensubstanz und Protein im Produktstrom kam im Teilprozeß der Extraktion vor. Bedingt durch die Extraktionsbedingungen verblieben lediglich 21,4 % der Masse an Trockensubstanz bzw. 12,5 % der Masse an Protein von der Ausgangsmasse im Extraktionsüberstand. Der größte Anteil der Masse an Trockensubstanz und Protein verblieb bei diesem Teilprozeß in der Nebenfraktion.

Am Ende des Aufarbeitungsprozesses wurden 1,0 % der Trockensubstanz und 1,6 % des Proteins der Ausgangsmasse an Trockensubstanz und Protein als WSP-haltiges Rohpräparat erhalten.

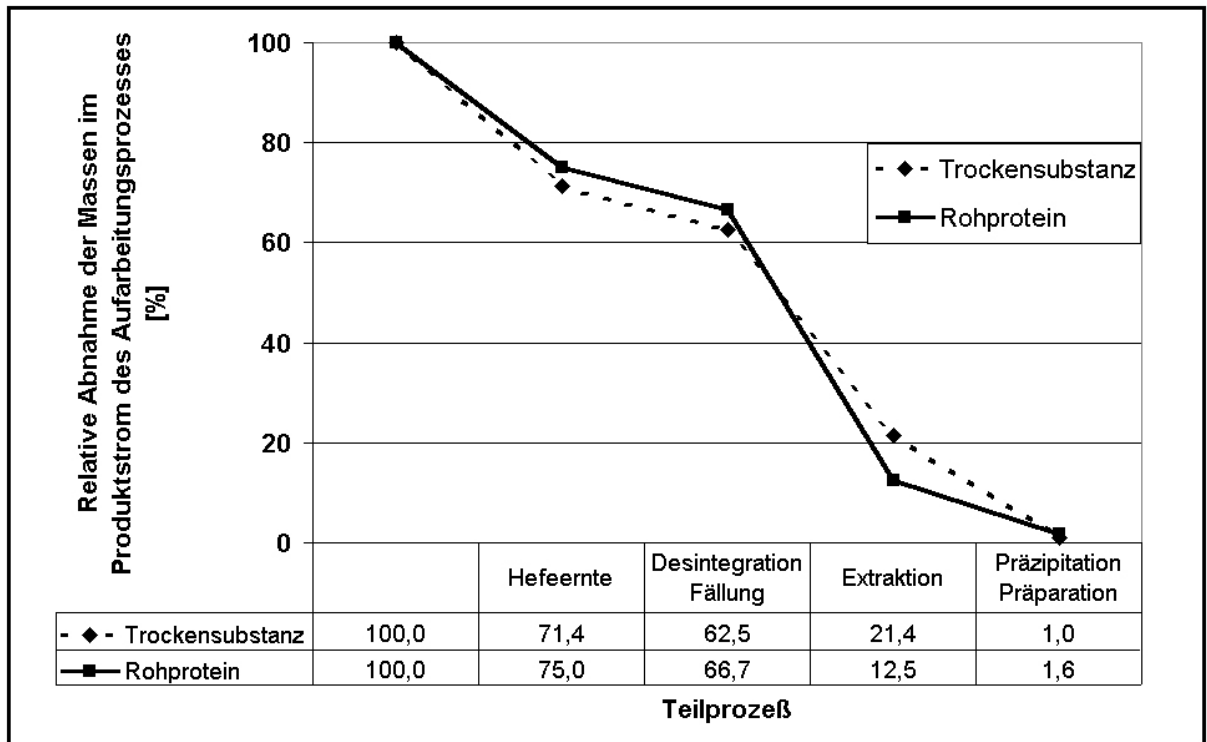


Abb. 46: Abnahme der Masse an Trockensubstanz und Protein während der im Aufarbeitung der transgenen Hefen

4.9 Charakterisierung der Glutenin-Untereinheiten

Nachdem es nun gelungen war, Sicherheit in der Propagation und Aufarbeitung der transgenen Hefen zu erreichen, konnte der nächste Schritt in diesem Projekt in Angriff genommen werden, der darin bestand, die transgen erzeugten WSP auf ihre funktionellen Eigenschaften hin zu untersuchen. Diese Eigenschaften bestimmen letztendlich die Verwertbarkeit solcher Proteine für die Herstellung von Backwaren. Die Funktionalitätsprüfung erfolgte in zwei Stufen. In der ersten ging es zunächst darum, ein geeignetes Verfahren zur weiteren Anreicherung der WSP aus den WSP-Rohpräparaten zu entwickeln. Damit sollten die Voraussetzungen dafür geschaffen werden, genügend WSP für einen Teig- und Backversuch zur Verfügung stellen zu können, der sich an einen Standardbackversuch anlehnen sollte. In der zweiten Stufe wurden dann die erzeugten WSP zur Einsparung des wertvollen Materials in Mikroversuchen auf ihre funktionellen Eigenschaften hin geprüft.

4.9.1 Erste Funktionalitätsprüfung der HMW-1Dx5-Untereinheiten

Zur Durchführung der ersten Funktionalitätsprüfung wurde aus den bis zu diesem Zeitpunkt hergestellten WSP-Rohpräparaten ein hochkonzentriertes HMW-1Dx5-Produkt zu erzeugt. Das grundsätzliche Ziel des Versuchs bestand darin herauszufinden, ob die WSP in den WSP-Rohpräparaten funktionelle Eigenschaften aufweisen, die denen der auf natürlichem Wege synthetisierten Glutenine in Weizen gleichen.

4.9.1.1 Anreicherungsversuch

Für diesen Anreicherungsversuch wurden die WSP-Rohpräparate aus den Versuchen 10-13 mit einem Gehalt von 20-42 % HMW-1Dx5-Untereinheiten verwendet (vgl. Tab. 52). Zur Anreicherung der WSP wurde deren hohes Löslichkeitsprodukt bei niedrigen pH-Werten ausgenutzt. Der Anreicherungsversuch wurde in zwei wesentliche Verfahrensabschnitte unterteilt. Im ersten Schritt wurden lösliche Verunreinigungen entfernt sowie das WSP bei niedrigen pH-Wert in Lösung gebracht. Der zweite Schritt bestand in der Präzipitation des in Lösung gebrachten WSP. Dazu wurde die zuvor zugegebene Säure mittels Dialyse entfernt, so daß das WSP präzipitierte. Das Präzipitat wurde anschließend durch Gefriertrocknung zum hochkonzentrierten WSP-Präparat getrocknet.

Abweichend zu der im Abschnitt 3.9 beschriebenen Verfahrensweise wurde wie folgt gearbeitet:

75,7 g der WSP-haltige Rohpräparatemischung, bestehend aus den Rohpräparaten der Versuche 10 (7,6 g), 11 (33,6 g), 12 (17,5 g) und 13 (17,0 g) mit einem mittleren HMW-1Dx5-Gehalt von 27,4 % wurde in 2 L Waschlösung suspendiert. In dieser Waschlösung waren sowohl 0,02 M EDTA- Na_2 als auch 0,02 M DTT enthalten. Diese Suspension wurde in einem geschlossenen Gefäß unter kräftigen Rühren innerhalb von 30 min auf 55°C erhitzt und noch weitere 30 min bei dieser Temperatur gerührt.

Durch diese Behandlung sollten die WSP in eine reduzierte Form überführt werden und gleichzeitig eventuell vorhandene und mit dem WSP Komplexe bildenden, Erdalkali-Ionen unwirksam gemacht werden.

Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (Becherzentrifuge, 5 min bei 5000 min^{-1} = 5500 * g am maximalen Radius). Es wurde ein gummiartiges Pellet erhalten. Dieses wurde grob zerkleinert und für 10 min in 1000 mL dest. Wasser unter kräftigen Rühren suspendiert. Im Anschluß wurde diese Suspension wiederholt für 10 min zentrifugiert und das so gewaschene Pellet erfaßt. Die Überstände beider Waschvorgänge wurden verworfen.

Die Extraktion der WSP aus dem Pellet erfolgte in 0,1 M Zitronensäurelösung. Dazu wurde das Pellet mit 1,6 L Zitronensäure für 2 h bei 40°C und im Anschluß daran über Nacht bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Da dies nicht zur vollständigen Lösung des Pellets ausreichte, wurde ein zweiter Extraktionsprozeß durchgeführt. Zuvor wurde die Suspension 30 min zentrifugiert. Danach wurde der erste WSP-haltige Überstand erhalten. Das Pellet wurde wiederholt mit 1,0 L Zitronensäure für 2 h bei RT gerührt bis keine Partikel mehr erkennbar waren. Im Anschluß wurde die Suspension 30 min zentrifugiert. Danach wurde der zweite WSP-haltige Überstand und ein Pellet von puddingartiger Konsistenz erhalten. Das Pellet wurde in 0,3 L dest. Wasser 10 min suspendiert und die Suspension 30 min zentrifugiert. Alle Überstände der Extraktion sowie der des letzten Waschschrittes wurden vereinigt, so daß insgesamt 3 L eines WSP-haltigen Extraktes gewonnen wurden. Das WSP-abgereicherte Pellet wurde lyophilisiert und hatte danach ein Gewicht von 22,1 g.

Die Präzipitation des WSP erfolgte durch Dialyse im Dialyseschlauch (NADIR SO FARBLOS, Cal. 50 mm, ROTH). Die Dialyseschläuche wurden mit den 3 L Extraktionsüberstand befüllt und in folgenden Schritten dialysiert:

- 18 h bei RT mit der 17fachen Menge Leitungswasser
- 6 h bei RT mit der 17fachen Menge Leitungswasser mit 0,01 % EDTA- Na_2
- 26 h bei 4°C mit der 26fache Menge enthärtetem Wasser

Danach wurden die Dialyseschläuche entleert und das ausgefallene, gummiartige Präzipitat durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt. Nach der Lyophilisierung des Pellets wurden 28,5 g eines hochkonzentrierten WSP-Präparates mit 68,3 % HMW-1Dx5-Untereinheiten erhalten. Somit wurde ein Anreicherungsfaktor von 2,5 erreicht. Der abgereicherte Überstand mit einem pH-Wert von 5,6 wurde lyophilisiert und hatte danach ein Gewicht von 4,0 g.

Durch den beschriebenen Anreicherungsprozeß wurden 93,6 % der als WSP-Rohpräparat eingesetzte Menge an HMW-1Dx5-Untereinheiten im hochkonzentriertes WSP-Präparat erhalten.

4.9.1.2 Teig- und Backversuch

Der Teig- und Backversuch wurde mit einer Weizenmehlfraktion durchgeführt, die aus einem Weizenmehl der T550 durch Auswaschen des Weizenklebers aus einem aus dem Mehl bereiteten Teig hergestellt worden war (vgl. 3.10.2). Die durch gefriertrocknen hergestellte Weizenmehlfraktion besaß alle Inhaltsstoffe des Weizenmehls mit Ausnahme des Weizenklebers. 28 g der Weizenmehlfraktion wurden mit 7 g des 68 %igen HMW-1Dx5-Präparates versetzt. Der Mischung wurden außerdem Hefe, Zucker und Salz gemäß Standardrezeptur zugesetzt.

Die gesamte Mehlmenge (35 g) wurde zunächst im Farinographen mit Wasser (21 mL) angeteigt. Dadurch wurde zusätzlich auch ein Farinogramm erhalten (Abb. 47), mit dem die Eigenschaft der Mischung, einen Teig bilden zu können, bewiesen wurde.

Die blaue Linie zeigt den Verlauf des Farinogramms im Mittelwert. Die ober- und unterhalb der blauen Linie verlaufenden schwarz dargestellten Linien zeigen die Schwankungsbreite des Farinogramms in Farinogrammeinheiten (FE) während der

Messung. Nach kurzer Knetzeit wurde ein so starker Anstieg des Farinogramms beobachtet, daß eine zweite Wasserzugabe erfolgte. Das erklärt die Unterbrechung im Farinogramm. Nach der zweiten Wassergabe stellte sich, wie gewünscht, ein Wert von knapp 500 FE ein. Diese Wassergabe entsprach der zu einem normalen Weizenmehl. Eine Teigbildung im Farinogramm war deutlich an der Einstellung des Farinogrammverlaufes zu erkennen. Nach fünf Minuten wurde der Knetvorgang abgebrochen. Der gebildete Teig wurde aus dem Knetzer entnommen und es wurde ein Brötchen aus ihm gebacken. Die dann erforderliche weitere Bearbeitung des Teiges erfolgte unter den Bedingungen des Standardbackversuches [84].

Teigentwicklungszeit: 4.2 min
 Stabilität: 3.3 min
 Teigerweichung: 481 FE (10 min nach Beginn)
 (ICC): 460 FU (12 min nach Max.)
 Farinograph Qualitätszahl: 43
 Bemerkungen: mit Premix
 schnellere Wasserzugabe

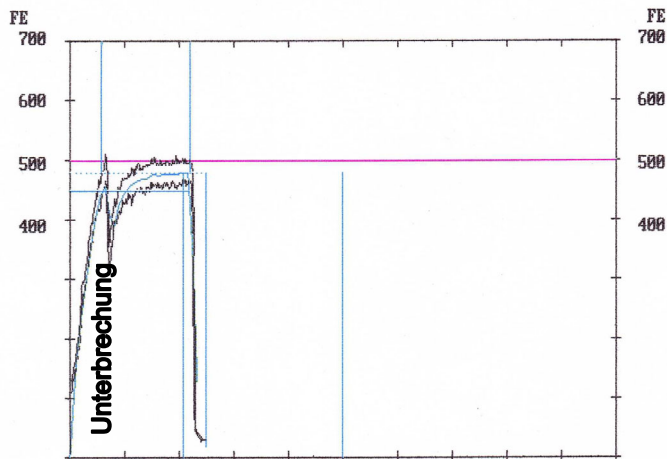


Abb. 47: Farinogramm des Anteigversuches

Während der ersten Gare wurde eine deutliche Volumenausdehnung des Teiglings beobachtet. Diese Volumenausdehnung war vergleichbar zu der des Teiges für das zum Vergleich hergestellte Standardbrötchen. Während der zweiten Gare, die nach dem Ausformen erfolgte, wurde keine weitere Volumenzunahme des Teiglings beobachtet. Somit war auch nach dem Abbacken das Backvolumen des Brötchens im Vergleich zum Standardbrötchen klein (80 mL). Das Brötchengewicht betrug 52,9 g, der Backverlust 19,6 %.

Deutlich ist eine gelockerte Krume erkennbar. Damit ist das Gashaltvermögen des Teiges bewiesen. Außerdem bildete sich eine braun gefärbte Kruste aus. Beide Kri-

terien belegen die Funktionalität der zugesetzten HMW-1Dx5-Untereinheiten als Kleberprotein.

Das Ergebnis des Backversuches zeigt Abb. 48.

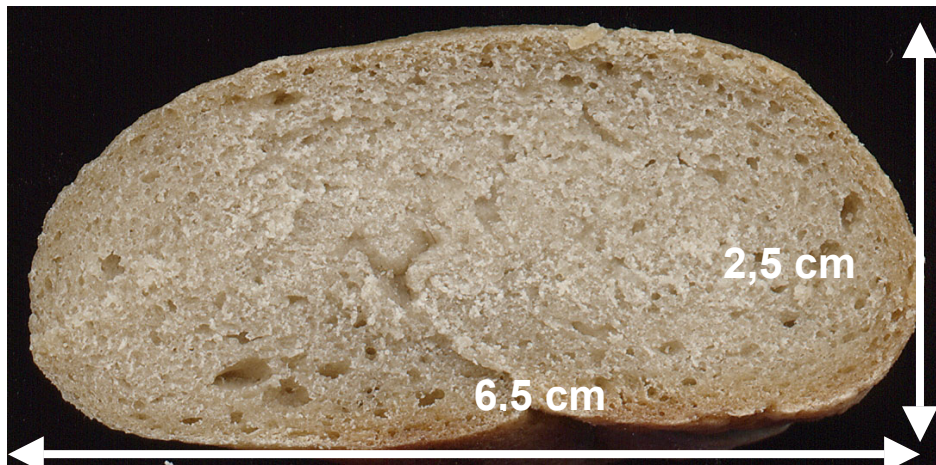


Abb. 48: Backergebnis im Schnitt

Dieses positive Ergebnis des Versuches war ein bedeutender Meilenstein im Projektverlauf, der durch die erfolgreiche Zusammenarbeit aller beteiligten Arbeitsgruppen ermöglicht wurde. Einzigartig ist dabei das erhaltene Produkt, weil in ihm erstmals ein transgen in Hefe hergestelltes Weizenprotein die Funktion der Kleberproteine aus Weizen übernommen hatte.

4.9.2 Weitere Funktionalitätsprüfungen verschiedener Glutenin-Untereinheiten im Mikromaßstab

4.9.2.1 Ergebnisse des Anreicherungsverfahrens

Im Ergebnis des unter Abschnitt 3.9 beschriebenen Anreicherungsverfahrens wurden aus verschiedenen WSP-Rohpräparaten angereicherte WSP-Präparate hergestellt. Diese angereicherten WSP-Präparate stellten gleichzeitig das Ausgangsmaterial für weitere Funktionalitätsprüfungen im Mikromaßstab dar. Die Tab. 54 zeigt eine Übersicht der hergestellten Präparate und deren Analysenergebnisse, der für die Anreicherung verwendeten WSP-Rohpräparate und eingestellten pH-Werte zur Präzipitation sowie die erreichten Anreicherungs faktoren an Gesamt-WSP-Gehalt.

Anhand der Ergebnisse in Tab. 54 wird deutlich, daß das Ziel des Anreicherungsverfahrens erreicht wurde. Aus jedem WSP-Rohpräparat wurde ein angereichertes

WSP-Präparat erhalten, welches sich durch einen im Vergleich zum jeweiligen Rohpräparat höheren Gehalt an WSP auszeichnete.

Tab. 54: Ergebnisse der Anreicherungsversuche verschiedener WSP-Rohpräparate

Angereichertes WSP-Präparat Nr.	1B ⁽²⁾	2B ⁽²⁾	3B	4B	5B ⁽³⁾	6B
Verwendete WSP-Rohpräparate aus den Versuchen:	21/23/24	18/20	18/20	25/27	14/ (12+13) ⁽⁴⁾	14/ (12+13) ⁽⁴⁾
Hefetransformant ⁽¹⁾	F	E	E	G	C	C
WSP-Gehalt des Rohpräparats [%]	28,2	21,1	21,1	9,7	17,6	17,6
pH-Wertbereich der Präzipitation	3,8-4,9	2,3-4,9	3,4-6,5	3,4-6,5	2,2-3,4	3,4-6,5
<i>Analysenergebnisse der angereicherten WSP-Präparate</i>						
Gesamtgehalt an WSP [%]	37,5	27,5	47,0	11,9	7,8	46,7
Gehalt an HMW-1Dx5 [%]	-	27,5	37,2	-	7,8	46,7
Gehalt an HMW-1Dy10 [%]	11,5	-	9,8	11,9	-	-
Gehalt an LMW-a3 [%]	26,0	-	-	-	-	-
Feuchtegehalt [%]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proteingehalt TS [%]	96,2	96,5	91,5	91,6	92,8	93,7
Erreichter Anreicherungsfaktor des Gesamt-WSP-Gehaltes	1,3	1,3	2,2	1,2	-	2,6

⁽¹⁾ Codierte Hefebezeichnung; vgl. Tab. 3

⁽²⁾ Präzipitation der WSP mittels Dialyse

⁽³⁾ Aus ein- und demselben Präzipitationsversuch wurden die Präparate 5B und 6B als zwei Fraktionen bei verschiedenen pH-Wertbereichen erhalten.

⁽⁴⁾ Präparat, welches durch einen wiederholten Extraktionsprozeß aus den Nebenfraktionen der ersten Extraktion (Feststoffphasen) der Versuche 12 und 13 gewonnen wurde.

Der größte Anreicherungsfaktor wurde bei der Herstellung des Präparates 6B beobachtet. Hier wurde der WSP-Gehalt im Vergleich zum Ausgangsmaterial um den Faktor 2,6 erhöht.

Weniger deutlich erhöhte sich der WSP-Gehalt bei der Herstellung des Präparates 4B, wobei ein sehr kleiner Anreicherungsfaktor von 1,2 erreicht wurde. Vermutlich ist dieses Ergebnis auf den geringen WSP-Gehalt im Rohpräparat von 9,7 % zurückzuführen.

Die Präparate 2B und 3B stammen aus ein- und demselben Anreicherungsversuch, wobei der WSP-haltige saure Extraktionsüberstand aufgeteilt und mit verschiedenen Präzipitationsmethoden weitergearbeitet wurde. Eine Dialyse des Extraktionsüberstandes, wonach ein pH-Wert von 4,9 erreicht wurde, führte letztendlich zum Präparat 2B. Zur Herstellung des Präparates 3B wurde die Präzipitation durch Neutralisation der Säure im Extraktionsüberstand genutzt. Zusätzlich wurde durch eine stufenweise Anhebung des pH-Wertes eine fraktionierte Präzipitation durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte eine pH-Werterhöhung im Extraktionsüberstand von ausgehend pH 2,3 auf 3,4. Hierdurch fiel ein erstes, stark verunreinigtes Präzipitat aus, was durch Zentrifugation vom Extraktionsüberstand abgetrennt wurde. Erst danach erfolgte die Fällung des „Kernpräzipitates“ durch eine pH-Werterhöhung auf pH 6,5. Die Vorteile dieser fraktionierten Präzipitation zeigen sich deutlich in den WSP-Gehalt der Präparate 3B von 47,0 %. Im Gegensatz dazu wurde im Präparat 2B, welches durch Dialyse präzipitiert wurde, lediglich ein WSP-Gehalt von 27,5 % erreicht.

Das Verfahren zur fraktionierten Präzipitation wurde ebenfalls bei der Herstellung der Präparate 4B-6B genutzt. Die Präparate 5B und 6B stammen aus ein- und demselben Anreicherungsversuch. Das Präparat 5B fiel als Fraktion bei der ersten Stufe der pH-Werterhöhung von pH 2,2 auf pH 3,4 an. Es besaß einen WSP-Gehalt von 7,8 %. Aus dem Kernpräzipitat der anschließenden pH-Werterhöhung von pH 3,4 auf pH 6,5 wurde das Präparat 6B mit einem WSP-Gehalt von 46,7 % hergestellt.

Somit standen für die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der angereicherten WSP-Präparate unter anderem drei Präparate (2B, 5B, 6B) mit gleichen WSP-Untereinheiten (HMW-1Dx5) aber unterschiedlichem Gehalt zur Verfügung.

4.9.2.2 Backversuche mit angereicherten WSP-Präparaten aus Hefe

Nach den Vorgaben für Rezeptur und Verfahren aus Abschnitt 3.10.5 wurden Gebäcke hergestellt, welche sich nach bestimmten Kriterien voneinander unterschieden. Zur Bewertung der Gebäcke wurden die Kriterien Gebäckvolumen, Gebäckform und Porung der Krume gewählt.

In Tab. 55 sind sämtliche verbackenen WSP-Präparate mit den dabei erreichten Gebäckvolumina aufgeführt. Die in Tab. 55 gewählte Reihenfolge der angereicherten WSP-Präparate nach abnehmenden Gesamt-WSP-Gehalt von links nach rechts lässt eine Korrelation zwischen Gesamtgehalt an WSP im Präparat und dem erreichten Gebäckvolumen erkennen.

Die Gebäcke aus den Präparaten mit einem niedrigen Gehalt an WSP-Untereinheiten (4B und 5B) fielen signifikant kleiner aus als diejenigen der übrigen Präparate mit höherem WSP-Gehalt. Betrachtet man die Gruppe der Präparate mit dem höchsten Gehalt an Gluteninen, war mit steigender Konzentration keine weitere Volumenzunahme mehr zu beobachten. Im Gegenteil, das größte Volumen erreichten nicht die Gebäcke aus 3B und 6B mit 47,0 % bzw. 46,7 % WSP-Gehalt sondern das Gebäck aus dem Präparat 1B, welches einen WSP-Gehalt von 36,6 % aufwies.

Tab. 55: Angereicherte WSP-Präparate und damit erreichten Gebäckvolumina.

Präparat	3B	6B	1B	2B	4B	5B
Gesamtgehalt an WSP [%]	47,0	46,7	36,6	27,5	11,9	7,8
Gehalt an HMW-1Dx5 [%]	33,2	46,7	-	27,5	-	7,8
Gehalt an HMW-1Dy10 [%]	9,8	-	11,5	-	11,9	-
Gehalt an LMW-a3 [%]	-	-	26	-	-	-
Gebäckvolumen [mL]	18,7	19,0	19,3	18,7	16,7	15,0

Die Präparate 2B, 5B und 6B waren HMW-1Dx-5-Präparate mit unterschiedlichem WSP-Gehalt (vgl. Tab. 55). Innerhalb dieser Gruppe gleicher WSP-Untereinheiten zeigte sich die Korrelation zwischen WSP-Gehalt und erreichten Volumina sehr deutlich.

Anhand dieser Ergebnisse wurde jedoch deutlich, daß das erreichte Gebäckvolumen als einziges Kriterium zur eindeutigen Differenzierung der funktionellen Eigenschaften der WSP-Präparate nicht ausreichte. Das wurde besonders deutlich, als ein Gebäck aus glutenfreiem Mehl ohne Zusatz eines WSP-Präparats sogar ein Volumen von 20 mL erreichte. Die Gebäckform war im Gegensatz zu den Gebäcken mit WSP-Präparat-Zusatz ausgesprochen flach (Abb. 49). Der zugehörige Teig hatte keinen Stand und besaß kaum Gashaltevermögen.

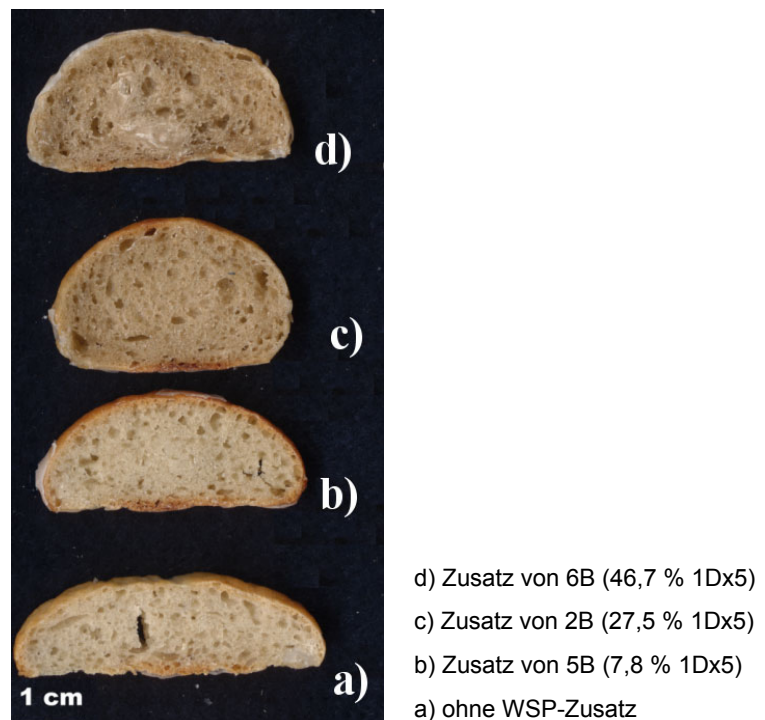


Abb. 49: Gebäcke aus HMW-1Dx5-Präparaten und glutenfreiem Mehl

Mit steigender Konzentration an HMW-1Dx5-Untereinheiten im Mehl zeigte sich dessen positiver Einfluß auf Form und Struktur der Gebäcke. Das Gebäck aus 5B hatte noch eine flache Form und eine sehr kompakte Krume mit kaum ausgeprägter Porung. Im Gegensatz dazu besaß das Gebäck aus 2B eine fast idealtypische Form, erkennbar an einem optimalen Verhältnis von Gebäckhöhe zu –breite. Auch die Porung wies eine gleichmäßige Struktur auf. Im Ofen hob sich das Gebäck leicht von der Unterlage ab.

Beim Gebäck mit dem höchsten Gluteningehalt (Abb. 49 d) durch den Zusatz vom Präparat 6B verschlechterten sich sowohl die Gebäckform wie auch das Volumen gegenüber dem Gebäck mit dem Zusatz des Präparats 2B. Die Teig- und Gebäck-

oberflächen waren uneben. Ebenfalls enthielt die Krume nicht gelockerte, harte Einschlüsse, bei denen es sich vermutlich um nicht ausreichend hydratisierte Kleberaggregate handelte. Bei der Teigbereitung hatten sich diese möglicherweise aufgrund der hohen Menge an kohäsivem Kleberprotein gebildet.

Bei der Verwendung vom Präparat 4B (HMW-1Dy10) wurde im Gegensatz zu den Teigen mit Zusatz von HMW-1Dx5-haltigen Präparaten eine ausgeprägte plastische Konsistenz des Teigs beobachtet. Dadurch bildete sich, ähnlich wie bei Roggenmikrobackversuchen, ein flacher Boden zusammen mit einer hohen runden Form aus (Abb. 51). Da das vorliegende Präparat 4B mit einem Gehalt von 11,9 % HMW-1Dy10-Untereinheiten relativ wenig WSP enthielt ist nicht auszuschließen, daß mit konzentrierteren HMW-1Dy10-Präparaten ebenfalls Weizenbrot-ähnliche Gebäcke zu erzielen wären.

Beim Vergleich des Gebäcks mit Zusatz von Präparat 4B (11,9 % 1Dy10) mit dem unter Zusatz von Präparat 5B (7,8 % 1Dx5) hergestellten Gebäck zeigte sich, daß bei annähernd gleicher WSP-Konzentration im Präparat grundsätzliche Unterschiede in der Wirkung zwischen 1Dx5- und 1Dy10-Untereinheiten bestehen müssen (vgl. Abb. 50 und Abb. 51).



Abb. 50: Gebäck aus WSP-Präparat 5B (7,8 % HMW-1Dx5) und glutenfreiem Mehl

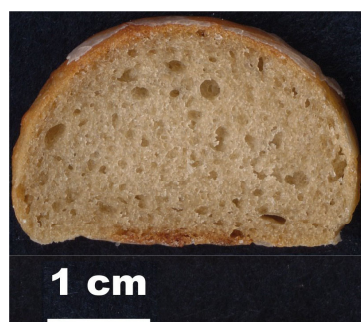


Abb. 51: Gebäck aus WSP-Präparat 4B (11,9 % HMW-1Dy10) und glutenfreiem Mehl

Der Backversuch mit dem angereicherten WSP-Präparat 3B (33,2 % 1Dx5- + 9,8 % 1Dy10-Untereinheiten) zeigte eine gut gelockerte, sehr feinporige Krume. Die Gebäckform und Krumenstruktur zeigte bei diesem Versuch, daß der Teig weniger viskoelastisch als der des Backversuches mit dem Präparat 6B war, obwohl der Gesamt-WSP-Gehalt im Präparat mit 47,0 % ebenfalls sehr hoch war (Abb. 52).

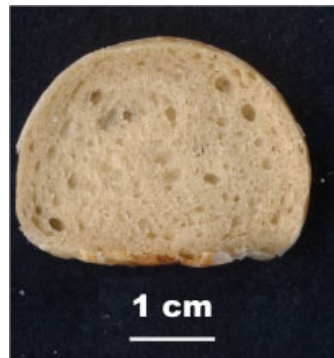


Abb. 52: Gebäck aus WSP-Präparat 3B (33,2 % HMW-1Dx5 + 9,8 % HMW-1Dy10) und glutenfreiem Mehl

Ebenfalls wurde im Vergleich zum Backversuch mit dem Präparat 6B (46,7 % 1Dx5) hier bei vergleichbar großem Gebäckvolumen eine gleichmäßige Krumenbeschaffenheit ohne harte Einschlüsse beobachtet. Alle Ergebnisse ließen auf eine bessere Verarbeitbarkeit der Mischung von Untereinheiten im WSP-Präparat 3B als im Präparat 6B schließen.

4.9.2.3 Rheometrie

Die durchgeführten rheologischen Messungen lieferten einen wichtigen Beitrag zur Erklärung der Ergebnisse der Backversuche. Das HMW-1Dx5 Präparat 5B mit nur 7,8 % WSP-Gehalt sowie das HMW-1Dy10 Präparat 4B mit einem ähnlich niedrigen Gehalt von 11,9 % WSP waren wegen unzureichender Kohäsivität nicht meßbar, obwohl eine Kohäsivität durch Zugabe von Gliadin aus Weizen subjektiv beobachtet wurde. Diese mangelhafte Kohäsivität, aufgrund des geringen WSP-Gehalts und des hohen Gehalts nicht-kleberähnlicher Hefeproteine im WSP-Präparat (vgl. Tab. 10), dürfte die Ursache sein für die plastischen Teigeigenschaften bei den Backversuchen.

Von den angereicherten WSP-Präparaten und von Trockenkleber wurden Extensogramme aufgenommen und der maximale Dehnwiderstand ($R_{\max}$), die Dehnbarkeit am Maximum ($E_{\max}$) und die Fläche unter der Kurve als Maß für die zur Dehnung des Klebers aufzuwendende Energie bestimmt (Tab. 56).

Tab. 56: Vergleich der Dehnungseigenschaften der angereicherten WSP-Präparate und Trockenkleber (TK).

Präparat	6B	2B	3B	1B	TK
Gesamtgehalt an WSP [%]	46,7	27,5	47,0	36,6	-
Gehalt an HMW-1Dx5 [%]	46,7	27,5	33,2	-	-
Gehalt an HMW-1Dy10 [%]	-	-	9,8	11,5	-
Gehalt an LMW-a3 [%]	-	-	-	26	-
Dehnwiderstand $R_{\max}$ [N]	2,5	0,46	0,18	0,4	0,8
Dehnbarkeit $E_{\max}$ [cm]	4,5	1,4	1,2	0,6	5
Energie [N*cm]	4,75	0,36	0,14	0,13	2,34

Die in Tab. 56 gewählte Reihenfolge der angereicherten WSP-Präparate nach WSP-Untereinheit und abnehmenden Gesamt-WSP-Gehalt von links nach rechts läßt eine Korrelation zwischen Gesamtgehalt an WSP im Präparat und der gemessenen Dehnbarkeit erkennen. Die Ergebnisse der Zugversuche mit den Präparaten 6B und 2B zeigten, daß mit dem Präparat 2B (27,5 % HMW-1Dx5) im Vergleich zum Präpa-

rat 6B (46,7 % HMW-1Dx5) eine deutlich geringere Dehnbarkeit ermittelt wurde. Auch der Dehnwiderstand war beim Versuch mit dem Präparat 2B verringert.

Trotz des hohen Gesamt-WSP-Gehalts im Präparat 3B von 47,0 % wurden beim Zugversuch mit diesem Präparat ein geringerer Dehnwiderstand und eine geringere Dehnbarkeit als bei den Versuchen mit den Präparaten 6B (46,7 % Gesamt-WSP) und 2B (27,5 % Gesamt-WSP) ermittelt. Als Ursache hierfür kann der Gehalt von 9,8 % HMW-1Dy10-Untereinheiten im Präparat 3B angesehen werden. Vermutlich kam es hier durch die Kombination von HMW-1Dx5- und HMW-1Dy10-Untereinheiten zu einer Abschwächung der funktionellen WSP-Eigenschaften. Diese Vermutung wird durch den HMW-1Dx5-Gehalt von 33,2 % im Präparat 3B gestützt. Dieser ist höher als im Präparat 2B (27,5 %). Dennoch wurden beim Zugversuch mit dem Präparat 3B kleinere Werte der Dehnungseigenschaften gemessen. Folglich war neben Gesamt-WSP-Gehalt auch die Art der enthaltenen Glutenin-Untereinheiten für die funktionellen Eigenschaften der Präparate von entscheidender Bedeutung.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Präparate 3B und 1B mit einem Gesamt-WSP-Gehalt von 47,0 bzw. 36,6 % wurde die geringste Dehnbarkeit von 0,6 cm beim Zugversuch mit dem Präparat 1B beobachtet. Entgegen diesem Verhalten war der Dehnwiderstand beim Versuch mit dem Präparat 1B im Vergleich zum Präparat 3B erhöht. Die Ergebnisse zeigten, daß sich die Wirkung der LMW-Untereinheiten wesentlich von der der HMW-Untereinheiten unterschied.

Besonders auffällig war der mit 2,5 N hohe Dehnwiderstand von 6B. Dieser Wert war dreimal höher als der Dehnwiderstand des aus Weizenmehl gewonnenen Trockenklebers. Demgegenüber besaß der Trockenkleber mit 5 cm eine um 0,5 cm größere Dehnbarkeit als das HMW-1Dx5-Präparat 6B. Der große Dehnwiderstand war demzufolge auch die Ursache dafür, daß das Gebäck aus 6B kein größeres Volumen erreichte (Tab. 55). Wie oben beschrieben, ließen dies die kompakten Strukturen nicht zu.

Hydratisierter gewöhnlicher Weizenkleber zeichnet sich durch seine Viskoelastizität aus. Das Gemisch aus 6B und Gliadin zeigte nach Hydratisierung dagegen fast ausschließlich elastische Eigenschaften, die Kohäsivität war deutlich erkennbar (Abb. 53).

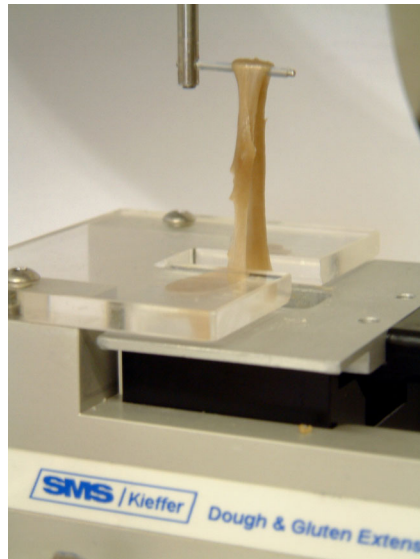


Abb. 53: Dehnversuch mit dem Präparat 6B (46,7 % HMW-1Dx5)

Zur Klärung ob die hier dargestellten rheologischen Ergebnisse durch den Zusatz von Gliadin zu den angereicherten WSP-Präparaten stark beeinflusst wurden, wurde ein Zugversuch mit ausschließlich Gliadin durchgeführt. Im Ergebnis dieses Versuchs konnte keine Elastizität gemessen werden. Somit war bewiesen, daß die hier dargestellten Ergebnisse ausschließlich auf die Wirkung der zugesetzten WSP-Präparate zurückzuführen waren.

5 Nebenergebnisse

5.1 Untersuchungen zur Verwertbarkeit von Nebenfraktionen

Im Aufarbeitungsverfahren der Fermentationslösung bis zum WSP-Rohpräparat fielen insgesamt fünf Nebenfraktionen an. Es stellte sich die Frage, ob es möglich wäre, aus einer Nebenfraktion ein Nebenprodukt zu gewinnen. Die Tab. 57 zeigt die durchschnittlich angefallene Menge an Nebenfraktionen und deren Proteingehalt bei der Aufarbeitung der Hefezellmasse in der Übersicht. Die numerische Bezeichnung der Nebenfraktionen wurde aus der Abb. 45 im Abschnitt 4.8 übernommen. Bei den angegebenen TS-Massen und deren Proteingehalt handelt es sich um Durchschnittswerte aus allen betrachteten Aufarbeitungen. Die Nebenfraktionen 1, 2, 3 sowie 5 fielen im Prozeßverlauf als Flüssigphasen an. Die Nebenfraktion 5 bestand hauptsächlich aus Ammoniumsulfat. Der Proteingehalt der Nebenfraktion 5 wurde analytisch nicht ermittelt. Die Nebenfraktion 4 war das Pellet, welches nach dem Extraktionsschritt als feste Phase vorlag. Dieses Pellet besaß den größten Anteil an der TS-Masse aller Nebenfraktionen. Die Nebenfraktion 4 bestand aus Zellbestandteilen (hauptsächlich aus Zellwandmaterial) und Hefeproteinen. Durch den Gehalt an Zellwandmaterial und der Möglichkeit dieses Fraktionieren zu können, um einzelne Stoffgruppen daraus anzureichern, erschien die Nebenfraktion 4 für weitere Versuche am besten geeignet zu sein.

Tab. 57: Nebenfraktionen des Anreicherungsprozesses.

Nebenfraktion	Trockensubstanzmasse [kg]	Proteingehalt TS [%]
1	1,09	36,33
2	0,54	35,39
3	0,76	31,95
4	2,75	48,71
5	13,68	n.b.

Die Zellwand der Hefe ist mit 100 bis 200 nm relativ zur Zelle (8-15 µm) sehr dick. Sie besteht zu 80 bis 90 % aus Polysacchariden, außerdem aus Proteinen, Lipiden

und anorganischem Phosphat. In der Zellwand befindet sich ein komplexes Polysaccharidnetzwerk. Das Netzwerk ist durch proteinverknüpfte Mannoseketten verankert. Die Zellwand von Hefe enthält bis zu 30 % Mannoprotein im Mannose-Protein-Komplex. Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen dieser Verbindung haben einen Nutzen für die Gesundheit von Menschen und Tieren gezeigt.

Generell stärkt Mannoprotein das Immunsystem. Bei Nutztieren wirkt es positiv auf die Darmflora und kann Toxine binden, was zu einem deutlich geringeren Bedarf an Antibiotika führt [80, 81, 82]. Mannane aus der Hefezellwand von *Saccharomyces cerevisiae* können demnach das Immunsystem positiv beeinflussen. Sie verändern die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstraktes und verhindern die Ansiedlung pathogener Mikroorganismen [83]. Es wurde deshalb versucht, die in der Nebenfraktion 4 enthaltenen Zellwandbestandteile anzureichern, um ein Nebenprodukt mit hohem Mannananteil zu gewinnen und dieses als Backzusatz verwenden zu können.

5.1.1 Vorversuche zur Anreicherung der Zellwandbestandteile aus der Nebenfraktion 4

Der erste Schritt zur Anreicherung einer zellwandbestandteil- und somit mannanreichen Fraktion bestand in der Abreicherung von Protein. Die Abreicherung erfolgte enzymatisch durch die Aktivität von zugesetzten, proteolytisch wirkenden Enzympräparaten. Ziel der Vorversuche im Labormaßstab war es, aus einer Vielzahl von verwendbaren technischen Enzympräparaten eine Auswahl für weitere Versuche im Technikumsmaßstab zu treffen. Zur Beurteilung der hydrolytischen Enzymwirkung auf die Proteine wurde der freie Amino-Stickstoff (FAN) analytisch bestimmt. Durch die Wirkung der Enzyme während einer Inkubationszeit wurde der Gehalt an freien Aminosäuren und löslichen kurzkettigen Peptiden in der Reaktionsmischung erhöht. Als Maßstab für die Enzymwirkung wurde der Gehalt an freien Aminosäuren im Reaktionsgemisch herangezogen.

Als Ausgangsmaterial für diese Vorversuche wurde ein sprühgetrocknetes Produkt aus der Nebenfraktion 4, welches durch intensive Waschung an der Ultrafiltrationsanlage hergestellt wurde, verwendet. Die Waschung und Trocknung erfolgte analog zu der im Abschnitt 5.1.2 beschriebenen Methode. Somit war dieses Produkt von potentiellen Inhibitoren für Enzyme, wie Mercaptoethanol, PMSF und 2-Propanol befreit.

Im Labormaßstab wurden ca. 5 g des Ausgangsmaterials in 200 mL dest. Wasser suspendiert. Die Suspensionen wurden über einen Zeitraum von 4 h, unter Enzymzusatz bei Optimalbedingungen (Temperatur, pH-Wert) inkubiert. Im Versuchsverlauf wurden im 30 Minuten Abstand Proben entnommen um den FAN Gehalt zu bestimmen. In der Tab. 58 sind alle Enzympräparate, deren Herkunft, deren optimalen Wirkungsbedingungen sowie die eingesetzten Mengen aufgeführt, mit denen Vorversuche durchgeführt wurden.

Tab. 58: Auswahl der verwendeten Enzympräparate.

Enzympräparat	[°C]	pH	Menge g/kg Probe	Herkunft (Enzym)	Firma
Gammazym NP	40 -55	4,5-8,0	0,8	<i>B. subtilis</i> (Protease)	Gamma Chemie
Gammazym YLL	40 -50	5,0-7,5	0,8	<i>B. subtilis</i> (neutrale Protease)	Gamma Chemie
Corolase TS	75	7,9	0,4	<i>B. stearothermophilus</i> (Endoprotease)	AB Enzymes
Corolase L10	75	3-9	0,4	Papain, <i>Papaya carica</i> (Protease)	AB Enzymes
Pepsin	40	2,0	0,4	Kälbermagen (saure Protease)	Merk 2000 FIP-U/g
Trypsin	40	7,8	0,2	Bauchspeicheldrüse (alkalische Protease)	Fluka 95 U/mg

In der Abb. 54 sind die Ergebnisse der Vorversuche graphisch dargestellt. Die Graphik zeigt den Verlauf des FAN-Gehaltes und dessen Entwicklung über die Inkubationszeit. Bei einem Versuch wurde die kombinierte Wirkung der Enzympräparate Trypsin und Pepsin untersucht. Hierfür wurde zunächst mit Pepsin unter optimalen Bedingungen 60 min inkubiert. Nach der pH-Wert-Verschiebung auf 8,0 wurde Trypsin zugegeben und bei 40°C weiter inkubiert. Das Enzympräparat Corolase TS zeigte kaum eine Wirkung, der FAN-Gehalt blieb nahezu konstant. Dieses Enzym hatte seine Aktivität evtl. schon im Vorfeld durch falsche Lagerbedingungen und Temperaturschwankungen verloren oder war prinzipiell ungeeignet, um denaturierte Hefeproteine zu hydrolysieren.

Bei den übrigen Enzympräparaten stieg der FAN-Gehalt in den ersten 60 Minuten an, dann pendelte er sich ein. Der FAN-Gehalt stieg beim Versuch mit dem Enzym Pepsin am schnellsten an und erreichte in den ersten 60 Minuten den größten Wert. Der FAN-Gehalt der Suspensionen unter Wirkung der übrigen Enzyme pendelte sich nach 120 Minuten im Mittelfeld ein. Der höchste FAN- Gehalt wurde nach 240 Minuten Inkubationsdauer durch Corolase L10 erzielt. Bei diesem Enzym stieg der FAN-Gehalt über den gesamten Versuchszeitraum an.

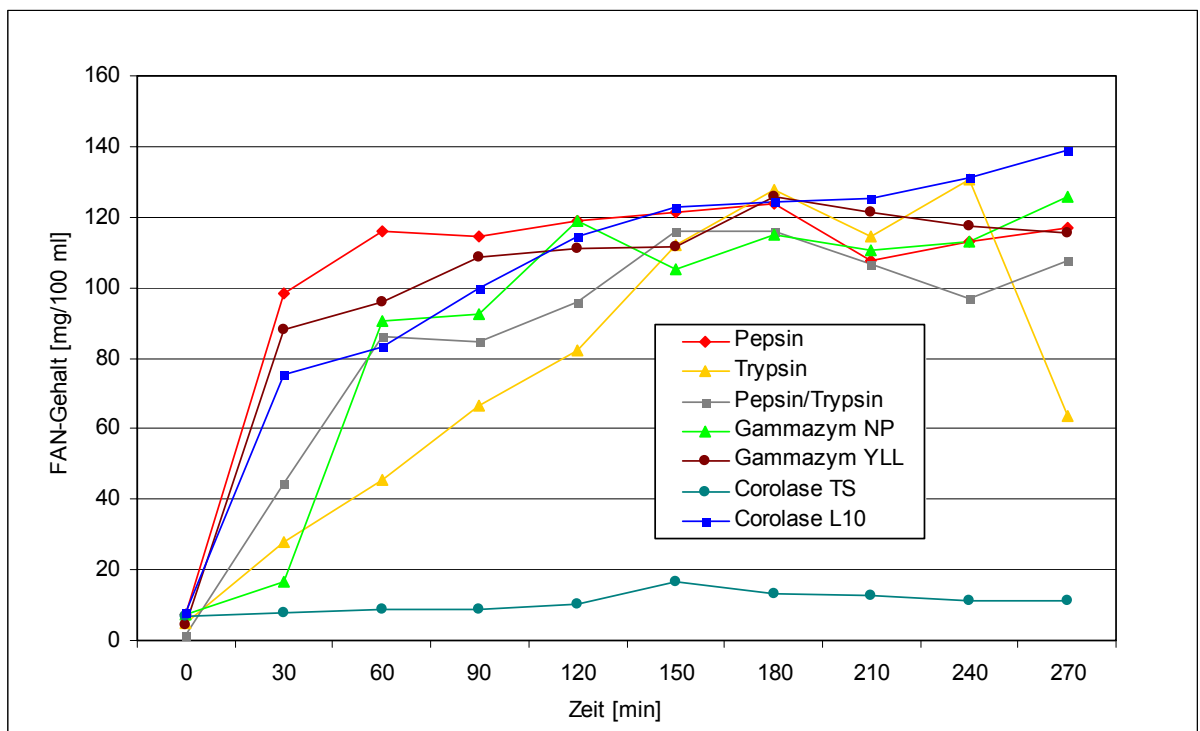


Abb. 54: Verlauf des FAN-Gehalts bei der enzymatischer Proteinhydrolyse

Anhand der Ergebnisse dieser Vorversuche wurde bei der anschließenden Abreicherung von Protein im Technikumsmaßstab auf die Enzympräparate Pepsin und Corolase L10 zurückgegriffen. Pepsin und Corolase L10 wurden in zwei aufeinander folgenden Teilschritten eingesetzt. Im ersten Schritt wurde Pepsin, im zweiten Corolase L10 bei jeweiligen Optimalbedingungen verwendet.

Bei der Corolase L10 handelt es sich um eine Protease mit einer hohen Temperaturtoleranz. Das Enzym zeigt seine beste Wirkung um 72 °C, weshalb es in Temperaturbereichen eingesetzt werden kann, bei denen eine Vermehrung von Mi-

koorganismen unterdrückt wird. In diesem Temperaturbereich zeigt das Enzym Pepsin (Optimum 40 °C) bereits keine Aktivität mehr. Pepsin hingegen hat ein pH-Optimum bei 2, so daß einer bakteriellen Vermehrung von möglichen Kontaminanten ebenfalls entgegengewirkt wird.

5.1.2 Versuchsdurchführung der Proteinabreicherung aus einer Nebenfraktion

Im Versuchszeitraum wurde eine Vielzahl von Versuchen zur Aufreinigung von Nebenfraktionen im Technikumsmaßstab durchgeführt. Im Folgenden wird ein optimierter Versuch beschrieben. Die optimale Einstellung der dazu benötigten Anlagen und Versuchsbedingungen wurden in Vorversuchen ermittelt. Als Versuchsmaterial wurde das Pellet der Extraktion des Versuches 22 (Nebenfraktion 4). herangezogen. Dieses Pellet hatte einen TS-Gehalt von 23,3 % und einen Proteingehalt von 55,6 %.

Die Aufarbeitung der Nebenfraktion wurde in folgende fünf Teilabschnitte gegliedert: die Waschung der Nebenfraktion, den proteolytischen Proteinabbau, die Abreicherung löslicher Proteinabbauprodukte, die Herstellung eines Trockenpräparates sowie die Extraktion und Anreicherung einer mannanreichen Fraktion aus diesem.

Im ersten Schritt der Anreicherung wurden 6,32 kg des Pellets mit 30 l Wasser suspendiert. Die Nebenfraktion 4 des Anreicherungsprozesses zum WSP-Rohprodukt enthielt nach der Extraktion noch Rückstände des Reduktionsmittels und Extraktionsmittels. Da somit potentielle Inhibitoren für Enzyme enthalten waren, wurde zunächst eine intensive Waschung mittels Ultrafiltration bei einer Ausschlußgrenze von 80 kD durchgeführt. Die Ultrafiltrationsanlage wurde bei einem retentatseitigen Eingangsdruck von 1,5 bar und Ausgangsdruck von 0,5 bar betrieben. Der Permeatstrom betrug 0,9 l/min. Die Suspension wurde mit insgesamt 155 l Leitungswasser in 5 l Schritten gewaschen. Sobald 5 l Permeat ausgetragen waren, wurde diese Menge durch die Zugabe von 5 l Wasser zum Vorratsbehälter ersetzt. Die Temperatur der Suspension lag während der Ultrafiltration zwischen 35 und 40 °C. Damit wurde eine stufenweise Abreicherung der löslichen Verunreinigungen in der Nebenfraktion 4 um den Faktor 285 erreicht.

Während der Ultrafiltration wurde das Permeat mittels photometrischer Extinktionsmessung auf seinen Mercaptoethanolgehalt hin überprüft. Anhand der Ergebnisse der Extinktionsmessung und der sensorischen Beschaffenheit der Suspension konn-

te nach insgesamt 31 Waschgängen mit je 5 L Leitungswasser davon ausgegangen werden, daß die Rückstände ausreichend entfernt wurden. Der pH-Wert der Suspension lag am Ende des Waschvorganges bei 8,0. Laut Eichgrade lag der Mercaptoethanolgehalt nach der Waschung bei 1,3 µL/L.

Im zweiten Schritt der Abreicherung wurden zur Suspension 3,2 g Lipase (Nutralife V39713-9) zugegeben. Die in der Suspension vorhandenen Fette wurden durch die Wirkung des Enzyms zu Fettsäuren und Glycerin gespalten. Dies erfolgte in einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 35 bis 40 °C. Der pH-Wert lag während dieser Zeit bei 7,7. Im Anschluß wurden zwei weitere Waschschrte mit je 10 L Wasser durchgeführt. Die gelöste Bestandteile wurden somit entfernt. Dann wurde der pH-Wert mit Salzsäure auf 1,95 eingestellt. Zur Suspension wurden 25,4 g Pepsin gegeben. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 35 bis 40 °C wurde die Suspension schließlich in den Fermenter gepumpt. Der Fermenter diente in diesem Teil des Abreicherungsverfahrens als Reaktionskessel. Im Fermenter wurden optimale Bedingungen (pH 6,5, 72 °C) für die enzymatische Behandlung mit Corolase TS eingestellt. Anschließend wurden 11 mL des Enzympräparates zugegeben. Die gesamte Suspension wurde für 15 h bei konstant geregelten pH- und Temperaturbedingungen inkubiert. Der Suspension wurde zur Konservierung 5 g Natriumazid zugesetzt, um eine Kontamination und Vermehrung von Mikroorganismen auszuschließen.

Im dritten Schritt wurden die löslichen Proteinabbauprodukte abgereichert. Die Suspension wurde hierfür in die UF-Anlage zurückgepumpt und in der gleichen Art und Weise wie bei der ersten Waschung mit enthärtetem Wasser gewaschen. Insgesamt wurden 135 L dest. Wasser in 5 L Schritten für den Waschprozeß verwendet. Am Ende der Waschung betrug der pH-Wert der Suspension 6,5. Die Suspension wurde in der UF-Anlage auf ein Retentatvolumen von 20 L konzentriert. Das verbleibende Retentat war nahezu weiß und schäumend, das Permeat hingegen farblos und geruchsneutral.

Im vierten Schritt des Anreicherungsverfahrens wurde aus den verbleibenden 20 L Retentat mittels Sprühtrocknung ein Trockenpräparat gewonnen. Die Sprühtrocknungsanlage wurde mit einer Luft Eintrittstemperatur von 180 °C und einer Luftaustrittstemperatur von 85 °C betrieben. Bei maximaler Ventilatorleistung der Anlage wurde mit einer Schlauchpumpe 1,8 L/h des Retentats zudosiert. Die Ausbeute

nach der Sprühtrocknung lag bei 520 g Trockenpräparat. Der TS-Gehalt betrug 94,7 %, der Proteinanteil lag bei 18,7 % in TS. Bei dem gewonnenen Präparat handelte es sich um ein feines, weiß/gelbes Pulver, welches nahezu geruchsneutral war. Mit diesem Nebenprodukt wurde ein Backversuch durchgeführt (vgl. 5.1.3). In diesem Proteinabreicherungsprozeß konnte der Proteingehalt in der Nebenfraktion 4 auf ein Drittel (34 %) des Ausgangsproteingehaltes reduziert und Zellwandbestandteile angereichert werden.

Es wurden hohe Verluste an Trockenmasse während der Trocknung der proteinangereicherten Suspension deutlich, da die Sprühtrocknungsanlage ohne Feinstaubfilter betrieben wurde. Der integrierte Zyklon der Sprühtrocknungsanlage war nicht geeignet die sehr leichten Partikel quantitativ zurückzuhalten. Nach der Sprühtrocknung wurden lediglich 35 % der zu Beginn eingesetzten Trockenmasse als getrocknetes Präparat erhalten.

Im fünften Schritt wurde versucht, das im sprühgetrockneten, zellwandmaterialhaltigen Produkt enthaltene Mannan anzureichern. Hierfür wurden 250 g des Produktes mit 5 L 0,02 M Zitratpuffer gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt und die Suspension wurde 90 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Dieser Vorgang sollte das Mannan aus dem Produkt lösen und noch evt. vorhandene Protein-Mannan-Komplexe auftrennen. Das noch heiße Probematerial wurde nach der thermischen Behandlung durch Zentrifugation mittels Becherzentrifuge fraktioniert. Dabei war eine Zentrifugationszeit von 8 min bei 5000 min⁻¹ ausreichend (entspr. 5500 * g am maximalen Radius), um die Feststoffphasen quantitativ als gelatinöses Pellet abzutrennen. Im Überstand waren nunmehr die gelöste Mannanfraktion (ca. 2 L) enthalten. Aus diesem Überstand wurde durch Zugabe von Ethanol (21 L, 86 Vol%) das mannanhaltige Präparat präzipitiert. Die Abtrennung der gefällten mannanhaltigen Fraktion erfolgte durch Sedimentation. Die Abb. 55 zeigt eine Übersicht zum beschriebenen Prozeß der Anreicherung der mannanhaltigen Fraktion aus der Nebenfraktion 4.

Nach der Hitzebehandlung der Suspension im Autoklav wurde eine deutliche Wasseraufnahme der Suspension die mit einer starken Quellung einher ging beobachtet. Das Gemisch hatte eine puddingartige Konsistenz. Die anschließende Trennung in der Becherzentrifuge gestaltete sich aus diesem Grund schwierig, so daß von den 5 L des Ausgangsvolumens der Suspension ca. 2 L als Zentrifugationsüberstand erhal-

ten wurde. In diesen 2 L wurden 40 % der Ausgangstrockensubstanz, welche vor der Hitzebehandlung in der Suspension vorhanden war, gefunden.

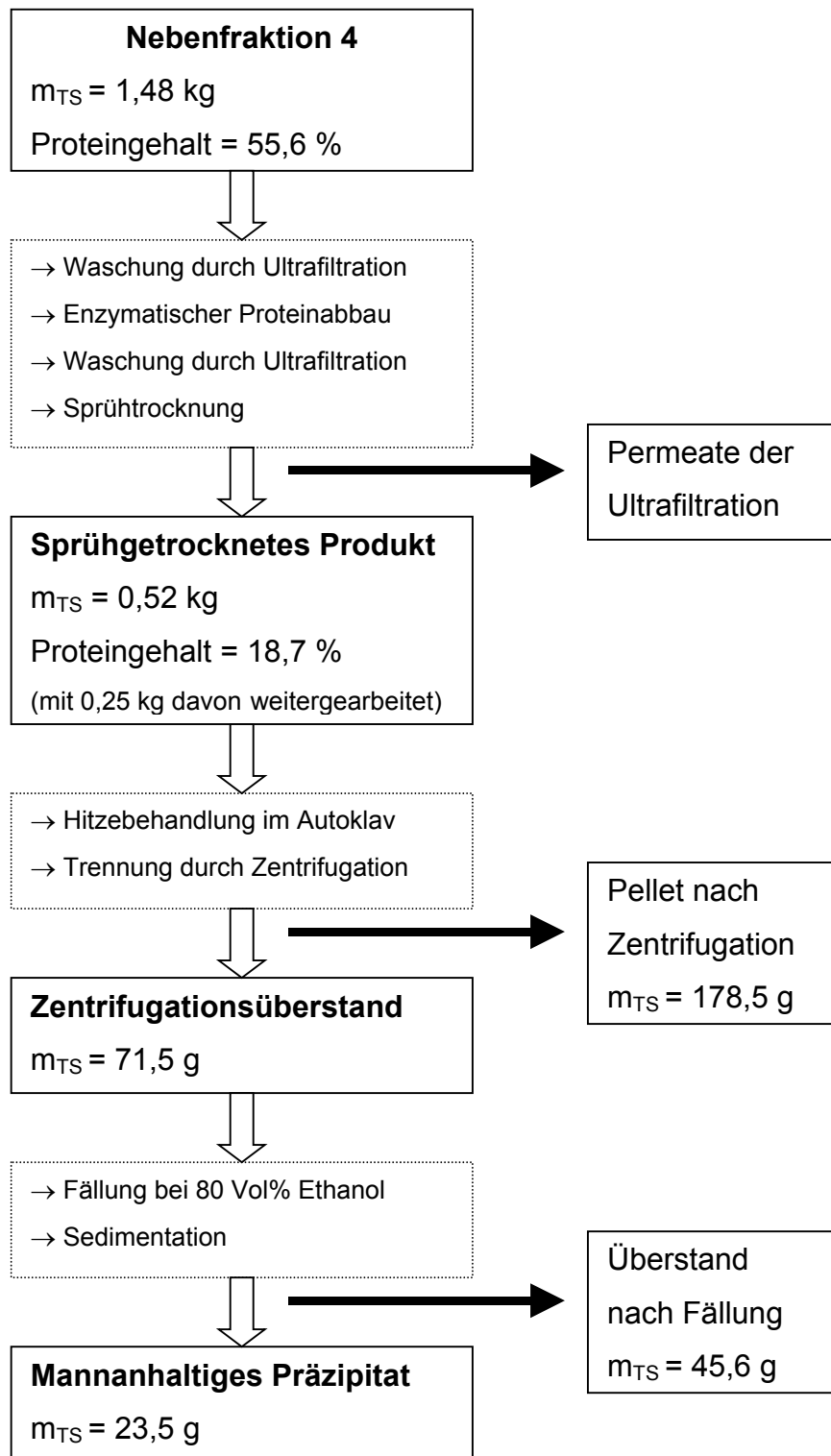


Abb. 55: Schema der Aufarbeitung der Nebenfraktion 4 zum mannanhaltigen Präparat

Der Präzipitationsschritt zur Ausfällung eines mannanhaltigen Produktes verlief nicht quantitativ. Bei einer Ethanolkonzentration von 80 Vol% wurden lediglich 33 % der im Zentrifugationsüberstand in Lösung vorliegenden Trockensubstanz präzipitiert. Die restlichen 2/3 der Trockensubstanz verblieben gelöst im 80 %igen alkoholisch-wässrigen Sedimentationsüberstand.

Die Produkte und Zwischenfraktionen dieses Versuches wurden mittels HPLC auf ihren Glucose- und Mannosegehalt hin untersucht. Bei der Untersuchung mittels HPLC konnte aufgrund einer fehlerhaften Programmoption die absolute Menge an Monosacchariden im Probematerial nicht festgestellt werden. Die prozentuale Verteilung von Glucose und Mannose in der Gesamtmenge der Monosaccharide wurde jedoch ermittelt. Der Glucoseanteil im Produktstrom nahm während der Aufarbeitung ab. Der Anteil an Mannose wurde im Produktstrom des Anreicherungsverfahrens deutlich erhöht (Abb. 56). Er lag zu Beginn im zellwandmaterialhaltigen Nebenprodukt bei 27,2 % der Gesamt-Monosaccharide. Das mannanhaltige Präzipitat hatte einen Mannoseanteil von 64,2 % bezogen auf die gefundene Menge an Gesamt-Monosacchariden.

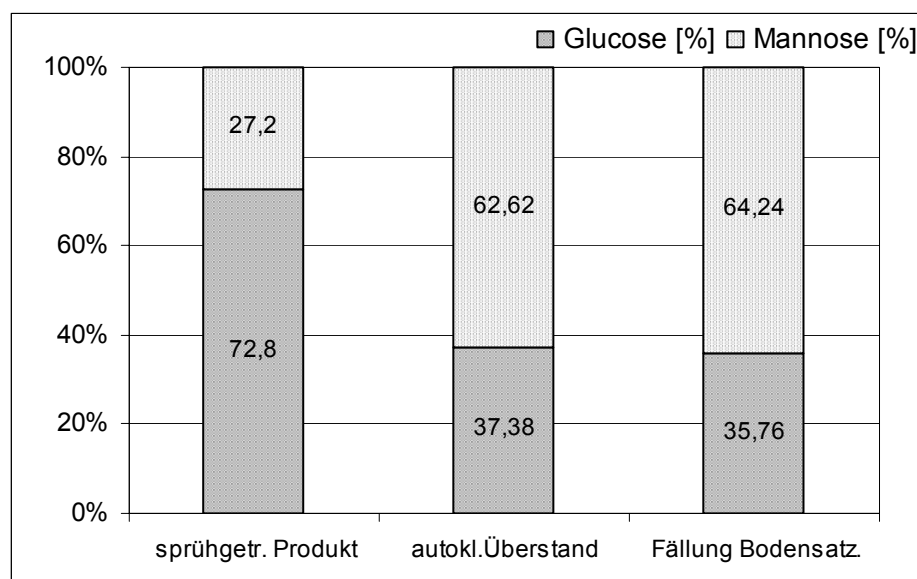


Abb. 56: Glucose- und Mannoseanteil des Gesamt-Monosaccharidgehaltes im Produktstrom des Anreicherungsversuches

Die Abb. 56 zeigt die prozentuale Verteilung der Monosaccharide in den Phasen des Anreicherungsverfahrens. Die Monosaccharidzusammensetzung der Trockensubstanz vom Zentrifugationsüberstand nach der Hitzebehandlung und die des

sedimentierten Präzipitates waren identisch. Somit war kein Einfluß durch die Präzipitation in Ethanol auf die Monosaccharidverteilung im Fällungsprozeß erkennbar.

5.1.3 Backversuch

Mit dem zellwandmaterialhaltigen, sprühgetrockneten Nebenprodukt wurde ein Backversuch durchgeführt. Es wurden Brötchen nach dem Standardrezept hergestellt. Teile des Mehls wurden durch das Nebenprodukt ersetzt. Ziel war es, den Einfluß dieses ernährungsphysiologisch wertvollen Produktes auf die Backeigenschaften und damit die Auswirkung auf die Gebäckqualität zu überprüfen.

5.1.3.1 Rezeptur und Teigherstellung

Die Teigzusammensetzung des Backversuches wurde in Anlehnung an die Standard-Backmethode für Weizenmehlbrötchen [84] gewählt. Die Versuche wurden mit Weizenmehl der T 550 durchgeführt. Der Anteil des Mehls wurde teilweise durch das sprühgetrocknete Nebenprodukt ersetzt. Die verwendeten Zusätze zum Weizenmehl bzw. zur Weizenmehl/Nebenproduktmischung zeigt Tab. 59.

Tab. 59: Zusätze zum Mehl bzw. zur Backmischung.

Zusätze	Menge
Frischhefe	5 %
Kochsalz	1,5 %
Zucker	1,0 %
Fett	1,0 %
Ascorbinsäure	0,002 %

Die Herstellung erfolgte nach der im Backhandwerk gängigen Methode [85]. Zunächst wurden die Zutaten mit der 1,5fachen Wassermenge verknetet. Es folgte eine Teigruhe (Zwischengare) von 20 Minuten bei 32 °C und 80 % relativer Feuchte. Der Teig wurde anschließend geknetet und 10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert (2. Teigruhe). Dann wurde der Teig portioniert und per Hand ausgeformt. Für die folgende Stückgare wurden die Teiglinge 30 Minuten bei 32 °C und 80 % relativer Feuchte gelagert. Im Anschluß an die Stückgare wurden die Teiglinge bei 250 °C für 20 Minuten im Ofen gebacken.

5.1.3.2 Ergebnisse der Backversuch mit dem sprühgetrockneten Nebenprodukt

Es wurden drei Brötchen nach dem beschriebenen Grundrezept hergestellt. Ein Standardbrötchen ohne Zusatz des Nebenproduktes sowie zwei Brötchen, wobei jeweils 5 bzw. 10 % des Mehls durch das zellwandmaterialhaltige Nebenprodukt ersetzt wurden. Die Abb. 57 zeigt im Ergebnis des Backversuches die Brötchen a) in der Draufsicht und b) in der Seitenansicht. Jeweils von links nach rechts sind folgende Brötchen abgebildet: der Standardversuch ohne Zusatz vom Nebenprodukt, Backergebnis mit Ersatz von 5 % des Mehls durch das Nebenprodukt, Backergebnis mit Ersatz von 10 % des Mehls durch das Nebenprodukt. Bei der Teigherstellung wurde beobachtet, daß der Teig, in dem 10 % des Mehls durch das zellwandmaterialhaltige Nebenprodukt ersetzt wurden, sehr klebrig war und weniger stark aufging. Der Teig bei dem 5 % des Mehls durch das Nebenprodukt ersetzt wurden, verhielt sich vergleichbar zum Teig des Standardbrötchens.

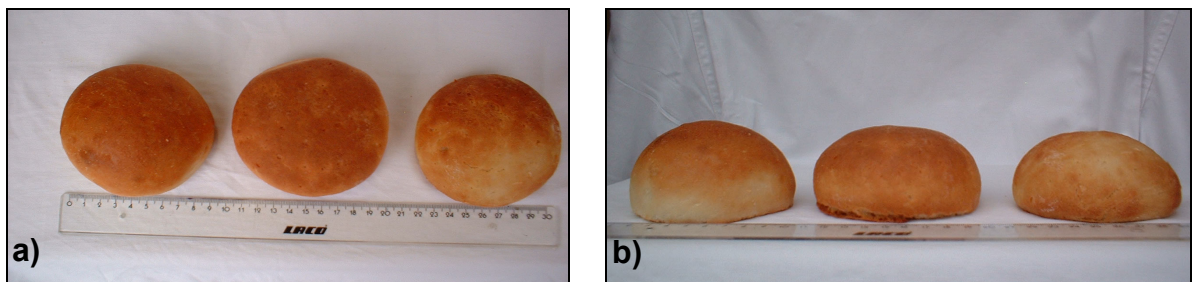


Abb. 57: Brötchen mit Anteilen des sprühgetrockneten Zwischenprodukts

Tab. 60: Beurteilungen der Gebäckstücke des Backversuches.

Qualitätsmerkmal	Standard	5 % im Mehlannteil	10 % im Mehlannteil
Brötchengewicht	48,1 g	47,85 g	53,0 g
Form	normal	normal	etwas kleiner
Bräunung	normal	normal	etwas schwach
Lockerung	wollig	wollig	etwas grob
Gleichmäßigkeit	gleichmäßig	gleichmäßig	ungleichmäßig
Porenbild	gleichmäßig	gleichmäßig	ungleichmäßig
Krumenbeschaffenheit	gut	gut	befriedigend

In der Tab. 60 sind die Qualitätsmerkmale zur Beurteilung von Gebäck und die jeweilige Bewertung für die hergestellten Gebäckstücke aufgeführt.

Die Abb. 58 zeigt die Horizontalschnitte der Versuchsbrötchen wodurch die Struktur der Porung zu erkennen ist. Beim Standardbrötchen (links) ist eine typische Porung mit vereinzelter Kaminbildung zu sehen. Das Brötchen mit 5 % Nebenprodukt im Mehnteil hat eine feine Porung, die der des Standardbrötchens ähnelt. Rechts ist das Brötchen, bei dem 10 % des Mehls durch das Nebenprodukt ersetzt wurden, abgebildet. Es zeigt eine unregelmäßige Porung. Im Randbereich dieses Brötchens war es zu vereinzelter Reißbildung gekommen.



Abb. 58: Horizontalschnitte der Versuchsbrötchen

Bei diesem Versuch wurde beobachtet, daß durch die Zugabe des sprühgetrockneten Nebenprodukts die Qualität des Brötchens beeinflusst wurde. Der Teig wurde bei Zugabe von 10 % des Nebenprodukts deutlich klebriger und schwer verarbeitbar. Durch die Zugabe von 5 % des Nebenprodukts zum Weizenmehl wurde ein Brötchen von guter, mit dem Standardbrötchen vergleichbarer Qualität mit homogener Porenstruktur, Krume und Kruste erhalten. Bei Zugabe von 10 % war die Qualität deutlich vermindert.

5.2 Versuche zur Substitution von 2-Mercaptoethanol im Extraktionsprozeß bei der Aufarbeitung der Hefebiomasse

Bei der Aufarbeitung der Biomasse der Hefetransformanten wurde ein Extraktionsprozeß der WSP aus der zuvor gefällten Zellmasse durchgeführt. Die Extraktion erfolgte bei gleichzeitiger Reduktion der Disulfidbindungen zwischen WSP und der Zellmasse in wäßrigem 2-Propanol. Dazu war ein Zusatz von 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel zum Extraktionsgemisch notwendig. 2-Mercaptoethanol ist jedoch ein Gefahrstoff und besitzt zudem selbst in größerer Verdünnung einen durchdringenden, fäkalartigen Geruch.

Mit dem Ziel, ein nichttoxisches und sensorisch akzeptables Reduktionsmittel zu finden, wurden Vorversuche mit verschiedenen potentiellen Substanzen durchgeführt. Hierbei stellte sich die Substanz Natriumhypophosphit (NaH_2PO_2) als möglicher Ersatzstoff heraus. Bisher war Natriumhypophosphit als Reduktionsmittel für chemische Synthesen und metallurgische Prozesse bekannt. Natriumhypophosphit ist eines der kräftigsten Reduktionsmittel das in wäßriger Lösung nicht nur reduzierend, sondern, ähnlich wie Metallhydride, auch hydrierend wirkt [86]. Die reduzierende Wirkung von Natriumhypophosphit wird nicht durch die Substanz selbst, sondern durch das Hypophosphit-Ion verursacht. Die dazugehörige unterphosphorige Säure wird beim Redoxprozeß in einem ersten Schritt zur phosphorigen Säure oxidiert:



Die gebildete phosphorige Säure besitzt ebenfalls ein Reduktionspotential und kann weiter zu Phosphorsäure oxidiert werden:



Zur Prüfung der Wirkung des Hypophosphit-Ions beim Extraktionsprozeß der WSP, wurde ein Versuch unter zum Extraktionsprozeß vergleichbaren Bedingungen (vgl. Abschnitt 4.6) im Labormaßstab durchgeführt.

5.2.1 Versuchsdurchführung

Als Ausgangsmaterial diente das bei der Aufarbeitung der Zellmasse im Versuch 21 (Transformant F; HMW-1Dy10- und LMW-a3-Expression) erhaltene Präzipitat aus dem Fällungsschritt (vgl. Abschnitt 4.5).

Eine äquivalente Menge des Präzipitates, welche einer Erntehefemenge von 0,5 kg entsprach, wurde in 1 L 50 %igen wäßrigem 2-Propanol suspendiert, woraus sich eine Gesamtmenge von 1,5 L Suspension mit ca. 40 Vol% 2-Propanol ergab. Von dieser Suspension wurden jeweils 0,375 L (Äquivalent von 0,125 kg Erntehefe) in drei Erlenmeyerkolben mit 0,8 L Fassungsvermögen übergeführt. Mit diesen Mengen wurden drei Parallelversuche unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt:

1. ein Nullversuch ohne Zusatz eines Reduktionsmittels
2. ein Kontrollversuch mit Zusatz von 2-Mercaptoethanol
3. ein Versuch mit Zusatz von Natriumhypophosphit-Monohydrat

Die zugesetzten Mengen an Reduktionsmitteln entsprachen der im Technikumsmaßstab verwendeten Mercaptoethanolmenge von 0,358 mol/kg Erntehefe, d.h. es wurde dem Kontrollversuch 3,5 g 2-Mercaptoethanol und dem Hypophosphitversuch 4,75 g Natriumhypophosphit-Monohydrat zugesetzt.

Nach erfolgter Zugabe der Reduktionsmittel wurde bei allen drei Ansätzen durch Zugabe von Triethanolamin-Base ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Im Anschluß wurden die Reaktionsmischungen für 60 min im Wasserbad geschüttelt.

Eine weitere Fragestellung, die es in diesem Versuch zu klären galt, war die Frage, ob es durch eine pH-Wertabsenkung am Ende des Extraktionsprozesses möglich wäre, den Gehalt an Hefeproteinen im propanolischen Extrakt zu verringern. Somit könnte eine höhere Reinheit des WSP-Rohpräparates erreicht werden.

Nach der Abkühlung der Reaktionsgemische wurde die weitere Versuchsdurchführung deshalb wie folgt gestaltet:

- Zentrifugation einer Teilmenge der Reaktionsgemische und Probenahme vom klaren Überstand = Probe pH 8
- pH-Wertabsenkung durch Zugabe von 85 %iger Phosphorsäure zum restlichen Reaktionsgemisch auf pH 7,0

- Zentrifugation einer Teilmenge der Reaktionsgemische und Probenahme vom klaren Überstand = Probe pH 7
- pH-Wertabsenkung durch Zugabe von 85 %iger Phosphorsäure zum restlichen Reaktionsgemisch auf pH 6,0
- Zentrifugation einer Teilmenge der Reaktionsgemische und Probenahme vom klaren Überstand = Probe pH 6

Die Proben wurden zur Analyse des Gesamtproteingehalts und des Gesamt-WSP-Gehalts der AG Stahl/ Hinzmann übergeben.

5.2.2 Ergebnisse

Von den Proben wurden SDS-PAGE-Analysen durchgeführt. Der Gesamt-WSP-Gehalt der Proben wurde indirekt durch eine bildanalytische Verarbeitung der SDS-PAGE-Analysen ermittelt und als Netto-Intensität dargestellt. Diese Größe verhält sich proportional zum WSP-Gehalt und konnte somit als Maß für diesen interpretiert werden.

Der Gesamtproteingehalt wurde nach einer adaptierten Methode der Proteinbestimmung nach BRADFORD [87] bestimmt.

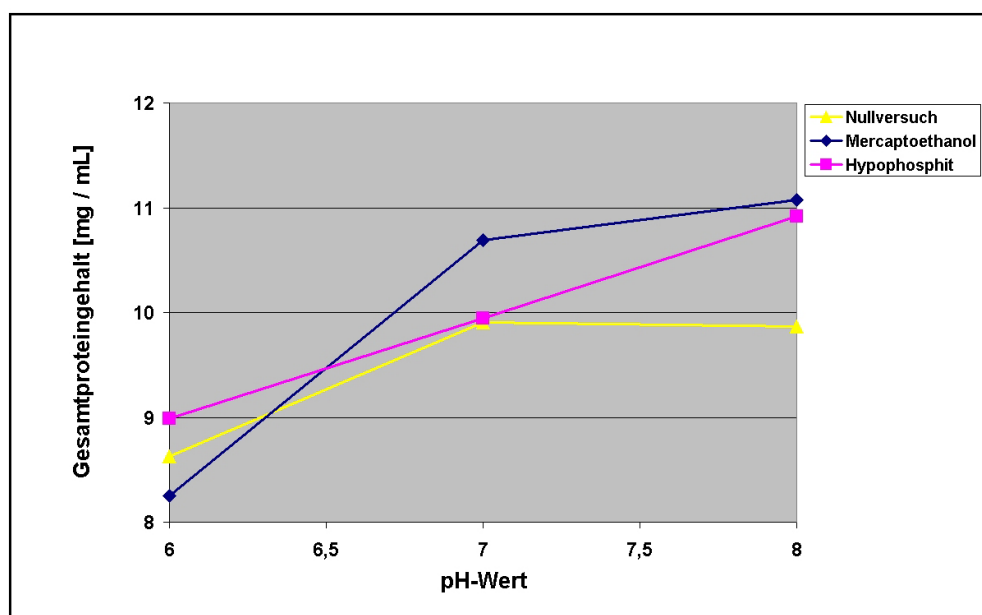


Abb. 59: Gesamtproteingehalt im Verlauf der pH-Wertabsenkung

Am Ende des Extraktionsprozesses (pH 8,0) stellte sich der Gesamtproteingehalt im Extraktionsüberstand des Nullversuchs im Vergleich zum Kontroll- und Hypophosphitversuch um ca. 1 mg/mL verringert dar. Durch die nachfolgende pH-Wertabsenkung auf pH 6,0 verringerte sich der Gesamtproteingehalt in den Extraktionsüberständen aller drei Versuchsreihen auf vergleichbar große Werte zwischen 8,2 und 9,0 mg Gesamtprotein/mL (Abb. 59).

Die gemessene Netto-Intensität im Extraktionsüberstand am Ende des Extraktionsprozesses des Hypophosphitversuchs war mit 360.000 kleiner als die des Null- und Kontrollversuches mit 393.000 bzw. 440.000. Mit abnehmendem pH-Wert des Extraktionsgemisches war eine stetige Zunahme der Netto-Intensität beim Kontroll- und Hypophosphitversuch zu verzeichnen, die beim Hypophosphitversuch am größten ausfiel (360.000 bei pH 8,0; 515.000 bei pH 6). Dabei wurde bei pH 6,0 das Niveau der Netto-Intensität des Kontrollversuchs von 531.000 erreicht (Abb. 60). Beim Nullversuch wurde durch die pH-Wertabsenkung nur eine vergleichsweise geringe Zunahme der Netto-Intensität im Extraktionsüberstand beobachtet.

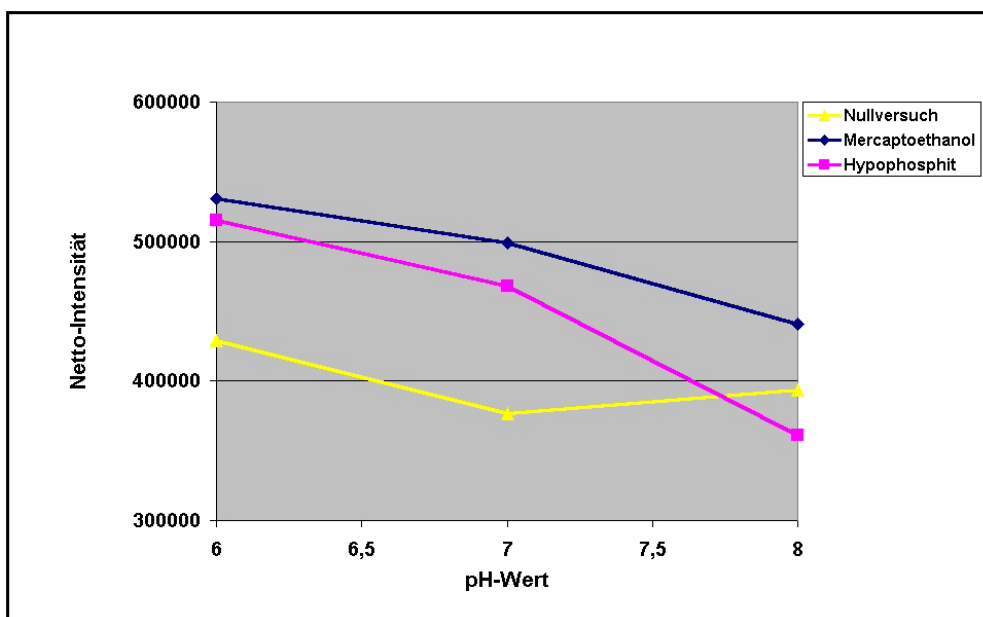


Abb. 60: Netto-Intensität im Verlauf der pH-Wertabsenkung

Eine Begründung für dieses Verhalten der WSP im Hypophosphitversuch könnte im Salzcharakter des Natriumhypophosphites selbst liegen. Dieser führte während des Extraktionsprozesses zu einem Aussalzeffekt, der sich wiederum besonders deutlich auf die WSP-Fraktion der gesamten löslichen Proteine auswirkte. Somit lagen am

Ende des Extraktionsprozesses reduzierte WSP teilweise als Präzipitat im Extraktionsgemisch vor. Durch die pH-Wertabsenkung nach pH 6,0 und der damit verbundenen Ausfällung von Hefeproteinen (Abb. 59) erhöhte sich die Lösungskapazität des Lösungsmittels für die WSP. Die als Präzipitat im Extraktionsgemisch vorliegenden WSP wurden somit in der liquiden Phase des Extraktionsgemisches gelöst, weshalb sich der WSP-Gehalt im Extraktionsüberstand erhöhte.

Dieser Effekt wurde bei der pH-Wertabsenkung im Nullversuch nicht beobachtet. Da beim Nullversuch kein Reduktionsmittel vorhanden war, wurden deutlich weniger WSP aus der Zellmasse reduziert und somit in eine lösliche Form überführt.

5.2.3 Versuch im Technikumsmaßstab

Bei der Extraktion der WSP aus der Hefebiomasse des Versuchs Nr. 26 wurde das Reduktionsmittel Mercaptoethanol durch 26,5 g Natriumhypophosphit Monohydrat pro Kilogramm Erntegewicht der Hefe ersetzt. Nach der pH-Wertkorrektur durch Zugabe von Triethanolamin-Base auf pH 7,8 erfolgte der zweistündige Extraktionsprozeß bei 60°C. Am Ende des Extraktionsprozesses wurde zusätzlich eine pH-Wertabsenkung auf pH 6,4 durch Zugabe von Phosphorsäure durchgeführt. Alle anderen Prozeßparameter blieben identisch zu den Extraktionsversuchen mit Mercaptoethanol.

Die Wirkung der veränderten Extraktionsbedingungen beim Versuch 26 (Reduktionsmittel, pH-Verschiebung) zeigte sich, im Vergleich zu den Versuchen 25 und 27 mit dem gleichen Transformanten, in einem doppelten Gehalt an HMW-1Dy10-Untereinheiten im Rohpräparat bei vergleichbar hohem Ertrag an WSP-Untereinheiten (vgl. Tab. 52).

Dieses Ergebnis sprach für die Wirksamkeit des verwendeten Reduktionsmittels als Substitut für 2-Mercaptoethanol. Gleichzeitig konnte durch die pH-Wertabsenkung die Reinheit des so hergestellten WSP-Rohpräparates deutlich erhöht werden.

6 Zusammenfassung

Ziel des Teilprojektes war die Produktion von möglichst hochangereicherten WSP-haltigen Präparaten aus der Zellmasse von Hefetransformanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* im Technikumsmaßstab. Die erhaltenen WSP-Präparate sollten auf ihre backtechnische Funktionalität geprüft und für Toxizitätstest zur Verfügung gestellt werden.

Der erste Produktionsschritt war die Propagation der Hefetransformanten im Fermenter. Der Propagationsprozeß wurde in zwei aufeinanderfolgende Teilprozesse gegliedert: Der erste Teilprozeß wurde als Batch-Verfahren durchgeführt, bei dem die gesamte Menge des vorab hergeführten Inokulums mit der im Fermenter vorgelegten Menge an steriler Substratlösung versetzt wurde. Das gesamte Volumen des Batches wurde für 24 Stunden bei konstanter Temperatur, Luftzufuhr, Rührwerksdrehzahl und bei konstantem pH-Wert inkubiert. Der nachfolgende zweite Teilprozeß wurde als Fed-Batch-Verfahren mit dem Ziel durchgeführt, durch eine definierte Zuführung steriler Substratlösung, das maximale Nutzvolumen des Fermenters in möglichst kurzer Zeit zu erreichen.

Zu Beginn der Arbeiten wurden die Propagationen in einer bereits in einem früheren Projekt entwickelten und für das Verfahren modifizierten Fermentationsanlage durchgeführt. Die Fortführung der Propagationsarbeit erfolgte mit einem neu angeschafften Fermenter (Typ P, Bioengineering AG, 100 L Nutzvolumen). Die Beschaffung dieser Propagationsanlage wurde notwendig, da sich deutliche Mängel an der bestehenden Propagationsanlage bemerkbar machten. Grund hierfür waren bauliche Mängel der Eigenkonstruktion. Dadurch war es kaum möglich, konstante und reproduzierbare Verhältnisse zu schaffen, die für die weitere Optimierung des Vermehrungsprozesses dringend notwendig waren. Zudem begrenzte das geringe Nutzvolumen von 50 Liter sowie eine ungenügende Sauerstoffversorgung durch erwähnte Konstruktionsmängel die Hefeerntemenge auf ca. 1 kg Trockensubstanz pro Propagationsversuch. Durch die Propagation in der neuen Fermenteranlage konnte die Hefeerntemenge unter sicheren und reproduzierbaren Verfahrensbedingungen auf ca. 4 kg Trockensubstanz pro Propagationsversuch im Mittelwert erhöht werden.

Insgesamt wurden 29 Propagationen mit acht verschiedenen Hefetransformanten sowie mit Bäckerhefe durchgeführt. Zur Bewertung der mit den transgenen Hefen erzielten Vermehrungsergebnisse wurde ein Transformant vermehrt, welcher lediglich ein Kontrollplasmid enthielt, also keine WSP exprimierte. Dieser Kontrolltransformant stellte die gleichen Nährstoffansprüche an das Substrat wie die anderen sieben Transformanten, die keinen Bedarf an Leucin und Uracil haben. Ziel dieser Propagation war es zu prüfen, ob die WSP-Produktion der Transformanten eine Belastung für die Zellvermehrung dieser Hefen darstellte. Ebenfalls wurde ein Stamm der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* Typ 2.200 mit dem Ziel vermehrt, die aus den Versuchen mit den Transformanten erhaltenen Eckdaten der Zellvermehrung mit denen einer Propagation konventioneller Bäckerhefe zu vergleichen. Die Ergebnisse zeigten, daß während der Fed-Batch-Phase eine deutlich höhere mittlere spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Bäckerhefe mit $2,1 \text{ kg}/(\text{m}^3\text{h})$ und des Kontrolltransformanten mit $2,3 \text{ kg}/(\text{m}^3\text{h})$ gegenüber den WSP-exprimierenden Transformanten vorhanden war, die im Mittelwert nur eine Wachstumsgeschwindigkeit von ca. $1 \text{ kg}/(\text{m}^3\text{h})$ erreichte. Somit bestätigte sich die Annahme, daß die zusätzliche WSP-Produktion der Transformanten die Zellvermehrung hemmte.

Der Ertragskoeffizient der Bäckerhefe (BH 2.200) war während der Fed-Batch-Phase mit $0,57 \text{ kg Hefetrockensubstanz /kg Saccharose}$ größer als der der Transformanten. Der Mittelwert des Ertragskoeffizienten für die Propagationen mit den WSP-exprimierenden Transformanten und dem Kontrolltransformanten von ca. $0,5 \text{ kg Hefetrockensubstanz /kg Saccharose}$ war jedoch nur wenig kleiner als der Ertragskoeffizient der Bäckerhefe. Folglich wurde bei den Propagationen der Transformanten während der Fed-Batch-Phase eine annähernd optimale Zuckerumsetzung zu Hefebiomasse erreicht. Die deutlich niedrigeren Werte für den erreichten Ertragskoeffizienten der Propagationen im Eigenbau-Fermenter zu Beginn der Arbeiten von ca. $0,3 \text{ kg Hefetrockensubstanz /kg Saccharose}$ waren auf die unzureichenden Propagationsbedingungen in dieser Anlage zurückzuführen.

Nach beendeter Propagation wurde die Hefezellmasse aus der Fermentationslösung in einem zweistufigen Trennprozeß (Separator → Becherzentrifuge) erhalten. Die Hefeernte aus der Fermentationsflüssigkeit erfolgte durch Separation mit einem selbstaustragenden Tellerseparator. Dabei wurden die Hefezellen so effizient separiert, daß in der Flüssigphase nur noch eine Zellkonzentration von $\leq 1 \cdot 10^5 \text{ Zellen/mL}$

gefunden wurde. Mit den oben genannten Prozeßparametern wurde eine erste Anreicherung der Zellmasse aus der Fermentationsflüssigkeit um den Faktor $\cong 3$ erreicht, d.h. das Gesamtvolumen der Fermentationsflüssigkeit wurde auf ca. 1/3 des Fermenterinhaltess verringert. Danach war die erhaltene feststoffreiche Phase noch so dünnflüssig, daß diese mit minimalen Verlusten aus dem Separator ausgetragen wurde. Der Trockensubstanzgehalt der feststoffreichen Phase bewegte sich im Bereich von 10,4 bis 14,9 %.

Im Anschluß wurde die weitere Aufkonzentrierung der Hefebiomasse in einer Becherzentrifuge mit 2,5 Liter Fassungsvermögen durchgeführt. Dabei war eine Zentrifugationszeit von 5 min bei 5000 min^{-1} ausreichend (entspr. $5500 \cdot g$ am maximalen Radius), um die Zellmasse als pastöses Pellet zu erhalten. Auch hierbei war der Trenneffekt so effizient, daß in der Flüssigphase nur noch eine Zellkonzentration von $\leq 1 \cdot 10^5$ Zellen/mL gefunden wurde. Der Trockensubstanzgehalt der so erhaltenen Erntehefen betrug im Mittelwert ca. 25 %. Der Proteingehalt der Erntehefen bewegte sich, mit einer Ausnahme, zwischen 43,2 % und 49,7 %. In diesem Teilprozeß wurden insgesamt 28,6 % der Trockenmasse der Fermentationslösung mit den Flüssigphasen der Separation und der Zentrifugation aus dem Produktstrom als Nebenfraktion ausgetragen.

Die in den transgenen Hefezellen exprimierten WSP sind intrazellulär über Disulfidbindungen im Zellinneren verankert. Die zuvor in Pufferlösung suspendierte Erntehefe mußte deshalb in einer Kugelmühle aufgeschlossen werden, um die WSP extrahieren zu können. Nach dem ersten Durchlauf der gesamten Hefesuspension wurde ein Zellaufschlußgrad von ca. 60 % erreicht. Im Anschluß wurde dieser Prozeß wiederholt. Es wurde nach den zwei Durchläufen ein Zellaufschlußgrad von $\geq 90\%$ erreicht.

Im anschließenden Teilprozeß wurde die aufgeschlossene Zellmasse durch Zugabe von 2-Propanol einer Fällung unterzogen. Die 2-Propanolzugabe führte zur Koagulation und anschließender Präzipitation einer unlöslichen WSP-haltigen Fraktion, die sich im wesentlichen aus koagulierten Proteinen und unlöslichen Zellfragmenten (hauptsächlich Zellwandbestandteilen) zusammensetzte. Niedermolekulare Hefepro-

teine und andere lösliche Zellinhaltsstoffe verblieben in der liquiden Phase des Gemisches, in welcher Trockensubstanzgehalte von 2,4-3,4 % ermittelt wurden. Durch diesen Fällungsschritt wurden bei der nachfolgenden Zentrifugation die in Lösung gebliebenen Zellinhaltsstoffe aus dem Produktstrom mit der flüssigen Phase entfernt. Dabei wurden durchschnittlich 12,5 % der Trockenmasse der Erntehefe mit der Flüssigphase der Zentrifugation aus dem Produktstrom als Nebenfraktion ausgetragen.

Danach erfolgte die Extraktion der WSP aus der gefällten Zellmasse durch Reduktion der Disulfidbindungen und Lösen der Glutenine in wäßrigem 2-Propanol. Erst nach diesem Reduktionsprozeß und der damit einhergehenden Freisetzung der WSP war deren Löslichkeit im Lösungsmittel möglich. Der Lösungs- und Extraktionsprozeß erfolgte in einem geschlossenen Kreislauf für 2 h bei 60°C. Die Extraktionsmischung wurde anschließend zentrifugiert, wobei die unlöslich gebliebene Zellmasse abgetrennt wurde. Diese machte durchschnittlich 65,7 % der Trockenmasse der im vorhergehenden Teilprozeß gefällten, unlöslichen WSP-haltigen Fraktion aus und wurde als Feststoffphase (Nebenfraktion) der Zentrifugation aus dem Produktstrom ausgetragen. Der Trockensubstanzgehalt des WSP-haltigen Extraktionsüberstandes (Flüssigphase) bewegte sich im Bereich von 1,5 bis 2,7 %, womit praktisch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Transformanten zu erkennen waren.

Der WSP-haltige Extraktionsüberstand aus dem Extraktionsprozeß wurde in einem Proteinfällungsverfahren weiterverarbeitet. Dieses Prozeß zielte darauf, die WSP möglichst vollständig zu präzipitieren, um sie in einer Fraktion anzureichern. Die gelösten WSP wurden unter Ausnutzen ihrer spezifischen Löslichkeitseigenschaften durch Präzipitation bei hoher 2-Propanolkonzentration oder durch Zugabe von Ammoniumsulfat aufkonzentriert und durch Gefriertrocknen als Trockenpräparate gewonnen.

Beim Präzipitationsverfahren durch Erhöhung der 2-Propanolkonzentration im Extraktionsüberstand wurde durch die Zugabe von 100%igen 2-Propanol angestrebt, eine Präzipitationskonzentration von 80-85 Vol% einzustellen. Die unter dieser Bedingung ermittelte spezifische Menge an WSP-haltigen Rohpräparat hing deutlich vom jeweils aufgearbeiteten Transformanten ab. Bei einer Präzipitationskonzentration

on unterhalb von 80 Vol% verringerte sich die spezifische Rohpräparatmenge bei sonst identischen Bedingungen deutlich.

Ein wesentlicher Nachteil dieses Präzipitationsverfahrens bestand in der Handhabung der großen Alkoholmengen die benötigt wurden, um den 30 bis 40 Vol% 2-Propanol enthaltenden Extraktionsüberstand auf ≥ 80 Vol% 2-Propanol aufzukonzentrieren. Dieser arbeitstechnische Nachteil stellte außerdem ein sicherheitstechnisches Risiko und auch einen erheblichen Kostenfaktor für die Gewinnung des WSP-Rohpräparats dar. Dieser risikobehaftete Nachteil konnte weder auf Dauer der Projektdurchführung getragen werden, noch würde er für die Umsetzung des Pilotmaßstabes in den technischen Maßstab angenommen werden können. Es mußte deshalb versucht werden, den Nachteil durch die Entwicklung eines für die WSP-Rohpräparatgewinnung geeigneten Verfahrens zu überwinden. Es wurde deshalb ein Präzipitationsverfahren entwickelt, das im kleineren Volumenmaßstab realisierbar war und ohne weiteren Verbrauch an 2-Propanol durchgeführt werden konnte.

Die Verfahrensentwicklung gründete auf die gemachte Beobachtung, daß Mischungen aus 2-Propanol und Wasser durch die Zugabe von Ammoniumsulfat in zwei Phasen getrennt werden können, die sich so in der Dichte unterscheiden, daß darin präzipitierendes WSP auf der schwereren Phase aufschwimmen und in der leichteren absinken kann. Es ergaben sich deshalb drei Phasen unterschiedlicher Zusammensetzung, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch Dekantation voneinander getrennt werden konnten.

Beim Präzipitationsverfahren durch Zugabe von Ammoniumsulfat konnte kaum ein Einfluß auf die spezifische Rohpräparatmenge in Abhängigkeit der AMS-Konzentration sowie des Hefetransformanten beobachtet werden. Dies lag einerseits an den konstanten Versuchsbedingungen, die geringe Varianzen in den Phaseigenschaften (Dichte der propanolreichen Ober- und Dichte der AMS-reichen Unterphase) zuließen sowie an dem variierenden Ammoniumsulfatgehalt des gefriergetrockneten Rohpräparats, der sich je nach Intensität des Waschvorgangs mit der 5 bis 10fachen Menge Wasser nach dem Präzipitationsschritt zwischen 2-43 % bewegte. Durch den schwankenden Ammoniumsulfatgehalt in den Rohpräparaten zeigte auch deren Proteingehalt eine große Streuung von 39,7 bis 91,0 %. Diese Bandbreite ging erheblich zurück, wenn der Ammoniumsulfatgehalt vom WSP-Rohpräparat rechnerisch abgezogen wurde. Nach dieser Korrekturrechnung ergab

sich eine Bandbreite für den Proteingehalt der WSP-Rohpräparate, die offenbar in einer gewissen Abhängigkeit vom Transformanten stand. Beim Präzipitationsschritt wurden durchschnittlich 4,7 % der Trockenmasse des WSP-haltigen Extraktionsüberstand als Trockenmasse im lyophilisierten WSP-Rohpräparat erhalten.

Die Bestimmung des WSP-Gehalts in den WSP-Rohpräparaten ermöglichte es schließlich, den Ertrag an den einzelnen WSP unter den Arbeitsbedingungen mit den Hefetransformanten zu ermitteln. Aus den auf der Hefeproteinmenge basierenden Ertragskennzahlen geht hervor, daß von den Transformanten ein starker Einfluß auf den Ertrag an den jeweiligen WSP ausging.

Zu Beginn der Projektdurchführung wurde nur ein sehr niedriger Ertrag von durchschnittlich 0,3 g HMW-1Dx5-Untereinheiten pro kg Hefeprotein erhalten. Der AG Stahl/Hinzmann gelang es im Verlaufe der Projektdurchführung Transformanten herzustellen, die eine wesentlich höhere Expressionsrate als die zuerst eingesetzten Transformanten besaßen, so daß der mittlere Ertrag an WSP auf 3,9 g HMW-1Dx5-Untereinheiten bzw. 2,3 g LMW-a3-Untereinheiten pro kg Hefeprotein erhöht werden konnte. Einen weiteren Fortschritt stellten die Transformanten dar, die in der Lage waren HMW-1Dx5- und HMW-1Dy10-Untereinheiten bzw. HMW-1Dy10- und LMW-a3-Untereinheiten gleichzeitig zu exprimieren. Dadurch konnte der Ertrag an WSP-Untereinheiten noch einmal deutlich gesteigert werden, im Einzelfall bis zu 12,2 g pro kg Hefeprotein.

Anhand der in Form von Rohpräparaten erhaltenen WSP-Menge wurde, als Kennzahl zur Beschreibung des Aufwand/Nutzen-Verhältnisses bei der Erzeugung der WSP im Propagationsprozeß, der Produktausbeutekoeffizient errechnet. Dieser beschreibt den Quotienten aus der erhaltenen WSP-Menge und der dafür benötigten Zuckermenge als Komponente des Substrates (Saccharose) während der gesamten Propagation (Inokulumanzucht, Batch- und Fedbatchphase). Der Aufwand für die Erzeugung der exprimierten WSP war beträchtlich. Selbst für die Transformanten mit starker Expression (Ertrag an WSP-Untereinheiten ≥ 4 g WSP/kg Hefeprotein) betrug der Produktausbeutekoeffizient lediglich 0,8-2,3 g WSP/ kg Saccharose.

Der nächste Schritt in diesem Projekt bestand darin, die transgen erzeugten WSP auf ihre funktionellen Eigenschaften hin zu untersuchen. Diese Eigenschaften bestimmen letztendlich die Verwertbarkeit solcher Proteine für die Herstellung von Backwaren. Die Funktionalitätsprüfung erfolgte in zwei Stufen.

In der ersten ging es zunächst darum, ein geeignetes Verfahren zur weiteren Anreicherung der WSP aus den WSP-Rohpräparaten zu entwickeln. Es wurde ein Verfahren entwickelt, welches sich durch hohe Reproduzierbarkeit auszeichnet und universell zur Anreicherung aller WSP-Rohpräparate angewandt werden konnte. Als Methode zur Anreicherung der WSP aus den Rohpräparaten wurde deren hohes Löslichkeitsprodukt bei tiefen pH-Werten genutzt. Im ersten Schritt des Verfahrens wurden zunächst wasserlösliche Stoffe aus den Rohpräparaten entfernt und anschließend die WSP in einem Lösungsmittel extrahiert. Der zweite Schritt bestand aus der Präzipitation der durch Extraktion in Lösung gebrachten WSP und der anschließenden Präparation zum hochkonzentrierten Trockenpräparat. Mit diesem Anreicherungsverfahren wurden hochangereicherte WSP-Präparate hergestellt, im Einzelfall mit bis zu 68 % HMW-1Dx5-Untereinheiten. Der Anreicherungsfaktor an Gesamt-WSP-Gehalt bewegte sich im Bereich von 1,2-2,6. Diese angereicherten WSP-Präparate stellten gleichzeitig das Ausgangsmaterial für weitere Funktionalitätsprüfungen dar.

In der zweiten Stufe wurden dann die erzeugten WSP zur Einsparung des wertvollen Materials in Mikroversuchen auf ihre funktionellen Eigenschaften hin geprüft. Das grundsätzliche Ziel der Versuche bestand darin herauszufinden, ob die erzeugten WSP funktionelle Eigenschaften aufweisen, die denen der auf natürlichem Wege synthetisierten Glutenine in Weizen gleichen.

Für die durchgeführten Backversuche wurde der Weg beschritten einem Handelsmehl den Kleber durch Auswaschen eines Teigs zu entziehen und alle Bestandteile des Mehl (ohne Kleber) durch Gefriertrocknen in ein Pulver zu verwandeln. Diesem Pulver wurden anschließend die angereicherten WSP-Präparate zugesetzt.

Anhand der hergestellten Gebäcke ließ sich eine Korrelation zwischen Gesamtgehalt an WSP im angereicherten WSP-Präparat und dem erreichten Gebäckvolumen erkennen. Die Gebäcke aus den Präparaten mit einem niedrigen Gehalt an WSP-Untereinheiten ($\leq 12\%$) fielen signifikant kleiner aus als diejenigen der übrigen Präparate mit höherem WSP-Gehalt. Bei Verwendung von Präparaten mit einem WSP-

Gehalt von ≥ 37 %, war mit steigender Konzentration keine weitere Volumenzunahme mehr zu beobachten. Im Gegenteil, das größte Volumen erreichten nicht die Gebäcke aus angereicherten WSP-Präparaten mit 47 % WSP-Gehalt sondern das Gebäck aus einem Präparat, welches einen WSP-Gehalt von 37 % aufwies. Durch diese Ergebnisse wurde jedoch deutlich, daß das erreichte Gebäckvolumen als einziges Kriterium zur eindeutigen Differenzierung der funktionellen Eigenschaften der WSP-Präparate nicht ausreichte. Bei der Betrachtung der Form und Struktur der Gebäcke wurde mit steigender Konzentration an HMW-1Dx5-Untereinheiten in den angereicherten WSP-Präparaten ein positiver Einfluß beobachtet. Das Gebäck aus einem angereicherten WSP-Präparat mit 8 % HMW-1Dx5-Gehalt hatte noch eine flache Form und eine sehr kompakte Krume mit kaum ausgeprägter Porung. Im Gegensatz dazu besaß das Gebäck aus einem angereicherten WSP-Präparat mit 27 % HMW-1Dx5-Gehalt eine fast idealtypische Form. Auch die Porung wies eine gleichmäßige Struktur auf. Im Ofen hob sich das Gebäck leicht von der Unterlage ab. Beim Gebäck mit dem höchsten Gluteningehalt durch den Zusatz eines angereicherten WSP-Präparats mit 47 % HMW-1Dx5-Gehalt verschlechterten sich sowohl die Gebäckform und -struktur wie auch das Volumen. Die Teig- und Gebäckoberflächen waren uneben. Ebenfalls enthielt die Krume nicht gelockerte, harte Einschlüsse, bei denen es sich vermutlich um nicht ausreichend hydratisierte Kleberaggregate handelte. Bei der Teigbereitung hatten sich diese möglicherweise aufgrund der hohen Menge an kohäsivem Kleberprotein gebildet.

Der Backversuch mit einem angereicherten WSP-Präparat mit gemischten Glutenin-Untereinheiten (33,2 % HMW-1Dx5 + 9,8 % HMW-1Dy10) zeigte eine gut gelockerte, sehr feinporige Krume. Die Gebäckform und Krumenstruktur zeigte bei diesem Versuch, daß der Teig weniger viskoelastisch als der des Backversuches mit dem Präparat mit 47 % HMW-1Dx5-Gehalt war, obwohl der Gesamt-WSP-Gehalt im Präparat identisch und ebenfalls sehr hoch war. Die zuvor beschriebenen Einschlüsse beim Backversuch mit dem Präparat mit 47 % HMW-1Dx5-Gehalt zeigten sich bei diesem Versuch nicht. Alle diese Beobachtungen ließen auf eine bessere Verarbeitbarkeit der Mischung von Untereinheiten im verwendeten WSP-Präparat schließen.

Von den angereicherten WSP-Präparaten und von Trockenkleber (Kontrolle) wurden Extensogramme aufgenommen und der maximale Dehnwiderstand, die Dehnbarkeit

am Maximum und die Fläche unter der Kurve als Maß für die zur Dehnung des Klebers aufzuwendende Energie bestimmt.

Aufgrund der unzureichenden Kohäsivität der angereicherten WSP-Präparate mit einem WSP-Gehalt von ≤ 12 % waren Messungen an diesen Präparaten nicht durchführbar. Aus den Ergebnissen der Zugversuche mit den HMW-1Dx5-Präparaten wurde bei abnehmenden WSP-Gehalt im Präparat eine Abnahme der Dehnbarkeit erkennbar.

Trotz des hohen Gesamt-WSP-Gehalts im angereicherten WSP-Präparat mit gemischten Glutenin-Untereinheiten (33,2 % HMW-1Dx5 + 9,8 % HMW-1Dy10) von 47,0 % wurden beim Zugversuch mit diesem Präparat ein deutlich geringerer Dehnwiderstand und eine geringere Dehnbarkeit als bei den Versuchen mit HMW-1Dx5-Präparaten mit 47 % und 27 % Gesamt-WSP ermittelt. Als Ursache hierfür kann der Gehalt von 9,8 % HMW-1Dy10-Untereinheiten in diesem Mischpräparat angesehen werden. Vermutlich kam es hier durch die Kombination von HMW-1Dx5- und HMW-1Dy10-Untereinheiten sogar zu einer Abschwächung der funktionellen WSP-Eigenschaften.

Ebenfalls zeigten die Ergebnisse eines LMW-a3-haltigen Präparates, daß sich die Wirkung der LMW-Untereinheiten wesentlich von der der HMW-Untereinheiten unterschied. Folglich war neben Gesamt-WSP-Gehalt auch die Art der enthaltenen Glutenin-Untereinheiten für die funktionellen Eigenschaften der Präparate von entscheidender Bedeutung.

Besonders auffällig war der mit 2,5 N enorm hohe Dehnwiderstand vom Präparat mit 47 % HMW-1Dx5-Gehalt. Dieser Wert war dreimal höher als der Dehnwiderstand des aus Weizenmehl gewonnenen Trockenklebers. Demgegenüber besaß der Trockenkleber mit 5 cm eine um 0,5 cm größere Dehnbarkeit. Der große Dehnwiderstand war demzufolge auch die Ursache dafür, daß das Gebäck aus diesem Präparat kein größeres Volumen erreichte. Wie oben beschrieben, ließen dies die kompakten Strukturen nicht zu.

Als Nebenergebnis der Arbeit wurden Versuche unternommen aus einer Nebenfraktion der Hefezellmasseaufarbeitung ein Produkt mit ernährungsphysiologisch wertvollen Eigenschaften zu gewinnen. Durch den Gehalt an Zellwandmaterial und der Möglichkeit dieses Fraktionieren zu können, um einzelne Stoffgruppen wie Man-

noprotein und Glucan daraus anzureichern, erschien die Nebenfraktion aus dem Extraktionsprozeß für weitere Versuche am besten geeignet zu sein. Durch eine enzymatische Abreicherung von Protein aus dieser Nebenfraktion wurde ein Produkt mit 19 % Protein (in TS) erhalten. Somit konnte der Proteingehalt in der Nebenfraktion auf ein Drittel des Ausgangsproteingehaltes reduziert und Zellwandbestandteile angereichert werden. Mit diesem Produkt wurde ein Versuch zur weiteren Anreicherung von Mannan unternommen sowie ein Backversuch durchgeführt.

Durch einen aufeinanderfolgenden Lösungs- Trenn- und Präzipitationsprozeß konnte ein mannanreiches Präparat hergestellt werden. Im Produktstrom des Anreicherungsverfahrens wurde der Anteil an Mannose im Gesamt-Monosaccharid-Gehalt deutlich erhöht. Er lag zu Beginn im sprühgetrockneten Nebenprodukt bei 27,2 % . Das mannanhaltige Präzipitat hatte einen Mannoseanteil von 64,2 % bezogen auf die gefundene Menge an Gesamt-Monosacchariden.

Mit dem zellwandmaterialhaltigen Nebenprodukt wurde ein Backversuch durchgeführt. Es wurden Brötchen nach dem Standardrezept hergestellt. Teile des Mehls wurden durch das Nebenprodukt ersetzt. Ziel war es, den Einfluß dieses ernährungsphysiologisch wertvollen Produktes auf die Backeigenschaften und damit die Auswirkung auf die Gebäckqualität zu überprüfen. Es wurden drei Brötchen hergestellt. Ein Standardbrötchen ohne Zusatz des Nebenproduktes sowie zwei Brötchen, wobei jeweils 5 bzw. 10 % des Mehls durch das zellwandmaterialhaltige Nebenprodukt ersetzt wurden. Bei der Teigherstellung wurde beobachtet, daß der Teig, in dem 10 % des Mehls durch das Produkt ersetzt wurden, sehr klebrig war und weniger stark aufging. Der Teig bei dem 5 % des Mehls durch das Produkt ersetzt wurden, verhielt sich vergleichbar zum Teig des Standardbrötchens. Ebenso wurde beobachtet, daß durch die Zugabe des sprühgetrockneten Nebenprodukts die Qualität des Brötchens beeinflußt wurde. Durch die Zugabe von 5 % des Nebenprodukts zum Weizenmehl wurde ein Brötchen von guter, mit dem Standardbrötchen vergleichbarer Qualität mit homogener Porenstruktur, Krume und Kruste erhalten. Bei Zugabe von 10 % war die Qualität deutlich vermindert.

Als weiteres Nebenergebnis wurde ein Ersatzstoff für Mercaptoethanol gefunden. Bei der Aufarbeitung der Biomasse der Hefetransformanten wurde ein Extraktionsprozeß der WSP aus der zuvor gefällten Zellmasse durchgeführt. Die Extraktion erfolgte bei gleichzeitiger Reduktion der Disulfidbindungen zwischen WSP und der Zellmasse in

wäßrigem 2-Propanol. Dazu war ein Zusatz von 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel zum Extraktionsgemisch notwendig. 2-Mercaptoethanol ist jedoch ein Gefahrstoff und besitzt zudem selbst in größerer Verdünnung einen durchdringenden, fäkalartigen Geruch.

Mit dem Ziel, ein nichttoxisches und sensorisch akzeptables Reduktionsmittel zu finden, wurden Vorversuche mit verschiedenen potentiellen Substanzen durchgeführt. Hierbei stellte sich die Substanz Natriumhypophosphit (NaH_2PO_2) als möglicher Ersatzstoff heraus. Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, daß es möglich ist durch eine zusätzliche pH-Wertabsenkung am Ende des Extraktionsprozesses einen vergleichbar großen WSP-Gehalt im Extraktionsüberstand wie bei der Verwendung von Mercaptoethanol zu erhalten. Dieses Ergebnis bestätigte sich beim Versuch im Technikumsmaßstab. Die Wirkung der veränderten Extraktionsbedingungen bei diesem Versuch (Reduktionsmittel, pH-Verschiebung) zeigte sich, im Vergleich zu den Versuchen mit Mercaptoethanol mit dem gleichen Transformanten, in einem doppelten Gehalt an HMW-1Dy10-Untereinheiten im Rohpräparat bei vergleichbar hohem Ertrag an WSP-Untereinheiten. Dieses Ergebnis sprach für die Wirksamkeit des verwendeten Reduktionsmittels als Substitut für 2-Mercaptoethanol. Gleichzeitig konnte durch die pH-Wertabsenkung die Reinheit des so hergestellten WSP-Rohpräparates deutlich erhöht werden.

7 Literatur

- [1] Pschyrembel, W. (Herausgeber): Klinisches Wörterbuch. Verlag Walter de Gruyter Berlin, 259. Auflage (2002), 1818.
- [2] Ciclitira, P. J.; Cerio, R.; Ellis, H. J.; Maxton, D.; Neuufer, J. M.; Macartney, J. M.: Evaluation of a gliadin-containing gluten-free product in coeliac patients. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, 39C (1984), 303.
- [3] Vogelsang, H.; Granditsch, G.; Prost, B.; Dragosics, B.: Diagnostik und Therapie der Zöliakie im Adoleszenz- und Erwachsenenalter - Ein Konsensus der Arbeitsgruppe für chronisch entzündliche Darmerkrankungen der ÖGGH. *Z. Gastroenterol.* 40 (2002), 6-8.
- [4] Catassi, C.; Fabiani, E.; Ratsch, I. M. : The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr. Suppl.* 412 (1996), 29-35.
- [5] Catassi, C.; Ratsch, I. M.; Grandolfi, L.: Why is coeliac disease endemic in the people of Sahara? *Lancet* 354 (1999), 647- 648.
- [6] Not, T.; Horvath, K.; Hill, I. D.: Celiac disease risk in the USA: High prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand. J. Gastroenterol.*, 33 (1998), 494-498.
- [7] Vogelsang, H.: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Ärzte Woche Zeitungsverlagsgesellschaft m.b.H., Universitätsklinik für Innere Medizin IV, AKH Wien, (2004).
- [8] Jansen, T.; Mulder, C.; Karssen, P.; Wagenaar C.: Epidemiological survey of the Dutch coeliac disease society: An update 1992. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (1993), 73-78.
- [9] DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ZÖLIAKIE e. V., DZG-Medizin: Die Zöliakie & Sprue.: URL: www.DZG-online.de (März 2005).
- [10] Ternes, W.: Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung. 2. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg (1993), 549-555.
- [11] Stahl, U.; Hinzmann, E.: Expression und Produktion von Weizenspeicherproteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Technische Universität Berlin, Mikrobiologie und Genetik. URL: www.vvgvg.org/projekt1.htm (März 2005).

- [12] Wrigley, C. W.; Bietz, J. A.: Proteins and amino acids. In: Wheat: Chemistry and Technology. Y. Pomeranz, ed. AACC, St. Paul, Minnesota (1988), 159-276.
- [13] Elliasson, A.C.: Rheological properties of cereal proteins. In: Dough Rheology and Baked Product Texture. H. FARIDI; J. M. Faubion, eds. Van Norstrand Reinhold, New York (1990), 67-110.
- [14] Pyler, E. J.: Flour proteins role in baking performance. Baker's Dig. 57 (1983), 24-33.
- [15] Weegels, P. L.; Van de Pijpekamp, A. M.; Graveland, A.; Hamer, R. J.; Schofield, J. D.: Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationship between glutenin macropolymer content and quality parameters. J. Cereal Sci. 23 (1996), 103-111.
- [16] Ewart, J. A. D.: Recent research and dough viscoelasticity. Baker's Dig. 46 (1972), 22-26.
- [17] Hoseney, R. C.; Finney, K. F.; Shogren, M. D.; Pomeranz, Y.: Functional (bread-making) and biochemical properties of wheat flour components. Cereal Chem. 48 (1971), 191-192.
- [18] Shewry, P. R.: Manipulating cereals to improve end-use properties. In: Biotechnology of Cereals. P. R. Shewry, ed. Academic Press, San Diego (2001), 14-16.
- [19] Belitz, H-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. Auflage, Springer – Verlag Berlin (2001), 660-677.
- [20] Seilmeier, W.; Belitz, H.-D.; Wieser, H.: Separation and quantitative determination of high-molecular-weight subunits of glutenin from different wheat varieties and genetic variants of the variety Sicco. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 192 (1991), 124-129.
- [21] Graveland, A.: Struktur und funktionelle Eigenschaften von Gluteninen. Getreide Mehl und Brot 42 (1988) 35-38.
- [22] Wieser, H.; Seilmeier, W.; Belitz, H.-D.: Klassifizierung der Proteinkomponenten des Weizenklebers. Getreide Mehl und Brot 45 (1991), 35-38.
- [23] Nierle, W.: Löslichkeit und Fraktionierung von Weizenproteinen. Getreide Mehl und Brot 38 (1984), 315-319.
- [24] Yajima, M.; Katahira, R.: Wheat gluten fractions. European Patent Application: EP0824870, 25.02.1998.

- [25] Bassi, S. Maningat, C.: Alcohol-free wet extraction of gluten dough into gliadin and glutenin. International Patent WO9710260, 20.03.1997.
- [26] Yajima, M.; Katahira, R.: Process for making bread with addition of a gliadin-rich fraction, without incorporation of yeast food and emulsifier. European Patent Application: EP0992193, 12.04.2000.
- [27] Berot, S.; Gautier, S.; Nicolas, M.; Popineau, Y.; Godon, B.: Pilot scale preparation of wheat gluten protein fractions.
I. Influence of process parameters on their protein composition. Intern. J. Food Sci. Technol. 29 (1994), 489–502.
- [28] Roels, S.: Method for the preparation of gliadin- and glutenin-rich fractions out of gluten in an aqueous medium and in the presence of an acid. United States. Patent: US 2004/0198956A1, 07.10.2004.
- [29] Hagel, I.: Biobrot aus Schwefelmangelweizen? Ein Beitrag zur Qualitätsbeurteilung der festen Proteinstruktur moderner Weizensorten. Schriftenreihe: Band 14 Institut für Biologisch-Dynamische Forschung e.V. Darmstadt (2000), 3-8.
- [30] Shewry, P. R.; Halford, N. G.; Tatham, A. S.: High molecular weight subunits of wheat glutenin. J. Cereal Sci. 15 (1992), 105-120.
- [31] Wieser, H.; Seilmeier, W.; Belitz, H.-D.: Use of RP-HPLC for a better understanding of the structure and functionality of wheat gluten proteins. In: High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. J. E. Kruger, J. A. BIETZ, eds. AACC, St. Paul, Minnesota (1994).
- [32] Schropp, P.; Wieser, H.: Wirkung von HMW-Untereinheiten des Glutenins auf die rheologischen Eigenschaften von Weizenkleber. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching. Jahresbericht (1994), 136-147.
- [33] Kiefer, R.; Wieser, H.: Bedeutung einzelner Kleberproteintypen für die im Mikromaßstab bestimmten Verarbeitungseigenschaften von Weizenmehl. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, Jahresbericht (1996), 151-164.
- [34] Tscheuschner, H.-D.: Rheologie der Lebensmittel. In: Grundzüge der Lebensmitteltechnik. H.-D. Tscheuschner, Behr's Verlag Hamburg (1996).
- [35] Weipert, D.: Brotgetreide und seine Produkte. In: Rheologie der Lebensmittel. D. Weipert, H.-D. Tscheuschner, Behr's Verlag Hamburg, (1993).

- [36] Oliver, J. R.; Allen, H. M.: The prediction of baking performance using the farinograph and extensograph. *J. Cereal Sci.* 15 (1992), 79-85.
- [37] Universität f. Bodenkultur, Wien: Züchtung auf Qualitätseigenschaften bei Getreide. URL: http://ipp.boku.ac.at/pz/uebungen/hg/qu_cereal_1.htm, (März 2005).
- [38] Rasper, V. F.; Preston, K. R.: *The Extensograph Handbook*. AACC, St. Paul, Minnesota (1987).
- [39] Faridi, H.; Rasper, V. F.: *The Alveograph Handbook*. AACC, St. Paul, Minnesota (1987).
- [40] Basuki, W.; Weegels, P.L.; Prieto, J. A.; Hamer, R. J.: Breadmaking quality and functional properties of a low molecular weight wheat protein fraction. In: *Gluten Proteins*. W. Bushuk and R. Tkachuk, eds. AACC, St. Paul, Minnesota (1991).
- [41] Antes, S.; Wieser, H.: Effects of high and low molecular weight glutenin subunits on rheological dough properties and breadmaking quality of wheat. *Cereal Chem.* 78 (2001), 157-159.
- [42] Hou, G.; Yamamoto, H.; NG, P. K. W.: Relationships of quantity of gliadin subgroups of selected US soft wheat flours to rheological and baking properties. *Cereal Chem.* 73 (1996), 352-357.
- [43] Hou, G.; Yamamoto, H.; NG, P. K. W.: Relationships of quantity of glutenin subgroups of selected US soft wheat flours to rheological and baking properties. *Cereal Chem.* 73 (1996), 358-363.
- [44] Kiefer, R.; Garnreiter, F.; Belitz, H.-D.: Beurteilung von Teigeigenschaften durch Zugversuche im Mikromaßstab. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 172 (1981), 193-194.
- [45] Kiefer, R.; Garnreiter, F.; Belitz, H.-D.: Zugversuche mit Weizenkleber im Mikromaßstab. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 172 (1981), 190-192.
- [46] Bundessortenamt. Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen, Hackfrüchte (außer Kartoffeln). Deutscher Landwirtschaftsverlag GmbH, Hannover (2004).
- [47] Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung: *Standard-Methoden für Getreide, Mehl und Brot*. 7. überarb. u. erw. Aufl. Verlag Moritz Schäfer, Detmold (1994).
- [48] Kiefer, R.; Belitz, H.-D.; Zweier, M.; Ipfelkofer, R.; Fischbeck, G.: Der Rapid-Mix-Test als 10 g Mikrobackversuch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 197 (1993), 134-136.

- [49] Rooke, L.; Bekes, F.; Fido, R.: Over-expression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J. Cereal Sci.* 30 (1999), 115-120.
- [50] Butow, B. J.; Tatham, A. S.; Savage, A. W. J.; Gilbert, S. M.; Shewry, P. R.; Solomon, R. G.; Bekes, F.: Creating a balance – the incorporation of a HMW glutenin subunit into transgenic wheat lines. *J. Cereal Sci.* 38 (2003), 181-187.
- [51] Alvarez, M. L.; Guelman, S.; Halford, N. G.; Lustig, S.; Reggiardo, M. I.; Ryabushkina, N.; Shewry, P.; Stein, J.; Vallejos, R. H.: Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (2000), 319-327.
- [52] Blechl, A. E.; Thrashler, K. S.; Vensel, W. H.; Green, F. C.: Purification and characterization of alpha-gliadin synthesized in yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Gene* 116 (1992), 119-127.
- [53] Pratt, K. A.; Madgewick, P. J.; Shewry, P. R.: Expression of a wheat gliadin protein in yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*). *J. Food Sci.* 14 (1991), 223-229.
- [54] Muttzall, K.: Einführung in die Fermentationstechnik. Behr's Verlag, Hamburg (1993), 17-69.
- [55] Goffeau, A.; Barell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; Johnston, M.: Life with 6000 genes. *Sci.* 274 (1996), 546-567.
- [56] Ploger, R.; Zhang, J.; Bassett, D.; Reeves, R.; Hieter, P.; Bouguski, M.; Spencer, F.: Cross-referencing the genetics and genes of mammals and model organisms. *Nucleic Acids Res.* 28 (2000), 120-122.
- [57] Nielsen, J.; Villadsen, J.: *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Press, New York, London (1994).
- [58] Crueger, W.; Crueger, A.: *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. 2. Auflage, Oldenbourg Verlag, München (1982), 50-58.
- [59] Monod, J.: The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 3 (1949), 371-394.
- [60] Schlegel, H-G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart (1992), 290-294.
- [61] Müller, D.; Hauk, A.; Bucher J.: *Regelung der Zufütterung von Glucose beim Wachstum von Saccharomyces cerevisiae*. IBVT, Stuttgart. URL:

- http://www.ibvt.uni-stuttgart.de/lehre/praktika/vt_tb/Versuch2/Versuch2.htm
(März 2005).
- [62] Ostfildern, U.T.: Untersuchungen zur Dynamik des Crabtree-Effekts. Reihe 17: Biotechnik 129, VDI-Verlag, Düsseldorf (1995), 3-8.
- [63] Tscheuschner, H.-D.: Grundzüge der Lebensmitteltechnik. Behr's Verlag, Hamburg, 2. Auflage (1996), 225-226, 354.
- [64] Toledo, R. T.: Verfahrenstechnische Grundlagen der Lebensmittelproduktion. Behr's Verlag, Hamburg (2004), 272-273, 325-329.
- [65] Scopes, R.K.: Protein Purification. 3th edition. Springer-Verlag, New York (1994), 110-118.
- [66] Murray, P.: Protein Purification. In: Methods in Enzymology. Vol. 182. J. N. Abelson and M. I. Simon, eds. Academic Press, San Diego (1990).
- [67] Proteinbiochemische Methoden (Vers 2.0), Grundlagen der Proteinreinigung. URL: www.uv.ruhr-uni-bochum.de/pvz-planung/i3v/00022200/09463722.htm,
(März 2005).
- [68] Sadler, B.: Analyse von Molekulargewichtsparametern und physikalischen Eigenschaften nassvermahlener Stärken. Diss., D 83, TU-Berlin (2002).
- [69] Baumgart, J.: Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Hamburg (1990).
- [70] Bronn, K.K.: Vorlesungsreihe „Technologie der Hefefabrikation“ Technische Universität Berlin (1986).
- [71] ICC. Standard Methods of the International Association for Cereal Chemistry. Verlag Moritz Schäfer, Detmold, (1980).
- [72] EN ISO 3188. Bestimmung des Stickstoffgehalts nach dem Kjeldahl-Verfahren. Deutsches Institut für Normung (1978).
- [73] Wieser, H.; Antes, S.; Seilmeier, W.: Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography. Cereal Chem. 75 (1998), 644-650.
- [74] ICC. Standard Methods of the International Association for Cereal Chemistry ICC-Standard Nr. 104/1: Bestimmung der Asche von Getreide und Mahlprodukten aus Getreide. Verlag Moritz Schäfer, Detmold (1990).
- [75] Krüger, E.; Bielig, H.-J.: Betriebs- und Qualitätskontrolle in Brauerei und alkoholfreier Getränkeindustrie. Verlag Paul Parey Berlin/Hamburg, (1976), 216-218, 320-321.

- [76] Rohrllich, M.; Brückner, G.: Das Getreide und seine Verarbeitung. Band 4, 1. Teil, 2. Auflage. Verlag Paul Parey Berlin/Hamburg (1967), 67.
- [77] Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung. Standard-Methoden für Getreide Mehl und Brot, 6. Auflage, Verlag Moritz Schäfer, Detmold (1978), 225-228.
- [78] Ellman, G.L.: A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958), 443-450.
- [79] Meuser, F.; Kutschbach, A.; Kieffer, R.; H. Wieser, H.; Schieberle, P.: Investigation of the effect of hot air drying of wheat gluten on its viscoelasticity and baking performance by a systems analytical model. Cereal Chem. 79 (2002), 617-623.
- [80] Kovalenko, A.G.; Telegeeva, T.A.: Properties of the biologically active mannan preparations extracted from fodder yeast. Ukr. Biokhim. Zh. 71 (1999), 104-109.
- [81] Newman, K.E.: Mannan oligosaccharide - A review of scientific data on this novel ingredient. Concepts Pig Sci.(1999), 47-52.
- [82] Kim, J. D.; Hyun, Y.; Sohn, K.S.; Kim, T.J.; Woo, H.J.; Han, K.: Effects of mannan oligosaccharide and protein levels on growth performance and immune status in pigs weaned at 21 days of age. J. Anim. Sci. Technol. 42 (2000), 489-498.
- [83] Maxwell, M.E.; Brown, D.C.; Wistuba, T.J.: 1. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. Davis. J. Anim. Sci. 82 (2004), 1882-1891.
- [84] Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung. Standard-Methoden für Getreide Mehl und Brot, 6. Auflage, Verlag Moritz Schäfer, Detmold (1978), 209-210.
- [85] Schild, E.: Der junge Bäcker. Fachbuchverlag Dr. Pfanneberg & Co., Gießen, (1989), 57.
- [86] Lux, H.: Anorganisch-Chemische Experimentierkunst, 2. Auflage, Johann Ambrosius Barth Verlag Leipzig (1959), 311-312.
- [87] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72 (1976), 248-254.