

Bernburg  
Dessau  
Köthen



**Hochschule Anhalt**  
Anhalt University of Applied Sciences

**Fachbereich Angewandte Biowissenschaften  
und Prozesstechnik**

# **Optimierung industrieller Nebenprodukte als Substrat zur Produktion von Acetoin und 2,3- Butandiol mit Hilfe von Bakterien**

## **Bachelorarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Bachelor of Science (B.Sc.)**

**Fricke, Tobias**

**Mat.-Nr.: 4057909**

**Studiengang: Biotechnologie**

- 1. Gutachter: Prof. Reinhard Pätz**
- 2. Gutachter: Dipl.-Wirtsch.-Ing. Jan-Henryk Richter-Listewnik**

**Datum der Abgabe: 25.11.2016**

## Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis .....	III
2. Abbildungsverzeichnis .....	IV
3. Tabellenverzeichnis .....	V
4. Zielstellung der Arbeit .....	1
5. Theoretische Grundlagen .....	1
5.1. Die Mikroorganismen.....	1
5.1.1. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	1
5.1.2. <i>Paenibacillus polymyxa</i> .....	2
5.2. Die Produkte .....	2
5.2.1. Acetoin.....	2
5.2.2. 2,3-Butandiol.....	3
5.2.3. Stoffwechselwege für Acetoin und 2,3-Butandiol .....	3
6. Materialien und Methoden .....	5
6.1. Chemikalien .....	5
6.2. Geräte .....	5
6.3. Verwendete Mikroorganismen.....	5
6.4. Vorkultur und Medien.....	5
6.5. Methoden .....	10
6.5.1. Glucosebestimmung.....	10
6.5.2. Analyse mit dem Gaschromatographen.....	10
7. Ergebnisse.....	12
7.1. Untersuchung auf den Einfluss von Wasser .....	12
7.2. Fermentation mit Maisquellwasser.....	13
7.3. Fermentation mit Pepton .....	17
8. Diskussion .....	19
8.1. Wachstumsauswertung .....	19
8.2. Produktbildung bei Wasserversuchen.....	19
8.3. Produktbildung mit Maisquellwasser.....	21
8.3.1. Hamino-Medium .....	21
8.3.2. Fermentino-Medium .....	24
8.4. Produktbildung mit Pepton .....	28
8.5. Allgemeine Produktauswertung.....	33
9. Zusammenfassung und Ausblick.....	35

10.	Literaturverzeichnis .....	36
11.	Eidesstattliche Erklärung.....	38

## 1. Abkürzungsverzeichnis

B. lich.	<i>Bacillus licheniformis</i>
CSL	Maisquellwasser (corn steep liquor)
GC	Gaschromatograph
Glc	Glucose
NADH/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
P. poly.	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute

## 2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 S-Acetoin (Yikrazuul, 2010) .....	2
Abbildung 2 Stereoisomere des 2,3-Butandiols .....	3
Abbildung 3 Stoffwechselweg in Bakterien zu Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol (Celińska, et al., 2009) .....	4
Abbildung 4 Fermentationsverlauf der Wasseruntersuchung mit Hamino-Medium .....	12
Abbildung 5 Fermentationsverlauf der Wasseruntersuchung mit Fermentino-Medium.....	13
Abbildung 6 Fermentationsverlauf bei 5gCSL/L, Hamino .....	13
Abbildung 7 Fermentationsverlauf bei 5 gCSL/L, Fermentino .....	14
Abbildung 8 Fermentationsverlauf bei 20 gCSL/L, Hamino .....	15
Abbildung 9 Fermentationsverlauf bei 20 gCSL/L, Fermentino .....	15
Abbildung 10 Fermentationsverlauf bei 40 gCSL/L, Hamino .....	16
Abbildung 11 Fermentationsverlauf bei 40 gCSL/L, Fermentino .....	16
Abbildung 12 Fermentationsverlauf bei 10 gP/L, Hamino .....	17
Abbildung 13 Fermentationsverlauf bei 10 gP/L, Fermentino .....	17
Abbildung 14 Fermentationsverlauf bei 33 gP/L, Hamino .....	18
Abbildung 15 Fermentationsverlauf bei 33 gP/L, Fermentino .....	18
Abbildung 16 Produktbildung bei Wasserversuchen, Hamino .....	19
Abbildung 17 Produktbildung bei Wasserversuchen, Fermentino .....	20
Abbildung 18 Produktbildung bei 5 gCSL/L, B. lich., Hamino .....	21
Abbildung 19 Produktbildung bei 5 gCSL/L, P. poly., Hamino .....	22
Abbildung 20 Produktbildung bei 20 gCSL/L, B. lich., Hamino .....	22
Abbildung 21 Produktbildung bei 20 gCSL/L, P. poly., Hamino .....	23
Abbildung 22 Produktbildung bei 40 gCSL/L, B. lich., Hamino .....	23
Abbildung 23 Produktbildung bei 40 gCSL/L, P. poly., Hamino .....	24
Abbildung 24 Produktbildung bei 5 gCSL/L, B. lich., Fermentino .....	25
Abbildung 25 Produktbildung bei 5 gCSL/L, P. poly., Fermentino .....	25
Abbildung 26 Produktbildung bei 20 gCSL/L, B. lich., Fermentino .....	26
Abbildung 27 Produktbildung bei 20 gCSL/L, P. poly., Fermentino .....	26
Abbildung 28 Produktbildung bei 40 gCSL/L, B. lich., Fermentino .....	27
Abbildung 29 Produktbildung bei 40 gCSL/L, P. poly., Fermentino .....	27
Abbildung 30 Produktbildung bei 10 gP/L, B. lich., Hamino .....	28
Abbildung 31 Produktbildung bei 10 gP/L, P. poly., Hamino.....	29
Abbildung 32 Produktbildung bei 33 gP/L, B. lich., Hamino .....	29
Abbildung 33 Produktbildung bei 33 gP/L, P. poly., Hamino.....	30
Abbildung 34 Produktbildung bei 10 gP/L, B. lich., Fermentino .....	31
Abbildung 35 Produktbildung bei 10 gP/L, P. poly., Fermentino .....	31
Abbildung 36 Produktbildung bei 33 gP/L, B. lich., Fermentino .....	32
Abbildung 37 Produktbildung bei 33 gP/L, P. poly., Fermentino .....	32

### 3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Chemikalien .....	5
Tabelle 2	Verwendete Geräte .....	5
Tabelle 3	Zusammensetzung des YEPG-Mediums.....	6
Tabelle 4	Zusammensetzung Hamino, Prüfbericht vom 05.06.2014 .....	7
Tabelle 5	Zusammensetzung Hamino, Prüfbericht vom 20.06.2014 .....	7
Tabelle 6	Parameter des GC .....	10
Tabelle 7	Vergleich der maximalen Produktkonzentrationen in Leitungswasser .....	20
Tabelle 8	Vergleich von Produktkonzentrationen im Hamino-Medium mit CSL.....	24
Tabelle 9	Vergleich der Produktkonzentrationen im Fermentino-Medium mit CSL.....	28
Tabelle 10	Vergleich der Produktkonzentrationen im Hamino-Medium mit Pepton .....	30
Tabelle 11	Produktbildung bei 40 gP/L im Fermentino-Medium .....	33
Tabelle 12	Vergleich der Produktkonzentrationen im Fermentino-Medium mit Pepton .....	33
Tabelle 13	Maximale Produktkonzentrationen aus allen Fermentationen .....	34

#### **4. Zielstellung der Arbeit**

Im Rahmen der Bachelorarbeit sollte auf den gesammelten Erfahrungen des Praktikums mit dem Thema „Untersuchung von Substraten auf das Wachstum von *Bacillus licheniformis* und *Paenibacillus polymyxa*“ aufgebaut werden. Nachdem zunächst während des Praktikums die nötigen Medienkomponenten für die Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol durch die genannten Bakterien bestimmt wurden, sollten nun ein stärke- und ein glucosehaltiges Industriesubstrat weitestgehend für die Produktion der vorher genannten Stoffe optimiert werden. Außerdem sollten weiterhin die Fähigkeiten des selbstständigen Arbeitens, des Fermentierens und Analysierens und des wissenschaftlichen Schreibens vertieft und ausgebaut werden. Hierbei sollte auch eine statistische Auswertung der Versuche erfolgen, um die optimalen Konzentrationen für die zugegebenen Komponenten zu erhalten.

#### **5. Theoretische Grundlagen**

##### **5.1. Die Mikroorganismen**

Zu den Mikroorganismen wurde sich in der vorangegangenen Arbeit bereits geäußert (Fricke, 2016). Aus diesem Grund werden nur noch einmal kurz die wichtigsten Eigenschaften zusammengefasst.

##### **5.1.1. *Bacillus licheniformis***

*Bacillus licheniformis* ist ein stäbchenförmiger, Gram-positiver, fakultativ anaerob wachsender Mikroorganismus, der im Boden gefunden werden kann (Micheal, et al., 2004). Seine optimale Wachstumstemperatur liegt bei etwa 30°C und er bevorzugt leicht saure pH-Bereiche um etwa 5,5. Wie sein naher Verwandter, *Bacillus subtilis*, bildet er sehr viele extrazelluläre Enzyme, die vielseitig in der Industrie angewendet werden können, aber auch in der Natur zu finden sind. So zählt *B. licheniformis* zu den Bakterien, die durch seine Produkte auch Federn zersetzen können, um die ansonsten nicht nutzbaren Proteine zugänglich zu machen (Williams, et al., 1990). Aufgrund der vielen verschiedenen gebildeten Enzyme, die zum hydrolisieren von Polysacchariden, Peptiden und Lipiden verwendet werden, kann der Bacillus viele Quellen für Nährstoffe nutzen.

### 5.1.2. *Paenibacillus polymyxa*

Ebenso wie *Bacillus licheniformis* zählt dieses Bakterium zu den stäbchenförmigen, Gram-positiven, fakultativ anaerob wachsenden Mikroorganismen (He, et al., 2007). Eine Einsatzmöglichkeit bietet sich in der Agrarwirtschaft. Durch die Bildung von Cytokininen, Auxinen, Ethylen und Gibberellinen, werden das Pflanzenwachstum und die Wurzelausbreitung gefördert (Timmusk, et al., 1999). Sekundärmetabolite haben antimikrobielle Eigenschaften gegen viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Lal, et al., 2009), was zu Anwendungen in der Medizin führt.

## 5.2. Die Produkte

### 5.2.1. Acetoin

Acetoin, oder auch 3-Hydroxy-2-butanon, Acetylmethylcarbinol oder Dimethylketol ist eine farblose, angenehm riechende Flüssigkeit. Die Molmasse beträgt 88,11 g/mol. Der Schmelzpunkt liegt bei 15°C und der Siedepunkt bei 147°C. Es hat eine Dichte von 1,01 g/cm<sup>3</sup> (2016).

Acetoin besteht aus einem C<sub>4</sub>-Körper mit einer Ketogruppe am zweiten und einer Hydroxylgruppe am dritten C-Atom. Die außenständigen C-Atome bilden Methylgruppen. Aufgrund dieses Aufbaus kann sich ein Chiralitätszentrum bilden und Acetoin sowohl in einer S-Form, als auch in einer R-Form vorliegen. Der Unterschied liegt bei der Lage der Hydroxylgruppe am dritten C-Atom.

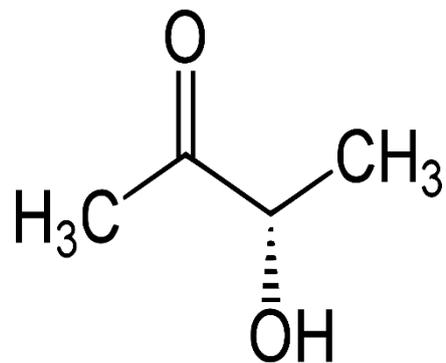


Abbildung 1 S-Acetoin (Yikrazuul, 2010)

Anwendungsgebiete für Acetoin sind insbesondere die Lebensmittel-, Kosmetik- und landwirtschaftliche Industrie. Außerdem ist es eine wichtige Plattformchemikalie. Bisher wurde es aus fossilen Rohstoffen gewonnen, was auf umweltschädliche Prozesse aufbaut und oft viel Energie benötigt. Aus diesem Grund wird nach Alternativmöglichkeiten gesucht Acetoin zu gewinnen. 1998 wurde es von der World Health Organisation als ungefährlicher Aromastoff klassifiziert (WHO, 2010) und wird seither zur Aromatisierung in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Für die Landwirtschaft spielen andere Funktionen eine Rolle. Zum einen wirkt sich

Acetoin positiv auf das Wachstum von Pflanzen aus (Ping, et al., 2004), zum anderen zieht es Insekten an und kann somit zum Aufstellen von Fallen genutzt werden (Chen, et al., 2011).

### 5.2.2. 2,3-Butandiol

2,3-Butandiol ist weiterhin bekannt als 2,3-Butylen-Glykol, Dimethylethylen-Glykol oder nach IUPAC-Standard Butan-2,3-Diol. Das Molekulargewicht beträgt 90,121 g/mol und mit seiner Dichte von 1,01 g/cm<sup>3</sup> und einem Heizwert von 27198 J/g liegt es zwischen Ethanol (29055 J/g) und Methanol (22081 J/g) (Celińska, et al., 2009). Der Siedepunkt liegt zwischen 177°C bis 182°C und es gefriert bei -60°C.

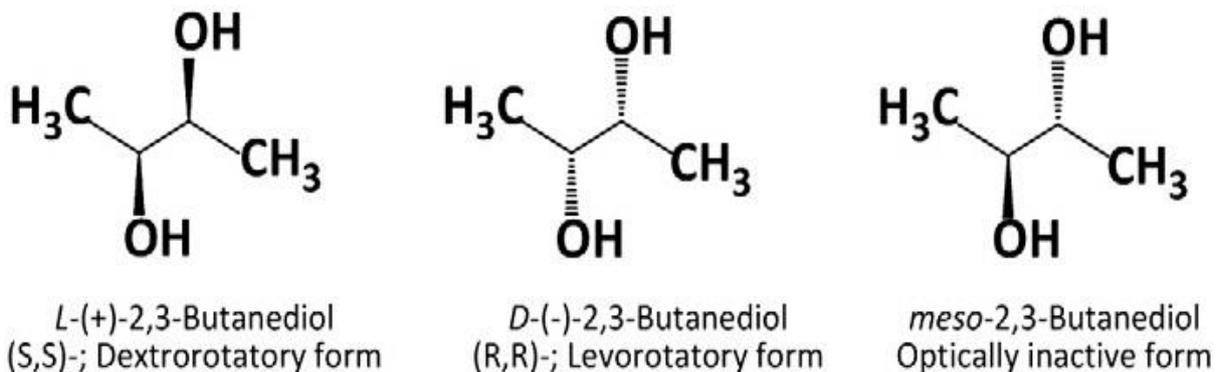


Abbildung 2 Stereoisomere des 2,3-Butandiols

Wie beim Acetoin findet sich auch beim 2,3-Butandiol ein C<sub>4</sub>-Körper, der ein chirales Zentrum besitzt, wodurch Stereoisomere entstehen. Allerdings liegen hier zwei Hydroxylgruppen vor, was das 2,3-Butandiol zur oxidierten Form des Acetoin macht. Das *meso*-2,3-Butandiol ist im Gegensatz zu den anderen beiden Isomeren optisch inaktiv.

2,3-Butandiol wird als Trägermolekül für Medikamente (Garg, et al., 1995), als Frostschutzmittel (Nakashimada, et al., 1998), als Weichmacher für thermoplastische Polymere oder auch als Komponente in Druckertinte, Parfümen und Nahrungsmitteln (Ji, et al., 2011).

### 5.2.3. Stoffwechselwege für Acetoin und 2,3-Butandiol

Acetoin und 2,3-Butandiol werden beide in den gleichen Stoffwechselwegen gebildet. Diese sind relativ simpel und werden nur durch drei Enzyme reguliert, welche zum Teil in einem Operon zusammengefasst werden.

Pyruvat, welches aus der Glykolyse gewonnen wird, wird mittels 2-Acetolactat-Synthese (ALS) in 2-Acetolactat umgebaut. Hierbei reagieren zwei Pyruvatmoleküle unter Abspaltung von CO<sub>2</sub>. Danach wird durch 2-Acetolactat-Decarboxylase (ALDC) das 2-Acetolactat unter Abspaltung von weiterem Kohlenstoffdioxid zu Acetoin umgewandelt. Bevor dies geschieht, kann sich das 2-Acetolactat spontan zu Diacetyl umwandeln.

In diesem Fall wird dieses von der Diacetyl-Reduktase (DAR) zu Acetoin umgesetzt

(Celińska, et al., 2009). Alle diese Schritte können nur in eine Richtung stattfinden. Dies gilt nicht für den letzten Schritt, bei dem Acetoin durch 2,3-Butandiol-Dehydrogenase

(BDH) oder Acetoin-Reduktase (AR) zu 2,3-Butandiol reagiert. Hierfür wird das Coenzym NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> reduziert.

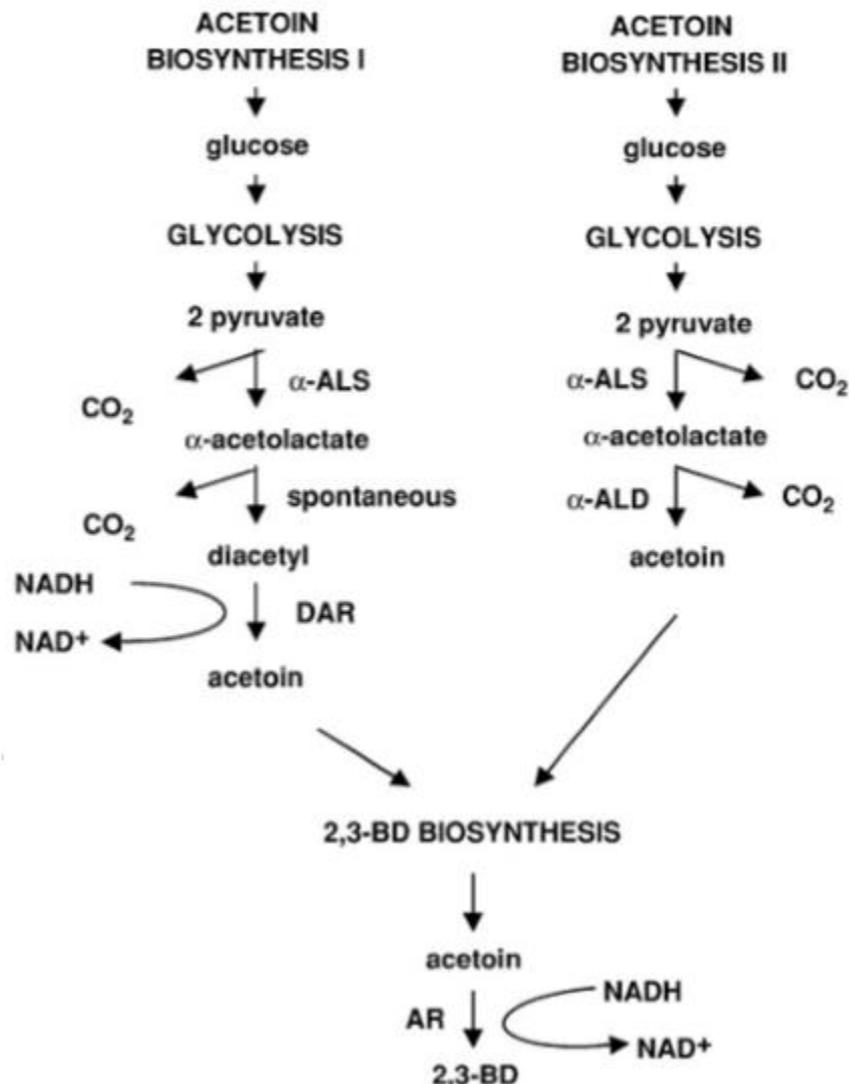


Abbildung 3 Stoffwechselweg in Bakterien zu Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol (Celińska, et al., 2009)

Dieser Stoffwechselweg ermöglicht sowohl die Regulierung des NADH/NAD-Spiegels (Xiao, et al., 2007), als auch die der Pyruvatkonzentration im Zellinneren. Kommt es zu einem Mangel an Kohlenstoff während der Fermentation, können die Mikroorganismen auf das gebildete Acetoin und 2,3-Butandiol zurückgreifen und als Quelle nutzen.

## 6. Materialien und Methoden

### 6.1. Chemikalien

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
CSL	Sigma Aldrich
Glucose	Roth
Hefeextrakt	Roth
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5%ige Lsg.)	
NaOH (5%ige Lsg.)	VWR International GmbH
Pepton	

### 6.2. Geräte

Tabelle 2 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
YSI	Yellow Springs Instrument Co.
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus
GC mit Autosampler Clarus 480	Perkin Elmer
Schüttelschrank	Gesellschaft für Labortechnik mbH

### 6.3. Verwendete Mikroorganismen

Folgende Wildtyp-Stämme wurden verwendet:

- *Bacillus licheniformis* DSM-Nummer 8785
- *Paenibacillus polymyxa* DSM-Nummer 365

Beide wurden aus der Stammhaltung der Hochschule entnommen.

### 6.4. Vorkultur und Medien

Wie im Allgemeinen üblich wurden die Mikroorganismen, bevor sie in Produktionsmedium fermentiert werden, zunächst in einer Vorkultur gezüchtet. Damit wurde gesichert, dass von Beginn an, eine ausreichend hohe Zahl an Zellen vorhanden war.

Das verwendete Medium war ein YEPG-Medium, welches sich bei den Versuchen im Praktikum als ein gutes Medium für beide Bakterienstämme herausgestellt hat.

Tabelle 3 Zusammensetzung des YEPG-Mediums

Komponente	Konzentration
Hefeextrakt	10,00 g·l <sup>-1</sup>
Pepton	20,00 g·l <sup>-1</sup>
Glucose	25,00 g·l <sup>-1</sup>

Die Vorkulturen wurden in 300 ml Erlenmeyerkolben, welche mit 100 ml Medium gefüllt waren, im Schüttelschrank bei 30°C mit 150 rpm inkubiert. Wurde optisch eine ausreichende Trübung des Mediums festgestellt, wurde zunächst die Glucosekonzentration mit Hilfe des YSI festgestellt. Lag diese unter 5 g/l, wurde das Produktionsmedium mit der Vorkultur unter der Sterilwerkbank angeimpft. Hierbei wurden 30 ml Vorkultur in 300 ml Medium überführt, welches in 500 ml Erlenmeyerkolben vorlag. Diese wurden wie die Vorkulturen bei gleichen Bedingungen im Schüttelschrank fermentiert.

Die bereits erwähnten Produktionsmedien sind anfallende Nebenprodukte aus der Stärkeproduktion. Es lagen zwei verschiedene Varianten des Mediums vor. Zum einen in einer stärkehaltigen Form, welche direkt aus der Produktion anfällt, die als Hamino bezeichnet wird, zum anderen eine enzymatisch bearbeitete Form, Fermentino. Die beiden Medien wurden tiefgekühlt gelagert und brauchten selbst im warmen Wasser eine längere Zeit um komplett aufzutauen. Dies könnte dazu geführt haben, dass im Medium bereits Veränderungen auftraten, weil diese so reaktiv sind und möglicherweise durch Luftkeime oder noch vorhandene Restenzyme kontaminiert waren. Aus Untersuchungen von der produzierenden Firma wurden folgende Zusammensetzungen für Hamino ermittelt. Die Medien wurden vor der Nutzung noch im Verhältnis 1:3 mit Leitungswasser verdünnt (1 Teil Medium und 2 Teile Wasser). Ohne die Verdünnung wäre die Konzentration von Glucose im Fermentino bei etwa 150 g/L. Es wurde Leitungswasser genutzt, da auch bei der Anwendung in der Firma mit normalen statt mit destilliertem Wasser gearbeitet wird. Außerdem sind im Wasser noch einige Bestandteile, die von den Mikroorganismen genutzt werden können.

Tabelle 4 Zusammensetzung Hamino, Prüfbericht vom 05.06.2014

Prüfparameter	Einheit	Prüfergebnis		
		im Original	in TM	in 88% TM
Trockenmasse	%	37,7	100	88
Wasser	%	62,3	0	
Rohasche (XA)	%	2	5,3	4,7
Rohprotein (XP)	%	5,3	14,2	12,5
Rohfett (mit HCL)	%	0,5	1,2	1,1
Rohfaser (XF)	%	<0,4	<0,4	<0,4
Stärke (XS)	%	1	2,7	2,4
ME (Schwein) Mischfutter	MJ/kg	5,7	15,1	13,3
Calcium (Ca)	%	0,041	0,11	0,095
Phosphor (P)	%	0,23	0,61	0,54
Natrium (Na)	%	0,18	0,49	0,43
Kalium (K)	%	0,53	1,41	1,24
Magnesium (Mg)	%	0,079	0,21	0,19
Kupfer (Cu)	mg/kg	<10	<10	<8,8
Zink (Zn)	mg/kg	12,5	33,4	29,1
Mangan (Mn)	mg/kg	21,8	57,8	50,9
Eisen (Fe)	mg/kg	19,3	51,3	45,1
Cystin	%	0,17	0,44	0,39
Lystin	%	0,23	0,62	0,54
Methionin	%	<0,10	0,22	0,19
Threonin	%	0,18	0,49	0,13
Nitrat	mg/kg	<50		

Tabelle 5 Zusammensetzung Hamino, Prüfbericht vom 20.06.2014

Prüfparameter	Prüfergebnis	Einheit
Trocknungsverlust	89,2	%
Rohprotein (Nx6,25)	16,7	% i.T.
Stärkeabbauprodukte (Dextrine und Glucose)	15,5	% i.T.
Gesamtpentosane	7,2	% i.T.
Ballaststoffe		
ethanolunlöslich (hochmolekular)	10,8	% i.T.

<b>Prüfparameter</b>	<b>Prüfergebnis</b>	<b>Einheit</b>
ethanollöslich (niedermolekular)	3,6	% i.T.
Gesamt, berechnet	14,4	% i.T.
<hr/>		
freie Aminosäuren		
Alanin	7,22	mg/kg i.T.
Arginin	1,57	mg/kg i.T.
Asparagin	8,19	mg/kg i.T.
Asparaginsäure	10,4	mg/kg i.T.
Cystein	4,65	mg/kg i.T.
Glutamin	21,2	mg/kg i.T.
Glutaminsäure	18	mg/kg i.T.
Glycin	6,62	mg/kg i.T.
Histidin	1,81	mg/kg i.T.
Hydroxyprolin	<0,6	mg/kg i.T.
Isoleucin	4,81	mg/kg i.T.
Leucin	15,8	mg/kg i.T.
Lysin	9,54	mg/kg i.T.
Methionin	4,74	mg/kg i.T.
Phenylalanin	14	mg/kg i.T.
Prolin	6,77	mg/kg i.T.
Serin	8,95	mg/kg i.T.
Threonin	6	mg/kg i.T.
Tryptophan	7,57	mg/kg i.T.
Tyrosin	5,17	mg/kg i.T.
Valin	5,61	mg/kg i.T.
2-Aminobuttersäure (ABA)	<1,3	mg/kg i.T.
4-Aminobuttersäure (GABA)	3,83	mg/kg i.T.
Ornithin	6,38	mg/kg i.T.
<hr/>		
proteinbildende Aminosäuren		
Asparaginsäure	11,0	g/kg i.T.
Glutaminsäure	28,8	g/kg i.T.
Serin	7,1	g/kg i.T.
Histidin	4,7	g/kg i.T.
Glycin	7,3	g/kg i.T.
Threonin	5,1	g/kg i.T.

<b>Prüfparameter</b>	<b>Prüfergebnis</b>	<b>Einheit</b>
Arginin	8,7	g/kg i.T.
Alanin	7,1	g/kg i.T.
Tyrosin	2,8	g/kg i.T.
Valin	7,1	g/kg i.T.
Phenylalanin	5,0	g/kg i.T.
Isoleucin	4,6	g/kg i.T.
Leucin	9,1	g/kg i.T.
Lysin	5,7	g/kg i.T.
Prolin	8,6	g/kg i.T.
Hydroxyprolin	0,4	g/kg i.T.
Methionin	2,4	g/kg i.T.
Cystein	4,4	g/kg i.T.
Tryptophan	0,8	g/kg i.T.
Ammonium	82,0	g/kg i.T.
Nitrat	<5	g/kg i.T.

Leider liegt zu diesem Zeitpunkt kein Dokument mit der Zusammensetzung des Fermentinos vor, welches durch die enzymatische Behandlung von Hamino hergestellt wird.

Aus den Prüfberichten erkennt man, dass im Medium schon eine Vielzahl von Komponenten vorhanden ist. Es liegen beispielsweise bereits viele Aminosäuren und Spurenelemente vor. Allerdings werden keine Aussagen über ganze Vitamine getroffen. Man erkennt weiterhin, dass der Kohlenstoff hauptsächlich in Form von langkettigen Verbindungen wie Dextrin vorliegt. Die Mikroorganismen müssen diese Ketten zunächst aufspalten, um den Kohlenstoff nutzen zu können. Beim Fermentino sind die Ketten bereits getrennt, was dazu führt, dass die Zellen dies nicht mehr selbst tun müssen.

Mit dieser Arbeit soll, wie zu Beginn schon gesagt, herausgefunden werden welche Substratzusätze die Produktbildung verbessern, oder möglicherweise optimieren. Es wurde sich dafür entschieden, die komplexen Stickstoffquellen Maisquellwasser und Pepton zu benutzen. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen dem ansonsten gleichen Medium zugeführt. Im Fall von Maisquellwasser wurde mit den

Konzentrationen 5, 20 und 40 gCSL/L gearbeitet. Bei Pepton wurden 10, 33 und 40 gPepton/L eingesetzt. Die verschiedenen hohen Konzentrationen sollen Aufschluss darüber geben, wie viel von der jeweiligen Komponente in etwa zugegeben werden muss, um eine Verbesserung der Produktion zu erreichen.

## **6.5. Methoden**

Aufgrund der physikalischen Eigenschaften des Mediums war eine Bestimmung von der optischen Dichte und der Biotrockensubstanz nicht möglich. Es konnten nur die Glucosekonzentration, der pH-Wert und die Produktkonzentrationen bestimmt werden. Allerdings ist die Bestimmung der Glucose auch sehr fehlerbehaftet, weil der Kohlenstoff nicht nur in Form von Glucose vorliegt, sondern auch in anderen Formen, die durch den YSI nicht bestimmt werden können. Aus diesem Grund und weil die Analyse mit Hilfe des Gaschromatographen nicht direkt nach der Probennahme stattfinden konnte, war es nicht möglich festzustellen, ob die Produktbildung abgeschlossen war oder nicht.

### **6.5.1. Glucosebestimmung**

Wie in der Praktikumsarbeit (Fricke, 2016) wurde hier mit dem biochemischen Analysator YSI 2700 Select gearbeitet. Aus diesem Grund wird das Verfahren hier nur kurz beschrieben.

Durch eine enzymatische Reaktion an einer Membran, bei der Wasserstoffperoxid freigesetzt wird, welches dann an einer Platinelektrode einen Elektronenstrom auslöst, kann die Glucosekonzentration bestimmt werden. Dabei sollte hier keine Konzentration von über 3 g/L Glucose in der Probe sein, weshalb die Proben wenn nötig 1:10 verdünnt wurden.

### **6.5.2. Analyse mit dem Gaschromatographen**

Für die Analyse der Produkte wurde mit einem Gaschromatographen der Firma Perkin-Elmer gearbeitet, welches über einen Autosampler verfügt.

Tabelle 6 Parameter des GC

<b>Komponente und Parameter</b>	
Säule	Elite-624
Länge	30 m
Innendurchmesser	0,25 mm
Filmdicke	1,4 µm

<b>Komponente und Parameter</b>	
Max. Temperatur	240°C
Trägergas	Stickstoff
Detektor	FID
Injektortemperatur	230°C
Detektortemperatur	250° C

Die chromatographische Auftrennung und Analyse beruht auf der unterschiedlich starken Wechselwirkung zwischen den Analyten und der stationären Phase in der Säule. Diese Wechselwirkungen können physischer oder chemischer Natur sein. Vor allem bei der Dünnschichtchromatographie ist die Größe der Moleküle entscheidend. Kleine Moleküle bewegen sich schneller durch die Säule als Große, weshalb sie zu unterschiedlichen Zeiten aus der Säule heraustreten. Bei der HPLC und GC wird als Trennparameter meist die Polarität genutzt. In der Säule sind Gele, welche niederpolar sind, was bei polaren Molekülen zu Wechselwirkungen führt. Je polarer das Molekül ist, umso länger braucht es, um die gesamte Säule zu durchqueren. Die wichtigen Größen die hierbei ermittelt werden sind die Retentionszeit und die Fläche des Peaks. Die Retentionszeit wird benötigt, um die Peaks im Chromatogramm zu identifizieren. Dabei kommt es aber auch auf die Parameter des Verfahrens an. Sollte eine Säule länger sein, so ist die Retentionszeit natürlich ebenfalls größer. Aus diesem Grund ist es entscheidend, die Eigenschaften des GC und die gefahrene Methode zu kennen, wenn man verschiedene Chromatogramme miteinander vergleichen will. Die Fläche wird benötigt, um mit einem bestimmten Faktor die Konzentration des Analyten zu ermitteln.

## 7. Ergebnisse

Auf den folgenden Seiten werden zunächst die Fermentationsverläufe dargestellt und beschrieben. Im darauf folgenden Kapitel 8 wird zusätzlich die Produktbildung dargestellt und diese ausgewertet.

### 7.1. Untersuchung auf den Einfluss von Wasser

Bevor mit den Fermentationen mit unterschiedlichen Medienzusätzen begonnen wurde, sollte zunächst festgestellt werden, ob oder wie sich das Wasser auf die Produktion auswirkt. Hierbei wurde überprüft, ob es von Bedeutung ist, dass Leitungswasser statt destilliertem Wasser als Lösemittel genutzt wird.

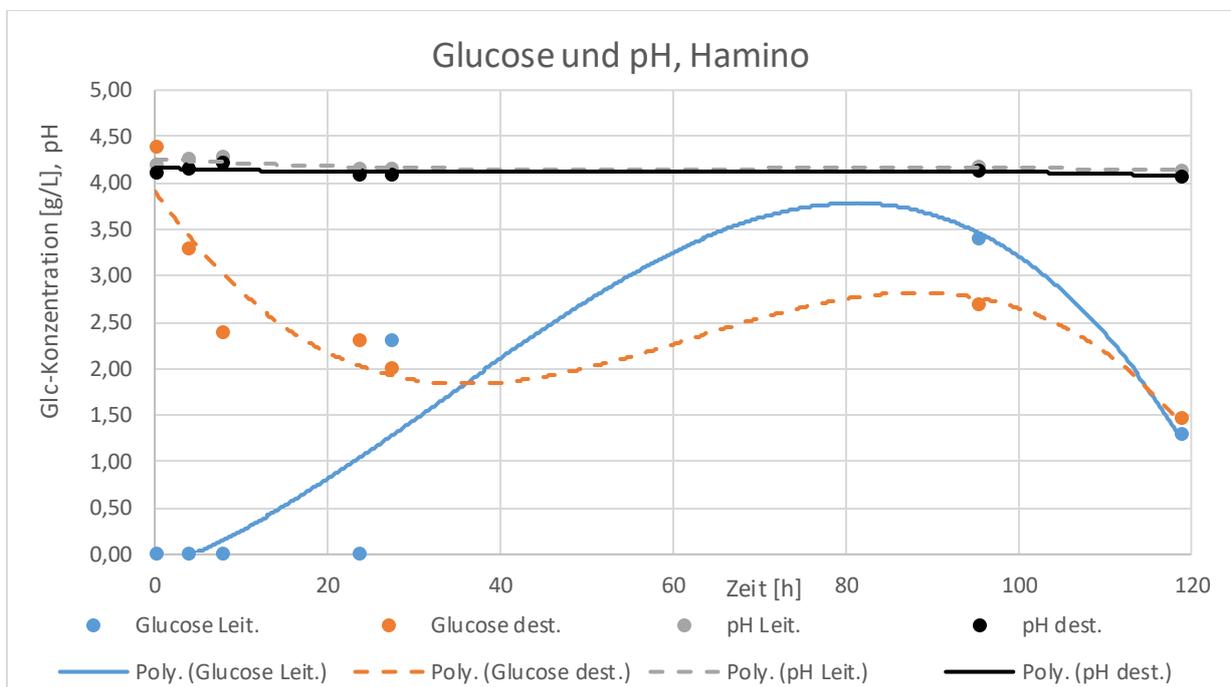


Abbildung 4 Fermentationsverlauf der Wasseruntersuchung mit Hamino-Medium

Um die beiden Ansätze besser unterscheiden zu können, wird der Ansatz mit destilliertem Wasser als unterbrochene Linie dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass bei beiden Medien der pH-Wert stabil bei etwa 4,1 lag. Die Glucosekonzentration ist allerdings sehr unterschiedlich bei beiden Ansätzen. Bei der Fermentation mit destilliertem Wasser ist zu Beginn eine Glucosekonzentration von 4,5 g/L festzustellen, welche über den gesamten Zeitraum auf 1,5 g/L abfällt. Zwischen 40 und 100 h scheint die Glucosekonzentration zu steigen. Beim fermentieren mit Leitungswasser kann zu Beginn keine Glucose festgestellt werden. Im späteren Verlauf wird allerdings Glucose nachgewiesen. Bei etwa 80 h hat diese ihr Maximum erreicht und fällt danach auf einen Wert von 1,5 g/L ab.

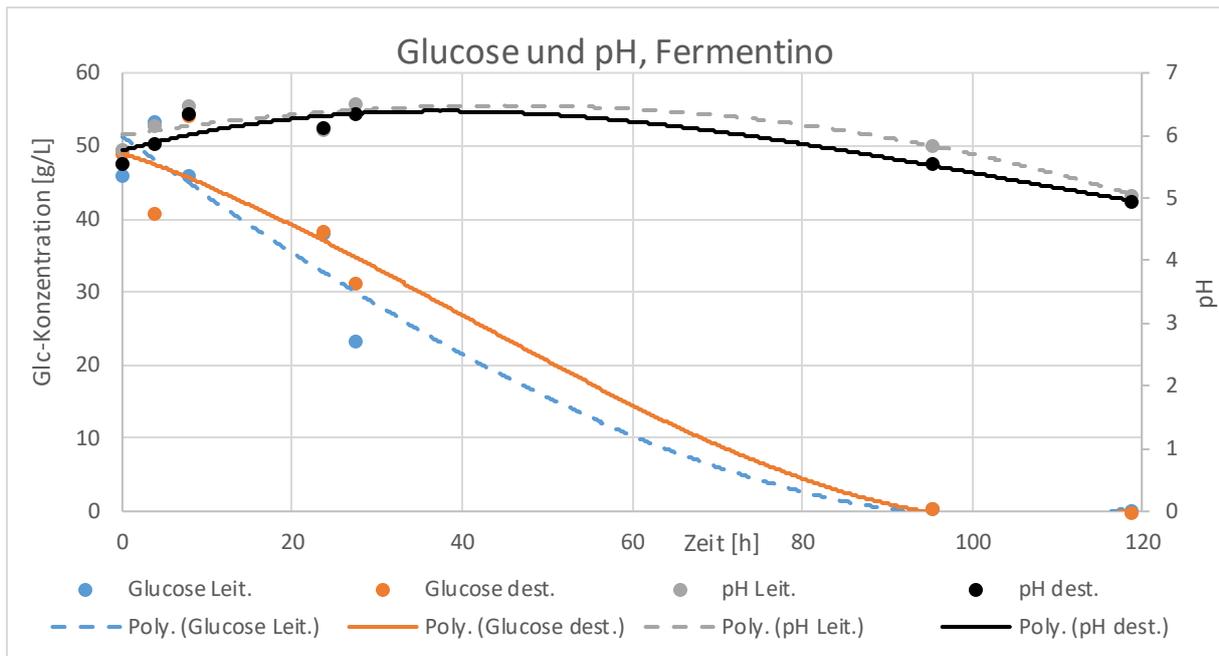


Abbildung 5 Fermentationsverlauf der Wasseruntersuchung mit Fermentino-Medium

Bei den Ansätzen mit Fermentino sieht man sofort, dass hier von Beginn an viel mehr Glucose nachgewiesen werden kann, weil das Medium vorher schon enzymatisch bearbeitet wurde. In beiden Fällen liegt die Startkonzentration von Glucose um 50 g/L. Diese fällt im Verlauf von 90 bis 100 h auf null. Während dieser Zeit steigt der pH-Wert zunächst von 5,5 auf etwa 6,5 an, fällt aber nach etwa 40 h ab auf einen Wert von 5.

## 7.2. Fermentation mit Maisquellwasser

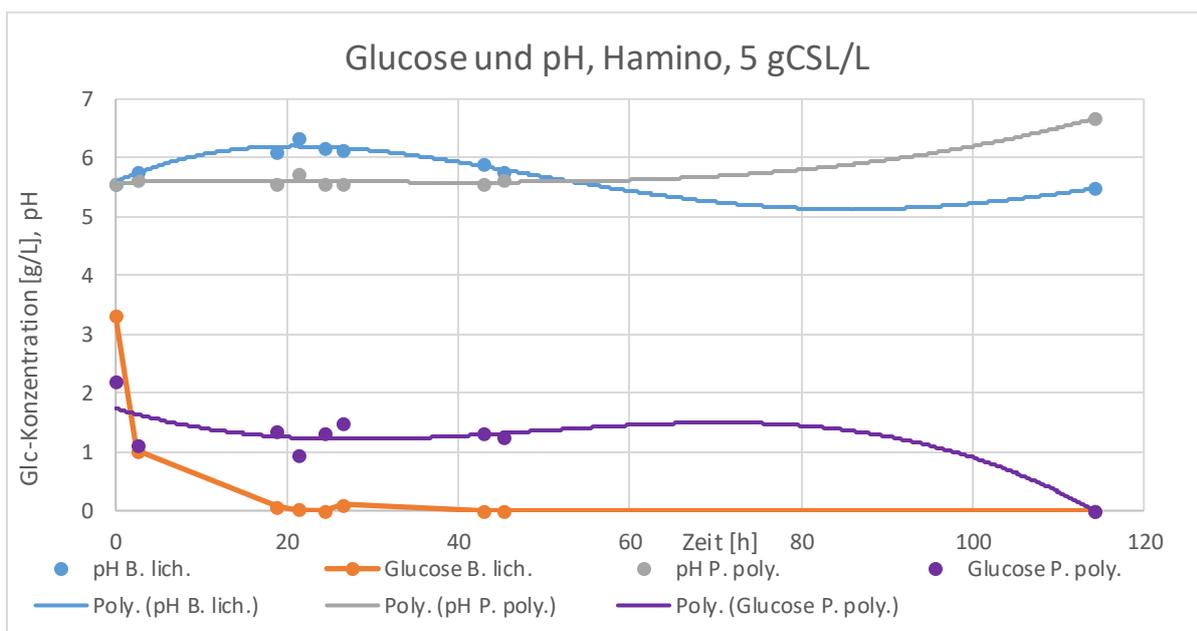


Abbildung 6 Fermentationsverlauf bei 5gCSL/L, Hamino

Der pH-Wert bei der Fermentation mit *Paenibacillus polymyxa* bleibt während der ersten 40 h konstant bei etwa 5,5, steigt dann zum Ende der Fermentation allerdings auf etwa 6,5 an. Bei dem Ansatz mit *Bacillus licheniformis* liegt der pH-Wert zu Beginn ebenfalls bei 5,5. Dieser steigt innerhalb der ersten 20 h auf etwa 6,3 an, fällt danach allerdings wieder auf 5,5 ab. Die Glucosekonzentration fällt bei beiden Kulturen über den gesamten Verlauf ab. *P. polymyxa* startet mit einer Konzentration von etwa 2 g/L, welche erst ziemlich spät während der Fermentation auf null fällt. *B. licheniformis* beginnt mit einer höheren Konzentration von etwa 3 g/L. Diese fällt allerdings schon nach 20 h auf null.

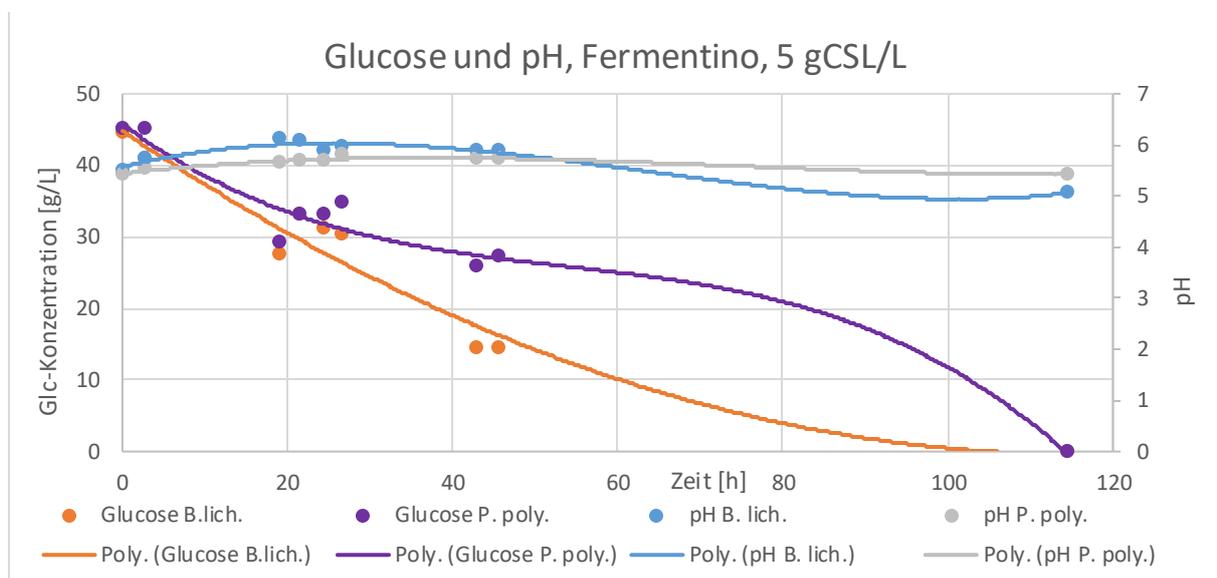


Abbildung 7 Fermentationsverlauf bei 5 gCSL/L, Fermentino

Auch hier erkennt man wieder, dass die Glucosekonzentration zu Beginn höher liegt. Diesmal bei etwa 45 g/L. Diese fällt bei beiden wieder ab, bis keine Glucose mehr vorhanden ist. *Bacillus licheniformis* ist auch dieses Mal wieder schneller, braucht allerdings deutlich mehr als 20 h. Beide haben die Glucose erst nach etwa 100 h abgebaut. Die pH-Werte liegen relativ stabil um 5,5 während der gesamten Fermentation.

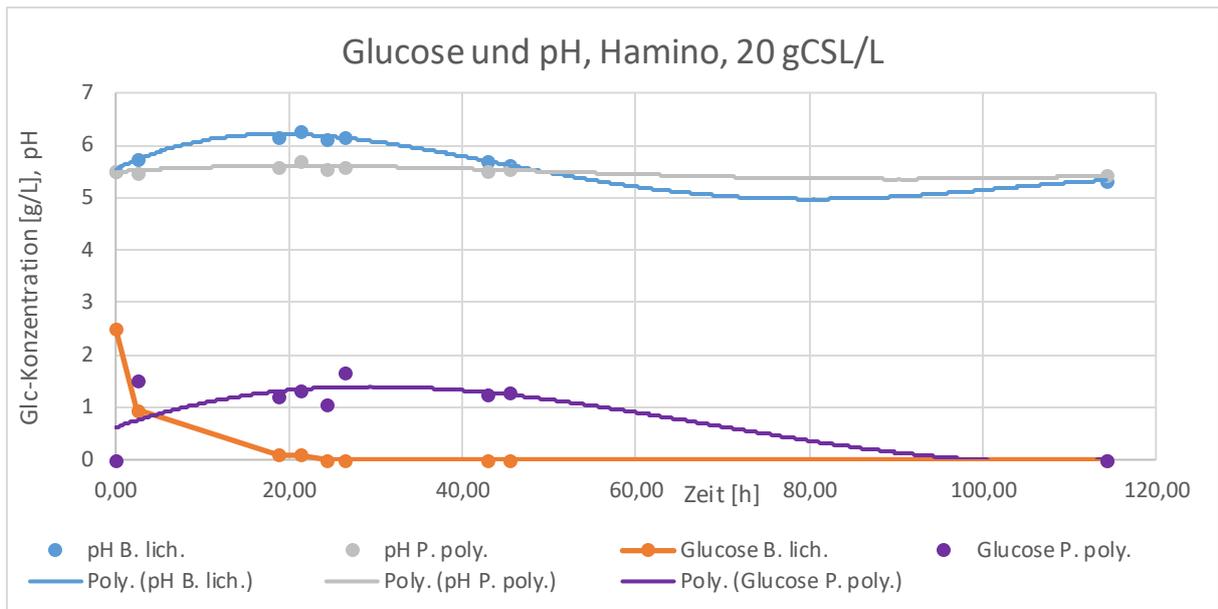


Abbildung 8 Fermentationsverlauf bei 20 gCSL/L, Hamino

Der Fermentationsverlauf ist dem von 5 gCSL/L sehr ähnlich. Der pH-Wert von *P. polymyxa* ist sehr stabil, wobei der von *B. licheniformis* zu Beginn etwas ansteigt, aber dann wieder fällt. Das Gleiche ist bei den Glucosekonzentrationen zu beobachten. Der *Bacillus licheniformis* benötigt nur 20 h, um die gesamte Glucose abzubauen, wohingegen der *Paenibacillus polymyxa* etwa 100 h gebraucht hat.

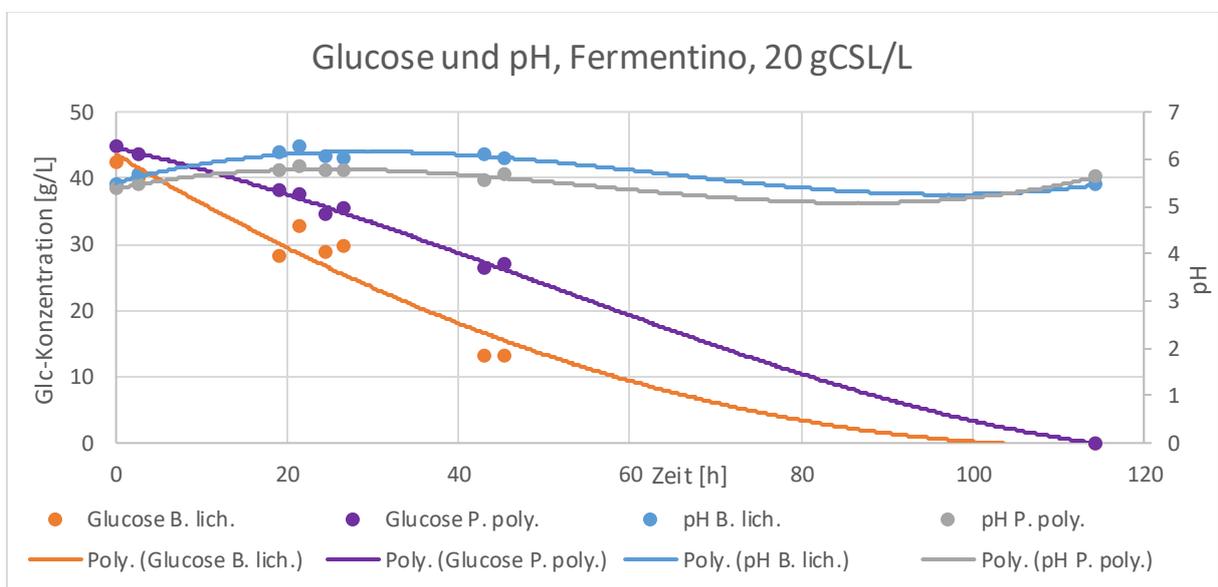


Abbildung 9 Fermentationsverlauf bei 20 gCSL/L, Fermentino

Auch hier ist die Ähnlichkeit zur Fermentation mit 5 gCSL/L nicht zu übersehen. Die Glucosekonzentrationen fallen im Verlauf von etwa 100 h komplett ab und die pH-Werte liegen stabil um etwa 5,5.

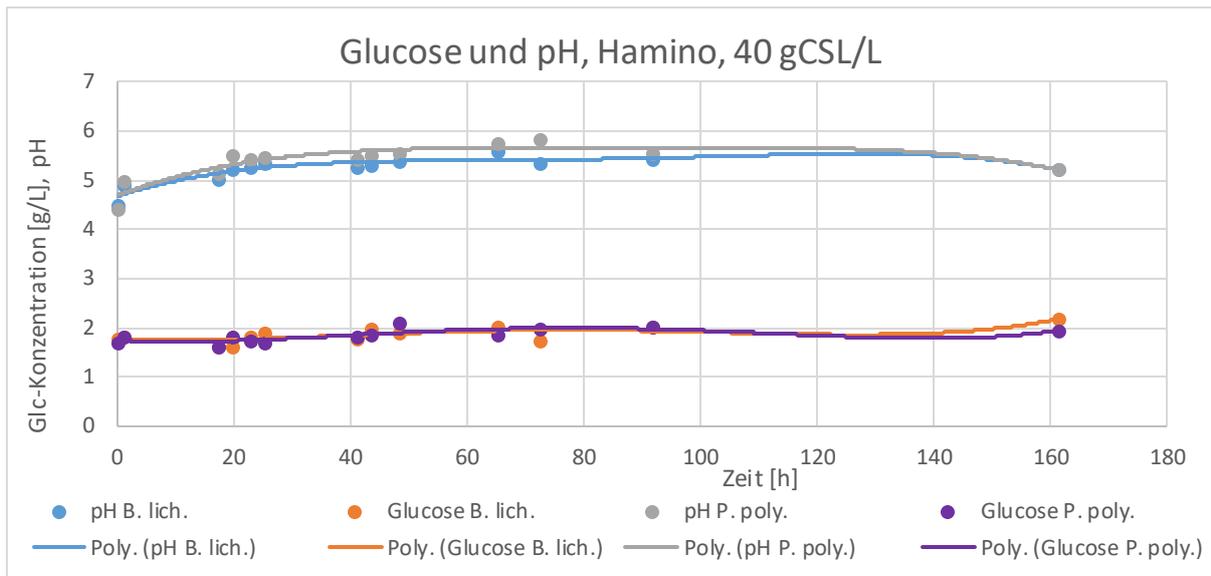


Abbildung 10 Fermentationsverlauf bei 40 gCSL/L, Hamino

Im Gegensatz zu den Fermentationen bei niedrigeren CSL-Konzentrationen kann man hier beobachten, dass die Glucose scheinbar nicht abgebaut wird. Über den gesamten Verlauf liegt die Glucosekonzentration um etwa 2 g/L. Die pH-Werte liegen, nachdem sie angepasst wurden ebenfalls stabil um einen Wert von 5,5.

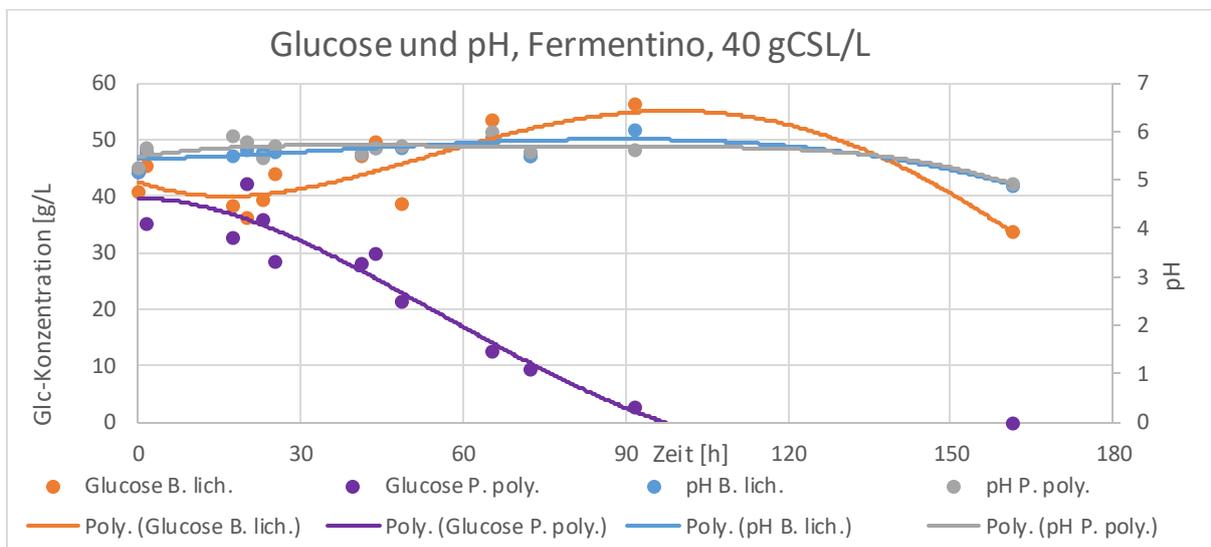


Abbildung 11 Fermentationsverlauf bei 40 gCSL/L, Fermentino

Im Gegensatz zur Fermentation mit 20 gCSL/L wird hier die Glucose vom *Bacillus licheniformis* nicht abgebaut, sondern steigt über einen Zeitraum von 90 h an und fällt erst dann wieder ab, bis knapp unter den Ausgangswert von 40 g/L Glucose. Der andere Stamm hingegen baut die Glucose normal ab und ist nach etwa 100 h fertig damit. Der pH-Wert ist bei beiden relativ stabil bei etwa 5,5, fällt allerdings zum Ende hin ab.

### 7.3. Fermentation mit Pepton

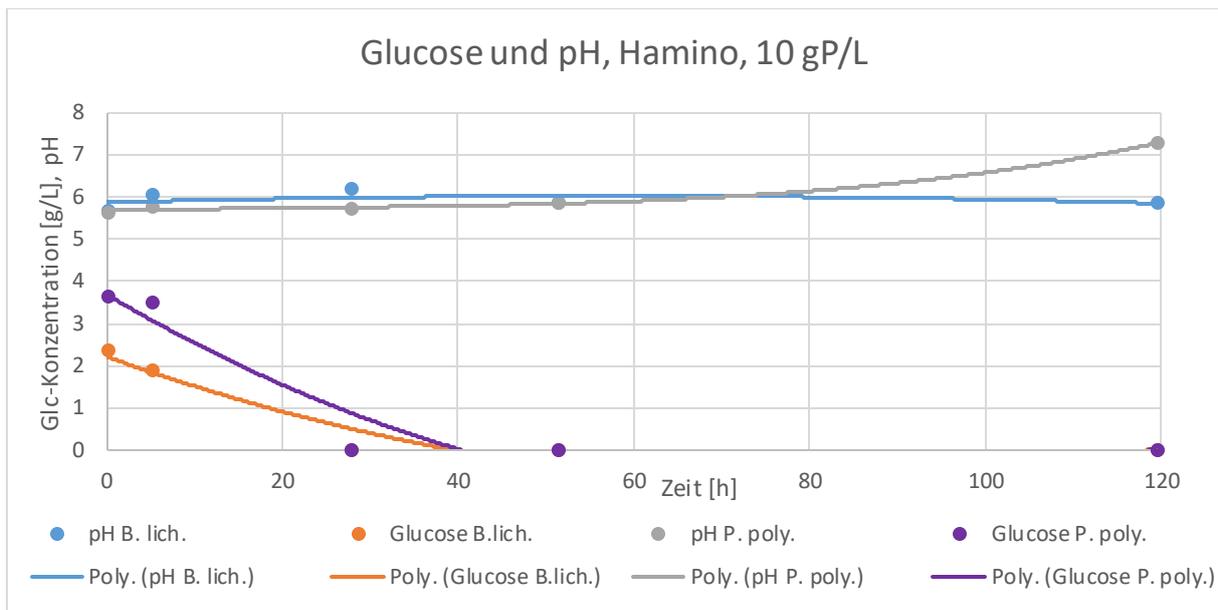


Abbildung 12 Fermentationsverlauf bei 10 gP/L, Hamino

Bei der Fermentation mit 10 gPepton/L blieben die pH-Werte relativ stabil um einen Wert von 6. Der pH-Wert des Mediums in dem *Paenibacillus polymyxa* gezüchtet wurde, stieg zum Ende hin an. Die Glucosekonzentration von etwa 2,2 g/L bei *B. lich.* und 3,8 g/L bei *P. poly.* fiel bei beiden Fermentationen innerhalb von 40 h auf null.

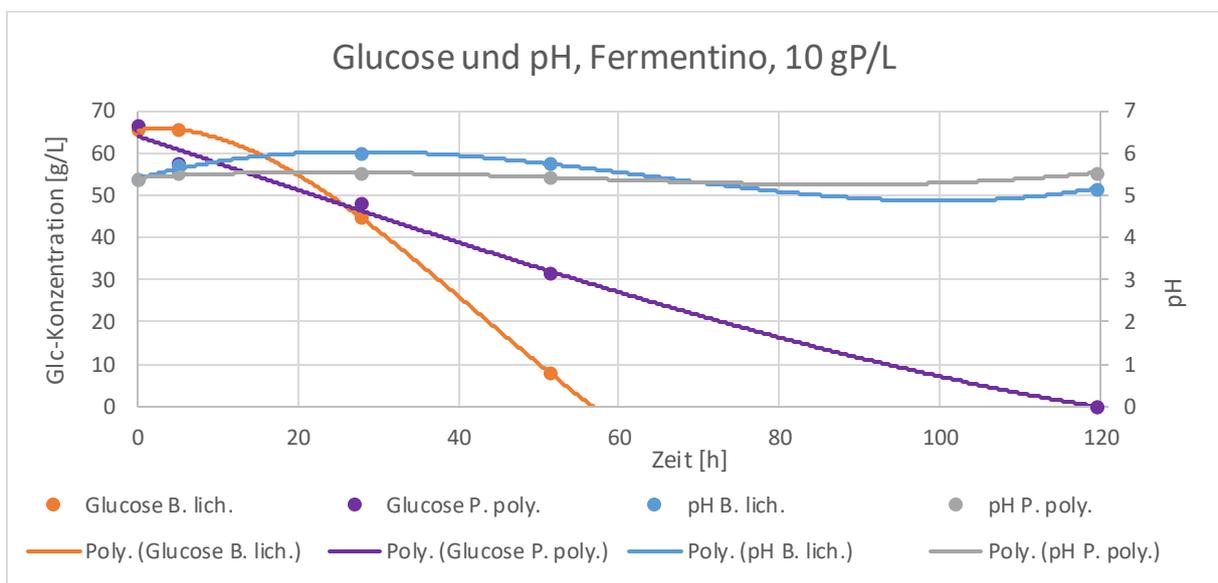


Abbildung 13 Fermentationsverlauf bei 10 gP/L, Fermentino

Auch bei der Fermentation mit Fermentino blieben die pH-Werte relativ stabil um einen Wert von 5,5. Die Glucosekonzentration lag in beiden Fällen über 50 g/L. *Bacillus licheniformis* schaffte es die gesamte Glucose in etwas mehr als 50 h abzubauen. *Paenibacillus polymyxa* benötigte etwa 120 h.

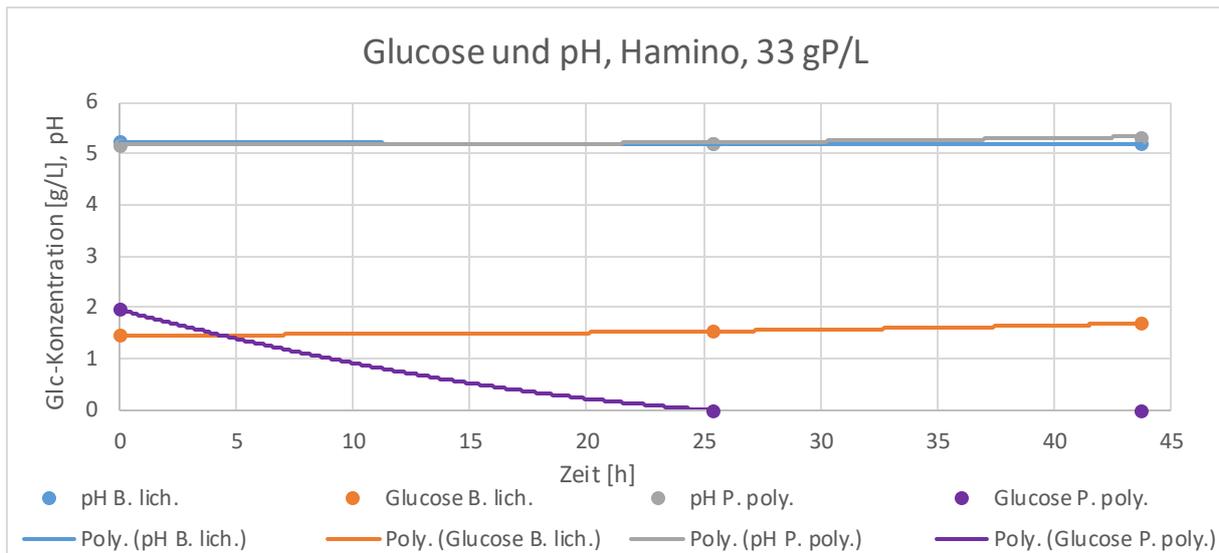


Abbildung 14 Fermentationsverlauf bei 33 gP/L, Hamino

Wie bei den anderen Fermentationen blieb auch hier der pH-Wert in beiden Medien stabil. Der *Bacillus licheniformis* schaffte es nicht, die Glucose abzubauen. Die Anfangskonzentration von 1,5 g/L blieb über den gesamten Zeitraum erhalten. Das andere Bakterium schaffte es hingegen innerhalb von etwa 25 h die Konzentration von 2 g/L komplett abzubauen.

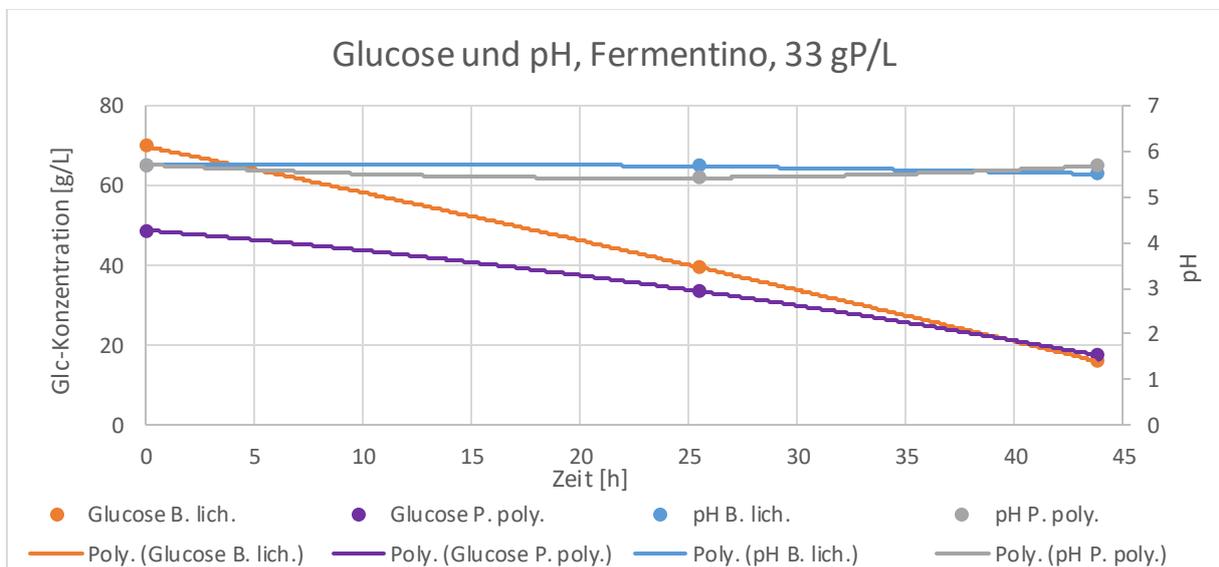


Abbildung 15 Fermentationsverlauf bei 33 gP/L, Fermentino

Auch hier blieben die pH-Werte über den gesamten Zeitraum gleich. Beide Mikroorganismen haben begonnen die Glucose abzubauen und hätten sie bei längerer Fermentation auch sicher komplett verbraucht.

Leider kann aufgrund von unvollständigen Daten keine Auswertung der Fermentation mit 40 gPepton/L durchgeführt werden.

## 8. Diskussion

### 8.1. Wachstumsauswertung

Man erkennt trotzdem, dass bei den Versuchen mit destilliertem Wasser sich zum Ende die Glucosekonzentrationen annähern, nachdem sie bereits auf einem niedrigeren Stand waren. Dies könnte daran liegen, dass die gebildeten Zellen die Stärke des Mediums abbauen und dadurch mehr Glucose entsteht, welche darauf hin nachgewiesen werden kann. Am Ende ist in beiden Ansätzen etwa die gleiche Konzentration, was möglicherweise auf ein Gleichgewicht hinweisen könnte, welches die Mikroorganismen einstellen, damit kein Überschuss an Glucose vorliegt.

Aufgrund der fehlenden Möglichkeiten zur Bestimmung der Biomasse oder optischen Dichte, können keine Aussagen zu Größen wie Wachstumsgeschwindigkeit und ähnlichem getätigt werden. Außerdem ist durch die Ungenauigkeit der Glucosemessung, weil vor allem beim Hamino neue Glucose aus der Stärke genommen werden kann, das Arbeiten mit dem verbrauchten Substrat von vornherein fehlerbelastet. In verschiedenen Literaturquellen lassen sich Wachstumsgeschwindigkeiten und andere Parameter finden. Dabei wurde allerdings in anderen Medien gearbeitet.

### 8.2. Produktbildung bei Wasserversuchen

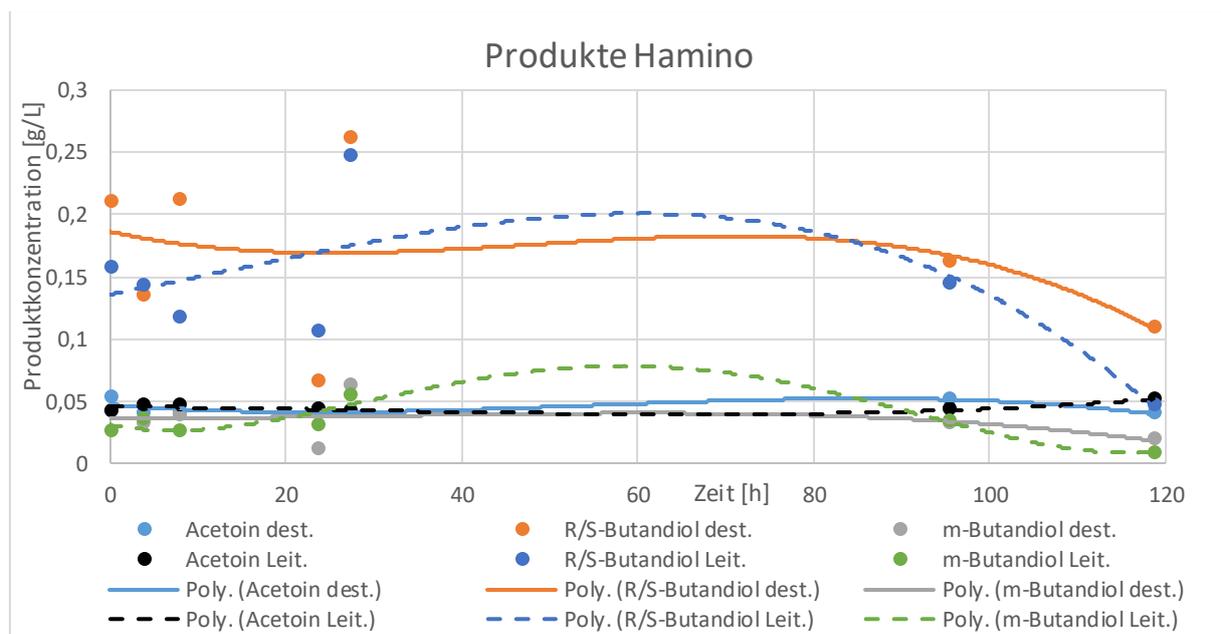


Abbildung 16 Produktbildung bei Wasserversuchen, Hamino

Man erkennt, dass die Produktkonzentration im Allgemeinen gering ist. Das Maximum der aufgenommenen Werte liegt bei unter 0,3 g/L. Laut Sun et al. ist die höchste Acetoinkonzentration bei Bakterien 75,2 g/L (Sun, et al., 2012). Diese wurde von dem Mikroorganismus *Serratia marcescens* H32 in einem fed-batch Verfahren erreicht. Außerdem wurde gleichzeitig die 2,3-Butandiolkonzentration heruntergeregelt und das NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis erhöht. Grundsätzlich liegen die Konzentrationen der Produkte wenn Leitungswasser benutzt höher als im destillierten Wasser. Weshalb man darauf schließen kann, dass einige Bestandteile des Wassers durchaus positive Effekte während der Fermentation hervorrufen.

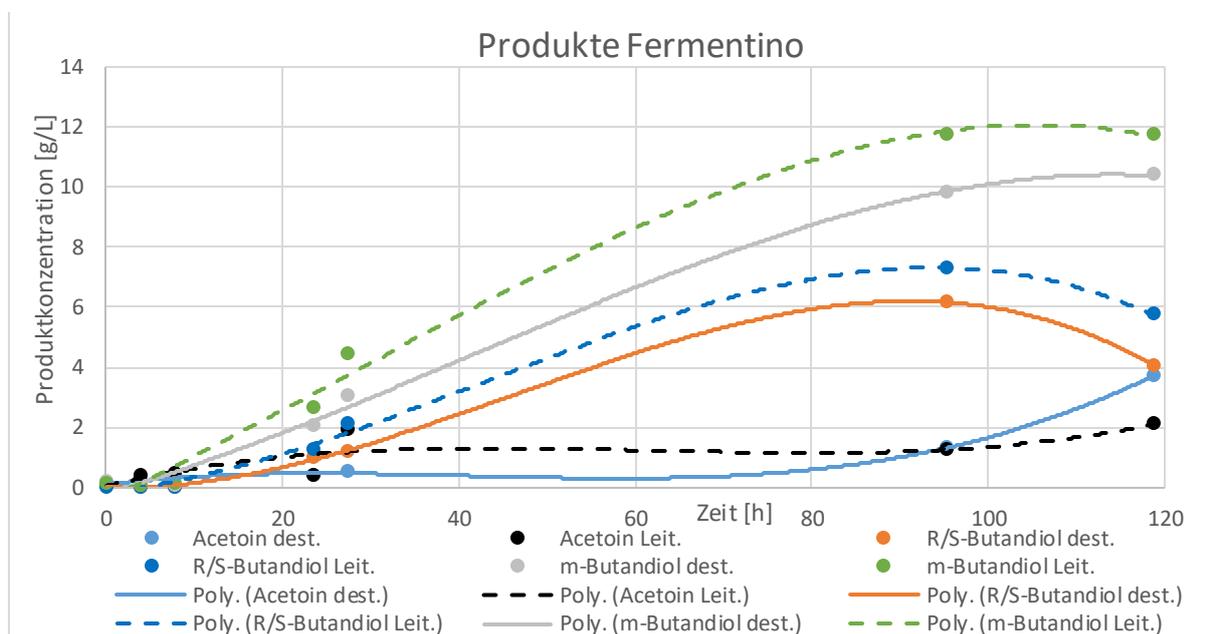


Abbildung 17 Produktbildung bei Wasserversuchen, Fermentino

Die Betrachtung der Produktbildung im Fermentino-Medium bestätigt die vorangegangene Vermutung. Auch hier liegen die Produktkonzentrationen mit Leitungswasser höher als mit destilliertem Wasser. Allerdings werden hierbei höhere Konzentrationen als im Hamino-Medium erreicht.

Tabelle 7 Vergleich der maximalen Produktkonzentrationen in Leitungswasser

Produkte	Produktkonzentration [g/L]	
	Hamino	Fermentino
Acetoin	0,05	1,7
R/S-2,3-Butandiol	0,2	7,3
meso-2,3-Butandiol	0,08	12

Es sind große Unterschiede zu erkennen. Vor allem der Unterschied für das meso-2,3-Butandiol ist enorm. Hier sollte es eigentlich nicht der Fall sein, dass die Produktbildung durch fehlende Substratbestandteile inhibiert wird. Die Bestandteile könnten Carbonate oder Salze sein, die durch das Destillieren des Wassers verloren gehen. Allerdings wurden nur die Produkte im Leitungswasser verglichen. Es lohnt sich also in doppelter Hinsicht mit Leitungswasser zu arbeiten. Zum einen wird die Produktbildung unterstützt, zum anderen ist es viel billiger, wenn das Wasser nicht vorher auf gereinigt werden muss.

### 8.3. Produktbildung mit Maisquellwasser

#### 8.3.1. Hamino-Medium

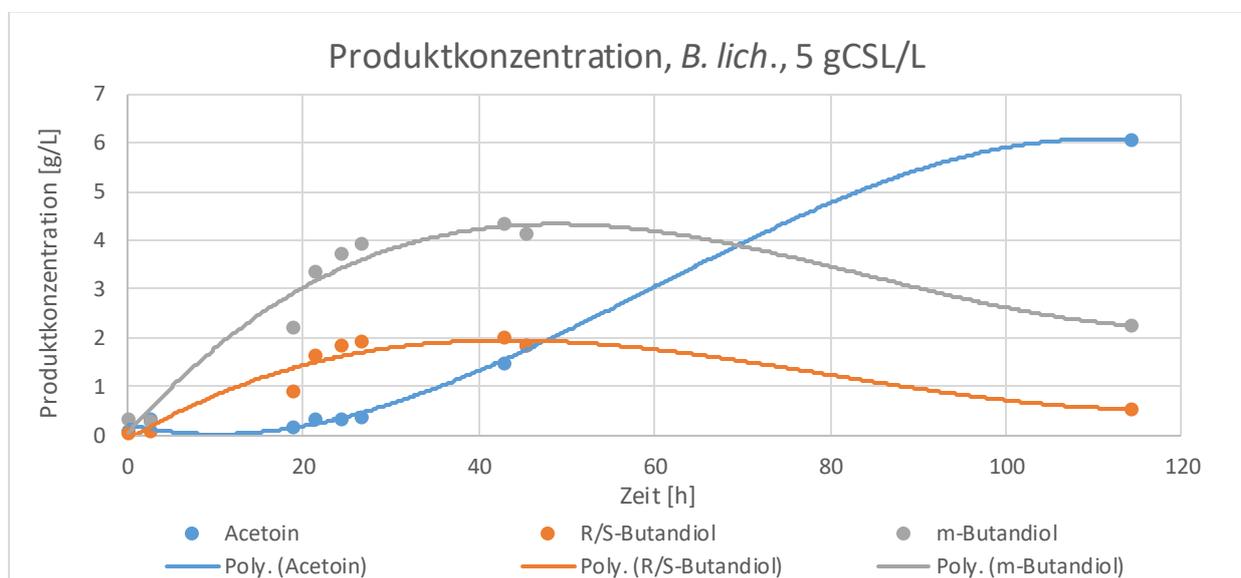


Abbildung 18 Produktbildung bei 5 g CSL/L, *B. lich.*, Hamino

Man sieht, dass 2,3-Butandiol bei etwa 40 h ein Maximum erreicht. Zu dieser Zeit ist bereits das Substrat vollkommen aufgebraucht. Acetoin steigt erst später an und erreicht am Ende seine maximale Konzentration. Die Werte für 2,3-Butandiol liegen hier aber nicht höher als bei den Versuchen mit Leitungswasser. Acetoin hat ein Maximum von 6 g/L, was mehr ist, als bei den vorangegangenen Versuchen. R/S-2,3-Butandiol liegt allerdings nur bei 2 g/L und meso-2,3-Butandiol bei etwa 4,3 g/L.

Der *Paenibacillus polymyxa* weist ein verspätetes Wachstum auf. Hier wird erst viel später begonnen Produkt zu bilden, was aber auch daran liegen kann, dass die Glucose erst später abgebaut wird. Der Abbau beginnt erst nach etwa 40 h. Genau zu diesem Zeitpunkt fängt auch die Produktbildung an.

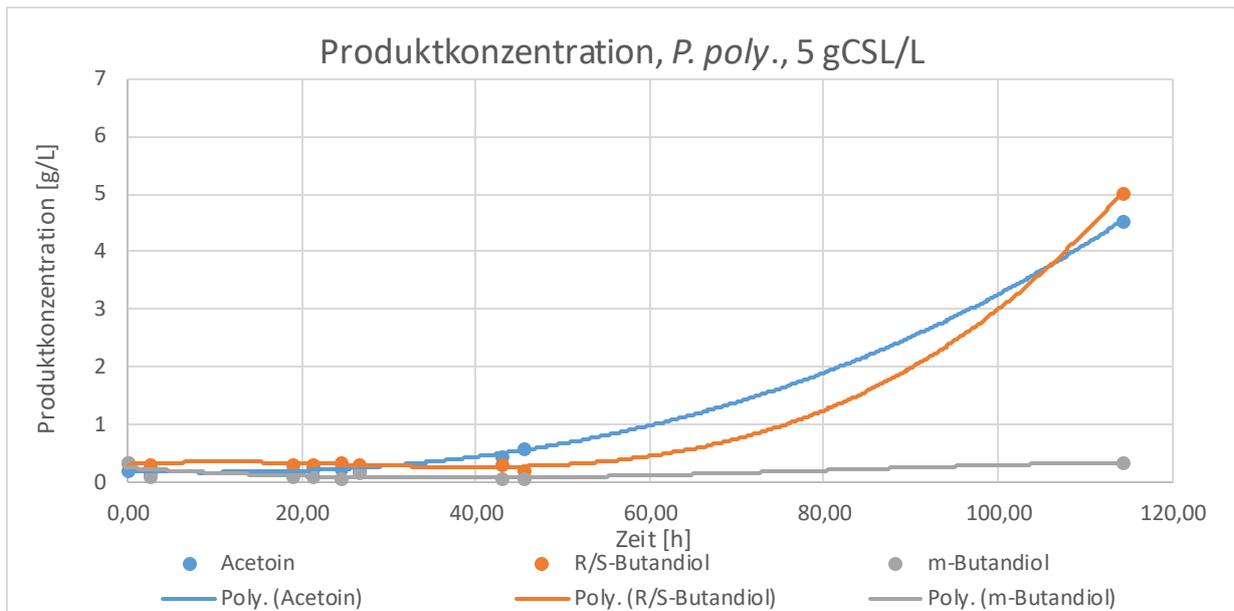


Abbildung 19 Produktbildung bei 5 gCSL/L, *P. poly.*, Hamino

Im Gegensatz zum licheniformis Bakterium werden hier allerdings zunächst Acetoin und R/S-2,3-Butandiol gebildet und kaum meso-2,3-Butandiol.

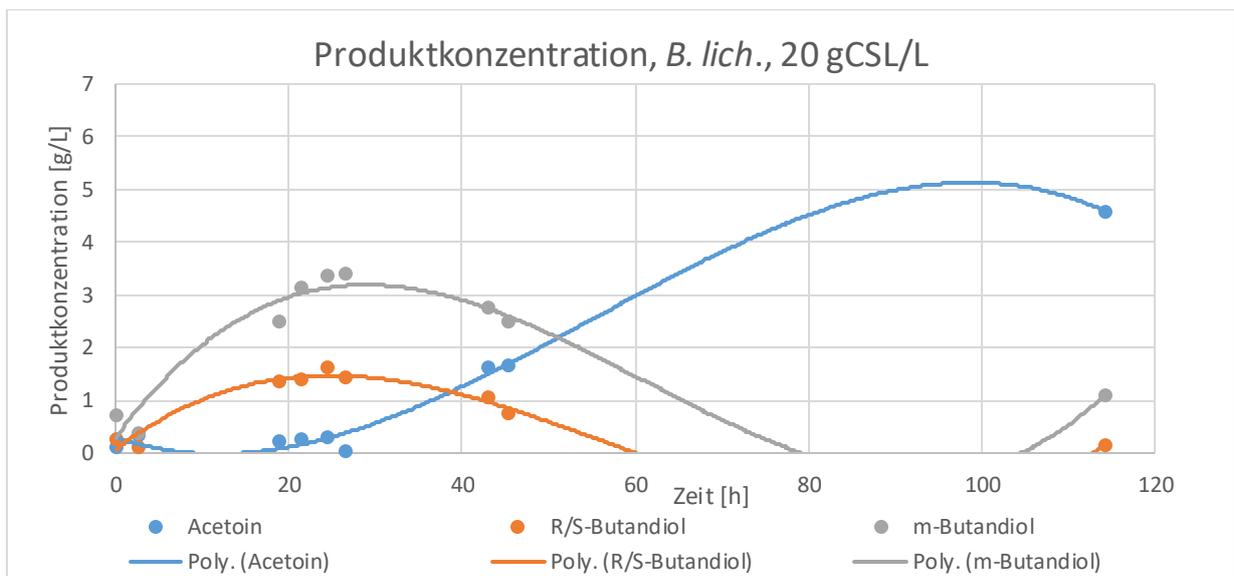


Abbildung 20 Produktbildung bei 20 gCSL/L, *B. lich.*, Hamino

Die Produktbildung bei 20 gCSL/L ist der bei 5 gCSL/L sehr ähnlich. Zunächst wird das 2,3-Butandiol gebildet und hat sein Maximum kurz nachdem die Glucose aufgebraucht ist. Erst später wird das Acetoin gebildet. Allerdings sind die maximalen Konzentrationen für alle 3 Produkte geringer als bei der Fermentation mit nur 5 gCSL/L.

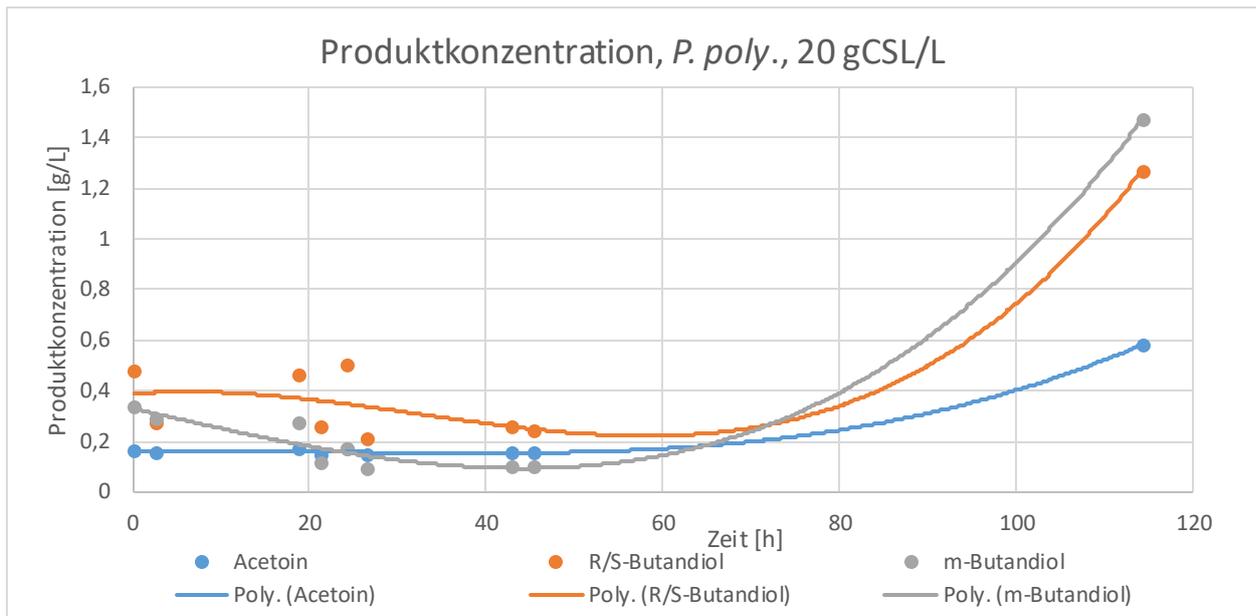


Abbildung 21 Produktbildung bei 20 gCSL/L, *P. poly.*, Hamino

Der Verlauf sieht dem von 5 gCSL/L sehr ähnlich, allerdings ist die Konzentration viel geringer. Es ist sehr gut möglich, dass sich mit mehr Zeit noch mehr Produkt gebildet wird. Hier werden außerdem bevorzugt wieder die Butandiol-Stereoisomere gebildet, statt dem Acetoin. Der Beginn der Produktion hängt aber scheinbar wieder direkt mit dem Abbau der Glucose zusammen.

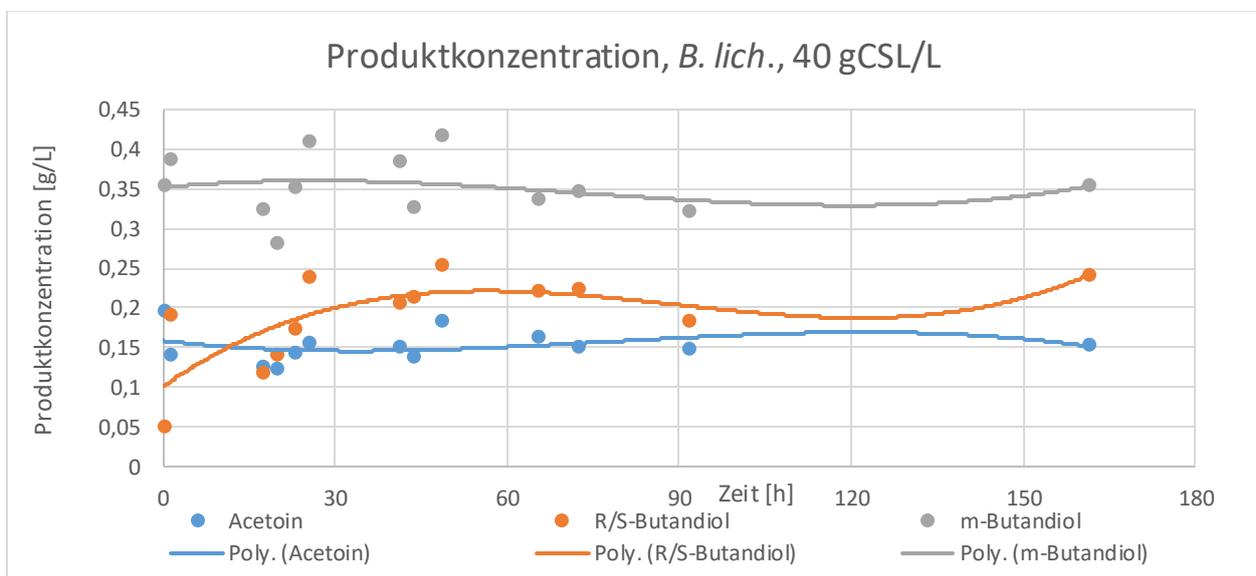


Abbildung 22 Produktbildung bei 40 gCSL/L, *B. lich.*, Hamino

Bei der Fermentation mit 40 gCSL/L ist nur eine geringe Konzentration von allen drei Produkten zu beobachten. Diese steigen in der gesamten Zeit auch nicht an. Nur die Konzentration von R/S-2,3-Butandiol steigt von 0,05 auf 0,25 an g/L an.

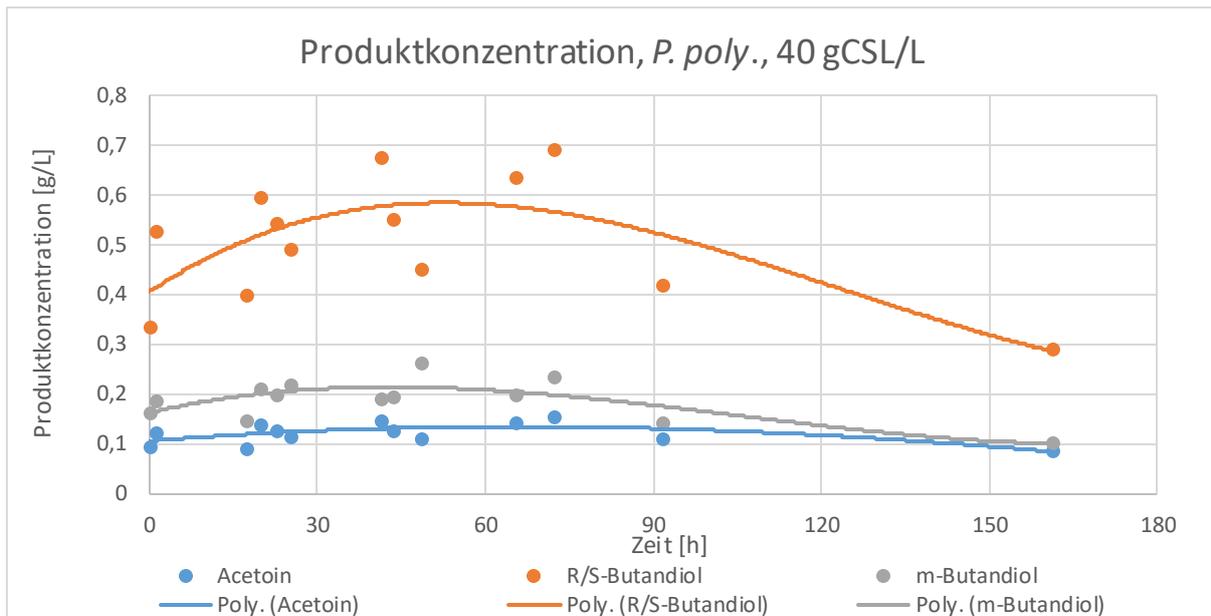


Abbildung 23 Produktbildung bei 40 gCSL/L, *P. poly.*, Hamino

Auch mit *Paenibacillus polymyxa* als Mikroorganismus ist die Produktion geringer als zuvor. Alle drei Produkte liegen unter 1 g/L, 2,3-Butandiol sogar unter 0,2 g/L.

Tabelle 8 Vergleich von Produktkonzentrationen im Hamino-Medium mit CSL

CSL-Konzentration [g/L]	MO	Produktkonzentration		
		Acetoin	R/S-2,3-Butandiol	meso-Butandiol
5	<i>B. lich.</i>	6	2	4,3
	<i>P. poly.</i>	4,5	5	0,5
20	<i>B. lich.</i>	5,1	1,5	3,2
	<i>P. poly.</i>	0,6	1,3	1,5
40	<i>B. lich.</i>	0,18	0,25	0,35
	<i>P. poly.</i>	0,15	0,6	0,2

Die höchsten Konzentrationen wurden grün unterlegt.

Man erkennt, dass mit zunehmender CSL-Konzentration die Produktbildung abnimmt. *Bacillus licheniformis* bildet bei allen drei Versuchen mehr Acetoin und meso-2,3-Butandiol als *Paenibacillus polymyxa*. Im Gegensatz dazu wird mehr R/S-2,3-Butandiol von *P. polymyxa* als von *B. licheniformis* gebildet.

### 8.3.2. Fermentino-Medium

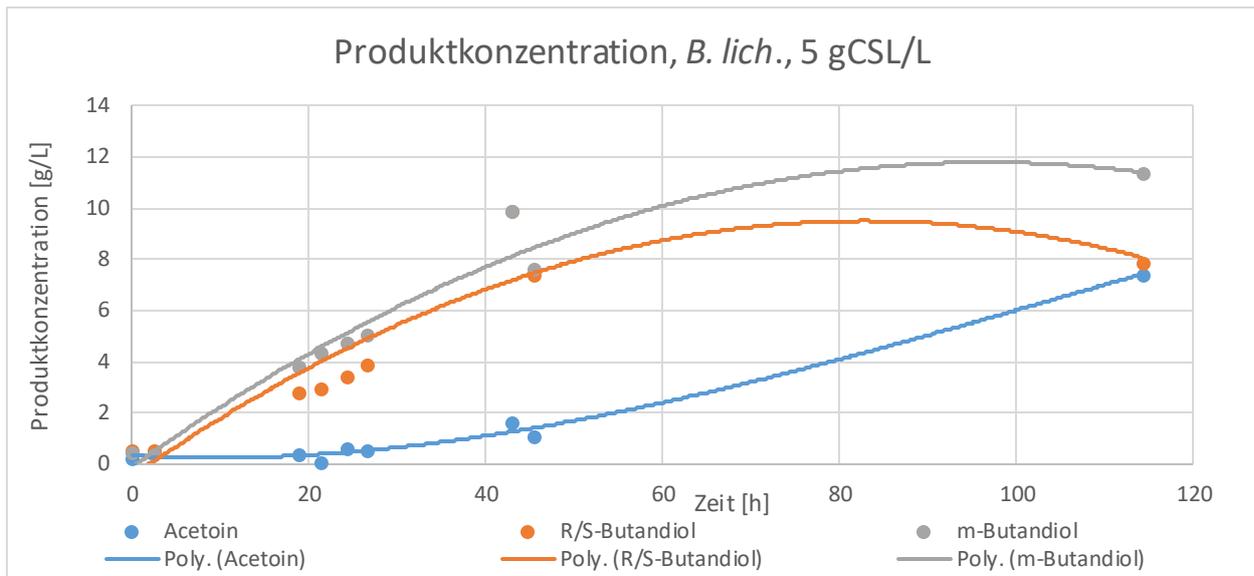


Abbildung 24 Produktbildung bei 5 gCSL/L, *B. lich.*, Fermentino

Bei der Fermentation im Fermentino-Medium und 5 gCSL/L wurde mehr R/S-2,3-Butandiol und meso-2,3-Butandiol gebildet als Acetoin. Die Bildung der Produkte ging auch hierbei wieder von dem Verbrauch des Substrates aus. Während die Bildung von 2,3-Butandiol bereits wieder zurückgeht, steigt die Konzentration von Acetoin weiter an.

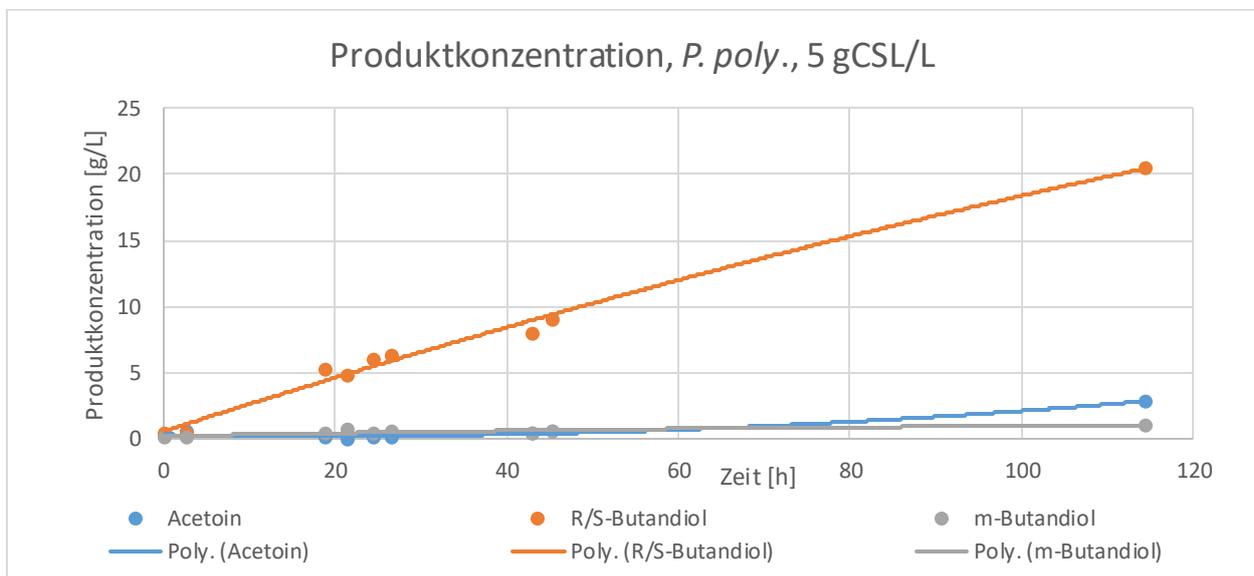


Abbildung 25 Produktbildung bei 5 gCSL/L, *P. poly.*, Fermentino

Im Vergleich zum *B. lich.* produziert der *P. poly.* hier deutlich weniger meso-2,3-Butandiol und Acetoin, dafür aber mehr R/S-2,3-Butandiol. Alle drei Produktbildungen scheinen noch weiter ansteigen zu können, wenn man die Fermentationsdauer verlängern würde.

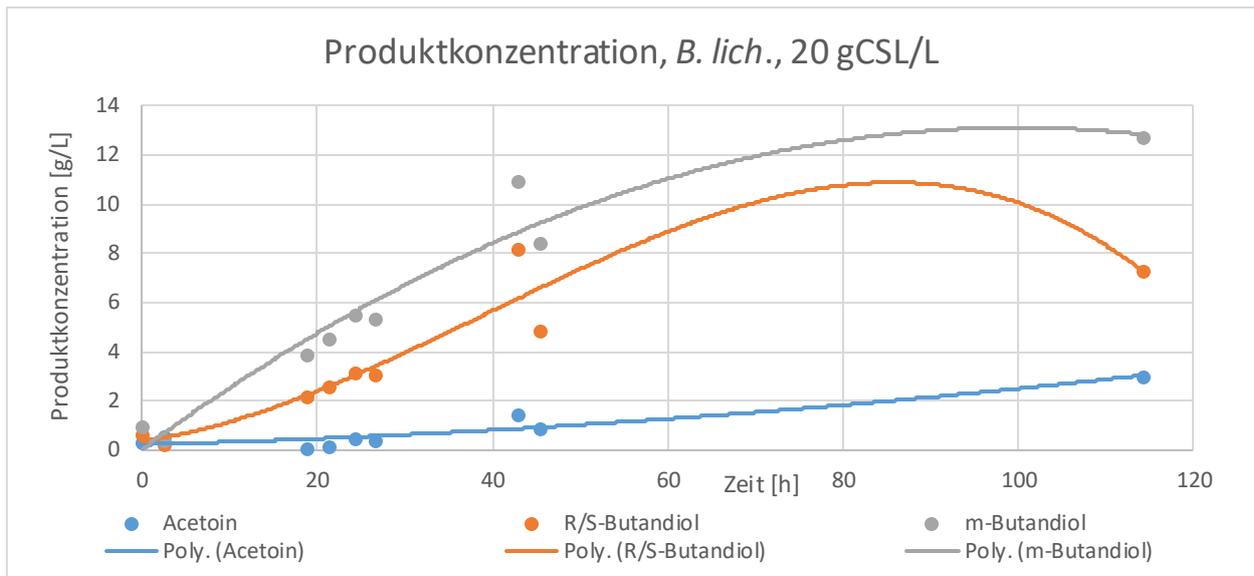


Abbildung 26 Produktbildung bei 20 gCSL/L, *B. lich.*, Fermentino

Diese Kurven sehen denen bei 5 gCSL/L sehr ähnlich. Auch hier wird weniger Acetoin gebildet und die beiden Butandiol-Isomere haben zur etwa gleichen Zeit ihren Maximalwert erreicht. Weiterhin kommt die Bildung von R/S-2,3-Butandiol bereits zum Erliegen, während Acetoin scheinbar noch steigen könnte.

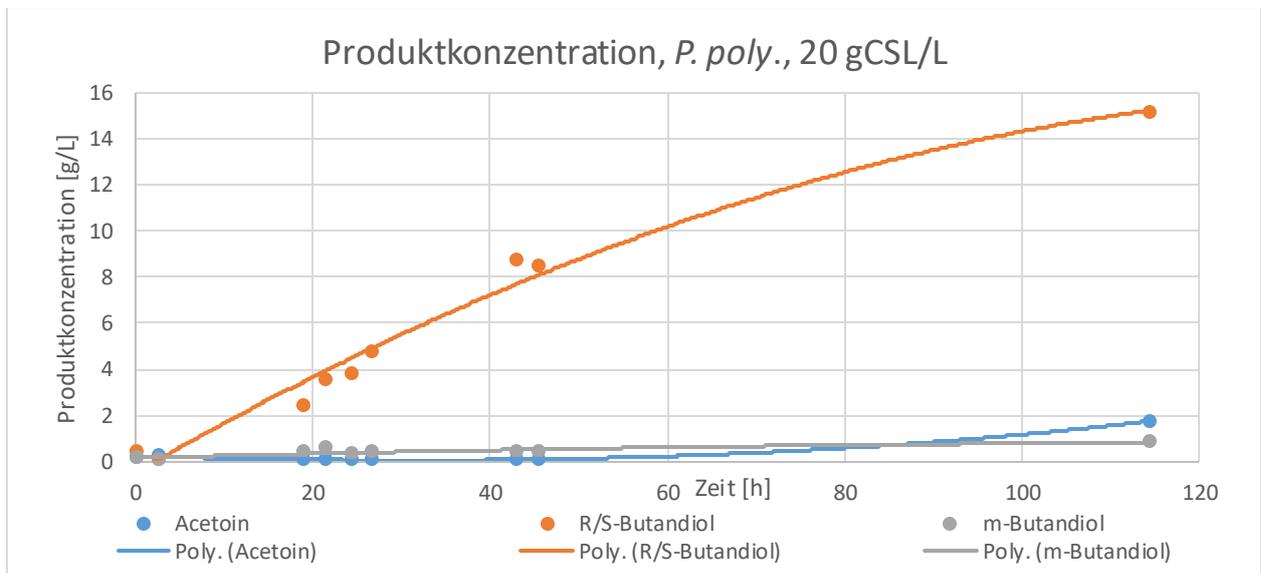


Abbildung 27 Produktbildung bei 20 gCSL/L, *P. poly.*, Fermentino

Auch hier sieht man, dass der Verlauf der Graphen fast identisch zu dem der geringeren CSL-Konzentration ist. Man muss allerdings beachten, dass hier deutlich weniger R/S-2,3-Butandiol gebildet wurde, als bei 5 gCSL/L. Acetoin und meso-Butandiol sind aber auf einem ähnlich geringem Niveau.

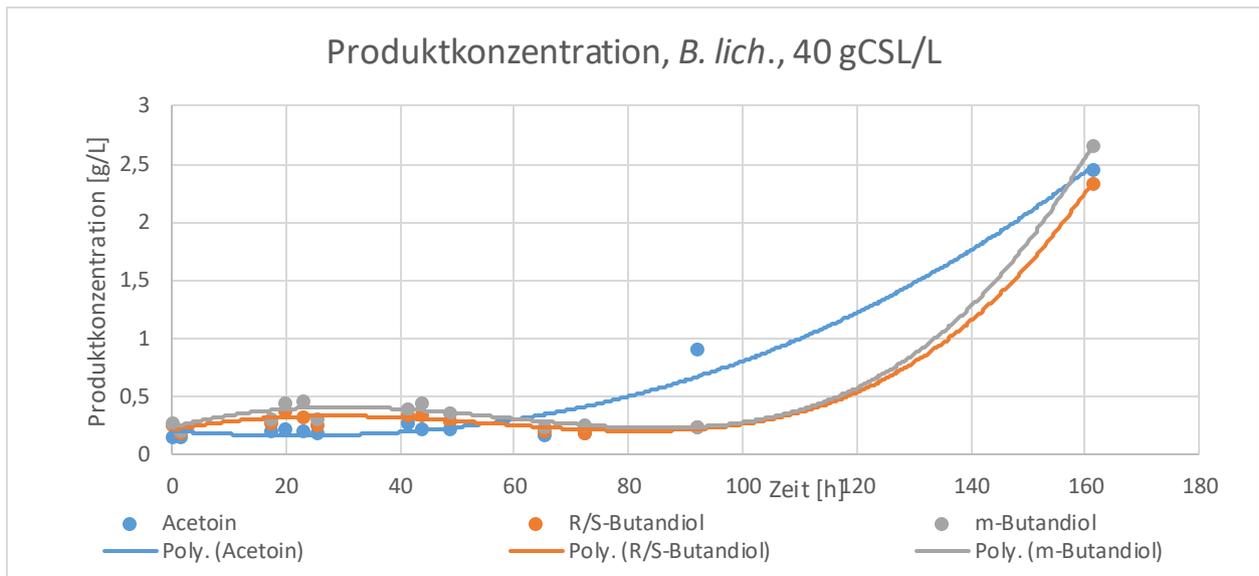


Abbildung 28 Produktbildung bei 40 gCSL/L, *B. lich.*, Fermentino

Bei dieser Fermentation sieht man, dass die Bildung von 2,3-Butandiol deutlich später erfolgt, als bei den anderen Konzentrationen von CSL. Außerdem wird im Allgemeinen viel weniger Produkt gebildet während den 160 h Fermentation. Am Ende liegen alle drei Produkte bei etwa der gleichen Konzentration.

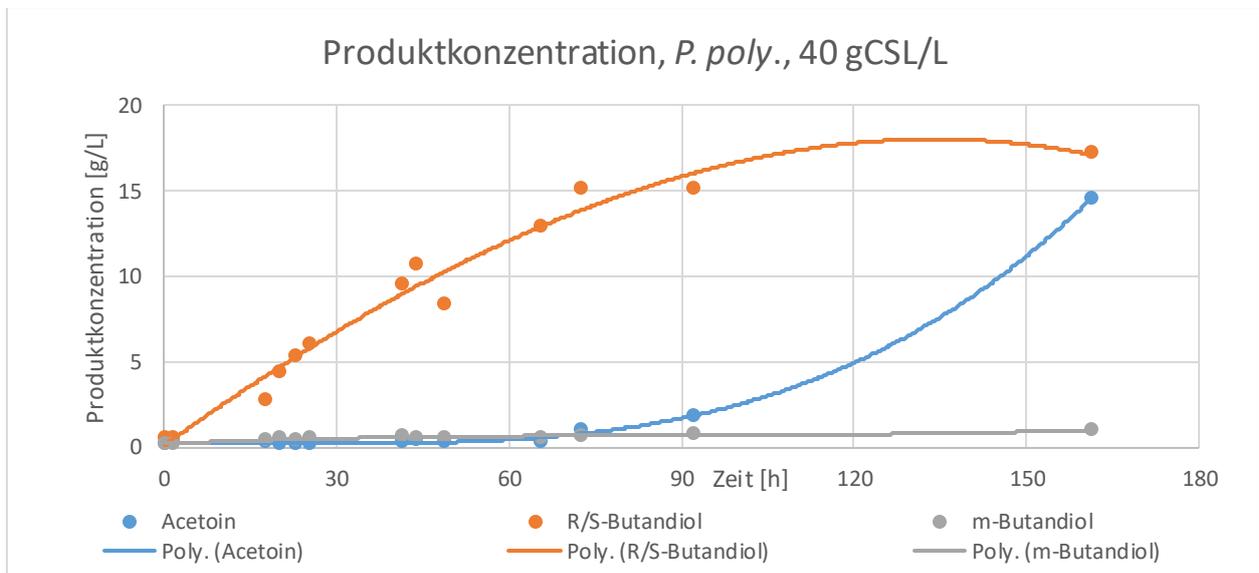


Abbildung 29 Produktbildung bei 40 gCSL/L, *P. poly.*, Fermentino

Diese Fermentation sieht der Vorherigen mit *P. poly.* wieder sehr ähnlich. Allerdings wurde hier deutlich mehr Acetoin gebildet als bei der vorangehenden. Es scheint als würde auch hier die Bildung von R/S-2,3-Butandiol bereits zu Ende gehen, während Acetoin noch weiter gebildet werden würde.

Tabelle 9 Vergleich der Produktkonzentrationen im Fermentino-Medium mit CSL

CSL-Konzentration [g/L]	MO	Produktkonzentration		
		Acetoin	R/S-2,3-Butandiol	meso-Butandiol
5	<i>B. lich.</i>	7	9,3	11,9
	<i>P. poly.</i>	2,5	20,5	1
20	<i>B. lich.</i>	3,7	11	13
	<i>P. poly.</i>	1,9	15	1
40	<i>B. lich.</i>	2,5	2,4	2,7
	<i>P. poly.</i>	15	17	1

Auch hier wurden die höchsten Konzentrationen wieder grün unterlegt.

Grundsätzlich scheinen auch hier die gleichen Erkenntnisse gewonnen zu werden. R/S-2,3-Butandiol wird von *P. polymyxa* besser gebildet als von *B. licheniformis*. Mit Ausnahme der Konzentrationen bei 40 gCSL/L ist *B. licheniformis* der bessere Acetoinbildner. Er ist auch besser in der Produktion von meso-Butandiol.

## 8.4. Produktbildung mit Pepton

### 8.4.1. Hammino-Medium

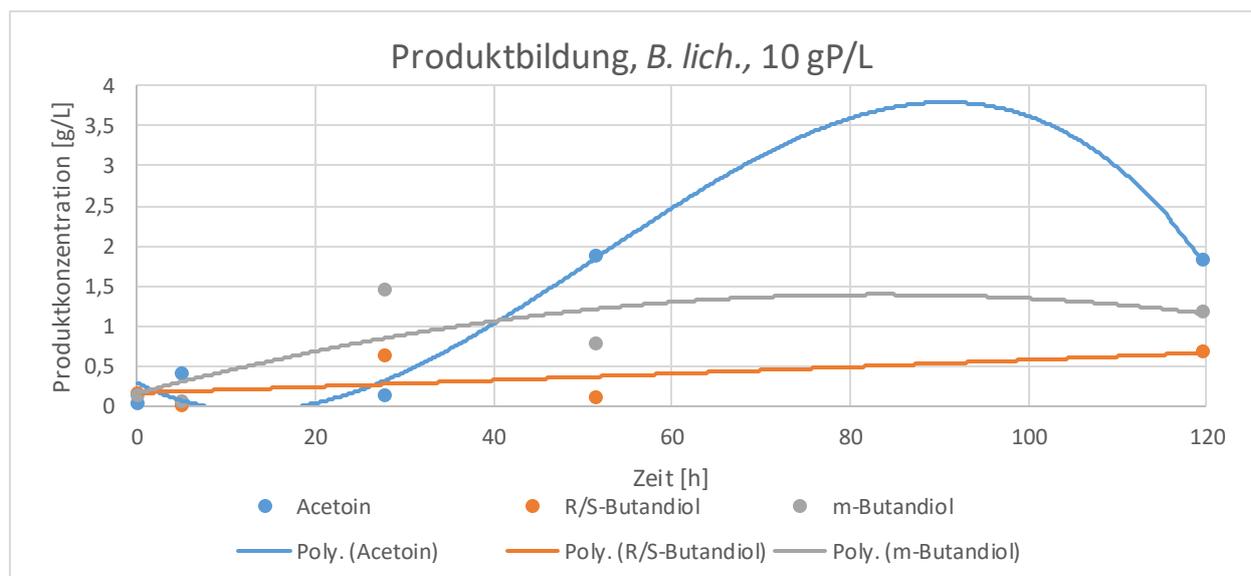


Abbildung 30 Produktbildung bei 10 gP/L, *B. lich.*, Hamino

Aus dem Verlauf des Diagrammes erkennt man, dass Acetoin im Gegensatz zu den beiden anderen Produkten vermehrt gebildet wird. Nach etwa 90 h wird hierbei ein Maximum 3,8 g/L erreicht. Meso-Butandiol wird vorher gebildet, allerdings in geringeren Mengen. Hier findet sich das Maximum schon bei etwa 20 h. Danach bleibt die Konzentration stabil. R/S-2,3-Butandiol wird nur in geringem Maße produziert.

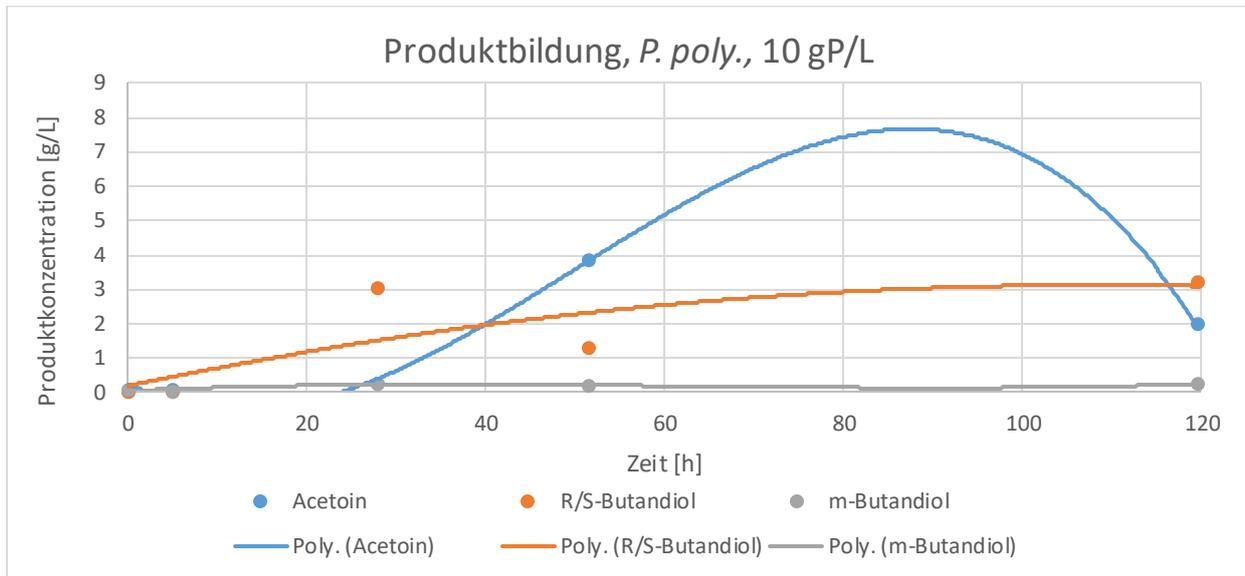


Abbildung 31 Produktbildung bei 10 gP/L, *P. poly.*, Hamino

Hier lassen sich in etwa die gleichen Erkenntnisse treffen. Acetoin wird vermehrt gebildet, mit einem Maximalwert bei 90 h, der allerdings viel höher ist, als in der vorangegangenen Fermentation. Die beiden Butandiole haben hierbei die Rollen getauscht. R/S-2,3-Butandiol wurde vermehrt gebildet, aber das meso-Butandiol kaum.

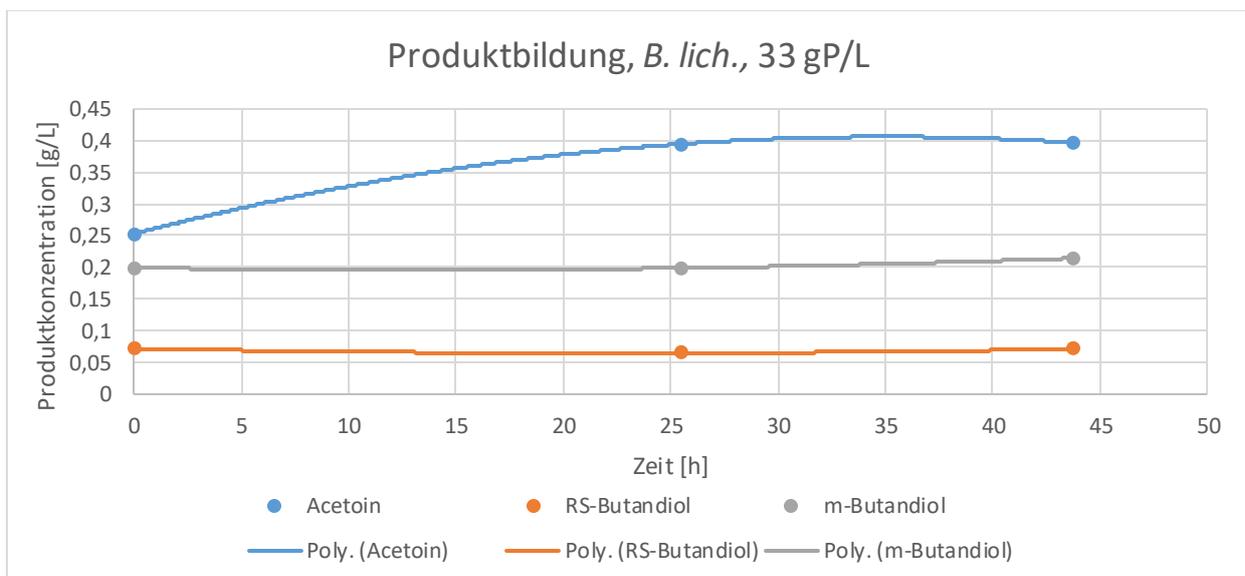


Abbildung 32 Produktbildung bei 33 gP/L, *B. lich.*, Hamino

Aufgrund der wenigen Datenpunkte lassen sich nur schwer wirkliche Trends erkennen. Auch ist die Fermentationsdauer geringer als zuvor, was ebenfalls zu einer nicht so guten Auswertung führt. Man kann allerdings erkennen, dass scheinbar Acetoin in höherem Maße gebildet wird. Die Konzentrationen sind trotzdem geringer, als bei anderen Fermentationen. Es wird nur etwa halb so viel meso-Butandiol gebildet und die Produktion von R/S-2,3-Butandiol ist noch geringer.

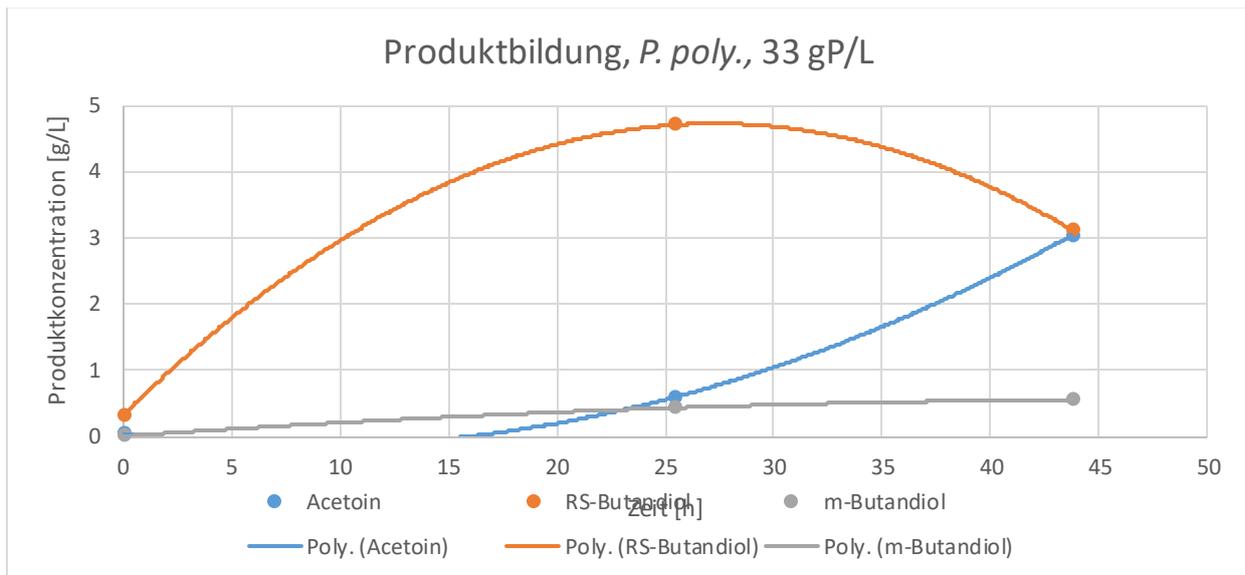


Abbildung 33 Produktbildung bei 33 gP/L, *P. poly.*, Hamino

Bei dieser Fermentation wird wieder deutlich mehr Produkt gebildet. R/S-2,3-Butandiol steigt bis auf fast 5 g/L an und Acetoin auf etwa 3 g/L. Das meso-Butandiol wird wieder kaum gebildet.

Tabelle 10 Vergleich der Produktkonzentrationen im Hamino-Medium mit Pepton

Pepton-Konzentration [g/L]	MO	Produktkonzentration		
		Acetoin	R/S-2,3-Butandiol	meso-Butandiol
10	B. lich.	3,7	0,6	1,3
	P. poly.	7,8	3,6	0,01
33	B. lich.	0,4	0,08	0,21
	P. poly.	3	4,7	0,5

Es scheint, dass der Polymyxa-Stamm besser geeignet ist, für die Arbeit mit Peptone. Er hat fast immer einen höheren Maximalwert, außer bei der Bildung von meso-Butandiol mit 10 gPepton/L. Im Vergleich mit den Werten für CSL sind die ermittelten Produktkonzentrationen allerdings kleiner.

## 8.4.2. Fermentino-Medium

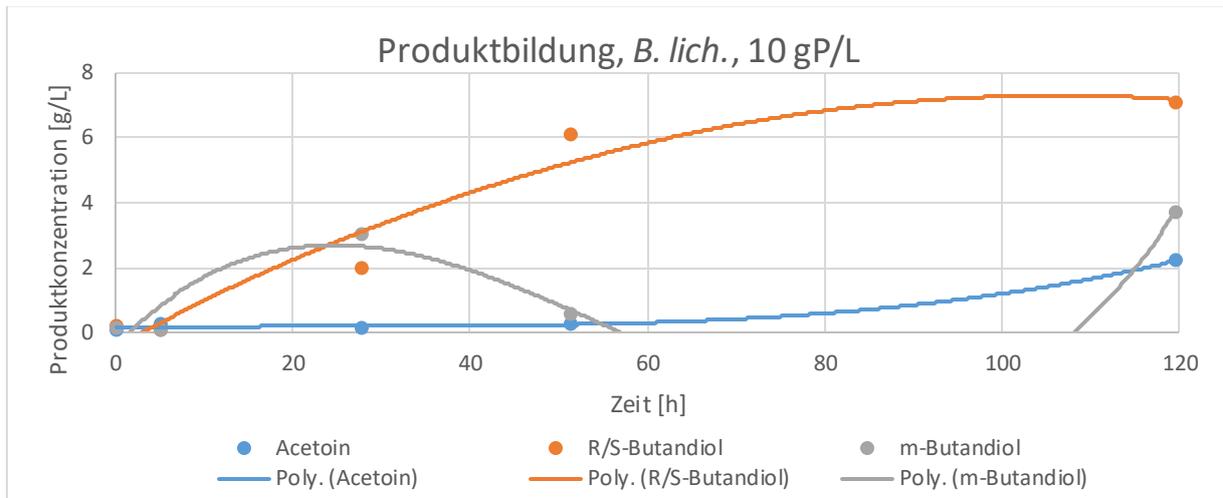


Abbildung 34 Produktbildung bei 10 gP/L, *B. lich.*, Fermentino

Im Vergleich zum Hamino-Medium, wird hier eindeutig mehr R/S-2,3-Butandiol gebildet. Die Bildung von Acetoin ist auf einem viel geringeren Niveau. Die Bildung von meso-Butandiol sieht der vom Hamino sehr ähnlich, ist allerdings etwa doppelt so hoch.

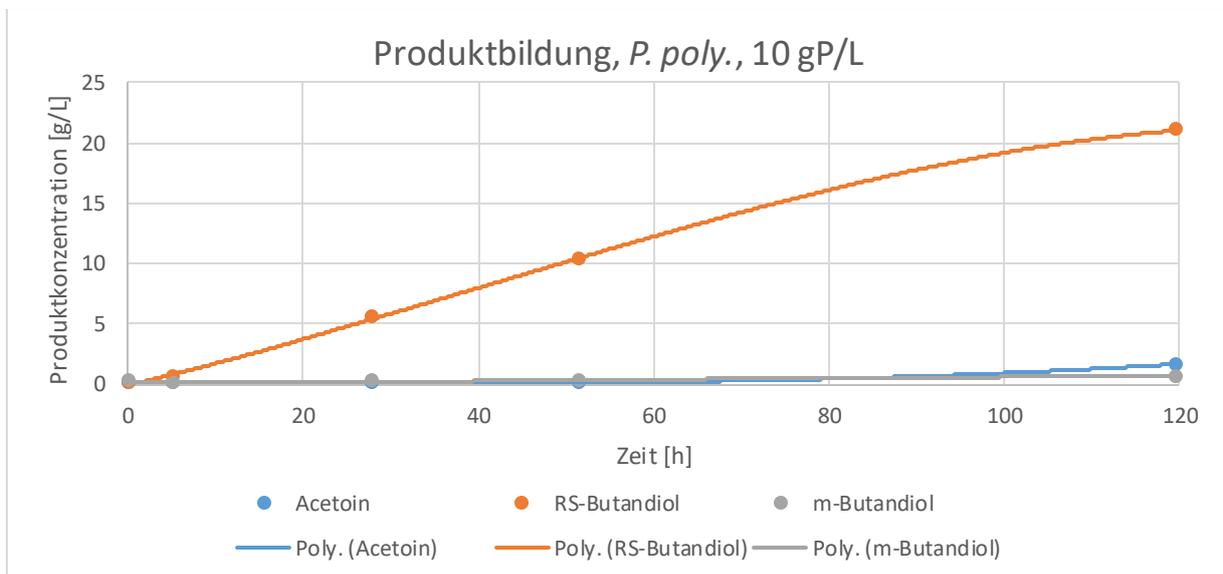


Abbildung 35 Produktbildung bei 10 gP/L, *P. poly.*, Fermentino

Hier sieht man eine komplett andere Produktbildung. Die Bildung von R/S-2,3-Butandiol ist sehr hoch, wo hingegen die Bildung der anderen beiden Produkte sehr gering ist.

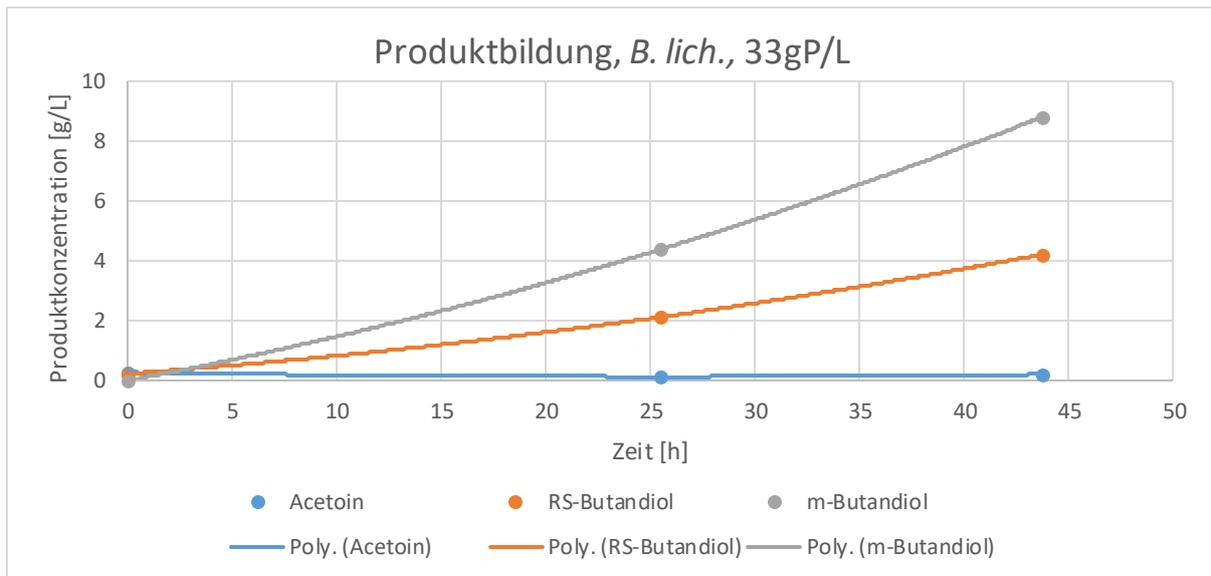


Abbildung 36 Produktbildung bei 33 gP/L, *B. lich.*, Fermentino

In diesem Diagramm sieht man zum ersten Mal bei der Fermentation mit Pepton, dass die Bildung von meso-Butandiol höher ist, als die der anderen. Sie ist etwa doppelt so groß wie die des anderen 2,3-Butandiols. Weiterhin scheint es so, dass kein oder kaum Acetoin gebildet wird.

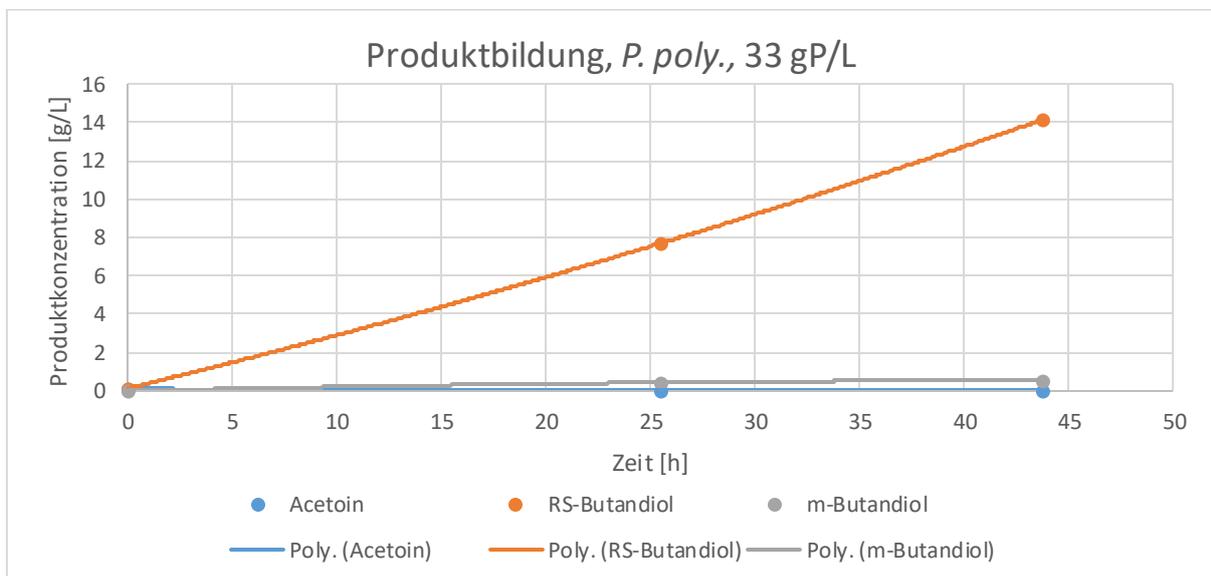


Abbildung 37 Produktbildung bei 33 gP/L, *P. poly.*, Fermentino

Während bei dieser Fermentation kaum Acetoin und meso-2,3-Butandiol gebildet werden, ist die Bildung von R/S-2,3-Butandiol bereits auf einem relativ hohen Niveau. Vielleicht hätten sich mit mehr Zeit auch die anderen Produkte noch gebildet.

Tabelle 11 Produktbildung bei 40 gP/L im Fermentino-Medium

Nr	SK-Volumen [ml]	Bacillus licheniformis			Paenibacillus polymyxa		
		Acetoin	2,3 BD	meso	Acetoin	2,3 BD	meso
1	330,00	0,3471	0,4131	0,4789	0,2309	0,4591	0,2694
2	325,00	0,3884	0,4901	0,4902	0,439	0,6772	0,3059
3	320,00	0,349	0,4953	0,5033	0,3115	0,5079	0,206
4	315,00	0,5289	0,7624	0,2105	0,3493	0,4005	0,4306
5	310,00	0,3578	0,4564	0,4562	0,3935	0,6144	0,1922
6	305,00	0,2834	0,346	0,3848	0,4607	0,6619	0,1967
7	300,00	0,3208	0,465	0,4883	0,4762	0,649	0,2072
8	295,00	0,3643	0,4884	0,4913	1,4445	1,3331	0,3301
9	290,00	0,3155	0,5069	5,7675	0,1017	5,7646	0,53
10	285,00	4,5316	1,1608	15,7262	1,5384	17,7924	0,9355

Dies ist die einzige Fermentation mit 40 gP/L für die die Werte vorliegen. Hieran erkennt man, dass es wichtig ist, die Fermentation über einen längeren Zeitraum laufen zu lassen. Fast alle Produkte wurden erst mit zunehmender Zeit gebildet.

Tabelle 12 Vergleich der Produktkonzentrationen im Fermentino-Medium mit Pepton

Pepton-Konzentration [g/L]	MO	Produktkonzentration		
		Acetoin	R/S-2,3-Butandiol	meso-Butandiol
10	B. lich.	2,1	7,2	3,8
	P. poly.	0,2	22	0,5
33	B. lich.	0,1	4,1	9
	P. poly.	0	14	0,8
40	B. lich.	4,5	1,2	15,7
	P. poly.	1,5	17,8	0,9

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass *B. lich.* für die Produktion von Acetoin und meso-2,3- Butandiol besser geeignet ist, der *P. poly.* allerdings mehr R/S-2,3-Butandiol bildet. Vergleicht man nun wieder mit den Werten aus der Tabelle für CSL, so sind die hier erhaltenen Werte im Allgemeinen relativ nah bei einander.

## 8.5. Allgemeine Produktauswertung

Bisher wurden nur die Werte der eigenen Fermentationen mit einander verglichen. Folgend noch einmal die maximalen Produktkonzentrationen die erreicht wurden.

Tabelle 13 Maximale Produktkonzentrationen aus allen Fermentationen

<b>Produktkonzentration</b>		
<b>Acetoin</b>	<b>R/S-2,3-Butandiol</b>	<b>meso-Butandiol</b>
15	22	15,7

Die erreichten Konzentrationen sind im Vergleich recht gut. Man muss hierbei bedenken, dass nur in Schüttelkolben gearbeitet wurde und dadurch nur wenige Parameter gut geregelt werden konnten. Es wurde zwar nicht eine Acetoinkonzentration von 75,2 g/L (Sun, et al., 2012) erreicht, aber mit einer Konzentration von 15 g/L kann darüber nachgedacht werden, weitere Versuche zu starten. Die höchsten Konzentrationen wurden in den meisten Fällen durch fed-batch Verfahren erhalten. Konzentrationen für 2,3-Butandiol die in der Literatur gefunden schwanken zwischen 150 g/L (Ma, et al., 2009) und 2,5 g/L (Moes, et al., 1985). Leider fehlt bei der Übersicht von Xiao-Jun die Angabe, ob es sich um ein Stereoisomer des 2,3-Butandiols handelt, oder die Konzentrationen der einzelnen hierfür addiert wurden (Ji, et al., 2011).

Im Vergleich zu anderen Stämmen die in unserem eigenen Labor untersucht wurden, bei denen ebenfalls in Reaktoren gearbeitet wurde, sind die erhaltenen Werte ebenfalls konkurrenzfähig. Hier wurden bei der Fermentation mit *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 eine Konzentration für Acetoin von 25 g/L erreicht und 31 g/L für 2,3-Butandiol (Haberland, 2016).

## 9. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der Arbeit war es, die Medien für die Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol zu optimieren. Man erkennt ganz klar, dass die gewählten Komponenten Einfluss auf die Bildung der Produkte nehmen. Mit diesen wenigen Ansätzen kann aber keine statistische Auswertung erfolgen. Dazu fehlen noch mehr Daten, die in weiteren Versuchen aufgenommen werden müssten. Hierbei wäre auch die Kombination von verschiedenen Komponenten von Interesse. Außerdem wurde sich in dieser Arbeit hauptsächlich auf komplexe Stickstoffquellen konzentriert. Bei weiteren Versuchen könnte ermittelt werden, welche Bestandteile dieser Zusätze die Produktion verbessert, damit dadurch vielleicht weitere Einsparungen bei den Beschaffungskosten erzielt werden können. Weiterhin kann man auch versuchen mit Mischkulturen zu arbeiten, um vielleicht weitere Verbesserungen bei der Produktion zu erzielen.

Ein Punkt, der in dieser Arbeit nicht beachtet wurde, sind die Möglichkeiten, wie der Prozess an sich verbessert und optimiert werden kann. Viele Literaturquellen zeigen eine große Abhängigkeit der Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol mit der Sauerstoffzufuhr. Diese konnte in den Schüttelkolben nicht untersucht werden. Darum ist es wichtig, dass in größeren Fermentoren Versuche durchgeführt werden, bei denen die verschiedenen Prozessparameter genauer betrachtet, eingestellt und gehalten werden können. Hierbei ist zu bedenken, ob die bisher gewonnen Erkenntnisse direkt in einen größeren Maßstabüberführt werden können, oder ob bei größeren Volumina weitere Dinge hinzukommen, auf die während der Fermentation geachtet werden muss.

Weiterhin könnte man sich nach anderen Mikroorganismen umschauchen, die zwar trotzdem noch in die Sicherheitsklasse S1 gehören, aber besser für die Produktion der genannten Stoffe geeignet sind. Hierbei sollten allerdings Mikroorganismen gewählt werden, die zu den späteren Bedingungen in der Industrie passen. Sollte in der Industrie heißes Medium aus anderen Produktionsschritten anfallen, so sollten die Organismen nicht zu hitzeempfindlich sein, da sonst eine lange Standzeit des Mediums, oder eine sehr schnelle Kühlung nötig wäre.

## 10. Literaturverzeichnis

- Celińska, E. und Grajek, W. 2009.** Biotechnological production of 2,3-Butanediol - current state and prospects. *Biotechnology Advances*. 2009, 27:715-725.
- Chen, Ri-Zhao und Li, Yu. 2011.** A novel plant volatile attractant scheme to protect corn in China from the white-spotted flower chafer (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *Journal of Pest Science*. 2011, Bd. 84, 3.
- Fricke, Tobias. 2016.** Untersuchung von Substraten auf das Wachstum von *Bacillus licheniformis* und *Paenibacillus polymyxa*. 2016.
- Garg, S. und Jain, A. 1995.** Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresource Technology*. 1995, 51:103-9.
- 2016.** GESTIS-Stoffdatenbank. [Online] IFA, 05. 08 2016. [Zitat vom: 10. 08 2016.] [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis\\_de/000000.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$vid=gestisdeu:sdbdeu\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates$fn=default.htm$vid=gestisdeu:sdbdeu$3.0).
- Haberland, Clauia. 2016.** Ermittlung und Untersuchung von Bakterien zur Herstellung von Acetoin und 2,3-Butandiol. Köthen (Anhalt) : s.n., 2016.
- He, Zengguo und Kislá, Duygu. 2007.** Isolation and Identification of a *Paenibacillus polymyxa* Strain That Coproduces a Novel Lantibiotic and Polymixin. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 2007, Bd. 1, 168-178.
- Ji, X.-J., Huang, H. und Ouyang, P.-K. 2011.** Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*. 2011, 29:351-364.
- Lal, Sadhana und Tabacchiono, Silvia. 2009.** Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian Journal of Microbiology*. 49, 2009, Bd. 1, 2-10.
- Ma, CQ, et al. 2009.** Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Appl Microbiol Biotechnol*. 82, 2009.
- Micheal, Rey, Ramaiya, Preethi und Nelson, Beth. 2004.** Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*. 2004, Bd. 5(10).
- Moes, J, et al. 1985.** A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. *Biotechnol Bioeng*. 27, 1985, Bd. 482, 9.
- Nakashimada, Y., Kanai, K. und Nishio, N. 1998.** Optimization of dilution rate, pH and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnology Letters*. 1998, 20:1133-8.
- Ping, Liyan und Boland, Wilhelm. 2004.** Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 2004, Bd. 9.
- Sun, Jian-An, et al. 2012.** Enhanced acetoin production by *Serratia marcescens* H32 with expression of a water-forming NADH oxidase. *Bioresource Technology*. 119, 2012.

**Timmusk, S., et al. 1999.** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1999, 1847-1852.

**WHO. 2010.** www.who.int. [Online] 2010. [Zitat vom: 5. November 2016.] <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/PrintPreview.aspx?chemID=1192>.

**Williams, C. M. und Richter, C. S. 1990.** Isolation, Identification, and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 1990, Bd. 6, 1059-1515.

**Xiao, Zijun und Xu, Ping. 2007.** Acetoin Metabolism in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 2007, Bd. 33, 2.

**Yikrazuul. 2010.** de.wikipedia.org. [Online] 24. Februar 2010. [Zitat vom: 5. November 2016.] [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:\(S\)-Acetoin.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:(S)-Acetoin.svg).

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Praktikumsarbeit mit dem Thema „Optimierung industrieller Nebenprodukte als Substrat zur Produktion von Acetoin und 2,3-Butandiol mit Hilfe von Bakterien“ selbstständig verfasst habe. Es wurden keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Zitate wurden als solche kenntlich gemacht.

Köthen, den 25.11.2016