

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 9/24, 1/20, C12Q 1/34, C12P 19/14	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/49277 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. November 1998 (05.11.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/02426 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. April 1998 (24.04.98) (30) Prioritätsdaten: 197 17 823.5 26. April 1997 (26.04.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: TSHISUAKA, Barbara, I. [DE/DE]; Steckfeldstrasse 62, D-70599 Stuttgart (DE). (74) Anwalt: WINTER, Martina; Kirchstrasse 4-6, D-71364 Winnenden (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING AN ENDOINULINASE-PRODUCING MICROORGANISM AND METHOD FOR DETECTING AN ENDOINULINASE-ACTIVITY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERZEUGUNG EINES ENDOINULINASE PRODUZIERENDEN MIKROORGANISMUS UND VERFAHREN ZUR DETEKTION VON ENDOINULINASE-AKTIVITÄT

(57) Abstract

The invention relates to a method for obtaining an endoinulinase-producing microorganism, comprising the following steps: collecting earth and/or tissue samples in the root area of inuline-storing plants; selecting microorganisms using inuline as the only carbon source, by adding an inulin-containing agent during a determined period; separating and culturing said selected microorganisms. The invention also relates to a microorganism having strictly an endoinulinase-activity, as well as a method for detecting such an activity, comprising the following steps: marking said inulin with a marker substance; incubating the marked inulin with inulase during a determined period; separating the non-converted marked inulin; determining the charge extinction at 592 nm.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung eines Endoinulinase produzierenden Mikroorganismus. Erfindungsgemäß sind folgende Verfahrensschritte vorgesehen: Sammeln von Erdproben und/oder Gewebeprobe aus dem Wurzelbereich inulinspeichernder Pflanzen, Selektion von Mikroorganismen, die Inulin als einzige Kohlenstoffquelle nutzen, durch Zufügen von inulinhaltigem Medium über einen definierten Zeitraum, Vereinzeln und Kultivieren der selektierten Mikroorganismen. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Mikroorganismus mit reiner Endoinulinase-Aktivität sowie ein Verfahren zur Detektion von Inulinase-Aktivität mit folgenden erfindungsgemäßen Verfahrensschritten: Markieren von Inulin mit einer Markierungssubstanz, Inkubation des markierten Inulins mit Inulinase über einen definierten Zeitraum, Abtrennung des nicht umgesetzten markierten Inulins, Bestimmung der Extinktion des Ansatzes bei 592 nm.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERFAHREN ZUR ERZEUGUNG EINES ENDOINULINASE PRODUZIERENDEN MIKROORGANISMUS UND
VERFAHREN ZUR DETEKTION VON ENDOINULINASE-AKTIVITÄT

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung eines Endoinulinase produzierenden Mikroorganismus, den Mikroorganismus selbst, ein Verfahren zur Herstellung von Endoinulinase, ein Verfahren zur Herstellung von Oligofructosiden aus Inulin sowie ein Verfahren zur Detektion auf Endoinulinase-Aktivität.

Inulin ist nach Stärke das am häufigsten vorkommende pflanzliche Reservekohlenhydrat. Es ist ein Fructosepolymer, das im Wesentlichen durch Beta-D-(2 -> 1)-fructosyl-fructoseglycosidische Bindungen linear verknüpft ist. Inulinmoleküle beginnen am nicht-reduzierenden Ende oft mit einer Glucoseeinheit. Üblicherweise sind zwei bis sechzig Einheiten miteinander verknüpft. Die bekanntesten Inulinquellen sind Chicorée-Wurzeln sowie die Knollen von Dahlien und Topinambur. Letztere werden von Diabetikern als Kartoffel- bzw. Stärkeersatz benutzt, da bei der Verdauung nicht Glucose, sondern Fructose entsteht, der den Blutzuckerspiegel nicht erhöht. In der Diagnostik spielt Inulin eine Rolle zur Bestimmung der Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate), da radioaktive Methoden zunehmend auf Ablehnung stoßen.

Inulin ist im Handel unter dem Namen Fibrulin oder Raftilin aus Chicorée-Wurzeln isoliert erhältlich. Die Kettenlängen von Fibrulin und Raftilin schwanken zwischen 2 bis 60 Fructoseeinheiten. Diese Produkte enthalten einen gewissen Anteil an Oligofructosiden sowie geringen Mengen an Glucose, Fructose und Saccharose.

Inulinasen sind Enzyme, die Inulin hydrolytisch, d.h. unter Einbau von Wassermolekülen spalten. Nach der Art der Spaltung werden sie in Exoinulinasen und Endoinulinasen unterteilt. Exoinulinasen spalten Inulin vom Ende her in Fructoseeinheiten. Endoinulinasen spalten Inulin intramolekular, wobei kürzere Inulineinheiten und Oligofructoside, aber keine Fructose entsteht. In der Natur kennt man bisher beide Enzymtypen gemeinsam, sei es aufgrund des gleichzeitigen Vorkommens zweier Enzyme oder aufgrund gleichzeitigen Vorkommens beider Aktivitäten auf demselben Enzym. Die Einwirkung dieser Enzyme auf Inulin führt immer zu Fructose als Endprodukt. Bisher sind verschiedene Mikroorganis-

men, vor allem Pilze, bekannt, die Enzyme synthetisieren, die sowohl Endo- wie auch Exoinulinase-Aktivität besitzen.

Oligofructoside kommen in vielen Pflanzen, z. B. in Spargeln und Zwiebeln, natürlich vor. Dabei handelt es sich um kurze Inulinmoleküle, die aus 2 bis 10 miteinander verbundenen Fructoseeinheiten bestehen. Im menschlichen Darm werden sie nicht verdaut und sind deshalb, wie höher polymerisiertes Inulin auch, als kalorienarmer Ballaststoff in Diätetika und Diabetika einsetzbar. Sie beeinflussen die Darmflora günstig und sind von medizinischem Interesse, insbesondere hinsichtlich der Behandlung von Durchfallerkrankungen, Verdauungsstörungen, Regenerierung der Darmflora nach Antibiotika-Therapie. Sie sollen ferner eine lipidsenkende Wirkung haben, so daß sie zur Vorbeugung und Behandlung koronarer Herzkrankheiten eingesetzt werden können.

Bestimmte Oligofructoside werden industriell aus Saccharose durch enzymatische Transfructosylierung hergestellt (vgl. DE 31 12 842 A1). Dabei entsteht eine Mischung relativ kurzer Oligofructoside aus zwei bis vier miteinander verbundenen Einheiten, die enzymatisch aus Saccharose durch wiederholtes Anknüpfen des Fructoserestes der Saccharose an ein anderes Saccharose-Molekül hergestellt werden. Die Mischung dieser Oligofructoside wird unter den Handelsnamen "Neosugar" oder "Actilight" vertrieben.

Die Anwendung des Neosugar wird erheblich eingeschränkt durch die abführende Wirkung der enthaltenen sehr kurzen Oligofructoside. Es ist daher auf Dauer zur Nahrungsergänzung bei Adipositas und Diabetes nicht geeignet. Außerdem ist bedingt durch den Herstellungsprozess Saccharose ebenfalls enthalten, die abgetrennt werden muß, wenn der als Lebensmittel verwendete Neosugar kalorienarm sein soll.

In der DE 40 03 140 A1 wird ein Verfahren zur Herstellung eines glucose-, fructose- und saccharosearmen Inulo-Oligosaccharid-Produkts beschrieben, das auf enzymatischer Hydrolyse mittels einer von Pilzen produzierten Endoinulinase basiert. Das unter dem Namen Raftilose vertriebene Produkt ist eine Mischung aus Oligofructosiden mit einer Kettenlänge von zwei bis acht Einheiten. Zur Senkung des Gehalts an Glucose, Fructose und Saccharose wird Alpha-Glucosidase im Laufe des Verfahrens eingesetzt. Die verwendete Endoinulinase muß außerdem in einem aufwendigen Reinigungsschritt zuvor von Exoinulinase befreit werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, Mikroorganismen sowie Verfahren zu ihrer Isolierung bereitzustellen, die Enzyme mit ausschließlicher Endoinulinaseaktivität produzieren. Aufgabe der Erfindung ist es ferner, ein Verfahren zur Herstellung von Endoinulinase bzw. Oligofructosiden aus Inulin sowie ein Verfahren zur Detektion der Endoinulinase-Aktivität bereitzustellen.

Die Lösung besteht in einem Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1, einem Mikroorganismus mit den Merkmalen des Anspruchs 17, sowie Verfahren mit den Merkmalen der Ansprüche 19, 20 und 22.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren isolierten Mikroorganismen stellen Enzyme her, die eine reine Endoinulinase-Aktivität entfalten. Diese Enzyme können auf bekannte Weise z. B. chromatographisch isoliert und ggf. immobilisiert werden und zur Herstellung von Oligofructosiden aus Inulin eingesetzt werden. Im einfachsten Fall genügt es, den Überstand ohne eine weitere Aufarbeitung durch Zentrifugation abzutrennen, einzuzengen und zu lyophilisieren. Die aufwendige Abtrennung der Exoinulinaseaktivität entfällt. Die Behandlung mit Alpha-Glucosidase und die Abtrennung von Monosacchariden entfällt ebenfalls.

Die hier beschriebene Endoinulinase wird von Inulin-abbauenden Bakterien produziert. Durch Einwirken der bakteriellen Endoinulinase auf inulinhaltige Lösungen oder geeigneten Pflanzenextrakt entstehen bei 50 bis 60°C und pH 5 - 7 Oligofructoside. Fructose entsteht nicht oder nur in Spuren. Das Verfahren der enzymatischen Hydrolyse mit bakterieller Endoinulinase ist für die biotechnologische Produktion von Oligofructosiden geeignet. Durch Variation der Einwirkungszeit des Enzyms kann der Polymerisationsgrad der Oligofructoside beeinflusst werden.

Vorteilhafte Weiterbildungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Im Folgenden wird ein Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen Verfahrens anhand der beigefügten Abbildungen näher beschrieben. Es zeigen:

Figur 1 eine dünnschichtchromatische Analyse des Inulinabbaus durch die erfindungsgemäßen Bakterienstämme BI (Spuren 1 - 6) und KJ (Spuren 13 - 16);

- Figur 2 eine dünnschichtchromatographische Analyse der Wirkung von Succinat auf die Endoinulinase-Aktivität des erfindungsgemäßen Bakterienstammes MN (Spuren 1 - 4 und 9 - 13);
- Figur 3 eine dünnschichtchromatographische Analyse der Endoinulinase-Aktivität des erfindungsgemäßen Bakterienstammes MN (Spuren 1 - 4 und 9 - 12);
- Figur 4 eine dünnschichtchromatographische Analyse der pH-Abhängigkeit der Endoinulinase-Aktivität.

Zunächst wurden geeignete Mikroorganismen mit Hilfe Inulin-haltiger Anreicherungskulturen isoliert. Ausgangsstoff waren Erdproben, die in den Gärten der Stadt Joinville, S.C., Brasilien gesammelt wurden. Die Erdproben wurden den Wurzelbereichen von Dahlien, Chicorée, Agave und Topinambur entnommen. Die Erdproben wurden in Blumentöpfen mit Wasser feucht gehalten und in Intervallen von drei bis fünf Tagen mit einer inulin- oder fibrulinhaltigen wäßrigen Lösung mit einer Konzentration von 1 Gew.-% Inulin bzw. Fibrulin versetzt. Ferner wurde Pflanzengewebe aus zerfallenden Dahlienknollen in M-Medium gegeben und geschüttelt. Inulin kann von der Firma Serva, Heidelberg, Deutschland; Fibrulin von der Firma Cosucra, Fontenoy, Belgien bezogen werden.

Für die weitere Behandlung wurden folgende Medien verwendet (jeweils in Aqua bidest):

1. M-Medium, enthaltend 0,9 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g/l KH_2PO_4 , 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 ml einer Stammlösung von Spurenelementen. Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt.
2. Stammlösung von Spurenelementen enthaltend 5,0 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/l H_3BO_4 , 0,45 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/l $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l CuSO_4 , 0,1 g/l KI, 0,04 g/l $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.
3. SM-Medium enthaltend M-Medium zuzüglich 1,0 g/l Bernsteinsäure bei einem pH von 6,5.
4. YM-Medium aus M-Medium zuzüglich 0,5 g/l Hefeextrakt (Unipath Ltd. Basingstoke, Hampshire, England).

5. SYM-Medium aus SM-Medium zuzüglich 0,5 g/l Hefeextrakt.
6. FYM-Medium aus YM-Medium zuzüglich 5 g/l Fibrulin.
7. FYSM-Medium aus SM-Medium zuzüglich 0,5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l Fibrulin.

Zur Herstellung der Medien wurden eine 4,5-prozentige Stammlösung Inulin und eine 10-%-ige Stammlösung Fibrulin in Aqua bidest angesetzt, separat sterilisiert und dem jeweiligen Medium zugefügt. Zur Herstellung von Plattenmedien wurden 1,5 - 2 Gew.-% Agar zugesetzt. Alle Medien wurden für 20 Minuten bei 121°C sterilisiert.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden folgende Lösemittelsysteme benutzt:

- I. Essigsäure : Chloroform : Wasser (7/6/1, v/v/v); vgl. Egge [7]
- II. Ethylacetat : 65 % Isopropanol (1/3 v/v) unter Modifizierung des Verfahrens von Stahl und Kaltenbach [8].
- III. Butanol : Isopropanol : Wasser (3/12/4, v/v/v), vgl. [9].

Alle Lösemittelsysteme wurden täglich frisch angesetzt.

Ferner wurde ein kolorimetrischer quantitativer Nachweis der Endoinulinase-Aktivität entwickelt. Dazu wurde zunächst ein mit dem Farbstoff RBB (Remazol Brilliant Blue R; Sigma, St. Louis, USA) markiertes Inulin (im Folgenden: RBB-Inulin) hergestellt. Zur Herstellung dieses chromogenen Substrats analog bekannter Verfahren [4, 5, 6] wurden 5 g Inulin in 50 ml H₂O bei 50°C unter Schütteln suspendiert und zu 50 ml einer wäßrigen RBB-Lösung (1 Gew.-% RBB in Wasser) zugefügt. Die Mischung aus Inulin und RBB wurde bei 50°C weiter geschüttelt. Anschließend wurde innerhalb 45 min 10 g festes Na₂SO₄ in kleinen Mengen zugefügt. Anschließend wurden 5 ml 10 %-ige wäßrige Na₃PO₄-Lösung zugefügt. Die resultierende Lösung wurde weitere 75 min bei 50°C geschüttelt und anschließend auf Eis gekühlt. RBB-Inulin wurde durch Zentrifugation bei 4°C (20 - 30 min, 5.000 rpm) erhalten. Der Niederschlag wurde zwei Mal mit eiskaltem Wasser gewaschen, dann in etwa 20 bis 30 ml kaltem Wasser suspendiert und gegen 5 Liter destilliertes Wasser bei Raumtemperatur dialysiert. Während der Dialyse wurde das Wasser häufig gewechselt, bis die Extinktion bei

592 nm bei etwa 0,006 lag. Das Produkt wurde mit 2 Vol. Ethanol gefällt, zentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Ausbeute betrug 2,25 g RBB-Inulin. Die Reinheit wurde dünnschichtchromatographisch (Lösemittelsysteme I und III) überprüft. Der Farbstoffgehalt wurde photometrisch zu etwa 5,7 % bei $\epsilon_{595} = 9,25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und M_r etwa 5.000 für Inulin bestimmt (vgl. [5]).

Zur Isolierung inulin-abbauender Stämme wurden 50 ml M-Medium in 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit einer kleinen Menge Bodenprobe bzw. Gewebeprobe inokuliert und bei 50°C und 160 rpm inkubiert. Dem M-Medium wurde 0,1 Gew.-% Inulin als einzige Kohlenstoffquelle bzw. Energiequelle zugefügt. Höhere Anteile an Inulin (bis 10 Gew.-%) zur Verbesserung der Wachstumsrate sind möglich. Jedoch ist der Selektionsdruck umso höher, je geringer der Inulin-Anteil ist. Bevorzugt ist ein Anteil von 0,1 - 2 Gew.-%. Jeden zweiten oder dritten Tag wurde frisches Medium mit 0,5 bis 1 ml Überstand der alten Kultur beimpft. Dieses sukzessive Kultivierungsverfahren wurde über drei Wochen fortgesetzt.

Einige wenige Tropfen jeder nach drei Wochen resultierenden Anreicherungskultur wurde auf M-Agar-Platten mit 0,1 Gew.-% Inulin plattiert und bei 50°C kultiviert, bis Einzelkolonien erhalten wurden. Einzelkolonien wurden gepickt und wieder ausplattiert. Dieser Zyklus wurde mehrmals wiederholt, um sicherzustellen, daß eine Reinkultur vorlag. Die resultierenden Reinkulturen wurden für 2 - 3 Tage bei 50 ° C in Flüssigmedium inkubiert. Die Stämme wurden auf M-Agar mit 0,1 Gew.-% Inulin oder auf FYSM-Agar in Schrägagar-Röhrchen bei Raumtemperatur aufbewahrt. In Abständen von etwa einem Monat wurden die Kulturen überimpft.

Der Abbau von Inulin und das Auftreten von Zwischenprodukten während des Zellwachstums in den verschiedenen Kultivierungsschritten wurde mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Analyse verfolgt.

Zur Herstellung von Endoinulinase wurden mit Bakterien bewachsene Schrägagar-Röhrchen (FYSM) mit 2 ml sterilem FYSM-Medium versetzt und heftig geschüttelt. Die resultierende bakterielle Suspension wurde zur Inokulierung von 50 ml FYSM-Medium in 100 ml-Erlenmeyerkolben benutzt. Die Inkubation erfolgte bei 50°C und 160 rpm. Der Fibrulinabbau wurde täglich dünnschichtchromatographisch überprüft.

Durch die beschriebenen Verfahrensschritte konnten drei Endoinulinase-produzierende Mikroorganismenstämme BI, MN und KJ isoliert werden. Die drei Stämme wurden am 15. April 1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, 38124 Braunschweig, gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrags hinterlegt. Die Eingangsnummern sind:

Stamm BI: DSM 11508

Stamm KJ: DSM 11509

Stamm MN: DSM 11510.

Kopien der Empfangsbestätigungen sind beigefügt.

Die Auswahl erfolgte danach, ob die selektierten Stämme ein Inulinabbau-Muster zeigten, das sehr niedrige Fructose-Anteile enthält und auch während des Wachstums in inulin-haltigem Medium Oligofructoside im Überstand nachweisbar war. Die Zugabe von Hefeextrakt erwies sich als vorteilhaft für die Wachstumsrate der selektierten Mikroorganismen. Die selektierten Stämme wuchsen sowohl auf FYM- bzw. FYSM-Medium als auch auf SYM-Medium mit 2 Gew.-% Inulin unabhängig von der Kohlenstoffquelle (Inulin oder Fibrulin) gut. In flüssigem FYM-Medium kann eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 innerhalb von einem oder zwei Tagen erreicht werden. Bei Verwendung eines FYSM-Mediums liegt der Wert bei 0,6 bis 0,75.

Die Dünnschichtchromatographie wurde durchgeführt mittels manueller dreifacher Entwicklung analog zu den bekannten automatisierten Verfahren in einem lösemittelgesättigten Tank; vgl. [10, 11]. Es wurden DC-Aluminiumbeschichtete Silicagelkärtchen 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) verwendet. Drei Läufe zu 5, 10 und 20 Minuten wurden durchgeführt. Zwischen jedem Lauf wurden die Kärtchen getrocknet. Die Oligofructoside wurden durch Besprühen der Kärtchen mit Anilin-Diphenylamin-Phosphorsäure-Reagenz [12] und Erhitzen für einige Minuten bei 100°C sichtbar gemacht. Als Referenzen dienten je 2 µg Neosugar (Meiji Seika Kaisha Ltd., Kawasaki, Japan) und Raftilose P 95 (Orafti S.A., Tienen, Belgien) bzw. je 1 µg Fructose und Saccharose.

Es zeigte sich, daß im Lösemittelsystem I nur Inulin mit bis zu 30 Einheiten, Glucose, Fructose, Saccharose und die im Neosugar enthaltenden Oligofructoside der Kettenlänge 2 bis 4 aufgetrennt werden konnten. Mit den Lösemittelsystemen II und III konnten höhere Rf-Werte erzielt werden, so daß Oligomere mit mehr als 4 Einheiten aufgetrennt werden konnten.

Figur 1 zeigt das Analyseergebnis der beiden Stämme BI (Spuren 1 - 6) und KJ (Spuren 13 - 16) während des Wachstums in FYSM-Medium. Hierzu wurde je 1 µl des zellfreien Überstandes im Lösemittelsystem III wie beschrieben aufgetrennt. Die Proben wurden bei t=0 (Spuren 1,13), nach einem Tag (Spuren 2,14) und nach zwei (Spuren 3,15), drei (Spuren 4,16), vier (Spur 5) und fünf (Spur 6) Tagen entnommen. Die Referenzsubstanzen sind Raftilose (Spur 7), Neosugar (Spur 8), Fructose (Spur 9) und Saccharose (Spur 10). Die Spuren 11 und 12 zeigen die Sterilkontrollen zu Beginn bzw. bei Beendigung des Experiments. Man erkennt eine kontinuierliche Zunahme der auf die Endoinulinase-Aktivität zurückzuführenden Abbauprodukte, jedoch keine auf Exoinulinase-Aktivität hindeutende Fructose. Im FYSM-Medium enthaltenes Inulin wurde somit innerhalb von drei Tagen zu Oligofructosiden abgebaut. Der Stamm BI produzierte darüber hinaus ein weiteres Abbauprodukt, welches angereichert wurde und auch nach längerer Inkubationszeit nicht verschwand. Da der Anteil an generierter Fructose selbst nach einer Inkubationszeit bis zu 24 Stunden extrem gering war, ist eine Exoinulinase-Aktivität praktisch auszuschließen.

Alle drei isolierten Stämme BI, MN, KJ zeigten auch in den Enzymtests mit gelöstem oder suspendiertem Inulin oder Fibrulin und RBB-Inulin (siehe unten) signifikante Endoinulinase-Aktivität.

Figur 2 zeigt den Einfluß von Succinat auf die Endoinulinase-Aktivität am Beispiel des Stammes MN während des Wachstums in FYSM-Medium (Spuren 1 - 4) und FYM-Medium (Spuren 9 - 11). Die Probenentnahme erfolgte bei t=0 (Spur 1), nach einem Tag (Spuren 2,9) sowie nach zwei (Spuren 3,10) und drei (Spuren 4,11) Tagen. Die Spuren 5 bis 8 zeigen wiederum die Referenzsubstanzen Raftilose, Neosugar, Fructose, Saccharose. Die Spuren 12 und 13 sind die Sterilkontrollen zu Beginn und Ende des Experiments. Man erkennt, daß im succinatfreiem FYM-Medium kein Inulin- oder Fibrulin-Abbau stattfindet. Enzymtests und weitere dünnschichtchromatographische Analysen bestätigten, daß der zellfreie Überstand weder Exo- noch Endoinulinaseaktivität aufweist. Daher scheint die Anwesenheit von Succinat wesentlich für die Expression von Endoinulinase zu sein.

Die enzymatische Aktivität der zellfreien Überstände der Bakterienkulturen wurden wie folgt bestimmt. 0,1 ml Inulin- oder Fibrulin-Lösung (4 % in Natriumacetatpuffer, pH 6,0) und 0,1 ml Überstand wurden gemischt und bei 50°C inkubiert. Aliquots von je 1 µl wurden dem Ansatz sofort und in definierten Zeitabständen entnommen und dünnschichtchromatographisch analysiert (Lösemittelsysteme II oder III).

Figur 3 illustriert das Ergebnis, nämlich die enzymatische Gewinnung und Akkumulation kurzer Oligofructoside aus Inulin mit etwa 30 Einheiten (Spuren 1 - 4) und Fibrulin (Spuren 9 - 12) mit Hilfe des Stammes MN. Zur dünnschichtchromatographischen Analyse wurde das Lösemittelsystem III verwendet. Die Probenentnahme erfolgte bei $t=0$ (Spuren 1,9), nach 30 min (Spuren 2,10), 3 h (Spuren 3,11) und 22,5 h (Spuren 4,12). Die Spuren 7 - 10 zeigen die Referenzen Raftilose, Neosugar, Fructose und Saccharose. Der Anteil der Oligofructoside steigt mit der Zeit.

Zur Ermittlung der Endoinulinaseaktivität in Abhängigkeit des pH-Werts wurden die folgenden Puffer verwendet: 0,1 M Natriumphosphat (pH 6 bis 8), Citratphosphat (pH 3 bis 7) und Glycin-NaOH (pH 9 bis 10). Die zellfreien Überstände wurden im Verhältnis 1 : 10 mit den jeweiligen Puffern verdünnt und wie oben beschrieben getestet. Die Reaktionszeit betrug 3 Stunden.

Das Ergebnis ist in Figur 4 dargestellt. Sie zeigt die dünnschichtchromatographische Analyse der Reaktionsansätze mit Citratphosphat (Spuren 1 - 5), Natriumphosphat (Spuren 6 - 8) und Glycin-NaOH (Spuren 9,10) bei pH 3 (Spur 1), pH 4 (Spur 2), pH 5 (Spur 3), pH 6 (Spuren 4,6), pH 7 (Spuren 5,7), pH 8 (Spur 8), pH 9 (Spur 9) und pH 10 (Spur 10). Spur 11 zeigt als Referenz Raftilose.

Aus Figur 4 wird sichtbar, daß sich die enzymatische Aktivität auf einen pH-Bereich von 5 bis 7 beschränkt. Bei einem pH = 3 bzw. pH = 10 war keine enzymatische Aktivität zu beobachten.

Die Thermostabilität wurde überprüft, indem der endoinulinasehaltige Überstand 20 Minuten in einem Wasserbad zwischen 50 und 90°C inkubiert, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und wie beschrieben getestet wurde.

Die Endoinulinasen aller drei Stämme sind bis zu einer Temperatur von etwa 60°C aktiv. Diese Thermotoleranz kann bei biotechnischer Gewinnung reiner Endoinulinase von Vorteil sein.

Zur kolorimetrischen Bestimmung wurde 0,1 ml RBB-Inulin (4 % in Natriumacetatpuffer, 0,1 M, pH 6,0, X μ l Überstand und (100 - X) μ l Natriumacetatpuffer bei 50°C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurde 1,0 ml eiskaltes Ethanol zugefügt und die

Mischung für 10 Minuten bei - 20°C stehen gelassen, um die Fällung des nicht umgesetzten Substrats zu vervollständigen. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 Minuten wurde die Extinktion des Überstands bei 592 nm bestimmt. Für die Negativproben wurde die in den Überständen enthaltene Endoinulinase hitzeinaktiviert (20 min, 80°C).

Die Produkte der Enzymreaktion im Überstand wurden wie folgt dünnschichtchromatographisch überprüft. 6 µl der die blauen Oligofructoside enthaltenden ethanolischen Lösung wurden auf DC-Kärtchen mit Konzentrationszone aufgebracht, im Lösemittelsystem III entwickelt und wie oben beschrieben sichtbar gemacht. Für die Berechnung der Endoinulinaseaktivität wurden relative Einheiten (arbitrary units, aU) definiert, wobei 1 aU $\Delta_{\text{E595}}/\text{min} = 1,0$ entspricht.

Bei den kolorimetrischen Tests stellte es sich heraus, daß RBB-Inulin als Substrat genauso gut angenommen wird wie unverändertes Inulin oder Fibrulin. Die blau markierten Oligofructoside zeigen in der Dünnschichtchromatographie daſelbe Verhalten wie ihre nicht markierten Gegenstücke. Mit dem Enzymtest kann auch Exoinulinase-Aktivität bestimmt werden. Die Unterscheidung zwischen Exo- und Endoinulinase-Aktivität ist dünnschichtchromatographisch möglich durch Untersuchung der ethanolischen Überstände mit einem der erwähnten Lösemittelsysteme. Dabei wird eventuell entstandene Fructose abgetrennt. Der Enzymtest für die Bestimmung der Endoinulinase-Aktivität ist einfacher und leichter zu handhaben als die in der Literatur bisher bekannten Tests [7, 13].

Die kolorimetrischen Tests zeigten, daß die enzymatische Aktivität in den ersten 50 Minuten der Reaktion linear ist und anschließend eine Sättigung zeigt. Für Routinemessungen wird eine Inkubationszeit von 30 Minuten mit $0,018 \geq \Delta_{\text{E592}} \geq 0,120$ bevorzugt. In diesem Bereich kann der Test modifiziert werden, z. B. durch Vervielfachung der Aliquotmengen und der Probenentnahme in Intervallen von 5 bis 10 Minuten innerhalb der ersten 50 Minuten.

Bei der Produktion von Endoinulinase kann eine Aktivität nach dreitägiger Inkubation bei 50°C von 0,1 bis 0,5 aU/ml erreicht. Dieser Wert kann durch Optimierung der Züchtungsbedingungen bzw. durch Inkubation in großtechnischem Rahmen gesteigert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten also Bakterienstämme isoliert werden, die reine Endoinulinaseaktivität produzieren und thermotolerant sind. Die Selektion er-

folgt durch Minimalmedien, die Inulin als einzige Kohlenstoffquelle enthalten. Die selektierten Stämme produzieren in FYSM-Medium in zufriedenstellenden Ausbeuten Endoinulinasen bei 50° C, wenn den Medien höhere Inulinkonzentrationen, Hefeextrakt und Succinat zugeführt werden. Für biotechnologische Prozesse kann der zellfreie Überstand ohne weitere Reinigung benutzt werden. Die bakteriellen Endoinulinasen sind bis zu 60 ° C katalytisch aktiv.

Bibliographie

- 1 De Leenheer, L. and H. Hoebregs: Starch/Stärke 5 (1994), 193-196
- 2 Wiemken, A., M. Frehner, F. Keller, and W. Wagner: Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology 5 (1985), 17-31
- 3 Fuchs, A.: Inulin and inulin-containing crops. Elsevier, Amsterdam 1993.
- 4 Rinderknecht, H., P. Wilding, and B. J. Haverback: Experientia 23 (1967), 805
- 5 Biely, P., D. Mislovicová, and R. Toman: Anal. Biochem. 144 (1985), 142 - 146
- 6 Castro, G. R., M. D. Baigorí, and F. Siñeriz: J. Microb. Meth. 22 (1995), 51 - 56
- 7 Azhari, R., A. M. Szlak, E. Ilan, S. Sideman, and N. Lotan: Biotechnol. Appl. Biochem. 11 (1989), 105 - 117
- 8 Stahl, E., and U. Kaltenbach: J. Chromatog 5 (1961), 351 - 355
- 9 Kawamura, M. and T. Uchiyama: Biosci. Biotech. Biochem. 57 (1993), 343
- 10 Jupille, T. H., and J. A. Perry: Science 194 (1976), 288 - 293
- 11 Burger, K.: Fresenius Z. Anal. Chem. 318 (1984), 228 - 233
- 12 Chaplin, M. F.: Monosaccharides, in: Carbohydrate analysis, a practical approach. Eds. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. IRL Press, Oxford 1986, pp. 1 - 36
- 13 Ettalibi, M., and J. C. Baratti: Agric. Biol. Chem. 54 (1990), 61 - 68

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	Internationales Aktenzeichen
T 401 001-PCT	

ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS

(Regel 13^{bis} PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>7</u> , Zeile <u>6</u> .	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG	
Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Mascheroder Weg 1b DE-38124 Braunschweig	
Datum der Hinterlegung 15.04.1997	Eingangsnummer DSM 11508
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	
Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z. B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	

Nur zur Verwendung im Anmeldeamt
<input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung
Bevollmächtigter Bediensteter R. Mandemaker


Nur zur Verwendung im Internationalen Büro
<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	T 401 001-PCT	Internationales Aktenzeichen
---	---------------	------------------------------

ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS

(Regel 13^{bis} PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>7</u> , Zeile <u>7</u> .	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG	Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/>
Name der Hinterlegungsstelle DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)	
Mascheroder Weg 1b DE-38124 Braunschweig	
Datum der Hinterlegung 15.04.1997	Eingangsnummer DSM 11509
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z. B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	

Nur zur Verwendung im Anmeldeamt	
<input checked="" type="checkbox"/>	Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung
Bevollmächtigter Bediensteter	
 R. Mandemakers	


Nur zur Verwendung im Internationalen Büro	
<input type="checkbox"/>	Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter	

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts T 401 001	Internationales Aktenzeichen
---	------------------------------

ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEN MIKROORGANISMUS

(Regel 13^{bis} PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>7</u> , Zeile <u>8</u> .	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Mascheroder Weg 1b DE-38124 Braunschweig	
Datum der Hinterlegung 15.04.1997	Eingangsnummer DSM 11510
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z. B. "Eingangsnummer der Hinterlegung")	

Nur zur Verwendung im Anmeldeamt	
<input checked="" type="checkbox"/>	Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung
Bevollmächtigter Bediensteter  P. Mandentaker	

Nur zur Verwendung im Internationalen Büro	
<input type="checkbox"/>	Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter	

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung eines Endoinulinase-produzierenden Mikroorganismus, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
 - Sammeln von Erdproben und/oder Gewebeproben aus dem Wurzelbereich inulin-speichernder Pflanzen,
 - Selektion von Mikroorganismen, die Inulin als einzige Kohlenstoffquelle nutzen, durch Zufügen von inulinhaltigem Medium über einen definierten Zeitraum,
 - Vereinzeln und Kultivieren der selektierten Mikroorganismen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Medium inulinhaltiges Minimal-Medium verwendet wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Inulingehalt des Mediums auf 0,05 bis 10, vorzugsweise 0,1 - 2 Gew.-% eingestellt wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Minimal-Medium anorganische Salze, Spurenelemente und Inulin als einzige Kohlenstoffquelle enthält.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als inulinhaltiges Medium Minimal-Medium zzgl. weiterer C-Quellen (Bernsteinsäure, Zitronensäure) und/oder Hefeextrakt verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubationstemperatur 50° C beträgt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der definierte Zeitraum 2 bis 3 Wochen beträgt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die selektierten Mikroorganismen auf Platten vereinzelt werden.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die vereinzelt Mikroorganismen auf Endoinulinase-Produktion getestet werden, vorzugsweise durch Test des Kulturmediums auf Endoinulinase-Aktivität.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität mittels DC getestet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Laufmittel Butanol : Isopropanol : Wasser (3/12/4, v/v/v) verwendet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität kolorimetrisch getestet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zum Test markiertes Inulin, vorzugsweise RBB-Inulin verwendet wird.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Erdproben aus dem Wurzelbereich von Dahlie, Chicorée, Agave und Topinambur bzw. die Gewebeproben aus den Knollen von Dahlie, gewonnen werden.
16. Mikroorganismus, gekennzeichnet durch die Produktion reiner Endoinulinase-Aktivität.
17. Mikroorganismus nach Anspruch 15, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15.
18. Mikroorganismus nach Anspruch 16 oder 17, hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Eingangs-Nr. DSM 11508, 11509, 11510.
19. Verfahren zur Herstellung von reiner Endoinulinase, gekennzeichnet durch die Kultivierung eines Mikroorganismus nach Anspruch 15 oder 16 mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14, Abtrennung der bei der Vermehrung des Mikro-

organismus freigesetzten Stoffwechselprodukte und Isolierung einer Fraktion mit Endoinulinase-Aktivität.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß zur Isolierung der Endoinulinaseaktivität der Überstand durch Zentrifugation abgetrennt, eingengt und lyophilisiert wird.
21. Verfahren zur Herstellung von Oligofructosiden, gekennzeichnet durch die Verwendung reiner Endoinulinase, gewonnen gemäß Anspruch 19.
22. Verfahren zur Detektion von Inulinase-Aktivität, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
 - Markieren von Inulin mit einer Markierungssubstanz
 - Inkubation des markierten Inulins mit Inulinase über einen definierten Zeitraum
 - Abtrennung des nicht umgesetzten markierten Inulins
 - Bestimmung der Extinktion des Ansatzes bei 592 nm.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß Inulin mit RBB markiert wird.
24. Verwendung des Verfahrens nach Anspruch 22 oder 23 zur Aktivitätsbestimmung von Exoinulinase oder Endoinulinase.

1/2

FIG. 1

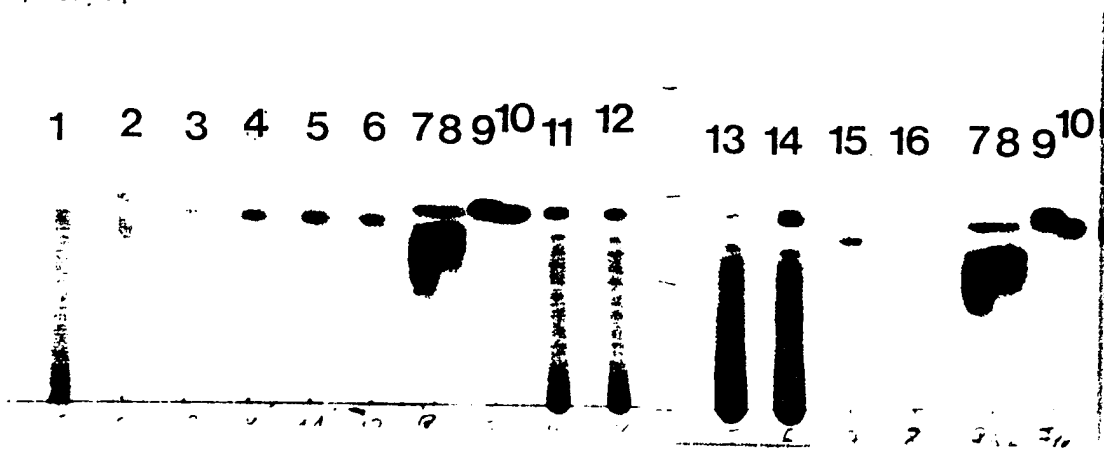
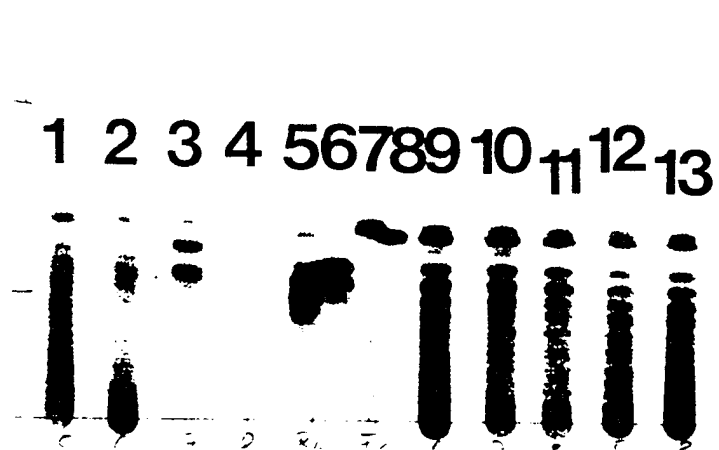


FIG. 2



T401 001-PCT

FIG. 3

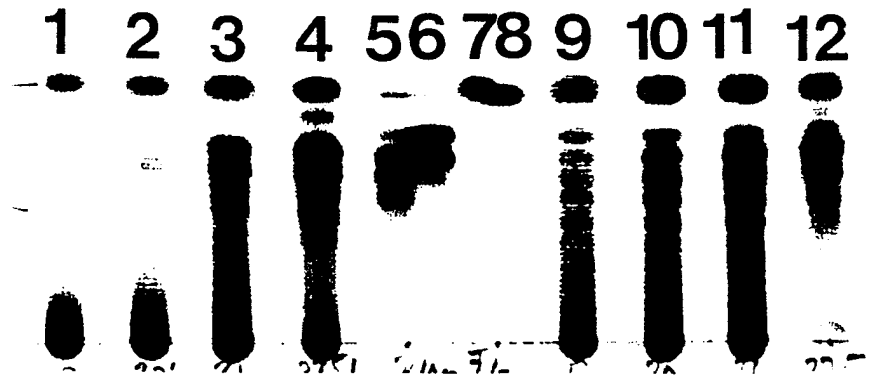
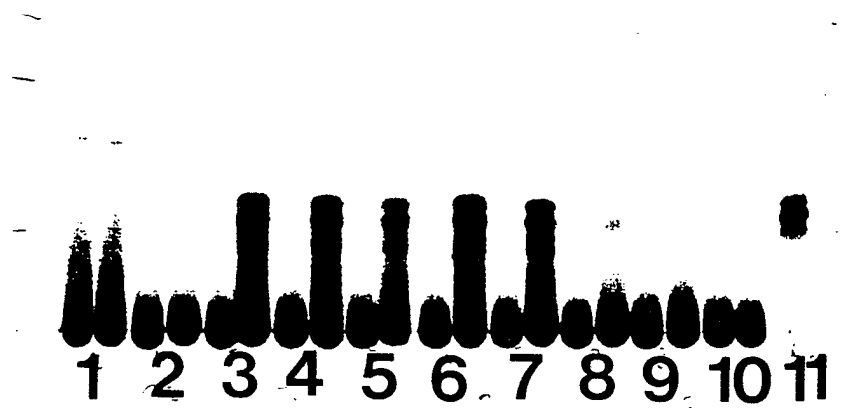


FIG. 4



T401 001-PCT