Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure

Zuwendungsempfänger:

Thünen-Institut

Institut für Agrartechnologie

Förderkennzeichen:

22037711

Laufzeit:

01.06.2012 bis **15.09.2015**

Datum der Veröffentlichung:

28.09.2016

Gefördert durch:

Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

I. Ziele 1

1. Aufgabenstellung 1

2. Stand der Technik 4

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 6

II. Ergebnisse 6

1. Erzielte Ergebnisse 6

AP 1. Stammscreening- Screening nach D-Milchsäure-Produzenten, Isolierung von Stämmen mit hoher D-Milchsäureproduktivität/-toleranz 6

AP 2. Bereitstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Rohstoffe 13

AP 3. Fermentation – Entwicklung eines biotechnischen Prozesses zur Herstellung von D-Milchsäure 16

AP 3. 1. Untersuchung der Rohstoffeignung 16

AP 3. 1. a) Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich der *Sporolactobacillus* Spezies 16

AP 3. 1. b) Alternative C-Quellen 18

AP 3. 1. c) Hefeextrakte und Suppline 21

AP 3. 2. Prozessoptimierung 23

AP 3. 2.a) Temperatur 23

AP 3. 2.b) Bestimmung der optimalen pH-Bedingungen 26

AP 3. 2.c) Variation des Inokulums 28

AP 3. 2.d) Medienbestandteile 30

AP 3. 2.e) Optimierung der Konzentrationen von Hefeextrakt und Glucose 37

AP 3. 2.f) Vergleich von Ammoniak und Calciumcarbonat als Neutralisationsmittel 38

AP 3. 3. Fermentationsstrategie 47

AP 4. Scale up 63

AP 5. Begleitende Analytik, Charakterisierung der Fermentationsbrühe 63

AP 6. Projektkoordination 64

Meilensteine 64

2. Verwertung 64

3. Erkenntnisse von Dritten 67

4. Veröffentlichungen 67

5. Literaturverzeichnis 68

I. Ziele

Milchsäure ist ein wichtiger chemischer Grundbaustein, der sowohl biotechnologisch über eine Fermentation von Kohlenhydraten (Zucker, Stärke) wie auch synthetisch auf der Basis petrochemischer Rohstoffe (Acetaldehyd) erfolgen kann. Genutzt wird die Milchsäure (2-hydroxypropionic acid) und ihre Derivate in der Lebensmittel-, Kosmetik,- Pharma- sowie Lederindustrie (Wang et al. 2011).
Aufgrund der zahlreichen Anwendungsgebiete besitzt die Milchsäure Produktion einen wachsenden globalen Markt von 100.000 t/a und eine jährlich erwartete Wachstumsrate von 15% (Mussatto et al. 2007). Die L-Form der Milchsäure hat in den letzten 20 Jahren als Ausgangsstoff für die Poly L-Milchsäure (poly L-lactic acid, PLLA) an Bedeutung gewonnen (Tashiro et al. 2011). Dieser Kunststoff stellt ein vielversprechendes Material dar, aber der Erweichungspunkt ist für eine Vielzahl an Anwendungsgebieten zu niedrig.
Der Stereokomplex hingegen aus PLLA und der poly D-Milchsäure (poly D-lactic acid, PDLA) ist von steigendem Interesse, da der Erweichungspunkt um ungefähr 50 °C höher liegt (Ikada et al. 1987; de Jong et al. 2001; Tsuji and Fukui 2003).
Im Vergleich zur L-Milchsäure gewinnt zurzeit die Forschung im Bereich der D-Milchsäure deutlich an Bedeutung, da ein hoch produktives biotechnisches Herstellungsverfahren bis dato nicht etabliert ist (Tashiro et al. 2011). Daher ist Ziel dieses Projektes ein hoch effizientes biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von D-Milchsäure zu etablieren. Dieses Verfahren soll auf kostengünstigen in Deutschland zur Verfügung stehenden Rohstoffen unter marktwirtschaftlichen und wettbewerblichen Aspekten durchgeführt werden. Dieses ist für den Standort Deutschland im höchsten Maße plausibel und attraktiv.

1. Aufgabenstellung

Das Interesse für ein hoch produktives biotechnisches Herstellungsverfahren für D-Milchsäure ist sehr groß und ein solches Verfahren ist bis dato nicht etabliert. Für die Etablierung ist ein kostengünstiges Verfahren zu entwickeln. Dieses soll durch einen stabilen, reproduzierbaren Prozess mit hoher Produktkonzentration bei kurzer Fermentationszeit erzielt werden. Zudem sind preiswerte Rohstoffe hinsichtlich ihrer Eignung zu untersuchen Das Projekt „Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure“ umfasst daher folgende wissenschaftlich-technische Ziele:

- Screening und Selektion nach Mikroorganismen, welche in der Lage sind D-Milchsäure mit einer hohen Raum-Zeit-Ausbeute und Enantiomerenreinheit zu produzieren (AP 1).
- Erschließung kostengünstiger in Deutschland verfügbarer Suppline und Kohlenstoffquellen für diese Biokonversion sowie deren Analyse (AP 2).
- Prozessoptimierung bezüglich Medienzusammensetzung (C-Quelle, Salze, Suppline, Neutralisationsmittel, Stickstoffquellen) und physikalischen Parametern (pH, T, pO_2) um das Verständnis der Biokonversion zu D-Milchsäure zu erhöhen (AP 3).
- Entwicklung geeigneter Fermentationsstrategien wie Batch, Fed-batch, kontinuierliche Verfahren, gegebenenfalls unter Nutzung von Immobilisaten, um den Prozess sinnvoll und effizient durchzuführen (AP 3).
- Weiterhin soll nach erfolgreicher Prozessoptimierung und Entwicklung einer geeigneten Fermentationsstrategie der Maßstab der biotechnologischen D-Milchsäureherstellung vergrößert werden (Abbildung 1).

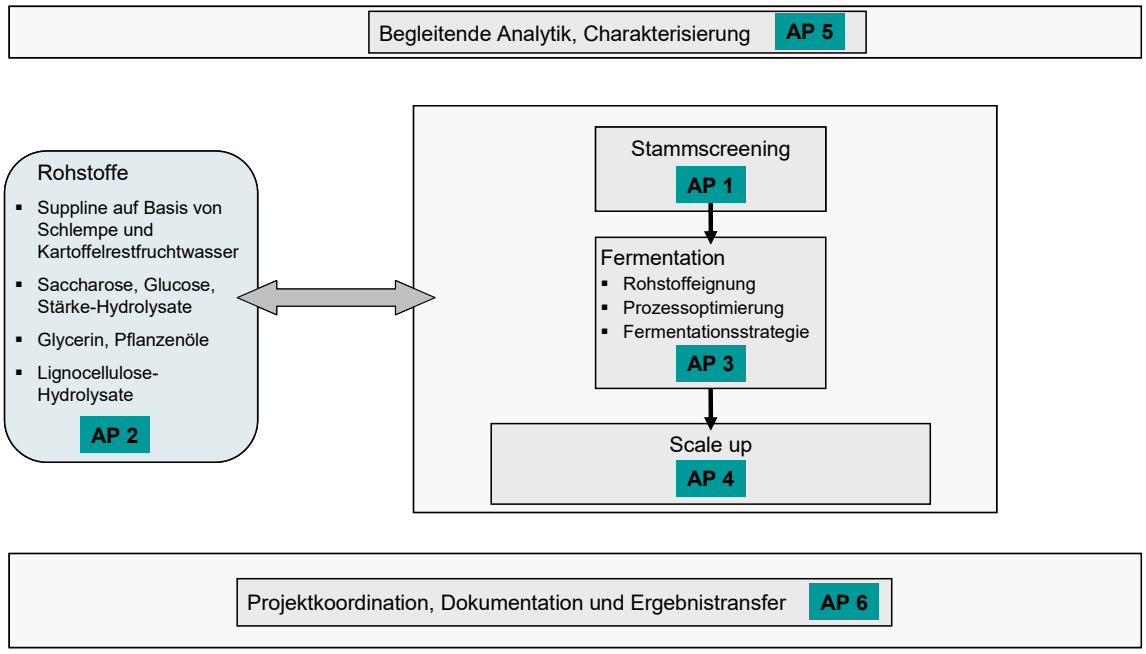


Abbildung 1: Fließschema des Projektes "Biotechnisch erzeugte D-Milchsäure“ inkl. der Arbeitspakete (AP)

Voraussetzung unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Institut für Agrartechnologie bearbeitet seit vielen Jahren Forschungsschwerpunkte komplexer bioverfahrenstechnischer Aufgaben und deren effiziente Umsetzung im Herstellungsprozess. Wissenschaftliche Kompetenzen und praktische Erfahrungen liegen auf

zahlreichen Gebieten vor, u.a. im Screening nach Mikroorganismen, Fermentation und Immobilisierung.

Die am Thünen-Institut für Agrartechnologie durchgeführten mikrobiellen Vorarbeiten bezüglich des hier beantragten Projektes wurden mit *Sporolactobacillus* sp. durchgeführt. Es wurde in einer ersten Untersuchung mikroaerob in Schüttelkolben mit freien Zellen innerhalb von 6 Tagen (144 h) 101 g/L D-Milchsäure mit einer Ausbeute von 0,89 g/g (Ausbeute bezieht sich im gesamten Dokument auf die verbrauchte Glucosemenge), Produktivität von 0,7 g/(L·h) und einem Enantiomerenüberschuss von >99 %ee hergestellt. Hierbei wurde zunächst ein kostenintensives Komplexmedium mit Hefeextrakt und Pepton verwendet. In Anbetracht dessen, dass dieses Ergebnis ohne Optimierung der Kolbengröße, Füllvolumen, Medienzusammensetzung, pH Wert u.a. durchgeführt wurde, ist anzunehmen, dass nach einer Prozessoptimierung die Fermentationszeit verkürzt und die Endkonzentration einschließlich der Ausbeute weiter gesteigert werden kann.

Planung und Ablauf des Vorhabens

In dem Balkendiagramm (Tabelle 1) ist der geplante zeitliche Projektablauf mit den vorgesehenen Meilensteinen dargestellt. Die Arbeitspakete wurden entsprechend dem Balkendiagramm bearbeitet. Besondere Schwerpunkte während der Laufzeit dieses Vorhabens wurden auf die Untersuchung der Rohstoffeignung und auf die Prozessoptimierung gelegt.

Tabelle 1: Gesamtplan über die auszuführenden Arbeiten und deren zeitlicher Ablauf

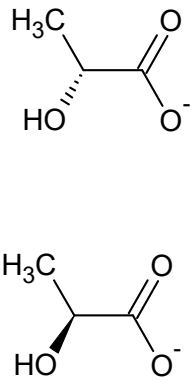
Arbeitspakete	**1. Jahr**				**2. Jahr**				**3. Jahr**			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
AP 1 Stammscreening - Screening nach D-Lactat-Produzenten, Isolierung von Stämmen mit hoher D-Lactatproduktivität/-toleranz				M1								
AP 2 Bereitstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Rohstoffe												
AP 3 Fermentation - Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von D-Lactat												
AP 3.1 Untersuchung der Rohstoffeignung												
AP 3.2 Prozessoptimierung								M2				
AP 3.3 Fermentationsstrategie										M3		
AP 4 Scale up												
AP 5 Begleitende Analytik, Charakterisierung der Fermentationsbrühe												
AP 6 Projektkoordination												

2. Stand der Technik

Bei der Milchsäure handelt sich um eine farblose, fast geruchlose, ölige Flüssigkeit (Eigenschaften siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Physikalische Eigenschaften der Milchsäure

Molekulargewicht	90,08 g/mol
Schmelzpunkt	17 °C (Racemat)
	53 °C (Enantiomere)
Siedepunkt	122 °C (20 hPa) (Racemat)
Dichte	1,21 g·cm^{-3} (Racemat)
Wasserlöslichkeit	vollständig mischbar mit Wasser
	löslich in Ethanol



Bei der fermentativen Milchsäureherstellung entstehen für die D,L Milchsäure folgende mögliche Produktfelder: Acrylsäure, 2,3-Pentadion, Lactid, Propylenglycol, Milchsäureamid. Die Polymerisation des Lactids resultiert in dem poly-Lactid (PLA) mit der in Abbildung 2 dargestellten Struktur des PLLA bzw. PDLA`s. Dieser Kunststoff stellt ein vielversprechendes biologisch abbaubares Material da, aber der Schmelzpunkt ist mit 175 °C für die Anwendungsgebiete zu niedrig (Tashiro et al. 2011).

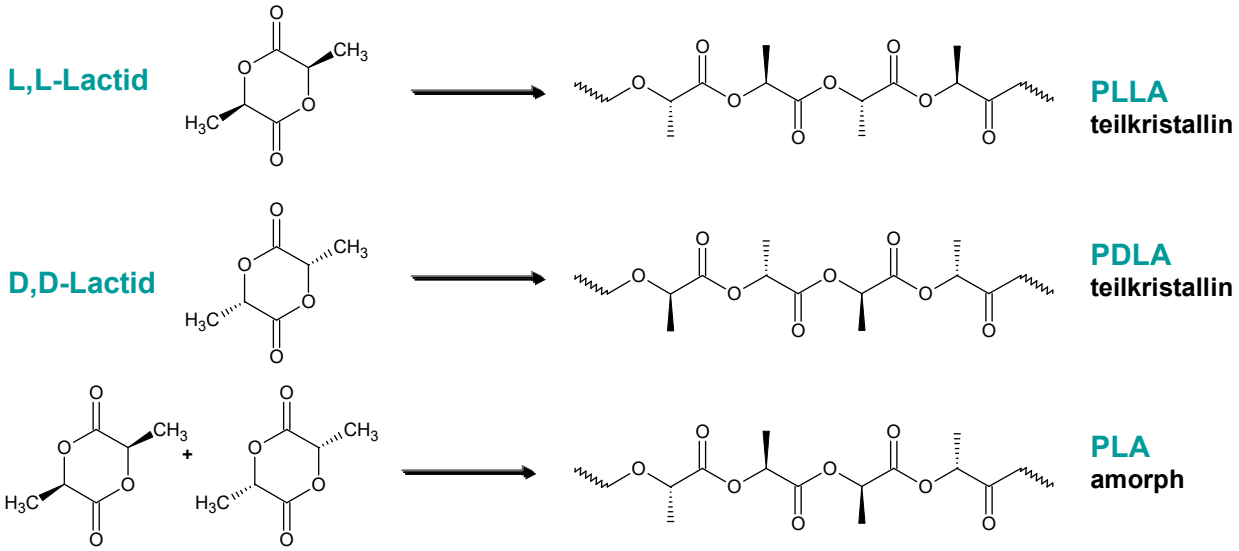


Abbildung 2: PLA Mikrostrukturen (Okihara et al. 1991)

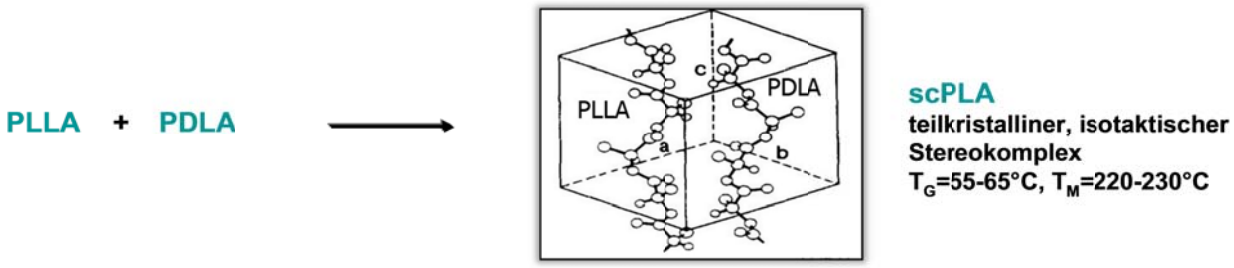


Abbildung 3: Stereokomplex gebildet aus PLLA und PDLA (Okihara et al. 1991)

Kombiniert man hingegen die PLLA und PDLA so erhält man einen teilkristallinen, isotaktischen Stereokomplex (Abbildung 3). Der Schmelzpunkt dieses Stereokomplexes ist um 50 °C höher als der der reinen Kunststoffe PLLA und PDLA (Ikada et al. 1987). Aufgrund der verbesserten Eigenschaften des Stereokomplexes ergibt sich die Notwendigkeit einer stabilen und zugleich hochproduktiven fermentativen Herstellung der D-Milchsäure. Trotz des steigenden Interesses an der Produktion der D-Milchsäure sind Informationen hierüber gering. Insbesondere die Anzahl der Veröffentlichungen bezüglich der D-Milchsäure produzierenden Bakterien ist wesentlich geringer als die der L-Milchsäure produzierenden Bakterien (Tashiro et al. 2011).

Die optische Reinheit der D-Milchsäure ist entscheidend für die physikalischen Eigenschaften von PDLA. Daher sind Mikroorganismen von großem Interesse, welche ausschließlich die D-Milchsäure produzieren. Aktuell sind einige wenige Wildtyp-Mikroorganismen wie *Sporolactobacillus inulinus* (Daicel 1995), *Sporolactobacillus sp.* strain CASD (Wang et al. 2011), *Lactobacillus delbrueckii* (Fukushima et al. 2004) und *Lactobacillus coryniformis subsp. torquens* (Yáñez et al. 2003) sowie Mutanten von *Lactobacillus lactis* (Joshi et al. 2010) als D-Milchsäure produzierende Bakterien identifiziert, die wenig bzw. keine L-Milchsäure herstellen. Weiterhin haben einige Arbeitsgruppen erfolgreich die D-Milchsäure mit Hilfe von gentechnisch veränderten Stämmen hergestellt: *Lactobacillus plantarum* (Okano et al. 2009a, b, c), *Escherichia coli* (Chang et al 1999;. Shukla et al 2004; Zhou et al 2003), *Corynebacterium glutamicum* (Okino et al. 2008), *Enterobacter asburiae* (Bi et al. 2009) und *Saccharomyces cerevisiae* (Ishida et al. 2006).

ThyssenKrupp Uhde baute zum Zeitpunkt der Antragstellung eine Pilotanlage zur Herstellung von L-Milchsäure aus Glucose oder Saccharose in Leuna, Deutschland. Mehr als 1.000 Tonnen Biochemikalien wie zum Beispiel Milchsäure oder Bernsteinsäure können pro Jahr produziert werden. Die erste Inbetriebnahme erfolgte im Februar 2013, das erste Produkt war Bernsteinsäure im März 2013 (Transkript). PURAC (Niederlande) ist weltweit führend in

der Produktion von Milchsäure. PURAC untersucht mit der Technologie von Myriant die Herstellung von D-Milchsäure in einer Pilotanlage in Barcelona, Spanien.
Die Aktivitäten der verschiedenen Firmen bezüglich der Herstellung des Stereokomplexes aus PLLA und PDLA zeigen, dass ein großes Interesse an diesem Biokunststoff besteht. Die aus der Literatur und Patentliteratur bekannten generellen Probleme bei der fermentativen D-Milchsäure Herstellung, wie geringe Produktivität und Einsatz teurer Suppline wie z.B. Erdnuss Mehl, Pepton, Hefeextrakt und Trypton, sind nicht gelöst. Das Problem der geringen Produktivität könnte durch den Einsatz von Immobilisaten gelöst werden, was in dem beantragten Projekt vorgesehen ist. Die Kostenreduzierung ist zwingend erforderlich um diesen Biokunststoff nicht nur für Spezialanwendungen nutzen zu können, sondern auch als Ersatz zu PET weiter zu entwickeln. Mit diesem beantragten Projekt soll ein Beitrag zur kostengünstigen Herstellung von D-Milchsäure geleistet werden, um den Biokunststoff für ein breiteres Anwendungsspektrum einsetzen zu können.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde im Institut für Agrartechnologie durchgeführt. Diverse Rohstoffe wurden von der Südzucker AG bereitgestellt und vom Thünen-Institut auf ihre Eignung getestet. Durch die Einbindung der Südzucker AG wurde sichergestellt, dass die Forschungsarbeiten sehr anwendungsorientiert durchgeführt wurden.

II. Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

AP 1. Stammscreening- Screening nach D-Milchsäure-Produzenten, Isolierung von Stämmen mit hoher D-Milchsäureproduktivität/-toleranz

Nach einer ausgiebigen Literaturrecherche wurden zwei hochproduktive Stämme erhalten, die D-Milchsäure mit einer hohen optischen Reinheit produzieren können. Dabei bot der *Sporolactobacillus* sp.1 neben seiner hohen Produktivität bei kurzer *lag*-Phase eine sehr hohe Substrat- und Produkttoleranz.
Sporolactobacillus sp.2 zeichnet sich hingegen durch einen sehr niedrigen pH-Wachstumsbereich aus (pH-Bereich: 4,0 – 6,5 im Vergleich zu *Sporolactobacillus* sp.1 pH-

Bereich: 5,0- 8,0). Jedoch besitzt dieser Stamm eine geringere Substrattoleranz und Produktivität.
Beide Stämme sind als R1 Organismen klassifiziert und bevorzugen eine mikroaerophile Atmosphäre zum Wachstum.

Allgemeine Charakterisierung der *Sporolactobacillus* Spezies zur Eignung für die biotechnische Herstellung von D-Milchsäure

Die Charakterisierung der beiden *Sporolactobacillus* Stämme sollte aufzeigen, ob die Stämme potentiell für eine biotechnische Anwendung zur D-Milchsäure-Produktion geeignet sind. Diesbezüglich sollte zum einen die Effizienz der Konversion von eingesetzter Glucose zu D-Milchsäure ermittelt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die D-Milchsäure-Produktion im kausalen Zusammenhang mit dem Populationswachstum der Bakterien steht. Ferner ist die optische Reinheit des D-Milchsäures bezüglich beider Stämme mittels chiraler HPLC bestimmt worden. Zur Untersuchung der Konversionseffizienz von Glucose zu D-Milchsäure wurden für beide Stämme Experimente im GYP-Medium (Glucose-Yeast-Peptone, DZMZ-Medium 852, ohne schütteln, siehe Tabelle 3),durchgeführt. Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der D-Milchsäure-Produktion und der Zunahme der bakteriellen Populationsdichte ist neben der Milchsäure-Konzentration (bei 150 g/L Glucose) zusätzlich die optische Dichte bei 605 nm (OD_{605}) zu den jeweiligen Probenahmepunkten gemessen worden.

Tabelle 3: Zusammensetzung des GYP-Mediums

GYP-Medium	g/L
Glucose	x
Hefeextrakt	10
Pepton	10
MgSO4 x 7H2O	0,2
FeSO4 x 7H2O	0,01
MnSO4 x 7H2O	0,01
NaCl	0,01
NaOAc	2
CaCO3	60
pH-Wert	5,0 und 6,2

x beschreibt die variable Glucosekonzentration.

Allgemeine Charakterisierung des *Sporolactobacillus* sp. 1

Die Resultate der Untersuchung zur D-Milchsäure-Produktion sind für den *Sporolactobacillus* sp. 1 anhand der Milchsäure-Konzentration [g/L] und der optischen Dichte [OD_{605}] über die Prozessdauer von 19 Tagen dargestellt (Abbildung 4).

Mit der Zunahme der Produktkonzentration nehmen ebenfalls die Werte der optischen Dichte zu, wobei die Steigung beider Kurven ab 7 d Kultivierungsdauer signifikant abflacht. Auf Grund dieser Resultate kann geschlussfolgert werden, dass die Produktkonversion für den *Sporolactobacillus* sp. 1 wachstumsgekoppelt ist. Zudem ist in der Abbildung 5 eine Korrelation hinsichtlich der optischen Dichte (OD_{605}) und der Biotrockenmasse (BTM) in g/L hergestellt worden.

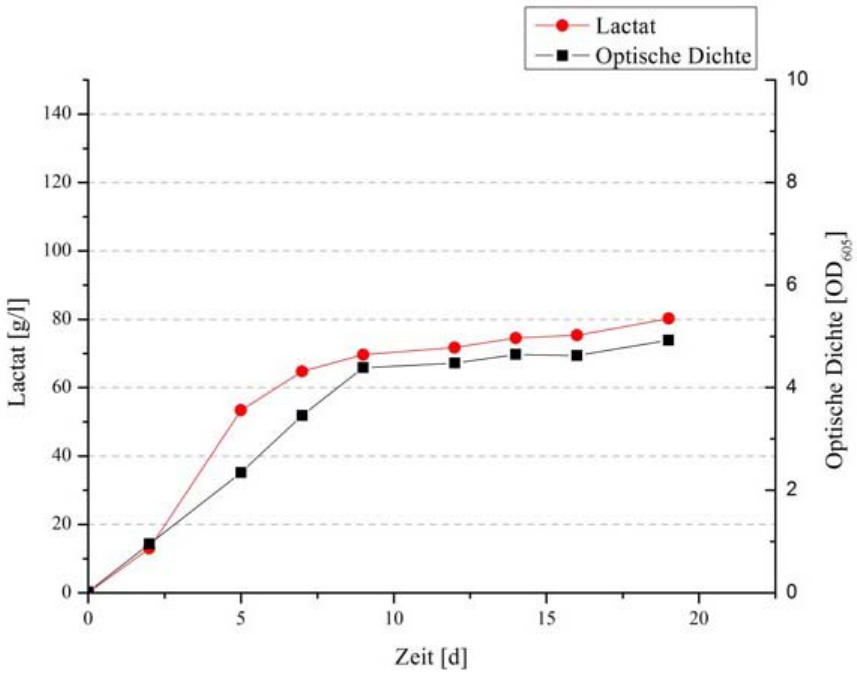


Abbildung 4: Milchsäure Produktion und optische Dichte des *Sporolactobacillus* sp.1., 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mLArbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

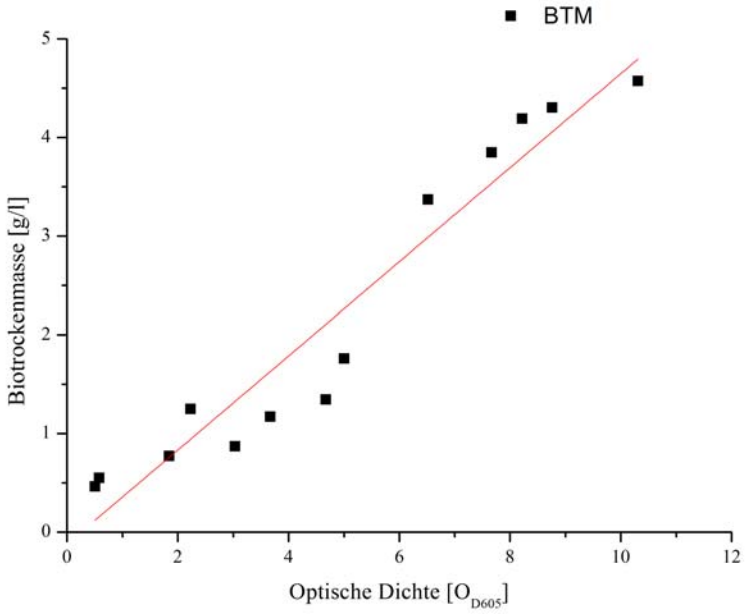


Abbildung 5: Korrelation von Biotrockenmasse und der optischen Dichte für den *Sporolactobacillus* sp.1

Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression weist dabei einen Wert von 0,924 auf. Die Variation von ca. 7 % kann damit erklärt werden, dass zur Bestimmung der Biotrockenmasse, das restliche $CaCO_3$ bzw. das präzipitierte Calciumlactat hydrolysiert werden musste, um die Biomasse durch Zentrifugation von dem Medium abtrennen zu können. Die Hydrolyse der Feststoffe kann unter anderem ebenfalls zu einer Zelllyse geführt haben, welche den Fehler erklärt.

Allgemeine Charakterisierung des *Sporolactobacillus* sp. 2

Die Abbildung 6 präsentiert den Zusammenhang der Produktzunahme [g/L] und der Populationswachstums anhand der optischen Dichte [OD_{605}]. Die Werte der Milchsäure-Konzentration und der OD steigen bis zum Tag 9 der Kultivierung gemeinsam an, während die OD-Kurve darüber hinaus bei einer OD von 4,0 stagniert. Die Stagnation der OD-Kurve kann mit der Tatsache erklärt werden, dass der *Sporolactobacillus* sp. 2 mit steigender Biomasse zur Zell-Aggregation neigt. Da dieser Versuch ohne Agitation durchgeführt worden ist, konnten sich Aggregate aus Biomasse und $CaCO_3$ bilden, wodurch die tatsächliche Biomasse höher gewesen ist als durch die OD-Messung bestimmt werden konnte. In diesem Kontext ist auch keine Korrelation der OD mit der BTM möglich gewesen.

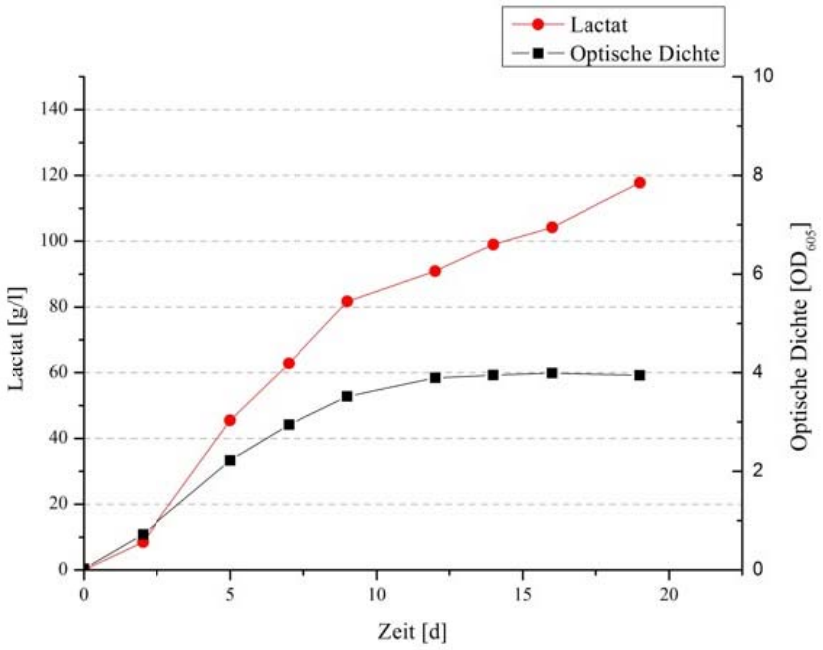


Abbildung 6: Milchsäure Produktion und optische Dichte des *Sporolactobacillus* sp.2., 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Eine Visualisierung der Zell-Aggregation findet sich als Beispiel eines Reaktorexperiments in der Abbildung 7. Die Produktbildung und die Zunahme der Biomasse sind direkt proportional zueinander. Als Konsequenz der ungeeigneten OD-Bestimmung für die Zunahme der Biomasse, wurde für weiterführende Experimente, die Produktbildung ebenfalls als Marker für das Wachstum der Zellpopulation gesetzt. In der Abbildung 8 ist ein zudem repräsentatives HPLC-Chromatogramm bzgl. beider Spezies nach 10 Tagen Kultivierungsdauer) dargestellt.

Abbildung 7: Zell-Aggregation des *Sporolactobacillus* sp.2., 250 mL Reaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38°C, 250 Upm.

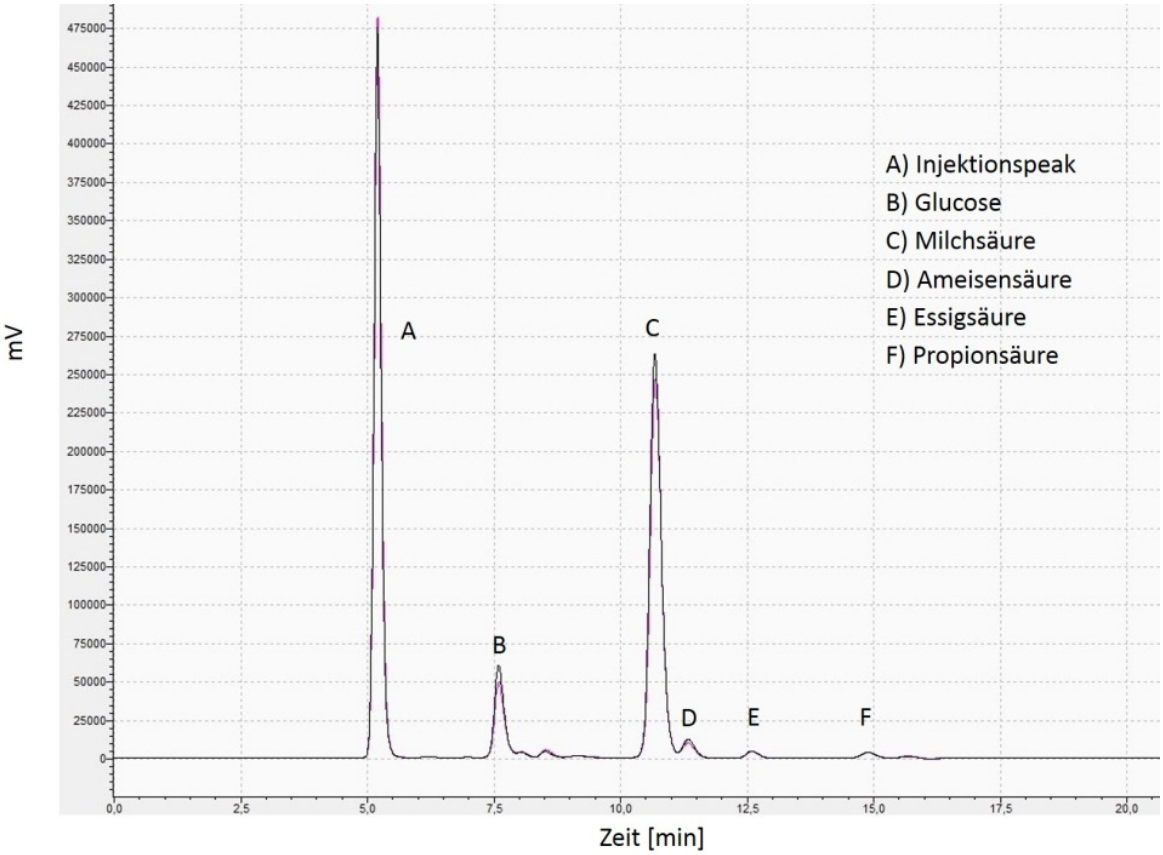


Abbildung 8: HPLC-Chromatogramm der *Sporolactobacillus* Spezies nach 10 Tagen Kultivierungsdauer, HPX-87 H-Säule, 60 °C, 0,6 mL/min Flussrate, Laufmittel 5 m m H_2SO_4.

Aus dem HPLC-Chromatogramm ist zu entnehmen, dass die Bakterien stoffwechselspezifisch ein sehr geringes Nebenproduktspektrum aufweisen. Neben dem Substrat Peak (B) und dem Produkt Milchsäure (C) werden zum einen die Ameisensäure (D), die Essigsäure (E) und die Propionsäure (F) nachgewiesen. Im Verhältnis zu der Konzentration der Milchsäure sind die Nebenprodukte deutlich geringer. Zudem tritt der Peak der Ameisensäure nur intermediär auf und kann nicht bei jedem Probenahmepunkt verifiziert werden. Demzufolge ist es möglich, dass die Ameisensäure von den Bakterien weiter metabolisiert wird. Des Weiteren ist die optische Reinheit der Milchsäure nach Beendigung der Kultivierung mittels HPLC und einer chiralen Trennsäule bestimmt worden (Abbildung 9). Beide *Sporolactobacillus* Spezies bilden ausschließlich D-Milchsäure, da kein quantifizierbares Signal für das L-Milchsäure in den Kultivierungsproben gemessen werden konnte. Für die optische Reinheit der D-Milchsäure der hier verwendeten Biokatalysatoren kann ein Wert von >99 % angenommen werden.

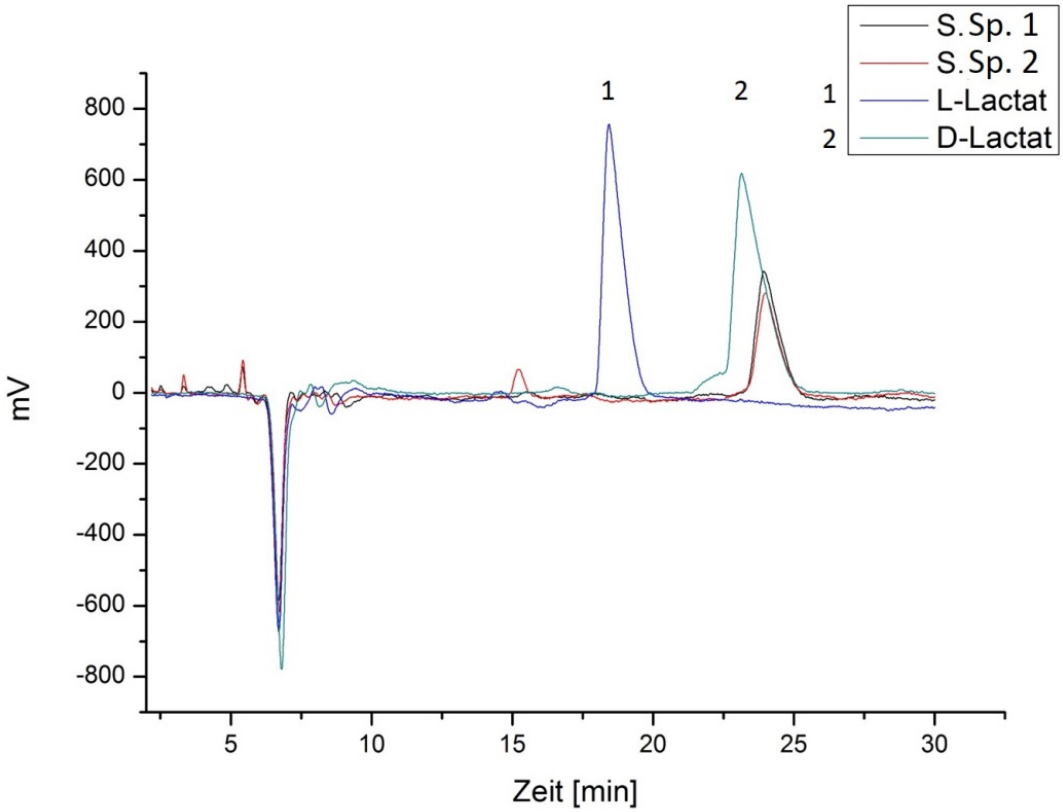


Abbildung 9: Bestimmung der optischen Reinheit der Milchsäures (*Sporolactobacillus* sp.1 und *Sporolactobacillus* sp.2) mittels HPLC. Säule: N,S-dioctyl-(D)-Penicillamine, Laufmittel: 2 mM$CuSO_4$x 5 H_2O, Diluent: $CuSO_4$ x 5 H_2O/ Isoprop. (95:5), Flussrate: 1mL/ min, UV Detektor bei 250 nm bei Raumtemperatur.

Anhand der hier dargestellten Experimente, kann die Eignung der beiden Spezies für die biotechnische Herstellung von D-Milchsäure nachgewiesen werden. Sowohl der Konzentrationsbereich, in dem die Bakterien wirken können, als auch die optische Reinheit des Produkts machen dies deutlich. In weiterführenden Experimenten soll die Prozesszeit minimiert werden. Die lange Kultivierungsdauer von 19 d (Abbildung 4 und Abbildung 6) führt zu einer zunehmenden Braunfärbung des Mediums über die Prozessdauer. Diese Färbung kann mit der Maillard-Reaktion erklärt werden, wobei unter anderem Zucker und Aminosäuren miteinander zu komplexeren Verbindungen reagieren (Maillard 1912). Diese komplexeren Produkte können wiederum das Wachstum von Bakterien negativ beeinflussen (Helou et al., 2014).

Aufgrund der guten Ergebnisse mit diesen beiden *Sporolactobacillus* sp. wurde der Fokus des Stammscreenings aus Umweltisolaten auf die Verwertung von Galacturonsäure als Substrat zur D-Milchsäureproduktion gelegt. Galacturonsäure ist in pektinhaltigen Pflanzenresten

vorhanden und fällt somit in großen Mengen als günstig verfügbarer Rohstoff an. Da es bisher keine biotechnologischen Prozesse gibt, in denen Galacturonsäure als Substrat genutzt wird, wurde im Folgenden nach Mikroorganismen gescreent, die in der Lage sind daraus Lactat zu produzieren.
Hierzu wurden 35 Proben von verschiedenen Böden, Pflanzen sowie Obst- und Gemüsesorten untersucht. Die Proben wurden zunächst in Flüssigmedium kultiviert, auf Agar-Platten vereinzelt und anschließend in 96-Well-Plate-Ansätzen mit Galacturonsäure als Kohlenstoffquelle fermentiert. Die HPLC-Analyse der Fermentationsproben zeigte den Abbau an Galacturonsäure, allerdings wurde dabei bisher von keinem der Stämme Milchsäure gebildet. Bei einigen Isolaten der Proben von z.B. Kastanien, Buchenerde und Eichenerde konnte jedoch die Konversion von Galacturonsäure zu Acetat und Butyrat beobachtet werden. Der Versuch in einem Stammscreening weitere Milchsäure produzierende Stämme zu isolieren, die Galacturonsäure als Substrat nutzen können, war nicht erfolgreich. Es wurden lediglich Stämme gefunden, die in der Lage sind Acetat aus Galacturonsäure zu bilden.

AP 2. Bereitstellung, Aufreinigung und Charakterisierung der Rohstoffe

Hefeextrakt stellt derzeit einen der größten Kostenfaktoren vieler Fermentationen dar. Um diesen durch kostengünstige Rohstoffe ersetzen zu können, müssen jedoch zunächst die Nährstoffanforderungen der beiden Stämme aufgeklärt werden. Das Ziel dieses Arbeitspaketes ist es, die verwendeten Nährstoffquellen detailliert zu analysieren, um mithilfe einer statistischen Auswertung Zusammenhänge zwischen Produktivität, Endkonzentration und Zusammensetzung der Nährstoffquelle zu entdecken.
Hierzu wurden 24 Hefeextrakte verschiedener Hersteller mit unterschiedlichen Eigenschaften und Anreicherungen, 14 kommerziell erhältliche Extrakte wie Pepton und Trypton und 23 pflanzliche und tierische Rohstoffe eingesetzt. Innerhalb des Projektes werden die Rohstoffe auf verschiedene Arten aufgeschlossen:

- Saure Hydrolyse: Die Rohstoffe wurden durch saure Hydrolyse vorbehandelt, um die polymeren Zellbestandteile wie Proteine in leichter bioverfügbare Komponenten zu spalten. Dazu wurde der Feststoff gemahlen, 150 g in 500 mL Wasser suspendiert und mit 3M Schwefelsäure (H_2SO_4) auf pH 1 angesäuert. Es wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit Calciumhydroxid neutralisiert, filtriert und gefriergetrocknet. Die auf diese Weise vorbehandelten Rohstoffe werden im Folgenden als Hydrolysate bezeichnet.

- Chemische Totalhydrolyse: Bei der Totalhydrolyse wurde der Rohstoff mit 3M H_2SO_4 versetzt und bei 110 °C für 24 h aufgeschlossen. Die auf diese Weise vorbehandelten Rohstoffe werden im Folgenden als Vollhydrolysate bezeichnet.
- Enzymatische Hydroysate: Für die enzymatische Hydrolyse wurde der Rohstoff in Wasser suspendiert und 1 % Enzym bezogen auf den Proteingehalt des Rohstoffs zugegeben. Die Inkubation erfolgte beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms bei 100 rpm für 48 h.

Die Hydrolysate, die vorhandenen Hefeextrakte, sowie Peptone und Tryptone (insgesamt 61 verschiedene Nährstoffquellen) wurden vollständig mit den in Tabelle 4 dargestellten Methoden auf ihre Bestandteile analysiert.

Die Analysendaten wurden mithilfe einer Clusteranalyse ausgewertet, die es ermöglicht, unabhängig von den hier verwendeten Stämmen die Nährstoffquellen aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung in Cluster zu gliedern. Diese hat den Zweck, die Daten und die zu testenden Nährstoffquellen, auch für andere Prozesse, zu reduzieren und dabei Ähnlichkeiten der Zusammensetzung als mögliche Einflussfaktoren sichtbar zu machen.

Um die Einflussfaktoren und Ähnlichkeiten deutlicher betrachten zu können, beschränkt sich die hier dargestellte Clusteranalyse (Abbildung 10 und Tabelle 5) auf die Hefeextrakte, einige Peptone, Tryptone, sowie Fleischextrakt. Zudem verdeutlichen die Differenzen zwischen *Sporolactobacillus* sp.1 und *Sporolactobacillus* sp.2 die unterschiedlichen Nährstoffanforderungen dieser beiden Stämme.

Tabelle 4: Übersicht über die Substanzklassen und Analysenmethoden

Substanzklasse	Analysemethode
Gesamtstickstoffgehalt	Nach Kjedahl
Aminostickstoffgehalt	UV-Vis-Spektroskopie mit Ninhydrin
Lösliche Kationen und Anionen	Ionenchromatographie
Aminosäuren und Peptide/Proteine	GC nach Derivatisierung (nach Aufschluss)
Kohlenhydrate, frei und total	HPAEC-PAD (nach Aufschluss)
Abbauprodukte bzw. Hemmstoffe	HPLC (nach Aufschluss)
Polyphenole - Flavonoide	UV-Vis Spektroskopie
Fettsäuren	GC nach Derivatisierung
Mineralien und Spurenelemente	ICP-OES nach Mikrowellenaufschluss
Vitamine	Mikrobiologische Testkits

Tabelle 5: Übereinstimmungen (rot) des Clustering der Nährstoffquellen mit den maximalen Produktivitäten von *Sporolactobacillus* sp.1 und *Sporolactobacillus* sp.2

Nährstoffquelle	P_{max} (*Sporolactobacillus* sp.1) [g/(L·h)]	P_{max} (*Sporolactobacillus* sp.2) [g/(L·h)]
Merck Fermtech	2,86	1,60
Weizenpepton	1,15	1,00
Trypton (Fluka)	0,73	0,87
Trypton (Roth)	0,51	0,62
Pepton (Fluka)	0,84	0,52
Pflanzenpepton	1,16	0,87
FNI 800	2,44	1,73
Fleischpepton	1,81	2,08
Sojapepton	2,76	1,42
HySoy	0,37	1,68
FNI 410	0,70	0,55
KAT GMP	2,70	1,81
CMT MP	2,58	1,63
CPT MP	2,77	1,71
PTK	2,63	1,83
Organotechnie	2,05	1,87
HiMedia	2,05	2,18
PTU	2,69	1,18
Fleischextrakt	1,70	1,62
Leiber H	1,59	1,84
FNI 200	1,56	1,78
CTT-R	1,83	1,14
FNI 103 ag	1,41	1,52
FNI 710	2,33	0,96
FNI 105 ag	2,66	1,20
FNI 100	2,17	1,37
FNI 210	2,41	1,15
Merck granuliert	2,12	1,70
Leiber E	2,32	2,01
Leiber S	2,29	0,00
CPT	2,43	0,00
CMRT	2,58	2,22
KAT	2,35	0,00

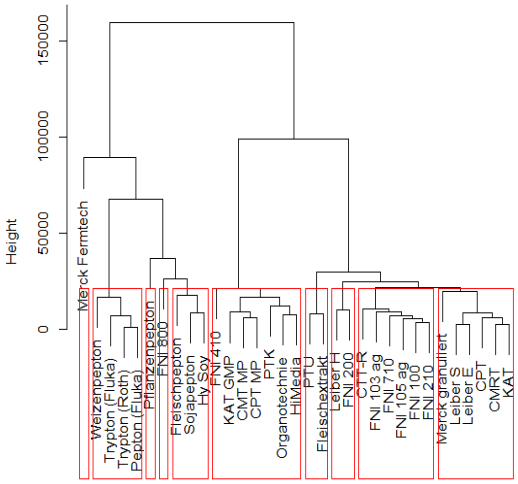


Abbildung 10: Cluster-Dendrogramm der Hefeextrakte, Peptone, Tryptone und Fleischextrakt mit der ward.D2-Methode

Die Analysendaten zeigen, dass Merck Fermtech® Hefeextrakt aufgrund seines hohen Phosphat-, Natrium- und Chloridgehalts gesondert von den anderen Nährstoffquellen auftritt. Während die Tryptone, Pepton (Fluka) sowie Weizenpepton einen sehr geringen Kaliumgehalt, einen geringen Gehalt an freien Aminosäuren aufweisen und geringe Produktivitäten lieferten, zeichnen sich KAT GMP, CMT MP, CPT MP, PTK, FNI 410, Qrganotechnie und HiMedia Hefeextrakt durch ihren hohen Kaliumgehalt aus und erbrachten mit *Sporolactobacillus* sp.1 größtenteils gute Ergebnisse. Weitere Übereinstimmungen des Clustering mit den Kultivierungsergebnissen sind zu erkennen, die Clusteranalyse liefert jedoch keine genauen Informationen über die betrachteten Ähnlichkeiten der Zusammensetzung, sondern ermöglicht nur durch Vergleich mit den Analysendaten

Einflussfaktoren leichter sichtbar zu machen. Auf diese Weise gelang es einige mögliche Faktoren hervorzuheben, deren Einfluss auf die Produktivität in AP.3 näher untersucht wird.

AP 3. Fermentation – Entwicklung eines biotechnischen Prozesses zur Herstellung von D-Milchsäure

AP 3. 1. Untersuchung der Rohstoffeignung

AP 3. 1. a) Untersuchung zur Nutzbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen bezüglich der *Sporolactobacillus* Spezies

Das Ziel dieser Untersuchungen war es festzustellen, welche Kohlenstoffquellen von den Bakterien genutzt werden können, um alternative Ressourcen auf der Basis agrarischer Reststoffe entsprechend der Nutzbarkeit der enthaltenden Zucker auswählen zu können.
Zur Bestimmung der Nutzbarkeit der Kohlenstoffquellen wurden die beiden *Sporolactobacillus* Stämme im 96-Well-Maßstab in einem Mikrotiterplattenleser mit den entsprechenden C-Quellen (jeweils 20 g/L) für 72 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle dienten hierbei Ansätze mit D-Glucose als Kohlenstoffquelle und als Negativkontrolle wurden Ansätze ohne Kohlenstoffquelle gemacht. Diejenigen Experimente, welche eine äquivalente D-Milchsäure-Produktion in Referenz mit der Positivkontrolle zeigten, wurden mit ++ bewertet. Ergebnisse die eine geringere D-Milchsäure-Produktion aufwiesen wurden mit + gekennzeichnet. Die Experimente, welche in den Ergebnissen der Negativkontrolle entsprachen, wurden mit – markiert. Die Resultate der Experimente ist in der Tabelle 6 dargestellt.
Anhand der Tabelle 6 wird deutlich, dass der *Sporolactobacillus* sp. 1 kein Glycerin und keine Pentosen, wie Arabinose, Xylose und Ribose für die Produktion von D-Milchsäure nutzen kann. Ferner kann D-Milchsäure aus Monosacchariden, wie den Hexosen, Glucose, Fructose und Mannose, aber nicht aus Galactose, Rhamnose, Sorbose, Glucosamin und Galacturonsäure gewonnen werden. Darüber hinaus können die Bakterien auch Disaccharide, wie Saccharose, Isomaltulose, Trehalulose und Maltose, aber nicht Lactose zu D-Milchsäure metabolisieren. Interessanterweise kann auch das Trisaccharid Raffinose genutzt werden, aber nicht das Polysaccharid Pullulan.

Tabelle 6: Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen durch *Sporolactobacillus* Sp. 1 und 2.

Spezifikation/ Anzahl der Kohlenstoffatome	Kohlenstoffquelle	*Sporolactobacillus* Sp. 1	*Sporolactobacillus* Sp. 2
Triol/ C-3	Glycerin	-	-
Aldose/ C-5	L-Arabinose	-	-
Aldose/ C-5	D-Arabinose	-	-
Aldose/ C-5	D-Xylose	-	-
Aldose/ C-5	D-Ribose	-	-
Aldose/ C-6	D-Glucose	++	++
Ketose/ C-6	D-Fructose	++	++
Aldose/ C-6	D-Galactose	-	++
Uronsäure/ C-6	D-Galacturonsäure	-	-
Aldose/ C-6	D-Mannose	++	++
Aldose/ C-6	L-Rhamnose	-	-
Ketose/ C-6	L-Sorbose	-	-
Aldose/ C-6	D-Glucosamin	-	-
Disaccharid/ C-12	Lactose	-	-
Disaccharid/ C-12	Saccharose	++	++
Disaccharid/ C-12	Isomaltulose	++	-
Disaccharid/ C-12	Trehalulose	++	-
Disaccharid/ C-12	Maltose	++	++
Trisaccharid/ C-18	D-Raffinose	+	-
Polysaccharid/ M_w= 10000	Pullulan	-	-

Hinsichtlich des *Sporolactobacillus* sp. 2 kann der Tabelle 6 entnommen werden, dass Glycerin und Pentosen, analog zum *Sporolactobacillus* sp. 1, nicht von den Bakterien als C-Quelle genutzt werden können. Des Weiteren können die Bakterien aus den Hexosen Glucose, Fructose, Galactose und Mannose D-Milchsäure produzieren, nicht aber aus Rhamnose, Sorbose, Glucosamin und Galacturonsäure. Ebenfalls genutzt werden können die Disaccharide Saccharose und Maltose. Isomaltulose, Trehalulose und Lactose können wiederrum nicht metabolisiert werden. Ferner zeigen die Bakterien bei dem längerkettigen Zucker, wie Raffinose und Pullulan kein Wachstum.

Die Tatsache, das Glycerin als Kohlenstoffquelle für die *Sporolactobacillus* Spezies nicht genutzt werden kann, kann möglicherweise mit dem auf die Bakterien wirksamen osmotischen Stress erklärt werden. Glycerin besitzt eine molare Masse von 92,09 g/mol, welche ungefähr die Hälfte der molaren Masse von Glucose (180,16 g/mol) entspricht. Demzufolge ist der osmotische Stress

auf die Bakterien bei äquivalenter Konzentration zur Glucose ca. doppelt so hoch. Darüber hinaus ist es möglich, dass das regulatorische System zur Aufnahme von Glycerin bei höheren Konzentrationen ineffizient funktioniert und somit Glycerin angesichts der geringen Molekülgröße ungehindert die Biomembran passieren kann.

AP 3. 1. b) Alternative C-Quellen

Diese Experimente sollten die Verwertbarkeit von alternativen Kohlenstoffquellen auf der Basis von Agrarreststoffen zur Produktion von D-Milchsäure prüfen. Die Auswahl der Substrate basierte auf den Ergebnissen der Untersuchung verschiedener Kohlenstoffquellen. So konnte gezeigt werden, dass die Bakterien in der Lage sind Disaccharide, wie z.B. Saccharose zu D-Milchsäure umzusetzen. Diese Tatsache macht Melassen und Zuckerrübendünnsaft (ZRDS) als Nebenprodukte der Zuckerherstellung zu potentiellen alternativen Kohlenstoffquellen.
Folgende C-Quellen wurden als Glucose-Ersatz getestet: Melassen 2-6 (Saccharose-Basis, Südzucker AG), die Beneo Carb S (Palatinosemelasse, Melasse 1) und Zuckerrübendünnsaft (Südzucker AG, ZRDS 7) (Tabelle 7). Als Kontrollen dienten Ansätze mit Glucose als C-Quelle.

Tabelle 7: Eingesetzte Zuckerkonzentrationen der verschiedenen C-Quelle für *Sporolactobacillus* Sp. 1 und 2.

			S. sp. 1	*S.* sp. 2
Nr	**Bezugsquelle**	**C-Quelle**	**Zucker g/L eingesetzt**	
1	Südzucker AG	Melasse 1 (Palatinose)	150	130
2	Südzucker AG	Melasse 2 (Saccharose)	150	130
3	Südzucker AG	Melasse 3 (Saccharose)	150	130
4	Südzucker AG	Melasse 4 (Saccharose)	150	130
5	Südzucker AG	Melasse 5 (Saccharose)	150	130
6	Südzucker AG	Melasse 6 (Saccharose)	150	130
7	Südzucker AG	ZRDS (Saccharose)	150	130
Kontrolle		Kontrolle (Glucose)	150	130

Im Vergleich zur Kontrolle sind die Melasse 1 und der Zuckerrübendünnsaft (ZRDS 7) als alternative C-Quelle für den *Sporolactobacillus sp.1* geeignet (Abbildung 11). Darüber hinaus macht die Abbildung 12 deutlich, dass für den *Sporolactobacillus sp.2* keine der gewählten Melassen potentiell als C-Quellen-Ersatz in Frage kommt, da keine signifikante Milchsäure-Produktion über den Gesamtzeitraum zu messen war. Lediglich der Ansatz bezüglich des Zuckerrübendünnsaft (ZRDS 7) zeigt eine entsprechende Produktzunahme (Milchsäure) über 160 Stunden.

Ferner wird aus den Experimenten deutlich, dass im Vergleich zur Kontrolle, die Ansätze mit Disacchariden als C-Quelle (z.B. Saccharose, siehe Tabelle 7) in der exponentiellen Produktionsphase eine geringere Produktivität (Abbildung 12), bzw. geringere Milchsäurekonzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten (Abbildung 11 und Abbildung 12) aufweisen. Dies ist wahrscheinlich mit der Tatsache zu erklären, dass die Bakterien Energie in Form von ATP in die Expression von Glykosidasen investieren müssen um die α 1-2 glykosidischen Bindungen der Saccharose zu spalten. Dadurch steht weniger ATP für die Milchsäure-Produktion zur Verfügung und folglich sind die Milchsäurekonzentrationen geringer. Weiterhin ist aus der Abbildung 11 zu sehen, dass der Kontroll-Ansatz und der Ansatz mit der Melasse 1 als C-Quelle bis zu dem Zeitpunkt von 48 Stunden einen ähnlichen Produktivitätsverlauf bezüglich der Milchsäure-Bildung aufweisen, wobei der Kurvenverlauf des Ansatzes mit der Melasse 2 zu späteren Zeitpunkten (ab 48 Stunden) deutlich abflacht. Die Erklärung hierfür ist, dass die Melasse 1 zusätzlich zu den Disacchariden (z.B. Palatinose und Saccharose) auch einen gewissen Monosaccharid-Anteil besitzt (z.B. Glucose und Fructose), welche von den Bakterien bevorzugt verstoffwechselt (weniger Energieaufwand) werden und es dadurch anfangs zu einem ähnlichen Produktivitätsverlauf im Vergleich zu der Kontrolle kommt. Weiterhin kann bezüglich der nicht fermentierbaren Melassen für beide Stämme darauf geschlossen werden, dass diese inhibitorische Substanzen enthalten und es somit zu keiner signifikanten Milchsäurebildung durch die Bakterien kommt.

Ein weiterer Grund hinsichtlich der Palatinose-Melasse ist, dass der *Sporolactobacillus* sp. 2 den Hauptzucker-Bestandteil, die Isomaltulose, nicht metabolisieren kann. Somit steht den Bakterien nur geringer Anteil an nutzbaren Zuckern für die D-Milchsäure-Produktion zur Verfügung. Zudem stellt der Zuckerrübendünnsaft eine Vorstufe der Melasse dar, wodurch die Konzentration möglicher inhibierender Substanzen geringer ist und dadurch das bakterielle Wachstum weniger stark negativ beeinträchtigt wird. Im Vergleich zu den Kontrollansätzen erreicht das ZRDS-Experiment 71 % der Produktivität des Glucose-Ansatzes und 48 % der Produktivität der Saccharose-Kontrolle.

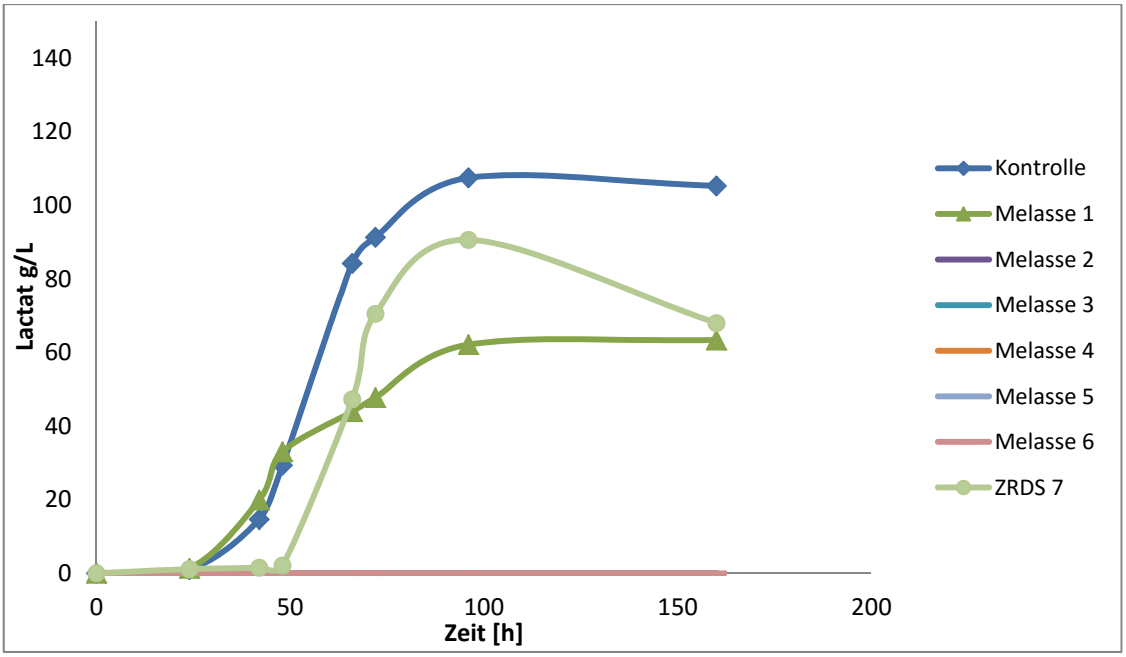


Abbildung 11: Einsatz verschiedener C-Quellen (mit Hefeextrakt) für *Sporolactobacillus sp. 1*., 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

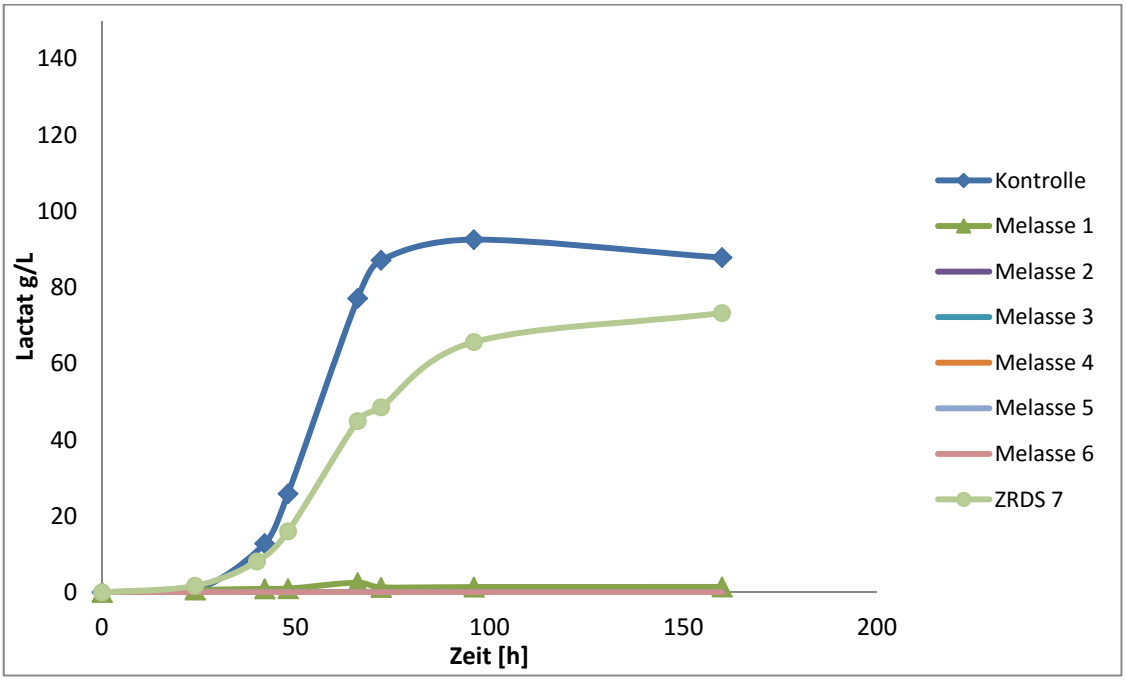


Abbildung 12: Einsatz verschiedener C-Quellen (mit Hefeextrakt) für *Sporolactobacillus sp.2*., 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Im Unterschied zu den Ergebnissen des *Sporolactobacillus* sp. 2 kann die Palatinose-Melasse als alternative C-Quelle von den *Sporolactobacillus* sp. 1 verwendet werden, was zum einen an der Nutzbarkeit der Isomaltulose durch den *Sporolactobacillus* sp. 1 liegt und zum anderen an einer

möglicherweise höheren Unempfindlichkeit gegenüber etwaiger Hemmstoffe. Die Produktivität des ZRDS-Ansatzes entspricht nahezu der Produktivität der Glucose-Kontrolle.

AP 3. 1. c) Hefeextrakte und Suppline

Die optimale Konzentration des Referenz-Hefeextraktes Merck Fermtech® beträgt 10 g/L bei einer Glucosekonzentration von 120 g/L für *Sporolactobacillus* sp.1 und 100 g/L für *Sporolactobacillus* sp.2 (siehe AP 3. 2.e) Für die Kultivierungen mit den verschiedenen Hefeextrakten und Hydrolysaten wurde der Gesamtstickstoffgehalt entsprechend des Gehaltes in 10 g/L Merck Fermtech® Hefeextrakt (dient als Referenz) konstant gehalten und die Einwaagen entsprechend angepasst. Um darüber hinaus eine Phosphatlimitierung zu vermeiden, wurde der Phosphatgehalt im Medium durch Zugabe von Natriumdihydrogenphosphat auf eine Konzentration von 55,6 mg/L eingestellt, was dem Phosphatgehalt in 10 g/L Merck Fermtech® Hefeextrakt entspricht. Unter diesen Bedingungen ist eine gute Vergleichbarkeit der folgenden Ergebnisse gewährleistet.
Die folgenden Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigen die mit *Sporolactobacillus* sp.1 (Abbildung 13) und *Sporolactobacillus* sp.2 (Abbildung 14) erhaltenen Kultivierungsergebnisse für eine Auswahl an Hefeextrakten, Peptonen und Hydrolysaten. Merck Fermtech® Hefeextrakt wurde in diesen Versuchen stets als Referenz betrachtet.
Sporolactobacillus sp.1 zeigt eine starke Abhängigkeit des Prozesses von der Nährstoffquelle, die sich sowohl auf die Produktivität als auch auf die erreichte Milchsäurekonzentration auswirkt. Mit den verschiedenen Hefeextrakten wurden im Allgemeinen hohe Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen erreicht, wobei die Referenz Merck Fermtech® Hefeextrakt das beste Ergebnis lieferte. Mit den Peptonen, Fleischextrakt und Hy-Soy® wurden deutlich geringere Produktivitäten und stark schwankende Milchsäurekonzentrationen erhalten. Ähnliche Ergebnisse wie die Peptone lieferten auch die selbst hergestellten Hydrolysate. Hier wurden mit *Sporolactobacillus* sp.1 noch geringere Produktivitäten und ebenfalls schwankende Milchsäurekonzentrationen erhalten. Zudem konnte mit den Hydrolysaten neben der geringeren Produktivität auch eine Verlängerung der *lag*-Phase beobachtet werden.

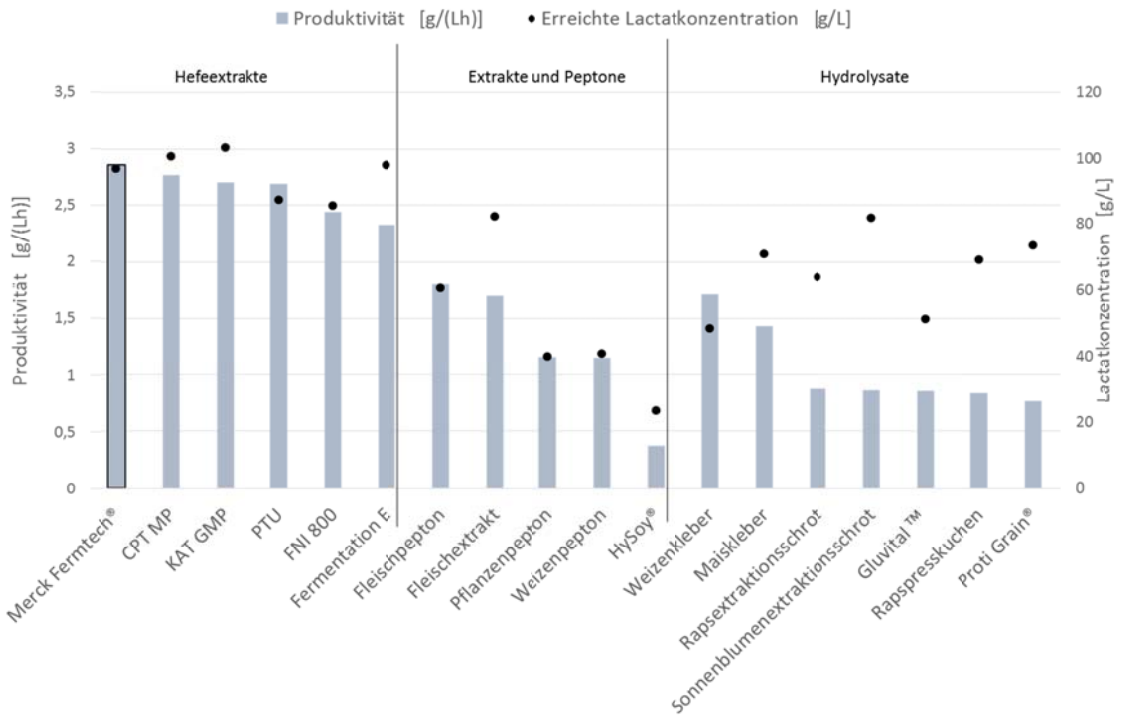


Abbildung 13: Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen erhalten mit Sporolactobacillus sp.1 unter Verwendung verschiedener Hefeextrakte, Peptone, Extrakte und Hydrolysate; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

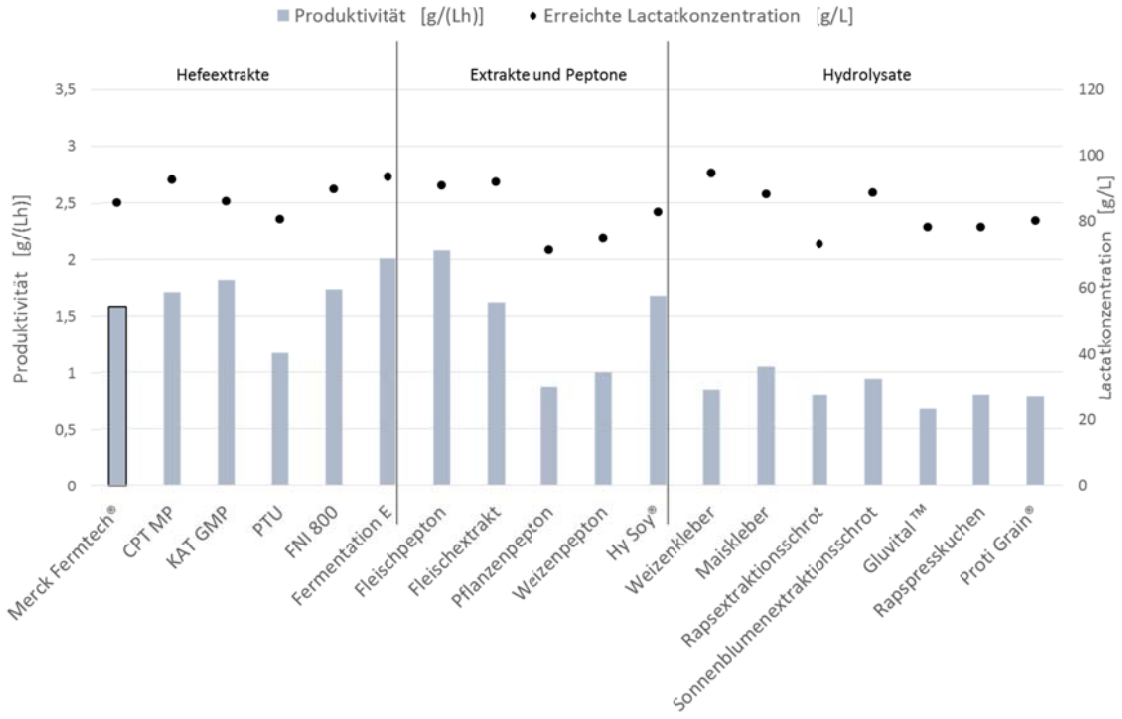


Abbildung 14: Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen erhalten mit Sporolactobacillus sp.2 unter Verwendung verschiedener Hefeextrakte, Peptone, Extrakte und Hydrolysate; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/ L $CaCO_3$.

Sporolactobacillus sp.2 konnte sowohl mit den Hefeextrakten, als auch mit Fleischpepton, Hy-Soy® und Fleischextrakt gute Ergebnisse erzielen, wobei der Einsatz von Fleischpepton zu der höchsten Produktivität von *Sporolactobacillus* sp.2 führte. Die Kultivierungen mit Weizenpepton und Pflanzenpepton verliefen hingegen ähnlich wie die der Hydrolysate, mit denen zwar nur geringe Produktivitäten erreicht wurden, aber mit Hefeextrakt vergleichbare Milchsäurekonzentrationen. Im Gegensatz zu *Sporolactobacillus* sp.1 waren die Schwankungen der Milchsäurekonzentrationen gering.
Ein möglicher Grund für die geringeren Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen, sowie die verlängerten *lag*-Phasen bei Verwendung der Hydrolysate könnte ein unzureichender Aufschluss der Proben sein. Auch die Analysen zeigten, dass die Hydrolysate im Gegensatz zu den Hefeextrakten nur wenige freie Aminosäuren aufweisen. Die Aminosäuren liegen demnach noch proteingebunden vor und sind somit möglicherweise für die Zellen nur begrenzt verfügbar.
Um diesen Sachverhalt genauer zu spezifizieren und analysieren. Wurden weitere Kultivierungen durchgeführt die in AP3.3 dargestellt sind.

AP 3. 2. Prozessoptimierung

Für die Prozessoptimierung zur biotechnologischen Herstellung von D-Milchsäure standen folgende Parameter im Fokus:

- Untersuchungen zur Spezifizierung der optimalen Temperatur bezüglich der Bakterienstämme im Fermentationsprozess.
- Bestimmung des optimalen pH-Werts
- Variation des Inokulums
- Medienbestandteile des GYP-Mediums (Tabelle 3)
- Optimierung der Stoffmengenkonzentration von Hefeextrakt und Glucose
- Vergleich von Ammoniak und Calciumcarbonat als Neutralisationsmittel

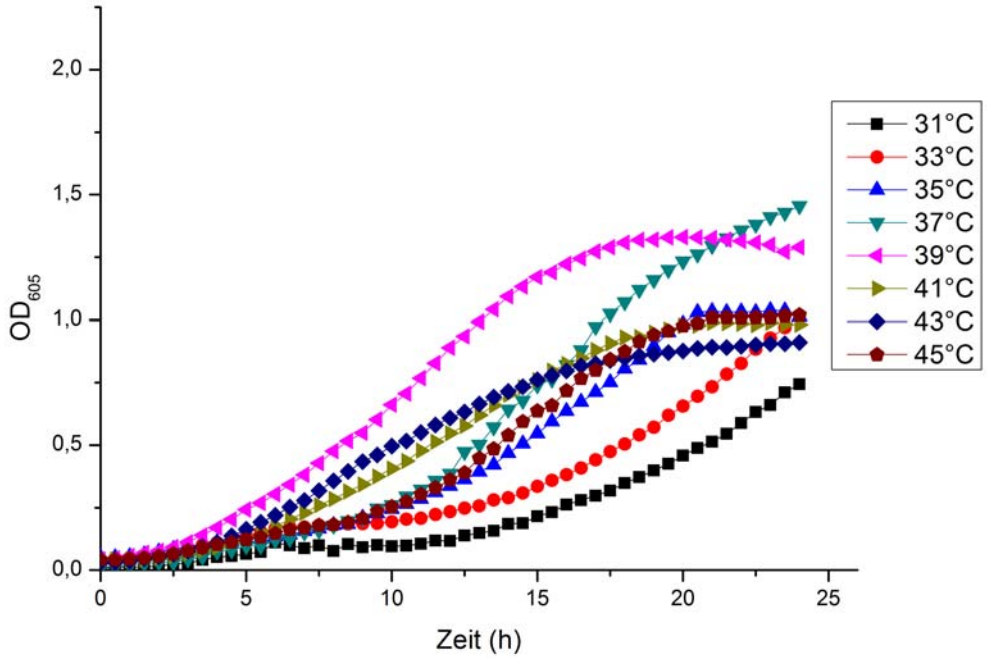
AP 3. 2.a) Temperatur

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums von *Sporolactobacillus sp.1* und *Sporolactobacillus sp.2* wurden Kultivierungsexperimente im 96-Well-Maßstab unter Zuhilfenahme eines temperaturregulierbaren Mikrotiterplatten-Photometers bei verschiedenen Temperaturen (43 °C, 41 °C, 39 °C, 37 °C, 35 °C, 33 °C) prozessiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 605 nm (OD_{605}) und die Experimente wurden über einen Zeitraum von 36 Stunden, in einem Arbeits-Volumen von 150 µL pro Well und in 18 Replikationen durchgeführt. Um das Wachstum der beiden Bakterienstämme bezüglich der verschiedenen Temperaturen vergleichen zu können, wurde ein Inokulum mit fester Zellzahl ($10{,}5*10^7$ Zellen/ 150 µL) gewählt. Die Medienzusammensetzung für die Experimente ist in Tabelle 3 (ohne Calciumcarbonat und mit

20g/L Glucose) dargestellt (Start-pH-Wert 6,4 für *Sporolactobacillus* sp.1 und 5,4 für *Sporolactobacillus* sp.2). Zur besseren Visualisierung der Daten wurde zu jedem Messpunkt der OD605 der Mittelwert aus den 18 Ansätzen gebildet.

Die Abbildung 15 zeigt die Wachstumskurven der beiden Bakterienstämme bezüglich des gewählten Temperaturbereichs von 33 °C – 43 °C. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass die optimale Wachstumstemperatur sowohl für *Sporolactobacillus sp.1*, als auch für *Sporolactobacillus sp.2* bei 39 °C liegt, da hier die Wachstumsgeschwindigkeit am größten ist, wobei die höchsten OD605-Werte für beide Bakterienstämme bei 37 °C erreicht werden. Dies lässt sich mit der Tatsache erklären lässt, dass die Bakterien bei 37 °C langsamer wachsen und dadurch eine wachstumshemmende Versäuerung durch D-Milchsäure erst im späteren Zeitverlauf auftritt, da in diesem Experiment auf eine Pufferung verzichtet wurde. Ferner ist aus der graphischen Darstellung zu sehen, dass bereits Temperaturunterschiede von 2 °C einen deutlichen Einfluss auf das bakterielle Wachstum haben.

Beide Bakterienstämme wachsen bei 41 °C und 37 °C deutlich langsamer als bei 39 °C. Darüber hinaus befinden sich die Populationen von *Sporolactobacillus sp.2* (Abbildung 15, unten) unterhalb von 39 °C noch in der exponentiellen Phase und die Wachstumskurven zeigen nach 36 Stunden keinen sigmoidalen Verlauf. Anhand dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Experimente bei 38 °C durchgeführt, da in einer großtechnischen Anwendung, eine präzise Temperaturregulierung schwierig ist und somit eine Kapazität zu höheren Temperaturen besteht, ohne den Fermentationsprozess negativ zu beeinflussen.



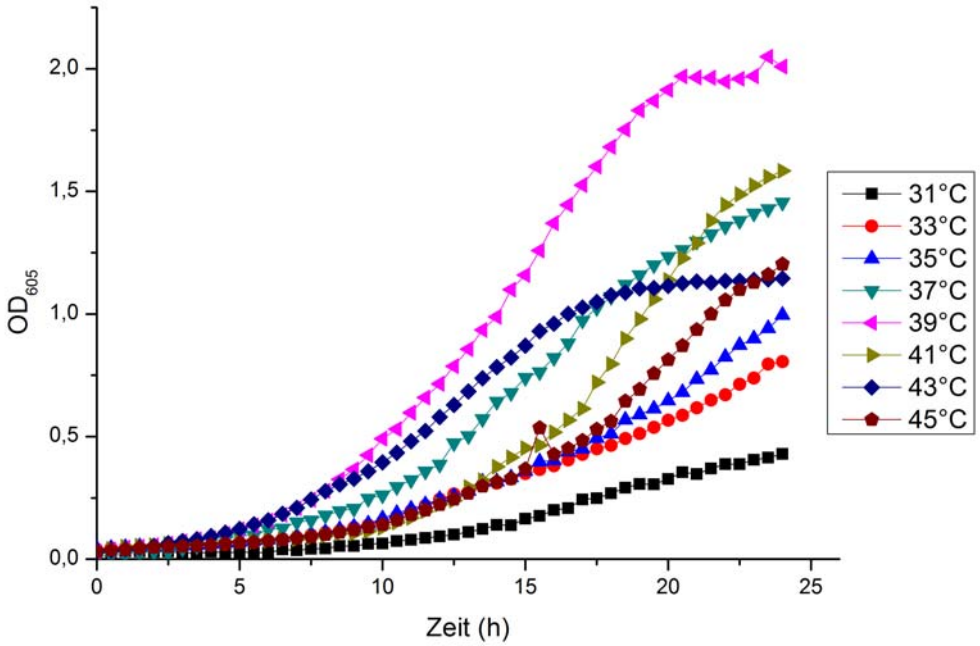
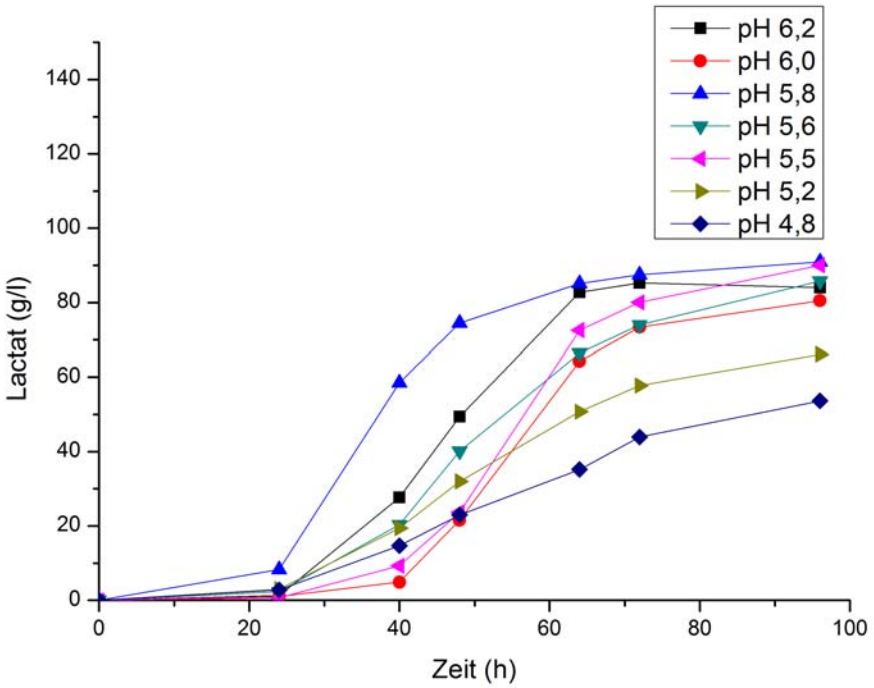


Abbildung 15: Einfluss der Temperatur auf das Wachstums von *Sporolactobacillus sp.1*, (oben) und *Sporolactobacillus sp.2 (*unten); 96-Well Mikrotiterplatte, ungepuffert.

AP 3. 2.b) Bestimmung der optimalen pH-Bedingungen

Um die optimalen pH-Werte für das Wachstum der Bakterien zu bestimmen, wurden bezüglich beider Stämme Experimente bei konstanter pH-Regelung im Bioreaktor durchgeführt.
Die Reaktionsansätze wurden bei 38 °C, 100 Upm und in einem Arbeitsvolumen von 100 mL für 160 Stunden kultiviert (Medium siehe Tabelle 3). Als Inokulum wurden 4% der Vorkultur bei einer optischen Dichte bei 605 nm (OD_{605}) von 0,4 verwendet.
Um die verschiedenen Ansätze untereinander vergleichen zu können, wurden die Experimente bei *Sporolactobacillus* sp. 1 bei einem pH-Wert von 7,5 mit einer Glucose-Konzentration von 150 g/L gestartet und bei dem *Sporolactobacillus* sp. 2 mit 130 g/L Glucose und einem pH-Wert von 6,2. Die jeweiligen zu untersuchenden pH-Werte wurden als Fix-Wert gesetzt, was bedeutet, dass wenn diese pH-Werte erreicht wurden, das Pumpensystem die Titration gestartet hat, um den jeweiligen pH-Wert konstant zu halten. Als Neutralisationsmittel wurde eine 3,4 molare Ammoniaklösung verwendet. Die Ergebnisse der Experimente sind in der Abbildung 16 dargestellt.
Für den *Sporolactobacillus* sp. 1 wurde diesbezüglich ein pH-Bereich von 5,2- 6,0 untersucht. Aus der Abbildung 16 wird deutlich, dass die Bakterienspezies in einem Bereich von pH 5,2- 6,0 D-Milchsäure produzieren kann, wobei bei pH 5,2 die geringste Produktivität und Endkonzentration erzielt wird. Der Optimalwert für die Produktion von D-Milchsäure/ bzw. für das Wachstum der Bakterien liegt bezüglich der Ergebnisse bei pH 5,8 aufgrund der höchsten Produktivität und der höchsten D-Milchsäure-Konzentration von 85 g/L nach 72 Stunden Kultivierungsdauer.
Des Weiteren wurde bezüglich des *Sporolactobacillus* sp. 2 ein pH-Bereich von 4,4- 5,8 untersucht. Aus der Abbildung 16 geht hervor, dass der optimale Bereich zur Produktion von D-Milchsäure zwischen pH 5,2 und 5,6 liegt, wobei die Werte unterhalb und oberhalb dieses Bereiches niedrigere Produktivitäten und D-Milchsäure-Konzentrationen nach 72 Stunden aufweisen.



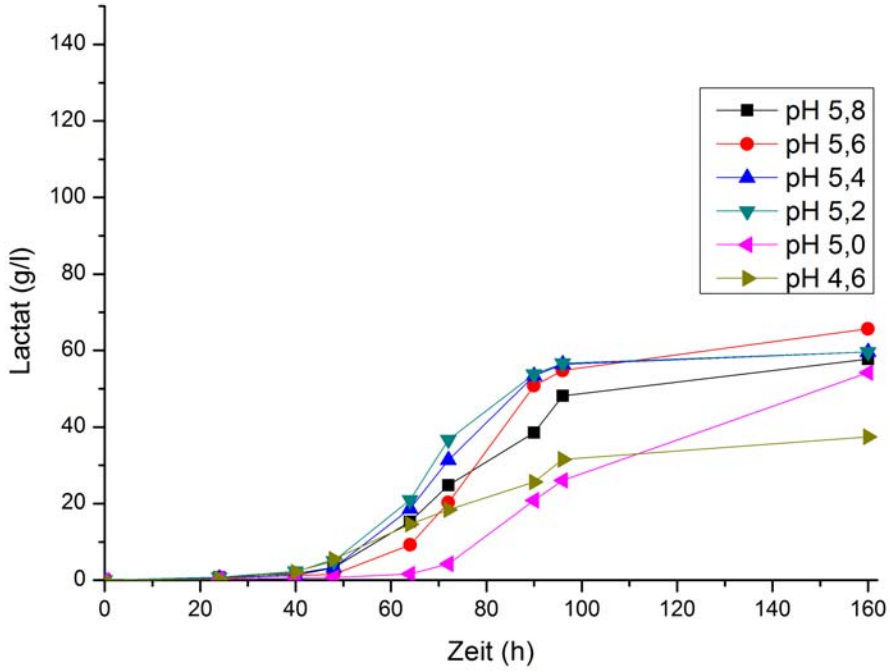


Abbildung 16: Einfluss des pH-Werts (*Sporolactobacillus* sp.1, oben und *Sporolactobacillus* sp.2 unten); 250 mL Reaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38°C, 100 Upm, 3,4 molare Ammoniaklösung.

AP 3. 2.c) Variation des Inokulums

Des Weiteren wurden Experimente zur Variation des Inokulums bezüglich beider *Sporolactobacillus* Spezies mit dem Ziel durchgeführt, die Lag-Phase innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultivierung zu verkürzen.

Dazu wurden die Bakterien in 300 ml Schüttelkolben mit 100 ml Arbeitsvolumen, mit einer Glucose-Startkonzentration von 150 g/L (*Sporolactobacillus* sp. 1) und 130 g/L (*Sporolactobacillus* sp. 2) bei 120 Upm und bei 38 °C für 96 Stunden kultiviert (Medium siehe Tabelle 3). Als Neutralisationsmittel wurden jeweils 60 g/L Calciumcarbonat verwendet und der Start-pH-Wert wurde zuvor auf 6,2 für *Sporolactobacillus* sp. 1 bzw. 5,6 für den *Sporolactobacillus* sp. 2 eingestellt, um die Kultivierungsansätze jeweils miteinander vergleichen zu können. In der Abbildung 17 sind die Ergebnisse bezüglich des *Sporolactobacillus* sp. 1 dargestellt. Als Kontrollansatz (OD 04 4%) wurden 4% der Vorkultur bei einer OD_{605} von 0,4 verwendet. Darüber hinaus wurden Experimente mit 10 % Inokulum bei einer OD_{605} von 0,4 (OD 04 10%), sowie bei einer OD_{605} von 1 (OD 1 10%) und einer OD_{605} von 2 (OD 2 10%) durchgeführt.

Aus der Abbildung 17 wird ersichtlich, dass eine sukzessive Erhöhung des Inokulums von einer OD_{605} von 0,4 mit 4 % Vorkultur zu einer OD_{605} von 1 mit 10 % Inokulum zu keiner signifikanten Verkürzung der Lag-Phase führt. Lediglich bei den Ansätzen mit 10 % Inokulum bei einer OD_{605} von 2 konnte die Lag-Phase innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultivierung verkürzt werden, wobei zu diesem Zeitpunkt 28 g/L D-Milchsäure gebildet wurden im Vergleich zur Kontrolle mit 4 g/L.

Nichtsdestotrotz ist bei den Kurven OD 1 10% und OD 2 10% ein deutlicher Produktivitätsverlust bzgl. der D-Milchsäure-Produktion im Vergleich zu den Kurven OD 04 4% und OD 04 10% nach 24 Stunden zu erkennen, was letztendlich zu einer geringeren D-Milchsäure-Konzentration nach 96 Stunden führt. Dieser Sachverhalt kann möglicherweise damit erklärt werden, dass der pH-Wert innerhalb der ersten 24 Stunden bei den Experimenten OD 1 10% (pH 4,93 nach 16 Stunden) und OD 2 10% (pH 4,67 nach 16 Stunden) deutlich stärker absank als bei den Kurven OD 04 4% (pH 5,73 nach 16 Stunden) und OD 04 10% (pH 5,40 nach 16 Stunden), was möglicherweise zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen geführt hat.

Die Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Variation der Inokula bezüglich des *Sporolactobacillus* sp. 2. Anhand der Kurven ist zu erkennen, dass im Vergleich zum Kontrollansatz (OD 04 4%), die Steigerung des Inokulums (OD 1 10% und OD 2 10%) zu keiner Verkürzung der Lag-Phase führt. Lediglich die maximale Produktivität wurde im Vergleich zur Kontrolle zwischen 24 Stunden und 40 Stunden erreicht (2,25 g/(L·h)), welche sich bei der Kontrolle erst zwischen 48 Stunden und 65 Stunden auf 2,43 g/(L·h) einstellt.

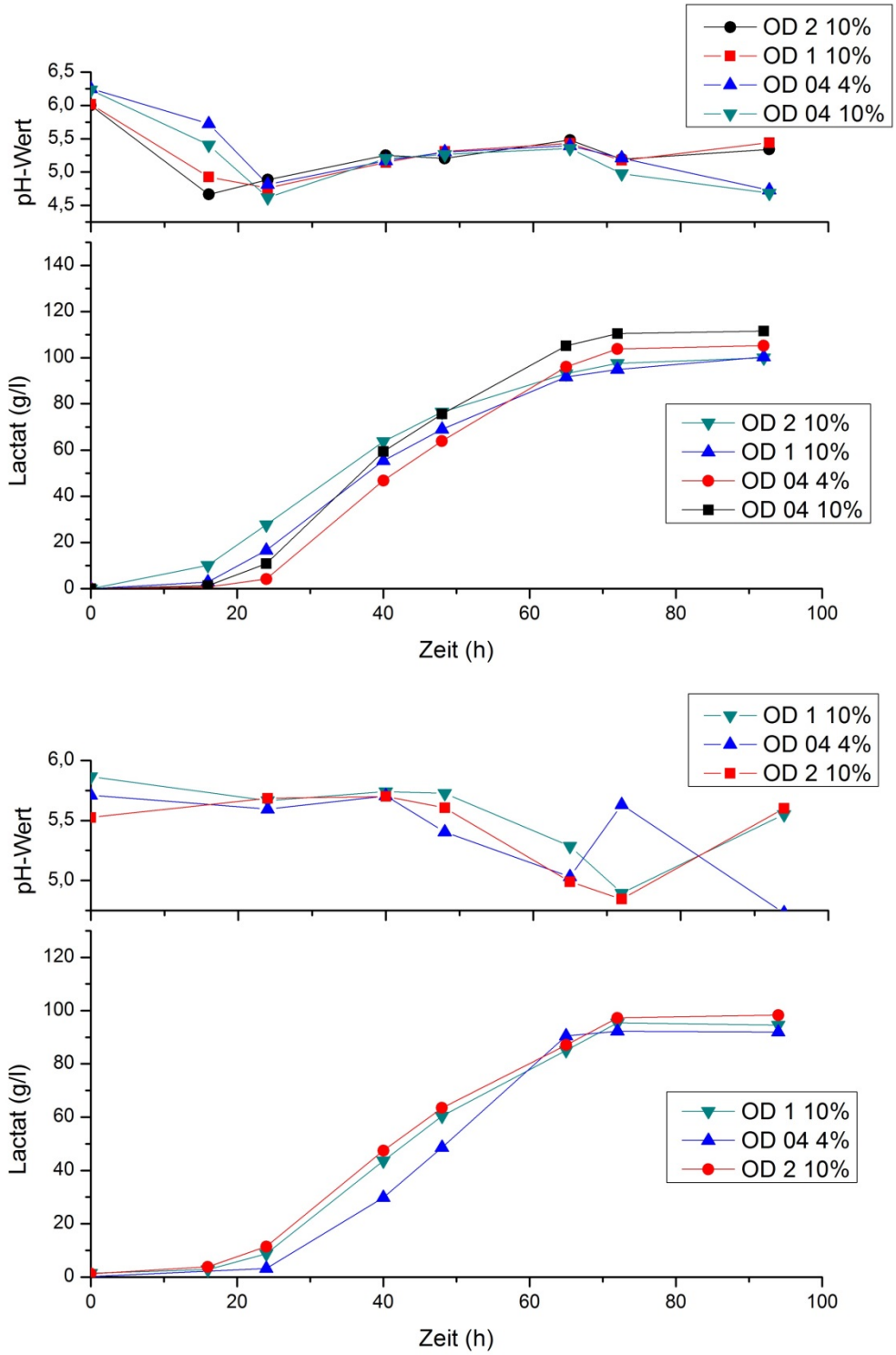


Abbildung 17: Variation der Inokula (*Sporolactobacillus* sp.1, oben und *Sporolactobacillus* sp.2 unten); 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

AP 3. 2.d) Medienbestandteile

Einfluss von Hefeextrakt, Pepton, Trypton und Spurenelemente

Um die Einflussgröße der verschiedenen Medienkomponenten des GYP-Mediums (Tabelle 3) auf den Fermentationsprozess zu untersuchen, wurden pro Bakterienstamm 6 Batch-Ansätze mit unterschiedlicher Kombinatorik der Medienkomponenten gemacht. Alle Ansätze des Experiments wurden in 300 mL Schüttelkolben (ungeschüttelt), 150 g/L Glucose in einem Arbeitsvolumen von 100 mL bei 38 °C und über einem Zeitraum von 19 Tagen durchgeführt. Um die Ergebnisse der beiden Stämme vergleichen zu können, wurde ein Inokulum von $28*10^8$ Zellen/ 100 mL gewählt. Im ersten Ansatz wurde der Einfluss des Hefeextrakts auf die bakterielle D-Milchsäure-Produktion untersucht (Tabelle 8, Punkt 1). Im zweiten Ansatz wurde zusätzlich zum Hefeextrakt, auch der Einfluss der Spurenelemente (SE) auf den Fermentationsprozess geprüft (Tabelle 8, Punkt 2). Dieselbe Kombination wurde mit dem Pepton/ Trypton-Medienbestandteil durchgeführt (Tabelle 8, Punkt 3 und Punkt 4). Zusätzlich wurden eine Negativkontrolle (Tabelle 8, Punkt 5) ohne Stickstoffquelle und eine Positivkontrolle (Tabelle 8, Punkt 6) mit vollständigen GYP-Medium als Referenz angesetzt. Die Ergebnisse der Experimente sind in der Abbildung 18 für *Sporolactobacillus sp.1* und der Abbildung 19 für *Sporolactobacillus sp.2* dargestellt.

Die Ansätze 2 (Hefeextrakt + SE, rote Linie) und 6 (GYP-Medium, orange Linie) weisen nach 19 Tagen die größte D-Milchsäure-Produktion auf (Abbildung 18 und Abbildung 19). Wobei die Differenz der Milchsäure-Produktion des Ansatzes 2 und Ansatzes 6 bei *Sporolactobacillus sp.2* über dem Gesamtzeitraum stärker ausgeprägt (14,4 g/L Milchsäure nach 19 Tagen) ist als bei *Sporolactobacillus sp.1* (7,5 g/L Milchsäure nach 19 Tagen).

Tabelle 8: Kombinatorik der verschiedenen Medienkomponenten für die Durchführung der Versuche zum Einfluss der Medienkomponenten (Abbildung 18 und Abbildung 19).

1. Hefeextrakt		2. Hefeextrakt + SE		3. Pepton / Trypton		4. Pepton/ Trypton + SE		5. Negativkontrolle (NK)		6. Positivkontrolle GYP (PK)	
Komponente	g/L	Komponente	g/L	Komponente	g/L	Komponente	g/L	Komponente	g/L	Komponente	g/L
Glucose	150	Glucose	150	Glucose	150	Glucose	150	Glucose	150	Glucose	150
Hefeextrakt	10	Hefeextrakt	10	-	-			-	-	Hefeextrakt	10
-	-	-	-	Pept./Trypt.	10	Pept./Trypt.	10	-	-	Pept./Trypt.	10
-	-	$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2	-	-	$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2	$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2	$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,2
-	-	$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,01	-	-	$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,01	$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,01	$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,01
-	-	$MnSO_4$ x H_2O	0,01	-	-	$MnSO_4$ x H_2O	0,01	$MnSO_4$ x H_2O	0,01	$MnSO_4$ x H_2O	0,01
-	-	NaCl	0,01	-	-	NaCl	0,01	NaCl	0,01	NaCl	0,01
NaOAc	2	NaOAc	2	NaOAc	2	NaOAc	2	NaOAc	2	NaOAc	2
$CaCO_3$	60	$CaCO_3$	60	$CaCO_3$	60	$CaCO_3$	60	$CaCO_3$	60	$CaCO_3$	60
Start-$pH_{S.sp.1}$	6,1	Start-$pH_{S.sp.1}$	6,0	Start-$pH_{S.sp.1}$	6,0	Start-$pH_{S.sp.1}$	6,1	Start-$pH_{S.sp.1}$	6,2	Start-$pH_{S.sp.1}$	6,0
Start-$pH_{S.sp.2}$	5,7	Start-$pH_{S.sp.2}$	5,7	Start-$pH_{S.sp.2}$	5,7	Start-$pH_{S.sp.2}$	5,7	Start-$pH_{S.sp.2}$	5,8	Start-$pH_{S.sp.2}$	5,7

Darüber hinaus ist aus den Abbildungen ersichtlich, dass sowohl die Ansätze 3 (Trypton/ Pepton) und 4 (Pepton/ Trypton + SE) im Vergleich zur Negativkontrolle (Ansatz 5) keinen relevanten Einfluss auf die Milchsäure-Produktion haben. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass hingegen die Spurenelemente einen wesentlichen Einflussfaktor bezüglich des Fermentationsprozesses darstellen.

Bei dem Vergleich des roten Kurvenverlaufs (Ansatz 2 Hefeextrakt + SE) mit dem blauen Kurvenverlaufs (Ansatz 1 Hefeextrakt) der Abbildungen beider Stämme wird deutlich, dass der Zusatz der Spurenelemente zu einer höheren Milchsäure-Produktion über den Fermentationszeitraum führt.

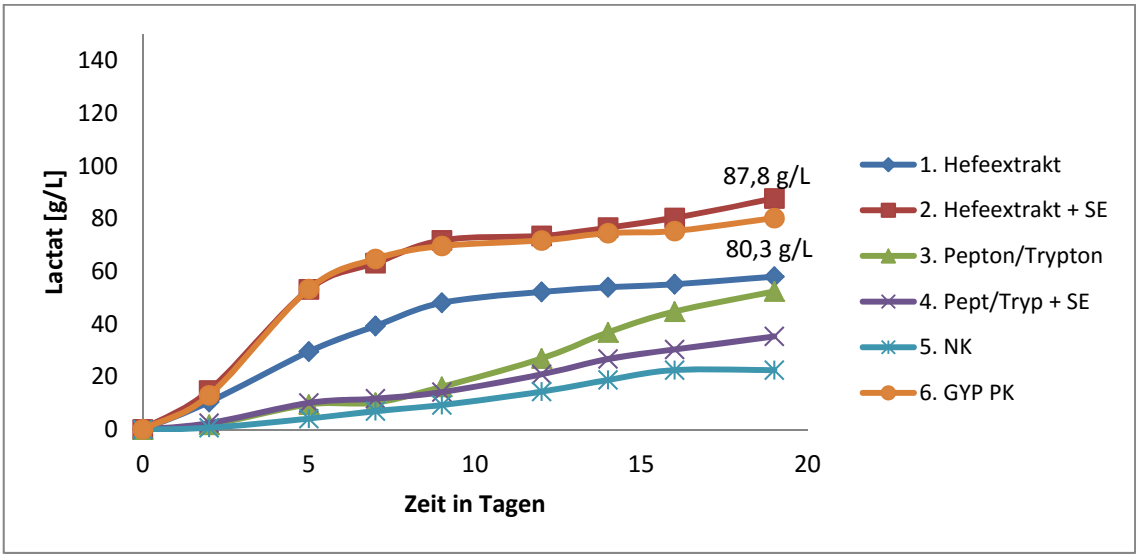


Abbildung 18: Einfluss der Medienkomponenten für *Sporolactobacillus sp. 1*; 300 mL Schüttelkolben (ungeschüttelt, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

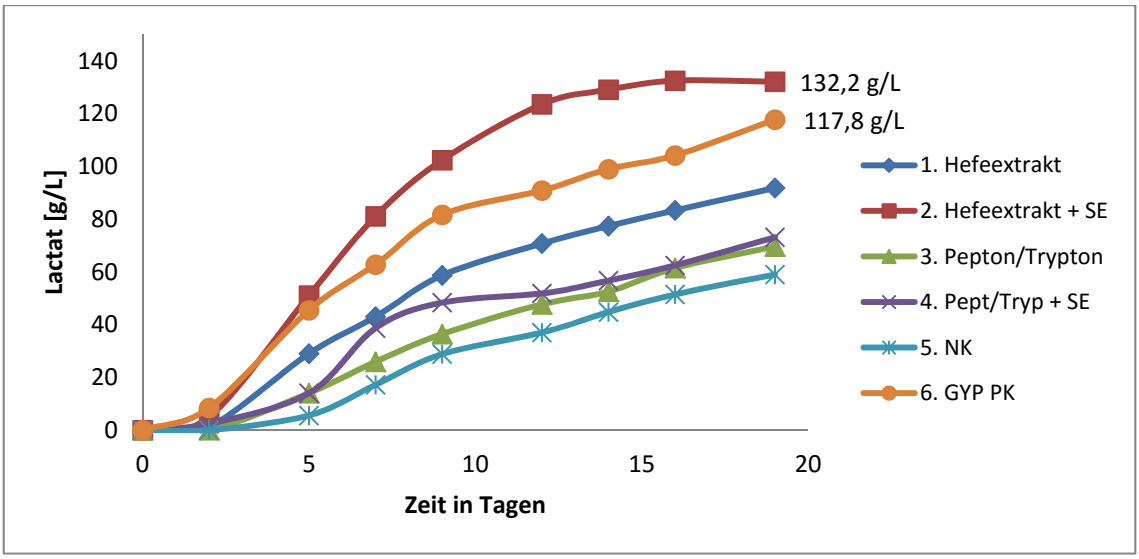


Abbildung 19: Einfluss der Medienkomponenten für *Sporolactobacillus* sp. 2; 300 mL Schüttelkolben (ungeschüttelt, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Für den *Sporolactobacillus sp.1* ergibt sich eine somit eine Steigerung der Milchsäure-Produktion von 50 % und für den *Sporolactobacillus sp.2* erhöht sich die Gesamtproduktion um 43 % über 19 Tage im Vergleich zu dem Ansatz ohne Spurenelemente. Anhand der hier erzielten Ergebnisse wurde in den folgenden Experimenten auf den Zusatz von Pepton/ Trypton im Medium verzichtet.

Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies

Hinsichtlich der Literatur sind keine Daten verfügbar, die die Einflüsse der Salzkomponenten im GYP-Medium auf die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies untersucht haben. Lediglich Kitahara und Suzuki (1963) geben an, dass Mangansulfat bei einer Konzentration von 0,1 mM die Sporulation der Bakterien fördern kann (Kitahara and Suzuki 1963). Die Experimente zur Untersuchung der Einflüsse der Spurenelemente (10 mg/L NaCl, $MnSO_4 \cdot H_2O$ und $Fe(II)SO_4 \cdot 7H_2O$) und des Magnesiumsulfats (200 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) haben das Ziel herauszufinden, welche Kationen für die Kultivierung der *Sporolactobacillus* Spezies essentiell sind. Des Weiteren sind für den *Sporolactobacillus* sp. 1 weitere Sulfatsalze in verschiedenen Konzentrationen getestet worden, um ihren Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien zu untersuchen.

Einfluss von Spurenelementen und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus* sp. 1

Zur Bestimmung der Einflüsse der Spurenelemente und Salze des GYP-Mediums (Tabelle 3) wurden drei verschiedene Ansätze gemacht. Hierzu wurde zunächst ein Kontrollexperiment mit allen Salzkomponenten, bestehend aus Magnesiumsulfat und den Spurenelementen, angesetzt (Kontrolle). In einem weiteren Ansatz wurde unter Abwesenheit des Magnesiumsulfats gearbeitet (ohne Magnesium) und im dritten Ansatz wurde auf die Spurenelemente verzichtet (ohne Spurenelemente) (Abbildung 20, durchschnittlichen Produktivität [g/(L·h)], D-Milchsäure-Konzentration [g/L] nach 40 h).

Das Magnesiumsulfat hat nur einen geringen Einfluss auf die Produktivität der Bakterien (Abbildung 20). So ist die Differenz des Kontroll-Wertes mit dem Ansatz ohne Magnesiumsulfat nur 0,14 g/(L·h). Vergleichend hierzu erzielt der Ansatz ohne Spurenelemente, nur eine Produktivität von 0,41 g/(L·h). Dies deutet darauf hin, dass die enthaltenden Mangan und/ oder Eisen(II)-Kationen für die Kultivierung der Bakterien essentiell sind und den größten Einfluss auf die D-Milchsäure-Produktion haben. Des Weiteren bestätigt die Lag-Phase der Bakterien anhand der D-Milchsäure-Konzentrationen nach 40 Stunden diesen Befund. So sind im Kontrollansatz 54,3 g/L Milchsäure nach 40 Stunden produziert worden, während ohne das Magnesiumsulfat, 41,2 g/L D-Milchsäure vorliegen. Im Ansatz ohne die Spurenelemente konnten im hingegen nur 9,4 g/L D-Milchsäure zu diesem Zeitpunkt gemessen werden.

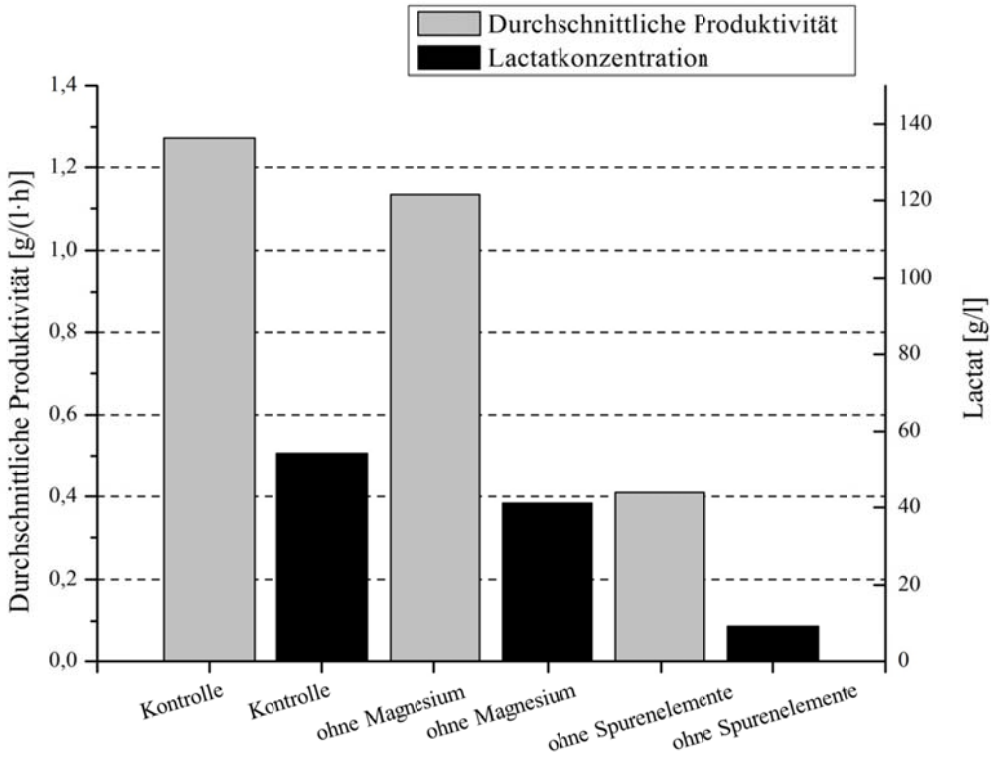


Abbildung 20: Einfluss der Salze auf den Sporolactobacillus sp.1; 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L CaCO3.

Einfluss von Sulfat-Salzen der ersten Übergangsmetalle auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus* sp. 1.

Zur Optimierung der Wachstumsgeschwindigkeit, anhand der vorigen Beobachtungen, wurden weitere Nebengruppenelemente der vierten Periode in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 mM, 1 mM und 2 mM) getestet. Neben den Mangan- und Eisens(II)-sulfatsalzen wurden ebenfalls die Sulfatsalze von Cobalt, Zink und Kupfer auf ihren Einfluss auf das bakterielle Wachstum untersucht. Als Parameter für die Wachstumsgeschwindigkeit wurde die maximale Produktivität in [g/(L·h)] für die Ansätze berechnet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 21 für den *Sporolactobacillus* sp. 1 dargestellt.

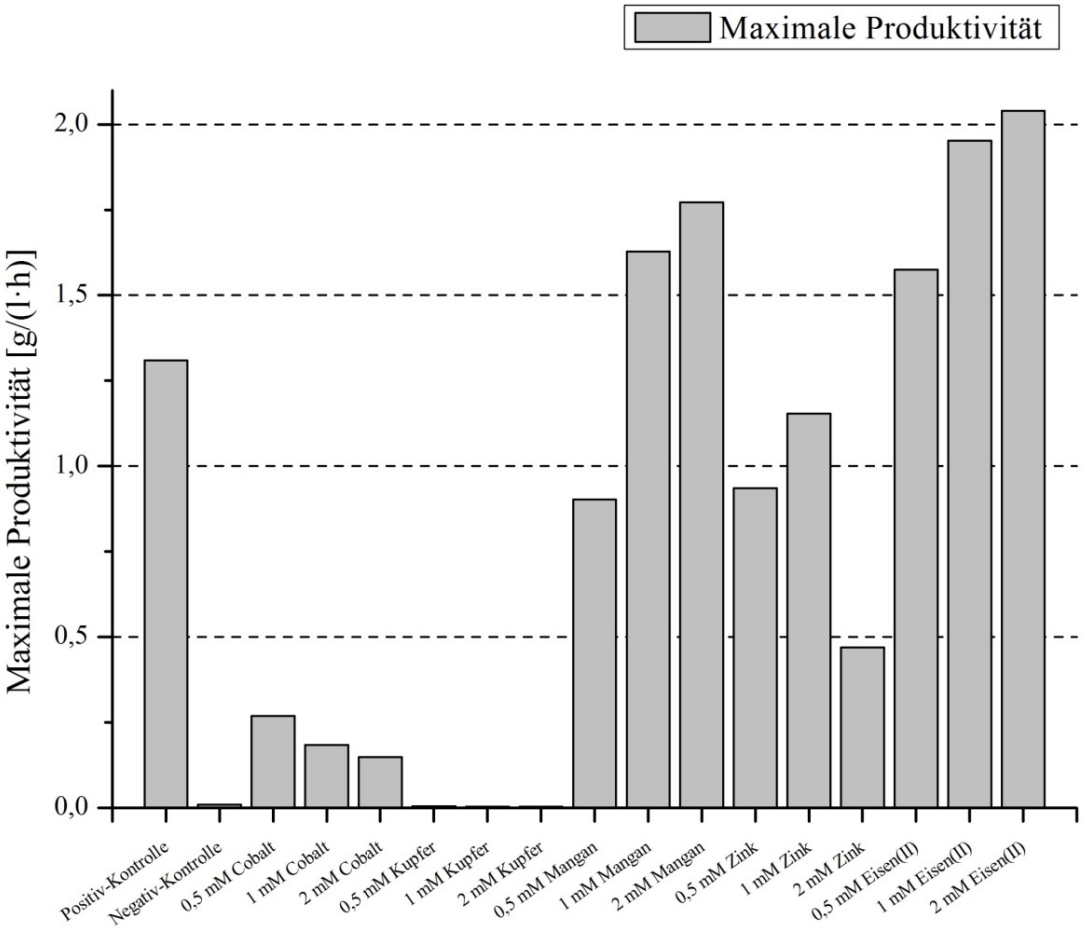


Abbildung 21: Einflüsse von Sulfat-Salze auf den *Sporolactobacillus* sp.1; 2,2 mL Deep-96-Well-Platte (2 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Die Abbildung 21 zeigt, dass die Positiv-Kontrolle (entspricht hinsichtlich der Medienzusammensetzung dem Kontrollansatz von Abbildung 20) eine maximale Produktivität von 1,31 g/(L·h) erzielt, wohingegen die Negativ-Kontrolle (ohne Salzkomponenten im Medium) erwartungsgemäß kein Wachstum aufweist. Die Experimente mit Cobaltsulfat zeigen ebenfalls nur ein geringes Wachstum auf, wobei hier konzentrationsabhängig Werte von 0,28 g/(L·h) (0,5 mM), 0,18 g/(L·h) (1 mM) und 0,15 g/(L·h) bei 2 mM Cobaltsulfat im Medium erreicht werden. Darüber hinaus ist bei den Ansätzen hinsichtlich des Kupfersulfats ebenfalls kein Wachstum zu erkennen. Bei den Ansätzen mit dem Mangansulfat ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der maximalen Produktivität zu beobachten. So wird ein Produktivitätswert von 0,90 g/(L·h) (0,5 mM) erzielt, 1,63 g/(L·h) (1 mM) und eine Maximalwert von 1,77 g/(L·h) mit 2 mM eingesetzten Mangansulfat erreicht. Eine Erhöhung der bakteriellen Sporulationsrate durch Mangan, wie sie Kitahara und Suzuki (1963) in ihrer Publikation beschreiben, kann angesichts der Produktivitätswerte in der Abbildung 21 ausgeschlossen werden.

Ferner kann auch bei den Ansätzen mit Zinksulfat zuerst eine Steigerung der Produktivität von 0,93 g/(L·h) (0,5 mM), auf 1,15 g/(L·h) bei 1 mM beobachtet werden, jedoch fällt dieser Wert wieder bei 2 mM Zinksulfat auf 0,47 g/(L·h) ab. Die größten Werte bezüglich der maximalen Produktivität der Bakterien können bei den Experimenten mit dem eingesetzten Eisen(II)-sulfat beobachtet werden. Mit 0,5 mM Eisen(II)-sulfat konnte ein Wert von 1,58 g/(L·h) erreicht werden, bei 1 mM Eisen(II)-sulfat steigert sich die Produktivität auf 1,95 g/(L·h), wobei zusätzlich eine geringe Steigerung auf 2,04 g/(L·h) mit 2 mM Eisen(II)-salz auftritt. Des Weiteren konnte die maximale Produktivität der Bakterien bezüglich der Kontrolle um maximal 0,71 g/(L·h) mit 2 mM Eisen(II)-sulfat gesteigert werden. Ein weiterer Vorteil für eine industrielle Anwendung ist, dass auf Salzkomponenten, wie Mangan verzichtet werden kann, da sie mit dem günstigeren Eisen(II)-salz ersetzt werden können.

Einfluss von Spurenelemente und Magnesiumsulfat auf die Kultivierung des *Sporolactobacillus* sp. 2

Die Experimente zur Untersuchung der Einflüsse der Spurenelemente und des Magnesiumsulfats wurden analog zu den Ansätzen hinsichtlich des *Sporolactobacillus* sp. 1 gemacht. Der Kontroll-Ansatz enthielt ebenfalls alle Salzkomponenten, wobei bei den weiteren Ansätzen entweder auf das Magnesiumsulfat oder auf die Spurenelemente verzichtet worden sind. Als Parameter wurden die durchschnittliche Produktivität [g/(L·h)] und die Lag-Phase der Bakterien anhand der D-Milchsäure-Konzentration [g/L] nach 48 Stunden gewählt (Abbildung 22).

Die Produktivitätswerte mit 1,08 g/(L·h) für den Ansatz ohne Magnesiumsulfat und dem Kontrollwert mit 0,98 g/(L·h) unterscheiden sich nur geringfügig. Hingegen erreicht der Ansatz ohne die Spurenelemente im Vergleich nur einen Wert von 0,47 g/(L·h), was auch für diese Untersuchung den Schluss zulässt, dass die Mangan- und Eisensalze für das bakterielle Wachstum essentiell sind. Vergleicht man des Weiteren die Lag-Phase der Bakterien, so stellt man einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrolle und dem Ansatz ohne Magnesiumsulfat fest. Während das Kontrollexperiment eine D-Milchsäure-Konzentration von 21,5 g/L nach 48 Stunden erreicht, so wird zum selben Zeitpunkt eine Produktkonzentration von 50,2 g/L im Ansatz ohne Magnesiumsulfat gemessen. Hingegen erreicht der Ansatz ohne die Spurenelemente mit 18,6 g/L D-Milchsäure einen ähnlichen Wert wie die Kontrolle.

Im Vergleich zu den Ergebnissen bezüglich des *Sporolactobacillus* sp. 1, wo das Magnesiumsulfat nur einen geringen Einfluss auf die Produktivität hat, wird hier deutlich, dass sich das Magnesiumsulfat zusammen mit den anderen Spurenelementsalzen (Kontrolle) negativ auf das initiale Wachstum der Bakterien auswirkt.

Wobei diese Tatsache nicht unbedingt dem Magnesiumsulfat als Salzspezies geschuldet sein muss, sondern möglicherweise auch damit erklärt werden kann, dass der *Sporolactobacillus* sp. 2 empfindlicher gegenüber einer Erhöhung der Ionenstärke bei geringer Zellzahl ist als im Vergleich

zum *Sporolactobacillus* sp. 1. Weitere Untersuchungen vergleichend zu Abbildung 21 wurden mit dem *Sporolactobacillus* sp. 2 aus Zeit Gründen nicht durchgeführt.

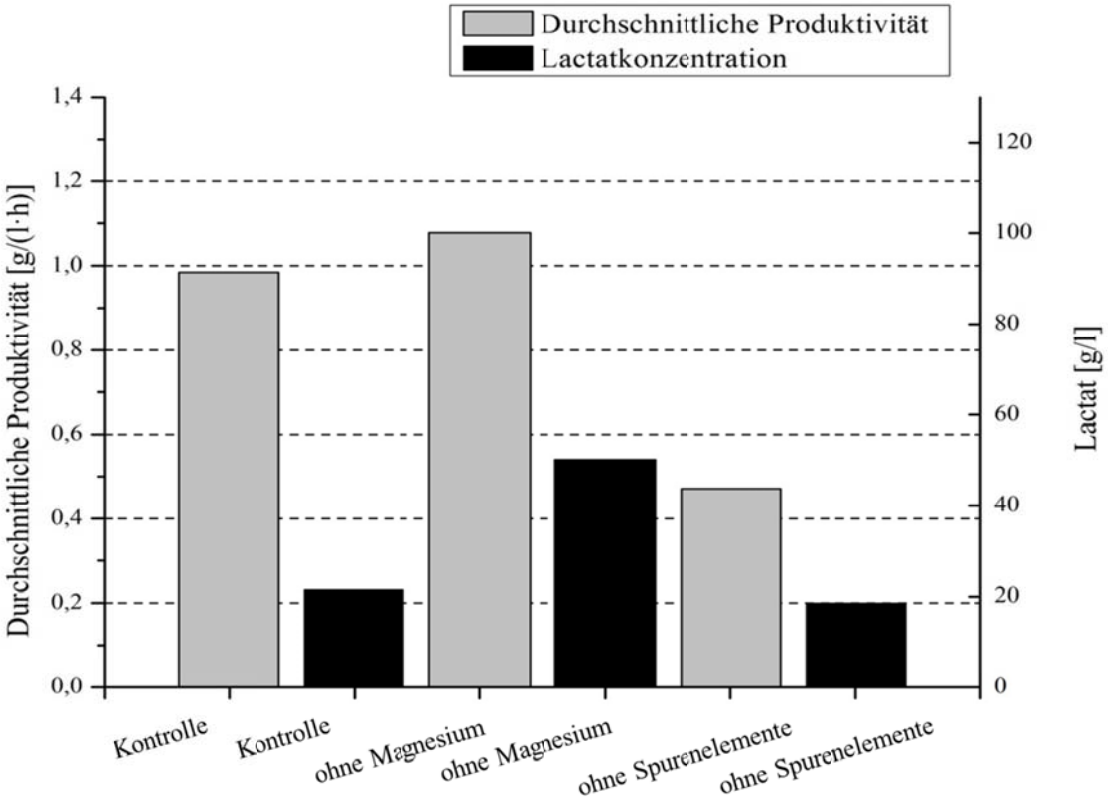


Abbildung 22: Einfluss der Salze auf den *Sporolactobacillus* sp.2; 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

AP 3. 2.e) Optimierung der Konzentrationen von Hefeextrakt und Glucose

Um die Produktivität der beiden Stämme zu optimieren, wurden Variationen bezüglich der Glucose- und Hefeextraktkonzentration durchgeführt.

Getestet wurden Hefeextraktkonzentrationen von 3, 5, 8, 10, 15 und 20 g/L sowie Glucosekonzentrationen von 80, 100, 120 und 150 g/L mit *Sporolactobacillus sp.1* und 50, 80, 100 und 120 g/L mit *Sporolactobacillus sp.2* (Abbildung 23).

Dadurch wurde für *Sporolactobacillus sp.1* eine maximale Produktivität von 3,45 g/(L·h) bei 10 g/L Hefeextrakt und 120 g/L Glucosestartkonzentration ermittelt. Für *Sporolactobacillus sp.2* wurde bei einer Hefeextraktkonzentraion von ebenfalls 10 g/L und einer Glucosekonzentration von 100 g/L eine maximale Produktivität von 2,10 g/(L·h) erzielt.

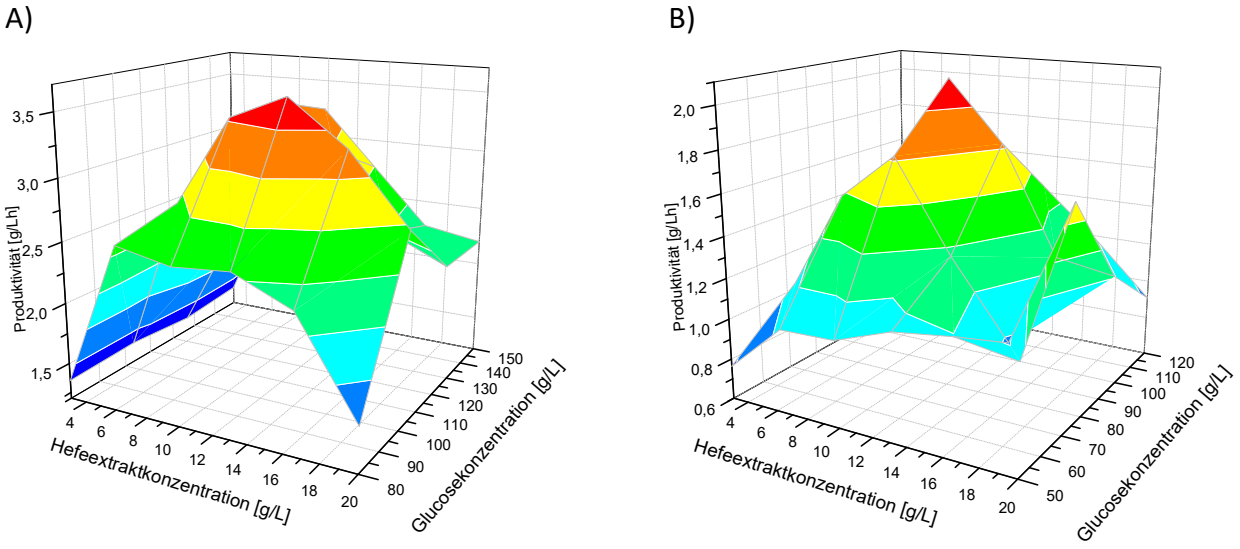


Abbildung 23: Produktivität in Abhängigkeit der eingesetzten Hefeextrakt- und Glucosekonzentration für A) *Sporolactobacillus* sp.1 und B) *Sporolactobacillus* sp.2; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

AP 3. 2.f) Vergleich von Ammoniak und Calciumcarbonat als Neutralisationsmittel

Untersuchung zur Reaktionsführung im Schüttelkolben

Ziel dieser Experimente ist es, eine geeignete Reaktionsführung hinsichtlich der D-Milchsäure-Produktion mit $CaCO_3$ als Neutralisationsmittel zu ermitteln. Die Untersuchung zur Variation der Initial-Biomasse hat ergeben (siehe Kapitel AP3.2.c.)), dass die Kultivierungsexperimente mit höherem Inokulum bezüglich der Produktivität und Produktendkonzentration niedrigere Werte erzielt haben, als im Vergleich zu den Experimenten mit geringerer Initial-Biomasse. Diese Ergebnisse sind damit begründet worden, dass der pH-Wert zu Beginn der Kultivierung mit höheren Inokulum relativ stark abfiel und der damit einhergehende pH-Stress einen negativen Einfluss auf das Gesamtergebnis der Kultivierung gehabt hat. Um diese Stresssituation für die Bakterien zu vermeiden, ist ein Fed-Batch-Experiment (FB) mit reduzierter Glucose-Startkonzentration (80 g/L) bei geleichbleibender $CaCO_3$-Startkonzentration (60 g/L) gemacht worden. Das Inokulum für dieses Experiment betrug ebenfalls zehn Prozent einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 2,0. Die Ergebnisse Fed-Batch-Experiments sind in der Abbildung 24 anhand der D-Milchsäure-bzw. Glucose-konzentration [g/L] gegen die Zeit [h], sowie des pH-Verlaufs aufgetragen. Im Vergleich dazu ist der Kurvenverlauf des Batch-Experiments (B) mit 150 g/L Glucose-Startkonzentration bei gleichem Inokulum und gleicher $CaCO_3$-Startkonzentration dargestellt (Abbildung 24).

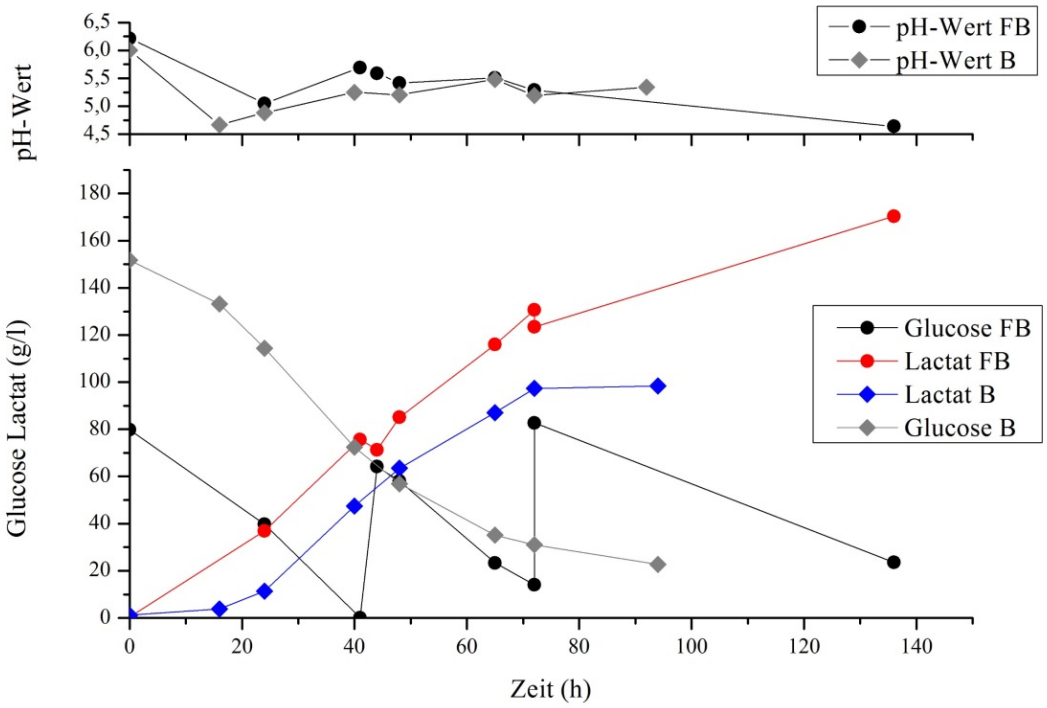


Abbildung 24: Vergleich einer Batch Kultivierung (B) mit 150 g/L Glucose-Startkonzentration und einem Fed-Batch-Experiment (FB) mit reduzierter Glucose-Startkonzentration (80 g/L) bei gleichbleibender $CaCO_3$-Startkonzentration (60 g/L); *Sporolactobacillus* sp.1, 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm.

Aus der Abbildung 24 ist ersichtlich, dass der pH-Verlauf zu den jeweiligen Probenahmepunkten (bis zu 40 h) im Fed-Batch-Experiment im Vergleich zu dem Batch-Experiment tendenziell höhere Werte aufzeigt. Darüber hinaus sind die Produktkonzentrationen mit 37 g/L D-Milchsäure nach 24 h und 75,6 g/L nach 40 h im Fed-Batch-Ansatz deutlich höher als im Vergleich zum Batch-Experiment (27,7 g/L nach 24 h und 63,6 g/L nach 40 h).

Der Kurvenverlauf des Fed-Batch-Experiments zeigt, dass die Glucose nach 42 h komplett verbraucht ist. Da der zweite Glucose-Feed (64,14 g/L und weitere 30 g/L $CaCO_3$) aber erst nach 44 h erfolgt ist, kann daraus geschlossen werden, dass die Bakterien unempfindlich gegenüber einer Limitierung der Kohlenstoffquelle sind, da sie nach erneuter Glucosezufuhr ohne signifikanten Produktivitätsverlust weiter D-Milchsäure bilden.

Nach 72 h erfolgte der dritte Feed (mit 68,65 g/L Glucose), wobei zu diesem Zeitpunkt eine Produktkonzentration von 130,62 g/L gemessen werden konnte. Letztendlich ist das Experiment nach 136 h beendet worden, da zum einen der pH-Wert für die weitere Kultivierung in einem suboptimalen Bereich lag.

Die Daten in der Tabelle 9 zeigen, dass durch die Reaktionsführung mittels Fed-Batch die D-Milchsäure-Konzentration signifikant erhöht werden kann, während die durchschnittliche Produktivität um ca. 20 % und die Ausbeute um 15 % gesteigert werden können. Zudem kann diesem Ergebnis noch weitere wichtige Informationen entnommen werden. So können mit 10 g/L Hefeextrakt mindestens 190 g/L Glucose umgesetzt werden. Dies bedeutet, dass die Bakterien das vorhandene Nährstoffangebot effizient nutzen können und dass mögliche Limitierungen durch wichtige Medienkomponenten, wie z.B. Stickstoff und Phosphat, für das Batch-Experiment ausgeschlossen werden können.
Somit scheint die Empfindlichkeit der Bakterien auf suboptimale pH-Bedingungen im sauren Bereich ein sehr entscheidender Faktor für die Kultivierung zu sein.

Tabelle 9: Ergebnisse der Batch Kultivierung (B) mit 150 g/L Glucose-Startkonzentration und einem Fed-Batch-Experiment (FB) mit reduzierter Glucose-Startkonzentration (80 g/L) bei gleichbleibender $CaCO_3$-Startkonzentration (60 g/L) und *Sporolactobacillus* sp.1.

Reaktionsführung	D-Milchsäure-Endkonzentration [g/L]	Durchschnittliche Produktivität [g/(L·h)]	Ausbeute [%]
Fed-Batch	170,35	1,25	80,60
Batch	99,94	1,09	65,88

Optimierung der D-Milchsäure-Produktion im Bioreaktor

Anhand der Ergebnisse der Reaktionsführung (Tabelle 9) wurde weiter untersucht, inwiefern die Produktivität der Bakterien im Bioreaktor mit $CaCO_3$ als Neutralisationsmittel mittels Fed-Batch (FB) gesteigert werden kann. Dazu wurden Experimente mit unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten gemacht (FB1 bei 750 Upm und FB2 bei 250 Upm). Somit sollte die bessere Homogenisierung von Neutralisationsmittel und Medium eine effizientere Pufferung bei gleicher Massenkonzentration (60 g/L) sicherstellen. Die Ansätze wurden mit 10 % Inokulm einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 2 und 90 g/L Glucose gestartet (Abbildung 25).

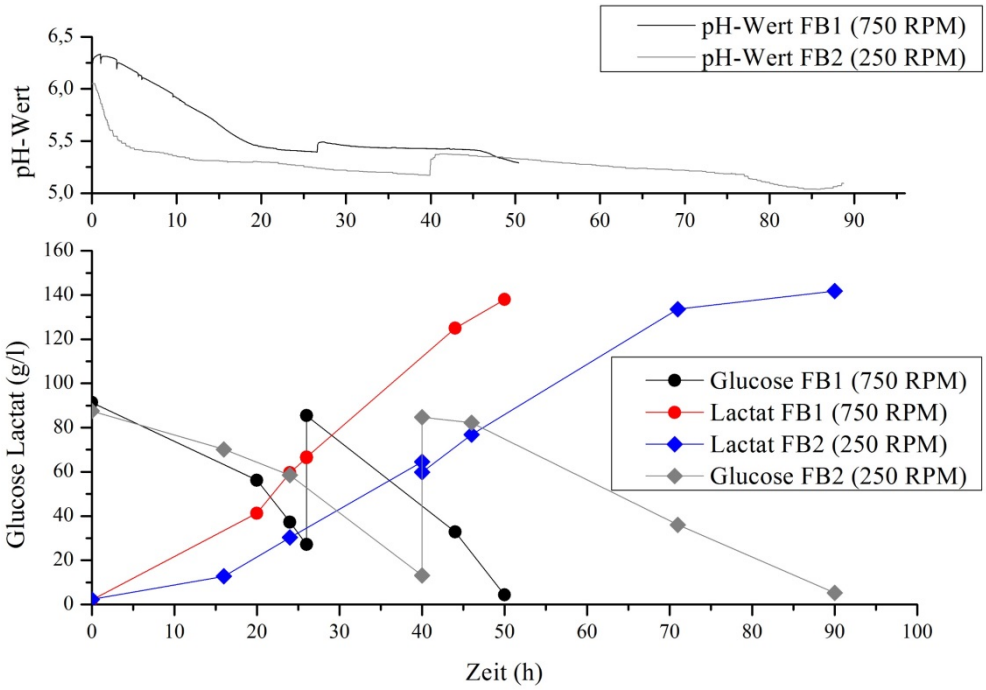


Abbildung 25: Fed-Batch-Experiment mit unterschiedlicher Rührgeschwindigkeit; *Sporolactobacillus* sp.1, 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 60 g/L $CaCO_3$.

Der Ansatz FB1 mit der höheren Rührergeschwindigkeit von 750 Upm erreicht nach 24 h eine fast doppelt so hohe Produktkonzentration (59,6 g/L) im Vergleich zum Experiment FB2. Mit der geringeren Rührgeschwindigkeit wird nach gleicher Kultivierungsdauer nur 30,3 g/L Milchsäure gebildet. Eine vergleichbare Konzentration (64,5 g/L) wird mit der geringern Rührung erst nach 40 h erreicht.

Der zweite Feed ist bei dem Ansatz FB1 (750 Upm) nach 28 h erfolgt. Es wurden 58 g/L Glucose und 15 g/L $CaCO_3$ zugeführt um den pH-Wert über pH 5,5 zu halten. Hingegen ist bei dem Ansatz FB2 (250 Upm) der zweite Feed (71,6 g/L Glucose) erst nach 40 h erfolgt, wobei hier 30 g/L $CaCO_3$ nötig waren um den pH-Wert bei ca. 5,5 zu halten.

Zusätzlich wurde ab 44 h bei dem Experiment FB1 die Rührgeschwindigkeit auf 1000 Upm erhöht, um angesichts der hohen Viskosität durch das präzipitierte Calciumlactat die weitere Durchmischung im Bodenbereich der Reaktoren aufrechtzuerhalten. Das Experiment wurde bei komplettem Verbrauch der Glucose nach 50 h beendet, während die Glucose bei dem Experiment FB2 erst nach 96 h vollständig umgesetzt wurde.

Es zeigte sich, dass mit höherer Rührgeschwindigkeit, die Pufferung durch das suspendierte $CaCO_3$ effektiver ist und die Produktivität an D-Milchsäure durch die Bakterien erhöht ist (Abbildung 25, Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse des Fed-Batch-Experimentes mit unterschiedlicher Rührgeschwindigkeit; *Sporolactobacillus* sp.1, 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 60 g/L $CaCO_3$.

Experiment	D-Milchsäure-Endkonzentration [g/L]	Durchschnittliche Produktivität [g/(L·h)]	Insgesamt eingesetztes $CaCO_3$ [g/L]	Ausbeute [%]
FB1-750 Upm	137,94	2,82	75	94,93
FB2-250 Upm	141,86	1,58	90	89,18

Es konnte gezeigt werden, dass eine Verbesserung der Homogenität durch eine gesteigerte Rührgeschwindigleit (um 500 Upm) fast zu einer Verdoppelung der durchschnittliche Produktivität führt (FB1), wobei in beiden Experimenten vergleichbare Produktendkonzentrationen erreicht werden (Tabelle 10). Zudem konnte hier die Menge an eingesetzten $CaCO_3$ reduziert werden, welche ungefähr dem theoretischen Verhältnis der zur Komplexierung der Milchsäure-Ionen nötigen Ca^{2+}-Ionen (2:1) entspricht.

Untersuchung zur Reaktionsführung im Bioreaktor mit NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel

Analog zu der Kultivierung mit $CaCO_3$ als Neutralisationsmittel, sollte mit Hilfe dieser Experimente getestet werden, welche Reaktionsführung für die Kultivierung mit Ammoniakwasser als Neutralisationsmittel am besten geeignet ist. Dazu wurden zum einen Ansätze im Batch-Experiment (B) mit 150 g/L Glucose durchgeführt und zum anderem Fed-Batch Experimente (FB) mit einer Startkonzentration von 80 g/L Glucose. Als Inokulum wurden 10 % einer Vorkultur bei einer OD_{605} von 2,0 verwendet.

Darüber hinaus wurde bei diesen Experimenten eine 6,75 M Ammoniaklösung verwendet, um eine möglichst hohe Produktkonzentration zu erhalten (Abbildung 26). Der Sollwert für die Titration wurde auf pH 5,8 eingestellt (siehe AP3. 2.b).

Die Reaktionsführung in Abhängigkeit der Glucosestartkonzentration hat keinen Einfluss auf das Wachstum bzw. auf die Produktivität der Bakterien (Abbildung 26, Tabelle 10). Beide Ansätze erreichen nach 24 h eine ähnliche Produktkonzentration (58,7 g/L im Fed-Batch-Experiment und 62,2 g/L im Batch-Ansatz). Zudem weisen beide Experimente eine vergleichbare Produktivität auf. Der Batch-Ansatz erzielt einen Wert von 2,32 g/(L·h) und für das Fed-Batch-Experiment kann ein Wert von 2,23 g/(L·h) nach 40 h berechnet werden. Die Produktkonzentrationen erreichen zu diesem Zeitpunkt 89,5 g/L D-Milchsäure im Fed-Batch und 92,6 g/L im Batch-Experiment. Darüber hinaus verringert sich die Produktivität der Bakterien signifikant. So beträgt die durchschnittliche Produktivität für die Zeit zwischen 40 und 90 h Kultivierungsdauer im Batch nur noch 0,40 g/(L·h), während das Fed-Batch-Experiment für diesen Zeitraum einen Wert von 0,57 g/(L·h) aufweist.

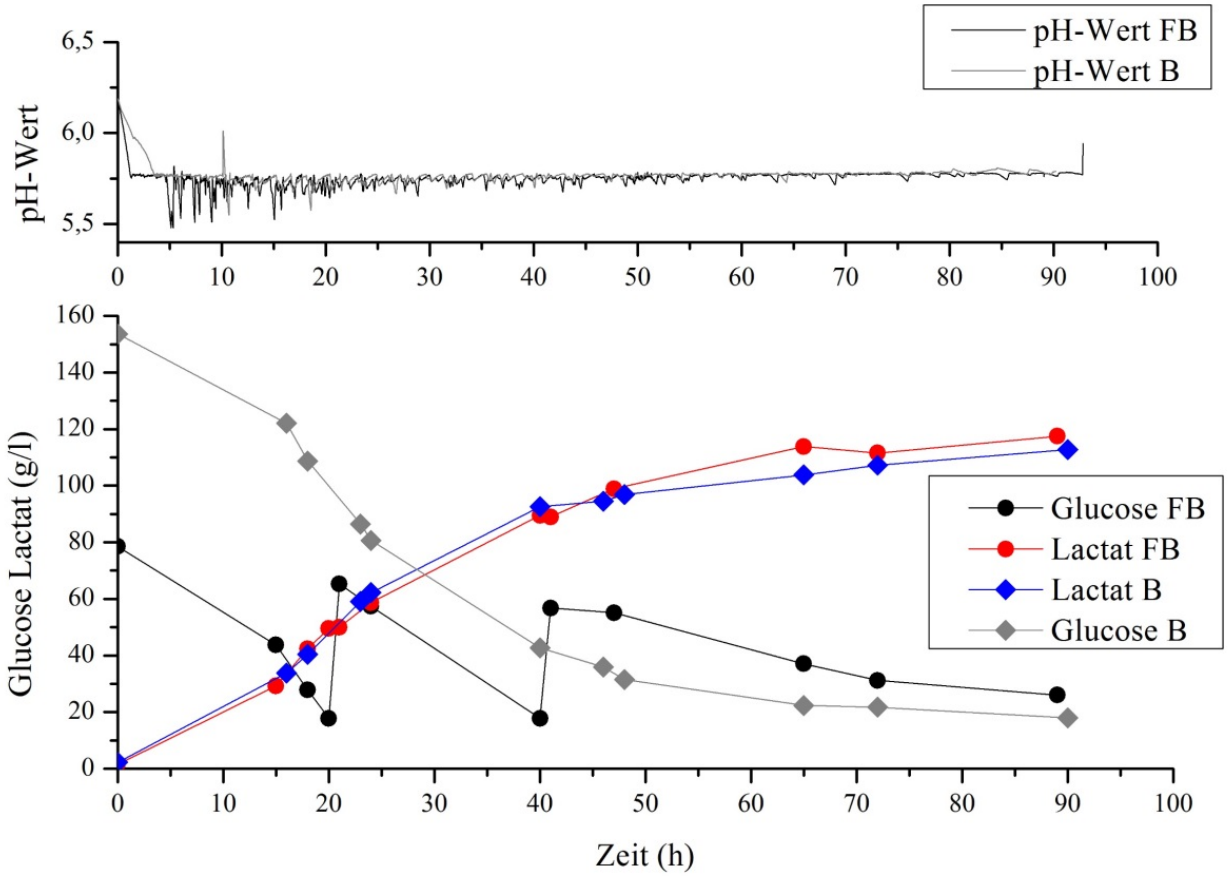


Abbildung 26: Vergleich einer Batch Kultivierung (B) mit 150 g/L Glucose-Startkonzentration und einem Fed-Batch-Experiment (FB) mit reduzierter Glucose-Startkonzentration (80 g/L) mit 6,75 M Ammoniaklösung als Neutralisationsmittel; *Sporolactobacillus* sp.1, 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 250 Upm, pH 5,8.

Tabelle 11: Ergebnisse der Batch Kultivierung (B) mit 150 g/L Glucose-Startkonzentration und einem Fed-Batch-Experiment (FB) mit reduzierter Glucose-Startkonzentration (80 g/L) mit 6,75 M Ammoniaklösung als Neutralisationsmittel; *Sporolactobacillus* sp.1, 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 250 Upm, pH 5,8.

Experiment	D-Milchsäure-Endkonzentration [g/L]	Durchschnittliche Produktivität [g/(l·h)]	Ausbeute [%]
Batch (B)	112,83	1,25	86,34
Fed-Batch (FB)	117,56	1,32	92,82

Ein Vergleich der Tabelle 10 und Tabelle 11 zeigt, dass mit beiden Neutralisationsmitteln vergleichbare Ausbeuten erzielt werden können. Hingegen sind die Produktendkonzentration durch die Verdünnung mit NH_3 H_2O geringer und die Produktivität der Bakterien ist im Vergleich zu den $CaCO_3$-Ansätzen verringert. In weiteren Experimenten soll für den *Sporolactobacillus* sp. 1 geprüft werden, inwiefern eine Steigerung des pH-Werts während der Kultivierung die Produktion beeinflusst.

Optimierung der D-Milchsäure-Produktion im Bioreaktor mittels pH-Shift mit NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel

Der Hintergrund dieser Experimente beruht auf der Publikation von Zhao et al. (2014). In diesem Artikel ist experimentell festgestellt worden, dass bei Kultivierungsbedingungen über dem für das Wachstum der Bakterien optimalen pH-Wert eine Steigerung der D-Milchsäure-Produktion erreicht werden kann (Zhao et al. 2014). So wurde in dieser Studie ermittelt, dass sich die Zellen bei pH 5,0 und 5,5 besser reproduzieren konnten, aber die D-Milchsäure-Produktion bei pH-Werten größer 6,0 im Vergleich höher war. Die Autoren begründeten diese Erkenntnis damit, dass bei steigender D-Milchsäure-Konzentration bei pH-Werten von 5,0-5,5 der Anteil an nicht-dissoziierter D-Milchsäure ebenfalls zunimmt, welcher die Bakterien bei der weiteren Produktion hemmt.

Im Falle des *Sporolactobacillus* sp. 1 kann davon ausgegangen werden, dass die D-Milchsäure-Produktion zum größten Teil wachstumsgekoppelt ist (vergleiche Kapitel AP1) und die Bakterien sich über pH-Wert 5,8 langsamer reproduzieren (vergleiche Kapitel AP3.2.b.)). Infolgedessen soll getestet werden, ob ein produktkonzentrationsabhängiger pH-Shift auf pH 6,5 die Produktivität der Bakterien steigern kann.

Dazu sind pH-Shift-Experimente bei einer D-Milchsäure-Konzentrationen von 20 g/L (Ansatz 1), 50 g/L (Ansatz 2), 60 g/L (Ansatz 3) und 70 g/L (Ansatz 4) durchgeführt worden. Ergänzend dazu, wurden zwei Kontrollen bei konstanten pH-Werten (Ansatz 5 mit pH 5,8 und Ansatz 6 mit pH 6,5) als Referenz angesetzt. Ferner sind die Ergebnisse der Experimente in der Abbildung 27 anhand der durchschnittlichen Produktivität [g/(L·h)] nach 51 Stunden aufgetragen.

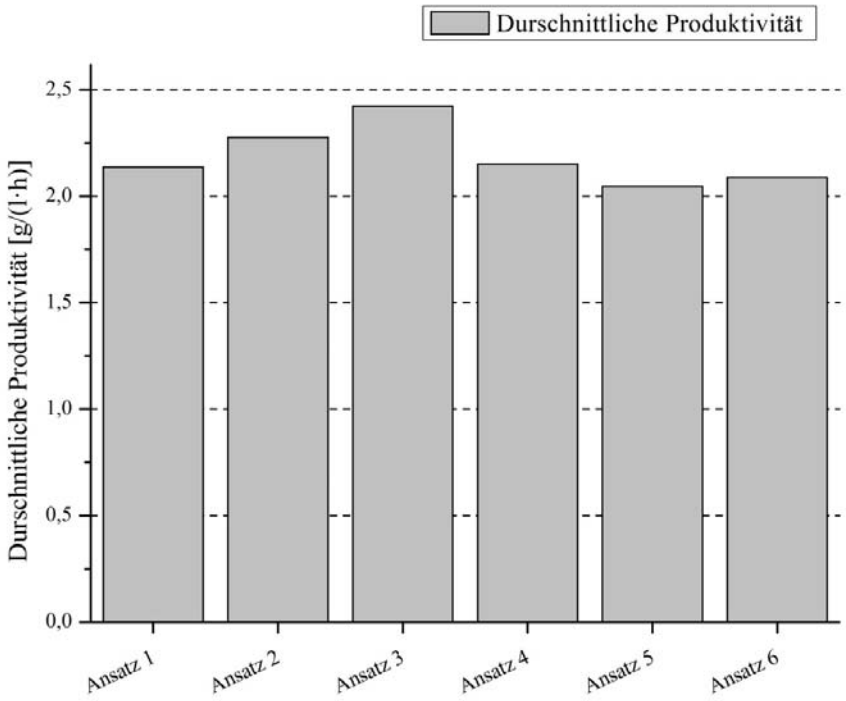


Abbildung 27: pH-Shift-Experimente bei einer D-Milchsäure-Konzentrationen von 20 g/L (Ansatz 1), 50 g/L (Ansatz 2), 60 g/L (Ansatz 3), 70 g/L (Ansatz 4) und zwei Kontrollen bei konstanten pH-Werten (Ansatz 5 mit pH 5,8 und Ansatz 6 mit pH 6,5) mit NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel auf pH 6,5; *Sporolactobacillus* sp.1, 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 250 Upm.

Tabelle 12: Wichtigen Kennzahlen der pH-Shift-Experimente bei einer D-Milchsäure-Konzentrationen von 20 g/L (Ansatz 1), 50 g/L (Ansatz 2), 60 g/L (Ansatz 3), 70 g/L (Ansatz 4) und zwei Kontrollen bei konstanten pH-Werten (Ansatz 5 mit pH 5,8 und Ansatz 6 mit pH 6,5) mit NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel auf pH 6,5; *Sporolactobacillus* sp.1, 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 250 Upm.

Ansatz	D-Milchsäure-Endkonzentration [g/L]	Ausbeute [%]	Maximale OD_{605}
(1) pH-Shift (20 g/L Milchsäure)	111,10	87,20	8,95
(2) pH-Shift (50 g/L Milchsäure)	117,03	96,16	9,64
(3) pH-Shift (60 g/L Milchsäure)	126,06	98,25	10,98
(4) pH-Shift (70 g/L Milchsäure)	113,64	91,38	9,42
(5) Kontrolle pH 5,8	106,36	82,09	10,27
(6) Kontrolle pH 6,5	108,60	83,82	7,30

Im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Ansatz 5 und 6) wurde mit einem pH-Shift während der Kultivierung die Produktivität der Zellen gesteigert (Abbildung 27). Ein Maximalwert der Produktivität wird bei dem Ansatz 3 (Shift bei 60 g/L) mit 2,48 g/(L·h) erzielt. Die Kontrollansätze (Ansatz 5 und 6) weisen hingegen Werte von 2,04 und 2,09 g/(L·h) auf. Somit ergibt sich für den Ansatz (3) eine Produktivitätssteigerung von 0,42 g/(L·h) im Vergleich zu den gemittelten Werten der Kontrollen.

Mit Ausnahme des Ansatzes 1 konnte durch den pH-Shift die Ausbeute und die Produkt-Endkonzentrationen gesteigert werden (Tabelle 12). Des Weiteren ist ersichtlich, dass sich die maximalen OD_{605}-Werte hinsichtlich der pH-Shift-Experimente (2) bis (4) und der Kontrolle (5) kaum unterscheiden. Lediglich der Ansatz (1) weist eine geringere maximale OD_{605} auf. Hingegen sind die maximalen OD_{605}-Werte für die beiden Kontrollen (5) und (6) deutlich abweichend, wobei die Werte bezüglich der Produktivität, Endkonzentration und Ausbeute annährend gleich sind.

Das legt die Vermutung nahe, dass sich die Effekte folglich der Produktinhibition durch nicht-dissoziierte Säure bei pH 5,8 und das verringerte Populationswachstum durch suboptimale Bedingungen bei pH 6.5 gegenseitig aufheben und zu ähnlichen Ergebnissen führen. Ferner kann angenommen werden, dass der Ansatz (1) möglicherweise bei zu niedriger Produktkonzentration durchgeführt wurde, so dass die Zellen in Folge bei pH 6,5 zu stark in ihrem Wachstum gehindert worden sind. Umgekehrt wäre dann der Ansatz (4) bei zu hoher Produktkonzentration erfolgt, was dazu führte, dass die Bakterien durch die nicht-dissoziierte Säure inhibiert wurden. In beiden Fällen würde das die niedrigeren Werte entsprechend der Produktivität, Produktendkonzentration und Ausbeute im Vergleich zu den Ansätzen (2) und (3) erklären.

Zusätzlich zur Konzentrationsabhängigkeit des pH-Shifts, könnten auch weitere pH-Werte unter pH 6,5 getestet werden. Möglicherweise reicht auch eine geringere pH-Steigerung aus um der Produktinhibition durch den Anteil an nicht-dissozierter Säure effektiv entgegenzuwirken. Zudem würde sich eine geringere pH-Steigerung auch weniger negativ auf das Wachstum der Bakterien auswirken, wodurch letztendlich eine höhere durchschnittliche Produktivität erzielt werden könnte.

AP 3. 3. Fermentationsstrategie

Aufgrund der besseren Kultivierungsergebnisse von *Sporolactobacillus* sp.1 fokussieren sich die folgenden Versuche auf die Nährstoffanforderungen dieses Stammes und die entsprechenden Optimierungsmöglichkeiten. Folgende Fermentationsstrategien sollen auf die Eignung zur Herstellung von D-Milchsäure untersucht werden: Batch, fed-batch, kontinuierlicher Prozess sowie der Einsatz immobilisierter Biokatalysatoren.

Batch und fed-batch

Sporolactobacillus sp.1 zeigt eine starke Abhängigkeit von den verschiedenen Nähstoffquellen (Hefeextrakte, Peptone, Extrakte und Hydrolysate, siehe AP3. 1.c). Im Speziellen sind die Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen unter Einsatz der Hydrolysate gering, was vermutlich an dem unzureichenden Aufschluss der Proben lag. Die Aminosäuren liegen den Analysen zu Folge nach dem Aufschluss der Hydrolysate noch proteingebunden vor und sind für die Zellen nur begrenzt verfügbar. Um nachvollziehen zu können welche Aminosäuren von den Zellen aufgenommen werden, wurde das Medium vor und nach der Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 mit Merck Fermtech® Hefeextrakt (Referenz Nährstoffquelle) analysiert. Abbildung 28 zeigt zum qualitativen Vergleich die Chromatogramme vor und nach der Kultivierung. Hier ist eine deutliche Abnahme der Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Serin, Asparagin, Methionin, Phenylalanin, Histidin, Tyrosin und Tryptophan zu erkennen, die auf eine Limitierung des Prozesses durch Aminosäuren bzw. Stickstoff hinweist.

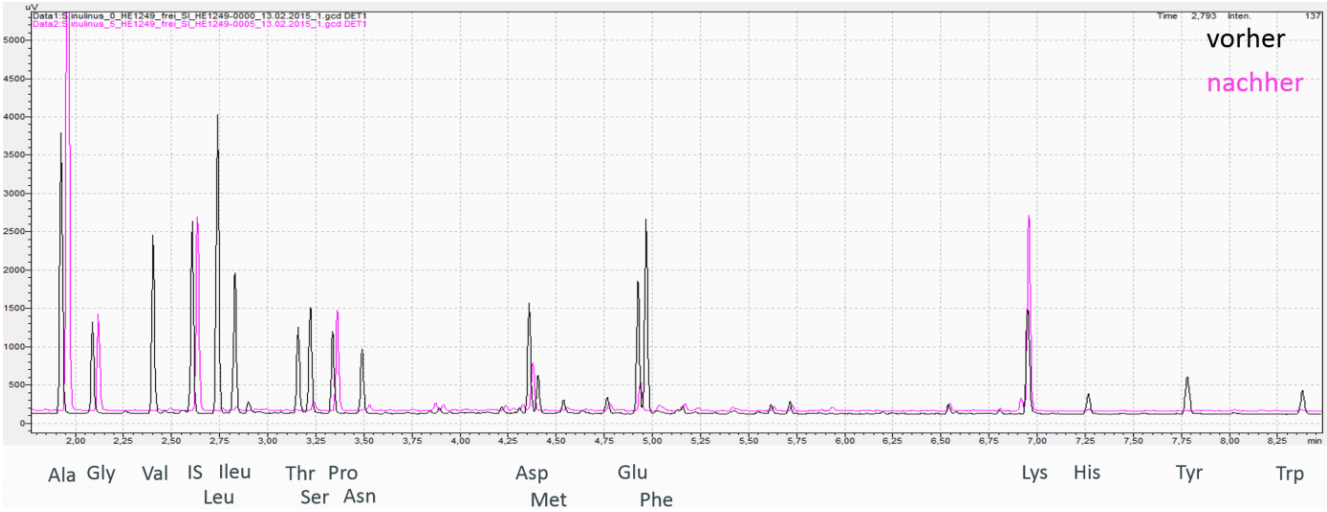


Abbildung 28: Chromatogramm der freien Aminosäuren vor und nach der Kultivierung mit *Sporolactobacillus* sp.1, GC nach Derivatisierung (EZ:faast GC-FID Physiological Amino Acid Analysis Kit, KG0-7165, Phenomenex)

Weitere Versuche zeigten, dass bei der Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 mit höhermolekularen Supplinen zunächst der Gehalt an freien Aminosäuren anstieg, bevor diese dann von den Zellen aufgenommen wurden. Dies weist darauf hin, dass die Zellen mithilfe von Proteasen die Proteine zerkleinern und erklärt die verlängerte *lag*-Phase. Des Weiteren zeigte sich, dass, sobald die oben genannten Aminosäuren verbraucht wurden, die exponentielle Phase und die Milchsäureproduktion endeten.

In einem Fed-Batch-Versuch konnte nachgewiesen werden, dass die fehlenden freien Aminosäuren der Grund für das Abknicken der Produktionskurve waren. In diesem Versuch (Abbildung 29) wurde ausgehend von Merck Fermtech® Hefeextrakt gegen Ende der exponentiellen Phase neben Glucose und Calciumcarbonat die verbrauchte Menge an Aminosäuren zugegeben. Während bei der alleinigen Zugabe von Glucose und Calciumcarbonat die Milchsäureproduktion endete, bevor die gesamte Glucose umgesetzt werden konnte, wurde durch Zugabe der verbrauchten Aminosäuren die exponentielle Phase verlängert und die Glucose vollständig verbraucht. Die Milchsäureendkonzentrationen betrugen 140 g/L ohne Aminosäurezugabe und 172 g/L mit Aminosäurezugabe.

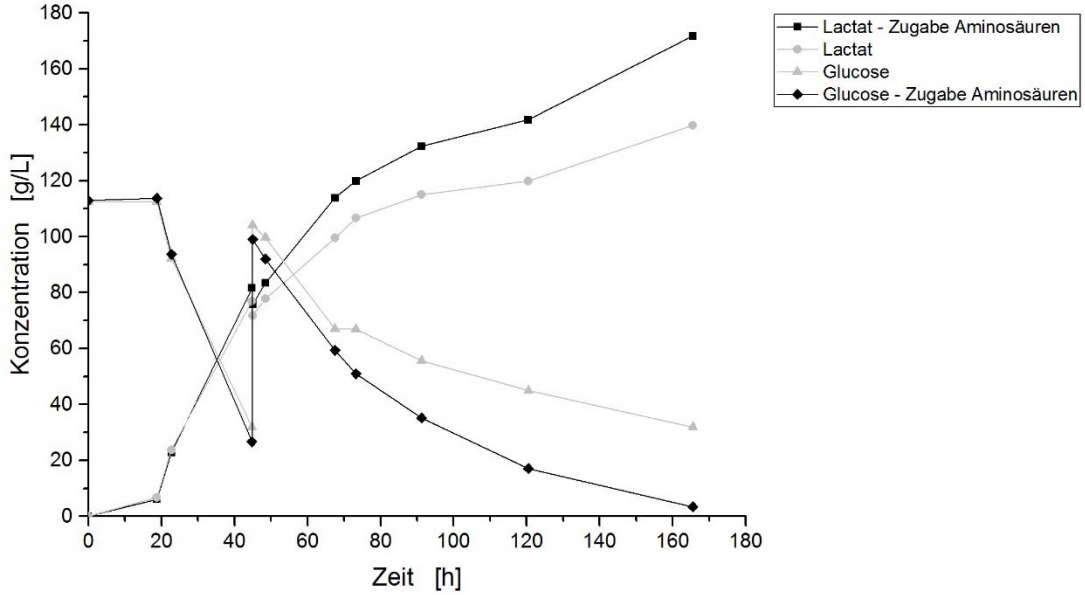


Abbildung 29: Fed-Batch-Versuch von *Sporolactobacillus* sp.1 mit und ohne Zugabe der verbrauchten Aminosäuren; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

In einem zweistufigen Fed-Batch-Versuch (Abbildung 30) wurde anschließend gezeigt, dass sich die Endkonzentration weiterhin steigern lässt, ohne dabei eine wesentliche Abnahme der Produktivität zu beobachten. In diesem Versuch wurde neben Glucose und Aminosäuren auch die Startkonzentration an Vitaminen zugegeben. Es gelang damit, die Milchsäurekonzentration auf 222 g/L zu steigern, wobei auch in diesem Versuch die Glucose vollständig umgesetzt wurde. Im Vergleich dazu erreichte der Batch Ansatz ausgehend von 150 g/L Glucose lediglich eine

Endkonzentration von 105 g/L Milchsäure, wobei die Glucose nicht vollständig abgebaut wurde. Bei gleicher Ausbeute konnte im Vergleich zum Batch Ansatz die Endkonentration und die Produktivität gesteigert werden (Tabelle 13).

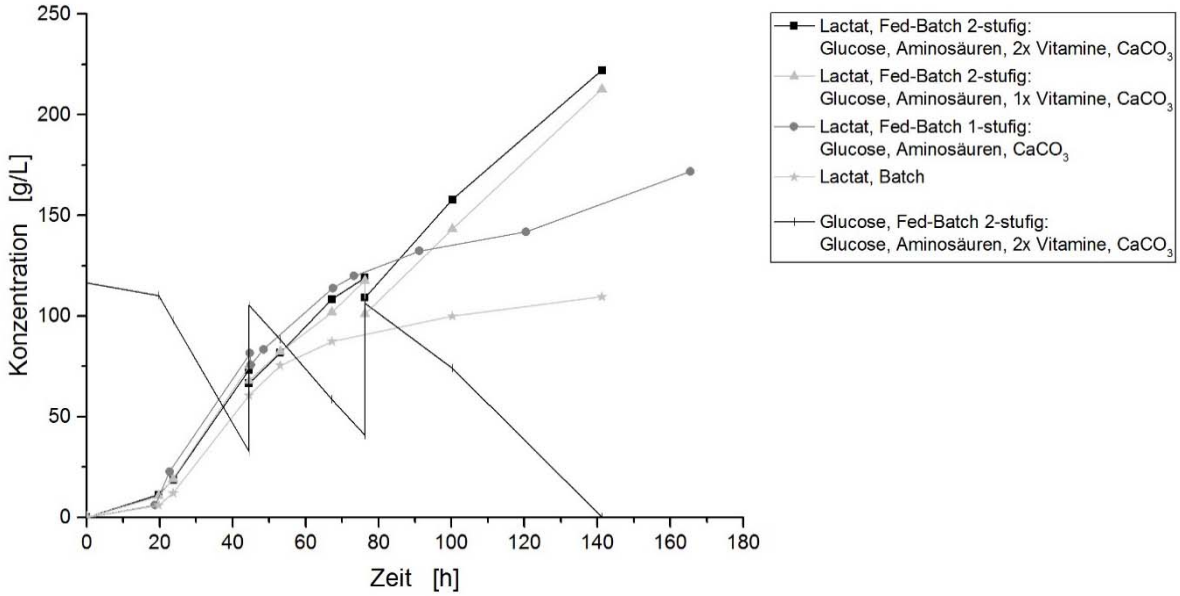


Abbildung 30: Milchsäureproduktion im zweistufigen Fed-Batch-Versuch mit *Sporolactobacillus sp.1;* 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Tabelle 13: Zweistufiger Fed-Batch-Versuch im Vergleich zur Batch Kultivierung mit *Sporolactobacillus* sp.1.

	Fed-Batch zweistufig	Batch
Eingesetzte Glucosekonzentration gesamt [g/L]	255	155
Milchsäurekonzentration nach 141 h [g/L]	222	105
Formiatkonzentration nach 141 h [g/L]	11,6	7,1
Acetatkonzentration nach 141 h [g/L]	2,2	0,75
Propionatkonzentration nach 141 h [g/L]	6,4	2,4
Ausbeute [%]	87,2	88,2
Max. Produktivität bis zur 1. Zugabe [g/(L·h)]	2,63	2,26
Max. Produktivität bis zur 2. Zugabe [g/(L·h)]	1,84	
Max. Produktivität nach der 2. Zugabe [g/(L·h)]	1,74	
Produktivität gesamt [g/(L·h)]	1,57	0,75

Ausbeute bezieht sich auf die verbrauchte Glucosemenge

Während mit *Sporolactobacillus* sp.1 unter Verwendung von Hefeextrakt als Nährstoffquelle Produktivitäten von 3 g/(L·h) erreicht wurden, waren die Produktivitäten bei Einsatz der Hydrolysate (siehe AP 2, S.15/16) gering. Um feststellen zu können, welche Komponenten im Hefeextrakt einen Einfluss auf die Produktivität haben, wurde die Konzentration an Merck Fermtech® Hefeextrakt auf 2 g/L reduziert und Aminosäuren, Vitamine, Phosphat und Ammonium in den Konzentrationen zugegeben, in denen sie in 10 g/L Hefeextrakt vorhanden sind, wobei Ammonium in einem Ansatz ergänzend und in einem Ansatz als Ersatz der Aminosäuren entsprechend der Gesamtstickstoffkonzentration eingesetzt wurde (Abbildung 31).

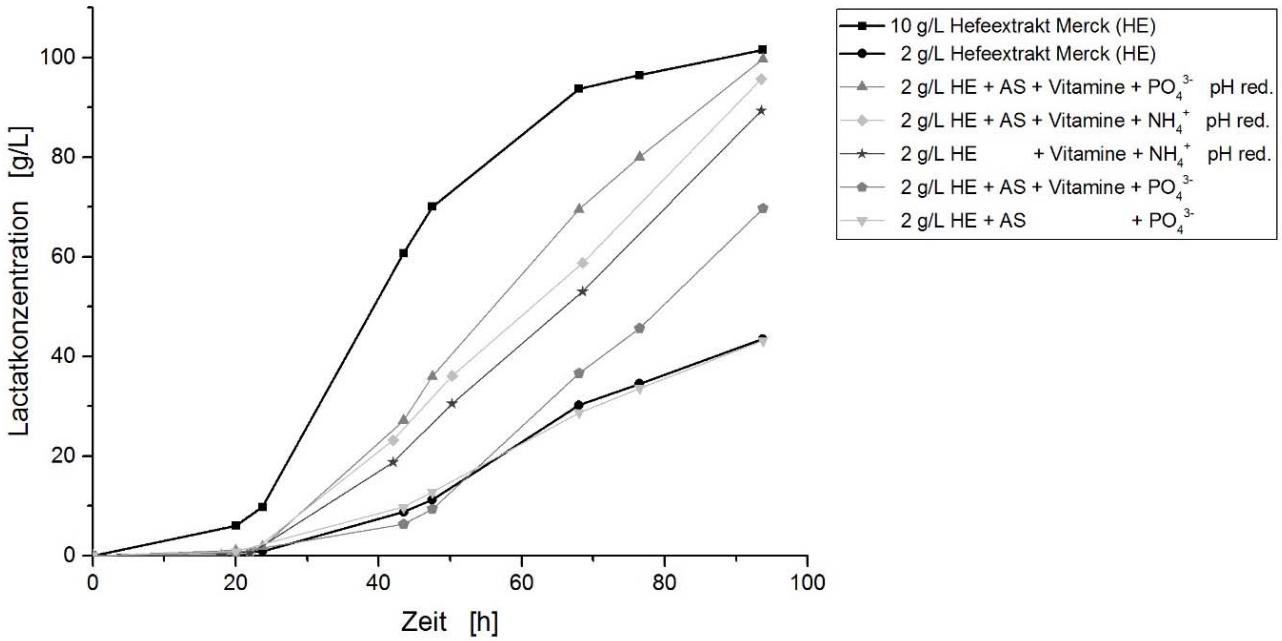


Abbildung 31: Einfluss der Hefeextraktbestandteile auf die Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp. 1; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass die Zugabe von Aminosäuren einen geringen Einfluss auf die Produktivität von *Sporolactobacillus* sp.1 hat, da bei Ersatz der Aminosäuren durch Ammonium eine ähnlich hohe Produktivität erreicht wird. Der Einfluss von Phosphat machte sich nur bei hoher Milchsäureproduktion und damit auch hohem Phosphatverbrauch bemerkbar. So konnte mit Phosphat im Vergleich zu ergänzendem Ammonium eine höhere Produktivität erzielt werden. Der größte Anstieg der Produktivität war allerdings bei der Supplementierung mit B-Vitaminen zu erkennen. Im Vergleich zu der 2 g/L Hefeextrakt-Referenz wurden in allen Ansätzen mit zusätzlichen Vitaminen signifikant höhere Produktivitäten erreicht, die nur etwas geringer ausfielen als die Produktivität der 10 g/L Hefeextrakt-Referenz. Durch eine Verringerung des Start-pH-Wertes konnte auch die *lag*-Phase verkürzt werden.

Bisher wurden nur ganze Stoffklassen auf ihren Einfluss auf die Produktivität getestet. Mithilfe eines vollsynthetischen Mediums gelang es im 96-Deep-Well-Platten-Maßstab den Einfluss der Einzelkomponenten auf die Milchsäureproduktion von *Sporolactobacillus* sp.1 durch Einstellen eines Mangels zu untersuchen. In diesem Versuch zeigte sich bezüglich der Aminosäuren nur bei fehlendem Leucin und Valin eine direkte Einschränkung der Milchsäureproduktion. Die Mängel anderer Aminosäuren hatten keinen Effekt. Bei den Vitaminen führten ein Mangel an Thiamin (B1), Riboflavin (B2), Niacin (B3) und Ca-Pantothenat (B5) zu einem Einbruch der Milchsäureproduktion, während das Fehlen von Pyridoxin (B6), Biotin (B7), Folsäure (B9) und Cyanocobalamin (B12) keine Auswirkungen hatte. Auch ohne Phosphat wurde nur eine geringe Milchsäureproduktion beobachtet (Abbildung 32).

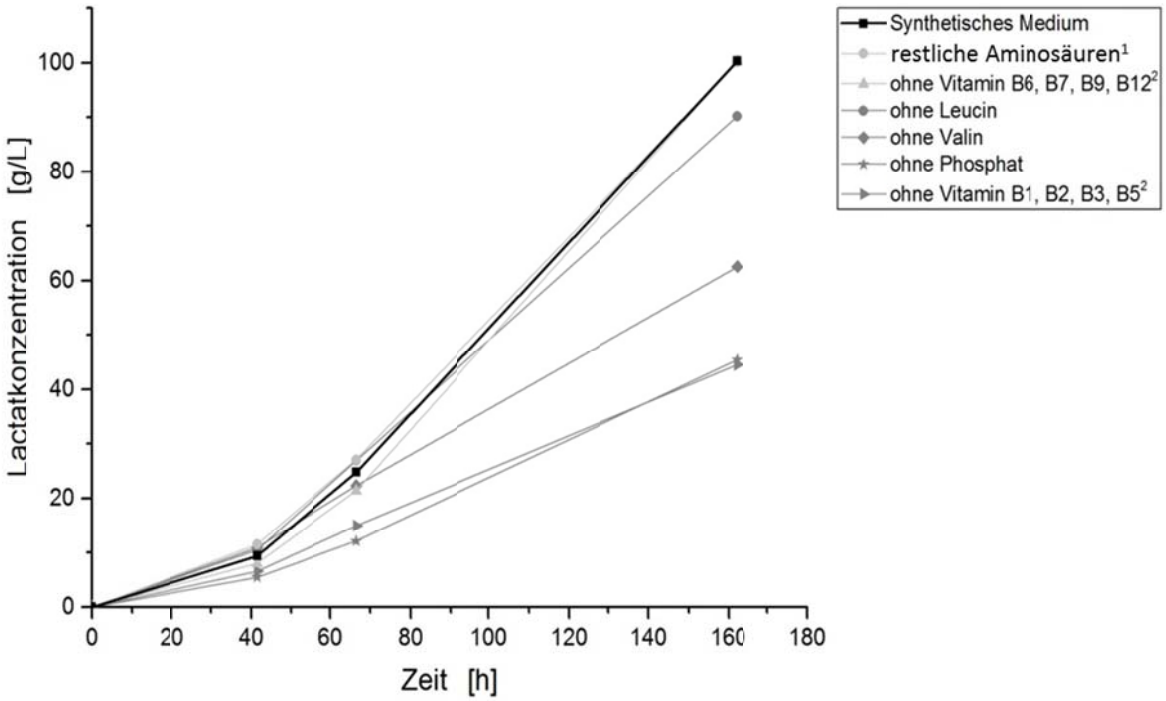


Abbildung 32: Einfluss der Aminosäuren, Vitamine und Phosphat auf die Milchsäureproduktion von Sporolactobacillus sp.1; 96-Deep-Well-Platten (2 mL Kulturvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L CaCO3.

[1] unter restliche Aminosäuren sind Kultivierungen ohne Glycin, Isoleucin, Threonin, Serin, Asparagin, Methionin, Glutaminsäure, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zusammengefasst. Sie wurden einzeln getestet und zeigten einen fast identischen Verlauf der Milchsäureporduktion.

[2] die Vitamine wurden ebenfalls einzeln getestet. Daraus ergaben sich diese zwei Gruppen mit fast identischem Verlauf der Produktionskurve

Durch die Zugabe von Nukleosiden zum synthetischen Medium konnte die Produktivität nochmals gesteigert werden. Eine Abnahme der Milchsäureproduktion wurde hierbei insbesondere bei

mangelndem Guanosin und Thymidin beobachtet, während Nukleobasen und Nukleotide keine Veränderung zur Folge hatten (Abbildung 33).

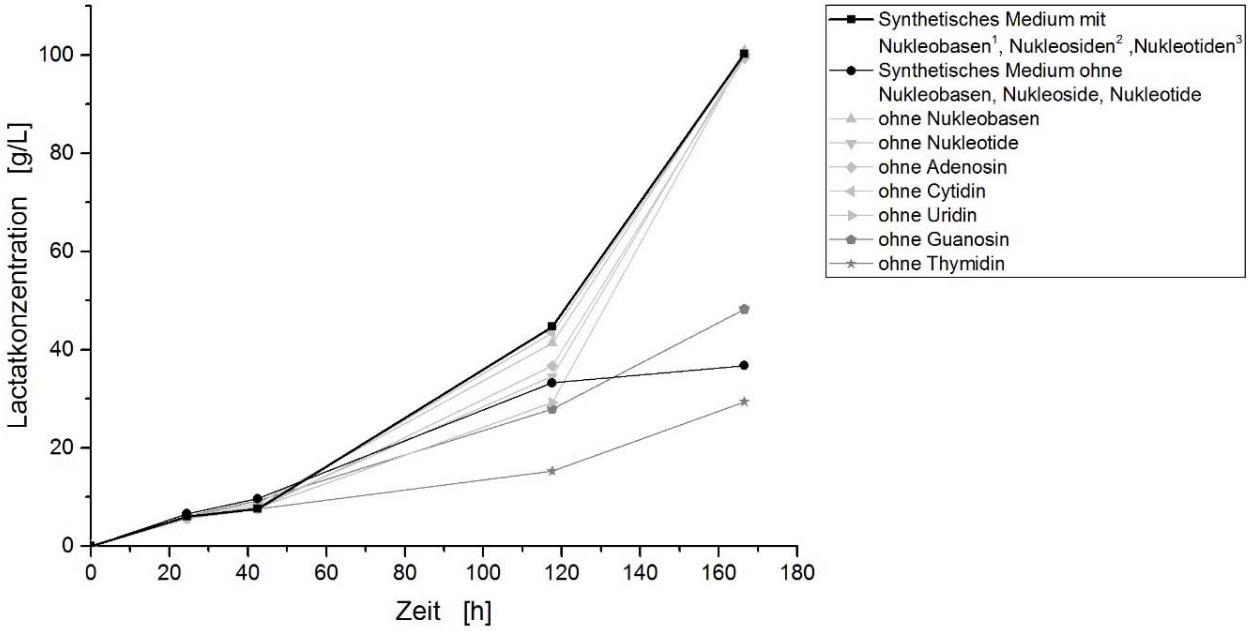


Abbildung 33: Einfluss der Nukleobasen, Nukleoside und Nukleotide auf die Milchsäureproduktion von *Sporolactobacillus* sp.1; 96-Deep-Well-Platten (2 mL Kulturvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

[1]Nukleobasen: Adenin und Cytosin

[2] Nukleoside: Adenosin, Cytidin, Uridin, Guanosin und Thymidin

[3] Nukleotide: AMP, ADP, ATP, GMP

Diese Erkenntnisse wurde im Folgenden genutzt, um die günstigen Rohstoffe als Nährstoffquellen für *Sporolactobacillus* sp.1 verfügbar zu machen. Dabei stellte bisher der geringe Hydrolysegrad, durch den die Proteine nicht effizient genutzt werden konnten, ein Problem dar. Dieses konnte durch eine chemische Totalhydrolyse behoben werden. Da unter den Hydrolysebedingungen die Vitamine und Tryptophan zersetzt werden, wurden diese dem erhaltenen Vollhydrolysat in ursprünglicher Menge anschließend zugegeben. In Abbildung 34 ist zu sehen, dass mit den Vollhydrolysaten hohe Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen, vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit Merck Fermtech® Hefeextrakt erhalten werden, erreicht werden können. Dabei zeigten die verschiedenen Rohstoffe nur geringe Unterschiede. Eine Ausnahme stellt Maiskleber-Vollhydrolysat dar, mit dem die Milchsäureproduktion möglicherweise durch ein ungünstiges Aminosäureprofil eher limitiert ist, als mit den anderen Vollhydrolysaten.

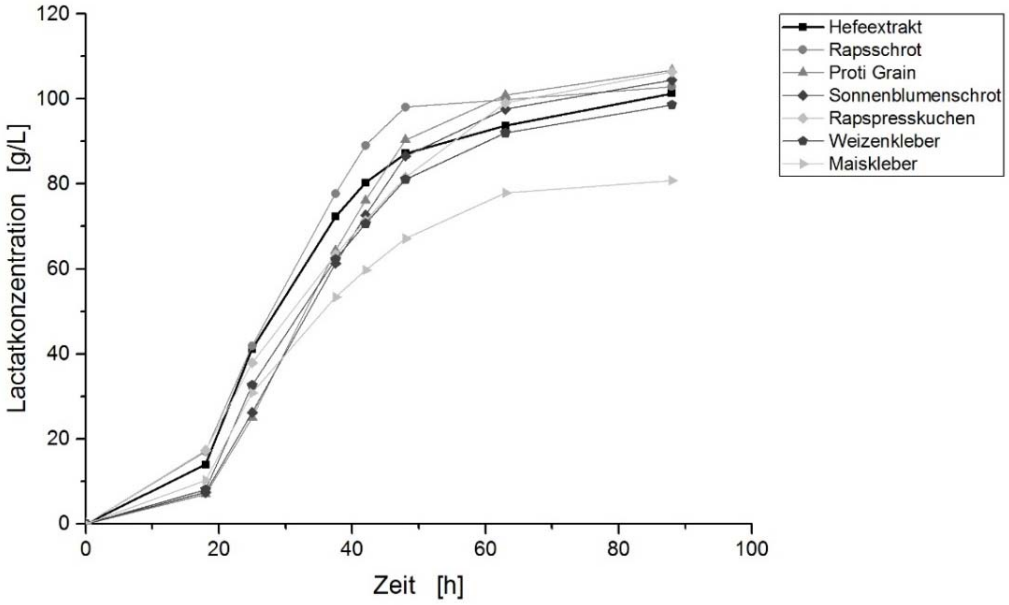


Abbildung 34: Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 mit Vollhydrolysaten verschiedener Rohstoffe; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Am Beispiel von Rapsschrot wurde zum Vergleich die enzymatisch Hydrolyse mit verschiedenen Proteasen untersucht. Dementsprechend wurden zwar höhere Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen erhalten als anfangs, diese waren aber dennoch deutlich geringer als die Ergebnisse der chemischen Hydrolyse (Abbildung 35). Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beizubehalten, wurden trotz der milden Hydrolysebedingungen ebenfalls Vitamine und Tryptophan zugesetzt.

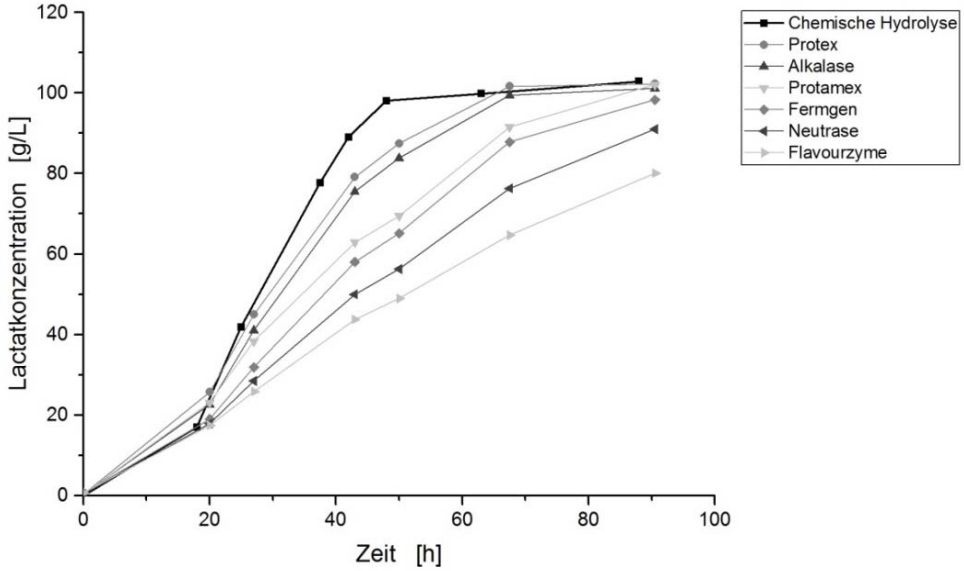


Abbildung 35: Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 bei Einsatz verschiedener Proteasen zur enzymatischen Hydrolyse von Rapsschrot; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Mit Rapsschrot wurde anschließend eine zweistufige fed-batch Kultivierung durchgeführt. Hierzu wurde ein Vollhydrolysat (chemische Totalhydrolyse) supplementiert mit Vitaminen und Tryptophan kultiviert. Bei dieser Kultivierung wurde, wie mit Hefeextrakt, in einem Fed-Batch-Ansatz hohe Milchsäurekonzentrationen von 193 g/L erreicht. Zudem wurden die Erkenntnisse über die Nährstoffanforderung genutzt, um einen Vergleich zwischen der Supplementierung mit den gesamten Vitaminen und Tryptophan und der Supplementierung mit den Vitaminen, die zuvor einen signifikanten Einfluss zeigten, und ohne Tryptophan durchzuführen. Dabei wurde bei minimaler Supplementierung 172 g/L Milchsäure gebildet, wobei nur eine leicht geringere Produktivität beobachtet wurde (Abbildung 36, Tabelle 14). Es sollte also abgewogen werden, welches Verfahren letztlich kostengünstiger ist.

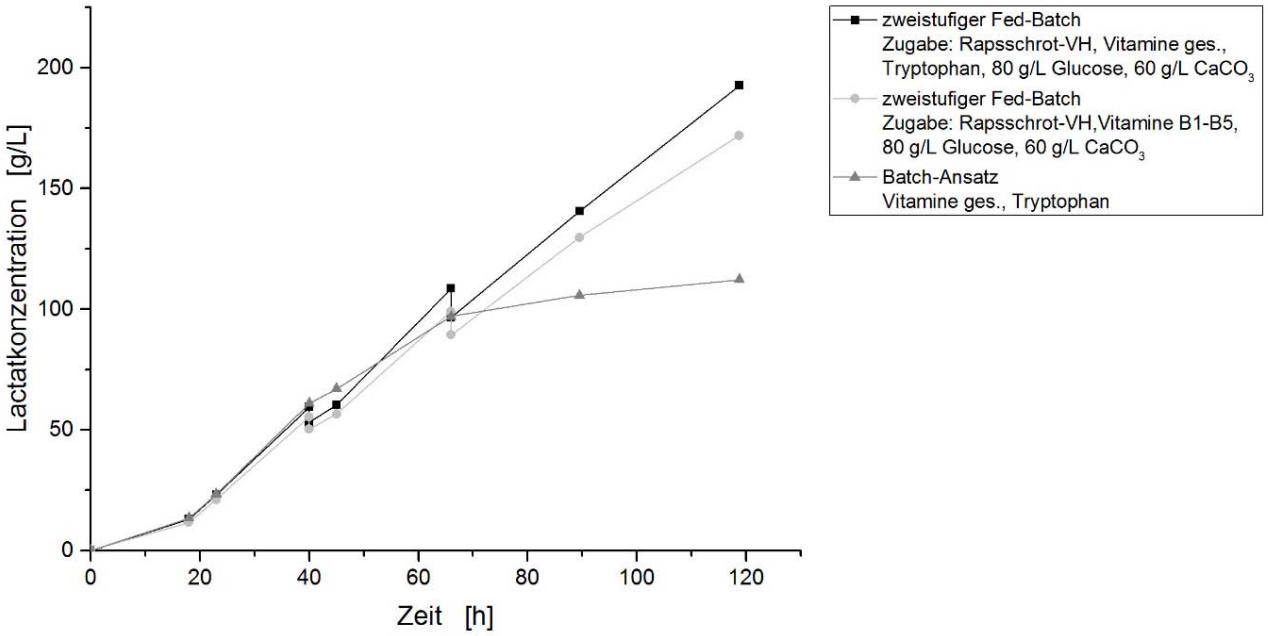


Abbildung 36: Fed-Batch-Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 mit Rapsschrot, Vergleich minimale und gesamte Supplementierung; 100 mL Schüttelkolben (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 0 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Tabelle 14: Fed-Batch-Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 mit Rapsschrot, Vergleich minimale und gesamte Supplementierung.

	Fed-Batch Vitamine B1-B5	Fed-Batch Vitamine ges. + Tryptophan	Batch Vitamine ges. + Tryptophan
Eingesetzte Glucosekonzentration gesamt [g/L]	241	247	122
Lactatkonzentration nach 119 h [g/L]	172	193	112
Formiatkonzentration nach 119 h [g/L]	13,7	15,4	7,5
Acetatkonzentration nach 119 h [g/L]	4,0	4,3	2,8
Propionatkonzentration nach 119 h [g/L]	4,2	4,4	2,1
Ausbeute [%]	82,6	82,0	94,0
Max. Produktivität bis zur 1. Zugabe [g/(L·h)]	2,02	2,14	2,16
Max. Produktivität bis zur 2. Zugabe [g/(L·h)]	2,03	2,30	
Max. Produktivität nach der 2. Zugabe [g/(L·h)]	1,57	1,82	
Produktivität gesamt [g/(L·h)]	1,44	1,62	0,95

Während die Art des Rohstoffs neben dem Hydrolysegrad nur eine sekundäre Rolle für die Produktivität und die Milchsäurekonzentration spielt, wurde festgestellt, dass sich in Abhängigkeit der Nährstoffquelle (Vollhydrolysat, Zusatz von Vitaminen und Tryptophan) die Enantiomerenreinheit der D-Milchsäure verändert, die ausschlaggebend für die Qualität des Produkts ist. Die Enantiomerenreinheit des Produkts ist daher letztlich das entscheidende Auswahlkriterium für eine geeignete Nährstoffquelle.

Tabelle 15 zeigt die mit *Sporolactobacillus* sp.1 erhaltenen Enantiomerenüberschüsse an D-Milchsäure bei Variation der Nährstoffquelle (Versuch siehe Abbildung 34). Durch welchen Parameter die Enantiomerenreinheit beeinflusst wird, blieb bisher ungeklärt.

Tabelle 15: Enantiomerenüberschuss des mit *Sporolactobacillus* sp.1 erhaltenen D-Milchsäures bei Variation der Nährstoffquelle (Vollhydrolysat, Zusatz von Vitaminen und Tryptophan)

Nährstoffquelle	Enantiomerenüberschuss in %ee D-Milchsäure
Hefeextrakt	> 99
Rapsschrot	95,1
Proti Grain®	> 99
Sonnenblumenschrot	97,3
Rapspresskuchen	86,4
Weizenkleber	95,2
Maiskleber	91,5

Proti Grain® lieferte unter diesen Rohstoffen, nach einer chemischen Totalhydrolyse und Zusatz von Vitaminen und Tryptophan, in Schüttelkolben Experimenten bei 38 °C, ungeschüttelt und unter Zusatz von $CaCO_3$ mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99 %ee und einer Produktivität von 3,00 g/(L·h) die besten Ergebnisse und stellt damit für die Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 eine gute kostengünstige Alternative zu Hefeextrakt dar.

Immobilisierte Biokatalysatoren

Im Vergleich zum *Sporolactobacillus* sp.2 erwies sich *Sporolactobacillus* sp.1 generell weniger anfällig gegenüber Substratinhibierung, so dass die folgenden Experimente zur Immobilisierung mit diesem Stamm durchgeführt wurden.
Als Immobilisierungstechnik wurde die Immobilisierung der Zellen in Polyvinyl-alcohol (PVA) in Form von LentiKats® eingesetzt. Eine gebrauchsfertige Lösung (LentiKat®-Liquid und – Stabilizer) der Firma geniaLab wurde zur Herstellung der Immobilsate verwendet. Das geschmolzene LentiKat®-Liquid wurde mittels LentiKat®-Printer zu linsenförmigen LentiKats® verarbeitet. Die LentiKats® wurden bis zu einer Restfeuchte von 28% getrocknet und anschließend für mindestens 2 Stunden in der LentiKat®-Stabilizer Lösung gehärtet und wurden dann in den Experimenten eingesetzt.
Um die Langzeitstabilität zu testen, wurden Repeated-Batch-Experimente mit durchschnittlich 140 g/L Glucose-Startkonzentration im Schüttelkolben bei einer durchschnittlichen Kultivierungszeit von 40 Stunden pro Batch, mit 20% Lentikats® (w/v) durchgeführt (Abbildung 37).

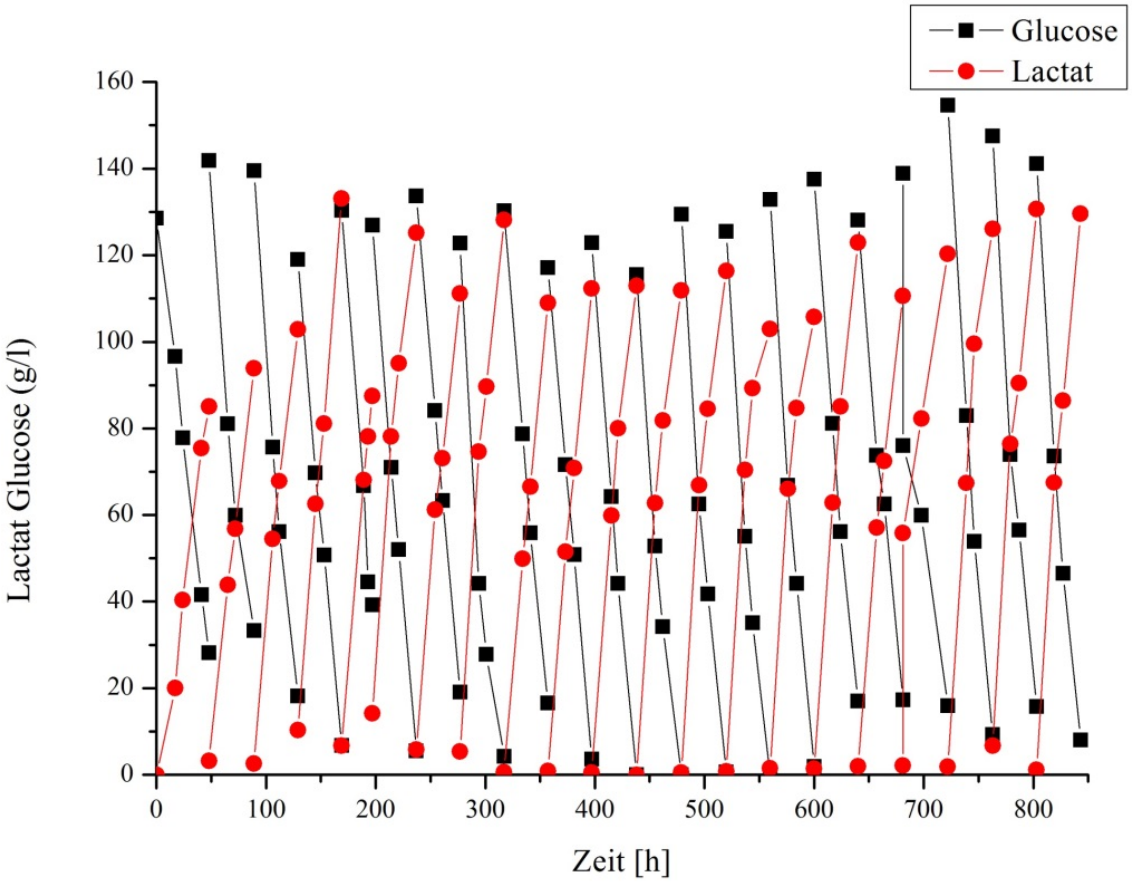


Abbildung 37: Repeated-Batch-Experimente mit durchschnittlich 140 g/L Glucose-Startkonzentration, mit 20% Lentikats® (w/v), *Sporolactobacillus* sp.1; 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L $CaCO_3$.

Über die Gesamtdauer der Batches wurden die immobilisierten Zellen über eine Mindestdauer von 843 Stunden ohne Produktivitätsverlust repetitiv kultiviert, da sich die Dauer der einzelnen Batches über die Zeit in Relation zu der Produkt-Endkonzentration nicht verlängert (Abbildung 37). Ferner wurden der absolute Glucose-Verbrauch und die D-Milchsäure-Produktion für die einzelnen Batches miteinander verglichen (Abbildung 38), um die Stabilitätsentwicklung der Zellimmobilisate beschreiben zu können. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass der Glucose-Verbrauch und somit die Produktkonzentration innerhalb der ersten drei Batches sukzessive ansteigt und sich die Werte ab dem vierten Batch stabilisieren. Ferner kann ab Batch 4 eine durchschnittliche Ausbeute von 90 % bis zum Ende der Experimente mit Batch 21 erreicht werden.

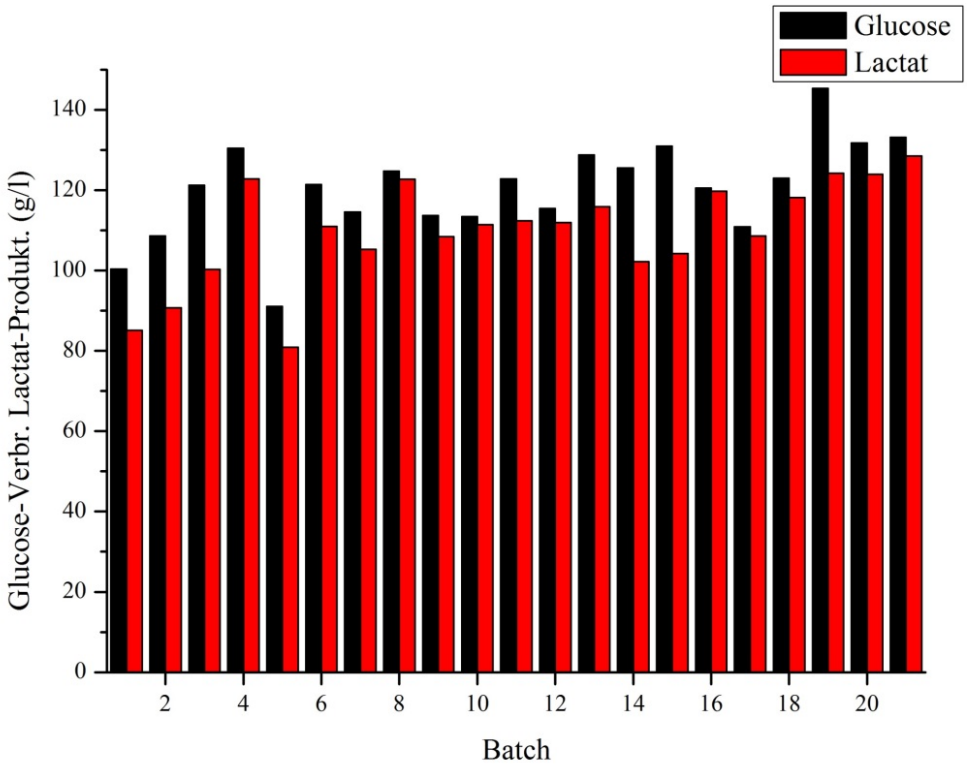


Abbildung 38: D-Milchsäure-Produktion und des Glucoseverbrauchs des Repeated-Batch-Experimentes mit durchschnittlich 140 g/L Glucose-Startkonzentration, 20% Lentikats® (w/v), *Sporolactobacillus* sp.1; 300 mL Schüttelkolben (mit Schikane, 100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 120 Upm, pH selbstreguliert mit 60 g/L CaCO3.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass der 5. Batch im Gegensatz zu weiteren Ansätzen nur über eine Dauer von 28 Stunden durchgeführt worden ist, was im Vergleich, den niedrigen Glucose-Verbrauch bzw. die niedrige Produktkonzentration, erklärt. Nichtsdestotrotz kann ab Batch 16 eine weitere sukzessive Steigerung des Glucose-Verbrauchs bzw. der Produktkonzentration beobachtet werden, was dadurch erklärt werden kann, dass die weitere Zugabe von 30 g/L $CaCO_3$ zur Pufferung schon ab 16 Stunden, anstatt, wie bei den Experimenten zuvor, erst nach 24 Stunden erfolgte. Diese Handhabung hat womöglich zu einer effizienteren Pufferung geführt und kann somit die Steigerung der Werte erklären.

D-Milchsäure-Produktion mit *Sporolactobacillus* sp1 auf der Basis erneuerbarer Rohstoffe

Ziel dieser Kultivierungsexperimente war es zum einen, die kostenintensive C-Quelle (p.a. Glucose) und N-Quelle (Hefeextrakt) durch kostengünstige in Deutschland zur Verfügung stehenden Rohstoffen zu ersetzen. Zum anderen sollte geprüft werden, ob es möglich ist, mit immobilisierten Zellen ein höher konzentriertes Neutralisationsmittels zu verwenden um die Produkt-

Endkonzentration zu steigern. Des Weiteren sollten die hier realisierten Ergebnisse mit den bisher literaturbekannten Daten bezüglich der D-Milchsäure-Produktion mittels erneuerbarer Rohstoffe verglichen und diskutiert werden.

Für die D-Milchsäure-Produktion auf der Basis von erneuerbaren Ressourcen wurde hier als alternative C-Quelle Zuckerrübendünnsaft (ZRDS) mit einer Saccharose-Start-Konzentration von 178,95 g/L eingesetzt. Darüber hinaus diente ein enzymatisch hergestelltes Rapsschrot-Hydrolysat als N-Quelle, welches äquivalent anhand des Stickstoffgehaltes zum Hefeextrakt, eingesetzt wurde und mit Vitaminen supplementiert wurde. Als Inokulum dienten 20 % (w/v) Lentikat®-Linsen. Als Neutralisationsmittel wurde 6,75 M NH_3-Lösung verwendet (Abbildung 39).
Die Konzentration der Saccharose sinkt innerhalb der ersten 10 Stunden der Kultivierung von ca. 179 auf 8,6 g/L (Abbildung 39). Darüber hinaus steigen die Konzentrationen von Glucose und Fructose innerhalb dieses Zeitraums auf 49,9 bzw. auf 11,9 g/L an, was darauf schließen lässt, dass die Saccharose zusätzlich, neben der Konvertierung zu D-Milchsäure, hydrolisiert wird. Des Weiteren scheinen die Bakterien eine Präferenz hinsichtlich der Fructose im Vergleich zur Glucose zu haben, da zu diesem Zeitpunkt die Glucose-Konzentration um den Faktor 4,2 gegenüber der Fructose erhöht ist und man eine Konzentration von 1:1 bei gleichwertigem Abbau erwarten würde. Nach 10 Stunden Kultivierung wird eine D-Milchsäure-Konzentration von 56,2 g/L erreicht, wobei bei dieser Konzentration ein pH-Shift von pH 5,8 auf pH 6,5 durchgeführt wurde um die Produktivität der Zellen bezüglich des D-Milchsäures zu erhöhen (Vergleiche AP3. 2.f). Nach 24 Stunden Kultivierungsdauer beträgt die Restzucker-Konzentration 13 g/L, während eine D-Milchsäure-Konzentration von 123,5 g/L erreicht wird. Nach 29 Stunden wird dir Kultivierung beendet bei einer finalen Konzentration von 135 g/L D-Milchsäure. Aus der Tabelle 16 ist ersichtlich, dass es innerhalb von 29 Stunden möglich ist, 135 g/L D-Milchsäure mit einer Ausbeute von 93,8 % und einer Produktivität von 4,65 g/(L·h) mit Zuckerrübendünnsaft als C-Quelle und einem Rapsschrot-Hydrolysat zu produzieren. In einem Folgeexperiment sollte geprüft werden, ob es realisierbar ist, ein höherer konzentriertes Neutralisationsmittel einzusetzen um die Produkt-Endkonzentration zu steigern und somit den Downstream-Prozess hinsichtlich der Produkt-Aufreinigung kostengünstiger zu machen.

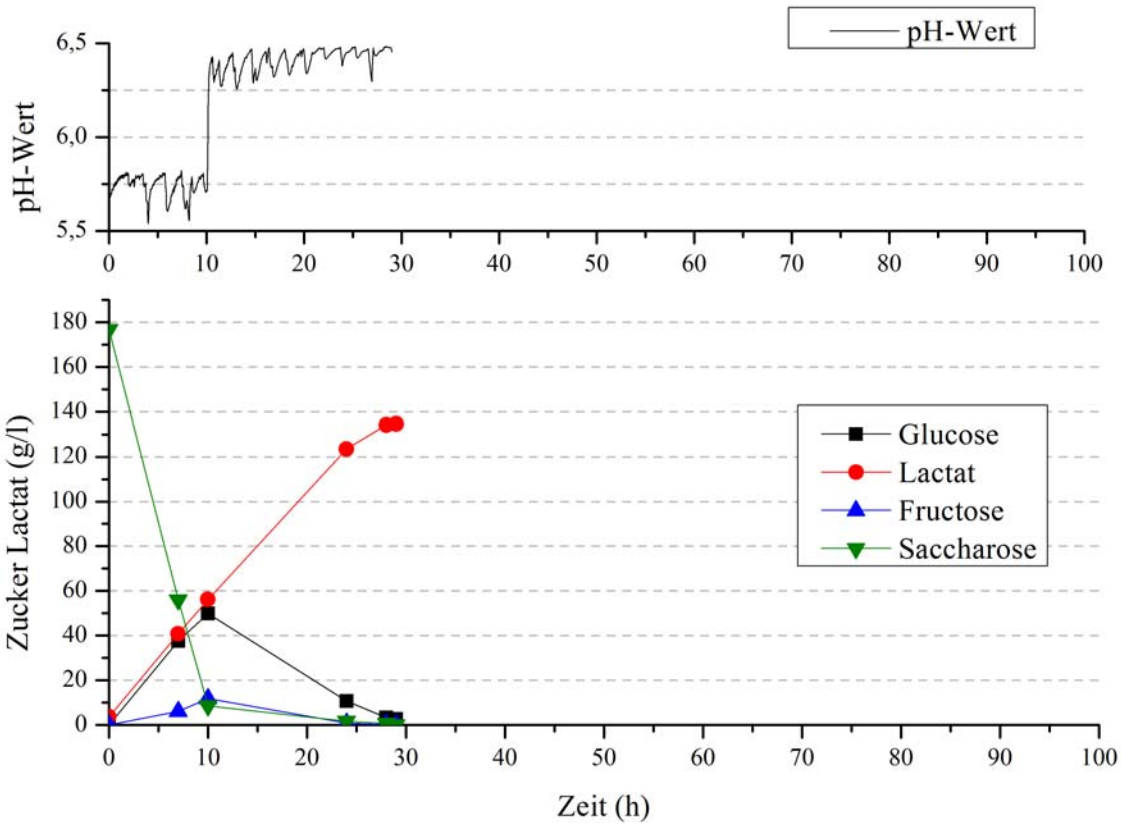


Abbildung 39: Einsatz von Zuckerrübendünnsaft als C-Quelle und Rapsschrot-Hydrolysat (enzymatisch vorbehandelt, supplementiert mit Vitaminen) als N-Quelle, *Sporolactobacillus* sp. 1 immobilisiert in Lentikats® (20% w/v), 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 6,5 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel, Start pH von 5,8 und pH Shift auf 6,5.

Tabelle 16: Wichtige Kennzahlen des Versuches mit Einsatz von Zuckerrübendünnsaft als C-Quelle und Rapsschrot-Hydrolysat (enzymatisch vorbehandelt, supplementiert mit Vitaminen) als N-Quelle, *Sporolactobacillus* sp. 1 immobilisiert in Lentikats® (20% w/v), 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 6,5 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel, Start pH von 5,8 und pH Shift auf 6,5.

D-Milchsäure-Endkonzen-tration [g/L]	Ausbeute [%]	Durchschnittl. Produktivität [g/(L·h)]	Summe der Nebenprodukte [g/L]	Finales Titrationsvolumen NH_3 [mL]
135	93,78	4,65	1,29	31,3

D-Milchsäure-Produktion mit *Sporolactobacillus* sp. 1 auf der Basis erneuerbarer Rohstoffe unter Einsatz von 13,4 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel

Analog zu den vorangegangen Experimenten wurden Rapsschrot-Hydrolysat und Zuckerrübendünnsaft als Substrate eingesetzt. Die Zucker-Startkonzentration betrug hier 183,8 g/L und als Neutralisationsmittel diente eine 13,4 M NH_3-Lösung. Das Inokulum war mit 20 % (w/v) Lentikat®-Linsen analog zudem vorausgegangen Ansatz (Abbildung 40).

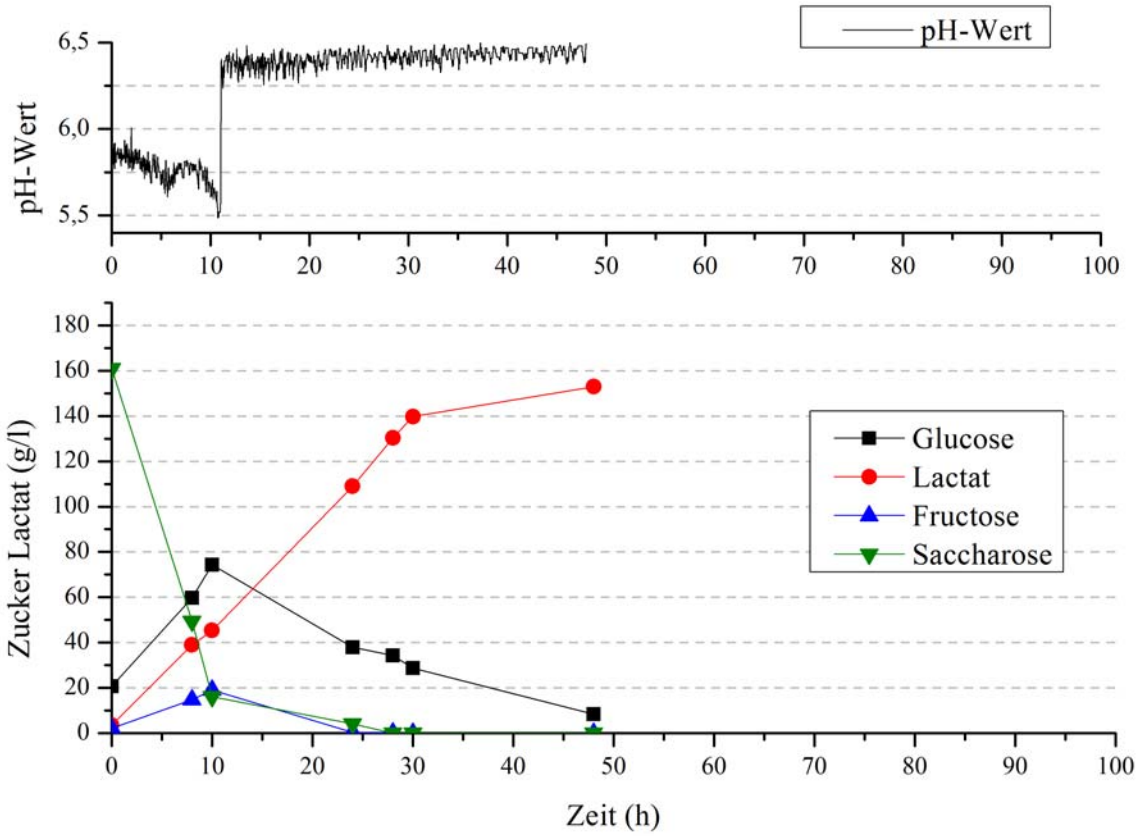


Abbildung 40: Einsatz von Zuckerrübendünnsaft als C-Quelle und Rapsschrot-Hydrolysat (enzymatisch vorbehandelt, supplementiert mit Vitaminen) als N-Quelle, *Sporolactobacillus* sp. 1 immobilisiert in Lentikats® (20% w/v), 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 13,4 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel, Start pH von 5,8 und pH Shift auf 6,5.

Auch hier ist im Kurvenverlauf eine abnehmende Saccharose-Konzentration auf 16 g/L innerhalb der ersten 10 Stunden zu erkennen. Ebenfalls zu sehen ist, dass die Konzentrationen der Monosaccharide Fructose und Glucose innerhalb dieser Zeit auf 19 g/L bzw. auf 74,3 g/L ansteigen und eine D-Milchsäure-Konzentration von 45,3 g/L erzielt wird. Die Tatsache hinsichtlich der ungleich steigenden Konzentration der Monosaccharide bestätigt die Präferenz der Bakterien für die Fructose im Vergleich zur Glucose aus dem vorausgegangen Experiment. Darüber hinaus

wurde bei einer D-Milchsäure-Konzentration von ca. 50 g/L ebenfalls ein pH-Shift auf 6,5 durchgeführt um eine Inhibition durch die nicht-dissoziierte Säure bei höheren Produktkonzentrationen bei pH 5,8 zu vermeiden. Das Kultivierungsexperiment war im Gegensatz zu dem vorigen Experiment erst nach 48 Stunden beendet und es konnte eine D-Milchsäure-Endkonzentration von 153 g/L erreicht werden (Tabelle 17). Zusätzlich wurde bei diesem Experiment die optische Reinheit des Produktes über die Kultivierungszeit bestimmt (Tabelle 18).

Tabelle 17: Wichtige Kennzahlen des Versuches mit Einsatz von Zuckerrübendünnsaft als C-Quelle und Rapsschrot-Hydrolysat (enzymatisch vorbehandelt, supplementiert mit Vitaminen) als N-Quelle, *Sporolactobacillus* sp. 1 immobilisiert in Lentikats® (20% w/v), 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 13,4 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel, Start pH von 5,8 und pH Shift auf 6,5.

D-Milchsäure-Endkonzen-tration [g/L]	Ausbeute [%]	Durchschnittl. Produktivität [g/(L·h)]	Summe der Nebenprodukte [g/L]	Finales Titrationsvolumen NH_3 [mL]
153	91,13	3,29	1,36	-

Tabelle 18: Optische Reinheit der D-Milchsäure während der Kultivierung unter Einsatz von Zuckerrübendünnsaft als C-Quelle und Rapsschrot-Hydrolysat (enzymatisch vorbehandelt, supplementiert mit Vitaminen) als N-Quelle, *Sporolactobacillus* sp. 1 immobilisiert in Lentikats® (20% w/v), 250 mL Rührreaktor (100 mL Arbeitsvolumen), 38 °C, 13,4 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel, Start pH von 5,8 und pH Shift auf 6,5.

Probennahme-Zeitpunkt in [h]	Milchsäure-Konzentration [g/L]	Enantiomerenüberschuss in %ee D-Milchsäure
8	38,98	≥ 99
10	45,32	≥ 99
24	105,36	≥ 99
28	126,81	≥ 99
30	136,19	≥ 99
48	153,00	≥ 99

Die chirale Messung (Tabelle 18) zeigt, dass unter diesen Bedingungen (Zuckerrübendünnsaft und Rapsschrot-Hydrolysat, enzymatisch vorbehandelt, supplementiert mit Vitaminen, Rührreaktor, 38 °C, 13,4 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel, Start pH von 5,8 und pH Shift auf 6,5) während der gesamten Kultivierung ein Enantiomerenüberschuss von > 99 %ee D-Milchsäure gebildet wird.

Mit Hilfe der hier dargestellten Ergebnisse bezüglich D-Milchsäure-Produktion auf der Basis von Rapsschrott (N-Quelle) und ZRDS (C-Quelle) konnte gezeigt werden, dass D-Milchsäure kostengünstig mit agrarischen Rohstoffen in hoher optischer Reinheit biotechnisch hergestellt werden kann. Des Weiteren ergeben sich konzentrationsabhängige Vor- und Nachteile hinsichtlich des eingesetzten Neutralisationsmittels für die Kultivierung. Der Vorteil des Experiments mit 6,75 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel ist, dass der Prozess schneller abläuft, da wahrscheinlich keine oder weniger freien Zellen abgetötet werden und demzufolge die durchschnittliche Produktivität höher ist. Der Nachteil gegenüber der verwendeten 13,4 M NH_3-Lösung liegt aber bei einer verminderten Produktendkonzentration. Ein weiterer Vorteil des Experiments bei Verwendung des höher konzentrierten Neutralisationsmittels könnte sein, dass aufgrund der oxidativen Bedingungen das Kontaminationsrisiko des Systems und ein mögliches Fouling im Bioreaktor drastisch minimiert werden.

AP 4. Scale up

Die Arbeiten im AP 3.1 „Eignung der Rohstoffe“ lieferten insbesondere im dritten Projektjahr sehr erfolgsversprechende Ergebnisse, die im AP 3.3 „Fermentationsstrategie“ im Bereich der fed-bach Kultivierung und im Bereich der Nutzung immobilisierter Biokatalysatoren eingesetzt wurden. Hierdurch ergab sich eine zeitliche Mehrarbeit im AP 3.3, so dass dieses AP sehr erfolgreich in der zweiten Hälfte des dritten Projektjahres weiter bearbeitet wurde. Die erzielten Ergebnisse insbesondere in diesem Bereich tragen maßgeblich zu der erfolgreichen Durchführung dieses Projektes bei. Die Maßstabsvergrößerung in den 15 L Maßstab konnte nach erfolgreicher Durchführung der AP 1 bis AP 3 aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

AP 5. Begleitende Analytik, Charakterisierung der Fermentationsbrühe

Durch begleitende Analytik (HPLC, GC, ICP-OES) wurden stets die Edukt- und Produktkonzentrationen in der Fermentationsbrühe qualitativ und quantitativ analysiert. Es wurden Analysen der Fermentationsbrühe durchgeführt, um mögliche auftretende Limitierungen zu entdecken. Auf diese Weise zeigte sich in GC-Analysen der freien Aminosäuren, dass die Milchsäureproduktion durch den Verbrauch der freien Aminosäuren begrenzt wird. ICP OES-Analysen wurden genutzt um die Verteilung der Spurenelemente in Medium und Biotrockenmasse zu untersuchen. Damit wurde beobachtet, dass die Spurenelemente hier zwar keinen limitierenden Faktor darstellen, aber ein großer Anteil des zur Verfügung stehenden Phosphats am Ende der Kultivierung in der Biotrockenmasse zu finden ist. Darüberhinaus wurde mittels chiraler HPLC-Analysen die Enantiomerenreinheit des Produkts analysiert und eine Veränderung bei Variation der Nährstoffquellen festgestellt. Die aus den Analysen gewonnenen Erkenntnisse wurden bereits in AP 3 diskutiert.

AP 6. Projektkoordination

Die Koordination, Berichtserstellung und der Ergebnistransfer lagen im Aufgabenbereich des Thünen-Institutes Braunschweig.

Meilensteine

In diesem Projekt sollten 3 Meilensteine erreicht werden. Für Meilenstein M1 sollte das Screening nach neuen Mikroorganismen aus der Natur, für Meilenstein M2 die Bestimmung der Prozessparameter für die D-Milchsäureherstellung und für Meilenstein M3 sollte die Entwicklung der Fermentationsstrategie abgeschlossen sein (Tabelle 1).

Aus dem Screening der Umweltisolate zur Produktion von Milchsäure aus Galacturonsäure traten keine milchsäureproduzierenden Isolate hervor. Da die beiden *Sporolactobacillus* Spezies der Literatursuche zu Beginn des Projektes erfolgsversprechende Ergenisse lieferten und sehr gute Eigenschaften aufwiesen, lag der Fokus dieses Projektes auf diesen beiden Stämmen. Ein erneutes Screening wurde nicht durchgeführt.

Zur Erfüllung von M2 wurden die Parameter Temperatur, optimaler pH-Werts, Inokulum, Medienbestandteile inklusiv der Stoffmengenkonzentration des Hefeextraktes und der Glucose für beide *Sporolactobacillus* Spezies optimiert. Der *Sporolactobacillus* sp.1 erwies sich bei den Untersuchungen als vielversprechender, so dass der Vergleich von Ammoniak und Calciumcarbonat als Neutralisationsmittel nur mit diesem Stamm durchgeführt wurde.

In die Erfüllung von M3 flossen diverse Parameter der Untersuchung und Charakterisiung der Rohstoffeignung in die optimierten Prozessparamter mit ein. So wurde mit immobiliserten Zellen des *Sporolactobacillus* sp.1 auf der Basis von Rapsschrott (N-Quelle), Zuckerrübendünnsaft (C-Quelle) und 13,4 M NH_3-Lösung als Neutralisationsmittel 153 g/L D-Milchsäure innerhalb von 2 Tagen gebildet, mit einer Ausbeute von 91 % und einer Produktivität von 3,3 g/(L·h). D-Milchsäure kann somit aus kostengünstigen in Deutschland zur Verfügung stehenden Rohstoffen in hoher optischer Reinheit biotechnisch hergestellt werden. Neutralisiert man mit 6,75 M NH_3-Lösung, läuft der Prozess schneller ab und die Produktivität konnte auf 4,65 g/(L·h) gesteigert werden.

2. Verwertung

Gegenüber der Ausgangssituation vor Beginn des Projektes konnten bedeutende Fortschritte erzielt werden:

- Die aus der Literatur gewählten Stämme erwiesen sich für dieses Projekt als sehr geeignet. Beide Stämme sind als R1 Organismen klassifiziert, weisen ein sehr geringes

Nebenproduktspektrum auf und bilden ausschließlich D-Milchsäure mit einer optischen Reinheit von >99,00 %. Die Charakterisierung der beiden Stämme wiesen Unterschiede im

Anspruch an das Medium, an den pH Wert und dem Substratspektrum auf. Beide Stämme sind je nach Anforderung geeignet, um hohe Konzentrationen an D-Milchsäure zu produzieren.

- Die aus der Literatur und Patentliteratur bekannten generellen Probleme bei der fermentativen D-Milchsäure Herstellung, wie geringe Produktivität und Einsatz teurer Suppline sollten im Rahmen dieses Projektes näher untersucht werden. Es sollte ein Verfahren entwickelt werden in dem kostengünstige in Deutschland verfügbare Suppline und Kohlenstoffquellen für diese Biokonversion eingesetzt und analysiert werden.
  Hierzu wurden selbst hergestellte Hydrolysate, die vorhandenen Hefeextrakte, sowie Peptone und Tryptone (insgesamt 61 verschiedene Nährstoffquellen) vollständig auf ihre Bestandteile analysiert. Die Kenntnisse die hier erschlossen wurden sind für die fermentative D -Milchsäure Herstellung aber auch für ähnliche biotechnologische Prozesse von enormen Interesse.
  Sporolactobacillus sp.1 zeigte eine starke Abhängigkeit des Prozesses von der Nährstoffquelle, so dass sich diese Arbeiten auf diese Spezies fokussierte. Mit den verschiedenen Hefeextrakten wurden, wie erwartet, im Allgemeinen hohe Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen erreicht. Mit den Peptonen, Fleischextrakt und Hy-Soy® wurden deutlich geringere Produktivitäten und stark schwankende Milchsäurekonzentrationen erhalten.
  Mit den selbst hergestellten Hydrolysaten wurden geringe Produktivitäten und ebenfalls schwankende Milchsäurekonzentrationen erhalten. Die Analysen zeigten, dass die Hydrolysate im Gegensatz zu den Hefeextrakten nur wenige freie Aminosäuren aufweisen. Des Weiteren zeigte sich, dass, sobald bestimmte Aminosäuren verbraucht wurden, die exponentielle Phase und die Milchsäureproduktion endeten. Durch Zugabe der verbrauchten Aminosäuren in Fed-Batch Kultivierungen konnte die exponentielle Phase erfolgreich verlängert und die Glucose vollständig verbraucht werden. Die Milchsäureendkonzentrationen betrugen 140 g/L ohne Aminosäurezugabe und konnte mit Aminosäurezugabe auf 172 g/L gesteigert werden. Durch eine weitere Supplementierung von Vitaminen konnte die Milchsäurekonzentration in einem zweistufigen Fed-Batch Experiment von 105 g/L im Batch Ansatz auf 222 g/L nach 141 h Kultivierungsdauer gesteigert werden. Durch systematische Optimierung und Analysen ist es innerhalb dieses Projektes gelungen, die Herstellung von D-Milchsäure so weit zu verbessern, dass eine dem

industriell etablierten Prozess der L-Milchsäureherstellung vergleichbare Ausbeute, Selektivität, Produktivität und Endkonzentration erreicht wurde.

- Die Erkenntnisse der Supplementierung wurden im Folgenden genutzt, um das Ziel, kostengünstige in Deutschland zur Verfügung stehende Rohstoffe einzusetzen, zu erreichen. Die Vollhydrolysate dieser Rohstoffe zeigten unabhängig von deren Art aber unter der Supplementierung ebenfalls hohe Produktivitäten und Milchsäurekonzentrationen, vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit teurem Hefeextrakt erhalten wurden.

  Mit Rapsschrot wurde eine zweistufige Fed-Batch Kultivierung durchgeführt. Hierzu wurde ein Vollhydrolysat hergestellt (chemische Totalhydrolyse), mit Vitaminen und Tryptophan supplementiert. Bei dieser Kultivierung wurden mit einem Rapsschrot Hydrolysat vergleichbar hohe Milchsäurekonzentrationen wie mit Hefeextrakt von 193 g/L nach 120 h Kultivierungsdauer erreicht.

  Während die Art des Rohstoffes neben dem Hydrolysegrad nur eine sekundäre Rolle für die Produktivität und die Milchsäurekonzentration spielt, wurde festgestellt, dass sich in Abhängigkeit der Nährstoffquelle die Enantiomerenreinheit der D-Milchsäure verändert, die ausschlaggebend für die Qualität des Produkts ist. Proti Grain® lieferte unter diesen Rohstoffen mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99 %ee und einer Produktivität von 3,00 g/(L·h) die besten Ergebnisse und stellt damit für die Kultivierung von *Sporolactobacillus* sp.1 eine gute kostengünstige Alternative zu Hefeextrakt dar.
- Da der *Sporolactobacillus* sp.1 im Vergleich zu *Sporolactobacillus* sp.2 generell weniger anfällig gegenüber Substratinhibierung ist, wurde diese Spezies als geeigneter Kandidat für die Immobilisierung ausgewählt. Um die Langzeitstabilität der Immobilisate zu testen, wurden Repeated-Batch-Experimente mit durchschnittlich 140 g/L Glucose-Startkonzentration bei einer durchschnittlichen Kultivierungszeit von 40 h pro Batch, mit 20 % Lentikats® (w/v) durchgeführt. Hierbei wurde über eine Gesamtdauer von 843 h ohne Produktivitätsverlust repetitiv kultiviert.
- Abschließend wurden diese Immobilisate eingesetzt, um D-Milchsäure kostengünstig mit agrarischen Rohstoffen in hoher optischer Reinheit biotechnisch herzustellen. Eingesetzt wurden Rapsschrot (enzymatisch hydrolysiert, supplementiert mit Vitaminen) als Stickstoffquelle und Hefeextrakt Ersatz sowie Zuckerrübendünnsaft als Substrat und Ersatz für reine Glucose. Erfolgreich wurden innerhalb von 29 h 135 g/L D-Milchsäure mit einer Ausbeute von 94 % und einer Produktivität von 4,65 g/(L·h) auf kostengünstigen in Deutschland zur Verfügung stehenden Rohstoffen in hoher optischer Reinheit biotechnisch produziert.

3. Erkenntnisse von Dritten

Während dieser Projektlaufzeit wurden folgende Reviews veröffentlicht:

Abdel-Rahman, M. A., et al. (2013). "Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes." Biotechnology Advances 31(6): 877-902.

Ghaffar, T., et al. (2014). "Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification." Journal of Radiation Research and Applied Sciences 7(2): 222-229.

Während dieser Projektlaufzeit wurden folgende Paper veröffentlicht:

Liu, D., et al. (2012). "Adaptation of Glycolysis and Growth to Acetate in Sporolactobacillus sp Y2-8." Applied Biochemistry and Biotechnology 168(2): 455-463.

Li, Y., et al. (2013). "Efficient production of polymer-grade D-lactate by Sporolactobacillus laevolacticus DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source." Bioresource Technology 142: 186-191.

Zhao, T., et al. (2014). "D-Lactic Acid Production by Sporolactobacillus inulinus Y2-8 Immobilized in Fibrous Bed Bioreactor Using Corn Flour Hydrolyzate." Journal of Microbiology and Biotechnology 24(12): 1664-1672.

Zheng, L.et al. (2014). "Mn2+/Mg2+-dependent pyruvate kinase from a D-lactic acid-producing bacterium Sporolactobacillus inulinus: characterization of a novel Mn2+-mediated allosterically regulated enzyme." Applied Microbiology and Biotechnology 98(4): 1583-1593.

4. Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Veröffentlichungen getätigt:

#

Kongressbeiträge

Klotz, S., Kaufmann N., Kuenz A., Vorlop K.-D. (2014) "Biotechnological production of D-lactic acid – Specific supplementation and process optimization". 11th International Symposium. Poster, Egmond aan Zee, Netherlands

Veröffentlichungen

Klotz, S., Kaufmann N., Kuenz A., Prüße U., Vorlop K.-D. (2016) " Biotechnological production of enantiomerically pure D-lactic acid ". In Arbeit

5. Literaturverzeichnis

Abdel-Rahman, M. A., et al. (2013). "Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes." Biotechnology Advances 31(6): 877-902.

Bi, C., X. Zhang, et al. (2009). "Genetic engineering of Enterobacter asburiae strain JDR-1 for efficient d(-) lactic acid production from hemicellulose hydrolysate." Biotechnology Letters 31(10): 1551-1557.

Chang, D. E., H. C. Jung, et al. (1999). "Homofermentative production of D- or L-Milchsäuree in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1." Applied and Environmental Microbiology 65(4): 1384-1389.

Daicel Chemical Industries, L. S., Osaka (1986). Gärung zur Gewinnung von d-Milchsäure. JP. DE 36 50 395 T2.

de Jong, S. J., B. van Eerdenbrugh, et al. (2001). "Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior." Journal of Controlled Release 71(3): 261-275.

Fukushima, K., K. Sogo, et al. (2004). "Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice starch." Macromolecular Bioscience 4(11): 1021-1027.

Ghaffar, T., et al. (2014). "Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification." Journal of Radiation Research and Applied Sciences 7(2): 222-229.

Helou C, Marier D, Jacolot P, Abdennebi-Najar L, Niquet-Léridon C, Tessier FJ, Gadonna-Widehem P.(2014) "Microorganisms and Maillard reaction products: a review of the literature and recent findings. " Amino Acids.;46(2):267-77.

Ikada, Y., K. Jamshidi, et al. (1987). "Stereocomplex Formation between Enantiomeric Poly(Lactides)." Macromolecules 20(4): 904-906.

Ishida, N., T. Suzuki, et al. (2006). "D-lactic acid production by metabolically engineered Saccharomyces cerevisiae." Journal of Bioscience and Bioengineering 101(2): 172-177.

Joshi, D. S., M. S. Singhvi, et al. (2010). "Strain improvement of Lactobacillus lactis for d-lactic acid production." Biotechnology Letters 32(4): 517-520.

Liu, D., et al. (2012). "Adaptation of Glycolysis and Growth to Acetate in Sporolactobacillus sp Y2-8." Applied Biochemistry and Biotechnology 168(2): 455-463.

Li, Y., et al. (2013). "Efficient production of polymer-grade D-lactate by Sporolactobacillus laevolacticus DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source." Bioresource Technology 142: 186-191.

Tashiro, Y., W. Kaneko, et al. (2011). "Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant Lactobacillus delbrueckii subsp lactis QU 41." Applied Microbiology and Biotechnology 89(6): 1741-1750.

Tsuji, H. and I. Fukui (2003). "Enhanced thermal stability of poly(lactide)s in the melt by enantiomeric polymer blending." Polymer 44(10): 2891-2896.

Maillard, L-C (1912). "Action des acides amines sur les sucres. Formation desmelanoidins par voie methodique. " Compt. Rend. Hebd. Seances Acad. Sci. 159: 66-68.

Mussatto, S. I., M. Fernandes, et al. (2007). "Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by Lactobacillus delbrueckii." Biotechnology Letters 29(12): 1973-1976.

Okano, K., S. Yoshida, et al. (2009a). "Homo-D-Lactic Acid Fermentation from Arabinose by Redirection of the Phosphoketolase Pathway to the Pentose Phosphate Pathway in L-Milchsäuree Dehydrogenase Gene-Deficient Lactobacillus plantarum." Applied and Environmental Microbiology 75(15): 5175-5178.

Okano, K., S. Yoshida, et al. (2009b). "Improved Production of Homo-D-Lactic Acid via Xylose Fermentation by Introduction of Xylose Assimilation Genes and Redirection of the Phosphoketolase Pathway to the Pentose Phosphate Pathway in L-Milchsäuree Dehydrogenase Gene-Deficient Lactobacillus plantarum." Applied and Environmental Microbiology 75(24): 7858-7861.

Okano, K., Q. Zhang, et al. (2009c). "Efficient Production of Optically Pure D-Lactic Acid from Raw Corn Starch by Using a Genetically Modified L-Milchsäuree Dehydrogenase Gene-Deficient and alpha-Amylase-Secreting Lactobacillus plantarum Strain." Applied and Environmental Microbiology 75(2): 462-467.

Okihara, T., M. Tsuji, A. Kawaguchi, K. Katayama, H. Tsuji, S. H. Hyon and Y. Ikada (1991). "Crystal-Structure of Stereocomplex of Poly(L-Lactide) and Poly(D-Lactide)." Journal of Macromolecular Science-Physics B30(1-2): 119-140.

Okino, S., M. Suda, et al. (2008). "Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation." Applied Microbiology and Biotechnology 78(3): 449-454.

Shukla, V. B., S. Zhou, et al. (2004). "Production of D(-)-Milchsäuree from sucrose and molasses." Biotechnology Letters 26(9): 689-693.

Transkript: http://www.transkript.de/nachrichten/wirtschaft/2013-03/thyssen-neue-anlage-in-leuna.html

Wang, L. M., B. Zhao, et al. (2011). "Highly efficient production of D-Milchsäuree by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal." Applied Microbiology and Biotechnology 89(4): 1009-1017.

Zhao T, Liu D, Ren H, Shi X, Zhao N, Chen Y, Ying H (2014). "D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 immobilized in fibrous bed bioreactor using corn flour hydrolyzate". J Microbiol Biotechnol 24(12):1664-1672.

Zheng, L.et al. (2014). "Mn2+/Mg2+-dependent pyruvate kinase from a D-lactic acid-producing bacterium Sporolactobacillus inulinus: characterization of a novel Mn2+-mediated allosterically regulated enzyme." Applied Microbiology and Biotechnology 98(4): 1583-1593.

Zhou, S. D., T. B. Causey, et al. (2003). "Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110." Applied and Environmental Microbiology 69(1): 399-407.