

Ingenieurwissenschaften

Studiengang Lebenstechnologie
Vertiefungsrichtung Biotechnologie

Diplom 2006

Emilie Baertschi

**Isolierung und
Charakterisierung von Endo-
Inulinase aus einer Kultur von
*Paenibacillus spec.***

Dozent: Simon Crelier
Experte: Günter Claus

Echéancier

Emilie Baertschi

2006-2007

Isolierung und Charakterisierung von Endo-Inulinase aus einer Kultur von
Paenibacillus spec.

Zusammenfassung:

Die Ziele der Diplomarbeit waren, Optimieren der Analytischen Methoden, Test und Beurteilung von Isolierungsmethoden, Optimierung der Aufarbeitungssequenz mit Bestimmung der Ausbeute und des reinheitsgrades. Diese konnten nicht ganz erreicht werden, da zuerst eine Optimierung der Fermentation des Organismuses in Bezug auf die Bildung des Produktes Endoinulinase erfolgen musste.

Der erste Schritt der Arbeit bestand darin aus fünf vorhandenen Stämmen den geeignetsten auswählen und dann das Nährmedium in Schüttelkulturen zu optimieren. Parallel werden die Analytischen Methoden zur Beurteilung des Fermentations-bzw. Aufarbeitungsergebnisses getestet und optimiert.

Anschließend wurden 5 Fermentationen im 10 L-Bioreaktor unter verschiedenen Bedingungen (Substratkonzentration, Umdrehung und Begasungsrate) durchgeführt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Bakterien mit Hefeextrakt besser wachsen als mit Biotin. Die Inulinaseaktivität ist erst nach Beendigung der Wachstumsphase im Kulturüberstand nachweisbar. Es wurde eine maximale Inulinaseaktivität von 0.33 U/mL nach 23 Stunden Fermentationszeit erreicht.

In dieser Diplomarbeit wurden die ersten Ergebnisse zur Fermentationen des *Paenibacillus spec.* im 10 L-Bioreaktor gewonnen. Es ist jetzt möglich die Fermentation zu optimieren und anschließend die Inulinase zu isolieren und zu charakterisieren.

Résumé:

Les objectifs du travail de diplôme étaient, une optimisation des méthodes analytiques, établir et juger des méthodes d'isolation avec la détermination du rendement du degré de pureté. Ces derniers ne pouvaient pas être tout à fait atteint, puisqu'une optimisation de la fermentation de l'organisme conduisant à la formation du produit endoinulinasique a dû être faite.

Le premier pas de ce travail a été de déterminer entre 5 souches de *Paenibacillus sp.* laquelle serait employée au cour de ce projet. Les résultats ont montré que seule la souche *Paenibacillus sp.* FH-138 pousse. L'étape suivante a été une optimisation du milieu de fermentation effectuée en Erlenmeyer avec chicanes. Parallèlement les méthodes analytiques (DNSA et HPLC) permettant de suivre et d'évaluer une fermentation ont été testées et optimisées. Ensuite 5 fermentations en bioréacteur de 10 litres ont été effectuées sous différentes conditions de culture (Conc.en substrat, aération et agitation). Les résultats ont montrés que les bactéries poussent mieux avec de l'extrait de levure qu'avec de la biotine. L'activité inulinasique apparaît dans le surnageant à la fin de la phase de croissance des bactéries. Une activité inulinasique maximale de 0.33 U/mL est atteint après 23 h de fermentation.

Dans ce travail de diplôme les premiers résultats des fermentations de *Paenibacillus sp.* FH-138 en bioréacteur de 10 litres ont été acquis. Il est maintenant possible d'optimiser cette fermentation et d'élaborer par la suite une stratégie d'isolation de l'endoinulinase et de caractériser cette enzyme.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als Diplomand am Institut für Technische Mikrobiologie an der Fachhochschule Mannheim.

Den Leitern des Fachgebietes, Herrn Prof. Dr.-Ing. S. Crelier und Herrn Prof. Dr. G. Claus, danke ich sehr herzlich für Ihre Betreuung, die Unterstützung und Ratschläge während der Durchführung meiner Diplomarbeit.

Ich möchte mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken. Ein besonderer Dank an Herrn Reuter für seine Geduld und Hilfe bei der Korrektur dieses Berichts.

Ich danke meinen Eltern, die mir mein Studium finanziell ermöglicht haben.

Und Schlussendlich möchte ich meinem Freund von Herzen danken, welcher mich während meines ganzen Studiums stets unterstützt und motiviert hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	7
1.1	Zielsetzung	7
1.2	Stand des Wissens und der Technik	7
1.2.1	Inulinasen	7
1.2.2	Inulin und Oligofructose	8
1.2.3	Prebiotika	9
1.2.4	<i>Paenibacillus species X</i>	10
1.2.5	Inulobiose	10
2	Reagenzien, Material und Methoden	11
2.1	Reagenzien	11
2.2	Material	12
2.3	Methoden	13
2.3.1	Zusammensetzung des Nährmediums, Herstellung der Agarplatten ..	13
2.3.2	Kultivierung auf Agarplatten zum Stammvergleich	16
2.3.3	Vorkulturen	16
2.3.4	Fermentationen	17
2.3.5	Bestimmung der optische Dichte	20
2.3.6	Substratverlauf mit der DNSA-Methode	20
2.3.7	Substratverlauf mit der HPLC-Methode	22
2.3.8	Bestimmung der Enzymaktivität mit der DNSA-Methode	24
2.3.9	Bestimmung der Inulinaseaktivität mit der HPLC-Methode	26
2.3.10	Bestimmung der Biotrockenmasse	29
2.3.11	Bestimmung Proteinkonzentration im Kulturüberstand	29
2.3.12	Zellausbeute	30
2.3.13	Abgasanalyse	31
2.3.14	Optimierung der HPLC-Methode für die Inulinaseaktivität	32
2.3.15	Optimierung der DNSA-Methode für die Enzymaktivität	34
2.3.16	Lokalisation der Endoinulinase	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Fermentationen	39
3.1.1	Kultivierung auf Agarplatten zum Stammvergleich der <i>Paenibacillus spec.</i>	39
3.1.2	Fermentationen in Schüttelkultur	39
3.1.3	Optimierung der Vorkultur für die Fermentation im 10 L-Bioreaktor	42
3.1.4	Erste Fermentation im 10 L-Bioreaktor	43

3.1.5	Zweite Fermentation im 10 L-Bioreaktor	47
3.1.6	Dritte Fermentation im 10 L-Bioreaktor	53
3.1.7	Vierte Fermentation im 10 L-Bioreaktor	54
3.1.8	Fünfte Fermentation im 10 L-Bioreaktor.....	56
3.2	Vergleich der DNSA-Methode und HPLC-Methode für den Substraverlauf	63
3.3	Optimierung der Analytik	64
3.3.1	Optimierung der HPLC-Methode für die Inulinaseaktivität	64
3.3.2	Optimierung der DNSA-Methode für die Enzymaktivität	66
4	Diskussion	69
4.1	Fermentationen	69
4.1.1	Kultivierung auf Agarplatten zum Stammvergleich der <i>Paenibacillus spec.</i>	69
4.1.2	Fermentation in der Schüttelkultur	69
4.1.3	Optimierung der Vorkultur für die Fermentation im 10 L-Bioreaktor	69
4.1.4	Erste Fermentation im 10 L-Bioreaktor	70
4.1.5	Zweite Fermentation im 10 L-Bioreaktor	70
4.1.6	Dritte und vierte Fermentation im 10 L-Bioreaktor.....	71
4.1.7	Fünfte Fermentation im 10 L-Bioreaktor.....	72
4.1.8	Gesamt Diskussion	73
4.2	Vergleich der DNSA-Methode und HPLC-Methode für den Substraverlauf	73
4.3	Optimierung der Analytik	74
4.3.1	Optimierung der HPLC-Methode für die Inulinaseaktivität.....	74
4.3.2	Optimierung der DNSA-Methode für die Enzymaktivität	74
5	Schlussfolgerung und Perspektiven	75
6	Literatur	76
7	Anhang	77

1 Einführung

1.1 Zielsetzung

Die Zielsetzungen dieser Diplomarbeit sind:

- Analytik (Aktivitätstest, Proteingehalt, SDS) beherrschen und optimieren
- Die zur Verfügung stehenden Isolierungsmethoden austesten und beurteilen
- Ausbeute und Reinigungsgrad bestimmen
- Optimale Aufarbeitungssequenz definieren
- Schlussbericht schreiben

1.2 Stand des Wissens und der Technik

1.2.1 Inulinasen

Inulinasen gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen. Sie katalysieren eine Transferaktion mit Wasser als Akzeptor. Man unterscheidet bei der Inulinase die Endoinulinasen und die Exoinulinasen. Die Abbildung 1 zeigt die Aktion von Endo- und Exoinulinase.

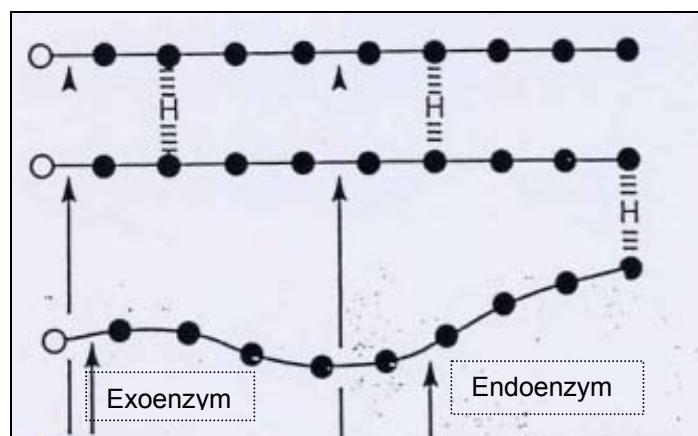


Abbildung 1: Aktivität von Endo- oder Exoenzym.

Die Endoinulinase (EC 3.2.1.7) ist eine 2,1- β -D-Fructan-Fructano-Hydrolase. Sie spaltet die 2,1- β -D-fructosidische Bindungen in Inulin. Dabei entstehen Oligosaccharide mit einer Kettenlänge von zwei DP (degree of polymerization) und größer, und nur in geringem Umfang werden Mono-Saccharide abgespalten. [1]

Die Exoinulinase (EC 3.2.1.80) ist eine Fructan- β -Fructosidase. Sie spaltet vom nicht reduzierenden Ende von 2,1- und 2,6- β -D-Fructofuranosen ab. Außer Inulin und Levan hydrolysiert sie auch Saccharose. [2] [3]

1.2.2 Inulin und Oligofructose

Das Inulin, abgeleitet vom Inule ist ein Kohlenhydrat mit besonderen Eigenschaften.

Es gehört zur Familie der Fructane oder Fructo-Oligasaccharide, der gärungsfähigen Fasern, die sich in mehr als 36000 Pflanzenarten wieder finden, wo es die Energiereserve gewährleistet.

Diese Zusammensetzung wird aus linearen Ketten von Fruktosemolekülen mit einer Abschlussglukose gebildet. [4]

Man kann in der Abbildung 2 die Struktur des Inulins sehen.

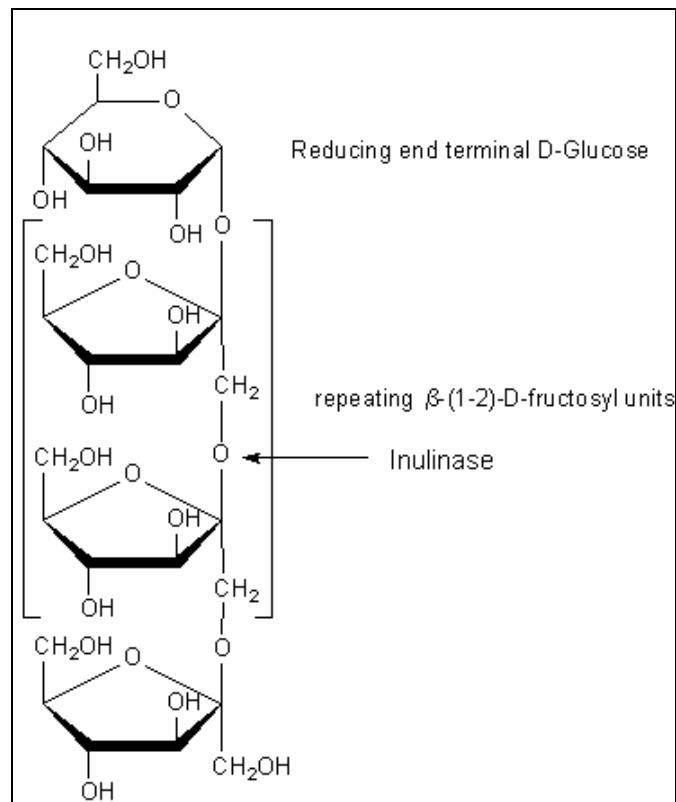


Abbildung 2: Struktur des Inulins.

Dieses Fruktosepolymer kommt vor allem in der Endivienwurzel vor, aus der es industriell extrahiert wird. Diese enthält 15 bis 20 % Inulin und zwischen 5 und 10 % Oligofruktose. Die Verfahrensweise der Extraktion des Inulins aus der Wurzel ist jener ähnlich, die in der Zuckerindustrie benutzt wird. Die Endivienwurzel wird zuerst zerschnitten und gewaschen. Danach wird das Inulin von der Wurzel mit heissem Wasser extrahiert, gefolgt von einer schnellen Trocknung. Sie wird zur Zuckergewinnung in der Industrie als Nahrungsmittelzusatz benutzt. Der Grad der Polymerisation variiert und konditioniert die Funktionalität. Die Polymere, die weniger als zehn Einheiten Fruktose enthalten, werden Fructooligosaccharide (F.O.S) genannt, sie werden als süßende Zutat benutzt. Die Polymere mit mehr als zehn Einheiten verbessern die Struktur von Nahrungsmitteln oder dienen als Ersatz für Fette. [5] [6]

Man findet Inulin auch in anderen Pflanzen der Familie Asteraceae wie zum Beispiel Topinambur oder der Dahlienzwiebeln.

Weder die Enzyme des menschlichen Verdauungstrakts noch die Magensäure, können die Verbindung β -(2,1) zwischen den Einheiten der Fruktose des Inulins spalten. Das Inulin kommt also intakt im Darm an, deshalb kann es als Ballaststoff angesehen werden. Aufgrund dieser Tatsache und da es geschmacks- und farblos ist, wird es in zahlreichen Nahrungsmitteln als Ergänzungsstoffe benutzt. [7]

Der Inulinverbrauch scheint die Biodisponibilität des Kalziums zu erhöhen, obwohl mehrere Studien diese Wirkung beim Menschen noch nicht bestätigt haben. Eine der vertretbaren Erklärungen für dieses Phänomen beruht auf der Bildung von kurzkettigen Fettsäuren im Laufe der Gärung des Inulins in der Darmflora. Der Rückgang des luminalen pH, der sich daraus ergibt, begünstigt die Ionisation des Kalziums, welches leichter durch passive Verbreitung absorbiert wird. Da das Inulin gewöhnlich in Milcherzeugnissen benutzt wird, ist die Absorption des Kalziums, ein interessanter Aspekt im Kampf gegen die Osteoporose. [6]

1.2.3 Prebiotika

Unter «Prebiotika » versteht man Substanzen, deren Aufnahme einen positiven Einfluss auf gastrointestinale Funktionen haben. Man versteht darunter vor allem Fructosepolymere oder –oligomere, so genannte Fructooligosaccharide. Sie zeichnen sich durch einen homogenen Aufbau aus Fructoseuntereinheiten aus, die durch β -1,2 Bindungen untereinander verknüpft sind und eine terminale Glukoseeinheit besitzen. Sie können nicht aufgenommen werden, da sie resistent gegen die enzymatische Hydrolyse im Darm des menschlichen Verdauungstraktes sind. Sie erreichen daher fast vollständig den Dickdarm. Dort regen sie die Mobilität des Magendarmtraktes an, dienen der Mikroflora als Substrat und besitzen so eine selektive Wirkung. Diese Selektion geschieht offenbar durch die bevorzugte metabolische Verwertung der Fructooligosaccharide durch Bifidobakterien. Diese können die Fructooligosaccharide besser nutzen als andere Bakterien im Darm und erhalten durch die zusätzliche Substratzufuhr einen Wachstumsvorteil. Versuche haben gezeigt, dass der Anteil der Bifidobakterien im Darm von 25 % auf 70 % ansteigt, wenn vermehrt Fructooligosaccharide aufgenommen werden.

Bifidobakterien fördern durch ihren Metabolismus das Milieu im Darm: Sie produzieren kurzkettige Fettsäuren, was sich positiv auf die Schleimhaut auswirkt. Sie produzieren Metabolite, die das Wachstum von exogenen Bakterien unterbinden, immunstimulierende Substanzen und verschiedene Vitamine, die der Mensch nicht selbst herstellen kann. Außerdem inhibieren sie das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen wie Clostridien oder Listerien.

Die Zufuhr von prebiotischen Substanzen hat gegenüber der Zufuhr von Probiotika, also der Bakterien selbst, den Vorteil, dass das saure Milieu des Magens keinen Einfluss besitzt. Man muss sehr viele probiotische Bakterien aufnehmen, damit eine ausreichende Menge die Magen-Darm-Passage überlebt. Prebiotika sind säureresistent und fördern im Darm selbst das Wachstum der gewünschten Bakterien. [8]

Prebiotika begünstigen eine ausgewogene Darmflora, sie begünstigen die Schaffung eines säurehaltigen Milieus im Dickdarm und vermindern das Risiko einer Geschwulstentwicklung. [9]

1.2.4 *Paenibacillus species X*

Der Stamm *Paenibacillus spec.* FH-138 ist thermotolerant, (Wachstums bis 55 °C), aerob, stäbchenförmiger und bildet Endosporen. [10]

Ein technologischer Vorteil des Bakteriums liegt darin, dass es nur Endoinulinase sekretiert, weswegen es vorzüglich für die Gewinnung von Oligofructosiden geeignet ist.

Abbildung 3 zeigt das mikroskopische Präparat des *Paenibacillus spec.* FH-138.



Abbildung 3: *Paenibacillus spec.* FH-138 mit Endospore (1000-fache Vergrößerung) nach 3 Tagen Inkubation auf Nährmedium 2. [10]

1.2.5 Inulobiose

Die Inulobiose ist das Hauptprodukt der Endoinulinase des *Paenibacillus spec.* [11]

Dieser Zucker besteht aus zwei Einheiten Fruktose (F2). Die Abbildung 4 zeigt die Struktur des Moleküls. Die Inulobiose, die ein Disaccharid ist, ist kein reduzierender Zucker. Tatsächlich gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Bildung des Disaccharids. Entweder wenn die H₂O-Gruppe zwischen den beiden halbacetalischen Hydroxylgruppen austritt, oder die H₂O-Gruppe zwischen einer halbacetalischen und einer alkoholischen Gruppe auftreten. [12]

Während dieser Diplomarbeit, wird die Inulinaseaktivität mit der HPLC-Methode durch Messung der Inulobiosekonzentration bestimmt.

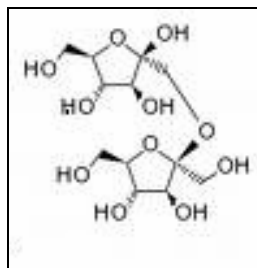


Abbildung 4: Struktur der Inulobiose. [13]

2 Reagenzien, Material und Methoden

2.1 Reagenzien

- $C_4H_6O_4$, n° A5246.0500, Reinheit > 99 %, Reizend, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, n° 2380.5000, Reinheit > 99 %, Reizend, Merck, Darmstadt, Deutschland
- KH_2PO_4 , n° 4871, Reinheit > 99.5 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, n° P027.2, Reinheit > 99 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- $(NH_4)_2SO_4$, n° 3746.4, Reinheit > 99.5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Biotin, n° 14400, Reinheit > 99.5 %, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, n° 3965, Reinheit > 99.5 %, Gesundheitsschädlich, Merck, Darmstadt, Deutschland
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, n° 915, Reinheit > 99 %, Gesundheitsschädlich, Merck, Darmstadt, Deutschland
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, n° 61240, Reinheit > 99 %, Gesundheitsschädlich, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- H_3BO_3 , n° A1097, Reinheit > 99.5 %, Giftig, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- KI, n° 5040.0250, Reinheit > 99 %, Merck, Darmstadt, Deutschland
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, n° 63543, Reinheit > 99 %, Mindergiftig, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, n° 71756, Reinheit > 99.5 %, Reizend, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, n° 96500, Reinheit > 99.5 %, Staub nicht einatmen, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Inulin Raftiline, Batch n° OXG0307J3, ORAFTI SA, Oreye, Belgien
- Inulin Serva, n° 26362, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Inulin Raftilose, Batch n° PEJKA4CKA4, ORAFTI SA, Oreye, Belgium
- Agar, n° 23170, Bernd Euler Biotechnologie-Mikrobiologie, Frankfurt am Main, Deutschland
- NaOH, n° 215-185-5, Reinheit > 99 %, Gesundheitsschädlich, Merck, Darmstadt, Deutschland

- $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, n° 0100, Reinheit > 99 %, Gesundheitsschädlich, Merck, Darmstadt, Deutschland
- $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, n° 71955, Reinheit > 97 %, Giftig, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- PPG 2000, n° 7180, Mallinckrodt Backer, Deventer, Holland
- Hefeextrakt, n° 19512, Bernd Euler Biotechnologie-Mikrobiologie, Frankfurt am Main, Deutschland
- $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, n° 60412, Reinheit > 99 %, Sigma-Aldrich Chemie AG, Buchs Schweiz
- HCl , n° P0742, Reinheit > 32 %, Ätzend, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, n° 6779.1, Reinheit > 99.5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- 3,5-Dinitrosalicylsäure, n° 20502, Reinheit > 98 %, Reizend, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- H_2SO_4 , n° A4390, Reinheit > 98 %, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- NaCl , n° 90180, Reinheit > 99 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- CH_3COOH , n° A0820, Reinheit 100 %, Ätzend, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Roti^R-Quant, n° 1760, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- BSA, n° 1391, Reinheit > 98 %, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.2 Material

- Mikroskop, Olympus BH-2, Olympus Hamburg GmbH, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge, Beckman Model J2-21, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- Zentrifuge, Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge, Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
- Waage, Mettler Toledo AE 2240, Mettler, Giessen, Deutschland
- Waage Sartorius LC 4201 S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Trockenschrank, Memmert, Bäch, Schweiz
- Schlauchquetschpumpe, Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Deutschland

- Sicherheitswerkbank, Waldner Electronics, Wangen, Deutschland
- Inkubator, Certomat H, Göttingen, Deutschland
- Filter 20 µm, Sartolab-P20, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Filter Spritzenvorsatzfilter steril, 0.45 µm, Laborservice, Harthausen, Deutschland
- Spritze 10 mL, Terumo, Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland
- Zuluftfilter, Bioengineering, Wald, Schweiz
- 10 L-Bioreaktor, Bioengineering, Wald, Schweiz
- Abgasanalyse, Maihak, Hamburg, Deutschland
- pH-Sonde, Mettler Toledo, Toledo, Spanien
- pO₂-Sonde, Mettler Toledo, Toledo, Spanien
- Spektrophotometer, Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- HPLC-Säule, Polyspher OA HY mit Vorsäule Merck, Darmstadt, Deutschland
- HP 3394A Integrator, Hewlett Packard, Beijing, China
- HPLC-Pumpe, Intelligent HPLC Pump 880 PU, jasco, Japan
- Brutschrank Memmert Elektronik, Memmert Instrument, Schwabach, Deutschland
- Ultraschall Finger, Sonifier Cell Disrupter B15, Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
- Ultraschall Bad Sonorex super 10 D, Bandelin Elektronik, Berlin, Deutschland
- Stamm *Paenibacillus* sp. X, Datum 15.02.00
- Stamm *Paenibacillus* sp. X, Datum 18.02.00
- Stamm *Paenibacillus* sp. X, Datum 05.11.99
- Stamm *Paenibacillus* sp. X, Datum 28.10.99
- Stamm *Paenibacillus* sp. X, FH-138, Datum 18.01.00

2.3 Methoden

2.3.1 Zusammensetzung des Nährmediums, Herstellung der Agarplatten

Nährmedium 1

Man kann aus Tabelle 1 die Zusammensetzung für einen Liter der Spurenelementlösung 1 und aus Tabelle 2 die Zusammensetzung für einen Liter des Nährmedium 1 einnehmen. [14]

Tabelle 1: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für einen Liter des Nährmediums 1. [14]

Komponenten	Einwaage [g]
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.30
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.10
H_3BO_3	1.00
KI	0.10
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.30
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.45
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02

- Alle Komponenten in 1L-Schottflasche einwiegen
- 1 L VE- H_2O hinzufügen
- Mit Alufolie abdecken und im Kühlschrank konservieren

Tabelle 2: Zusammensetzung des Nährmediums 1 für einen Liter. [14]

Komponenten	Einwaage
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.00 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.56 g
KH_2PO_4	2.45 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.96 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.22 g
Hefeextrakt	1.00 g
Spurenelementlösung	3.5 mL
Bersteinsäure	0.50 g
Biotin	3.05 μg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g

- Alle Komponenten in 1 L-Flasche einwiegen
- 900 mL VE- H_2O hinzufügen
- 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren
- 100 mL sterilfiltrierte Inulinlösung 50 g/L hinzufügen
- 1.5 mL NaOH 5 M hinzufügen

Da mit Nährmedium 1 kein oder nur sehr schlechtes Wachstum erreicht wurde, wurde das Medium 2 für die Fermentationen verwendet.

Nährmedium 2

Man kann aus Tabelle 3 die Zusammensetzung für einen Liter der Spurenelementlösung 2 und aus Tabelle 4 die Zusammensetzung für einen Liter der Nährmedium 2 entnehmen. [10]

Im Vergleich zu der Spurenelementlösung aus Tabelle 1, beseitigen $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ und aus Tabelle 2, ist die Hefeextrakt beseitigt und die Biotinkonzentration ist erhöht.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Spurenelementlösung für einen Liter des Nährmediums 2. [10]

Komponenten	Einwaage [g]
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.30
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.10
H_3BO_4	1.00
KI	0.10
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.30
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.45

- Alle Komponenten in 1 L-Flasche wiegen
- 1 L VE- H_2O hinzufügen
- mit Alufolie abdecken und im Kühlschrank konservieren

Tabelle 4: Zusammensetzung des Nährmediums 2 für einen Liter. [10]

Komponenten	Einwaage
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.00 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
KH_2PO_4	0.70g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
Na_2HPO_4	0.35 g
Spurenelementlösung	1.00 mL
Bersteinsäure	1.00 g
Biotin	5 μg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 g

- Alle Komponenten in 1 L-Schottflasche einwiegen
- 900 mL VE- H_2O hinzufügen
- pH-Wert auf 6.5 mit NaOH 5 M stellen
- 20 min bei 121 °C autoklavieren
- 100 mL sterilfiltrierte Inulin 50 g/L hinzufügen

Für die Fermentation in einem 10 L-Bioreaktor, wurden die Inulinkonzentration, die von Ammoniumsulfat und die von Biotin verdoppelt.

Vorbereitung der Inulinlösung 50 g/L

- 50 g Raftiline-Inulin in 1 L-Flasche einwiegen
- 1 L VE-H₂O hinzufügen
- diese Lösung mit einem Filter der Porengröße 0.20 µm filtrieren
- im Kühlschrank aufbewahren

Herstellung der Agarplatten

- 500 mL des Nährmediums 1 oder 2 vorbereiten
- 10 g Agar hinzufügen vor dem Autoklavieren
- die Agarplatten gießen
- im Kühlschrank aufbewahren

2.3.2 Kultivierung auf Agarplatten zum Stammvergleich

Je zwei Agarplatten wurden mit 100 µL von jedem der 5 Stämme angeimpft, um den mit dem besten Wachstum auszuwählen

Dieser Versuch wurde einmal mit dem Nährmedium 1 und einmal mit dem Nährmedium 2 durchgeführt.

Die Bedingungen der Kultivierung sind 50 °C in einem Brutschrank über 4 Tagen.

Im Brutschrank wurde ein Behälter, der 100 mL VE-H₂O mit 22-24 g NaCl enthält zur Erhöhung der Luftfeuchte aufgestellt, um ein Austrocknen der Agarplatten zu verhindern.

2.3.3 Vorkulturen

Vorkultur für die erste Fermentation in Schüttelkultur

Zu Herstellung der Agarplatten wurde das Nährmedium 2 verwendet.

- 100 µL der bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen vom Stamm FH-138 ausplattieren (2x)
- Im Brutschrank 4 Tagen bei 50 °C inkubieren
- Etwas Bakterien von der Agarplatten entnehmen und in 0.9 % Saline resuspendieren
- 75 mL Nährmedium 2 in einem 300 mL-Schüttelkultur mit 2 mL der Bakteriensuspension animpfen (4x)

- die Schüttelkultur 1 und 2 wurden am Morgen um 8:30 angeimpft und die Schüttelkultur 3 und 4 um 17:00
- 24 Stunden bei 50°C und 160 U/min inkubieren

Vorkultur für die Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Das Volumen der Vorkultur beträgt 5 % des Volumens der Hauptkultur. Das heißt 500 mL für den 10 L-Bioreaktor. Für jede Fermentation im 10 L-Bioreaktor wurden, 4 Vorkulturen von 250 mL vorbereitet, weil die Bakterien erfahrungsgemäß nicht immer angewachsen sind.

- 250 mL des Nährmedium 2 in einem 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikanen geben
- mit 2 mL der Kryokonserven FH-138, 18.01.00 animpfen
- bei 50°C, 160 U/min für 24 Stunden inkubieren

2.3.4 Fermentationen

Erste Fermentation in der Schüttelkultur

Das Volumen für eine Kultur beträgt 250 mL im 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Die Fermentation dauert 50 Stunden. Da während der Nacht keine Proben genommen werden, wurden 4 Fermentationen vorbereitet. Die ersten zwei Fermentationen (S1 und S2) werden um $t = 0$ h (8:30 am Morgen) angeimpft. Und die zwei anderen (S3 und S4) werden um $t = 8.5$ h (17:00 am Nachmittag) angeimpft. Somit konnte die ganze Wachstumskurve erfasst werden.

- 237.5 mL Nährmedium 2 in einer 1 L-Schüttelkultur vorbereiten
- Kultur mit 12.5 mL der Vorkultur animpfen
- 50 Stunden bei 50 °C und 160 U/min inkubieren

Man kann aus Tabelle 5 die Entnahmen der Proben nachvollziehen. Für jede Probe, wurden 10 mL entnommen. Nur bei der ersten und letzten Probe wurden 30 mL entnommen, um die Biotrockenmasse (BTM) zu bestimmen. Während der Fermentation der Kultur wurden die optische Dichte (OD), der Substraverlauf und die Aktivität des Enzyms gemessen.

Tabelle 5: Probennahme.

Legende: S1 = Schüttelkultur 1, S2 = Schüttelkultur 2, S3 = Schüttelkultur 3, S4 = Schüttelkultur 4.

Fermentationszeit [h]	S1 und S2 Entnahme	S3 und S4 Entnahme
0	30 mL	keine
2	10 mL	
4		
6		
8		
15	keine	10 mL
17		
19		
21		
24	10 mL	keine
28		
30		
32		
39	keine	10 mL
42		
44	10 mL	keine
48		
50	30 mL	

Optimierung der Vorkultur für die Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Diese Optimierung wurde durchgeführt, um die exponentielle Phase zu bestimmen, da in dieser Phase der 10 L-Bioreaktor angeimpft werden sollte, um die Lag-Phase im Bioreaktor zu verkürzen.

Es wurden sechs Vorkulturen mit Nährmedium 2 vorbereitet in 1 L-Schüttelkolben. Jede Vorkultur wurde mit 2 mL Kryokonserven des *Paenibacillus spec.* FH-138 angeimpft, drei um 8:30 h und die drei anderen um 16:00.

Man kann aus Tabelle 6 die Entnahmen der Proben nachvollziehen. Für jede Probe, wurden 10 mL entnommen. Während der Fermentation der Kultur wurde die optische Dichte (OD) und der Substraverlauf gemessen. Die pH-Werte wurden jeder Schüttelkultur am Anfang und am Ende der Fermentation gemessen.

Tabelle 6: Probennahme.

Legende: S1 = Schüttelkultur 1, S2 = Schüttelkultur 2, S3 = Schüttelkultur 3, S4 = Schüttelkultur 4, S5 = Schüttelkultur 5, S6 = Schüttelkultur 6.

Fermentationszeit [h]	S1, S2, S3 Entnahme	S4, S5, S6 Entnahme
0	10 mL	keine
6.5		
16.5		
18	keine	10 mL
24		
26	10 mL	keine
28.5		
30.5		

Fermentationen im 10 L-Bioreaktor

Sterilisation im Autoklaven

Im Autoklaven wurde folgende Materialien sterilisiert:

- 1 leere 500 mL Schottflache mit Antischaum (PPG 2000)
- 2 leere 100 mL Erlenmeyerkolben (für die Reinheitskontrolle)
- ein Zuluftfilter

Sterilisation des Bioreaktors

Die Sterilisation des Bioreaktors wurde wie folgt durchgeführt:

- den Kaltwasserhahn der Zuleitung öffnen
- 1.5 bar an der pH-Sonde einstellen
- im Menü «Temperatur», die «Sterilisation» einschalten
- 250 U/min einstellen
- bei «95 °C», im Menü «Temperatur» auf «OK» drücken
- wenn aus dem Abluftschlauch Dampf austritt, muss das Ventil geschlossen werden bis Schleichdampf austritt
- wenn die Sterilisation beendet ist, im Menü «Temperatur» auf «OK» drücken zum Abkühlen auf Fermentationstemperatur

Kalibrierung der Abgasanalytik

Die Kalibrierung der Abgasanalytik wurde wie folgt durchgeführt:

- Ordner «Lab view» öffnen
- «QC-Abgas» anklicken
- «OK» anklicken
- «Abgasanalyse» anklicken
- «Titel» vergeben
- unten «Abgasanalysator» Oxygor 6N / Finor (21 % - 0 %) und Maihak wählen
- «Weiter» anklicken
- «OK» anklicken
- «Fermentation2.set» speichern
- «Beenden» anklicken
- «Beenden» anklicken
- «Prozess starten» anklicken
- Einstellen des 0-Punkts für O₂ und CO₂ mit Außerluft (O₂ in Stellung 2 (21 % - 0 %)). Der 0-Punkt für die O₂ liegt bei 21 %, der für CO₂ bei 0.03 %
- Einstellen der Steilheit mit Prüfgas O₂ = 0 % und CO₂ = 9 %
- «Prozess beenden» anklicken
- «Beenden» anklicken

- «Lab view beenden» anklicken
- «Beenden» anklicken
- «No» anklicken

Ablauf der Fermentation

Die Ablauf der Fermentation im 10 L-Bioreaktor wurde wie folgt durchgeführt:

- Zuluftfilters anstecken
- Zuleitung der Lauge anstecken
- Den Wasserhahn öffnen
- 250 U/min und 50 °C einstellen
- Inulinlösung hinzufügen
- pH-Wert auf 6.5 einstellen
- das Rührwerk und die Regulierung des pH-Werts (6.5) einschalten
- den Dampferzeuger, für die sterile Entnahme der Proben, einschalten
- der Abgasanalytik kalibrieren
- Ventil von Zuluft und der Abgaskühlung öffnen
- Das Rührwerk und die Zuluft an die Fermentation anpassen
- Die Abgasanalyse starten

Für die Proben wurden jeweils 50 mL entnommen, um die OD, die BTM (Biotrockenmasse), den Substratverlauf und die Inulinaseaktivität zu bestimmen. Außerdem wurden die erste und die letzte Probe einer Sterilitätskontrolle unterzogen.

2.3.5 Bestimmung der optische Dichte

Die Messung der Extinktion wurde bei 600 nm in einen Spektrophotometer für alle Proben bestimmt. Falls sich der Wert über 1.000 befindet, wurde die Probe verdünnt.

2.3.6 Substratverlauf mit der DNSA-Methode

Der Substratverlauf wurde nach einem Protokoll mit den folgenden Änderungen durchgeführt. [15]

Inulinlösung 5 g/L

Die Inulinlösung wurde mit Raftiline-Inulin wie folgt hergestellt:

- 0.05 g des Raftiline-Inulin in einen 10 mL Messkolben einwiegen
- mit VE-H₂O auffüllen

HCl 1 M

Die HCl 1 M wurde wie folgt hergestellt:

- 4.86 mL HCl (37 %) in einen 50 mL-Messkolben pipettieren
- mit VE-H₂O auffüllen

DNSA-Reagenz

Das DNSA-Reagenz wurde wie folgt angesetzt:

- 1 % Dinitrosalicylsäure
- 30 % Na-K-Tartrat
- NaOH 0.4 M

Vorbereitung der Standards

Die Standards wurden wie in Tabelle 7 gezeigt Hergestellt.

Im Anhang 3 befindet sich die Eichgerade des Raftiline-Inulins.

Tabelle 7: Erstellung der Standards mit Raftiline-Inulin.

Inulinkonzentration [g/L]	Inulinlösung 5 g/L [mL]	VE-H ₂ O [mL]
5	10	0
4	8	2
3	6	4
2	4	6
1	2	8
0.5	1	9
0.4	0.8	9.2
0.3	0.6	9.4

Herstellung der Eichgeraden

- 100 µL von jedem Standard und 100 µL VE-H₂O für den Leerwert verwenden
- 100 µL HCl 1 M hinzufügen
- 5 min bei 95 °C inkubieren
- 300 µL VE-H₂O und 500 µL DNSA-Reagenz hinzufügen
- Mischen und 10 min bei 100 °C inkubieren
- Die Extinktion im Spektrophotometer bei 546 nm in Plastikküvetten gegen den Leerwert messen

Leerwert

Der Leerwert wurde wie folgt erstellt:

- 100 µL VE-H₂O verwenden
- 100 µL HCl 1 M hinzufügen
- 5 min bei 95 °C inkubieren
- 300 µL VE-H₂O und 500 µL DNSA-Reagenz hinzufügen
- Mischen und 10 min bei 100 °C inkubieren
- Die Extinktion im Spektrophotometer bei 546 nm in Plastikküvetten messen

Proben

Die Proben wurden wie folgt erstellt:

- 100 µL Kulturüberstand zentrifugiert bei 8500 g, 10 min und filtriert (0.45 µm) verwenden
- 100 µL HCl 1 M hinzufügen
- 5 min bei 95 °C inkubieren
- 300 µL VE-H₂O und 500 µL DNSA-Reagenz hinzufügen
- Mischen und 10 min bei 100 °C inkubieren
- Die Extinktion im Spektrophotometer bei 546 nm in Plastikküvetten gegen den Leerwert messen

Inulinkonzentration

Die Inulinkonzentration wurde mit der Gleichung 1 bestimmt. Man sieht aus Tabelle 8, die Bedeutung der Abkürzung.

$$\text{Inulinkonzentration [g/L]} = \frac{A_{546 \text{ nm}} - O_{\text{EG}}}{S_{\text{EG}}} = \frac{A_{546 \text{ nm}} + 0.0603}{0.3193}$$

(Gleichung 1)

Tabelle 8: Bedeutung der Abkürzung der Gleichung 1.

Abkürzung	Bedeutung
A_{546}	Extinktion
O_{EG}	Ordinate der Eichgerade
S_{EG}	Steigung der Eichgerade

2.3.7 Substratverlauf mit der HPLC-Methode

Der Substratverlauf mit der HPLC-Methode wurde nach einem Protokoll mit den folgenden Änderungen realisiert. [15]

H₂SO₄ 0.01 N

- 270 µL H₂SO₄ in eine Flasche mit 999.73 mL VE-H₂O pipettieren
- 20 min bei 20 °C im Ultraschallbad vorentgasen
- mit Helium für 10 min entgasen

Vorbereitung des Standards

Serva-Inulin 2 g/L

- 0.050 g Serva-Inulin in einen 25 mL-Messkolben einwiegen
- mit H₂SO₄ 0.01 N auffüllen

Das Chromatogramm des Serva-Inulins befindet sich in Anhang 4.

Parametereinstellungen an der HPLC

- der Fluss auf 0.5 mL/min einstellen
- den Säuleofen auf Raumtemperatur einstellen

Parametereinstellung am Detektor

Man kann aus Tabelle 9 die Parametereinstellung am Detektor sehen.

Tabelle 9: Parametereinstellung am Detektor.

Parameter	Bedeutung der Parameter	Wert
Zero	Basislinieverschiebung	10
ATT^2	Regulieren der Höhe des Peaks	5
CHT SP	Papiergeschwindigkeit	0.5
PK WD	Aufspürung des Peaks	0.2
THRSH	Glätten der Basislinie	3

Wenn alle Parameter eingestellt sind, das System 30 min äquilibrieren.

Kalibrierung der HPLC

- den Standard injizieren
- CALIB ESTD drücken
- 5 und ENTER drücken
- das Retentionszeit einfügen und ENTER drücken
- die Konzentration des Standards einfügen und ENTER drücken
- LIST CALIB drücken
- Standard erneut injizieren
- RKALB und ENTER drücken (um Mittelwert aus bisherigen Läufen zu bilden)
- Noch zweimal den Standard injizieren

Proben

Als Laufmittel ist Schwefelsäure 0.01 N verwendet worden. Die Proben wurden verdünnt, um eine Konzentration unter 2 g/L zu erhalten. Die Verdünnung wurde mit Laufmittel realisiert. Dann wurden 100 µL des Kulturüberstand, zentrifugiert bei 8500 g, 10 min und filtriert (0.45 µm), in die HPLC injiziert. Eine Probe des Mediums ohne Inulin wurde in der HPLC gemessen, um die Verfälschung durch im Medium enthaltenes Ammoniumsulfat, welches einen Peak mit gleicher Retentionszeit ergibt, zu eliminieren.

Die Inulinkonzentration in g/L wurde mit der Gleichung 2 berechnet. Aus Tabelle 10, ist die Bedeutung der Abkürzung der Gleichung 2.

$$\text{Inulinkonzentration [g/L]} = \text{Konz}_{\text{SS}} \cdot \frac{\text{Fläche}_{\text{IP}} - \text{Fläche}_{\text{SP}}}{\text{Gesamtfläche}}$$

(Gleichung 2)

Tabelle 10: Bedeutung der Abkürzung.

Abkürzung	Bedeutung
Konz _{SS}	Konzentration des Servastandard
Fläche _{IP}	Fläche des Inulinpeaks
Fläche _{SP}	Fläche des Salzpeaks

2.3.8 Bestimmung der Enzymaktivität mit der DNSA-Methode

Die Messung der Enzymaktivität wurde nach einem Protokoll verwirklicht, das in der Literatur gefunden wurde. [12]

Dieses wurde folgendermaßen übernommen:

Vorbereitung des Natriumacetatpuffer 0.1 M, pH 5.5

Die Vorbereitung des Natriumacetatpuffers 0.1 M, pH 5.5 wie folgt durchgeführt:

- Vorbereitung der Lösung A:
13.61 g C₂H₃O₂Na · 3H₂O abwiegen und in einen 1 L-Messkolben geben mit VE-H₂O auffüllen
- Vorbereitung der Lösung B:
1.2 mL C₂H₄CO₂ in einen 200 mL-Messkolben pipettieren
- 840 mL der Lösung A mit 160 mL der Lösung mischen

Vorbereitung einer Inulinlösung 2 %

- 5 g Raftilose-Inulin abwiegen, in einen 250 mL-Messkolben geben und mit Natriumacetatpuffer 0.01 M, pH 5.5 auffüllen

Vorbereitung der NaCl 0.1 M

- 2.9 g NaCl in einen 500 mL-Messkolben einwiegen
- mit VE-H₂O auffüllen

Vorbereitung NaOH 0.4 M

- 8 g NaOH in einen 500 mL-Messkolben einwiegen
- mit VE-H₂O auffüllen

Vorbereitung einer Färbereagenzlösung (DNSA-Reagenz)

- 1 % Dinitrosalicylsäure
- 30 % Na-K-Tartrat
- NaOH 0.4 M auffüllen

Vorbereitung der Standards

Die Standards sind wie in Tabelle 11 gezeigt durchgeführt worden.

Tabelle 11: Aufbau der Standards.

Standard	Konzentration in Raftilose [mM]	Raftiloselösung [μ L]	VE-H ₂ O [mL]
1	0.4	20	9.98
2	0.8	40	9.96
3	1.2	60	9.94
4	1.6	80	9.92
Leerwert	0.0	0	10.00

Erstellung der Eichgeraden

Die Eichgerade ist wie in Tabelle 12 gezeigt realisiert worden.

Tabelle 12: Aufbau der Eichgeraden.

Standard	Standardlösung [mL]
1	0.50
2	
3	
4	
Leerwert	0.50 mL VE-H ₂ O

Diese Standards und der Leerwert wurden in Eppendorf-Cups pipettiert.

- 0.50 mL DNSA-Reagenz hinzufügen
- 10 min bei 100 °C inkubieren
- 10 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Proben in Plastikküvetten bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen den Leerwert messen

Proben

Die Proben und die Leerwert wurden wie in Tabelle 13 angesetzt.

Tabelle 13: Vorbereitung des Reaktionsgemisch für den Leerwert und die Proben.

Legende: (*) Der Kulturüberstand wurde zentrifugiert 10 min bei 4 °C in 8500 g.

Produkte	Leerwert	Probe
VE-H ₂ O [mL]	750	725
Inulinlösung [µL]	50	50
Natriumacetatpuffer [µL]	100	100
NaCl [µL]	100	100
Kulturüberstand *	0	25

- 20 min bei 50 °C in einen Wasserbad inkubieren
- 10 min bei 100 °C in einen Thermoblock inaktivieren
- 10 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- die Extinktion bei 546 nm gegen der Leerwert messen
- Mit der Gleichung 3, die Raftilosekonzentration berechnen

$$\text{Raftilosekonzentration [g/L]} = \frac{\text{Extinktion}_{546\text{nm}} \text{ der Probe} - \text{Ordinate der Eichgerade}}{\text{Steigung der Eichgerade}}$$

(Gleichung 3)

2.3.9 Bestimmung der Inulinaseaktivität mit der HPLC-Methode

Die Messung der Aktivität der Endoinulinase von *Paenibacillus spec.* FH 138 wurde nach einem Protokoll verwirklicht, das in der Literatur gefunden wurde. [14]

Dieses wurde folgendermaßen übernommen:

H₂SO₄ 0.01 N

- 270 µL H₂SO₄ 98 % in eine Flasche mit 999.73 mL VE-H₂O pipettieren
- 20 min bei 20 °C im Ultraschalbad vorentgasen
- mit Helium für 10 min entgasen

Vorbereitung des Standards

Raftilose-Inulin 1 g/L

- 0.025 g Raftilose-Inulin in einen 25 mL-Messkolben einwiegen
- mit H₂SO₄ 0.01 N auffüllen

In Anhang 5 befindet sich das Chromatogramm des Raftilosestandards.

Inulinlösung 2 %

- 4 g Raftilose-Inulin in einen 200 mL-Messkolben einwiegen
- mit Natriumacetatpuffer 0.1 M, pH 5.5 auffüllen

Parametereinstellung an der HPLC

- der Fluss auf 0.5 mL/min einstellen
- den Säuleofen auf Raumtemperatur einstellen

Parametereinstellung am Detektor

Man kann aus Tabelle 14 die Parametereinstellung am Detektor sehen.

Tabelle 14: Parametereinstellung am Detektor.

Parameter	Bedeutung der Parameter	Wert
Zero	Basislinieverschiebung	10
ATT^2	Regulieren der Höhe des Peaks	5
CHT SP	Papiergeschwindigkeit	0.5
PK WD	Aufspürung des Peaks	0.2
THRSH	Glätten der Basislinie	3

Wenn alle Parameter eingestellt sind, das System 30 min äquilibrieren.

Kalibrierung der HPLC

- den Standard injizieren
- CALIB ESTD drücken
- 5 und ENTER drücken
- Das Retentionszeit einfügen und ENTER drücken
- Die Konzentration des Standards einfügen und ENTER drücken

- LIST CALIB drücken
- Standard erneut injizieren
- RKALB und ENTER drücken (um Mittelwert aus bisherigen Läufen zu bilden)

Noch zweimal den Standard injizieren

Proben

- 0.50 mL Kulturüberstand (zentrifugiert 10 min bei 4 °C 8500 g und filtriert) mit 0.25 mL Inulinlösung 2 % mischen
- 60 min bei 50°C in einen Wasserbad inkubieren
- Um die Reaktion zu stoppen, sind die Proben auf Eis gestellt worden
- 10 min bei 16110 g und bei 4 °C zentrifugieren
- mit einen Filter 0.45 µm filtrieren
- Die Proben ohne Verdünnung injizieren

Das Laufmittel ist Schwefelsäure 0.01 N. Die Inulobiosekonzentration ist mit der Gleichung 4 bestimmt worden. Aus Tabelle 15 ist die Bedeutung der Abkürzungen der Gleichungen 4 und 5 ersichtlich.

$$\text{Inulobiosekonzentration [g/L]} = \text{Konz}_{\text{RS}} \cdot \frac{\text{Fläche}_{\text{IP}}}{\text{Gesamtfläche}}$$

(Gleichung 4)

Die Inulinaseaktivität ist mit der Gleichung 5 berechnet worden. Ein Units ist ein Mikromol des Produkts (Inulobiose) gebildet pro Minute.

$$\text{Inulinaseaktivität [U/mL]} = \frac{\text{Fläche}_{\text{IPP}} \cdot \text{Inulobiosekonzentration}}{\text{Fläche}_{\text{SI}}} \cdot \frac{\text{Reaktionsvolumen}}{\text{MM der Inulobiose} \cdot \text{Reaktionszeit}} \cdot 2$$

$$\text{Inulinaseaktivität [U/mL]} = \frac{\text{Fläche}_{\text{IPP}} \cdot \text{Inulobiosekonzentration [g/L]}}{810520} \cdot \frac{750 \mu\text{L}}{360.32 \text{ [g/mol]} \cdot 60 \text{ [min]}} \cdot 2$$

(Gleichung 5)

Tabelle 15: Bedeutung der Abkürzung der Gleichungen 4 und 5.

Abkürzung	Bedeutung
Konz _{RS}	Konzentration des Raftilosestandards
Fläche _{IP}	Fläche des Inulobiosepeaks
Fläche _{IPP}	Fläche des Inulobiosespeaks der Probe
Fläche _{SI}	Fläche des Standards des Inulobiosespeaks
MM	Molekulmasse

2.3.10 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse (BTM) wurde wie folgt gemessen:

- Die Zentrifugengläser sind für 2 Stunden im Trockenschrank bei 100 °C getrocknet worden
- Sie sind in einem Exsikkator für 30 min abgekühlt worden
- Mit einer analytische Waage auswiegen
- 10 mL der Kultur in jedes Zentrifugenglas pipettieren
- Bei 8500 g, 4 °C für 10 min zentrifugieren
- Den Kulturüberstand verwerfen, 5 mL VE-H₂O hinzufügen, um das Pelett zu waschen und noch mal zentrifugieren
- Zentrifugengläser in die Trockenschrank bei 100 °C für 15 Stunden und danach 30 min im Exsikkator abkühlen
- Zentrifugengläser wiegen, um die BTM zu berechnen

2.3.11 Bestimmung Proteinkonzentration im Kulturüberstand

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode bestimmt.

Das Prinzip der Bradford-Methode beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau an Proteine. Der Farbstoff bindet über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt an Argininreste sowie in geringem Mase an einige andere basische und aromatische Aminosäurereste. Dieser Tatsache ist u.a. durch die Wahl eines geeigneten Standards Rechnung zu tragen. [16]

Vorbereitung des Standards

Die Standards wurden wie in Tabelle 16 gezeigt hergestellt.

Tabelle 16: Erstellung der Standardgeraden des BSA.

Inulinkonzentration [µg/mL]	BSA-Lösung 1 g/L [mL]	VE-H ₂ O [mL]
20	0.200	9.80
15	0.150	9.85
10	0.100	9.90
5	0.050	9.95
2	0.020	9.98

Erstellung der Eichgerade

Die Eichgerade wurde wie folgt bestimmt:

- 800 µL von jedem Standard und 800 µL VE-H₂O für der Standard nehmen
- 200 µL 5x-Färbelösung hinzufügen und mischen
- 3 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Die Extinktion in Spektrophotometer bei 595 nm in Plastikküvetten gegen der Leerwert messen

Proben

Der Kulturüberstand wurde für 10 min bei 4 °C in 8500 g zentrifugiert und anschließend der gleichen Behandlung wie der Standard unterzogen.

Die Proteinkonzentration ist mit Gleichung 6 bestimmt worden. Aus Tabelle 17 sind die Bedeutungen der Abkürzungen der Gleichung 6 zu entnehmen.

$$\text{Proteinkonzentration [g/L]} = \frac{A_{595 \text{ nm}} - O_{EG}}{S_{EG}} \cdot 1000 = \frac{A_{595 \text{ nm}} - 0.0206}{0.038} \cdot 1000$$

(Gleichung 6)

Tabelle 17: Bedeutung der Abkürzung der Gleichung 5.

Abkürzung	Bedeutung
A_{595}	Extinktion 595 nm
O_{EG}	Ordinate der Eichgerade
S_{EG}	Steigung der Eichgerade

2.3.12 Zellausbeute

Die Zellausbeute wird mit der Gleichung 7 berechnet. Die Tabelle 18 zeigt die Bedeutungen der Variablen in der Gleichung.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \left[\frac{\text{g/L}}{\text{g/L}} \right]$$

(Gleichung 7)

Tabelle 18: Bedeutung der Variable der Gleichung 7.

Variable	Bedeutung
Y	Ausbeute [-]
X	Biomasse [g/L]
S	Substrat [g/L]

2.3.13 Abgasanalyse

Mit den Daten der Abgasanalyse und den Gleichungen 8, 9 und 10, können CPR-Wert, OUR-Wert und RQ-Wert bestimmt werden. Die Bedeutungen und die Einheiten der Parameter sind aus Tabelle 19 zuersehen.

$$\text{CPR} [\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})] = \frac{\dot{V}_G^\alpha}{V_{R,L} \cdot V_{\mu,\eta}} \cdot \left[\frac{1 - Y_{O_2}^\alpha - Y_{CO_2}^\alpha}{1 - Y_{O_2}^w - Y_{CO_2}^w} \cdot Y_{CO_2}^w - Y_{CO_2}^\alpha \right]$$

(Gleichung 8)

$$\text{OUR} [\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})] = \frac{\dot{V}_G^\alpha}{V_{R,L} \cdot V_{\mu,\eta}} \cdot \left[Y_{O_2}^\alpha - \frac{1 - Y_{O_2}^\alpha - Y_{CO_2}^\alpha}{1 - Y_{O_2}^w - Y_{CO_2}^w} \cdot Y_{CO_2}^w \cdot Y_{O_2}^w \right]$$

(Gleichung 9)

$$\text{RQ} [-] = \frac{\text{CPR}}{\text{OUR}}$$

(Gleichung 10)

Tabelle 19: Bedeutung Parameter in den Gleichungen 8, 9 und 10.

Parameter	Name	Wert und /oder Einheit
OUR	Sauerstoffaufnahme	[mol/(Lh)]
CPR	Kohlendioxidbildungsrate	[mol/(Lh)]
RQ	Respirationkoeffizient	[-]
\dot{V}_G^α	Gasvolumensstrom in den Reaktor	[L/h]
$V_{R,L}$	Reaktionsvolumen	[L]
$V_{\mu,\eta}$	Molvolumen Luft	22.4 [L/mol]
$Y_{O_2}^\alpha$	O ₂ -Anteil in der Luft im Eingangsstrom	0.21 [-]
$Y_{CO_2}^\alpha$	CO ₂ -Anteil in der Luft im Eingangsstrom	0.0004 [-]
$Y_{O_2}^w$	O ₂ -Anteil in der Luft im Ausgangsstrom	Wert gemessen
$Y_{CO_2}^w$	CO ₂ -Anteil in der Luft im Ausgangsstrom	Wert gemessen

Die Tabelle 20 zeigt die Bedeutung des Respirationkoeffizienten.

Tabelle 20: Bedeutung des Respirationskoeffizienten RQ bei Kohlenhydraten als Substrat.

RQ [-]	Bedeutung
< 1	Produktbildung (CO ₂ wird fixiert)
= 1	Normal Aerob Prozess (CO ₂ -Produktion und O ₂ -Verbrauch sind im Gleichgewicht)
> 1	Sauerstoffmangel

2.3.14 Optimierung der HPLC-Methode für die Inulinaseaktivität

Die HPLC-Methode musste optimiert werden, als der pH-Wert im Reaktionsmedium nicht 5.5 war und die Reaktion ist aus Eis nicht gestoppt.

Die Optimierung des Tests zur Bestimmung der Inulinaseaktivität mit der HPLC-Methode wurde wie folgt realisiert:

H₂SO₄ 0.01 N

- 270 µL H₂SO₄ in eine Flasche mit 999.73 mL VE-H₂O pipettieren
- 20 min bei 20 °C im Ultraschalbad vorentgasen
- mit Helium für 10 min entgasen

Vorbereitung des Standards

Raftilose-Inulin 1 g/L

- 0.025 g Raftilose-Inulin in einen 25 mL-Messkolben einwiegen
- mit H₂SO₄ 0.01 N auffüllen

Inulinlösung 2 %

- 4 g Raftilose-Inulin in einen 200 mL-Messkolben einwiegen
- mit Natriumacetatpuffer 0.1 M, pH 5.5 auffüllen

Natriumacetatpuffer 2 M, pH 5.5

- Vorbereitung der Lösung A:
136 g C₂H₃O₂Na 3 H₂O abwiegen und in einen 500 mL-Messkolben geben mit VE-H₂O auffüllen
- Vorbereitung der Lösung B:
11.96 mL C₂H₄O₂ in einen 100 mL-Messkolben pipettieren
- 420 mL der Lösung A mit 80 mL der Lösung B mischen

Parametereinstellung an der HPLC

- der Fluss auf 0.5 mL/min einstellen
- den Säuleofen auf Raumtemperatur einstellen

Parametereinstellung am Detektor

Man kann aus Tabelle 21 die Parametereinstellung am Detektor sehen.

Tabelle 21: Parametereinstellung am Detektor.

Parameter	Bedeutung der Parameter	Wert
Zero	Basislinieverschiebung	10
ATT^2	Regulieren der Höhe des Peaks	5
CHT SP	Papiergeschwindigkeit	0.5
PK WD	Aufspürung des Peaks	0.2
THRSH	Glätten der Basislinie	3

Wenn alle Parameter eingestellt sind, das System 30 min äquilibrieren.

Kalibrierung der HPLC

- den Standard injizieren
- CALIB ESTD drücken
- 5 und ENTER drücken
- Das Retentionszeit einfügen und ENTER drücken
- Die Konzentration des Standards einfügen und ENTER drücken
- LIST CALIB drücken
- Standard erneut injizieren
- RKALB und ENTER drücken (um Mittelwert aus bisherigen Läufen zu bilden)
- Noch zweimal den Standard injizieren

Linearitäts-Test

Dieser Test wurde wie folgt durchgeführt:

Der Kulturüberstand, die Inulinlösung und der Natriumacetatpuffer werden auf 50 °C erwärmt und wie in Tabelle 22 gezeigt gemischt.

Tabelle 22: Vorbereitung des Reaktionsgemisches.

Test	Verdünnung des Enzyms	Inulinlösung 2 % [mL]	Kulturüberstand [mL]	Natriumacetatpuffer 2 M, pH 5.5 [mL]
1	keine	5	10	keine
2	0.5	5	5	5

- Jede 10 min, eine Probe (750 µL) aus dem Reaktionsgemisch entnehmen (die Probe bei t= 0 min nicht vergessen)
- Bei 100 °C für 10 min inaktivieren
- Mit einem Filter (0.45 µm) filtrieren
- Die Probe ohne Verdünnung an der HPLC injizieren
- Die Inulobiosekonzentration (Gleichung 4) als Funktion der Inkubationszeit für die beide Tests auftragen

Proben

- 0.50 mL Kulturüberstand mit 0.25 mL Inulinlösung 2 % mischen
- 30 min bei 50°C in einen Wasserbad inkubieren
- 10 min bei 100 °C in einem Thermoblock inaktivieren
- 10 min bei 16110 g und bei 4 °C zentrifugieren
- mit einen Filter 0.45 µm filtrieren
- Die Proben ohne Verdünnung injizieren

Das Laufmittel ist Schwefelsäure 0.01 N. Die Inulobiosekonzentration ist mit der Gleichung 4 und die Inulinaseaktivität mit der Gleichung 5 bestimmt worden.

2.3.15 Optimierung der DNSA-Methode für die Enzymaktivität

Die DNSA-Methode musste optimiert werden, als der pH-Wert im Reaktionsmedium nicht 5.5 war und keine Extinktion ist bekommen. Die Optimierung des Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität mit der DNSA-Methode wurde wie folgt durchgeführt:

Natriumacetatpuffer 2 M, pH 5.5

- Vorbereitung der Lösung A:
136 g $C_2H_3O_2Na \cdot 3 H_2O$ abwiegen und in einen 500 mL-Messkolben geben mit VE- H_2O auffüllen
- Vorbereitung der Lösung B:
11.96 mL $C_2H_4O_2$ in einen 100 mL-Messkolben pipettieren
- 420 mL der Lösung A mit 80 mL der Lösung B mischen

Vorbereitung einer 2 %-igen Inulinlösung

- 5 g Raftilose-Inulin abwiegen, in einen 250 mL-Messkolben geben und mit Natriumacetatpuffer 0.01 M, pH 5.5 auffüllen

Vorbereitung einer Fruktosestammlösung

- 0.2 g Fruktose in einen 20 mL-Messkolben wiegen
- mit Natriumacetatpuffer 2 M, pH 5.5 füllen

Vorbereitung einer Färbereagenzenlösung (DNSA-Reagenz)

- 1 % Dinitrosalicylsäure
- 30 % Na-K-Tartrat
- NaOH 0.4 M auffüllen

Vorbereitung der Standards

Die Vorbereitung der Standards wurde wie in Tabelle 23 gezeigt realisiert.

Tabelle 23 : Vorbereitung der Standard für die Eichgerade.

Standardkonzentration [g/L]	Fruktoselösung [mL]	VE-H ₂ O [mL]
0.250	0.625	24.375
0.500	1.250	23.125
0.750	1.875	22.500
1.000	2.500	21.250
1.500	3.750	21.250
Leerwert	0	25

Kulturüberstand

Der Kulturüberstand wurde so vorbereitet:

- Eine 3 mL-Probe der Fermentation nehmen
- 10 min, bei 4 °C und 8500 g zentrifugieren
- Kulturüberstand abziehen

Linearitäts-Test

Dieser Test wurde wie folgt durchgeführt:

Der Kulturüberstand, die Inulinlösung und der Natriumacetatpuffer 2 M, pH-Wert 5.5 werden auf 50 °C erwärmt und wie in Tabelle 24 gezeigt gemischt. Diese Versuche wurden immer 3-mal gemacht. Dieser Test wurde bei 50 °C durchgeführt.

Tabelle 24: Vorbereitung des Reaktionsgemisches.

Legende: L.T1= Leerwert von der Test 1, L.T2= Leerwert von der Test 2.

Test	Verdünnung des Enzyms	Inulinlösung 2 % [mL]	Kulturüberstand [mL]	VE-H ₂ O [mL]	Natrium-acetatpuffer 2 M, pH, 5.5 [mL]
1	keine	1.250	2.500	keine	keine
2	0.5	1.250	1.250	keine	1.250
L.T1	keine	1.250	keine	2.500	keine
L.T2	keine	1.250	keine	1.250	1.250

- Jede 10 min, eine 500 μ L-Probe aus dem Reaktionsgemisch entnehmen (die Probe bei $t = 0$ min nicht vergessen)
- 500 μ L DNSA-Reagenz hinzufügen
- Bei 100 °C für 10 min inaktivieren
- 10 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Bei 546 nm in Spektrophotometer die Extinktion gegen der Leerwert messen
- Die Inkubationszeit als Funktion der Extinktion 546 nm übertragen

Eichgerade

Die Eichgerade wurde wie folgt bestimmt:

- 0.5 mL von jedem Standard nehmen
- 0.5 mL DNSA-Reagenz hinzufügen
- Bei 100 °C, 10 min inaktivieren
- Bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Bei 546 nm die Extinktion gegen der Leerwert messen
- Die Standardkonzentration über der Extinktion auftragen

Proben

- 0.5 mL Kulturüberstand mit 0.25 mL Inulinlösung (2%) mischen
- 10 min bei 50 °C
- bei 100 °C, 10 min inaktivieren
- bei Raumtemperatur, 10 min abkühlen lassen
- bei 546 nm die Extinktion gegen der Leerwert messen
- mit den Gleichungen 11 und 12 die Enzymaktivität berechnen

Die Fruktosekonzentration wurde mit der Hilfe der Eichgeraden bestimmt. Man kann es aus Gleichung 11 sehen. Die Enzymaktivität wurde dann mit der Gleichung 12

berechnet. Aus Tabelle 25 können die Bedeutungen der Abkürzungen der Gleichungen 11 und 12 entnommen werden.

$$\text{Fructosekonzentration [g/L]} = \frac{A_{546\text{ nm}} - O_{\text{EG}}}{S_{\text{EG}}} = \frac{A_{546\text{ nm}} - 0}{2.7808}$$

(Gleichung 11)

$$\text{Enzymaktivität [U/mL]} = \text{Fructosekonzentration} \cdot \frac{RV}{MM \text{ der Fructose} \cdot RT} \cdot 2$$

$$\text{Enzymaktivität [U/mL]} = \text{Fructosekonzentration [g/L]} \cdot \frac{500[\mu\text{L}] \cdot 2}{180 [\text{g/mol}] \cdot 20 [\text{min}]}$$

(Gleichung 12)

Tabelle 25: Bedeutung der Abkürzung von den Gleichungen 11 und 12.

Abkürzung	Bedeutung
A_{546}	Extinktion 546 nm der Probe
O_{EG}	Ordinate der Eichgerade
S_{EG}	Steigung der Eichgerade
RV	Reaktionsvolumen
RT	Reaktionszeit
MM	Molekulmasse

2.3.16 Lokalisation der Endoinulinase

Dieser Test soll zeigen, in wie weit das Enzym während der Kultivierung extrazellulär vorliegt. Weil wir bis jetzt nicht genau wissen, ob das Enzym sekretiert ist oder bei der Autolyse freigesetzt wird. Man weiß, dass die Inulinaseaktivität erst nach dem Wachstum, im Kulturüberstand auftritt.

Dieser Test wurde wie folgt durchgeführt:

Die Inulinaseaktivität wurde mit der HPLC-Methode gemessen. Ein Teil der Proben der Fermentation sind vor der Analyse in der HPLC mit dem Ultraschall Finger zum Zellaufschluss behandelt worden. Die Ergebnisse wurden mit Ergebnisse ohne Ultraschallbehandlung verglichen.

Parameter des Ultraschalls Fingers

Die Parameter des Ultraschalls Fingers wurden wie in Tabelle 26 eingestellt:

Tabelle 26: Parameter des Ultraschalls Fingers.

Parameter	Bedeutung der Parameter	Wert
Output Control	Amplitude an der Schallabstrahlenden Fläche des Arbeitskopfes	6
Duty Cycle	Pulselänge	60%

Durchführung mit dem Ultraschall Finger

- Die Elektrode ist in VE-H₂O installiert
- Die Parameter des Ultraschalls Fingers einstellen
- Die Proben in einen Becher (mit Eis gefüllt) setzen
- Den Ultraschall Finger in die Probe setzen
- Den Apparat für 10 sec einstellen
- 30 sec abkühlen lassen
- 5-mal wiederholen
- Die Proben zentrifugieren bei 4 °C, 10 min in 8500 g und mit einem Filter (0.45 µm) filtrieren
- Die Proben an der HPLC injizieren

3 Ergebnisse

3.1 Fermentationen

3.1.1 Kultivierung auf Agarplatten zum Stammvergleich der *Paenibacillus spec.*

Der Vergleich der fünf Stämme ist gemäß Kapitel 2.3.2 erfolgt worden.

Die Experimente mit den beidem Nährmedium 1 und 2 zeigten, dass nur der Stamm mit der Bezeichnung FH-138 im Medium 2 ein ausreichend gutes Wachstum zeigte um damit in der Fermentation weiterzuarbeiten. Die anderen Stämme zeigten kein oder nur schlechtes Wachstums mit sehr langer Lag-Phase (> 24 h).

Auf Nährmedium 1 fand überhaupt kein Wachstum statt.

3.1.2 Fermentationen in Schüttelkultur

Die Fermentation in Schüttelkultur wurde gemäß Kapitel 2.3.3 und 2.3.4 durchgeführt.

Die vier Vorkulturen wurden 24 Stunden inkubiert. Die Schüttelkulturen wurden bei einer OD von 0.5 angeimpft.

Optische Dichte und Inulinkonzentration

Die Darstellung der optischen Dichte und die Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit sind in Abbildung 5 zu sehen für eine Fermentation in Schüttelkultur bei 50 °C, 160 U/min und 50 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der HPLC-Methode bestimmt. Die zwei Kurven, die dargestellt sind, sind die Mittelwerte von den vier Kulturen in der Schüttelkultur.

Die Inulinkonzentration am Anfang ist 5.03 ± 0.15 g/L. Dann fällt diese Konzentration über 15 h auf 0.16 ± 0.1 g/L. Danach die Inulinkonzentration bleibt mehr oder weniger konstant. Man sieht, dass die Fehler um $t = 6, 8$ und 15 h groß sind ± 1.36 , ± 1.18 und ± 0.11 g/L. Für die anderen Messpunkte sind die Fehler deutlich geringer.

Nach 6 h Fermentationszeit ist die OD 1.185 ± 0.026 . Dann die optische Dichte fällt unregelmäßig bis 44 h. auf 0.650 ± 0.16 . Am Ende der Fermentation steigt die OD nochmals auf einem Wert von 1.39 ± 0.089 an.

Zu Beginn steigt die OD schnell an und die Inulinasekonzentration nimmt stark ab. Bei ca. 6 h hat die OD ihr erstes Maximum erreicht und bleibt etwa konstant während die Inulinasekonzentration weiter stark abfällt. Am Ende der Fermentation steigt die OD nochmals an, obwohl kein Inulin mehr vorhanden ist.

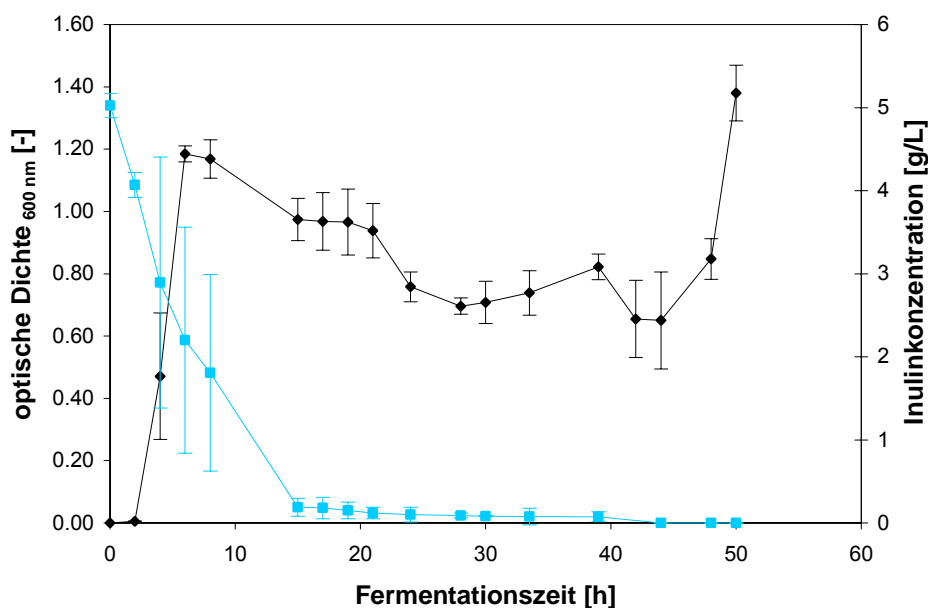


Abbildung 5: Optische Dichte und Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für vier Fermentationen in 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 160 U/min und 50 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der HPLC-Methode bestimmt.

Legende: (♦) Optische Dichte (■) Inulinkonzentration.

Inulinaseaktivität

Die Inulinaseaktivität im Kulturüberstand ist gemäß Kapitel 2.3.9 mit der HPLC-Methode bestimmt worden.

Aus Abbildung 6 ist die Darstellung der Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit von einer 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus spec.* FH-138 zu sehen. Die Bedingungen sind 50 °C, 160 U/min und 50 Stunden. Die Kurve der Inulinaseaktivität ist der Mittelwert aus den 4 Schüttelkulturen.

Die Inulinaseaktivität erscheint ab 4 h der Fermentation. Sie erreicht 0.08 ± 0.02 U/mL und steigt im Verlauf der Kultivierung an. Am Ende der Fermentation haben wir eine Inulinaseaktivität von 0.3 ± 0.05 U/mL. Man sieht auch, dass die Fehler um $t = 21, 30, 33.5$ und 48 h mit $\pm 0.08, \pm 0.10, \pm 0.10$ und ± 0.09 U/mL groß sind.

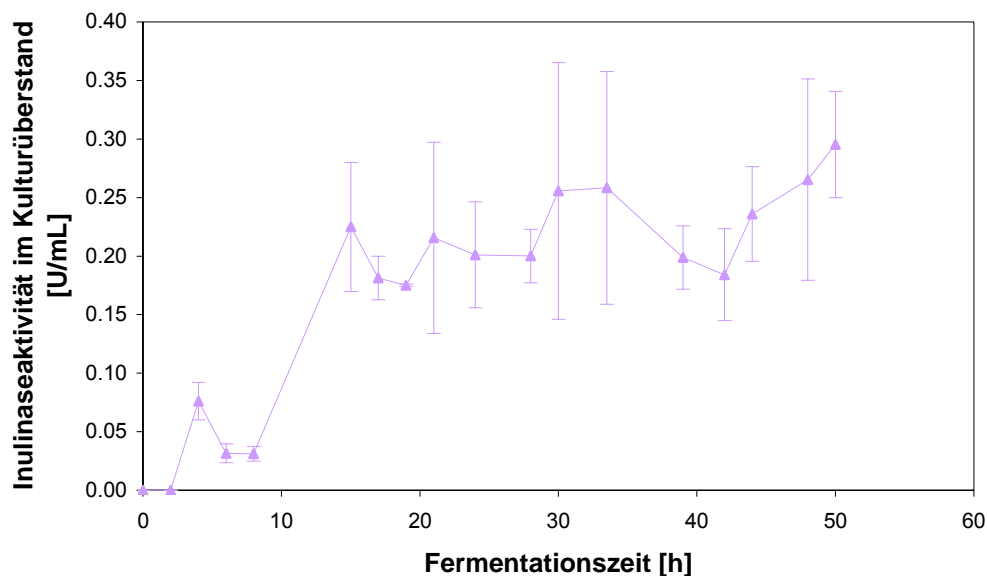


Abbildung 6: Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit für eine 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 160 U/min und 50 Stunden.

Zusammenfassung der Kultur

Aus Abbildung 7 sehen wir die Zusammenfassung der Fermentation in der 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus spec.* FH-138 als Funktion der Fermentationszeit. Die Bedingungen sind 50 °C, 160 U/min, 50 Stunden. Die Fehler sind nicht dargestellt, um die Abbildung klarer zu machen.

Bei $t = 15$ h hat die Inulinaseaktivität ein Plateau erreicht. Sie bleibt mehr oder weniger konstant. Zu dieser Zeit, fällt die OD und die Inulinkonzentration ist sehr niedrig.

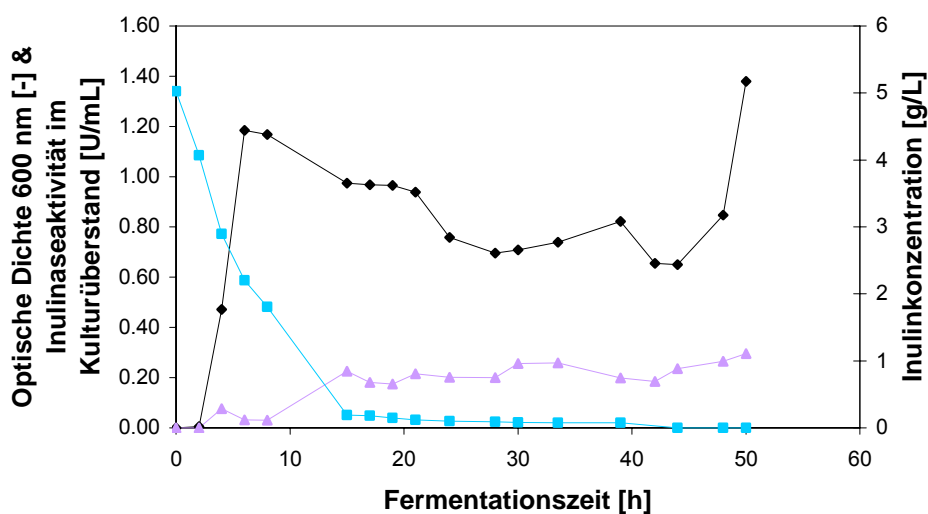


Abbildung 7: Zusammenfassung des Laufs der Fermentation in der 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus sp.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 160 U/min und 50 Stunden.

Legende: (♦) optische Dichte, (■) Inulinkonzentration, (▲) Inulinaseaktivität im Kulturüberstand.

3.1.3 Optimierung der Vorkultur für die Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Diese Optimierung der Vorkultur ist gemäß Kapitel 2.3.4 durchgeführt worden. Zwei der Ansätze zeigten kein Wachstum, die Ergebnisse der 4 anderen Schüttelkulturen sind hier dargestellt.

Optische Dichte, Inulinkonzentration, pH

Die optische Dichte und die Inulinkonzentration sind gemäß den Kapiteln 2.3.5 und 2.3.6 bestimmt worden.

Man kann in Abbildung 8 den Verlauf der optischen Dichte und der Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für vier Fermentationen in 1 L-Schüttelkultur bei 50°C, 160 U/min und 30.5 Stunden sehen. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Während der ersten 16.5 Stunden ist die optische Dichte fast immer sehr gering. Wir sehen, dass die exponentielle Phase sich zwischen 16.5 h und 24 h befindet. Dann die OD bleibt mehr oder weniger konstant.

Die Inulinkonzentration ist am Anfang 5.02 ± 0.1 g/L. Dann fällt sie relativ langsam und ab 18 h fällt sie stärker ab. Am Ende der Fermentation ist eine Inulinkonzentration von 0.25 ± 0.23 g/L erreicht.

Nach 24 h wenn die OD ihren maximalen Wert hat, beträgt die Inulinkonzentration 2.78 ± 0.22 g/L.

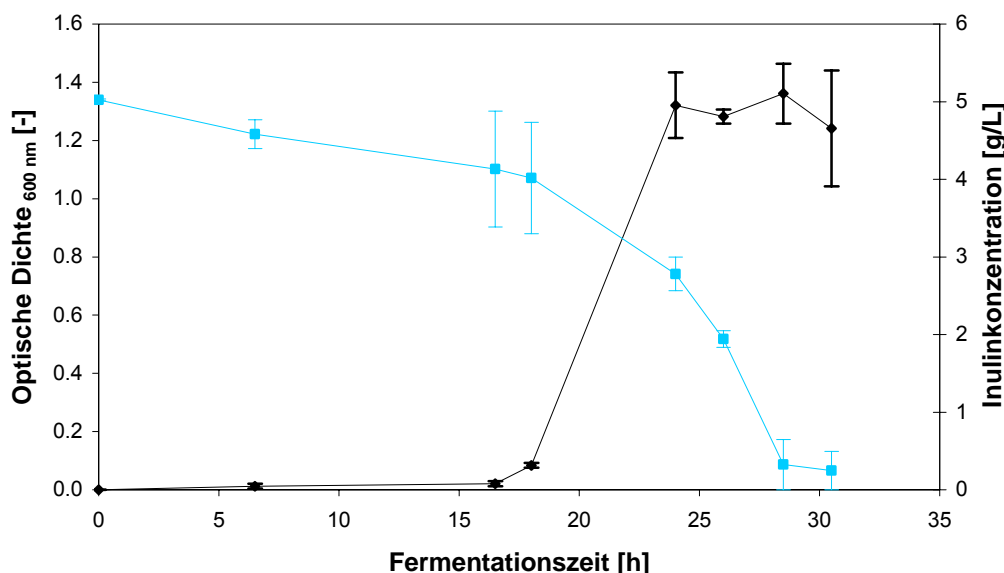


Abbildung 8: Optische Dichte und Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation in 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 160 U/min und 30.5 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Legende: (♦) Optische Dichte (■) Inulinkonzentration.

Der pH wurde nur am Anfang und am Ende der Fermentation für jede Kultur gemessen. Um $t = 0$ h haben wir einen pH-Wert von 6.2 ± 0 . Und am Ende der Fermentation ist er 4.9 ± 0.6 .

3.1.4 Erste Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Die Fermentation im 10 L-Bioreaktor ist gemäß Kapitel 2.3.4 durchgeführt worden. Die Vorkulturen wurden mit dem Nährmedium 2 angesetzt. Das Ammoniumsulfat ist in doppelt Menge, das heißt 1 g/L und die Inulinlösung mit 10 g/L im Nährmedium der Kultur vorhanden. Die optische Dichte der Vorkulturen im Zeitpunkt der Inokulation ist 0.895. Dieser Wert ist nach 27 Stunden Fermentation in die Schüttelkulturen erreicht.

Optische Dichte, Inulinkonzentration und Biotrockenmasse

Die Bestimmung der optische Dichte, der Inulinkonzentration und der Biotrockenmasse sind gemäß Kapiteln 2.3.5, 2.3.6 und 2.3.10 durchgeführt worden.

Man kann in Abbildung 9 den Verlauf der optischen Dichte und die Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor bei 50°C , 1000 U/min, 1 vvm und 42 Stunden sehen. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Wir können sich vorstellen, dass es eine exponentielle Phase zwischen 0 und 18 Stunden gibt. Nach 18 h Fermentationszeit erreicht die OD 1.376. Die maximale optische Dichte um 25.5 h mit einem Wert von 1.59 erreicht.

Die Inulinkonzentration am Anfang der Fermentation ist 9.31 g/L. Dann fällt diese und es bleiben nach 18 Stunden der Fermentationszeit nur 0.39 g/L. Diese Inulinkonzentration ist konstant bis am Ende der Fermentation.

Man sieht, dass wenn die optische Dichte ansteigt, sich die Inulinkonzentration vermindert. Dennoch wachsen ab 18 h, die Bakterien während die Inulinkonzentration konstant bleibt.

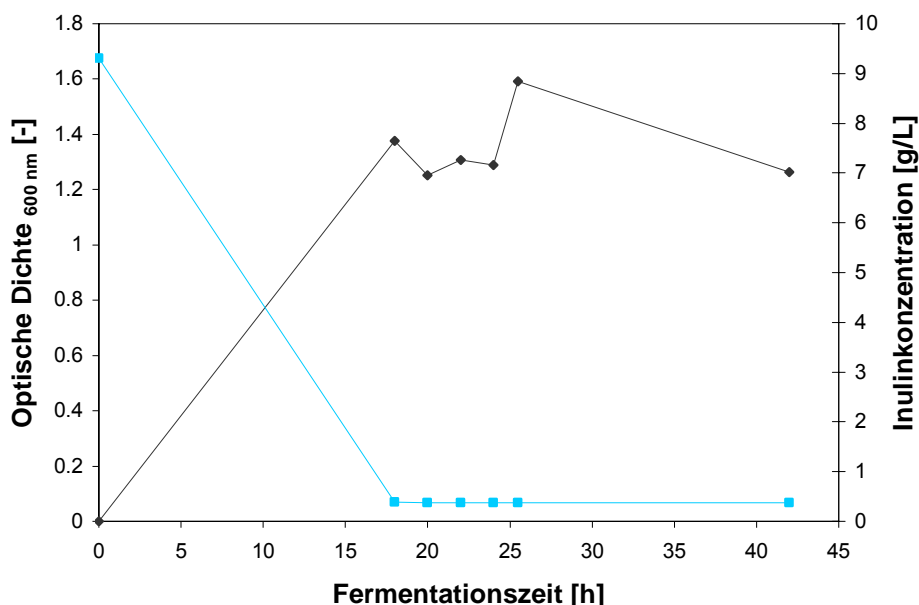


Abbildung 9: Optische Dichte und Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH 6.5 und 42 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Legende: (♦) Optische Dichte (■) Inulinkonzentration.

Die Ergebnisse für die Biotrockenmasse sind nicht dargestellt, weil keine Korrelation zwischen der optischen Dichte und der BTM besteht.

Inulinaseaktivität

Die Inulinaseaktivität im Kulturüberstand ist gemäß Kapitel 2.3.9 durchgeführt worden. Die Inulinaseaktivität ist mit der HPLC-Methode bestimmt worden.

Aus Abbildung 10 ist die Darstellung der Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit von einer Kultur des *Paenibacillus sp.* FH-138 zusehen. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH 6.5 und 42 Stunden.

Die Inulinaseaktivität erscheint ab 18 h der Fermentation und erreicht 0.67 U/mL. Am Ende der Fermentation haben wir eine Inulinaseaktivität von 0.82 U/mL erreicht.

Im Verlauf der Kultivierung steigt die Inulinaseaktivität langsam weiter an.

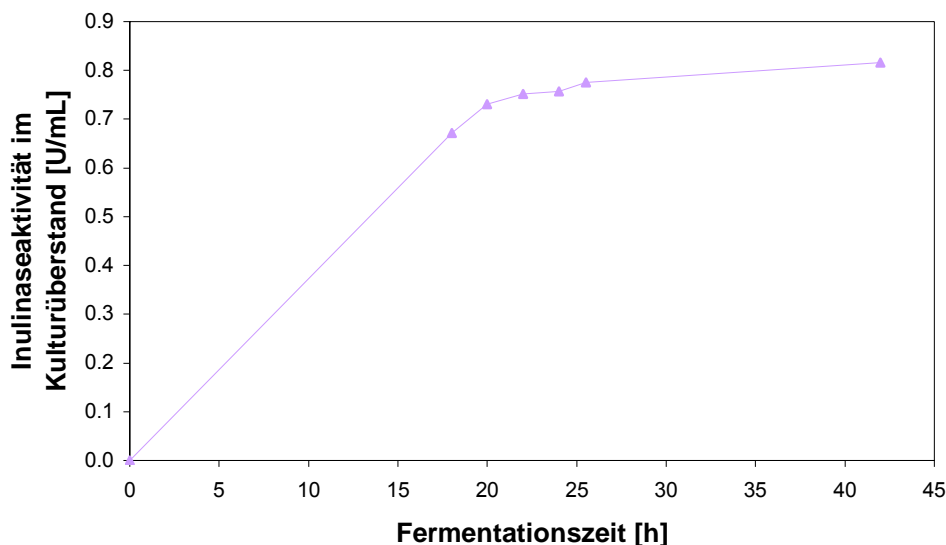


Abbildung 10: Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus sp.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH 6.5 und 42 Stunden.

pH- und pO₂-Verlauf

In Abbildung 11 ist der Verlauf des pH-Wertes und des pO₂ als Funktion der Fermentationszeit im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138 dargestellt. Die Bedingungen der Vorkultur sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm und 42 Stunden.

Der pH-Wert ist am Anfang 6.54, und steigt dann langsam. Der Wert am Ende der Fermentation ist 7.2

Man sieht allgemein, dass der pO₂-Wert sehr hoch bleibt während der Fermentation. Um 15 h Fermentationszeit, die pO₂ ist noch 100 %. Wir beobachten nach 17 h, dass wenn PPG 2000 zugegeben wird, der pO₂ abfällt. Schlussendlich bleiben die Werte der pO₂ bei 95 %.

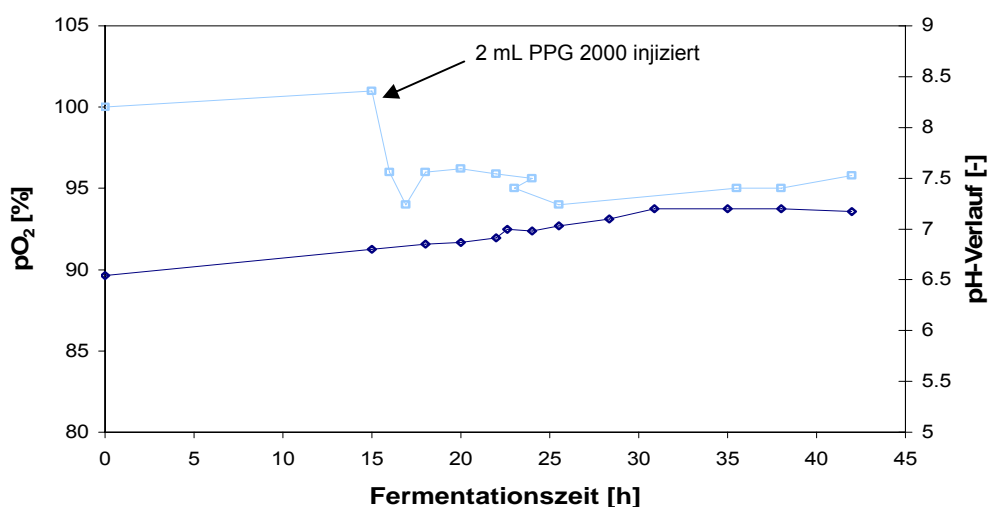


Abbildung 11: pH- und pO₂- Verlauf für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH 6.5 und 42 Stunden.

Legende: (□) pO₂ (◇) pH.

Abgasanalyse

Die Werte für OUR, CPR und der RQ sind mit den Gleichungen 8, 9 und 10 bestimmt worden.

Zwischen 0 und 15 Stunden gibt es keine Messpunkte, weil die Abgasanalyse sich über Nacht ausgeschaltet hat.

Aus Abbildung 12 sehen wir, OUR, CPR und RQ als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH 6.5 und 42 Stunden.

Es werden nur sehr geringe Werte erreicht, so beträgt der maximale OUR nur 0.022 mol/(L*h).

Man sieht, dass OUR und CPR die gleiche Tendenz zeigen. Dennoch, ist ab 18 h, der OUR ist viel höher als der CPR, der negativ ist.

Die maximalen Werte für OUR und CPR sind 0.02 beziehungsweise 0.01 mmol/(L*h). Diese Werte sind nach 2 h gemessen.

Man sieht, dass der RQ zwischen 11.17 und -19 schwankt ab einer Fermentationszeit von 18 Stunden. Am Ende der Fermentation erreicht der RQ 0.37.

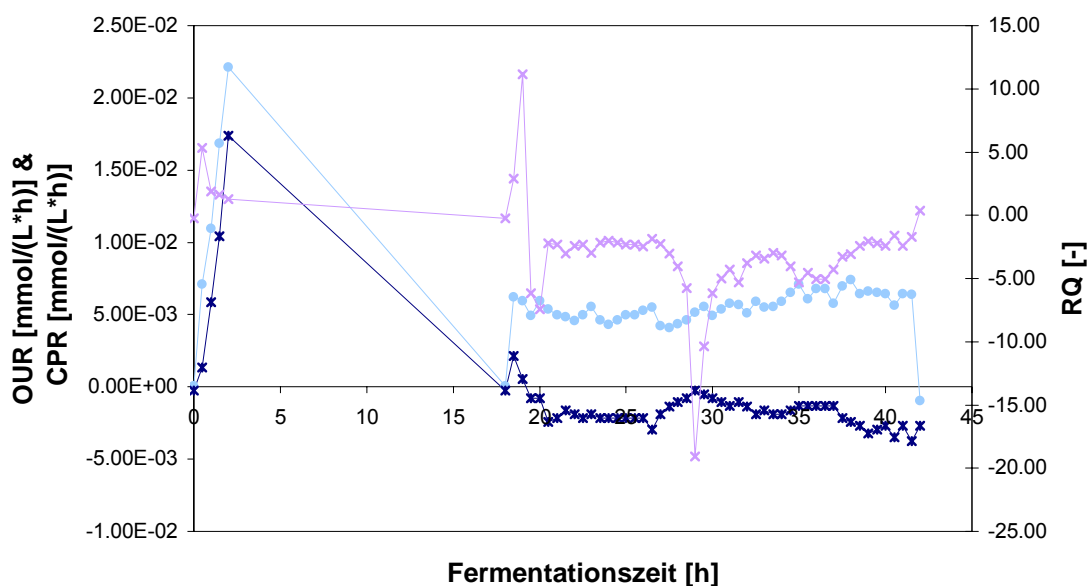


Abbildung 12: Darstellung der OUR, CPR und RQ für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH 6.5 und 42 Stunden.

Legende: (x) RQ, (*) CPR (●) OUR.

Zusammenfassung des Laufs der Fermentation

In Abbildung 13 sehen wir die Zusammenfassung der Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138 als Funktion der Fermentationszeit. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH-Wert 6.5 und 42 Stunden.

Nach 18 h beträgt die Inulinkonzentration 0.39 g/L und die OD ist 1.37. Im weiteren Verlauf nimmt die OD weiter zu, während die Inulinkonzentration bei 0.39 g/L bleibt.

Die Inulinaseaktivität erscheint wenn die optische Dichte 1.37 erreicht.

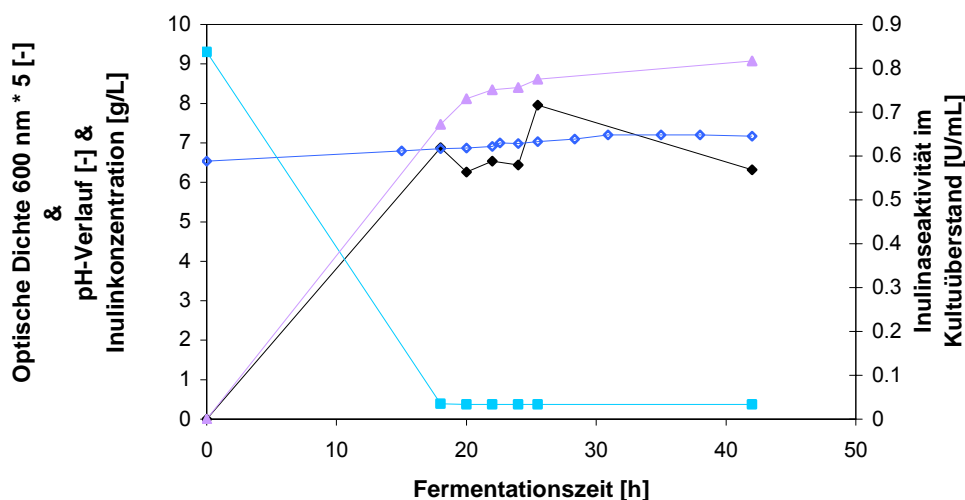


Abbildung 13: Zusammenfassung des Laufs der Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus* sp. FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 1 vvm, pH 6.5 und 42 Stunden.

Legende: (♦) optische Dichte, (■) Inulinkonzentration, (◇) pH-Wert, (▲) Inulinaseaktivität im Kulturüberstand.

3.1.5 Zweite Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Die Fermentation im 10 L-Bioreaktor ist gemäß Kapitel 2.3.4 durchgeführt worden. Die Vorkulturen sind mit dem Nährmedium 2 ohne Biotin sondern mit 0.5 g/L Hefeextrakt angesetzt worden. Die Konzentration des Ammoniumsulfats beträgt 2 g/L, die Inulinkonzentration 10 g/L und die Hefeextraktkonzentration beträgt 1 g/L. Die optische Dichte der Vorkulturen zum Zeitpunkt der Inokulation beträgt 2.456. Dieser Wert ist nach 26 Stunden Fermentation in der Schüttelkultur erreicht.

Optische Dichte, Inulinkonzentration und Biotrockenmasse

Die optische Dichte, die Inulinkonzentration und die Biotrockenmasse sind gemäß Kapiteln 2.3.5, 2.3.6 und 2.3.10 bestimmt worden. Das Volumen zur Bestimmung der Biotrockenmasse, ist von 5 mL auf 10 mL erhöht worden.

Man kann in Abbildung 14 den Verlauf der optischen Dichte und der Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor bei 50°C, 1000 U/min, 0.5 vvm und 22.25 Stunden sehen. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Wir sehen, dass die optische Dichte während der ersten 5.75 Stunden zunimmt. Ihr maximaler Wert ist 3.988. Am Ende der Fermentation ist die OD 1.968.

Die Inulinkonzentration am Anfang ist 10.41 g/L. Dann fällt diese Konzentration bis zum Zeitpunkt 5.75 h auf 1.99 g/L Inulin schnell ab. Zwischen 5.75 und 22.25 h die Inulinkonzentration weiter bis am Ende der Fermentation 0.61 g/L erreicht sind.

Es ist deutlich zu sehen, dass beim Steigen der OD die Inulinasekonzentration abnimmt und ab einer Inulinkonzentration von 1.99 g/L die Bakterien nicht mehr wachsen

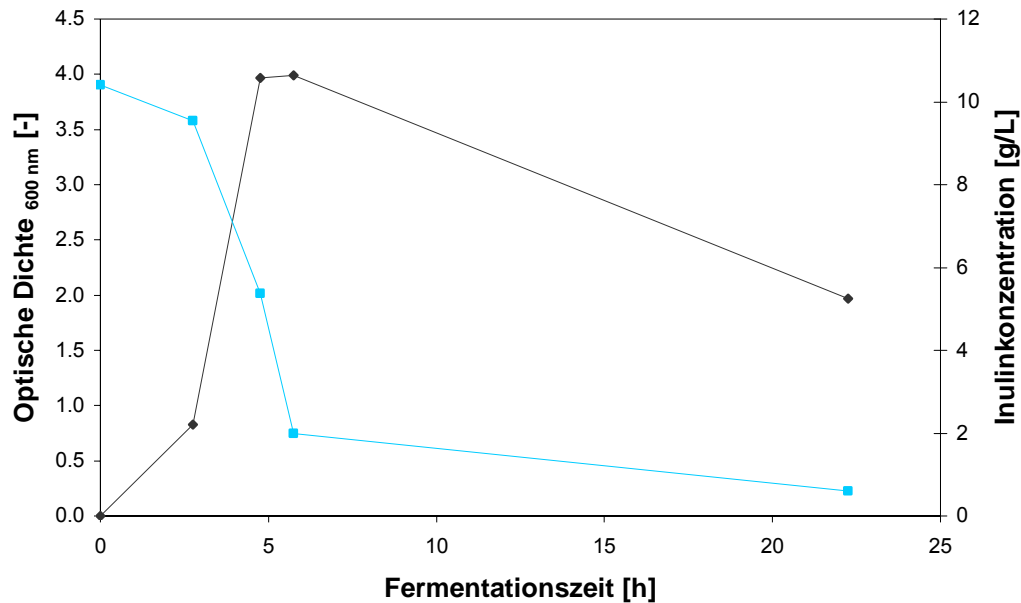


Abbildung 14: Optische Dichte und Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Legende: (♦) Optische Dichte (■) Inulinkonzentration.

Aus Abbildung 15 sehen wir den Zusammenhang zwischen der Biotrockenmasse und der optische Dichte.

Man sieht eine gute Korrelation der Werte. Der Korrelationskoeffizient 0.9938 beträgt. Die Biotrockenmasse am Ende der Fermentation beträgt 0.57 g/L und der maximale Wert 1.382 g/L.

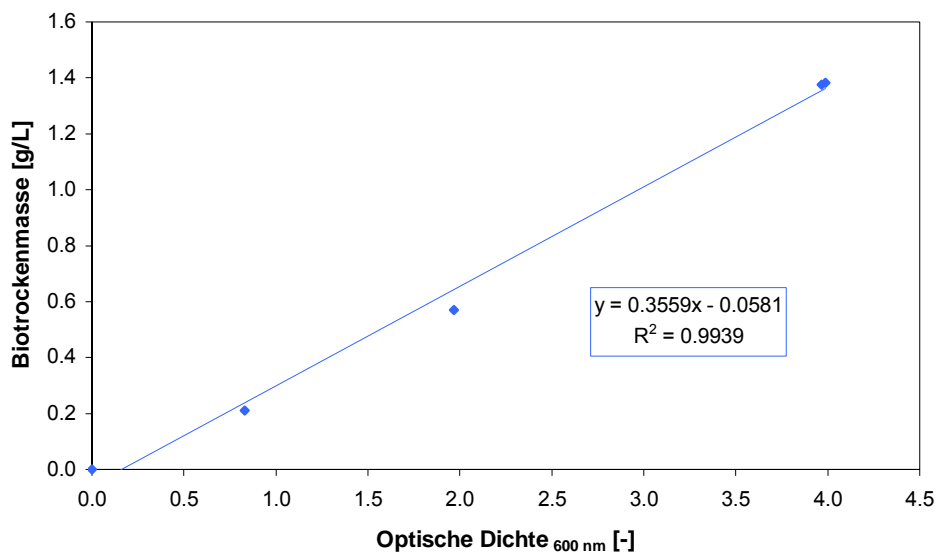


Abbildung 15: Biotrockenmasse als Funktion der optischen Dichte für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden.

Inulinaseaktivität, Proteinkonzentration, spezifische Aktivität und Zellausbeute

Die Bestimmung der Inulinaseaktivität und Proteinkonzentration im Kulturüberstand sind gemäß den Kapiteln 2.3.9 und 2.3.11 durchgeführt worden. Die Inulinaseaktivität ist mit der HPLC-Methode bestimmt worden.

Aus Abbildung 16 ist die Darstellung der Proteinkonzentration im Kulturüberstand und der Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit von einer Kultur des *Paenibacillus spec.* FH-138 zu ersehen. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden.

Nach 2.75 h Fermentationszeit gibt es eine Proteinkonzentration von 0.03 g/L. Diese steigt während der Fermentation an und erreicht 1.1 g/L am Ende der Kultivierung.

Die Inulinaseaktivität im Kulturüberstand erscheint ab 5.75 h mit 0.02 U/mL. Am Ende der Fermentation beträgt sie 0.31 U/mL.

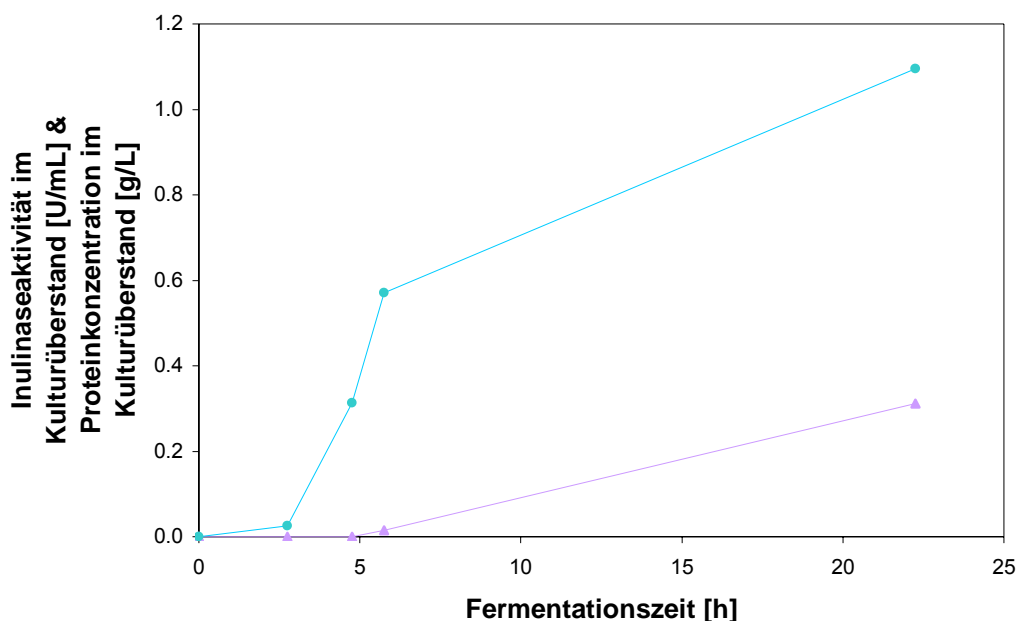


Abbildung 16: Proteinkonzentration im Kulturüberstand und Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden.

Legende: (▲) Inulinaseaktivität im Kulturüberstand, (●) Proteinkonzentration im Kulturüberstand.

Wir können die spezifische Aktivität im Kulturüberstand bestimmen indem man die Inulinaseaktivität durch die Proteinkonzentration teilt. Sie beträgt von 0.04 U/mg Protein nach 5.75 h und 0.28 U/mg Protein am Ende der Fermentation.

Die Zellausbeute ist mit Gleichung 7 berechnet. Diese ist 0.16.

pH- und pO₂-Verlauf

In Abbildung 17 ist die Darstellung des pH-Wert und des pO₂ als Funktion der Fermentationszeit im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138 zu sehen. Die Bedingungen der Kultur sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm und 22.25 Stunden.

Der pH-Wert am Anfang ist 6.5, dieser Wert bleibt konstant und fällt ab 2.75 h. Sein tiefster Wert ist 5.9 Ausschließend steigt der pH-Wert bis 7.7. Er bleibt so bis zum Ende der Fermentation.

Der pO₂ am Anfang ist 100 %. Ab 4 h, fällt er schnell ab und erreicht 69,9 % zum Zeitpunkt 5.5 Stunden. Nach dieser Zeit steigt die pO₂ und erreicht 119.8 % nach 8 Stunden und bleibt konstant bis zum Ende dieser Fermentation.

Man sieht, dass das Verhalten von diesen zwei Kurven gut korreliert. Der pH- Wert fällt fast zur gleichen Zeit wie der pO₂. Beide haben sie nach 5.5 h Fermentation ihren minimalen Wert und steigen auch synchron wieder an.

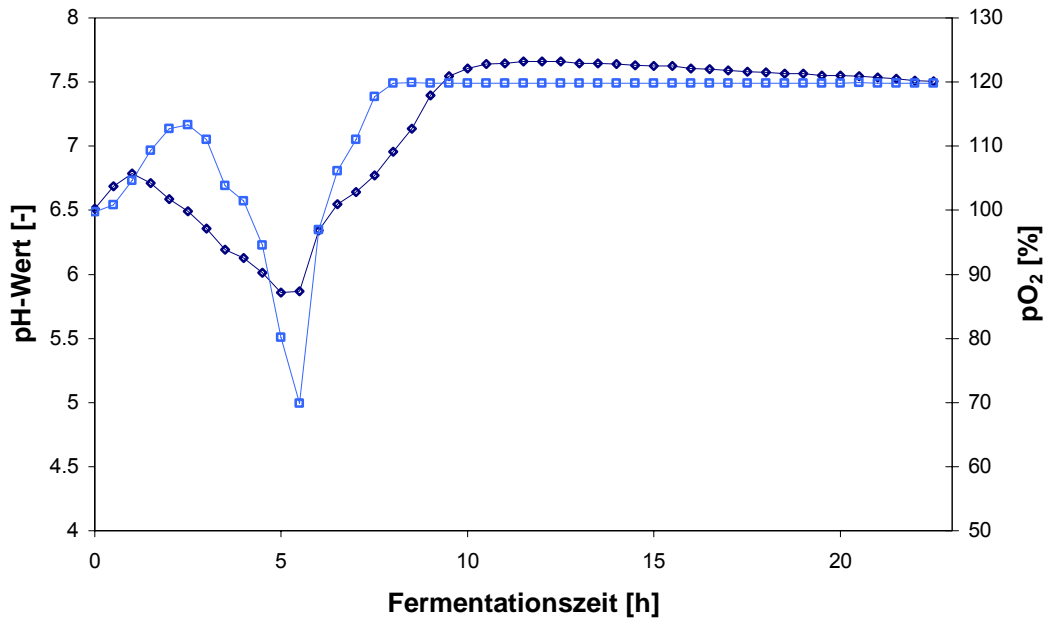


Abbildung 17: pH- und pO₂- Verlauf für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden.

Legende: (□) pO₂ (◇) pH.

Abgasanalyse

OUR, CPR und der RQ sind mit der Gleichungen 8, 9 und 10 bestimmt worden.

Aus Abbildung 18 sehen wir, OUR, CPR und RQ als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden.

Zuerst sehen wir, dass die erreichten Werte sehr gering sind. Der höchste Wert für den OUR beträgt 0.02 mmol/(L*h).

Die OUR- und CPR-Kurven sind sehr ähnlich. Sie haben das gleiche Verhalten. Beide steigen bis 2.5 h. langsam an und ab diesem Zeitpunkt Sprunghaft bis zum Maximum von 0.22 mol/(L*h) bei 5.5 h. Dann fallen die beiden Kurve bis 9 h und bleiben mehr oder weniger konstant bis zum Ende der Fermentation mit 0.001 mmol/(L*h).

Man sieht, dass der RQ-Wert unregelmäßig bis 5 h ansteigt. Dann bleibt er konstant und einen Wert von 1 um 5.5 Stunden. Danach fällt er bis 0.89 und steigt noch mal bis 8.5 h an. Schlussendlich die RQ fällt bis zum Ende der Fermentation und erreicht einen Endewert von minus 0.02.

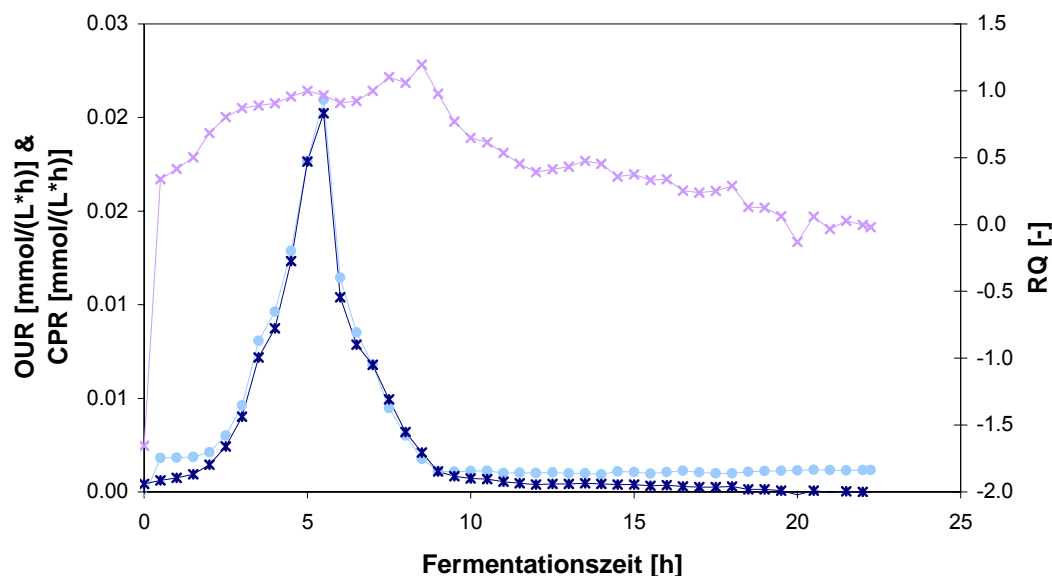


Abbildung 18: Darstellung der OUR, CPR und RQ für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden.

Legende: (x) RQ, (*) CPR (●) OUR

Zusammenfassung des Laufs der Fermentation

In Abbildung 19 sehen wir die Zusammenfassung der Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138 als Funktion der Fermentationszeit. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH-Wert 6.5 und 22.25 Stunden.

Wir sehen, dass bei einer Inulinkonzentration von 1.99 g/L, die optische Dichte am höchsten ist und der pH-Wert am niedrigsten. Zu diesen Zeitpunkt, kann man auch beobachten, dass die Inulinaseaktivität ansteigt.

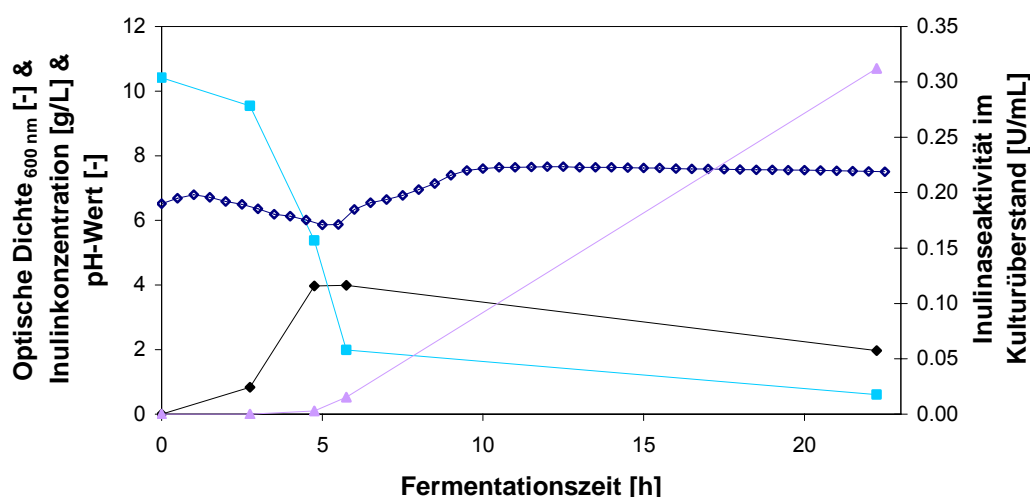


Abbildung 19: Zusammenfassung des Laufs der Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 1000 U/min, 0,5 vvm, pH 6.5 und 22.25 Stunden.

Legende: (♦) optische Dichte, (■) Inulinkonzentration, (◇) pH-Wert, (▲) Inulinaseaktivität im Kulturüberstand.

3.1.6 Dritte Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Die Fermentation im 10 L-Bioreaktor ist gemäß Kapitel 2.3.4 durchgeführt worden. Die Vorkulturen sind mit dem Nährmedium 2 ohne Biotin sondern mit 0.5 g/L Hefeextrakt angesetzt worden. Außerdem wurde für die Kultur die Ammoniumsulfatkonzentration 2 g/L erhöht, die Inulinkonzentration ist auf 10 g/L und die Hefeextraktkonzentration 1 g/L. Die optische Dichte der Vorkulturen zum Zeitpunkt der Inokulation ist 2.32. Dieser Wert wurde nach 25 Stunden der Fermentation in der Schüttelkultur erreicht.

Optische Dichte und Inulinkonzentration

Man sieht in Abbildung 20 die Darstellung der Inulinkonzentration und der optischen Dichte als Funktion der Zeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Kultivierung sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm und die Fermentation dauert 23 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Die Inulinkonzentration am Anfang ist 9.7 g/L. Sie fällt bis $t = 4$ h auf 8.32 g/L und bleibt dann konstant.

Die optische Dichte zeigt nur einen kurzen geringen Anstieg, fällt wieder ab und bleibt dann konstant. Es findet kein Wachstum statt.

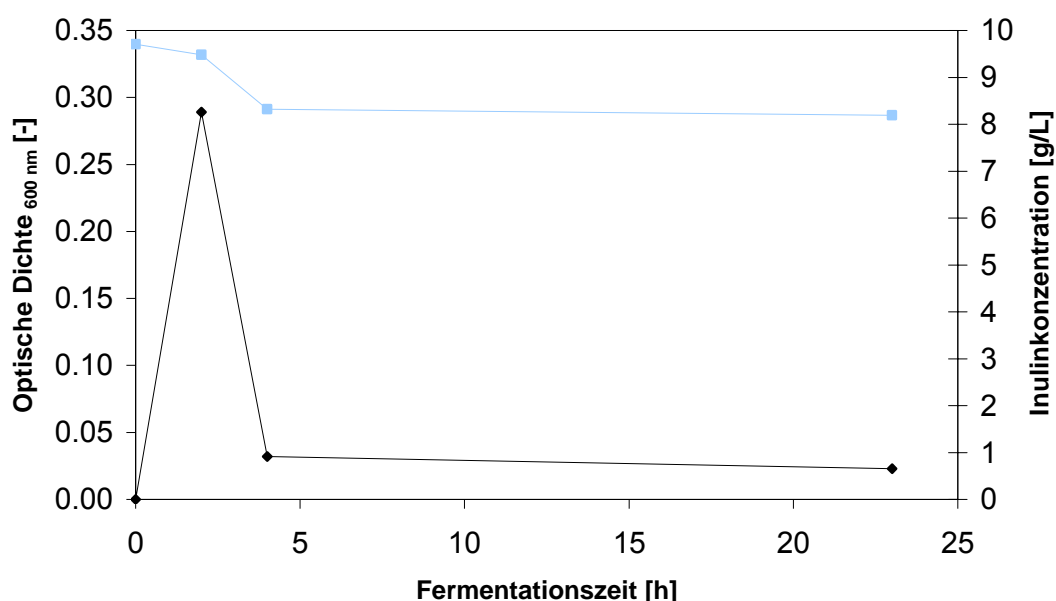


Abbildung 20: Darstellung der optische Dichte und der Inulinkonzentration als Funktion der Zeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Legende: (♦) optische Dichte, (▲) Inulinkonzentration.

pH-und pO₂- Verlauf

Man sieht in Abbildung 21 den Verlauf des pH-Werts und des pO₂ als Funktion der Zeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Kultivierung sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und die Fermentation dauert 22 Stunden.

Wir beobachten, dass die Kurve des pO₂ fast konstant bleibt während der Fermentation.

Auch sieht man, dass der pH-Wert von 6.5 sich während der Fermentation kann ändert.

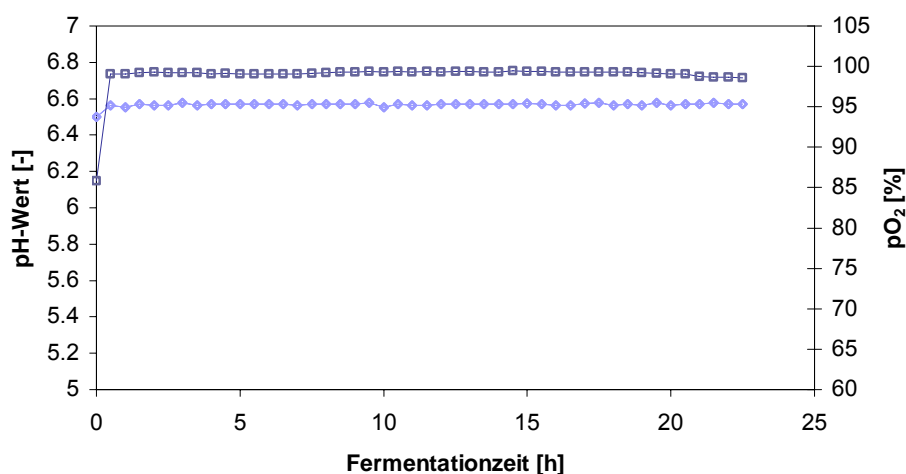


Abbildung 21: Darstellung des pO₂ und des pH-Wertes als Funktion der Zeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm und pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (◇) pH-Wert, (□) pO₂.

Abschließend muss diese Fermentation als gescheitert angesehen werden, der Organismus ist in Fermenteur nicht gewachsen.

3.1.7 Vierte Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Die Fermentation im 10 L-Bioreaktor ist gemäß Kapitel 2.3.4 durchgeführt worden. Die Vorkulturen sind mit dem Nährmedium 2 ohne Biotin sondern mit 0.5 g/L Hefextrakt angesetzt worden. Außerdem ist für die Kultur das Ammoniumsulfat auf 2 g/L erhöht worden, die Inulinkonzentration ist 10 g/L und die Hefeextraktkonzentration 1 g/L. Die optische Dichte der Vorkulturen zum Zeitpunkt der Inokulation ist 1.873. Dieser Wert ist nach 26 Stunden Fermentation in der Schüttelkultur erreicht.

Optische Dichte und Inulinkonzentration

Man sieht in Abbildung 22 die Darstellung der Inulinkonzentration und der optischen Dichte als Funktion der Fermentationszeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Kultivierung sind 50 °C

1000 U/min, 0.5 vvm und die Fermentation dauert 22 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Die Inulinkonzentration am Anfang beträgt 9.78 g/L. Zu Fermentationsbeginn sinkt die Inulinkonzentration etwas ab und bleibt konstant bis zum Ende der Fermentation.

Die optische Dichte steigt die zwei ersten Stunden. Zu dieser Zeit erreicht die optische Dichte einen Wert von 0.043. Dann fällt und der Wert am Ende der Fermentation 0.024 beträgt.

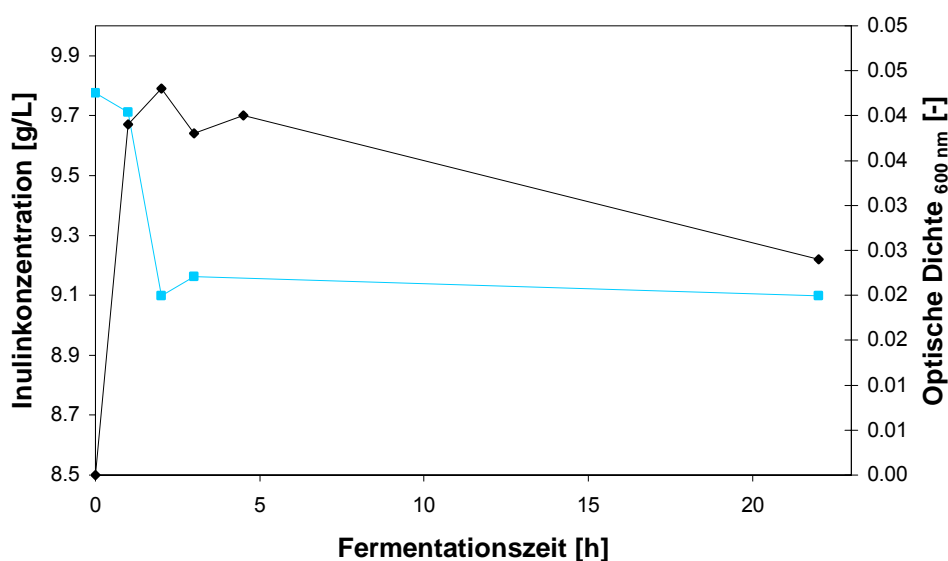


Abbildung 22: Darstellung der optischen Dichte und der Inulinkonzentration als Funktion der Zeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Legende: (♦) Inulinkonzentration, (▲) optische Dichte.

Man sieht in Abbildung 23 die Darstellung des pH-Werts und des pO_2 als Funktion der Zeit für die Kultur Nummer 4 im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Kultivierung sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm und die Fermentation dauert 22 Stunden.

Wir beobachten, dass die Kurve des pO_2 fast konstant bleibt während der Fermentation. Der Wert am Anfang ist 100 %, er sinkt im Verlauf von 22 h, auf 92.9 % ab.

Der pH-Wert am Anfang der Kultivierung beträgt 6.5. Wir bemerken, dass während die erste zwei Stunden, die Werte ansteigen und 6.9 erreicht. Danach fällt der pH-Wert bis Ende der Fermentation. Der Wert am Ende der Kultur ist 6.2.

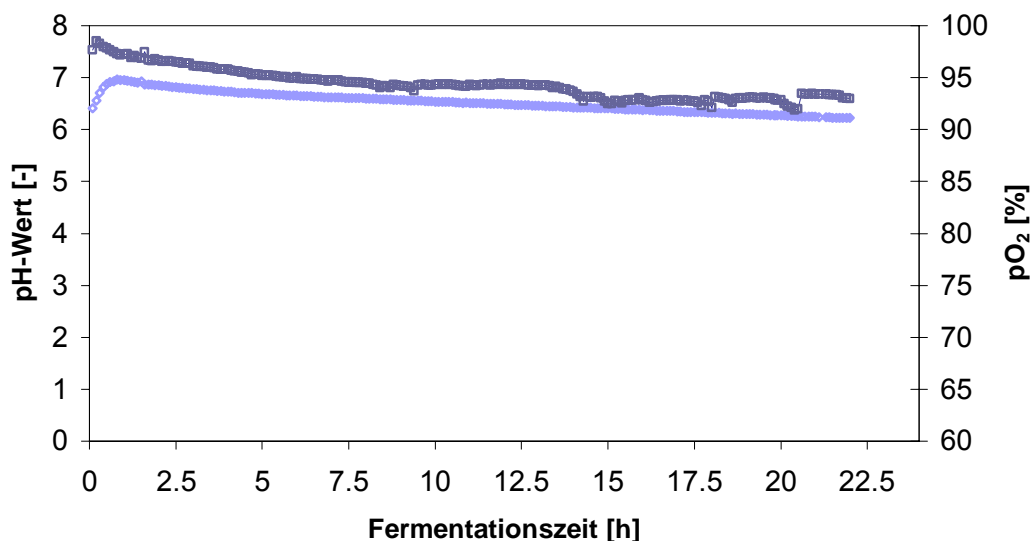


Abbildung 23: Darstellung des pO₂ und des Wertes als Funktion der Zeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 1000 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 22 Stunden.

Legende: (◇) pH-Wert, (□) pO₂.

Auch diese Fermentation muss als gescheitert angesehen werden, da die Organismen nicht im Fermenteur gewachsen sind.

3.1.8 Fünfte Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Die Fermentation im 10 L-Bioreaktor ist gemäß Kapitel 2.3.4 durchgeführt worden. Die Vorkulturen sind mit dem Nährmedium 2 ohne Biotin sondern mit 0.5 g/L Heffextrakt angesetzt worden. Die Konzentration von Ammoniumsulfat ist 1 g/L und die Inulinkonzentration ist 5 g/L. Die optische Dichte der Vorkulturen zum Zeitpunkt der Inokulation ist 0.887. Dieser Wert ist nach 24 Stunden der Fermentation in der Schüttelkultur erreicht worden.

Optische Dichte, Inulinkonzentration und Biotrockenmasse

Die optische Dichte, die Inulinkonzentration und die Biotrockenmasse sind gemäß Kapiteln 2.3.5, 2.3.6 und 2.3.10 bestimmt worden. Zur BTM-Bestimmung wurden mit einem Volumen von 10 mL gearbeitet.

Man kann in Abbildung 24 den Verlauf der optischen Dichte und die Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138 bei 50°C, 500 U/min, 0.5 vvm und 23 Stunden sehen. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Nach animpfen des Fermenteurs beginnen die Bakterien exponentiell zu wachsen, es gibt keine Lag-Phase. Nach 6 Stunden Fermentationszeit, erreicht die optische Dichte einen Wert von 0.904. Nach 23 Stunden ist die OD auf 0.610 gesunken.

Die Inulinkonzentration am Anfang beträgt 5.3 g/L. Dem Verhalten von dieser Kurve folgt eine exponentielle Annahme. Die Inulinkonzentration fällt sehr schnell während der ersten 3 Stunden und sinkt dann langsam weiter. Nach 6 Stunden

Fermentationszeit beträgt dieser Konzentration noch 1.04 g/L. Am Ende der Fermentation ist alles Inulin aufgebraucht.

In Abbildung 24 sieht man, dass bestiegender optische Dichte, die Inulinkonzentration sich vermindert.

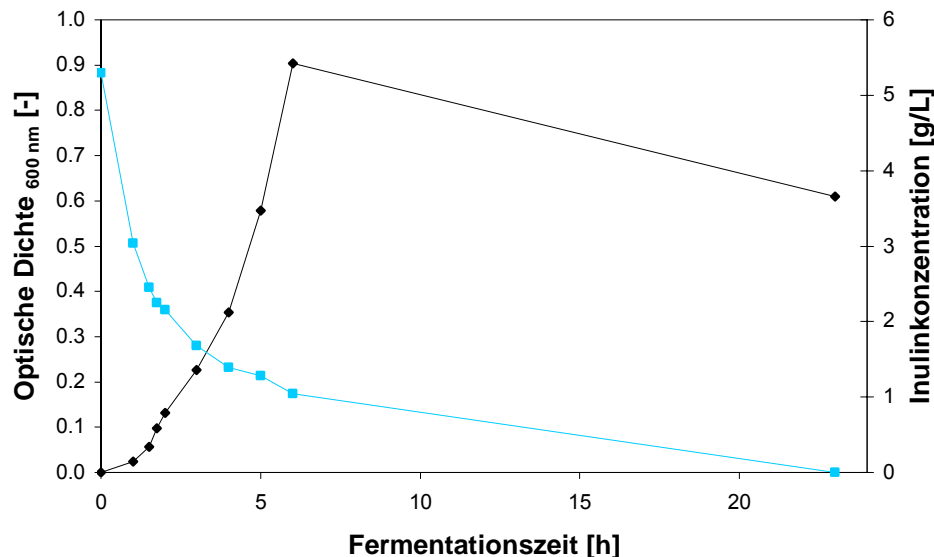


Abbildung 24: Optische Dichte und Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden. Die Inulinkonzentration ist mit der DNSA-Methode bestimmt worden.

Legende: (♦) Optische Dichte (■) Inulinkonzentration.

In Abbildung 25 sehen wir die Beziehung zwischen der Biotrockenmasse und der optischen Dichte. Die Biotrockenmasse ist mit der erste fünfte Probeannahme und die letzte bestimmt. Das heißt $t = 0, 1, 1.5, 1.75, 2$ und 23 Stunden. Die Anderen Punkte ($t = 3, 4, 5, 6$) sind mit der Gleichung der Trendline berechnet.

Man sieht, einen guten linearen Verlauf und eine gute Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.9976 ist. Die Biotrockenmasse am Ende der Fermentation ist beträgt 1.9 g/L.

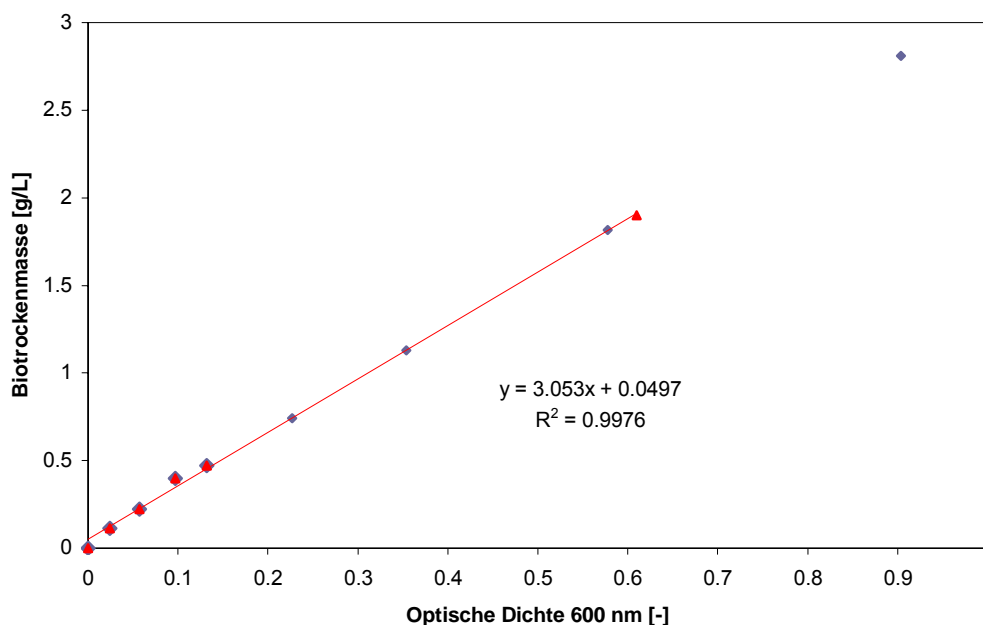


Abbildung 25: Biotrockenmasse als Funktion der optischen Dichte für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (▲) Punkte gemessen, (◆) Punkte berechnet.

Inulinaseaktivität, Proteinkonzentration, spezifische Aktivität und Zellausbeute

Die Bestimmung der Inulinaseaktivität, der Proteinkonzentration im Kulturüberstand sind gemäß die Kapiteln 2.3.9 und 2.3.11 durchgeführt worden.

Aus Abbildung 26 ist der Verlauf der Proteinkonzentration im Kulturüberstand und der Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit von einer Kultur des *Paenibacillus sp.* FH-138 zu sehen. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Man sieht, dass die Inulinaseaktivität im Kulturüberstand erst nach 23 Stunden Fermentation auftritt. Die Proteinkonzentration im Kulturüberstand ist bereits nach 3 Stunden Fermentation sichtbar. Am Ende der Fermentation, beträgt die Inulinaseaktivität 0.24 U/mL und die Proteinkonzentration 0.21 g/L.

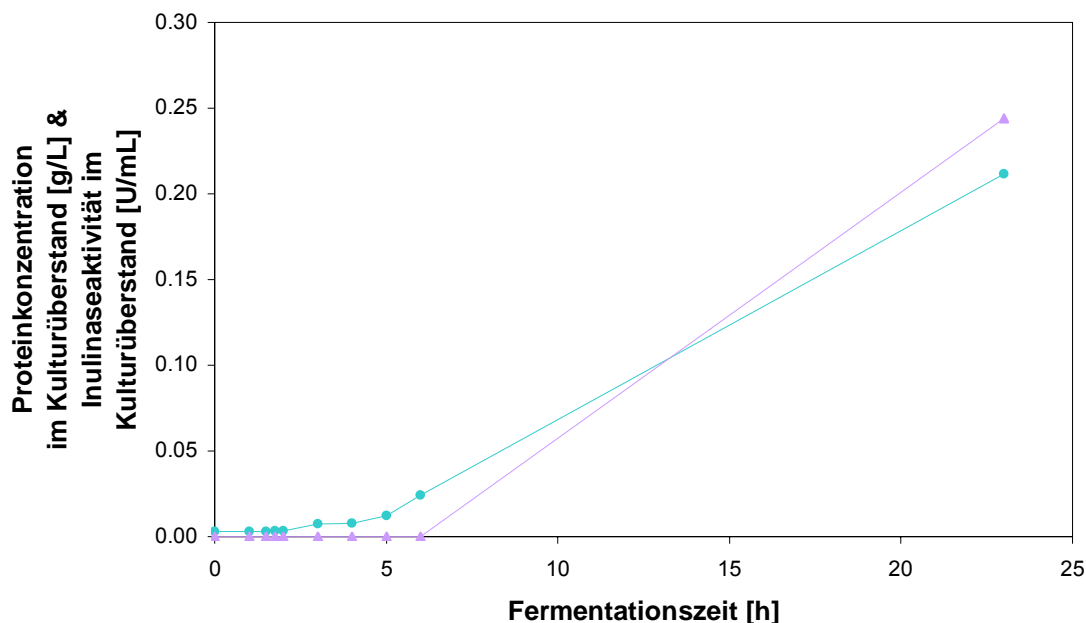


Abbildung 26: Proteinkonzentration im Kulturüberstand und Inulinaseaktivität im Kulturüberstand als Funktion der Fermentationszeit für eine Kultur im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus sp.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (▲) Inulinaseaktivität im Kulturüberstand, (●) Proteinkonzentration im Kulturüberstand.

Bestimmt man die spezifische Aktivität im Kulturüberstand so beträgt diese nach 23 Stunden 1.14 U/mg Protein.

In Abbildung 27 ist die Inulinaseaktivität von unbehandelten und ultraschallbehandelten Probe (gesamt Inulinaseaktivität) als Funktion der Fermentationszeit von einer Kultur des *Paenibacillus spec.* FH-138 dargestellt. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Die gesamt Inulinaseaktivität wie in Kapitel 2.3.16 angegeben bestimmt worden.

Man sieht, dass die Inulinaseaktivität bei ultraschallbehandelten Proben bereits nach 6 Stunden Fermentation gemessen werden kann. Zu diesem Zeitpunkt lässt sie sich noch nicht extrazellulär nachweisen. Die Inulinaseaktivität beträgt 0.03 U/mL. Am Fermentationende, nach 23 Stunden, ist ein Teil der Inulinaseaktivität ist im Kulturüberstand nachweisbar.

Die gesamt Inulinaseaktivität beträgt nach 23 Stunden Fermentationszeit 0.33 U/mL, die des anbehandelten Kulturüberstandes 0.24 U/mL. Damit sind 72.7 % der Inulinase zu diesem Zeitpunkt extrazellulär.

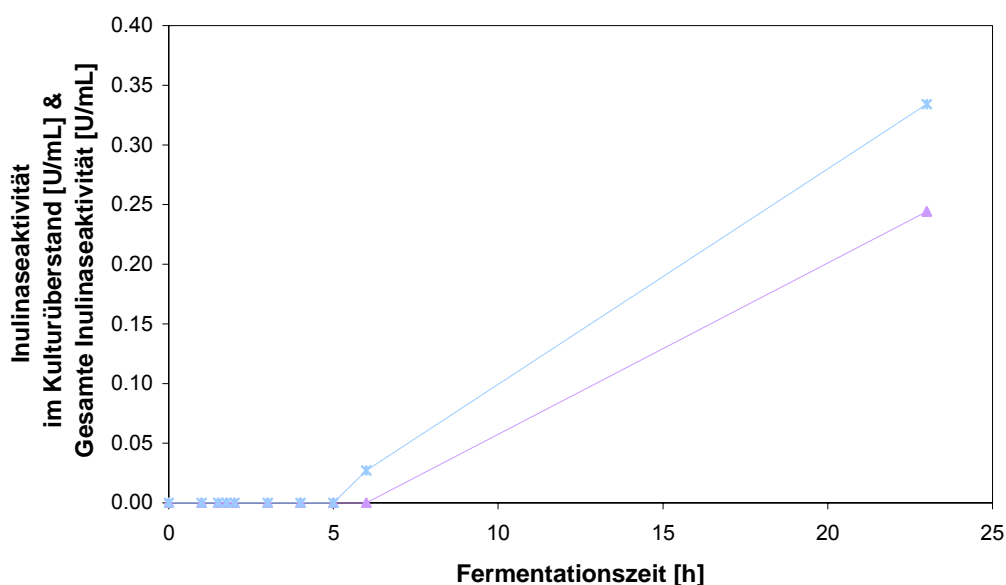


Abbildung 27: Inulinaseaktivität im Kulturüberstand und Gesamt Inulinaseaktivität als Funktion der Fermentationszeit für eine Kultur des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (▲) Inulinaseaktivität im Kulturüberstand, (*) Gesamt Inulinaseaktivität.

Die maximale Zellausbeute wurde mit Gleichung 7 berechnet. Diese beträgt 0.66.

pH- und pO₂-Verlauf

In Abbildung 28 ist die Darstellung des pH-Wertes und des pO₂-Wertes als Funktion der Fermentationszeit im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec* FH-138 gezeigt. Die Bedingungen der Vorkultur sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm und 23 Stunden.

Der pH-Wert ist am Anfang ist 6.4, fällt leicht ab und erreicht wieder 6.4 nach 10 h. Anschließend steigt der pH-Wert bis zum Ende der Fermentation und erreicht 7.3 als Endwert.

Der pO₂ ist am Anfang 100 %. Er fällt sehr schnell während der zwei ersten Stunden. Nach 2.5 Stunden ist der pO₂-Wert auf null gesunken. Dieser Wert wird bis zu 11 Stunden gehalten, dann erfolgt ein rascher Anstieg über 5 Stunden den auf 119 %. Dieser Wert wird bis zum Ende der Fermentation gehalten.

Man sieht, dass wenn der pO₂ null ist, der pH-Wert etwas absinkt. Und wenn der pO₂ wieder ansteigt sich auch der pH-Wert erhöht.

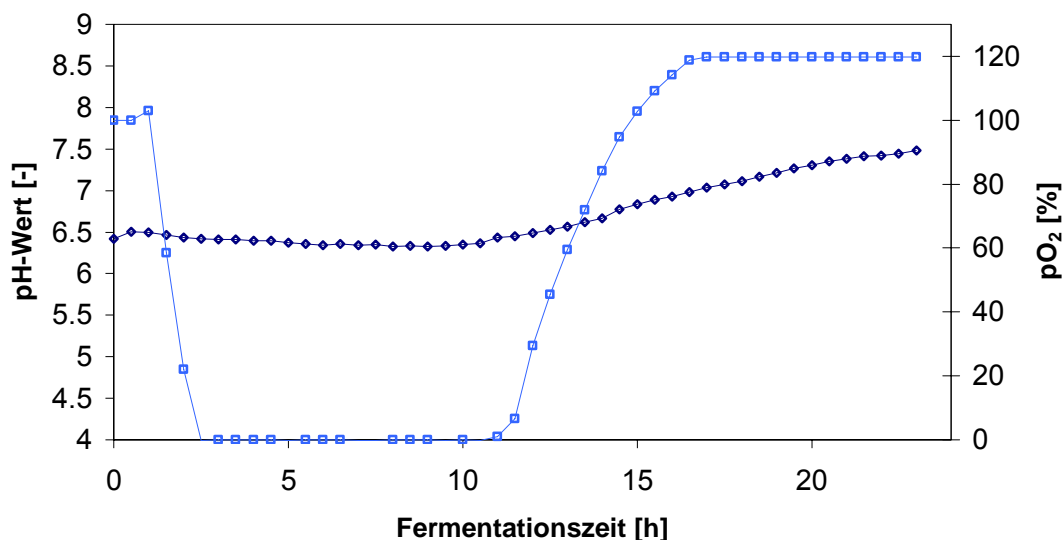


Abbildung 28: pH- und pO₂- verlauf für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (□)pO₂ (◇)pH.

Abgasanalyse

Die Abgasanalyse ist gemäß Kapitel 2.2.4 erfolgt. Die Werte für OUR, CPR und der RQ sind mit den Gleichungen 8, 9 und 10 bestimmt worden.

In Abbildung 29 sehen wir, OUR, CPR und RQ als Funktion der Fermentationszeit für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Die erreicht Werte sehr gering sind. Die höchsten Werte liegen um 0.025 mol/(L*h).

Der OUR bleibt bis 5 h bei null. Anschließend steigt der OUR sehr schnell und erreicht seinen maximalen Wert zum Zeitpunkt 7.5 h mit 0.02 mol/(L*h). Nach etwa 12 Stunden fällt der OUR allmählich wieder ab auf null bei 20 h Fermentationszeit.

Während der ersten fünf Stunden ist der CPR negativ. Danach steigt bis 9 h. Er bei seinem Maximum von 0.006 mol/(L*h). Dann sinkt er bis null bei 15 Stunden. Zwischen 15 und 23 h ist der CPR kommt noch mal negativ.

Der RQ schwankt zwischen 0.71 und 1.19 während der ersten fünf Stunden. Dann fällt er auf null und bleibt konstant bis 18.5 h. Nach diesem Zeitpunkt wird der RQ negativ bis 20 Stunden. Bei 20.5 h ist der RQ 4.9 und bei 21 h 13.13. Schlussendlich der RQ wird null ab 21.5 h.

Wir bemerken, dass während der ersten 5 h steigen die Werte von CPR und OUR null sind. Ab 5 h steigen diese an. Dennoch ist das Verhalten von diesen zwei Kurven nicht das gleiche. Die OUR-Kurve steigt heftig und geht dann langsamer weiter, während die CPR-Kurve langsamer bis zum maximalen Wert. fortzuschreitet. Man sieht auch, dass schon ab 15 h der CPR null ist während der OUR erst ab 20 h null wird.

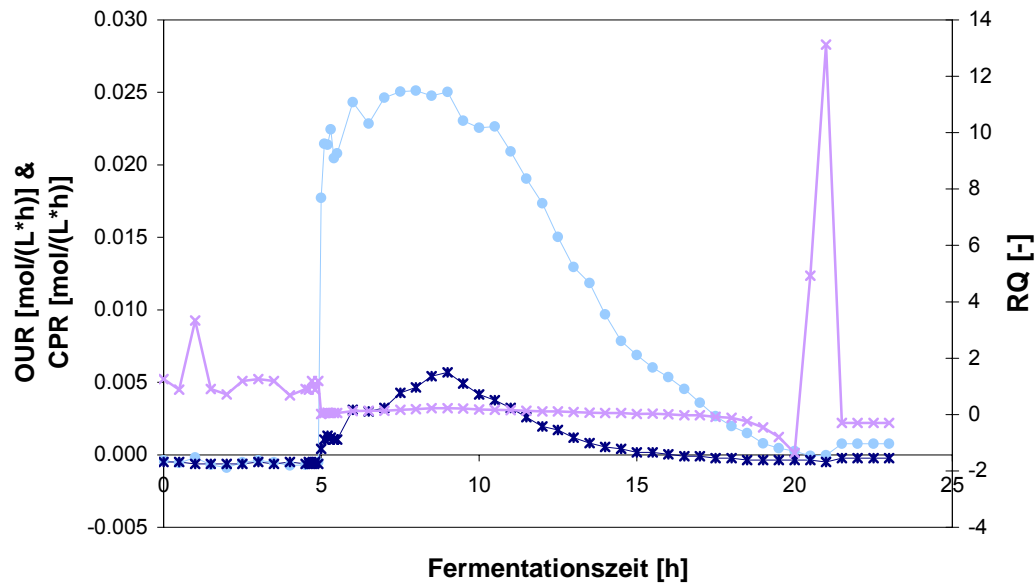


Abbildung 29: Darstellung der OUR, CPR und RQ für eine Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (x) RQ, (*) CPR (●) OUR

Zusammenfassung des Laufs der Fermentation

Aus Abbildung 30 sehen wir die Zusammenfassung der Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138 als Funktion der Fermentationszeit. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH-Wert 6.5 und 23 Stunden.

Wir sehen, dass sich die Inulinkonzentration vermindert, wenn die optische Dichte ansteigt und der pH-Wert etwas absinkt. Man beobachtet auch, dass die Inulinaseaktivität bei null ist solange die Bakterien wachsen. Die pO_2 fällt sehr schnell zu dieser Zeit, als die Bakterien sehr stark wachsen. Während der pO_2 null ist, erhöht sich die optische Dichte weiter. Zum Ende der Fermentation fällt die OD wieder etwas ab und der pO_2 steigt auf über 100 %.

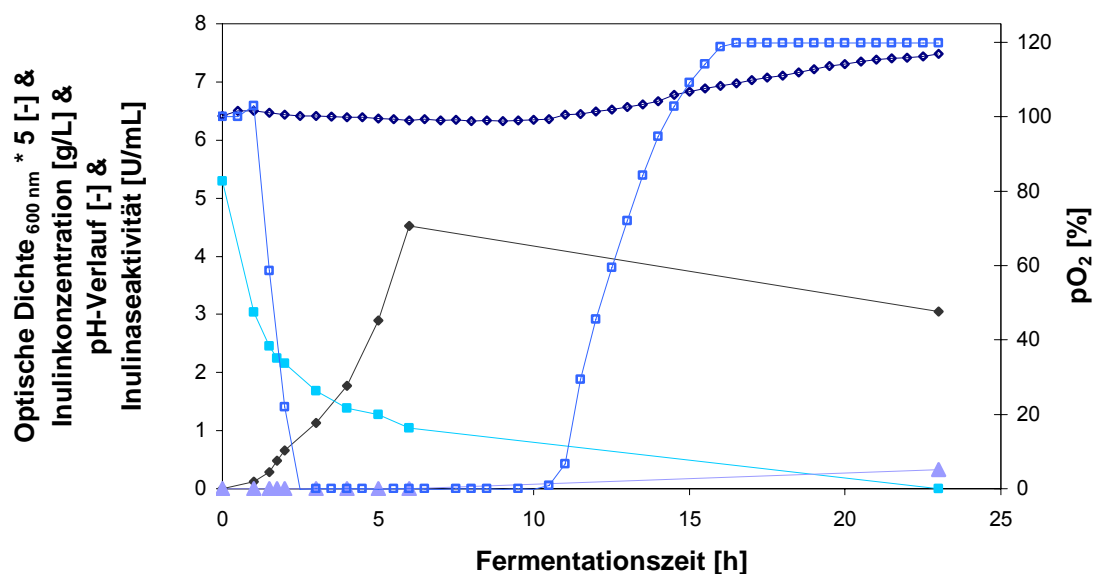


Abbildung 30: Zusammenfassung des Laufs der Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0,5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (♦) optische Dichte, (■) Inulinkonzentration, (□) pO₂, (◇) pH-Wert, (▲) Inulinaseaktivität im Kulturüberstand.

3.2 Vergleich der DNSA-Methode und HPLC-Methode für den Substraverlauf

Die Bestimmung der Inulinkonzentration ist wie in Kapiteln 2.3.6 und 2.3.7 ausgegeben durchgeführt worden.

Man kann in Abbildung 31 den Vergleich zwischen der DNSA-Methode und der HPLC-Methode für den Substratverlauf einer Fermentation von *Paenibacillus spec.* FH-138 in 1 L-Schüttelkultur sehen. Die Bedingungen der Kultivierung sind 50 °C, 160 U/min und 50 Stunden.

Zuerst sehen wir, dass sie beide Kurven mehr oder weniger die gleiche Tendenz haben.

Zu dem fällt auf, dass die Anfangsinulinkonzentrationen nicht die Gleich ist. Tatsächlich ist sie 5.03 g/L für die HPLC-Methode und 2.50 g/L für die DNSA-Methode.

Wir beobachten auch, dass ab $t = 15$ h die Inulinkonzentration mit der DNSA-Methode bestimmt, immer höher ist als die Inulinkonzentration mit der HPLC-Methode. Mit der HPLC-Methode, ist die Inulinkonzentration am Anfang am höchsten, während für die DNSA-Methode, die höchste Inulinkonzentration bei $t = 2$ ist.

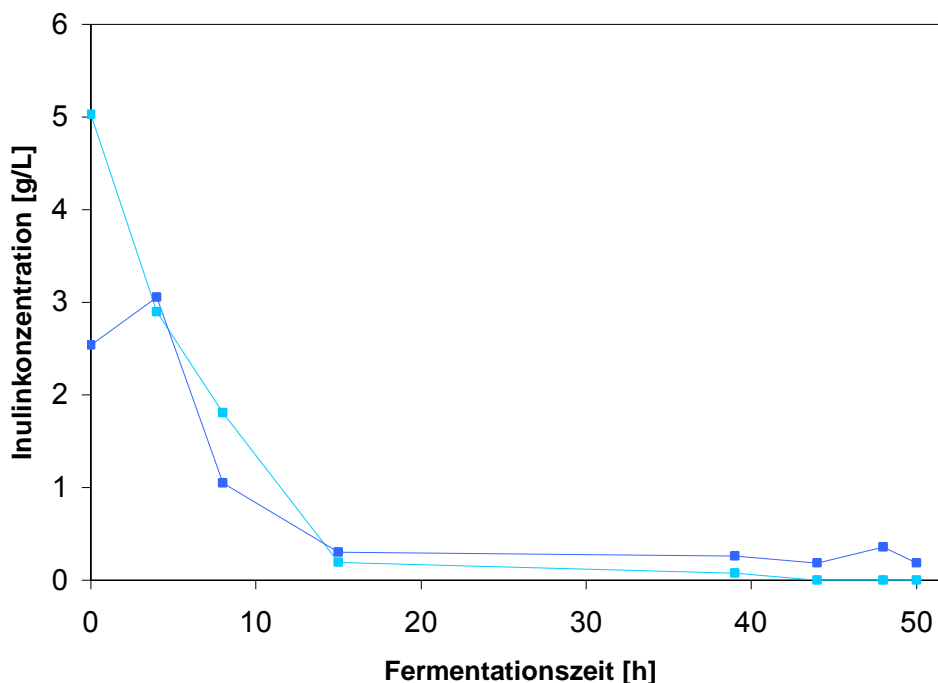


Abbildung 31: Darstellung der Inulinkonzentration als Funktion der Fermentationszeit für eine Kultur des *Paenibacillus* sp. FH-138 im 1 L-Schüttelkultur.

Legende: (■) Inulinkonzentration mit der HPLC-Methode, (■) Inulinkonzentration mit der DNSA-Methode.

3.3 Optimierung der Analytik

3.3.1 Optimierung der HPLC-Methode für die Inulinaseaktivität

Die Optimierung der HPLC-Methode ist gemäß Kapitel 2.3.14 durchgeführt worden.

In Abbildung 32 ist die Inulobiosekonzentration als Funktion der Inkubationszeit für zwei Versuche dargestellt. Für den zweiten Versuch, ist der Kulturüberstand 0.5-mal verdünnt. Der Kulturüberstand kommt aus eine 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 160 U/min, 50 °C, 33 Stunden.

Man sieht, dass ab 20 Minuten Inkubationszeit, die gemessen Punkte ein linear fortschreiten. Dies zeigt sich in dem Korrelationskoeffizient für die beiden Geraden. Für den ersten Versuch ist der Korrelationkoeffizient 0.9956 und für den zweiten 0.9888 ist.

Die Steigung des 2. Versuchs, der 0.5-facheder Inulobiosekonzentration enthält, ist 1.84-mal kleiner als die Steigung des Versuches 1.

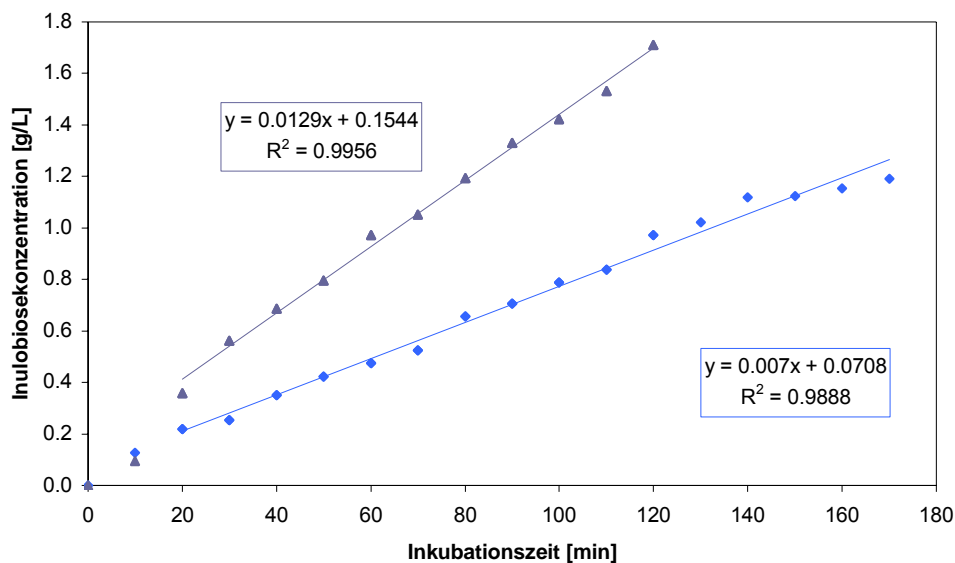


Abbildung 32: Inulobiosekonzentration als Funktion der Inkubationszeit für zwei Konzentrationen in Inulinase. Der Kulturüberstand kommt aus eine 1 L-Schüttelkultur des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 160 U/min, 50 °C und 33 Stunden.

Legende: (▲) 1x Kulturüberstand, (◆) 0.5x Kulturüberstand.

Ein weiterer Versuch wurde gemacht, um zu sehen, wann das Plateau erreicht wird.

Auf Abbildung 33 ist die Inulobiosekonzentration als Funktion der Inkubationszeit für zwei Versuche dargestellt. Der Kulturüberstand kommt aus einer Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen der Fermentation sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden. Die Inulobiosekonzentration ist gemäß Kapitel 2.3.14 bestimmt. Die Probenahme erfolgte alle 20 Minuten.

Die zwei Kurven haben das gleiche Verhalten. Man sieht, dass der Verlauf zwischen 20 und 80 min linear ist. Nach 140 min Inkubationszeit ist das Plateau erreicht. Da haben wir eine Inulobiosekonzentration von 1.98 g/L. Die Linearität ist sehr gut, weil die Korrelationkoeffizienten sind 0.9971 beziehungsweise 0.9991.

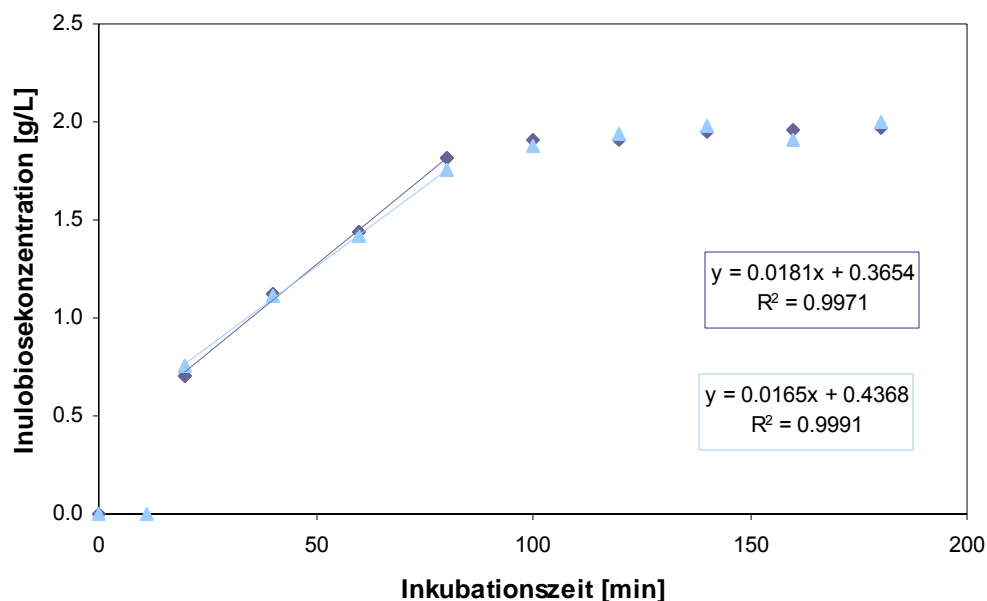


Abbildung 33: Inulobiosekonzentration als Funktion der Inkubationszeit für zwei Versuche in Inulinase. Der Kulturüberstand kommt aus einer Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec. FH-138*. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (▲) Versuch 1, (◆) Versuch 2.

3.3.2 Optimierung der DNSA-Methode für die Enzymaktivität

Die Optimierung der DNSA-Methode ist gemäß Kapitel 2.3.15 durchgeführt worden.

Man kann in Abbildung 34 die Eichgerade des Fruktoses sehen. Die Extinktion bei 546 nm der Standardlösung wird als Funktion der Konzentration an Fruktose dargestellt, um eine Eichgerade zu erhalten.

Die lineare Approximation stimmt in diesem Fall gut überein, der Korrelationskoeffizient 0.9997 beträgt.

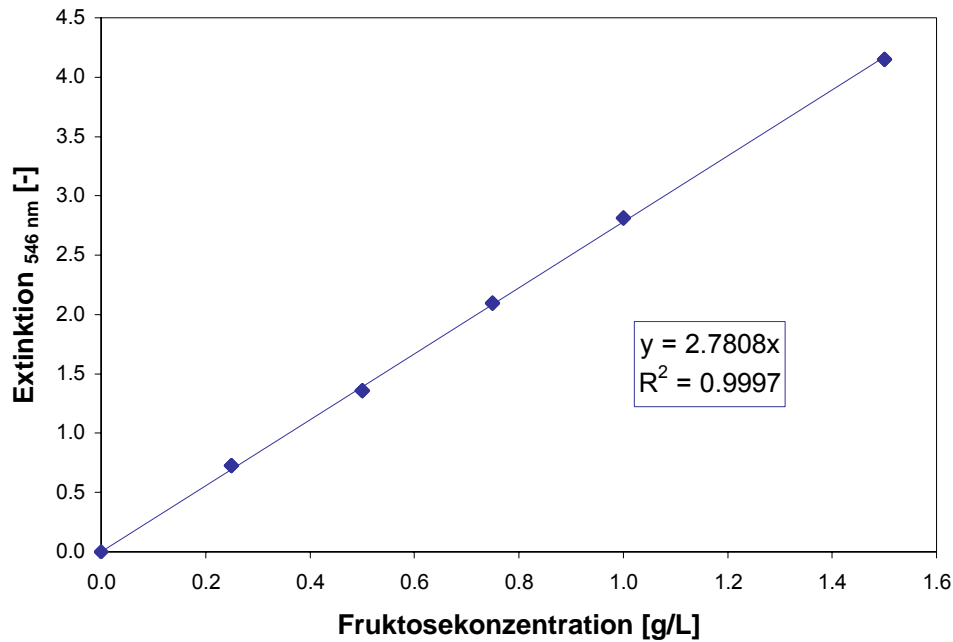


Abbildung 34: Darstellung der erhaltenen Eichgerade der Fruktose, indem man die Extinktion bei 546 nm gemäß der Konzentration der Fruktose für den Standard von 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25 g/L.

In Abbildung 35 ist die Extinktion als Funktion der Inkubationszeit für zwei Konzentrationen Inulinase. Der Kulturüberstand kommt aus einer Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/Min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Man sieht, dass ab 5 Minuten Inkubationszeit, die gemessenen Punkte linearfortschreiben. Dies zeigt sich in dem Korrelationskoeffizient, diese sind 0.991 für den ersten Versuch und 0.9989 für den Zweiten.

Die Steigung des 2. Versuch, der 0.5-fache Inulinasekonzentration enthält, ist 2.19-mal kleiner als die Steigung des Versuches 1.

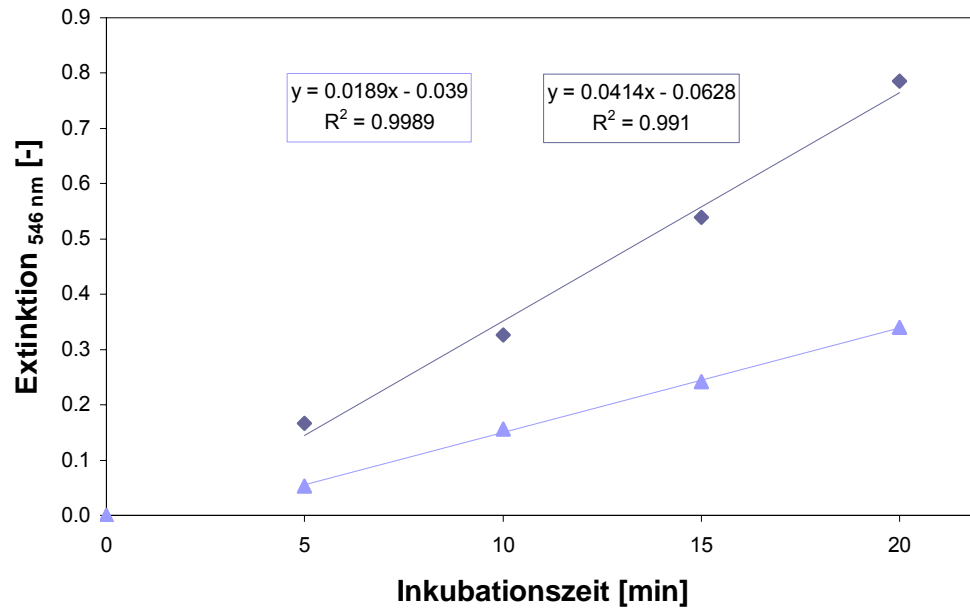


Abbildung 35: Extinktion als Funktion der Inkubationszeit für zwei Konzentrationen in Inulinase. Der Kulturüberstand kommt aus einer Fermentation im 10 L-Bioreaktor des *Paenibacillus spec.* FH-138. Die Bedingungen sind 50 °C, 500 U/min, 0.5 vvm, pH 6.5 und 23 Stunden.

Legende: (◆) 1x Kulturüberstand, (▲) 0.5x Kulturüberstand.

4 Diskussion

4.1 Fermentationen

4.1.1 Kultivierung auf Agarplatten zum Stammvergleich der *Paenibacillus spec.*

Die ersten Versuche zeigten, dass der Stamm *Paenibacillus spec.* FH-138 der einzige ist, der wächst. Die folgende Arbeit wurde mit diesem Stamm ausgeführt. Als Nährmedium wurde Nährmedium Nummer 2 verwendet, weil nur auf diesem die Bakterien wachsen.

4.1.2 Fermentation in der Schüttelkultur

Der Verlauf der optischen Dichte zeigt einen anderen Verlauf als wir laut Theorie erwarten. Man erwartet ein Ansteigen der OD beim Zellwachstum, dann ein konstant bleiben bis zur Abnahme wenn eine Lyse der Zellen stattfindet. Der Verlauf zeigt jedoch zwischen 8 und 44 Stunden ein Abfallen der OD und anschließenden schnellen Anstieg am Ende der Fermentation. Die Ergebnisse zeigen bei zwei Fermentationen die gleiche Tendenz und werden daher als gesichert angesehen. Ein möglicher Fehler liegt bei letzten Punkt des Verlaufes ($t = 50$ h) der deutlich höher liegt als der bisherige Verlauf. Eventuell liegt hier ein Fehler in der Messung vor. Der Nullpunkt des Photometers könnte nicht gestimmt haben.

Bei Arbeiten mit Mikro-Organismen ist es kaum möglich exakt Ergebnisse in mehreren Versuchen zu erzielen, daher kommen die im Diagramm angegebenen Fehler.

Nach 8 h haben wir die höchste OD. Zu dieser Zeit gibt es noch 1.8 g/L Inulin im Medium. Danach fällt die Inulinkonzentration fällt weiter während der Bakterien nicht mehr wachsen. Dies kann nicht erklärt werden, denn normalahnweise wird das Substrat zum Wachstum verwendet.

Wir sehen bei der Bestimmung der Inulinaseaktivität, dass sie erst nach 15 Stunden der Fermentationszeit beginnt. Es ist zu bemerken, dass es zwei höhere Punkten gibt. Der erste ist nach 35 Stunden (0.37 U/mL) und der zweite nach 48 Stunden (0.35 U/mL). Betrachtet man nur den Mittelwert zeigt sich, dass ab 15 Stunden die Inulinaseaktivität mehr oder weniger ein Plateau hat.

4.1.3 Optimierung der Vorkultur für die Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Bei den Versuchen der Optimierung zur Vorkultur, sehen wir, dass die exponentielle Phase sich zwischen 18.5 und 24 h findet. Dies ist aber auch nur eine grobe Abschätzung. Es zeigte sich, dass die Bakterien manches mal schneller oder langsamer wachsen. Eine ausreichend gewachsene Vorkultur im richtigen Stadium ist aber wichtig für ein gutes Wachstum im Fermenter. Daher sollte vor der Animpfung des Bioreaktors, die Vorkulturen mit dem Mikroskop kontrolliert werden und die optische Dicht sollte ungefähr 1.3 betragen.

Der pH-Wert der Vorkultur sollte bei 6.5 liegen. Der Anfangswert von 6.2 lässt sich durch das Autoklavieren die anschließende Zugabe des Inulins erklären. Möglicherweise senkt die benutzte Inulinlösung den pH etwas ab. Während der Fermentation sinkt der pH auf 4.9 ab, die ist für die Kultur nicht optimal und zeigt, dass der pH später im Fermenter reguliert werden muss.

4.1.4 Erste Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Die im Fermenter erzielte OD (1.59) ist nur wenig höher als in den Versuchen Schüttelkultur (1.17), obwohl die Menge an Inulin als Substrat im Medium doppelt zugegeben wurde. Es gibt keine Korrelation zwischen der Biotrockenmasse und der optischen Dichte, weil die Volumina bei der Probenbehandlung zu klein waren. Für die nächsten Versuche, werden 10 mL Medium für die Bestimmung der BTM gezogen.

Die Konzentration an Inulin, die zu Beginn der Fermentation 9.31 g/L ist, sollte 10 g/L sein, dies lässt sich durch das relativ grobe Abmessen der zugegebenen Wassermenge erklären.

Die Fermentation konnte um 14 Uhr gestartet werden, da die Vorkultur erst zu diesem Zeitpunkt die benötigte OD hatte. Daher wurden in der Zeit zwischen Animpfen ($t = 0$ h) und 18 Stunden keine Probe genommen (Fermentation über Nacht). Über das Wachstum (Dauer Lag-Phase, Exponentielle Phase) lässt sich daher nichts sagen, nur dass es nach 18 h abgeschlossen ist. Es bleibt eine Restkonzentration von Inulin von 0.39 g/L im Medium zurück. Ungewöhnlich ist der Anstieg der OD bei 25.5 h, da zu diesem Zeitpunkt die Inulinkonzentration nur sehr gering und Konstant ist.

Nach 18 h gibt es Inulinaseaktivität. Es ist aber auch möglich, dass vorher schon Inulinaseaktivität gebildet wurde. Leider können wir das nicht bestätigen, weil keine Probe vor 18 h (ausgenommen $t = 0$ h) gezogen wurden.

Die Ergebnisse der Abgasanalyse geben uns kaum Informationen. Die interessante Phase ist während der Nacht wo keine Punkte gemessen wurden.

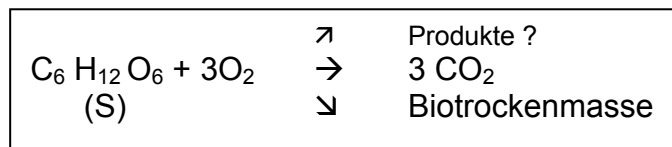
In den weiteren Fermentationen sollte durch die Zugabe von Hefeextrakt anstelle von Biotin das Wachstum gesteigert werden. Mit dem Hefeextrakt kommen weitere für das Wachstum förderliche Stoffe ins Medium. Weiters muss die Inokulation früher (Vormittags) stattfinden, dass das Wachstum (lag- und exp. Phase) besser verfolgt werden kann. Die Belüftung wird auf 0.5 vvm verringert, um bessere Werte bei der Abgasmessung zu erhalten.

4.1.5 Zweite Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Allgemein haben die Änderungen (Hefeextrakt, $q = 0.5$ vvm) einen guten Einfluss auf die Fermentation. Tatsächlich sind die Bakterien besser gewachsen als in Fermentation eins. Es wurde eine deutlich höher OD (3.9) erreicht.

Auch korrelieren dieses Mal die Ergebnisse der Messung von OD und BTM. Jedoch ist die BTM mit einem Wert von 1.38 g/L als Maximum noch sehr gering. Tatsächlich erwarten wir eine BTM von ungefähr 5 g/L. Die erwartete BTM, die kann, ist 50 %

des Kohlenstoff, wenn $RQ = 1$ und wenn keine Produkte gebildet werden. Diese Berechnung ist mit Gleichung 13 erklärt. Außerdem ist für Kohlenhydrate, die Ausbeute $Y_{X/S} = 0.5$. [17]



(Gleichung 13)

Die Inulinaseaktivität ist erst nach dem Wachstum messbar. Es betrug 0.31 U/mL, was deutlich weniger als bei der ersten Fermentation ist.

Das Wachstum der Bakterien zeigte sich auch im Verlauf des pO_2 . Dieser sank von Anfangs 100% während des Wachstums auf ein Minimum von 69.9 % ab. Der anschließende Anstieg auf einen Wert von größer als 100 % ist nicht realistisch, aber kann nicht erklärt werden.

Die Werte der Abgasanalyse zeigen einen ähnlichen Verlauf. Für CPR und OUR werden bei bestem Wachstum auch den höchsten Wert erzielt. Der RQ am Ende der Wachstumsphase ergibt einen Wert von 0.97. Dieser ist repräsentativ für eine aerobe Kultur, da die Theorie $RQ=1$ entspricht.

Die Zellausbeute von 0.36 g/L ist annehmbar, womit sie sich in der Literatur angegebenen Bereich von 0.4-0.5 befindet. [17]

Mit Hilfe der Zusammenfassung von dieser Kultur (Abbildung 19) sehen wir, dass diese Fermentation sehr gut geklappt hat. Die gemessenen Werte passen gut zu einander.

Beim nächsten Versuch, wäre es interessant eine Fed Batch-Fermentation zu machen. Nach fünf Stunden Fermentation, könnte man noch 10 g/L Inulinlösung ins Medium hinzufügen. Um zu sehen, ob das Wachstum der Bakterien weiter geht und die Ausbeute zu steigern.

4.1.6 Dritte und vierte Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Diese zwei Fermentationen sind als gescheitert anzusehen. Die Bakterien sind nur während zwei Stunden gewachsen, auf die weitere Auswertung der Fermentation (Protein, Inulinase) wurde aufgrund des geringen Wachstums verzichtet.

Ein Fehler in der Einwaage des Mediums wird ausgeschlossen, da zwei aufeinander folgende Fermentationen das gleiche Bild zeigten, die Protokolle wurden auch noch einmal kontrolliert. Der pH-Wert wurde mit einem zweiten pH-Meter als Vergleich kontrolliert, so kann auch hier ein Fehler ausgeschlossen werden.

Dass die Drehzahl des Rührers im Fermenter zu hoch war wird als mögliche Ursache gesehen (1000 U/min im Gegensatz zu 160 U/min auf dem Schüttler), obwohl dies

bei Fermentation funktioniert hat. Bei der folgenden Fermentation soll nur noch mit 500 U/min gerührt werden.

In Fermentation 5 sollen die Bedingungen möglichst ähnlich der Schüttelkultur sein, da dort die Bakterien ja bisher gut gewachsen sind.

4.1.7 Fünfte Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Diese Fermentation hat funktioniert. Wir sehen, dass die Bakterien während der ersten sechs Stunden gewachsen sind. (Abbildung 24).

Dennoch ist es möglich, dass die optische Dichte mehr als 0.904 als Maximum erreicht hätte. Nach 6 h gibt es noch 1.04 g/L Inulin im Medium. Das kann leider nicht erstätigt werden, weil zwischen 6 und 23 Stunden keine Messung gemacht wurde.

Wir sehen eine gute Korrelation zwischen der optischen Dichte und der Biotrockenmasse. Der Korrelationskoeffizient ist 0.9976. Die maximale Biotrockenmasse ist 2.8 g/L, dieser Wert ist zu hoch. Die gleiche Überlegung als für die Fermentation 1 wurde gemacht. Dieser höhere Wert kann so erklärt werden: er wurde nicht gemessen sondern mit einer Extrapolation der Eichgerade berechnet.

Die Inulinkonzentration am Anfang sollte 5 g/L sein. Der Unterschied von 0.3 g/L kommt von dem Rest des Inulins in der Vorkultur, wie vorhergehend erklärt.

Mit Hilfe der Abbildung 26, sehen wir, dass die Inulinase nach 6 Stunden gebildet ist. In diesem Moment, ist es intrazellulär. Nach 23 Stunden sind 72.7 % von dieser Inulinase extrazellulär. Wir können sagen, dass dieses Enzyms gegen Ende des Wachstums gebildet wurde. Zum Zeitpunkt $t = 6$ h ist die Inulinkonzentration 1.04 g/L. Das Inulinase wird mit der Autolyse die Zellen ins Medium abgegeben. Die maximale Ausbeute der Inulinases für diese Fermentation ist 0.33 U/mL. Das heißt 3300 U für den ganzen Fermenter.

Der Verlauf der pO_2 Kurve zeigt, dass das Wachstum ungefähr 11 Stunden dauert. Die ersten 3 h wachsen die Bakterien sehr schnell und der pO_2 fällt heftig. Der pH Verlauf ist auch mit dem Wachstum korreliert. Der pH-Wert fällt ein bisschen wenn die optische Dichte steigt.

Das Verhalten der Abgasanalyse ist nicht normal. Während der ersten fünf Stunden gibt es keine Produktion von Kohlenstoffdioxid und kein Sauerstoff wurde verbraucht. Dagegen ist das Wachstum der Bakterien sehr stark in dieser Zeit. Die Kurve von OUR und CPR haben nicht ganz die gleiche Tendenz. Dies muss Normalerweise immer so sein, weil wenn der O_2 verbraucht wird wachsen, die Bakterien und produzieren CO_2 . Ein möglicher Grund für die schlechten Werte der Abgasanalytik ist die geringe Rührerdrehzahl (500 U/min). Bei geringer Drehzahl und der hohen Fermentationstemperatur (50 °C) ist der Übergang des Sauerstoffs ins Medium nicht ideal.

In Abbildung 30, die den Lauf der Fermentation zusammenfasst, sieht man, dass alles gut korreliert ist. Wenn die optische Dichte ansteigt, sinkt, die Inulinkonzentration, der pH-Wert fällt etwas, und die Inulinaseaktivität erscheint wenn das Wachstum abgeschlossen ist. Und der pO_2 fällt bis null und steigt wieder an, wenn die Bakterien nicht mehr wachsen.

4.1.8 Gesamt Diskussion

Zuerst bemerken wir, dass die zweite Fermentation besser als die erste gelaufen ist. Wir können sagen, dass mit Hefeextrakt die Bakterien besser wachsen. Die maximale OD für die erste Fermentation ist 1.59 und für die zweite 3.9 und somit mehr als doppelt so hoch.

Dennoch ist die Inulinaseaktivität im Kulturüberstand beider ersten Fermentation höher (0.75 U/mL in $t = 22$ h) während für die zweite Fermentation, nur 0.31 U/mL in $t = 22.5$ erreicht werden. Eine mögliche Erklärung kann sein, dass zum Zeitpunkt der Fermentationen die Methode zur Bestimmung der Inulinaseaktivität noch nicht optimiert war. Die Enzymreaktion wurde nicht gestoppt und so kann es sein, dass bei Wartezeiten an der HPLC ein Teil der Proben schon weiterreagiert hat. Daher sind diese Ergebnisse nicht ganz aussagekräftig.

Wir beobachten auch, dass die Ergebnisse der Abgasanalyse in der zweiten Fermentation besser sind, wenn die Belüftung 0.5 vvm, statt 1 vvm ist.

Wir sehen, dass die Fermentation 5 eine niedrigere OD erreicht als die Fermentation 2. Nach ungefähr 6 Stunden ist die optische Dichte für die zweite Kultivierung 3.9 während die Fermentation 5 nur 0.904 erreicht. Diese Feststellung ist ganz normal. In Fermentation 5 gibt es nur 5 g/L Inulinlösung im Medium, statt 10 g/L. Und in dieser Zeit die Inulinkonzentration ist 2 g/L für die zweite Fermentation und 0.2 g/L für die fünfte Fermentation.

Die Inulinaseaktivität im Kulturüberstand ist 0.28 U/mL nach 23 h Fermentationszeit. Wir können diesen Wert wie eine Referenz betrachten, da er mit der HPLC-Methode (die optimiert ist) bestimmt wurde.

Die maximale Zellausbeute für die fünfte Fermentation ist 0.66 während sie für die zweite Fermentation 0.16 ist. Wenn man die Steigung von der Kurve BTM-OD für die zweite und fünfte Fermentation vergleicht, sollte man das gleiche erhalten. Leider ist es nicht der Fall. Wir haben einen Faktor 8.5, was sehr groß ist. Wir können doch nicht die Ergebnisse der Zellausbeuteberechnung wie sicheren Wert ansehen. Dennoch diese können diese Unterschiede nicht erklärt werden. Es wäre interessant für die nächsten Versuche die Proteinkonzentration im Pellet zu bestimmen. So haben wir eine zusätzliche Information.

Es wäre gut, noch mal ein paar Fermentationen durchzuführen, um reproduzierbare Resultate zu erhalten. Man könnte dann andere Parameter ändern wie Inulinkonzentration und Drehzahl. Die Belüftung sollte bei 0.5 vvm bleiben, da wir gesehen haben, dass mit 1 vvm die Abgasanalyse schlechter wird.

4.2 Vergleich der DNSA-Methode und HPLC-Methode für den Substraverlauf

Man sieht, dass der Verlauf beider Kurven gleich ist bis auf den ersten Punkt. Tatsächlich ist die Inulinkonzentration mit der DNSA-Methode 2.5 während mit der HPLC-Methode 5.03 g/L. Leider konnte der Punkt $t = 0$ mit der DNSA-Methode nicht noch einmal gemessen werden, er muss als falsch angesehen werden.

Dennoch sehen wir, dass die beiden Methoden gut funktionieren. Während der Fermentation hat die DNSA-Methode den Vorteil, dass die schneller im Medium gemessen werden kann. Dies ist zum Beispiel bei der Fed Batch-Fermentation von Vorteil.

4.3 Optimierung der Analytik

4.3.1 Optimierung der HPLC-Methode für die Inulinaseaktivität.

Wir können sagen, dass diese Methode optimiert ist. Die Versuche sind Reproduzierbar. Das Verhältnis zwischen den zwei Enzymkonzentrationen ist 1.84, dies sollte 2 sein. Dieser Unterschied kommt aus Pipettierfehlern und ist annehmbar. Die Abweichung der Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur Enzymkonzentration, in diesem Sinne eine Michaelis-Menten-Enzym ist.

Die Inulobiosekonzentration erreicht ein Plateau bei 1.98 g/L. Im Medium am Anfang ist die Inulinkonzentration 6.67 g/L. Das heißt, die Menge an Inulobiose ist ein bisschen weniger als ein Drittel.

Als der Zeitverlauf der Inulobiosekonzentration linear ist, könnten die Proben kürzer inkubiert werden. Es ist ein Zeitersparnis. Bis jetzt sind die Proben 30 min inkubiert worden, statt eine Stunde.

4.3.2 Optimierung der DNSA-Methode für die Enzymaktivität

Man sieht gut, dass die Abweichung der Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Enzymkonzentration ist. Tatsächlich die Steigung von Versuch 1 (1x Enzym) ist 2.19 mal größer als die Steigung von Versuch 2 (0.5x Enzym). Es sollte ein Faktor 2 sein. Aber dieser Unterschied kommt aus Pipettierungsfehlern. Wir können also sagen wie für die HPLC-Methode (Kapitel 4.3.1), dass das Enzym ein Michaelienenzym ist.

Um sicher zu sein, dass diese Methode optimiert ist, wäre es nötig jeden Versuch, zu wiederholen. Damit würde man sehen, ob die Versuche reproduzierbar sind.

5 Schlussfolgerung und Perspektiven

In dieser Diplomarbeit, die einzige kultivierbare Stamm und das Nährmedium auf welche wächst sie, ist bestimmt worden. Die analytischen Methoden wurden verbessert und erste Ergebnisse aus Fermentationen gewonnen.

Die Ziele dieser Arbeit wurden nur zum Teil erreicht. Denn vor der Isolierung und Charakterisierung der Inulinase des *Paenibacillus spec.* muss die Fermentation im 10 L-Bioreaktor optimiert werden. Und diese Optimierung schließt die Optimierung des Nährmediums und die Analytik-Methode ein. Im Moment bleiben noch folgende Fragen offen: Es konnte noch keine Erklärung gefunden werden, warum gewisse Kulturen erfolgreich gezüchtet werden konnten und weshalb andere nicht. Des weiteren wäre es von Vorteil die Produktion der Biomasse zu erhöhen, damit könnte die Menge der Inulinase gesteigert werden. Dies könnte erzielt werden, indem die Menge des Substrats erhöht würde. Allerdings muss die verhindert werden, dass es zu keiner Inhibition des Substrats kommt.

Die analytischen Methoden welche die Enzymaktivität Messen (Methode HPLC und DNSA) sind optimiert worden und geben korrekte Ergebnisse. In der Tat konnten die operativen Bedingungen wie zum Beispiel der pH-Wert, die Inkubation, die Zeit und die Temperatur der Inaktivierung so modifiziert werden. Dies führte zu einer Optimierung der Vorgänge.

Obwohl, die Inulobiose kein reduzierter Zucker ist, erlaubt die DNSA-Methode die Menge anderen Produkte der Hydrolyse des Inulins zu messen. Man weiß noch nicht, ob die Inulinaseaktivität, die im Kulturüberstand gemessen wird, aus Sekretion oder aus der Lyse der bakteriellen Zelle stammt. aus erscheint am Ende der Fermentation.

Des Weiteren wäre es interessant zu überprüfen ob mit einer modifizierte Ultraschall Behandlung (länger / stärker), eine höhere Menge an Inulinase gewonnen werden könnte. Die Ergebnisse könnten vertieft werden, indem man eine Behandlung in einer Kugelmühle in Betracht zieht, um die maximale Enzymaktivität der flüssigen Phase zu evaluieren.

Mit einigen weiteren Fermentationen wäre es möglich, die Reproduzierbarkeit zu prüfen und die idealen Bedingungen der Fermentation im 10 L-Bioreaktor zu finden.

Es wäre ebenfalls von Vorteil, das molekulare Gewicht, die Sequenz der Aminosäuren und den isoelektrischen Punkt der Inulinase zu bestimmen.

Dann könnte man daran denken eine Strategie der Isolation zu entwickeln. Zunächst wäre es von Vorteil eine Filtrationsstufe (um das Volumen zu reduzieren) einzusetzen, dann eine Stufe der Konzentration im Evaporator und schlussendlich Chromatografiestufen wie Ionen Austauschharz-, Affinität-, Size-Exclusion-Chromatografie. Schlussendlich wenn die Inulinase isoliert wäre, könnte sie charakterisiert werden.

6 Literatur

- [1] Internet, «Catalogue de documents pour le chercheur», Adresse URL: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2108308>, Seite konsultiert der 17.10.2006
- [2] K. Otha, N. Suetsugu, T. Nakamura (2002), Purification and Properties of an Extracellular Inulinase from *Rhizopus* sp. Strain TN-96, *Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Volumen* (N°94), Seite 78-80
- [3] Internet, «BRENDA», Adresse URL: <http://www.brenda-enzymes.org/>, Seite konsultiert der 17.10.2006
- [4] Internet, «Sigma-Aldrich», Adresse URL: <http://www.sigmaaldrich.com>, Seite konsultiert den 17.10.2006
- [5] Internet, «Wikipédia, l'encyclopédie libre», Adresse URL: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Inuline>, Seite konsultiert den 04.07.2006
- [6] Internet, «Prébiotiques: l'art de nourrir l'intestin et la santé», Adresse URL: http://www.healthandfood.be/html/fr/article/septembre2005/prebiotique_intestin.htm, Seite konsultiert den 25.09.2006
- [7] Internet, «Inuline FructoOligoSaccharide Presentation», Adresse URL: http://www.unipex.fr/unipex/195.68.24.130/UNIPEXINS/FRA/html/cata_alimentaire/gammes/sensusInuline.htm, Seite konsultiert den 25.09.2006
- [8] K-V.Praet (2007), Synergy 1 improves Calcium Absorption For stronger Bone, *Food Ingredients Asia-China, Volumen* (N°) unbekannt, Seite 1
- [9] Internet, «La chicorée, un puissant prébiotique», Adresse URL: <http://soignez-vous.com/2004/12/01/la-chicore-un-puissant-probiotique-4/>, Seite konsultiert der 10.10.2006
- [10] D.Schock (2005), Analyse von Inulinase-Genen und phylogenetische Einordnung von drei Bakterienisolaten, *Diplomarbeit, Volumen* (N°1), Seite 20-22
- [11] J.Yun, D. Kom, B.Kum, S. Song (1997), Comparison of sugar compositions inulo-and fructo-oligosaccharides produced by different enzyme forms, *Biotechnology Letters, Volumen* (N°19), Seite 553-556
- [12] Internet, «GenomeNet», Adresse URL: <http://www.genome.jp/Fig/Compound/C01711.gif>, Seite konsultiert den 10.10.2006
- [13] H. Beyer, W. Walter (1998), Disaccharid, *Lehrbuch der Organischen Chemie, Volumen* (N°11), Seite 657-662
- [14] E.Raunft, S.Wortmann (2006), Zur Bildung von Endoinulinase durch *Paenibacillus spec.*, *Studienarbeit, Volumen* (N°1), Seite 30- 32 und 55-68
- [15] Institute für Biochimie (2005), Kohlenhydrate, *Biochemisches Grundpraktikum, Volumen* (N°1), Seite 8-11
- [16] Internet, «Test Bradford», Adresse URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bradford.Test>, Seite konsultiert der 18.12.2006
- [17] H. Dellweg (1987), Ausbeute der Kohlenhydraten, *Biotechnologie, Grundlagen und Verfahren/VCH, Volumen* (N°3), Seite 322

7 Anhang

1. Laborheft
2. Zusammenfassung Fläche der Inulobiose-Peak
3. Eichgerade der Raftiline-Inulin
4. Chromatogramm der Serva-Inulinstandard
5. Chromatogramm der Raftilose-Inulinstandard
6. Verlauf der Diplomarbeit

Anhang 2 : Zusammenfassung Fläche der Inulobiose-Peak

Erste Fermentation im Schüttelkultur

Tabelle 1: Flask 1.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
0	0	1	3.5527E-07	0	0
2	0			0	0
4	2042000			2.72607	0.09226653
6	519540			0.6935859	0.0234751
8	826270			1.10307045	0.03733451
24	3447500			4.6024125	0.15577319
28	3919600			5.232666	0.17710475
30	3233600			4.316856	0.14610825
32	3516900			4.6950615	0.15890899
44	4325600			5.774676	0.19544961
48	3969300			5.2990155	0.17935041
50	5529000			7.381215	0.24982451

Tabelle 2: Flask 2.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
0	0	1	3.5527E-07	0	0
2	0			0	0
4	1328200			1.773147	0.06001391
6	875480			1.1687658	0.03955803
8	547970			0.73153995	0.02475969
24	5449400			7.274949	0.24622783
28	4933900			6.5867565	0.22293528
30	8084400			10.792674	0.36528871
32	7916700			10.5687945	0.35771128
44	6118500			8.1681975	0.27646071
48	7775500			10.3802925	0.35133125
50	7542200			10.068837	0.34078973

Tabelle 3: Flask 3.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
15	6199000	1	3.5527E-07	8.275665	0.28009805
17	3601800			4.808403	0.16274515
19	3897700			5.2034295	0.17611521
21	2966500			3.9602775	0.1340395
39	4996500			6.6703275	0.22576382
42	4945500			6.6022425	0.22345942

Tabelle 4: Flask 4.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
15	3758800	1	3.5527E-07	5.017998	0.1698391
17	4421600			5.902836	0.19978731
19	3853200			5.144022	0.1741045
21	6580400			8.784834	0.29733138
39	3798000			5.07033	0.17161032
42	3204900			4.2785415	0.14481146

Erste Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Tabelle 7: Erste Fermentation im 10 L-Bioreaktor.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
0	0	1	1.2562E-06	0	0
18	0	1		9.68982432	0.672306861
20	2042000	2		10.53047336	0.73063342
22	519540	2		10.82894648	0.751342312
24	826270	2		10.9025598	0.756449809
25.5	6199000	2		11.1751552	0.775363233
42	3601800	2		11.7680816	0.816502109

Zweite Fermentation um 10 L-Bioreaktor

Tabelle 8: Zweite Fermentation im 10 L-Bioreaktor.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
0	0	1	1.1729E-06	0	0
2.75	0	1		0	0
4.75	0	1		0	0
5.75	124200	1		0.14567418	0.015160917
22.25	2557700	1		2.99992633	0.312214802

Fünfte Fermentation im 10 L-Bioreaktor

Tabelle 9: Fünfte Fermentation im 10 L-Bioreaktor.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
0	0	1	7.1922E-07	0	0
1	0	1		0	0
1.5	0	1		0	0
1.75	0	1		0	0
2	0	1		0	0
3	0	1		0	0
4	0	1		0	0
5	0	1		0	0
6	0	1		0	0
23	3260400	1		2.344944888	0.244048161

Tabelle 10: Fünfte Fermentation im 10 L-Bioreaktor mit Ultraschall Finger.

Zeit [h]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]	Inulinaseaktivität [U/mL]
0	0	1	7.1922E-07	0	0
1	0	1		0	0
1.5	0	1		0	0
1.75	0	1		0	0
2	0	1		0	0
3	0	1		0	0
4	0	1		0	0
5	0	1		0	0
6	270850	1		0.194800737	0.02703163
23	3346800	1		2.407085496	0.334020523.

Optimierung der HPLC-Methode für die Bestimmung der Inulinaseaktivität

Tabelle 11 : 0.5x Enzym. Der Kulturüberstand kommt aus einer Kultur von *Paenibacillus* sp. FH-138 in 1 L-Schüttelkultur nach 33 h. Versuch 1.

Zeit [min]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]
0	577640	1	1.2466E-06	0.720086024
10	679280	1		0.846790448
20	752990	1		0.938677334
30	780640	1		0.973145824
40	859250	1		1.07114105
50	915900	1		1.14176094
60	958310	1		1.194629246
70	998700	1		1.24497942
80	1103300	1		1.37537378
90	1144500	1		1.4267337
100	1209100	1		1.50726406
110	1249600	1		1.55775136
120	1356600	1		1.69113756
130	1396500	1		1.7408769
140	1474400	1		1.83798704
150	1479500	1		1.8443447
160	1503500	1		1.8742631
170	1533800	1		1.91203508

Tabelle 12 : 0.5x Enzym. Der Kulturüberstand kommt aus einer Kultur von *Paenibacillus* sp. FH-138 in 1 L-Schüttelkultur nach 33 h. Versuch 2.

Zeit [min]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]
0	589630	1	1.2048E-06	0.710386224
10	709270	1		0.144142272
20	734800	1		0.174900816
30	827490	1		0.286573728
40	860240	1		0.326030928
50	935100	1		0.416222256
60	971120	1		0.459619152
70	998860	1		0.493040304
80	1145900	1		0.670194096
90	1219000	1		0.758264976
100	1251800	1		0.797782416
110	1358500	1		0.926334576
120	1396500	1		0.972116976
130	1436500	1		1.020308976
140	1494400	1		1.090066896
150	1494400	1		1.180547376
160	1583500	1		1.197414576
170	1653800	1		1.282112016

Tabelle 13: 1x Enzym. Der Kulturüberstand kommt aus einer Kultur von *Paenibacillus* sp. FH-138 in 1 L-Schüttelkultur nach 33 h. Versuch 1.

Zeit [min]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]
0	1143800	1	1.2316E-06	1.40870408
10	1228300	1		1.51277428
20	1416500	1		1.7445614
30	1604200	1		1.97573272
40	1723400	1		2.12253944
50	1825300	1		2.24803948
60	1928000	1		2.3745248
70	1966400	1		2.42181824
80	2114100	1		2.60372556
90	2200700	1		2.71038212
100	2305400	1		2.83933064
110	2362100	1		2.90916236
120	2522200	1		3.10634152

Tabelle 14 : 1x Enzym. Der Kulturüberstand kommt aus einer Kultur von *Paenibacillus* sp. FH-138 in 1 L-Schüttelkultur nach 33 h. Versuch 2.

Zeit [min]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]
0	1185900	1	1.1912E-06	1.41264408
10	1255700	1		1.49578984
20	1503100	1		1.79049272
30	1651200	1		1.96690944
40	1736800	1		2.06887616
50	1816000	1		2.1632192
60	2005700	1		2.38918984
70	2099500	1		2.5009244
80	2185300	1		2.60312936
90	2324400	1		2.76882528
100	2374600	1		2.82862352
110	2497000	1		2.9744264
120	2632400	1		3.13571488

Tabelle 15 : 1x Enzym. Der Kulturüberstand kommt aus einer Kultur des *Paenibacillus* sp, FH-138 im 10 L-Bioreaktor. Versuch 1.

Zeit [min]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]
0	0	1	1.9403E-06	0
20	364993	1		0.708193863
40	581091	1		1.127487596
60	742248	1		1.440179616
80	934433	1		1.813075089
100	982015	1		1.905398176
120	982810	1		1.90694071
140	1001989	1		1.944153616
160	1010986	1		1.961610444
180	1014627	1		1.968675056

Tabelle 16: 1x Enzym. Der Kulturüberstand kommt aus einer Kultur des *Paenibacillus* sp, FH-138 im 10 L-Bioreaktor. Versuch 2.

Zeit [min]	Fläche der Inulobiose-Peaks	Verdünnung	Response-Faktor	Inulobiose-konzentration [g/L]
0	0	1	1.9403E-06	0
20	391546	1		0.7597145
40	573625	1		1.113001358
60	729112	1		1.414691909
80	906478	1		1.75883416
100	969727	1		1.881555839
120	1001620	1		1.943437647
140	1021425	1		1.981865177
160	986044	1		1.913215622
180	1028724	1		1.996027386

Anhang 3: Eichgerade der Raftiline-Inulin

Diese Eichgerade benutzt, um die Berechnung der Inulinkonzentration mit der DNSA-Methode.

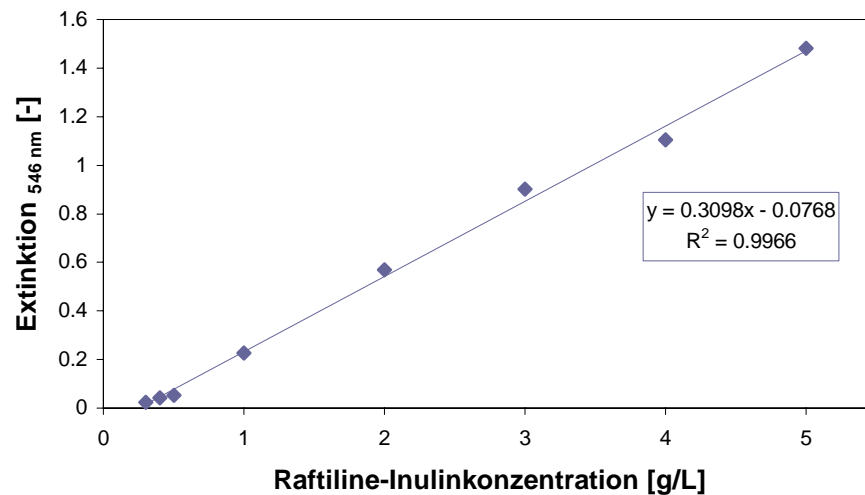


Abbildung 1: Darstellung der erhaltenen Eichgerade des Raftiline-Inulins, indem man die Extinktion bei 546 nm gemäß der Konzentration des Inulins für den Standard von 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.4, 0.3.

Anhang 4: Chromatogramm der Serva-Inulinstandard

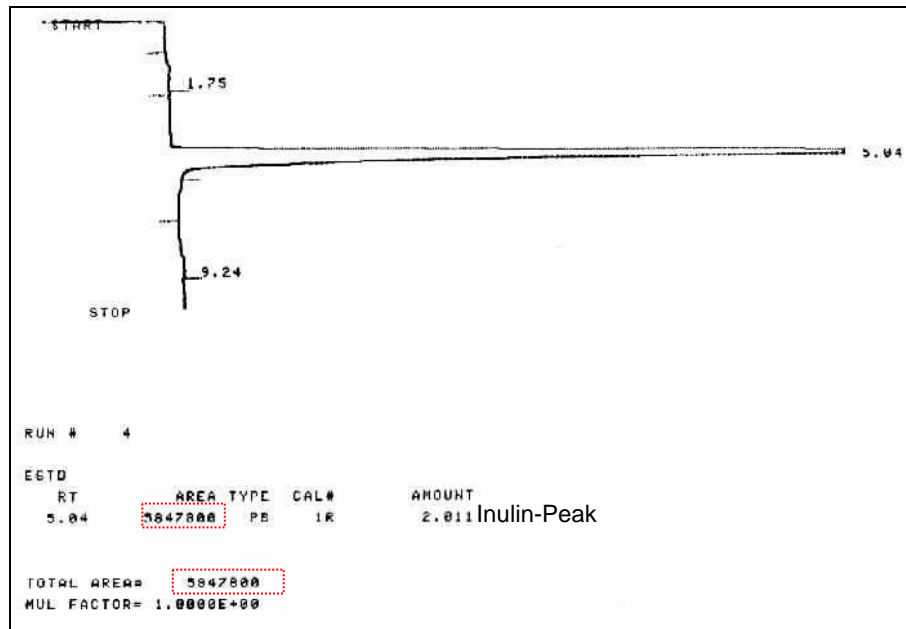


Abbildung 2 : HPLC-Chromatogramm der Kalibrierung für den Substratverlauf. Der Standard ist Serva-Inulin 2 g/L.

Legende: Peak 5.04 min ist Inulin

Anhang 5: Chromatogramm der Raftilose-Inulinstandard

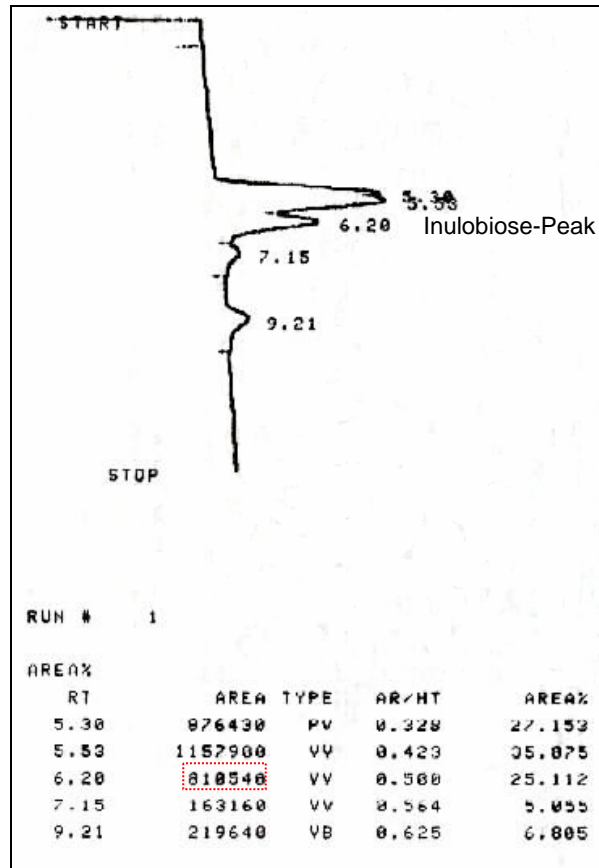


Abbildung 1: HPLC-Chromatogramm des Raftilosestandard 1 g/L. Der Peak in 6.2 min ist die Inulobiose. [16]

Anhang 6: Verlauf der Diplomarbeit

Tabelle 1: Verlauf der Diplomarbeit.

Monat	Arbeit ausgefahren
September	<ul style="list-style-type: none"> • Kontaktaufnahme des Laboratorium • Wahl des Stamms <i>Paenibacillus</i> sp. FH-138 • Optimierung der Nährmedium
Oktober	<ul style="list-style-type: none"> • Optimierung der Vorkultur • Analytik (Aktivitätstests / Substratverlauf) • Bericht schreiben
November	<ul style="list-style-type: none"> • Erste Fermentation • Bericht schreiben
Dezember	<ul style="list-style-type: none"> • Zweite Fermentation • Optimierung der Test HPLC für die Inulinaseaktivität • Dritte Fermentation • Bericht schreiben
Januar	<ul style="list-style-type: none"> • Vierte und fünfte Fermentation • Bericht schreiben
Februar	<ul style="list-style-type: none"> • Bestimmung des Ort wo die Inulinase sich findet • Aufräumen des Laboratorium • Bericht schreiben