

**Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure -
Substitution von Hefeextrakt durch agrarische Rohstoffhydrolysate**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Silvia Klotz
aus Hildesheim

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	11
2.	Theoretische Grundlagen	13
2.1	Milchsäure.....	13
2.1.1	Historischer Hintergrund.....	13
2.1.2	Herstellung	13
2.1.3	Anwendungen	15
2.2	Polylactide.....	16
2.3	Biotechnologische Lactatproduktion	18
2.3.1	Mikroorganismen	18
2.3.2	Kohlenhydrat-Metabolismus in Milchsäurebakterien.....	19
2.3.3	Nährstoffanforderungen von Milchsäurebakterien	22
2.3.3.1	Aminosäuren und Peptide	22
2.3.3.2	Vitamine.....	24
2.4	Hefeextrakt und alternative Nährstoffquellen.....	25
2.5	Einsatz alternativer Kohlenstoff- und Nährstoffquellen für die Lactatproduktion	25
3.	Material und Methoden.....	28
3.1	Nährstoffquellen.....	28
3.1.1	Hefeextrakte	28
3.1.2	Kommerziell erhältliche Hefeextraktersatzstoffe	29
3.1.3	Chemisch hergestellte Rohstoffhydrolysate.....	30
3.1.4	Eingesetzte Konzentrationen der Nährstoffquellen im Fermentationsmedium	30
3.2	Hydrolysemethoden	33
3.2.1	Milde chemische Hydrolyse.....	33
3.2.2	Chemische Vollhydrolyse	33
3.2.3	Enzymatische Hydrolyse.....	34

Inhaltsverzeichnis

3.3	Kultivierungen.....	34
3.3.1	Allgemeine Arbeitsweise	34
3.3.2	Mikroorganismen und Stammhaltung.....	35
3.3.3	Herstellung von Kryostockkulturen	35
3.3.4	Herstellung der Vorkulturen	35
3.3.5	Medien und Kultivierungsbedingungen.....	36
3.3.6	Probennahme.....	37
3.3.7	Variation der Nährstoffquelle	37
3.3.8	Bestimmung der Einflussfaktoren auf die Produktivität durch Supplementierung verschiedener Stoffklassen.....	38
3.3.9	Fed-Batch mit Zugabe der metabolisierten Aminosäuren	39
3.3.10	Vollsynthetisches Medium.....	40
3.3.11	Bestimmung des Einflusses der Einzelkomponenten in 96-Deepwell- Mikrotiterplatten	40
3.3.12	Einsatz der Rohstoffe ohne Vorbehandlung als Nährstoffquelle.....	42
3.3.13	Einsatz der enzymatischen Hydrolysate und Vollhydrolysate als Nährstoffquelle ...	42
3.3.14	Simultane Hydrolyse und Fermentation von Rapsschrot.....	43
3.3.15	Optimierte D-Lactat Produktion mit Rapsschrot im Fed-Batch-Versuch.....	43
3.4	Analytische Methoden	44
3.4.1	Bestimmung der Trockenmasse und des Aschegehalts	44
3.4.2	Bestimmung des Gesamtstickstoffgehalts nach Kjeldahl	44
3.4.3	Kohlenhydratanalytik.....	45
3.4.3.1	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts	45
3.4.3.2	Bestimmung des Gehalts an reduzierenden Zuckern.....	46
3.4.3.3	Bestimmung der Kohlenhydrate nach der NREL-Methode.....	47
3.4.4	Protein- und Aminosäureanalytik	47
3.4.4.1	Bestimmung des freien Aminostickstoffgehalts	47
3.4.4.2	Totalhydrolyse der Proteine	48

3.4.4.3	Bestimmung der freien Aminosäuren	48
3.4.5	Bestimmung der Fettsäuren.....	49
3.4.6	Bestimmung der B-Vitamine	50
3.4.7	Bestimmung der Polyphenole	50
3.4.7.1	Bestimmung des Gesamtphenolgehalts nach MEBAK.....	50
3.4.7.2	Bestimmung der Gesamtpolyphenole nach Folin-Ciocalteu.....	51
3.4.7.3	Bestimmung der Flavonoide	51
3.5	Instrumentelle Analytik.....	52
3.5.1	Allgemeine Arbeitsweise	52
3.5.2	HPLC-RI-UV/Vis	52
3.5.3	Chirale HPLC-RI-UV/Vis.....	54
3.5.4	HPAEC-PAD	55
3.5.5	GC-FID	56
3.5.6	GC-MS.....	57
3.5.7	IC.....	58
3.5.8	ICP-OES.....	59
3.5.8.1	Probenvorbereitung mittels Mikrowellenaufschluss.....	59
3.5.8.2	Bestimmung der Spurenelemente mit ICP-OES.....	60
3.5.9	UV/Vis-Spektroskopie	61
3.6	Datenauswertung.....	62
3.7	Multivariate statistische Auswertung der Analysenergebnisse.....	63
3.7.1	Clusteranalyse	63
3.7.2	Partial Least Squares-Regression.....	64
4	Ergebnisse und Diskussion	66
4.1	Zusammensetzung der Hefeextrakte und der alternativen Nährstoffquellen.....	66
4.2	Kultivierung und Lactatproduktion von <i>Sporolactobacillus putidus</i>	68
4.2.1	Optimierung der Startkonzentrationen von Glucose und Hefeextrakt.....	70
4.2.2	Variation der Nährstoffquellen	71

Inhaltsverzeichnis

4.3	Kultivierung und Lactatproduktion von <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	73
4.3.1	Optimierung der Startkonzentrationen von Glucose und Hefeextrakt.....	75
4.3.2	Variation der Nährstoffquellen	76
4.4	Multivariate statistische Betrachtung der Analysenergebnisse.....	79
4.4.1	Clusteranalyse	79
4.4.2	Partial Least Squares-Regression.....	81
4.5	Nährstoffanforderungen von <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	82
4.5.1	Einfluss von Hefeextrakt und daraus entstehende Limitierungen.....	83
4.5.1.1	Verwertbarkeit der Salze und Spurenelemente	83
4.5.1.2	Metabolisierung der Aminosäuren.....	84
4.5.1.3	Fed-Batch mit Zugabe der metabolisierten Aminosäuren	85
4.5.1.4	Abbau der Proteine und Peptide.....	89
4.5.2	Einflussfaktoren auf die Produktivität	91
4.5.3	Einfluss der Einzelkomponenten	94
4.5.3.1	Aminosäuren	95
4.5.3.2	Vitamine	96
4.5.3.3	Salze und Spurenelemente	97
4.5.3.4	Nukleobasen, Nukleoside und Nukleotide.....	98
4.5.4	Fazit.....	99
4.6	Einfluss der Hydrolyse der Nährstoffquelle auf die Lactatproduktion von <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	101
4.6.1	Einsatz chemischer Vollhydrolysate als Nährstoffquellen	101
4.6.2	Einsatz enzymatischer Hydrolysate am Beispiel von Rapsschrot.....	105
4.7	Optimierte D-Lactat Produktion von <i>Sporolactobacillus inulinus</i> mit alternativen Nährstoffquellen.....	109
4.7.1	Optimierte D-Lactat Produktion von <i>Sporolactobacillus inulinus</i> am Beispiel von Rapsschrot.....	109
4.7.2	Einfluss der Nährstoffquelle auf die optische Reinheit des D-Lactats	111

4.8	Abschätzung der Hydrolysekosten.....	112
5	Zusammenfassung und Ausblick	116
	Literaturverzeichnis.....	120
	Anhang	134