

# **Biomasse Recycling einer Riboflavinfermentation: Lyse, Extrakterstellung und Fermentation**

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften  
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde  
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

**Karlheinz Bretz**

aus Mühlbach

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. C. Syldatk

Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. M. Reuss

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.2006

**Universität Stuttgart  
Institut für Bioverfahrenstechnik**

**2006**



Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von März 2002 bis Februar 2005 im Riboflavin Betrieb von DSM Nutritional Products GmbH in Grenzach-Wyhlen durchgeführt.

## **Danksagung:**

Frau Dr. U. Becker danke ich für die Bereitstellung des Themas und die gewährleistete Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. C. Syldatk für die Betreuung der Arbeit und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Helmut Trautmann, Carlo Andretta und Christoph Ender (Biospectra AG, Schlieren, Schweiz), für das großzügig zur Verfügung gestellte Lucillus PIMS.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Nigel Mouncey, der mich großzügig bei der DNA-Analytik unterstützt hat und mir mit den Veröffentlichungen geholfen hat.

Herrn Dr. Werner Bretzel, der mir seine Unterstützung im Bereich HPLC-Analytik und Elementaranalyse gewährt hat.

Frau Dr. Isabelle Maillet und Frau Celine Maio für ihre tatkräftige Unterstützung im Bereich der Proteinanalytik.

Herrn Rolf Lang und Dr. Jürgen Haberland für ihre Unterstützung und die zur Verfügung gestellten Geräte im Bereich der Aufarbeitung.

Herrn Stefan Ilijevic für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Frau Norcross (BIO-CAT) für Ihre Hilfestellung im Bereich Proteasen.

Den Mitarbeitern der Riboflavinproduktion (DSM Nutritional Products GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) für ihre tatkräftige Unterstützung.







# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungen und Maßeinheiten.....</b>	<b>8</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>14</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>23</b>
1.1 Gegenwärtige mikrobiologische Verfahren zur Vitamin B2 Herstellung.....	24
1.2 Extraktherstellung.....	29
1.3 Zielsetzung.....	31
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.1 Organismus und Anzuchtbedingungen.....	32
2.2 Chemikalien.....	32
2.3 Fermentation.....	33
2.4 Lyseversuche.....	34
2.5 Analytik.....	36
2.5.1 Riboflavin.....	36
2.5.2 Biotrockenmasse.....	37
2.5.3 Acetat, Acetoin und Butandiol.....	38
2.5.4 CHN – Elementaranalysator.....	39
2.5.5 Ammoniumbestimmung [Daridon et al., 13].....	39
2.5.6 Phosphatbestimmung [van Veldhoven et al., 55].....	41
2.5.7 Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, 8].....	43
2.5.8 SDS-PAGE.....	45
2.5.8.1 Proteinabbau während der Lyse.....	45
2.5.8.2 Proteingehalt in den Riboflavinkristallen.....	46
2.5.9 DNA-Nachweis in den Riboflavinkristallen.....	46
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1 Machbarkeitsstudie.....	48

---

3.2 Extraktherstellung.....	52
3.2.1 Autolyse.....	54
3.2.1.1 Autolyse bei der aktuellen Riboflavin – Produktion.....	55
3.2.1.2 Temperatur- und pH-Optimum für eine Autolyse .....	56
3.2.1.3 Einfluss von Polyphosphat auf die Autolyse.....	64
3.2.2 Autolyse unter Zugabe von Proteasen.....	68
3.2.2.1 Autolyse mit Zugabe von Proteasen bei pH 7,5.....	70
3.2.2.2 Fermentation mit Bacillus – Extrakt hergestellt bei pH 7,5.....	79
3.2.2.3 Autolyse mit Zugabe von Proteasen bei pH 6,5.....	90
3.2.2.4 Fermentation mit Bacillus – Extrakt hergestellt bei pH 6,5.....	95
3.2.2.5 Autolyse mit Zugabe von Exoproteasen bei pH 8,0.....	97
3.3 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin.....	100
3.4 Einfluss der Autolyse auf das Riboflavin.....	104
3.4.1 Proteingehalt.....	105
3.4.2 DNA-Gehalt.....	106
3.5 Online Prozesskontrolle mittels Biomass Monitor.....	107
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>113</b>
4.1 Extraktherstellung.....	113
4.2 Fermentation.....	117
4.3 Wirtschaftlichkeit.....	119
4.4 Ausblick.....	121
<b>5 Literatur.....</b>	<b>123</b>



## Abkürzungen und Maßeinheiten

BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BTM	Biotrockenmasse [g/l]
Da	Dalton
DMRL	6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
GC	Gaschromatographie
GSP	General Stress Protein
GTM	Gesamtrockenmasse [g/l]
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie)
I	Stromstärke [A]
k	Kilo
MO	Mikroorganismus
mS	Millisiemens
pF	Pikofarrad
polyP	Polyphosphat
<i>rib</i>	Riboflavin Operon
<i>rib-cat</i>	Chloramphenicolresistenz auf dem Riboflavin Operon
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat Gelelektrophorese
U	Unit (Maßeinheit für die Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt (Spannung)



## Zusammenfassung

Die industrielle Herstellung diverser Feinchemikalien wie Vitamine und Enzyme mittels Fermentation wird immer wichtiger und hat bereits in vielen Fällen die chemische Herstellung abgelöst. Obwohl die in diesen Prozessen produzierte Biomasse ein sehr hohes Energiepotential hat, wird sie bisher meistens noch als Abfallprodukt entsorgt und nur in einigen Fällen als Futtermitteladditiv oder Dünger verwendet. Betrachtet man die Zusammensetzung der Biomasse, so stellt man fest, dass diese Biomasse genau die elementare Zusammensetzung hat, die im Fermentationsmedium benötigt wird. Dies trifft auch auf die fermentative Riboflavinherstellung mittels *Bacillus subtilis* zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die aus der Fermentation anfallende Biomasse zu verwerten, indem daraus ein Extrakt hergestellt wird, der wieder in der Fermentation eingesetzt werden kann. Hierdurch könnten die Kosten des Prozesses erheblich gesenkt werden, da einerseits der Hefeextrakt durch den hergestellten „*Bacillus* – Extrakt“ ersetzt und andererseits die Entsorgungskosten für die anfallende Biomasse minimiert bzw. ganz wegfallen würden.

Die Herstellung eines Extraktes erfordert als erstes eine geeignete Methode zum Aufschluss der Zellen. Die Methode der Wahl für den Zellaufschluss ist die Autolyse, da diese im Vergleich zu anderen Methoden die Vorteile wie z.B. schonende Behandlung der Extraktkomponenten, moderate Bedingungen und Nutzung der endogenen Proteasen hat.

Die Autolyse eines Riboflavin – produzierenden *Bacillus subtilis* wird durch die Einstellung des richtigen pH-Wertes, des Puffersystems und Mangel an Kohlenstoffquelle induziert. Stressfaktoren, wie z.B. Temperatur – Shift und Sauerstoffmangel beschleunigen den Autolyseprozess. Die optimalen Bedingungen für eine Autolyse sind bei einem pH Bereich von pH 6,5 bis 7,5 und einer Temperatur von 40 °C. Werden die hier genannten Parameter eingestellt, wird eine Abnahme der Biotrockenmasse auf ca. 43 % nachgewiesen. Um die Gefahr einer Kontamination während der Autolyse zu minimieren, wird die Temperatur während der Autolyse auf 45 °C angehoben. Hierdurch nimmt der Lysegrad ab, und nach Abschluss der Autolyse werden ca. 66 % Restbiomasse bestimmt.

Eine Steigerung der Extraktqualität wird durch die Zugabe von Proteasen erreicht, da die

endogenen Proteasen von *Bacillus subtilis* nicht ausreichend sind, um die freiwerdenden Proteine abzubauen. Ein Screening nach geeigneten Proteasen ergibt für die gewählten pH-Werte von 6,5 und 7,5 die Kombination von Protease N „Amano“, Promod 194P und Peptidase R für einen pH-Wert von 6,5 und die Kombination Alcalase, Umimazyme und Protease P „Amano“ für einen pH-Wert von 7,5. Durch die Zugabe der Proteasen wird einerseits die Autolyse beschleunigt und der Autolysegrad angehoben. Andererseits wird durch die Zugabe der Proteasen die Qualität des Extraktes gesteigert. Die Biotrockenmasse nimmt durch die Zugabe der Proteasen bei pH 7,5 und 45 °C von ca. 51 % auf ca. 25 % ab. Die Proteinkonzentration im Überstand nimmt für die oben angegebenen Parameter von 35 % auf 16 % ab. Für einen pH Wert von 6,5 bei einer Temperatur von 45 °C nimmt die Biotrockenmasse von ca. 60 auf ca. 35 % und die Proteinkonzentration im Überstand von ca. 45 auf ca. 25 % ab.

Wird vor der Autolyse die Biomasse isoliert und gewaschen, so kann die Extraktausbeute noch gesteigert werden. Die Biotrockenmasse nimmt in diesen Versuchen bei einem pH Wert von 6,5 auf ca. 22 % und für einen pH Wert von 7,5 auf ca. 10 % ab.

Ein vollständiger Abbau der freigesetzten Proteine wird jedoch in keinem Fall erreicht. Um den erhaltenen Überstand in einer Fermentation einsetzen zu können, werden die hochmolekularen Proteine aus dem Überstand mittels Ultrafiltration entfernt. Bei der Filtration ist eine Ausschlussgrenze von 10 kDa ausreichend, um während der Sterilisation und Fermentation ein Schäumen des Mediums zu vermeiden.

Eine Induktion der Autolyse direkt nach Fermentationsende bietet im Vergleich zu der Autolyse, bei der die Biomasse zuerst isoliert und gewaschen wird, einige Vorteile in Bezug auf das eigentliche Produkt Riboflavin. Während der Fermentation wird von *Bacillus subtilis* der biosynthetische Vorläufer des Riboflavins 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (DMRL) teilweise nicht zu Riboflavin umgesetzt und ins Medium ausgeschieden. Während der Autolyse wird 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin durch die freigesetzte Riboflavinsynthase zu Riboflavin umgesetzt. Der Umsatz von 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin zu Riboflavin ist abhängig vom eingestellten pH und nicht stöchiometrisch. Nebenprodukte dieser Umsetzung sind nicht nachweisbar. Durch diese Umsetzung ist eine Ausbeutesteigerung von bis zu 6 % im Bezug auf die Riboflavin –Konzentration am Ende der Fermentation möglich. Die tatsächliche Ausbeutesteigerung ist jedoch abhängig von der am Ende der Fermentation erreichten 6,7-Di-

methyl-8-Ribityllumazin- Konzentration.

Ein weiterer Vorteil der oben genannten Vorgehensweise betrifft die Reinheit des Produktes Riboflavin. Die Autolyse selbst hat keinen Einfluss auf den Protein- und DNA-Gehalt in den Riboflavinkristallen. Wird während der Autolyse die herausgefundene optimale Kombination und Menge an Proteasen zugegeben, kann der Protein- und DNA-Gehalt jedoch bis unter die Nachweisgrenze der aktuellen Analytik gesenkt werden.

Die während dieser Arbeit hergestellten Extrakte wurden in der Fermentation eingesetzt und aufgrund der erhaltenen Ausbeute des Produktes Riboflavin bewertet. Mit den Extrakten die hergestellt werden, indem die Autolyse direkt am Ende der Fermentation induziert wird, können unabhängig von dem eingestellten pH-Wert, bei dem der Extrakt hergestellt wird, Ausbeuten von durchschnittlich 77 % erreicht werden.

Wird vor der Induktion der Autolyse die Biomasse isoliert und gewaschen, so kann eine Ausbeute von durchschnittlich 93 % im Bezug auf die Standardfermentation mit Hefeextrakt erreicht werden wobei, die oben genannte Ausbeute unabhängig von dem eingestellten pH-Wert während der Autolyse ist.

In allen mit den hergestellten Extrakten durchgeführten Fermentationen konnte eine langsamere Zunahme der Biomassenkonzentration im Vergleich zur Standardfermentation mit Hefeextrakt festgestellt werden. Der Feed – Start verzögert sich in allen Fermentation abhängig von der Extraktherstellungsmethode im Vergleich zur Standardfermentation um 1 bis zu 3,5 Stunden. Nähere Untersuchungen ergaben, dass eine Stofflimitierung wie z.B. Phosphat und Stickstoff ausgeschlossen werden kann. Die Analyse des Extraktes ergibt im Vergleich zum verwendeten Hefeextrakt eine 14fach erhöhte Natriumkonzentration.

## Abstract

The fermentative production of various fine chemicals like vitamins, proteins, proteases becomes increasingly important. Mostly yeast extract is used as media and is beside glucose the second cost driver in these processes. Although the biomass produced has a very high energy potential, it is in most cases removed as a waste product. Alternatively it can be used as a feedstuff additive, or as a fertilizer. Regarding on the elements of this waste it consists principally exactly of the same elements of which the cells are build. Therefore, it makes sense to develop a process, which allows processing this waste to an extract that can be used in cultivation processes.

This also applies to fermentative riboflavin production. Riboflavin (vitamin B2) is an essential component of basic metabolism, being a precursor of the coenzymes flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavine mononucleotide (FMN). Many microorganisms, as well as plants and fungi synthesize riboflavin, but higher animals lack the biosynthetic genes and riboflavin must be obtained through their diet.

Fermentative riboflavin production has been employed since 1974 and is more cost-effective than traditional chemical synthesis. In industrial fermentative riboflavin production, different microorganisms are used such as *Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*, *Candida flareri*, *Saccharomyces sp.* and *Bacillus subtilis* [Stahmann *et al.*, 50]. The biomass produced is used as a feedstuff additive otherwise it is composted or disposed of.

Processing an extract, first the cells have to be disrupted. This can be done by mechanical disruption, thermolysis or plasmolysis. In a second step the dissolved proteins and DNA in the supernatant are digested. The most important process in yeast extract production is the autolysis. Processing yeast extract by autolysis has the advantage that both steps are united in one single process. A further advantage of autolysis is the use of the cells own endogenous enzymes for degradation of DNA and Proteins.

In *B. subtilis*, proteins retained in the cell wall include DNAses, RNAses, proteases, enzymes involved in the synthesis of peptidoglycan (penicillin-binding proteins) and cell-wall hydrolases that are involved in cell wall turnover during cell growth, cell division, sporulation and germination [Blackman *et al.*, 7]. Jolliffe and coworkers [Jolliffe *et al.*, 24] showed that cultures of *B. subtilis* lyse within a few hours when they are in stationary phase and that

anaerobic conditions enhance the autolysis. *B. subtilis* has two autolytic enzymes, the N-acetylglucosaminidase, which operates at a pH of 5.5 and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase, which works at a pH of 9.0. Both enzymes are functional at a pH value of 7.2 [Blackman *et al.*, 7, Jolliffe *et al.*, 23].

The objective of the present study was to investigate a way by which the produced biomass can be recycled. We considered to evaluate a way of producing an extract of the biomass and reuse it instead of yeast extract in the cultivation. The most common process for making yeast extract is autolysis. The autolysis can be induced by a temperature shift, causing the microorganisms to die without inactivating their own endogenous enzymes. For optimal autolysis pH, temperature and time are the decisive factors. The specific use of endo- and exoproteases improves the yield and quality of the extract. The reason for this improvement is the higher amount of peptides in the supernatant [Sommer, 48] and correspondingly a higher extract quality.

First we have checked, if it is possible to perform a cultivation with *B. subtilis* extract and what results can be obtained. For this, we disrupted the cells with a high pressure homogeniser (Microfluidizer M110-EH, Microfluidics, Newton, MA, USA) at 1900 bar and produced an extract which we used in the cultivation.

After cultivation, the cell mass was isolated and washed three times in phosphate buffer, (50 mM, pH 7) and disrupted three times at 1900 bar. The cell dry mass of the cell debris was estimated to be about 17% containing a protein content of 52% of the total cell dry mass (CDM). The disruption of the cells was checked microscopically.

The recovered supernatant after centrifugation was enzymatically digested with Alcalase (Calbiochem, San Diego, USA) in a shake flask (pH 7.0, 40 °C). After determination of total carbon content the digested supernatant was used 1:1 (C:C) in place of yeast extract. During sterilization of the media and the first six hours of cultivation a strong foam formation could be observed. This foaming indicates that the grade of digestion of the proteins in the supernatant in the *B. subtilis* extract is not high enough and there is too much high molecular weight protein in the supernatant.

The riboflavin concentration reaches after cultivation 94.6 % and the yield reaches 98.7 % of the parallel cultivation with yeast extract. The Feed - Start was approximately 3 hours delayed in comparison to the standard cultivation with yeast extract, so that the room-time yield is lower than the standard cultivation. During this cultivation we could observe with the CDM

estimation a lower growth of the microorganisms on *B. subtilis* extract in the first 18 hours.

For an economical production of a *B. subtilis* extract, the lysis process must be cheap and the product must show good properties for the cultivation of microorganisms. For yeast extract the average protein content is 73 – 75 %. Sodium and polysaccharides contents do not respectively exceed 0.5 % or 5 %. The composition of the yeast extract protein content is as follows: free amino acids amount to 35 - 40 %; di-, tri-, and tetra-peptides with molecular weights less than 600 MW (Dalton) contribute 10 - 15 % of the total protein. With a total of 45 – 55 %, these two fractions are the largest portion of the yeast extract protein [Sommer, 49].

Several preliminary experiments were conducted to determine the temperature and pH optimum. In these experiments protein in the supernatant and riboflavin and CDM were estimated. The trial was set up to 24h so that the autolysis process can be integrated in the actual riboflavin production process. After cultivation six sterilized fermenters of an Infors Sixfors fermenter system (Infors GmbH, Einsbach, Germany) were sterily filled in parallel. For CDM estimation only 5 ml were used in consequence of the small fermenter volume (500 ml working volume).

For determination of the temperature optimum a pH value of 7.0 was chosen according to Jolliffe *et al.* [Jolliffe *et al.*, 23, 24]. The temperature range was chosen from 30 to 60 °C with steps of 5 °C. These trials indicate that a temperature of 40°C is best suited for autolysis. For determination of the pH optimum, a temperature of 40 °C was chosen according to the experiment above. The adjusted pH range was between 5.0 and 9.0 in steps of 0.5 pH units. The results of these trials show that the pH optimum is between 6.5 and 7.5. For pH 6.5 a maximum lysis degree rate ( $ld$ ) of 4.87 %\*h<sup>-1</sup> and for pH 7.5  $ld = 5.79$  %\*h<sup>-1</sup> in the first 8 hours were achieved. After 16 hours autolysis was finished since CDM remained constant.

For processing a good extract it is necessary that the salt concentration in the extract is low, so that pH values around 7 should be best suited. For lowering the risk of contamination during autolysis without adding antiseptic agents a temperature of 45 °C or higher should be chosen [Reiff *et al.*, 41]. An advantage of the higher temperature is that the most commercially obtained enzymes work in a temperature range between 40 and 55 °C. For the further trials we decided to work at pH 6.5 and 7.5 and a temperature of 45 °C.

A good extract quality is received by hydrolysis of proteins to amino acids [Sommer, 48]. Initially we performed a screening for an endopeptidase able to digest the high molecular



weight proteins to small peptide fragments. For this screening proteases from Novo, Amano, Biocatalysts, Merck, Calbiochem, BIO-CAT and Genencor which had the right pH and temperature range were used. In these experiments the alkaline protease Alcalase (Alcalase, Calbiochem, San Diego, CA, USA) was found to be the best suited at pH 7.5, and at pH 6.5 Amano N (Amano Enzyme Europe LTD., Chipping Norton, U.K.) was best suited. The used proteases also enhanced the autolysis process, so that the CDM decreased from 42 % to 24 % for pH 7.5 and from 60 % to 48 % for pH 6.5. The lysis degree rate for pH 7.5 rose from 5.79 %\*h<sup>-1</sup> to 8.65 %\*h<sup>-1</sup>, and for pH 6.5 from 4.87 %\*h<sup>-1</sup> to 6.59 %\*h<sup>-1</sup> in the first 8 hours. Risse *et al.* [Risse *et al.*, 42] showed that application of alkaline protease enhanced the autolysis process. The protein concentration decreased despite a higher degree of autolysis. The optimization experiments showed that an increased amount of endoprotease did not increase the autolysis rate nor decreased the protein concentration in the supernatant. In the second step a further screening for exoproteases that can digest the fragments from the endoprotease reaction to amino acids and peptides was made. For pH 7.5 Amano P and Umimazyme (both from Amano Enzyme Europe LTD., Chipping Norton, U.K.) were found to be suitable. At pH 6.5 Promod 194P (Biocatalysts LTD., Treforest, U.K) and Peptidase R (Amano Enzyme Europe LTD., Chipping Norton, U.K.) were found to be suitable.

At pH 7.5 the addition of exoproteases had small influence on the protein concentration in the supernatant but no influence on the degree of lysis. In contrast, the addition of exoproteases at pH 6.5 had a great influence on both. The CDM decreased from 48 % to 27 % and the protein concentration decreased from 41 % to 24 %. The maximum rate of lysis remained constant, however the main autolysis was extended from 8 to 16 hours. The reason for the higher degree of lysis is the composition of the enzymes. The enzymes used are not pure exoproteases, rather they are a mixture of endo- and exoproteases.

An optimization of the amount and time intervals of endo- and exoprotease addition increased the degree of proteolysis at pH 6.5 from 24 % to 14 % and at pH 7.5 from 16 % to 14 %. In these trials the amount of endoproteases could be decreased to 75 % of the initial enzyme amount.

6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (DMRL) is the direct precursor of riboflavin in the biosynthetic pathway [Bacher *et al.*, 4, 5] and it is converted to riboflavin by the riboflavin synthase. The DMRL concentration in the supernatant is dependent on raw materials used and the conditions during cultivation. During the autolysis process we observed that the DMRL

concentration in the supernatant decreased more than the dilution and the level of increase of riboflavin concentration (depending on the DMRL concentration in supernatant) despite the dilution in the autolysis process. During autolysis, the initial volume increased in average by 4 % due to pH regulation. After 8 hours of the autolysis process, no DMRL was detectable in the supernatant and depending on the initial DMRL concentration, the riboflavin concentration increased up to 6 percent of the initial concentration. We compared the DMRL concentration profile of the autolysis process with the thermal treatment process in production (step after cultivation for inactivating the microorganisms and degradation of DNA in the supernatant [Bretzel *et al.*, 10]) where no autolysis occurs. In the production process, the DMRL concentration decreased proportional to the dilution. We supposed that the decreased level of DMRL and the increased riboflavin level were related to the autolysis. We hypothesised that during the autolysis, DMRL was oxidized to oxo-riboflavin. A second more plausible possibility is that the conversion of DMRL to riboflavin by the riboflavin synthase occurred in the supernatant during autolysis and the DMRL was converted into riboflavin [Bacher *et al.*, 4, 5].

To confirm the latter assumption, the cells were isolated and washed three times with 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and disrupted at 1900 bar with a high pressure homogeniser (Microfluidizer M110-EH, Microfluidics, Newton, MA, USA). The trial could be performed in normal phosphate buffer, because the riboflavin synthase is not depending on divalent metal ions [Eberhardt *et al.*, 15]. The supernatant was diluted in a shake flask to a total protein concentration of 5 g/l in a volume of 50 ml and the pH adjusted to 7.0, 7.5 and 8.0. A defined concentration of DMRL (5 g/l) was added to the supernatant and incubated at 45 °C.

In the samples only riboflavin could be detected. This trial showed that our assumption was correct and DMRL was converted into riboflavin. The conversion of DMRL to riboflavin was pH and temperature dependent; after 90 minutes no DMRL was detectable at pH 8 and also after 160 min at pH 7.5. The conversion of DMRL to riboflavin seems to be not stoichiometric and other products are unstable and not detectable.

During cultivation and autolysis, proteins and DNA are dissolving in the supernatant and could be trapped within the riboflavin crystals. To investigate this we checked whether there was an increase in the protein and DNA concentration incorporated into the riboflavin crystals compared to the actual process, to determine if autolysis has an influence on the downstream processing of the riboflavin.

For detection of protein impurities, we isolated the riboflavin crystals from the different autolysis processes and from the actual production process as reference. The proteins were extracted with SDS from the riboflavin crystals. With these samples, we performed an SDS-PAGE gel electrophoresis and compared the autolysis with the actual production process, where after cultivation a thermal treatment follows.

As a result of autolysis, the protein concentration in the riboflavin crystals did not increase in comparison to the protein concentration after cultivation. If autolysis was performed by adding proteases the protein concentration was lower or even not detectable by this method than in the crystals of the cultivation broth. The highest protein concentration was found for the first step in the actual downstream process.

The removal of DNA from a biotechnological-produced foodstuff additive, such as riboflavin, is of critical importance for marketing authorization and registration of the product. The ability to detect minute traces of recombinant DNA in a product requires the development of efficient and sensitive methods for extraction and detection of such DNA. Work by Hermann and Schurter at Roche led to the development of a highly effective method for the extraction of DNA from riboflavin, such that no significant loss of DNA during extraction and purification could be detected [Hermann *et al.*, 19].

PCR analyses were performed using primer pairs to amplify 1-kb and 0.5 kb fragments of the *rib-cat* boundary of the integrated engineered *rib* operon pRF69 to see, if the amount of recombinant DNA in the product increased or not during autolysis. All samples contain recombinant DNA, except the sample treated at pH 7.5 with 75 % proteases. Only in the sample from pH 6.5 is increased recombinant DNA detectable compared with the reference sample from the thermal treatment.

Riboflavin quality is improved related to protein content trapped in the crystals and can also improve the quality related to DNA content under the right conditions.

Cultivations were performed with yeast extract, *B. subtilis* extract (EF) and *B. subtilis* extract obtained from washed biomass (EW) (before autolysis, biomass was isolated and washed 3 times with phosphate buffer corresponding to the phosphate buffer concentration after cultivation). After autolysis, the supernatant was isolated by centrifugation (10 min, 4300g) and the media set 1:1 after carbon source balance. Due to the foaming of the media during the first cultivations the supernatant was cross-flow filtrated with a cut off of 10 kDa.

With EW an average yield of  $93.6 \pm 5.4$  % and a riboflavin concentration of  $90.7 \pm 4.3$  % at the end of cultivation could be reached. With EF an average yield of  $77.7 \pm 4.4$  % and a riboflavin concentration of  $78.7 \pm 5.3$  % at the end of cultivation could be reached. In contrast, the biomass concentration increased with EF around  $11.3 \pm 4.3$  %.

In these cultivations we could observe, that the biomass had a prolonged lag phase of about 2 hours in average. After 24 hours, the biomass concentration grown on *B. subtilis* extract overtakes the standard. A comparable time course of the biomass concentration could also be observed by Risse *et al.* [Risse *et al.*, 42]. The prolonged lag phase was not caused by the media composition. We checked the media for nitrogen, inorganic phosphate, ammonia and trace elements concentration but no significant deviations were found. Due to the prolonged lag phase, we extended the cultivation about six hours, but this had also no effect on the yield or riboflavin concentration.

Further, we could observe that in the cultivation with autolysate the DMRL production increased with factor 2 in comparison with the standard cultivation.

We hypothesized that the prolongation of the lag phase is a result of the media change from yeast extract used in the seed cultures and *B. subtilis* extract used in the cultivation. To confirm this assumption we compared the growing of *Bacillus subtilis* on yeast extract and bacillus extract in shake flasks. First, we inoculated seed 1 on both extracts in shake flasks. Due to the small volume and low cell concentration, we estimated only the OD for documentation of the growing. Like in the cultivation, the Seed 1 culture on bacillus extract is growing slower than the parallel culture growing on yeast extract. The lag phase on the culture with bacillus extract was nearly 6h in contrast of 2h of the culture grown on yeast extract.

With the received cultures, three shake flasks, two containing media with yeast extract, one containing *B. subtilis* extract were inoculated in parallel. The first shake flask containing yeast extract was inoculated with *B. subtilis* grown on yeast extract as reference. The second shake flask was inoculated with *B. subtilis* grown on *B. subtilis* extract. The third shake flask containing *B. subtilis* media was inoculated with *B. subtilis* grown on his own extract. We expected that the lag phase of the Seed 2 culture on bacillus extract would shorten when it is inoculated with Seed 1 grown also on bacillus extract. This supposition was wrong. The culture on bacillus extract grows slower than the standard culture on yeast extract. This experiment led to the assumption that there is something in the bacillus extract what has a

negative influence on the growth of the *Bacillus* cultures.

One more possibility for the extended lag phase could be the general stress proteins (GSP). González-Pastor *et al.* [González-Pastor *et al.*, 17] reported that cells that have entered the pathway to sporulate produce and export a killing factor and a signaling protein that act cooperatively to block sister cells from sporulating and to cause them to lyse. Further more Bernhardt *et al.* [Bernhardt *et al.*, 6] and Petersohn *et al.* [Petersohn *et al.*, 39] reported that the production of GSP rises from approximately 1% in growing cells to 20% or even more in starved or stressed bacteria. This knowledge seems to apply to our observations. During the cultivation experiments we observed on the development of the CDM that in the last 6 hours were entering in the stationary phase [Bretz, 9]. The cultivation with EF had in average one hour later Feed - Start than the cultivation with EW. We assume that in the EW are less GSP accumulated than in the EF caused by the washing the biomass. The acetoin concentration development during the first six hours of cultivation corroborate this hypothesis. In the normal cultivation with yeast extract the acetoin concentration increase and reaches its maximum after 6 hours due to the high glucose concentration in the cultivation media. Then the acetoin concentration decreases and after 18 hours the concentration is below the detect ability. Is EF used in the cultivation the highest acetoin concentration is reached only after 12 h and is than decreasing.

To confirm this assumption a further experiment was performed with seed cultures. Seed 1 was grown on standard media with yeast extract. When maximum OD<sub>540</sub> was reached a seed 2 was incubated with 1 ml of the seed 1. The seed 2 was prepared as follows. The first shake flask contains the standard media, the second shake flask contains the standard media and additionally 25 % (v:v) of the total volume was added isolated supernatant (centrifugation 4250g, crossflow filtrated with 10 kDA cutoff) and the third shake flask contains additionally 50 % (v:v) of the isolated supernatant. If *Bacillus subtilis* is producing GSP like mentioned by Bernardt *et al.* [Bernardt *et al.*, 6] and Petersohn *et al.* [Petersohn *et al.*, 39] than lowered growing of the *Bacillus subtilis* cultures in the shake flask with the added supernatant should be observed in comparison with the standard seed. With this trial, we also can exclude a lack of vitamins.

The results of the experiment indicate that *Bacillus subtilis* is producing GSP that inhibits its own growing. With 25 % (v:v) added cultivation supernatant the growing of the culture is slowed down and the exponential growing phase is reached only after 6 hours in comparison

to the standard which reaches the exponential growing after 4 hours. The addition of 50 % (v:v) cultivation supernatant inhibits the growing more strongly than 25 % of the cultivation supernatant. Further more this experiment showed, that the GSP are not hydrolyzed by the proteases used in this work. So some new proteases have to be tested which can hydrolyze these specific proteins.

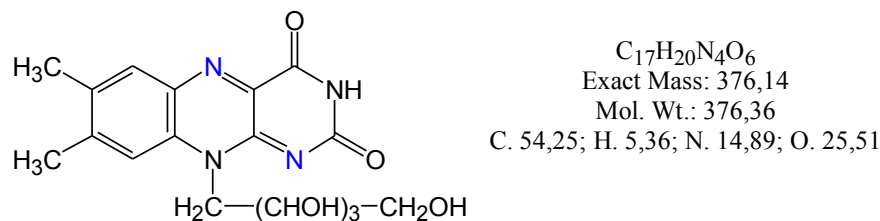
Further, we studied if inhibiting materials are accumulated if the biomass is continuously lysated and used in the cultivation. For this, we used this process 3 times in circle. No negative effect could be observed. We got the same results like mentioned above. Therefore *Bacillus subtilis* can degrade the GSP produced by itself and the inhibiting GSP's are not accumulated in the media.

The main reason for the decreased riboflavin yield and prolonged lag phase is the high sodium content of the extracts caused by protein hydrolysis during autolysis. The sodium concentration of yeast extract is 0.5 % exactly like reported in the literature by Sommer [Sommer, 49].

Summarizing the experiments above showed that it is possible to recycle the biomass from the cultivation by producing an extract, which can be used in the same cultivation. For increasing the product yield (riboflavin) it is necessary to decrease the sodium hydroxide solution consumption during autolysis. For lowering the sodium concentration of the extract the autolysis process has to be changed. For a good protein hydrolysis without a high sodium hydroxide consumption the pH must be regulated around pH 5.

# 1 Einleitung

Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) hat eine große Bedeutung für den Ablauf der Lebensprozesse und ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. In Form des Flavinadeninucleotids (FAD) und des Flavinmononucleotids (FMN) bildet es die Coenzyme bzw. prosthetischen Gruppen der Flavoproteine, die als Elektronenakzeptor der Oxidoreduktasen benötigt werden. Des Weiteren gibt es auf Riboflavin basierende Pigmente, die zur Lichtemission und zur „Lichternte“ z.B. in Cytochromen verwendet werden [Miyamoto *et al.*, 34].



**Abbildung 1.1:** Chemische Strukturformel des Riboflavins

Riboflavin kann im Gegensatz zu Mikroorganismen und Pflanzen von Mensch und Tier nicht synthetisiert und muss daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Mangelerscheinungen wie z.B. Dermatitis lassen sich vermeiden, indem eine empfohlene Tagesration von 0,3 - 1,8 mg/Tag beim Menschen und 1 - 4 mg/kg für Tiere dem Organismus zugeführt wird. Eine Überdosierung ist harmlos, da überschüssiges Riboflavin mit dem Urin ausgeschieden wird [Cooperman *et al.*, 11].

Der Gesamtbedarf an Riboflavin kann heutzutage nur durch eine industrielle Herstellung gedeckt werden. Von der industriellen Produktion werden über 80 % in Form von Additiven im Tierfutter verwendet, der Rest wird in hochreiner Form in Multivitaminensäften, Lebensmittelfarbstoffen oder Pharmaapplikationen verwendet [van Loon *et al.*, 54].

Die geschätzte Jahresproduktion der Marktführer DSM Nutritional Products GmbH (ehemals Roche Vitamine GmbH, Niederlande), BASF (Deutschland) und ADM (USA) ist größer als 3000 jato [Stahmann *et al.*, 50].

Die ersten großtechnischen fermentativen Verfahren zur Riboflavinproduktion gehen zurück bis in die dreißiger Jahre. Das erste Verfahren beruhte auf dem Organismus *Clostridium*

*acetobutylicum*. Um 1940 wurde dieses Verfahren durch *Eremothecium ashbyi* und 1946 durch *Ashbya gossypii*, bedingt durch die genetische Instabilität von *Eremothecium ashbyi*, abgelöst. 1965 wurde Riboflavin von drei Firmen (Commercial Solvents, Grain Processing Corporation, Premier Malt Products) fermentativ hergestellt, jedoch wurden diese Prozesse drei Jahre später wieder stillgelegt, da sie mit dem chemischen Prozess nicht konkurrieren konnten. 1974 wurde die fermentative Herstellung von Riboflavin durch die Firma Merck wieder aufgenommen, und seit diesem Zeitpunkt ist die fermentative Herstellung gegenüber der chemischen Synthese immer vorteilhafter geworden.

1990 nahm BASF die fermentative Produktion von Riboflavin mit *Ashbya gossypii* auf und nach 6 Jahren der parallelen Produktion (chemisch und fermentativ) wurde 1996 der chemische Prozess beendet. 2000 wurde auch bei Roche Vitamine GmbH die fermentative Herstellung von Riboflavin mit *Bacillus subtilis* parallel zur chemischen Synthese eingeführt. 2003 wurde die chemische Synthese eingestellt.

Zurzeit werden zur fermentativen Herstellung von Riboflavin die folgenden drei Stämme verwendet: *A. gossypii* (BASF, Deutschland), *Candida famata* (ADM, USA), *Bacillus subtilis* (Roche, Deutschland) [Stahmann *et al.*, 50].

## 1.1 Gegenwärtige mikrobiologische Verfahren zur Vitamin B2 Herstellung

Vitamin B<sub>2</sub> wird von Pflanzen und vielen Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und Pilzen synthetisiert. Der Riboflavingehalt von Mikroorganismen beträgt typischerweise 60-700 nM/g Protein. Die Riboflavinsynthese ist bei Mikroorganismen nur wenig reguliert, so dass manche Bakterien und Hefen Flavinmengen produzieren, die ihren Eigenbedarf um ein Vielfaches übersteigen. Für die fermentative Herstellung von Riboflavin gibt es verschiedene Organismen, die in Frage kommen: *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida flareri*, des weiteren die rekombinanten Organismen *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium ammoniagenes* [Stahmann *et al.*, 50].

Von diesen Organismen wurden bisher *Ashbya gossypii* (BASF, Deutschland) und *Candida flareri* (ADM, USA) für die industrielle Großproduktion verwendet. Die Produkte dieser industriellen Fermentation bestehen aus 80% Riboflavin, in denen 20% Biomassereststoffe



enthalten sind [Bretzel *et al.*, 50]. Dieses Produkt wird als Futtermittel-Zusatzstoff verkauft.

Die große physiologische Divergenz von *Bacillus* spp. und die Tatsache, dass die meisten Mitglieder dieses Genus nicht pathogen, genetisch leicht zu modifizieren, sehr gut Proteine und andere Metabolite sekretieren und einfach zu kultivieren sind, machen *Bacillus* spp. zu einem der bevorzugten Wirte für biotechnologische Produktionsprozesse. Zu den Produkten die heutzutage mit *Bacillus* in Fermentationen hergestellt werden, gehören neben den Vitaminen Enzyme, Antibiotika, Insektizide, Nucleotide und Nucleoside zur Geschmacksverstärkung und Aminosäuren [Arbige *et al.*, 3].

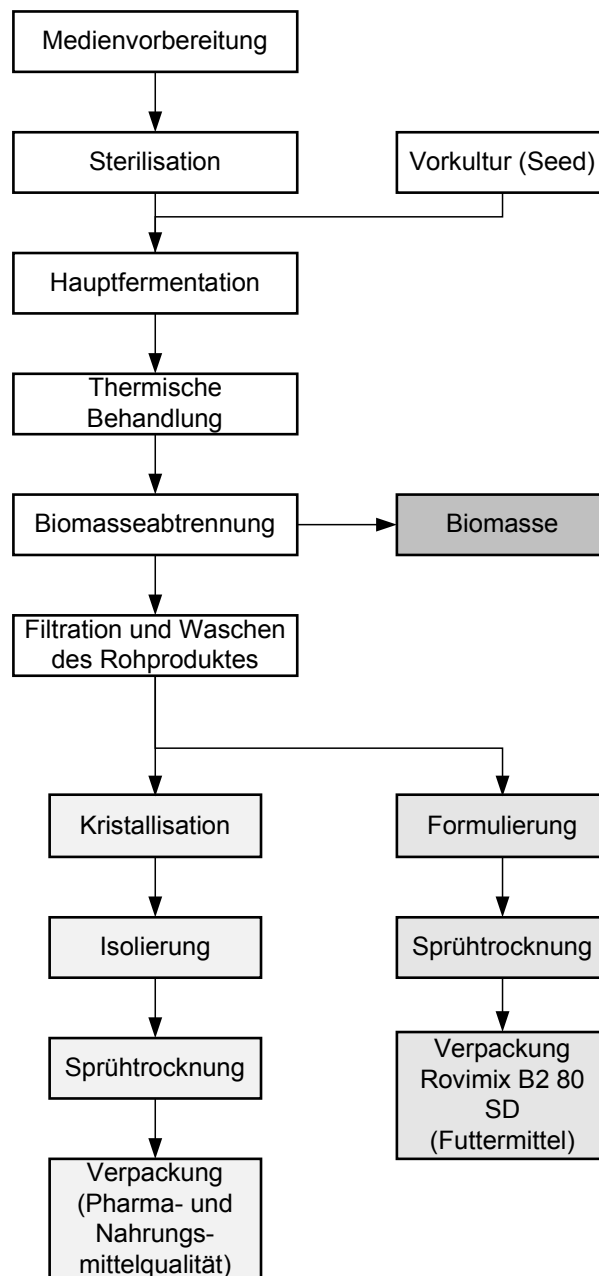
Der in dieser Arbeit verwendete Bakterienstamm (*Bacillus subtilis*) ist von Natur aus kein Riboflavinüberproduzent, sondern sekretiert nur geringfügige Mengen ins Medium. Die sechs Enzyme, die zur Biosynthese von Riboflavin benötigt werden, sind alle auf dem sogenannten *rib*-Operon lokalisiert. Die Riboflavin Produktion wird durch das *ribC*-Genprodukt negativ beeinflusst, wobei der genaue Zusammenhang bisher noch nicht geklärt ist. Durch die Anwendung „klassisch“ induzierter Mutationen konnte beim *Bacillus* Stamm die Repression der Riboflavin-Synthese durch das *ribC*-Genprodukt aufgehoben werden [Coquard *et al.*, 12; Mack *et al.*, 29]. Dadurch konnte eine bedeutende Überproduktion an Riboflavin erreicht werden. Die Riboflavinproduktion dieses *Bacillus* Stammes wurde durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden weiter gesteigert. Die Expression des *rib*-Gens wurde durch die Modifizierung des *rib*-Operons pRF69 und pRF93 unter die Kontrolle eines starken Promotors gebracht. Dieses *rib*-Operon wurde in das Genom des *Bacillus subtilis* Stamms integriert und vervielfältigt. Für diesen veränderten *B. subtilis* Stamm wurde ein für den Großmaßstab wirtschaftlich interessantes Fed-Batch-Verfahren entwickelt. Das produzierte Riboflavin wird von *B. subtilis* in das Fermentationsmedium abgegeben, wobei nur ein geringfügiger Teil in der Zelle verbleibt [Perkins *et al.*, 38; Hümbelin *et al.*, 20].

Vitamin B<sub>2</sub> akkumuliert im Fermentationsmedium und bildet aufgrund der geringen Löslichkeit nadelförmige Kristalle, die von der Biomasse durch verschiedene Aufreinigungsprozesse abgetrennt werden können. Nach dem Waschen der Kristalle mit heißer verdünnter Säure wird ein Produkt mit mindestens 96%igem Riboflavingehalt erhalten, das mit Maltodextrin formuliert als Futtermittelzusatzstoff verwendet werden kann.

Nach der Umkristallisation der Kristalle mit konzentrierter Säure erhält man > 98% reines Riboflavin, dass für den Humanbereich eingesetzt werden kann.

Der neu entwickelte Fermentationsprozess hat im Gegensatz zur chemischen Synthese den Vorteil, dass 87 % der verwendeten Rohstoffe Zucker sind, bei der chemischen sind es ledig-

lich 23 %. In der fermentativen Riboflavinproduktion werden im Gegensatz zur chemischen Synthese keine organischen Lösungsmittel verwendet. Des Weiteren sind Luftbelastung und Abfälle um bis zu 36 %, der Energieverbrauch um bis zu 25 % geringer.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des Riboflavinherstellungsverfahrens mit *Bacillus subtilis*.

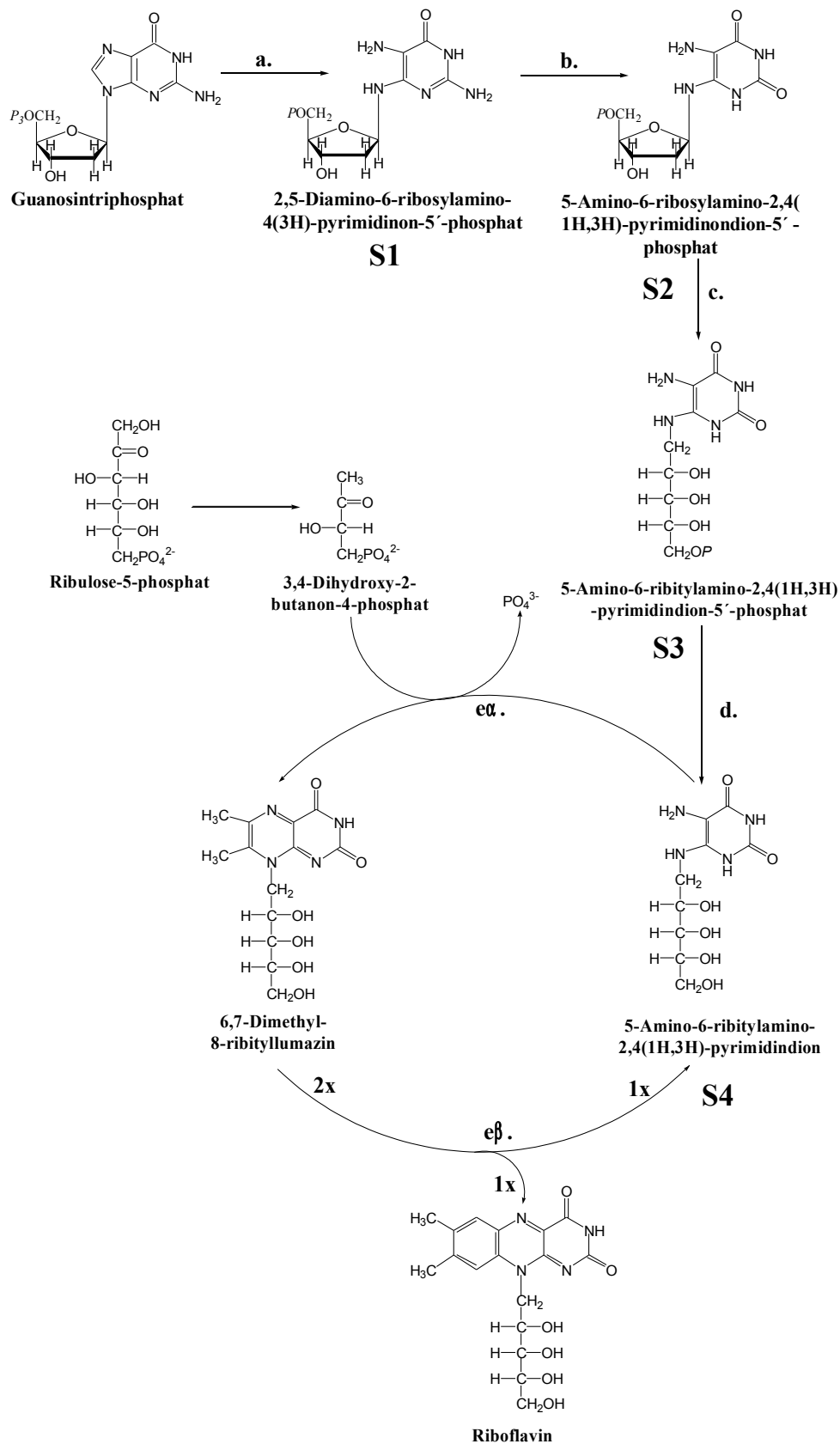
Im Vergleich zu den anderen mikrobiellen Verfahren zeichnet sich dieser Prozess durch hohe Endproduktkonzentrationen und kurze Prozesszyklen aus [van Loon *et al.*, 54].

Somit ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren der chemische Prozess durch diese Fermentation vollständig ersetzt wird [Stahmann *et al.*, 50].

**Riboflavinbiosynthese:** Die Biosynthese von Riboflavin benötigt ein Molekül Guanosintri-phosphat (GTP) und zwei Moleküle Ribulose-5-Phosphat und wird in sechs enzymatischen Reaktionen synthetisiert (siehe Abbildung 1.3).

Der Imidazolring des GTP wird hydrolytisch durch die GTP Cyclohydrolase II (*ribA*) unter Freisetzung von Formiat und Pyrophosphat geöffnet. *Bacillus subtilis* bildet hierbei ein bifunktionelles Enzym mit GTP Cyclohydrolase II und der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase. Das Enzymprodukt S1 wird in einer zweistufigen Reaktion in S2 umgewandelt, wobei der hydrolytische Schnitt der auf Position 2 stehenden Aminogruppe des heterocyclischen Ringes und die Reduktion der Ribosylseitenkette durch die Deaminase/Reduktase erfolgt. Die Sequenz der Reaktionsschritte variiert in den verschiedenen Organismen. In Eubakterien erfolgt zuerst die Deaminierung gefolgt von der Seitenkettenreduktion, bei Hefen und Pilzen ist die Reihenfolge genau umgekehrt. S3 kann nicht als Substrat für die 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase dienen, folglich muss es erst dephosphoryliert werden, jedoch ist über diesen Reaktionsschritt nichts bekannt. Das 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat wird von der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus dem Pentose/Pentulose Pool synthetisiert. Die Kondensation von S4 und 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat erfolgt durch die Lumazin Synthase, dabei werden zwei Wasser- und ein Orthophosphatäquivalent benötigt.

In *Bacillaceae* schließt das icosaedrische Lumazin Synthasecapsid die Riboflavin Synthase ein, die ihrerseits ein Trimer ist. Dieser Enzymkomplex kann somit die letzten zwei Schritte in der Riboflavinsynthese katalysieren. Das Riboflavin wird aus zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (DMRL) durch eine Dismutation, die von der Riboflavin Synthase katalysiert wird hergestellt. Überraschenderweise kann diese Dismutation auch spontan in einer heißen wässrigen Lösung in Abwesenheit der Riboflavin Synthase stattfinden [Bacher *et al.*, 4, 5].



**Abbildung 1.3:** Biosynthese von Riboflavin. a: GTP cyclohydrolase II (ribA); b,c: Desaminase & Reduktase (ribG); e $\alpha$ / $\beta$ : Lumazin/Riboflavin Synthase (nach Bacher *et al.*, 4, 5).

## 1.2 Extraktherstellung

Die in der Fermentation zur Herstellung der verschiedenen Feinchemikalien am häufigsten und in größten Mengen verwendeten Rohstoffe sind Glucose und Hefeextrakt. In den seltensten Fällen sind die Bedürfnisse der Mikroorganismen so gut bekannt, dass man ausschließlich ein Minimalmedium verwenden und somit auf Hefeextrakt verzichten kann. Hefeextrakt selbst, wird durch Fermentation von Hefe mit anschließender Autolyse und Extraktzubereitung hergestellt.

Die bei der Herstellung der diversen Feinchemikalien anfallende Biomasse wird, obwohl diese ein sehr hohes Energiepotential hat, in den meisten Fällen als Abfallprodukt entsorgt. Alternativ wird die Biomasse teilweise als Futtermitteladditiv oder Dünger verwendet. Betrachtet man die Zusammensetzung der Biomasse, so stellt man fest, dass diese genau aus den Elementen besteht, die eigentlich im Fermentationsmedium benötigt werden. Dementsprechend würde es Sinn machen, einen Prozess zu entwickeln, der es erlaubt dieses sogenannte „Abfallprodukt“ in ein Extrakt umzuwandeln, das in der Fermentation eingesetzt werden könnte.

Hefeextrakt ist der eingedickte und von der Hülle befreite Inhalt der Hefezellen. Die Konsistenz ist meist pastenförmig, jedoch gibt es auch flüssige und pulverförmige Hefeextrakt-Präparate [Reiff *et al.*, 41]. Der Aufschluss von Zellen kann auf verschiedene Weisen erfolgen, die im Folgenden aufgezählt werden:

- Chemisch: starke Basen oder Säuren, Lösungsmittel, Detergentien
- Biologisch: enzymatische, Antibiotika, Phagen, Autolyse
- Physikalisch: nicht-mechanisch: osmotischer Schock, Einfrieren / Auftauen
- mechanisch: Ultraschall, Druck

In der Hefeextraktindustrie werden zurzeit folgende Verfahren zur Extraktherstellung verwendet: Autolyse, Thermolyse (z.B. Kochen der Hefe in Wasser bei 100 °C), Plasmolyse (z.B. Behandlung mit hohen Salzkonzentrationen bei Temperaturen knapp unter 100 °C), mechanische Zerstörung (z.B. Hochdruckhomogenisator oder Kugelmühle).

Das am häufigsten eingesetzte Verfahren in der Hefeextrakt-Industrie ist die Autolyse. Während dieses Prozesses wird die Hefe bzw. das in den Überstand freigesetzte Protein von den eigenen endogenen Enzymen degradiert. Der Autolyseprozess kann durch einen kontrollierten Temperatur oder osmotischen Schock induziert werden, wodurch die Hefe-

zellen absterben ohne die eigenen endogenen Enzyme (Proteasen) zu inaktivieren. Kontrollierter pH-Wert, Temperatur und die Dauer der Autolyse sind entscheidende Faktoren für einen optimalen und standardisierten Autolyseprozess. Durch die Addition von Salzen und Enzymen (z.B. Proteasen oder Mischungen aus Proteasen und Peptidasen) kann die Protein-degradation der Hefezelle kontrolliert werden [Sommer, 49].

Durch den autolytischen Prozess werden nicht nur die Proteine, sondern auch alle anderen in der Hefezelle enthaltenen Substanzen mehr oder weniger abgebaut. So unterliegen dem enzymatischen Abbau auch Kohlenhydrate, Lipide und Nucleinsäuren.

Eine notwendige Bedingung für eine echte Autolyse ist die Ausschaltung von Bakterien. Die Autolyse der Hefe muss daher steril durchgeführt werden. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass man bei Temperaturen unter 40 °C mit mehr oder weniger großen Mengen an antiseptischen Mitteln arbeiten muss, während bei Temperaturen über 45 – 50 °C der Zusatz bakterizider Stoffe nicht notwendig ist.

Die Autolyse ist abhängig vom angewandten Prozess und kann zwischen 15 und mehr als 60 Stunden dauern. Bei einem Standard - Trockenhefeextrakt für die Fermentationsindustrie beträgt der durchschnittliche Proteingehalt zwischen 73 und 75 %. Dieser Proteingehalt teilt sich in folgende Fraktionen auf:

35-40% freie Aminosäuren

10-15% Di-, Tri- und Tetrapeptide mit einem Molekulargewicht kleiner als 600 Da.

40-45% Oligopeptide mit einem Molekulargewicht zw. 2-3 kDa

2-5 % Oligopeptide mit einem MW zw. 3-10 kDa [Sommer, 49].

Nach Beendigung der Autolyse erfolgt die Trennung der Hefezellwände von den in Lösung gegangenen Zellinhaltsstoffen, anschließend die Vorkonzentrierung mittels Vakuum-Fallstromverdampfer und nachgeschalteter Filtration, um verbliebene Trübstoffe und unlösliche Aminosäuren zu entfernen. Auf diese Weise wird ein klarlösliches Endprodukt erhalten.

Eine weitere Konzentrierung, die im Teilvakuum erfolgt, sowie eine Kurzzeitsterilisation, führen zu den auf dem Markt üblichen Anbietungsformen „flüssig“ und „viskos“, die Trockensubstanzgehalte bis zu 80% aufweisen und hochviskos sind [Sommer, 49].

Die Autolyse von *Bacillus subtilis* wurde bereits in den 80iger Jahren von Jolliffe *et al.* [23] untersucht. Hierbei konnten zwei Autolysine in *Bacillus subtilis* 168 nachgewiesen werden. Die *N*-Acetylglucosamidase (CwlG, Genprodukt von *lytD*, 90 kDa) hat ihr pH-Optimum bei pH 5,5 und *N*-Acetylmuramyl-L-Alaninamidase (CwlB, Genprodukt von *lytC*, 50 kDa) hat ihr

pH-Optimum bei pH 9,0. Bei einem pH-Wert von 7,2 sind sowohl die Glucosamidase als auch die Amidase aktiv. Margot *et al.* [31] konnte noch ein drittes Autolysin CwlF (Genprodukt von *LytE*) nachweisen. CwlB und CwlG machen über 95% der lytischen Aktivität aus. Die Expression der Gene *lytC*, *lytD* und *lytE* ist abhängig vom Sigmafaktor  $\delta^D$ , der die höchste Aktivität beim Start der stationären Phase hat. Des Weiteren spielen die Sigmafaktoren  $\delta^A$  und  $\delta^H$  eine Rolle bei der Lyse.

Die höchsten Autolyseraten wurden erreicht wenn die Zellen mit Wasser bzw. Phosphatpuffer gewaschen und in Phosphatpuffer bzw. in einer Minimalsalzlösung resuspendiert wurden [Jolliffe *et al.*, 23].

### 1.3 Zielsetzung

Wie bereits in Kapitel 1.2 bereits erwähnt sind in der fermentativen Riboflavinherstellung Glucose und Hefeextrakt die in den größten Mengen eingesetzten Rohstoffe und somit auch die Kostentreiber. Des Weiteren werden große Mengen an Biomasse produziert, die zurzeit kostenaufwendig entsorgt werden müssen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem die anfallende Biomasse so aufbereitet werden kann, dass diese in der fermentativen Riboflavinherstellung als Substrat wiederverwendet werden kann. Im Erfolgsfall könnten so nicht nur die Abfallmengen deutlich reduziert, sondern auch die Riboflavin - Herstellungskosten drastisch gesenkt werden, da weniger oder unter Umständen sogar kein Hefeextrakt mehr eingesetzt werden müsste.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismus und Anzuchtbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wird der Stamm *Bacillus subtilis* RB50::(pRF69)<sub>n</sub>::(pRF93)<sub>m</sub> (n und m repräsentieren die Anzahl der Kopien der einzelnen Plasmide die in das Genom von *B. subtilis* RB50 integriert wurden) [Perkins *et al.*, 37, 38] verwendet.

Die Anzucht der Kultur für die Fermentation erfolgt mittels Schüttelkolben in zwei Schritten. 100 ml Medium werden in einem 500 ml Schikanenkolben (4 Schikanen) sterilisiert und anschließend mit 1 % einer tiefgefrorenen Arbeitszellbank angeimpft. Die Kultur wird bei 37 °C und 250 Upm im Schüttler (Innova 4400, New Brunswick Scientific) inkubiert bis eine OD<sub>540</sub> von 1 erreicht wird.

Anschließend werden in einem sterilisierten 2 l Schikanenkolben mit 400 ml Medium Inhalt mit 1 % der angezogenen Vorkultur I angeimpft. Die Kultur wird wieder bei 37 °C und 250 Upm im Schüttler (Innova 4400, New Brunswick Scientific) inkubiert. Von der erhaltenen Vorkultur II wird nach zwölf Stunden die OD<sub>540</sub> gemessen und 350 ml in den Laborfermenter transferiert [Bretz, 9].

### 2.2 Chemikalien

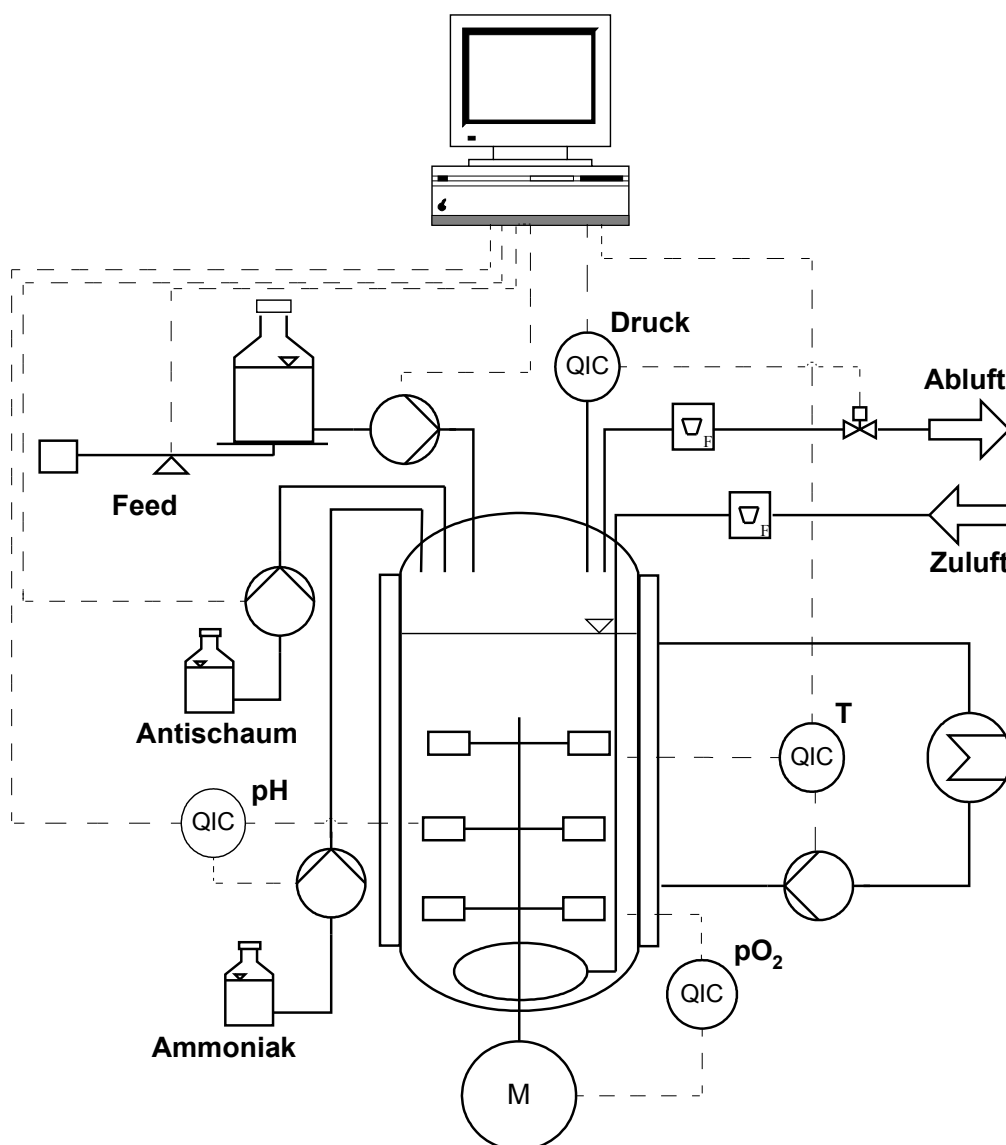
Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in analysenreiner Form von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland bezogen



## 2.3 Fermentation

Die Fermentation erfolgt in einem glucoselimitierten Fed-Batch – Verfahren unter Verwendung eines Biostat DL 10 Fermenters (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) mit 10 l Arbeitsvolumen.

Die Kultivierungsanlage ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. Der Fermenter verfügt über eine Drehzahl-, Temperatur- und pH-Regelung sowie über eine  $pO_2$ -Messung.



**Abbildung 2.1:** RI-Fließbild des Laborfermenters (Braun Biostat DL). Die Kennzeichnung erfolgt nach DIN 19277; C: selbsttätige Regelung; I: Anzeige; Q: Qualitätsgröße (z.B. pH)

Der Sauerstoffpartialdruck der Fermentationsbrühe wird mittels Kaskadenregelung automatisch durch das Prozessleitsystem (ABB Symphony) eingestellt, als unterer Grenzwert werden 15 % eingestellt, da dieser Sauerstoffpartialdruck ausreichend ist, um während der Fermentation eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Damit der untere Grenzwert nicht unterschritten wird, wird zunächst die Rührerdrehzahl erhöht. Der eingestellte Drehzahlbereich der Anlage ist zwischen 500 und 1200 Upm. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Druckerhöhung von 0,4 bar auf maximal 1 bar. Als letzter Schritt, um den Sauerstoffpartialdruck von 15 % nicht zu unterschreiten, wird schließlich die Feed-Rate stufenweise herabgesetzt.

Die Fermentation wird bei einer Temperatur von 39 °C, einem pH von 6,8 und einer Belüftungsrate von 10 NI/min durchgeführt. Die gesamte Prozessdauer beträgt 48 Stunden. Die pH-Regulierung erfolgt mit 25 %iger Ammoniaklösung.

Die Probennahme erfolgt alle sechs Stunden. Es werden BTM (vgl. Kapitel 2.5.2), Riboflavin-, DMRL- (mittels HPLC, vgl. Kapitel 2.5.1), Acetoin-, Butandiol- und Acetatgehalt (mittels Gaschromatographie, vgl. Kapitel 2.5.3) der Fermentationsbrühe bestimmt.

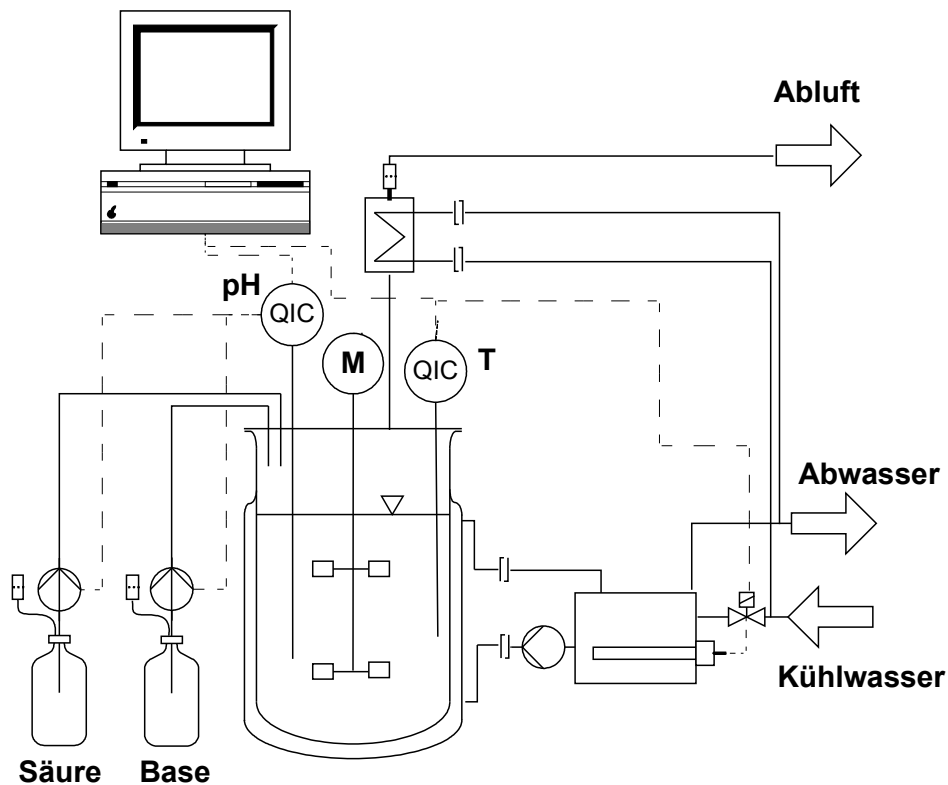
## 2.4 Lyseversuche

Die Screeningversuche auf Autolyse zur Herstellung eines Extraktes werden in einem Infors Sixfors System (Infors AG, Schweiz) mit 500 ml Arbeitsvolumen durchgeführt. Der Extrakt für die Fermentation wird in einem Biostat B (5 l Fermenter, BBI, Deutschland) mit 4 l Arbeitsvolumen hergestellt.

Die Anlage ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt. Jeder Fermenter verfügt über eine Drehzahl-, Temperatur- und pH-Regelung. Für den Großteil dieser Versuche wurde das Lucullus PIMS (Prozessinformations- und Management- System, Biospectra, Schweiz) verwendet. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven bei Befüllung mit 1 M NaCl-Lösung nach der Kalibration der pH Sonde. Nach der Sterilisation des Fermenters wird die NaCl-Lösung steril abgepumpt und die steril entnommene Fermentationsbrühe in den Fermenter gegeben.

Um eine zu starke Verdünnung der Brühe während den Lyseversuchen zu vermeiden erfolgt

die pH-Regulierung mittels 6 M Natronlauge bzw. 85 % *ortho*-Phosphorsäure.



**Abbildung 2.2:** RI-Fließbild des Laborfermenters (Braun Biostat B). Der Aufbau des Infors Sixfors Systems ist identisch. Die Kennzeichnung erfolgt nach DIN 19277; C: selbsttätige Regelung; I: Anzeige; Q: Qualitätsgröße (z. B. pH)

Die Probennahme erfolgt alle vier Stunden. Es werden BTM (vgl. Kapitel 2.5.2), Riboflavin-, DMRL (mittels HPLC, vgl. Kapitel 2.5.1), Proteinkonzentration im Überstand (mittels Bradford Proteinassay, vgl. Kapitel 2.5.7), Acetoin-, Butandiol- und Acetatgehalt (mittels Gaschromatographie, vgl. Kapitel 2.5.3) der Brühe bestimmt.

Am Ende der Lyse werden Kohlenstoff- und Stickstoff- (mittels CHN-Elementaranalysator, vgl. Kapitel 2.5.4), *ortho*-Phosphat- (vgl. Kapitel 2.5.6) und Ammoniumgehalt (vgl. Kapitel 2.5.5) des Überstandes bestimmt.

## 2.5 Analytik

### 2.5.1 Riboflavin

Für die Bestimmung der Riboflavin - Konzentration stehen zwei Methoden zur Verfügung. Die schnelle Beurteilung der Fermentation bzw. der Lyse erfolgt mittels einer HPLC der Firma TSP (Dauer dieser Methode 8 min.). Zur Endanalytik und während der Lyse wird die Riboflavin - Konzentration mittels einer HPLC der Firma Waters Alliance bestimmt. Mit dieser HPLC kann zusätzlich noch die DMRL-Konzentration bestimmt werden.

#### Probenaufbereitung:

Es werden ca. 0,5 g (Waters Alliance) bzw. 0,25 g (TSP) der Fermentationsbrühe und 5 ml einer 0,1 M Natronlauge in einen 50 ml (Waters Alliance) bzw. 100 ml (TSP) Messkolben gegeben. Die Probe wird ca. 1 min ins Ultraschallbad gegeben und anschließend auf die 50 bzw. 100 ml Marke mit 0,1 M Natriumacetat aufgefüllt. Nachdem die Probe gut durchmischt worden ist, wird sie über einem 0,2 µm Filter in ein HPLC-Probengefäß gegeben und in der HPLC vermessen.

Berechnung des Verdünnungsfaktor (VF):

$$V_{\text{Probe}} = \frac{\text{Einwaage [g]}}{\text{Dichte (1,03 g * ml}^{-1}\text{)}}$$

$$\text{VF} = \frac{V_{\text{Std}}(0,5 \text{ (Waters Alliance) bzw. } 0,25 \text{ g (TSP)})}{V_{\text{Probe}}}$$

#### Waters-Alliance-HPLC:

Die HPLC der Firma Waters Alliance (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) besteht aus dem Separationsmodul 2690 mit PDA 996. Als Vorsäule wird eine Phenomenex C8-Vorsäulenkartusche (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) und als Trennsäule eine Umkehrphasensäule (X-Terra RP-8, 5 µm Porengröße, 4,6 x 250 mm) der Firma Waters GmbH

verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt 5 µl. In Tabelle 2.1 ist die Zusammensetzung des Elutionsmittels in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung des Elutionsmittel in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit [h]	Fluss [ml/min]	Acetonitril [%]	Wasser/Puffer pH 6 (95:5) [%]	Methanol/ Wasser (1:1) [%]
0	1,0	0	92	8
10	1,2	21	71	8
16	1,2	81	11	8
19	1,2	81	11	8
20	1,0	0	92	8
24	1,0	0	92	8

### TSP-HPLC:

Die HPLC-Anlage der Firma TSP besteht aus dem Degaser SCM1000, der Pumpe P2000, dem Autosampler AS1000 sowie dem UV-Detektor UV1000. Als Vorsäule wird eine Phenomenex C8-Vorsäulenkartusche und als Trennsäule wird eine Umkehrphasensäule (X-Terra RP-8, 5 µm Porengröße, 4,6 x 250) der Firma Waters verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt 20 µl. Die Analysen-Methode ist isokratisch und die Zusammensetzung des Elutionsmittels 20% Acetonitril / 80% Wasser.

## 2.5.2 Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgt gravimetrisch. Hierzu werden beschriftete Probenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) erst bei 105 °C für 24 Stunden getrocknet, um mögliche Lösungsmittel zu entfernen. Anschließend werden die Probenröhrchen im Exsikkator abgekühlt und gewogen.

Es werden 10 ml Probe (beim Infors Sixfors Fermenter werden nur 5 ml aufgrund des geringen Arbeitsvolumens verwendet) nach Abkühlung auf Raumtemperatur in ein Proben-

röhrchen überführt und bei 10000 Upm fünf Minuten lang abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Röhrchen werden anschließend zum Abkühlen in den Exsikkator gestellt und danach auf einer Feinwaage gewogen. Die sich ergebende Differenz der beiden Einwaagen wird auf einen Liter hochgerechnet und davon anschließend die mit der HPLC bestimmte Riboflavin – Konzentration subtrahiert. Es wird jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Um die Fehlertoleranz bei der Biotrockenmassenbestimmung gering zu halten, wird für diese Proben eine doppelte Riboflavin – Bestimmung (1x TSP, 1x Waters Alliance) durchgeführt.

### 2.5.3 Acetat, Acetoin und Butandiol

Die Bestimmung von Butandiol-, Acetat- und Acetoingehalt erfolgt mittels Gaschromatographie. Hierzu wird der Gaschromatograph GC6890 der Firma Agilent Technologies (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Als Trennsäule wird eine HP-INNOWax Polyethylene Glycol-Säule, No.: HP 1901N-133 (Länge/Durchmesser/Filmdicke: 30 m/ 250 µm/ 0,25 µm) verwendet. Als Trägergas wird Helium (45 ml/min) verwendet. Zur Detektion wird ein FID-Detektor (260 °C) verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt 1 µl. Bei der Messung wird folgendes Temperaturprofil verwendet:

70 °C → + 5 °C/min → 100 °C → + 8 °C/min → 180 °C (4 min)

#### **Probenaufbereitung:**

Es werden ca. 0,8 ml der Fermentationsbrühe durch einen 0,2 µm Filter in ein GC-Probengefäß filtriert und anschließend in dem GC analysiert.

## 2.5.4 CHN – Elementaranalysator

Die hier durchgeführte Bestimmung dient dazu, anhand der Kohlenstoff- bzw. Stickstoffbilanz den Hefeextrakt durch den *Bacillus* – Extrakt zu ersetzen.

Der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der hergestellten Extrakte wird mittels CHN-2000 Elementar Analysator der Firma LECO (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA) bestimmt. Die Probe wird dazu bei 900 °C zu CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub> und NO<sub>x</sub> verbrannt. Diese Gase werden zu den Infrarot-Zellen transportiert, um Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt zu bestimmen. Der Stickstoff wird nach der Reduktion von NO<sub>x</sub> zu N<sub>2</sub> über die thermische Leitfähigkeit bestimmt. Die CO<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O-reste werden mittels Lecosorb<sup>®</sup> entfernt.

Helium (99,9% Reinheitsgrad, 40 PSI) wird als Trägergas, Sauerstoff (99,9 % Reinheitsgrad, 40 PSI) als Verbrennungsgas und Druckluft als pneumatisches Gas verwendet.

## 2.5.5 Ammoniumbestimmung [Daridon *et al.*, 13]

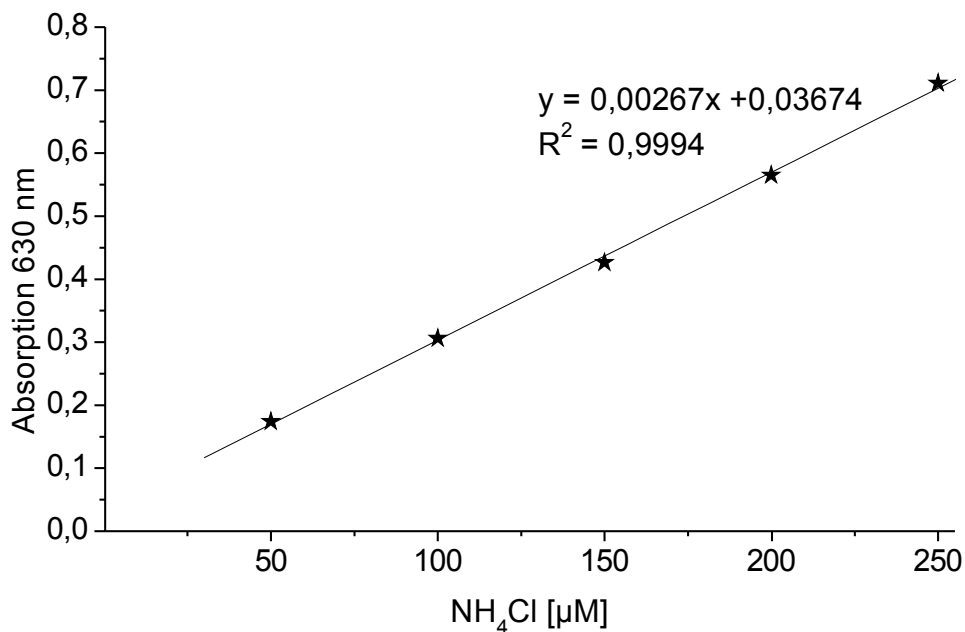
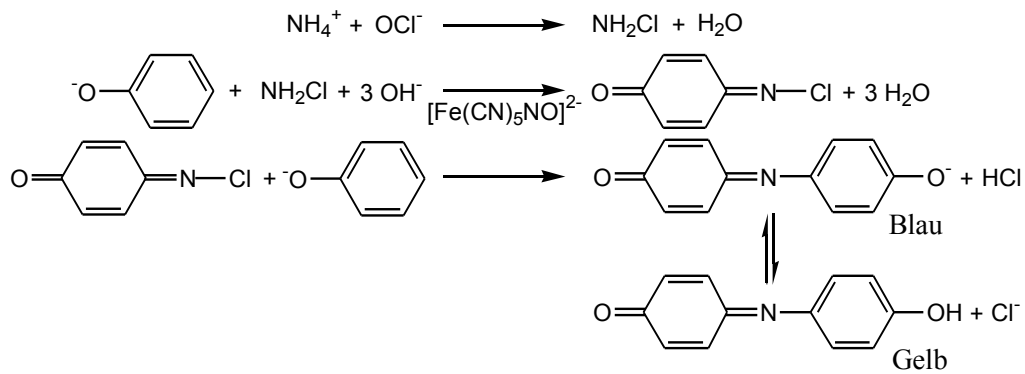
Der Nachweis von Ammonium mit dieser Methode beruht auf der Bildung von Indophenol, das quantitativ nachgewiesen werden kann (Berthelot Reaktion). Ammonium reagiert mit Hypochlorit zu Chloramin, das seinerseits mit Phenol zu Chinonchlorimin reagiert. Hierbei dient Natriumnitroprussid als Katalysator. Chinonchlorimin reagiert seinerseits mit Phenol zu Indophenolblau. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist temperaturabhängig.

Reagenz A: 30 g·l<sup>-1</sup> Na-K-Tartrat, 12 g·l<sup>-1</sup> NaOH, 4 g·l<sup>-1</sup> EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), pH=12,5

Reagenz B: 40 g·l<sup>-1</sup> Phenol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 0,6 g·l<sup>-1</sup> Na-Nitroprussid, pH=4,9

Reagenz C: 66,7 g·l<sup>-1</sup> 13 %ige Na-hypochloritlösung, 2 g·l<sup>-1</sup> NaOH, pH=12,3

(Reagenz B und C sind Lichtempfindlich und müssen dunkel gelagert werden.)



**Abbildung 2.3:** Kalibriergerade mit Ammoniumchlorid abgewandelt nach der Methode von Daridon *et al.* 13].

### Probenaufbereitung:

500 µl Kulturüberstand werden mit jeweils 500 µl Reagenz A und Reagenz B in einem Reagenzglas gemischt und die Reaktion durch die Zugabe von 500 µl Reagenz C gestartet. Die Lösungen werden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 630 nm gegen die Blindprobe (Probe durch H<sub>2</sub>O ersetzt) gemessen (Varian Cary 50, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland). Durch Aufnahme einer Kalibrationsgeraden mit Ammoniumchlorid (Konzentrationsbereich von 0 bis 250 µM)



werden die Probenkonzentrationen ermittelt.

Bedingt durch die komplexe Zusammensetzung des Mediums wird die Anwendbarkeit dieser Methode überprüft, indem im ersten Schritt von verschiedenen Fermentationen der Ammoniumgehalt bestimmt wird. In einem zweiten Schritt wird zu diesen Proben eine definierte Menge an Ammoniumchlorid zugegeben und überprüft, ob das erhaltene Ergebnis auch die Summe der Fermentationsprobe und des zugegebenen Ammoniumchlorids ergibt. Somit kann durch diese Vorgehensweise festgestellt werden, ob die Methode zuverlässige Ergebnisse liefert.

Aufgrund der oben genannten Vorgehensweise kann bei der Ammoniumbestimmung eine durchschnittliche Abweichung von  $\pm 2,3$  % berechnet werden. Die maximale Abweichung des Ammoniumgehaltes die in diesen Versuchen berechnet werden kann beträgt  $\pm 5,6$  %.

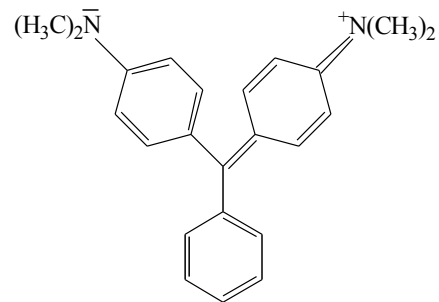
### 2.5.6 Phosphatbestimmung [van Veldhoven *et al.*, 55]

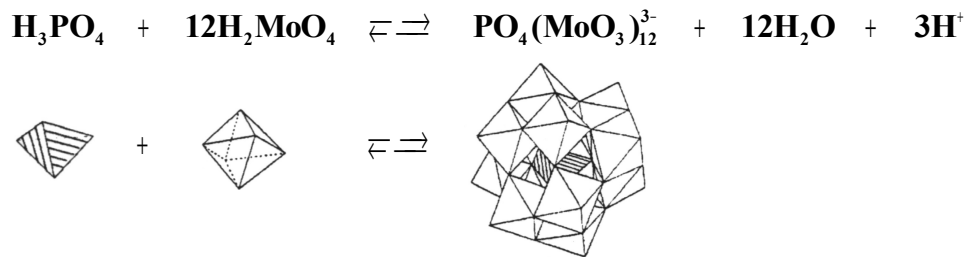
Diese Methode ist eine kolorimetrische Phosphatbestimmungsmethode, deren Messprinzip auf der Bildung von Phosphatmolybdat-Komplexen im sauren Milieu beruht.

Es ist bekannt, dass bei Zugabe von Säure Molybdän (VI)salze eine Vielzahl von Polymolybdat(VI)strukturen bilden. In Gegenwart von Phosphat werden Heteropolyanionen gebildet, bei denen die Phosphatgruppe von

$\text{MoO}_6$ -Oktaeder umgeben wird. Diese Heteropolyanionen sind auch als Heteropolysäuren, Phosphomolybdatkomplexe oder Keggin - Struktur bekannt. Die Form bzw. Struktur des gebildeten Heteropolyanions ist abhängig vom pH-Wert, der Molybdat- und der Phosphat-Konzentration.

Zwei essentielle Fakten sind für das Design dieses Assay relevant: Stark saure Bedingungen sind notwendig für die Stabilität des Komplexes und Molybdat muss im Überschuss vorhanden sein, um das Reaktionsgleichgewicht nach rechts zu verschieben und somit das gesamte Phosphat im Komplex zu binden. Eine weitere Stabilisierungskomponente des Komplexes ist der Polyvinylalkohol.





Reagenz A: 3,46 g Ammoniummolybdat-Tetrahydrat ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>\*4H<sub>2</sub>O) in 100 ml einer 2,1 M Schwefelsäure (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) lösen. (≈21,45 g einer 96% Schwefelsäure)

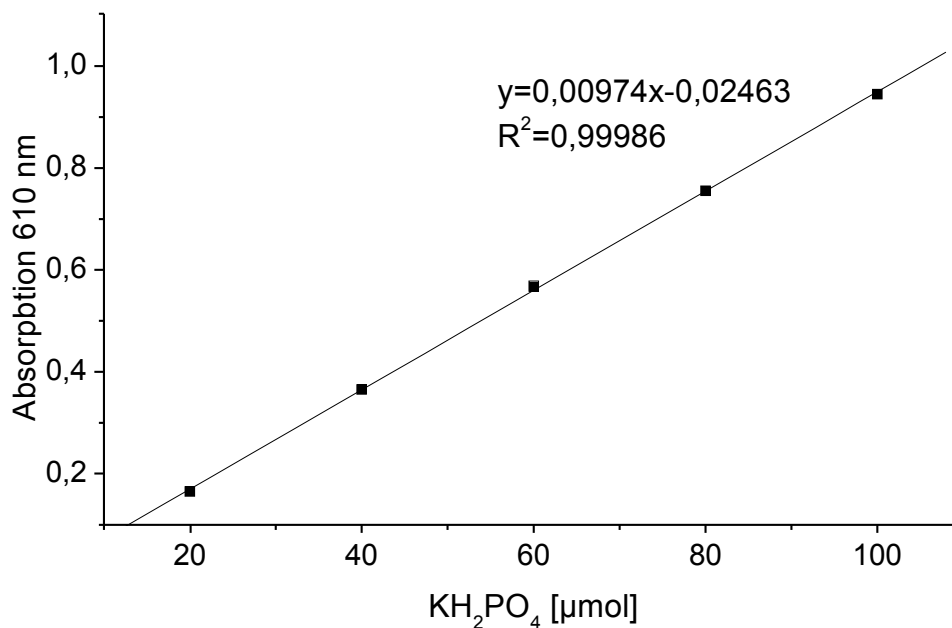
Reagenz B: 70,45 mg Malachitgrün und 350 mg Polyvinylalkohol in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> lösen (Ultraschallbad bzw. Temperatur 50 °C).

### Probenaufbereitung:

75 µl	Probe (Kulturüberstand) bzw. Referenz (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100 µM)
344 µl	Reagenz A
256 µl	Reagenz B
325 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

Die Probe wird 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 610 nm (Varian Cary 50, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Die Referenz (H<sub>2</sub>O) sollte eine Gelbfärbung aufweisen, *ortho*-Phosphat eine Blau-Grün-Färbung.

Als Kalibrierlösung dient eine 100 µM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung. Das Kaliumdihydrogenphosphat wird vorher für 24 Stunden bei 95 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.



**Abbildung 2.4:** Kalibriergerade mit Kaliumdihydrogenphosphat nach der Methode von van Veldhoven *et al.* [55].

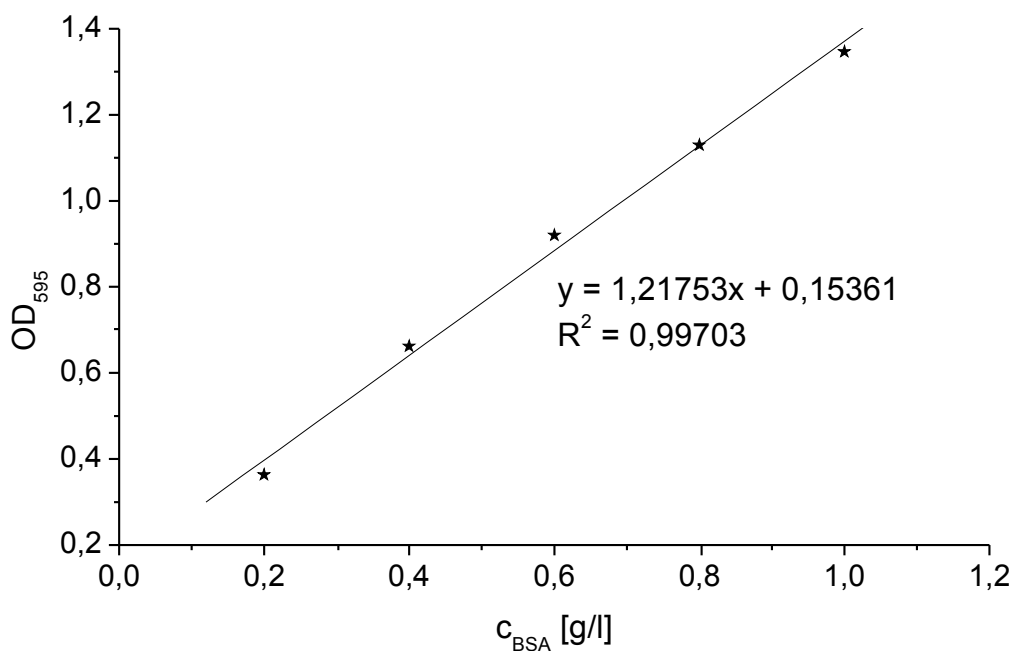
Wie auch bei der Ammoniumbestimmung (vgl. Kapitel 2.5.5) wird auch für diese Bestimmung eine Überprüfung mit Fermentationsproben durchgeführt. Aufgrund dieser Überprüfung wird eine mittlere Abweichung von durchschnittlich  $\pm 3$  % ermittelt.

### 2.5.7 Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, 8]

Die Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts basiert auf der Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie - Brilliantblau G-250 sich an Proteine zu binden, wobei sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Absorption der Probelösung bei 595 nm dient als Messgröße für die Proteinkonzentration. Der Farbstoff besitzt eine Affinität zu basischen und aromatischen Aminosäuren. Der Proteinnachweis nach Bradford hat jedoch den Nachteil, dass Proteine erst ab einer Größe von ca. 3 kDa damit nachgewiesen werden können.

Es wird eine Kalibrierung mit BSA durchgeführt. Hierzu wird eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 10 g/l in H<sub>2</sub>O dest. hergestellt. Mit dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe von 0,2 - 1,0 g/l hergestellt. Die Versuchsdurchführung erfolgt nach der Vorschrift von Merck. Dazu werden in eine Küvette 50 µl der entsprechenden Verdünnung (Referenz H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, 50 µl) gegeben und mit 2,5 ml Bioquant-Bradford Reagenz (Merck KGA, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Die Probe wird gut gemischt, und nach zwei Minuten Inkubationszeit wird die Absorption bei 595 nm (Varian Cary 50, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Wie auch bei der Ammoniumbestimmung (vgl. Kapitel 2.5.5) wird auch für diese Bestimmung eine Überprüfung mit Fermentationsproben durchgeführt. Aufgrund dieser Überprüfung wird eine mittlere Abweichung von durchschnittlich  $\pm 3,6\%$  ermittelt.



**Abbildung 2.5:** Kalibriergerade mit BSA nach der Methode von Bradford [8].

## 2.5.8 SDS-PAGE

### 2.5.8.1 Proteinabbau während der Lyse

Der Proteinabbau während der Lyse wird neben der Proteinbestimmung nach Bradford noch zusätzlich mit einer SDS – Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wird das NuPAGE – System der Firma Invitrogen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Zum besseren Auftrennen der niedermolekularen Proteine wird ein NuPAGE Tricine 10-20% (1,0 mm / 10 Taschen) Gradientengel verwendet. Für das Tricine Gel wird der NuPAGE Tricine Laufpuffer von der 20x Konzentration mit Nanopurwasser auf eine einfache Konzentration gebracht.

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung der Proben für die SDS-Gelelektrophorese (Marker: Mark12™, Invitrogen).

Probe	V <sub>Probe</sub> [μl]	V <sub>Probenpuffer</sub> [μl]	V <sub>Reduktionsmittel</sub> [μl]	V <sub>Nanopurwasser</sub> [μl]	Endvolumen [μl]
Marker	7	-	-	-	7
Probe	x	5	1	y	10

Die Proben werden für zwei Minuten bei 85 °C im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert und anschließend das Gel beladen. Nach dem Beladen der Gele wird für die ersten 30 Minuten eine Spannung von 60 V angelegt, anschließend wird die Spannung auf 120 V angehoben.

Nach dem Lauf werden die Gele fixiert, hierzu werden sie für 30 Minuten in eine Fixierlösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure) gegeben. Anschließend werden sie drei mal 10 Minuten in Nanopurwasser gewaschen. Nach dem Waschen werden die Gele mit Colloidalblau (Bio-Safe Coomassie Stain, BIO-RAD, München, Deutschland) Farbstoff eine Stunde lang gefärbt. Die Gele werden nach dem Färben für mindestens 30 Minuten in Nanopurwasser entfärbt bzw. bis sich der gewünschte Kontrast eingestellt hat.

Als Marker wird Mark12™ von Invitrogen verwendet, dessen Molekulargewichtsbereich sich von 2,5 bis 200 kDa erstreckt.

### 2.5.8.2 Proteingehalt in den Riboflavinkristallen

Ca. 20 mg der entsprechenden Probe werden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß genau eingewogen und 1 µl Reducing Agent und 10 µl\*mg<sup>-1</sup> Probe SDS Sample Buffer (Invitrogen) zugegeben.

Die Proben werden im Thermomixer bei 70 °C und 1000 Upm für 10 min inkubiert. Die Proben werden anschließend 3 min. abzentrifugiert (10000g) und vom erhaltenen Überstand werden 8 µl auf ein NuPAGE Tricine 10-20% (1,0 mm / 10 Taschen) Gradientengel aufgetragen.

Als Marker wird Mark12™ von Invitrogen verwendet, dessen Molekulargewichtsbereich sich von 2,5 bis 200 kDa erstreckt

Nach dem Beladen der Gele wird für die ersten 30 Minuten eine Spannung von 60 V angelegt, anschließend wird diese auf 120 V angehoben.

Nach dem Lauf werden die Gele wie in Kapitel 2.5.8.1 beschrieben präpariert.

### 2.5.9 DNA-Nachweis in den Riboflavinkristallen

Die DNA - Isolierung aus den Riboflavinkristallen erfolgt mittels Microspin S200 Säulen (Amersham Pharmacia, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Zu 50 mg trockenem Riboflavin werden 500 µl einer 1% Deoxycholatlösung (TE-Puffer, pH 8,0) gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 800 µl gepufferte Phenollösung zugegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation werden 50 µl der wässrigen Phase auf eine Microspin S200 Säule gegeben und nach Herstellerangaben behandelt.

Der DNA-Gehaltsnachweis im Riboflavin erfolgt mittels PCR. Die in dieser PCR verwendeten Primer umspannen das Chloramphenicol Resistenzgen im Riboflavin Operon (*rib-cat*) auf pRF69. Hierbei wird je nach Primer entweder ein 1000 bp oder ein 550 bp Fragment amplifiziert. Die PCR Reaktionen werden in einem 25 µl Reaktionsgefäß durchgeführt.

Zusammensetzung der Reaktionslösung: 0,4 pmol des entsprechenden Primers, 1U Taq DNA Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Deutschland), 1x Reaktionspuffer (10 mM Tris-

HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), jeweils 200 µM der vier Nucleotide, 0,1 % BSA und 2 µl der Ziel DNA.

**PCR Reaktionsbedingungen:**

Initiale Denaturierung 300s bei 94 °C, anschließend 35 Zyklen zu jeweils:

Denaturierung 60s bei 94 °C, Annealing für 60s bei 55 °C, Kettenverlängerung für 60s bei 72°C,

eine Finale Kettenverlängerung für 300s bei 72 °C.

Bei jeder Analyse wird eine positiv Kontrolle mit einer unbehandelten Probe und eine negative Kontrolle unter Verwendung von Wasser ohne DNA gemacht.

Nach erfolgreicher PCR werden die Proben auf ein 1 % Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 80 mA für ca. 30 min laufen gelassen. Die Banden werden unter UV Licht fotografiert.

## 3 Ergebnisse

In der fermentativen Riboflavin – Herstellung mit *Bacillus subtilis* ist Hefeextrakt neben Glucose der mit Abstand in größten Mengen eingesetzte Rohstoff und somit auch ein Kostentreiber dieses Prozesses. Hinzu kommt noch eine große Menge an produzierter Biomasse die, obwohl sie ein hohes Energiepotential hat, kostenaufwendig entsorgt wird. Betrachtet man die Zusammensetzung der Biomasse, so stellt man fest, dass diese genau aus den Elementen besteht, die eigentlich im Fermentationsmedium benötigt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem die anfallende Biomasse so aufbereitet wird, dass diese in der fermentativen Riboflavin – Herstellung als Substrat wieder verwendet werden kann.

Risse *et al.* [Risse *et al.*, 42] konnte bereits zeigen, dass mit *Bacillus licheniformis* eine Extrakterstellung und Fermentation möglich ist, dies muss jedoch nicht zwangsläufig auch für die fermentative Riboflavin – Herstellung mit *Bacillus subtilis* gelten. Aus diesem Grund sollte in dem ersten Schritt dieser Arbeit erstmals überprüft werden, ob es überhaupt möglich ist, Biomasse direkt aus dem aktuellen Prozess zu verwenden, und eine Fermentation auf Basis eines „*Bacillus* – Extraktes“ überhaupt möglich ist.

### 3.1 Machbarkeitsstudie

Die Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung eines Extraktes aus *Bacillus subtilis* einer Riboflavin – Fermentation macht nur Sinn, wenn dieser Extrakt auch wieder in folgenden Fermentationen eingesetzt werden kann. Der kostengünstigste Fall wäre, wenn die Biomasse ohne Abtrennung und Aufkonzentrierung direkt aus dem aktuellen Prozess verwendet werden könnte. Im aktuellen Prozess wird zwar die Biomasse nicht zu einem Extrakt aufgearbeitet (vgl. Abbildung 1.2), jedoch wäre es vorstellbar, Biomasse ab dem Dekantationsschritt (Abtrennung der Biomasse vom Riboflavin) einzusetzen. Direkt nach dem Dekantieren ist die Konzentration der Biomasse zu gering, um sie in einer Fermentation einzusetzen. Aus diesem Grund sollte in einer Fermentation überprüft werden, ob es möglich ist, die Biomasse nach



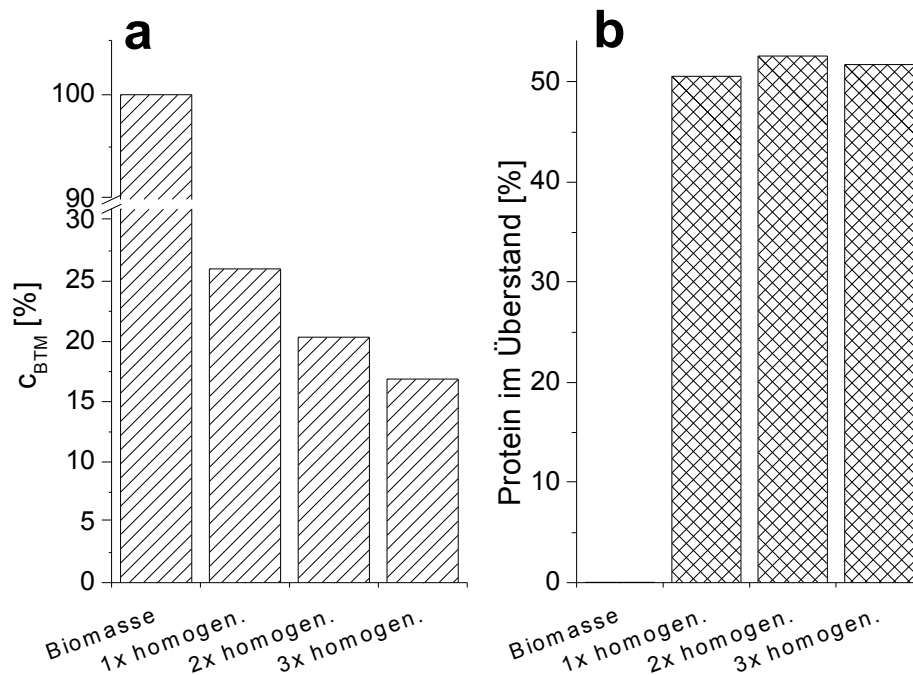
der Eindampfung einzusetzen, da nach diesem Schritt ein Trockensubstanzgehalt von mindestens 35% vorhanden ist. Diese Fermentation lässt sich nicht direkt mit einer Fermentation mit Hefeextrakt vergleichen, da die *Bacillus subtilis* Zellen nicht aufgeschlossen sind, jedoch kann sie möglicherweise erste Aufschlüsse über eine Verwendung eines *Bacillus* – Extraktes in der Fermentation geben.

Von der *Bacillus* Biomasse wurde mittels CHN – Elementaranalysator der Kohlenstoffgehalt bestimmt und der Hefeextrakt im Fermentationsmedium aufgrund der Kohlenstoffbilanz 1:1 ersetzt. Es wurde eine Parallelfertigung mit Hefeextrakt als Standard durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Fermentation zeigen einen im Vergleich zu der Standardfermentation verspäteten Feed - Start<sup>1</sup> um 7,6 Stunden, die Riboflavin Endkonzentration erreicht 73,6 % des Standards. Die Produkt-Substrat-Ausbeute (Riboflavin/Glucose) ist mit 93,4 % besser als erwartet, jedoch ist die Raum-Zeit Ausbeute aufgrund des verspäteten Feed - Start zu gering, um hieraus einen industriellen Prozess zu entwickeln. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Fermentation lassen jedoch erkennen, dass es möglich sein müsste aus der vorhandenen Biomasse ein Extrakt herzustellen, das in der Fermentation eingesetzt werden kann.

Die Verwendung der Biomasse zur Herstellung eines Extraktes aus dem oben genannten Produktionsschritt hätte den Vorteil, dass diese schon aufgereinigt wäre, hat jedoch auch den Nachteil, dass die Mikroorganismen bereits inaktiviert sind, so dass eine Anwendung der meisten biologischen Aufschlussverfahren wie z.B. Autolyse ausgeschlossen ist. Diese Biomasse könnte mit einer mechanischen Methode wie z.B. dem Hochdruckhomogenisatorverfahren, aufgeschlossen werden. Jedoch hat diese Methode den Nachteil, dass hierbei zur Herstellung eines Extraktes ein zweistufiges Verfahren angewendet werden müsste, da die durch den Aufschluss freigesetzten Proteine in einem zweiten Schritt degradiert werden müssten.

Der Versuch, die aufkonzentrierte Biomasse mittels Hochdruckhomogenisator aufzuschließen, gestaltet sich sehr aufwendig, da die Konzentration der Biomasse so hoch ist, dass teilweise schon Biomassenpellets vorliegen. Um diese Biomasse mit einem Hochdruckhomogenisator aufzuschließen muss sie erst verdünnt werden, da sonst die Düsen des Homogenisators verstopfen würden. Eine Verdünnung der Biomasse ist auch nur mit großem Aufwand realisierbar, da die Biomasse sich schlecht resuspendieren lässt.

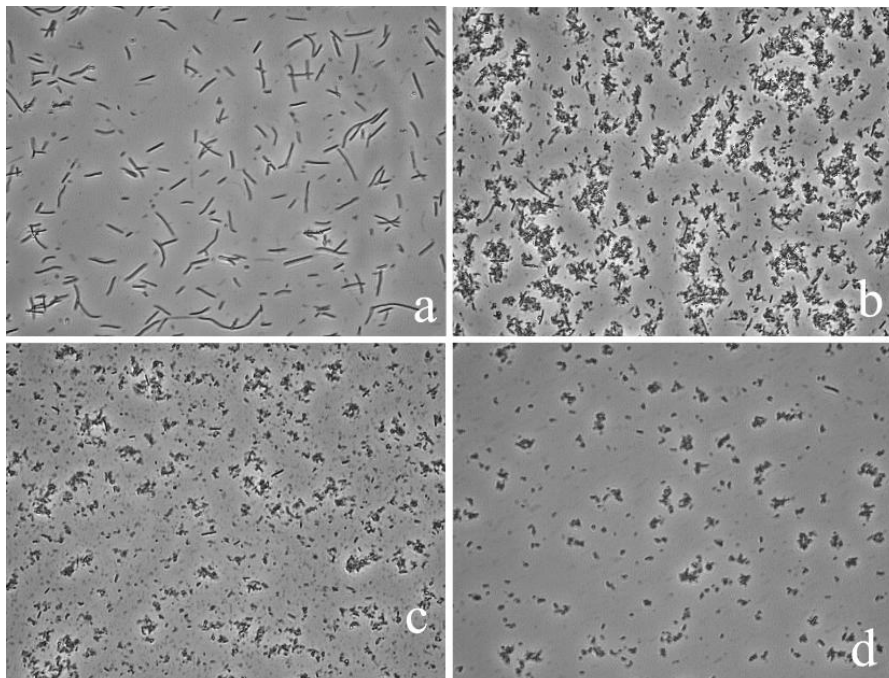
<sup>1</sup> Als Feed – Start wird derjenige Punkt des Prozesses bezeichnet, bei dem die Glucose des Anfangsmediums in der Fermentation aufgebraucht ist und es dadurch zu einem Anstieg der pO<sub>2</sub> Konzentration kommt. Der Anstieg erreicht in einer durchschnittlichen Fermentation einen Wert von ca. 70 %. Dieser Wert ist ausschlaggebend für das zuschalten aktive Zugabe von Glucose.



**Abbildung 3.1:** Aufschluss der Biomasse bei 1900 bar. Verlauf der Biotrockenmasse (a), Verlauf der Proteinkonzentration im Überstand (b).

Aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten wurde für die Durchführung der Machbarkeitsstudie daher Biomasse direkt nach einer Riboflavin – Fermentation isoliert. Hierzu wurde nach Abschluss einer Fermentation 10 l Fermentationsbrühe entnommen und die Biomasse mittels Zentrifugation (4250g, 10 min) abgetrennt und dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Hierzu wurde nach Beendigung der Fermentation der *ortho*-Phosphatgehalt des Überstands der Fermentationsbrühe bestimmt und ein Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (pH 7) mit identischer Konzentration hergestellt. Anschließend wurde die so erhaltene Biomasse in drei Durchläufen bei 1900 bar mit einem Hochdruckhomogenisator (Microfluidizer M110-EH, Microfluidics, Newton, MA, USA) aufgeschlossen.

Nach dem Aufschluss konnte ein Proteinanteil von 52 % und ein Zellwandanteil von 17 % der Zellmasse von *Bacillus subtilis* festgestellt werden (vgl. Abbildung 3.1). Die hier festgestellten Werte korrelieren gut mit den in der Literatur gefundenen Daten [Neilhardt, 35].

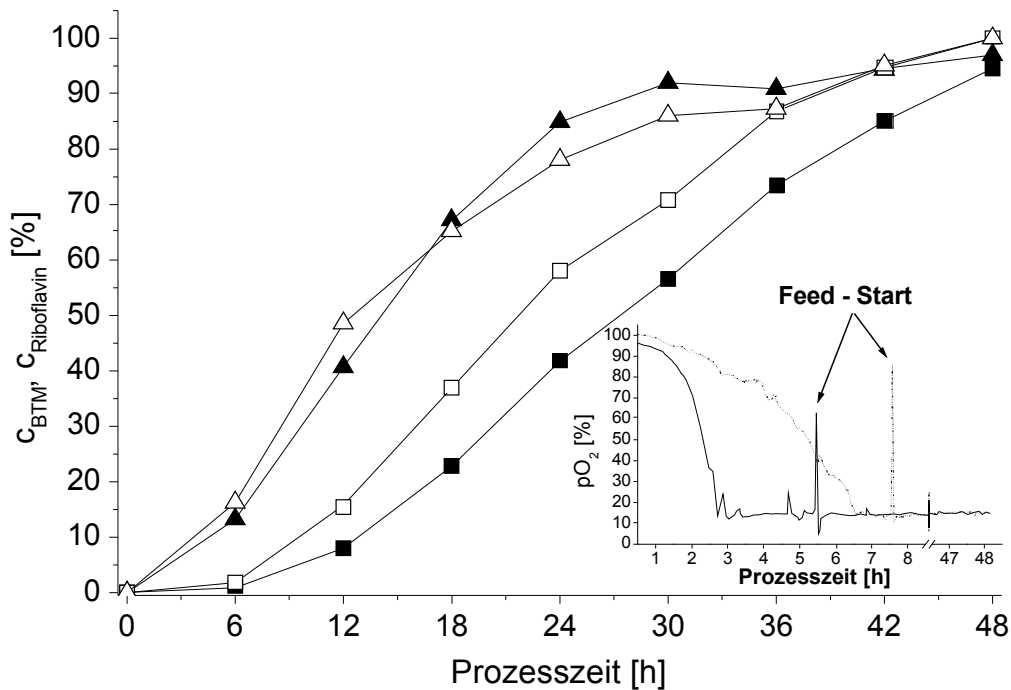


**Abbildung 3.2:** Mikroskopische Aufnahmen nach verschiedenen Aufschlusschritten mit dem Hochdruckhomogenisator (Vergrößerung 400x): Biomasse gewaschen (a), 1x homogenisiert (b), 2x homogenisiert (c), 3x homogenisiert (d)

Nach dem Aufschluss wurde der Überstand mittels Zentrifugation (4250g, 10 min) isoliert und einem Proteinverdau mit Alcalase (Calbiochem, San Diego, CA, USA) unterworfen, um den Eigenschaften eines Hefeextraktes näher zu kommen und eine Schaumbildung während der Fermentation zu vermindern. Dafür wurden 1,15 Volumenprozent Alcalase auf die Gesamtbiotrockenmasse zugegeben und für 24 Stunden bei 40 °C im Schüttler inkubiert. Durch die Proteinhydrolyse mit Alcalase reduzierte sich die Proteinkonzentration von 52 auf 6,7 % (Bradford Assay).

Der so erhaltene Extrakt, wurde aufgrund der Kohlenstoffbilanz 1:1 in einer Fermentation als Medium eingesetzt. Hierbei wurde wieder eine Parallelfermentation mit dem Standardmedium (Hefeextrakt) durchgeführt, so dass der einzige Unterschied zwischen den beiden Fermentationen der verwendete Extrakt war. Anhand der Abbildung 3.3 kann man erkennen, dass eine Fermentation mit *Bacillus* – Extrakt durchaus möglich ist. Der Feed – Start ist im Vergleich zum vorhergehenden Versuch mit nicht aufgeschlossenen Zellen lediglich 3 Stunden anstelle der 7,6 Stunden verspätet, und es wird eine Endkonzentration von 94,5 %

des Riboflavins bezogen auf den des Standardansatzes erreicht.



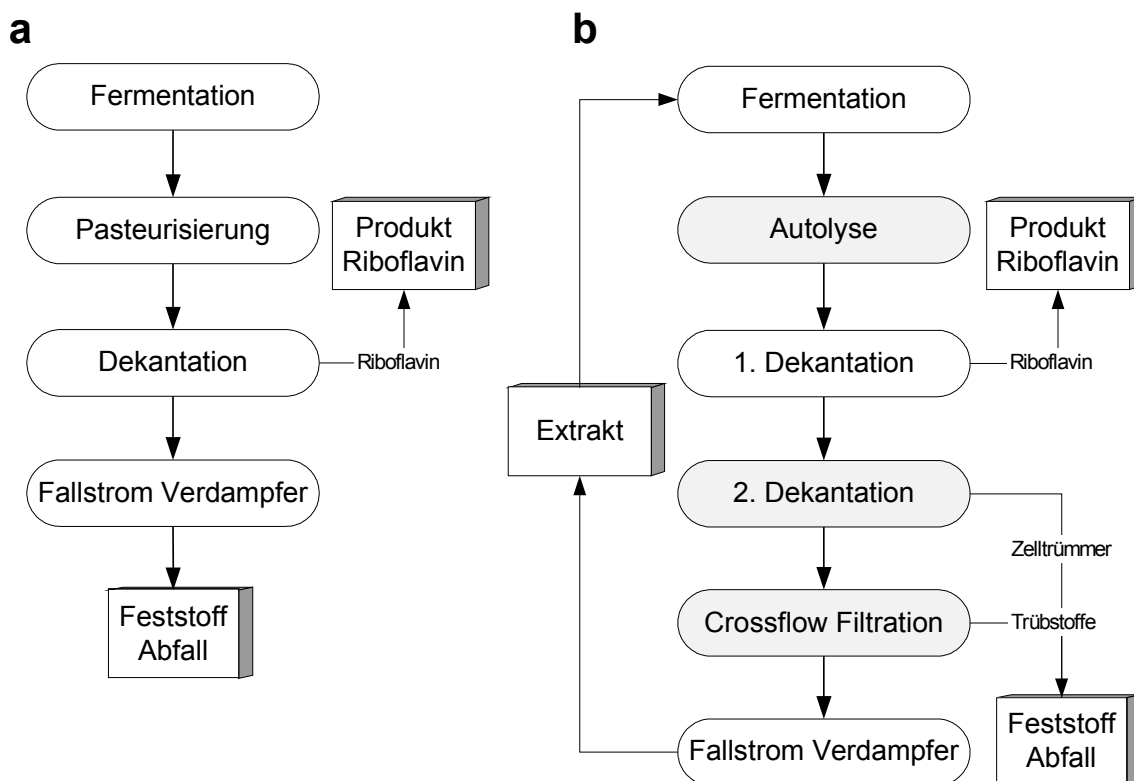
**Abbildung 3.3:** Vergleich der Fermentationen mit Hefeextrakt und *Bacillus* - Extrakt (■ Riboflavin *Bacillus* - Extrakt, □ Riboflavin Hefeextrakt, ▲ BTM *Bacillus* - Extrakt, △ BTM Hefeextrakt).

Dieser Versuch liefert den Beweis, dass es möglich ist, aus der anfallenden *Bacillus* Biomasse der fermentativen Riboflavin – Herstellung ein Extrakt herzustellen, der in der Fermentation als Substrat anstelle von Hefeextrakt eingesetzt werden kann.

## 3.2 Extrakterstellung

In Kapitel 1.2 wurde bereits beschrieben, dass es verschiedene Möglichkeiten gibt, um einen Extrakt herzustellen. Die Autolyse scheint von den genannten Möglichkeiten die Beste zu sein, da sie im Vergleich zu den anderen Methoden eine Reihe von Vorteilen zu bieten hat.

Dazu zählen z.B. die Nutzung der endogenen Proteasen und somit unter Umständen vermeiden von Kosten, die durch die Zugabe von Proteasen verursacht würden. Ein weiterer Vorteil ist eine schonendere Behandlung der Extraktkomponenten wie z.B. Vitamine, da die Autolyse bei moderater Temperatur und neutralem pH durchgeführt werden kann. Des Weiteren erfolgt die Durchführung zweier Prozesse, Lyse und Proteindegradation, in einem einzigen Schritt. Wird die Biomasse z.B. mechanisch aufgeschlossen, so müsste in einem zweiten Prozess der Proteinabbau eingeleitet werden. Weiterhin ist der Energiebedarf bei der Durchführung der Autolyse wesentlich geringer, da in diesem Prozess relativ moderate Bedingungen benötigt werden. Eine gute Integration in den aktuellen Prozess wäre zu erreichen, wenn die Autolyse direkt nach der Fermentation eingeleitet würde (vgl. Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4:** a: Vereinfachter Riboflavin - Herstellungsprozess (vgl. Abbildung 1.2). b: Mögliche Integration der Autolyse in den aktuellen Prozess.

In Abbildung 3.4a ist vereinfacht der bisherige Riboflavin – Produktionsprozess dargestellt.

Nach der Fermentation wird die Fermentationsbrühe auf einen pH-Wert von 5 eingestellt und durch Dampfinjektion auf die entsprechende Temperatur gebracht. Hierbei werden die Mikroorganismen inaktiviert (Pasteurisierung). Nach der thermischen Behandlung wird das Produkt (Riboflavin) dekantiert. Der Biomassestrom kommt in einen Fallstromverdampfer, wobei die Biomasse und der Überstand der Fermentation auf einen definiert Biotrockenmassengehalt von mindestens 35 % eingedampft und anschließend verwertet wird. In Abbildung 3.4b ist eine mögliche Integration der Extrakterstellung in den aktuellen Riboflavin – Herstellungsprozess dargestellt. Die Pasteurisierung würde hierbei durch die Autolyse ersetzt. Zwischen Dekantation und Fallstrom Verdampfer würden noch zwei zusätzliche Schritte integriert. In diesen zusätzlichen Schritten würden einerseits die Zelltrümmer und die Schwebstoffe vom Überstand getrennt und den Feststoffabfall bilden. Der Überstand selber käme in Fallstromverdampfer und würde aufkonzentriert werden. Dieser konzentrierte Überstand wäre somit der flüssige „*Bacillus* – Extrakt“. Die hier vorgestellte Prozessintegration würde allerdings auch einige Nachteile in sich bergen. Wird die Autolyse wie in Abbildung 3.4b dargestellt in den Prozess integriert, könnte sie einen Einfluss auf das eigentliche Produkt Riboflavin nehmen: Während der Autolyse werden Zellinhaltsstoffe in das Medium freigesetzt. Hierbei könnten zusätzlich zu den Stoffen, die während der Fermentation in den Riboflavinkristallen eingeschlossen werden noch zusätzliche Stoffe wie z.B. Proteine oder DNA in die Riboflavinkristalle inkorporiert werden. Dieses hätte wiederum zur Folge, dass die Aufarbeitung des Riboflavins geändert werden müsste. Daher muss nach Beendigung der Autolyse der DNA- und Proteingehalt der Riboflavinkristalle überprüft und mit dem Standardprozess verglichen werden.

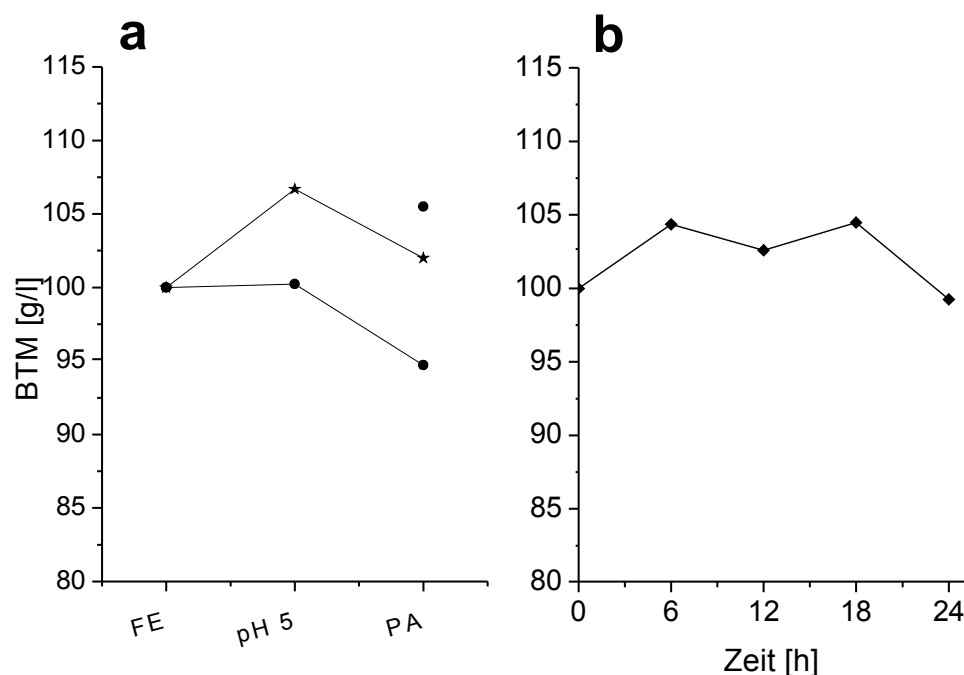
### 3.2.1 Autolyse

Die Herstellung eines Extraktes mittels Autolyse erfordert als erstes die Ermittlung der optimalen Bedingungen wie z.B. pH und Temperatur. Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt wurden bereits Experimente zur Autolyse von *Bacillus subtilis* von Jolliffe *et al.* [23, 24] durchgeführt, da es sich jedoch hier nicht um denselben Organismus handelt, gelten diese Ergebnisse lediglich als Anhaltswerte.

Zusätzlich müssen während der Autolyse noch Proteasen zugegeben werden, um die freiwerdenden Proteine im Überstand zu hydrolysieren. Dafür muss ein entsprechender Cocktail gefunden und die Zeitpunkte und die Menge der Proteasen optimiert werden, um den Prozess auch ökonomisch zu gestalten.

### 3.2.1.1 Autolyse bei der aktuellen Riboflavin – Produktion

Bevor Parameter wie pH oder Temperatur für eine Autolyse bestimmt werden, sollte als erstes überprüft werden, ob in dem aktuellen Herstellungsprozess eine Autolyse stattfindet. Diese könnte, wenn überhaupt, nur zwischen Ende der Fermentation und Dekantation stattfinden (vgl. Abbildung 1.2), da nach der Pasteurisierung die Mikroorganismen inaktiviert sind und somit keine Autolyse mehr stattfinden kann.



**Abbildung 3.5:** Überprüfung des Lysegrades in der Produktion. a: Proben aus der Produktion (FE = Fermentationsende, PA = Produktabtrennung mittels Dekantation). In dieser Abbildung sind die Daten aus drei verschiedenen Fermentationen dargestellt. b: Simulation der Produktion im Laborfermenter. 100 % BTM entsprechen der BTM – Konzentration am Ende der Fermentation.

Hierzu werden Proben aus dem Produktionsprozess am Ende der Fermentation, nach Ansäuerung und nach der Pasteurisierung Proben auf den Lysegrad der Biomasse hin untersucht. Anhand der Abbildung 3.5a kann man erkennen, dass in dem aktuellen Produktionsprozess als erstes eine leichte Zunahme der Biomassenkonzentration stattfindet. Diese Zunahme erfolgt durch die Fällung der löslichen Proteine im Überstand bedingt durch die hohe Konzentration der verwendeten Säure. Anschließend erfolgt wieder eine Abnahme der Biomassenkonzentration bedingt durch die Dampf-injektion mit der die Fermentationsbrühe auf die entsprechende Temperatur für die Pasteurisierung gebracht wird.

Der oben beschriebene Prozess wird zusätzlich nochmals im Laborfermenter durchgeführt. Der einzige Unterschied zwischen Produktion und Simulation ist die Temperierung der Fermentationsbrühe. In der Produktion wird aufgrund der großen Menge eine Dampf-injektion verwendet und somit eine schnelle Temperierung der Fermentationsbrühe erreicht. In der Simulation erfolgt die Temperierung der Brühe über den Heizmantel des Laborreaktors, mit dem bei dem geringen Volumen eine ebenso schnelle Temperierung wie mit der Dampf-injektion im Produktionsreaktor erzielt wird.

Die Simulation dieses Prozesses im Laborfermenter bestätigt die Ergebnisse aus der Produktion. Es kann somit gezeigt werden, dass in dem aktuellen Produktionsprozess keine Autolyse stattfindet.

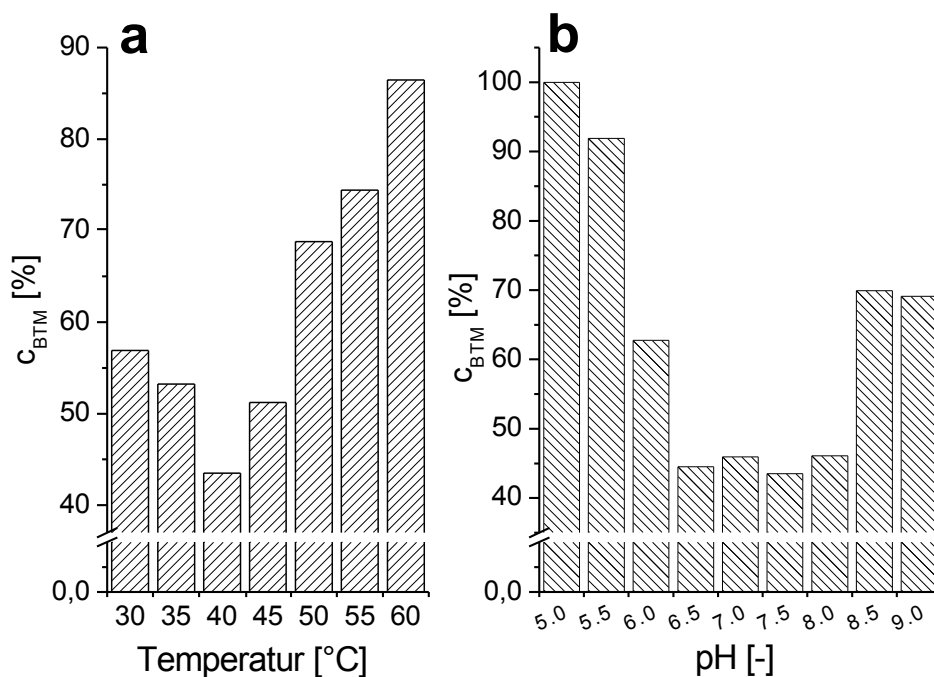
### **3.2.1.2 Temperatur- und pH-Optimum für eine Autolyse**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben pH und Temperatur einen großen Einfluss auf die Autolyse. Dementsprechend sollte zunächst das pH- und Temperatur – Optimum für die Autolyse bestimmt werden.

Jolliffe *et al.* [Jolliffe *et al.*, 23] konnten zeigen, dass *B. subtilis* Kulturen in kurzer Zeit lysieren, wenn sie sich in der stationären Phase befinden. Des Weiteren beschleunigen anaerobe Bedingungen die Autolyse. *B. subtilis* hat zwei autolytische Enzyme, die N-Acetylglucoseaminidase, die ihr Optimum bei pH 5,5 hat und die N-Acetylmuramyl-L-alanin-Amidase, die ihr pH Optimum bei pH 9,0 hat. Beide Enzyme sind jedoch bei pH 7,2 aktiv [Jolliffe *et al.*, 24, Blackman *et al.*, 7].



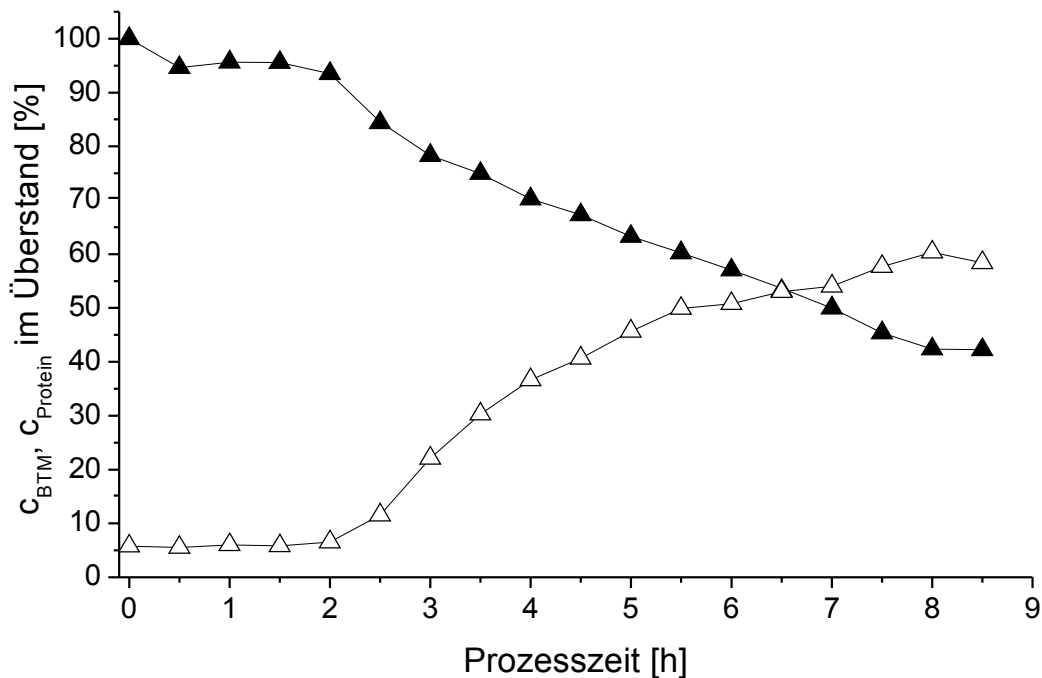
Aufgrund dieser Literaturhinweise bietet es sich an, zur Bestimmung des Temperaturoptimums einen pH-Wert von 7,0 zu wählen. Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte in 5 °C - Schritten im Bereich zwischen 30 und 60 °C. Hierzu wird nach Abschluss einer Riboflavinfermentation jeweils 500 ml der Fermentationsbrühe in sechs sterile Gefäße eines Infors - Sixfors gegeben. Anschließend wurden die Gefäße temperiert und der pH mittels 85 % *ortho*-Phosphorsäure bzw. 6 M Natronlauge auf pH 7 eingestellt. Alle vier Stunden wurden die Reaktionsgefäße auf Riboflavin-, Protein- und BTM-Konzentration hin beprobt. Für die BTM – Bestimmung wurden aufgrund des geringen Arbeitsvolumens nur jeweils 5 ml verwendet. Dies hatte zur Folge, dass die BTM-Bestimmung stärker Fehler behaftet war als mit 10 ml Probenvolumen. Die Versuchsdauer wurde auf 24 Stunden begrenzt.



**Abbildung 3.6:** a: BTM nach 24 Stunden Autolyse bei verschiedenen Temperaturen und einem konstanten pH - Wert von 7,5. b: BTM nach 24 Stunden Autolyse bei verschiedenen pH-Werten und einer konstanten Temperatur von 40 °C.

Anhand der Abbildung 3.6a kann man erkennen, dass das Temperaturoptimum für die Autolyse bei 40 °C liegt. Somit wurde für die Bestimmung des pH - Optimums eine Temperatur

von 40°C festgelegt. Da bereits in Kapitel 3.2.1.1 gezeigt werden konnte, dass bei pH 5 keine Autolyse mehr stattfindet und ab pH 9 der Salzeintrag in einen möglichen Extrakt recht hoch wäre, wurde zur Bestimmung des pH - Optimums der Bereich von pH 5 bis pH 9 festgelegt. Die Bestimmung des pH - Optimums erfolgte in Schritten von 0,5 pH Einheiten. Anhand der Abbildung 3.6b kann man erkennen, dass das pH - Optimum für die Autolyse zwischen pH 6,5 und 8,0 liegt. Für den pH Wert von 6,5 kann eine maximale Lyserate von  $4,87 \% \cdot h^{-1}$  und für den pH Wert von 7,5 kann eine maximale Lyserate von  $5,79 \% \cdot h^{-1}$  bestimmt werden.



**Abbildung 3.7:** Untersuchung der ersten 8 Stunden des Autolyseprozesses ( $\blacktriangle$  BTM-,  $\triangle$  Protein-Konzentration im Überstand). Als Grundlage der Berechnung des Proteins im Überstand dienen die Ergebnisse aus Kapitel 3.1, d.h. 100% Protein im Überstand entsprechen 50 % der BTM.

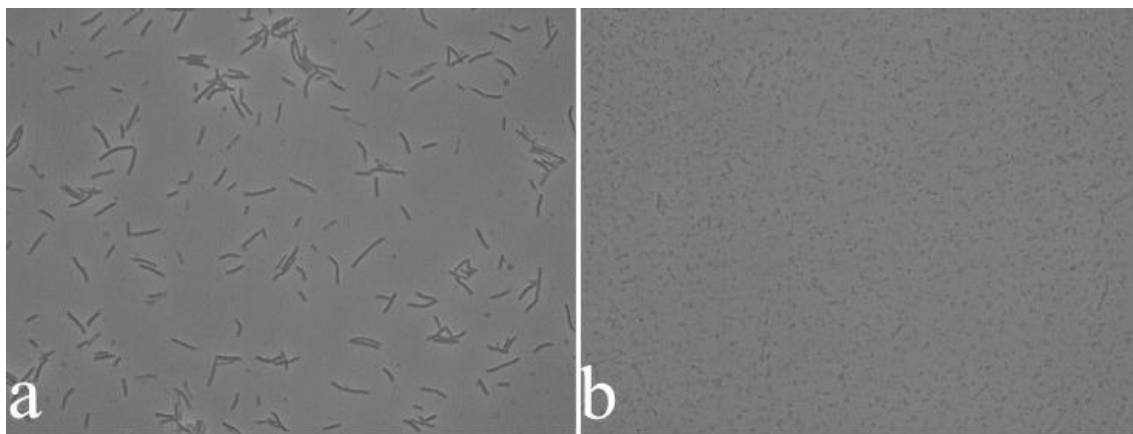
In den vorangegangenen Versuchen konnte aufgrund der Entwicklung der BTM – Konzentration festgestellt werden, dass eine Autolyse hauptsächlich in den ersten 8 Prozessstunden stattfindet. Dieses führte zu einem weiteren Versuch, in dem dieses Zeitintervall genauer untersucht werden sollte, indem die Zeitpunkte der Probennahme von 4 auf 0,5 Stunden herabgesetzt wurde. Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Abnahme der BTM mit der

Zunahme der Proteinkonzentration im Überstand korreliert. Hierzu wurden ein pH - Wert von 7,5 und eine Temperatur von 40 °C gewählt, da mit diesen Parametern zuvor die besten Ergebnisse erzielt worden waren. In Abbildung 3.7 sind BTM- und Protein- Konzentrationsverläufe im Überstand wiedergegeben.

Aus Abbildung 3.7 lässt sich erkennen, dass die Autolyse nach ca. 2 h einsetzt. Nach Einsetzen der Autolyse erfolgt die Abnahme der BTM mit einem relativ konstanten Faktor von  $7,44 \% \cdot h^{-1}$ . Nach ca. 8 Stunden erreicht die BTM einen Wert im Bereich von ca. 43 %.

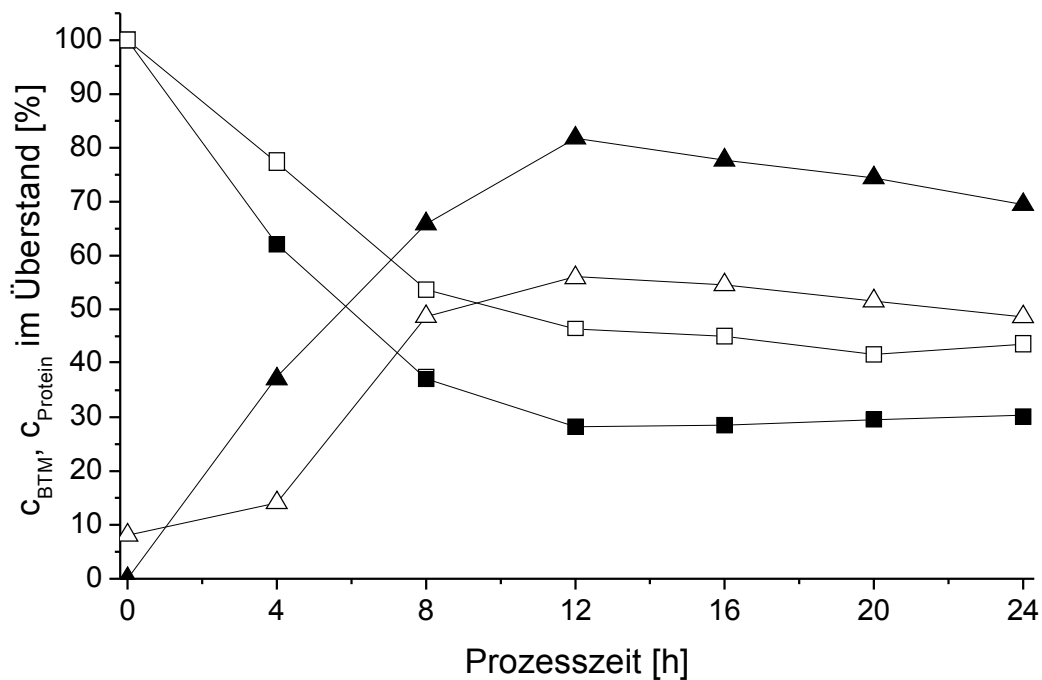
Dieser Versuch zeigt, dass der größte Teil der Mikroorganismen in den ersten 8 Stunden lysiert. Somit kann an einer Gesamtprozesszeit der Autolyse von 24 Stunden vorläufig festgehalten werden. Des weiteren kann man aus Abbildung 3.7 erkennen, dass die Proteinkonzentration im Überstand annähernd proportional zu der BTM – Konzentration verläuft.

In Abbildung 3.8 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Vergrößerung 400x) des Autolyseversuchs dargestellt. In Abbildung 3.8a ist die Aufnahme zu Beginn der Autolyse, auf der die *B. subtilis* Zellen sehr gut zu erkennen sind, dargestellt. In Abbildung 3.8b ist die lichtmikroskopische Aufnahme nach acht Stunden dargestellt, in der kaum noch intakte Zellen erkennbar sind.



**Abbildung 3.8:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Autolyse - Proben zu Prozessstart (a) und nach acht Stunden (b). Vergrößerung 400x.

Jolliffe *et al.* [Jolliffe *et al.*, 23, 24] haben berichtet, dass der höchste Lysegrad bei *Bacillus subtilis* erreicht wird, wenn die Zellen vor der Autolyse mit Wasser oder Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in Phosphatpuffer resuspendiert werden. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob bei dem gefundenen pH - Optimum von pH 7,5 und dem Temperatur optimum von 40 °C bei gewaschenen Zellen ein höherer Lysegrad im Vergleich zu ungewaschenen Zellen erreicht wird. Hierzu wurde nach Beendigung einer Riboflavin - Fermentation die Biomasse mittels Zentrifugation (4250g, 10 min) abgetrennt und dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen (Konzentration entsprechend der *ortho*-Phosphatkonzentration am Ende der Fermentation, pH 7,0). Anschließend wurde die Biomasse in Phosphatpuffer resuspendiert und die Autolyse induziert. Die Konzentration des Phosphatpuffers entsprach dabei der Konzentration des Puffers der Fermentation nach Fermentationsende.



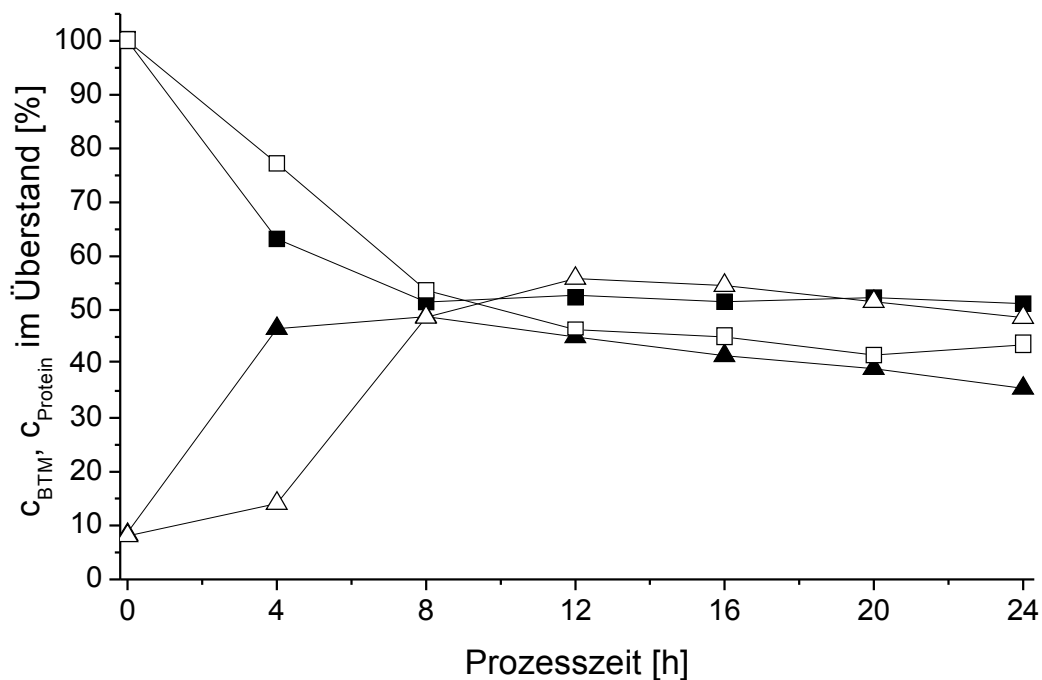
**Abbildung 3.9:** Vergleich der Autolyse von gewaschener Biomasse (■-BTM, ▲ Proteinkonzentration im Überstand) und Fermentationsbrühe (□ BTM, △ Proteinkonzentration im Überstand) nach Beendigung der Fermentation bei konstantem pH (7,5) und konstanter Temperatur (40 °C).

Anhand der Abbildung 3.9 kann man erkennen, dass mit gewaschener Biomasse ein höherer Lysegrad erreicht wird als mit Biomasse, bei der die Induktion der Autolyse direkt nach Fermentationsende erfolgt. Während bei dem Versuch mit Fermentationsbrühe nach Abschluss der Autolyse noch 43 % BTM nachgewiesen werden, kann bei der Autolyse mit gewaschener Biomasse lediglich eine BTM-Konzentration von 30 % nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich eine maximale Lyserate von  $7,86 \text{ \%*h}^{-1}$ . Diese Lyserate ist im Vergleich zu der ungewaschenen Biomasse um  $0,42 \text{ \%*h}^{-1}$  höher. Als Grundlage für die Berechnung der Proteinkonzentration im Überstand werden die Daten aus Kapitel 3.1 genommen. 100 % Protein im Überstand entsprechen 50 % der BTM - Konzentration zu Beginn des Versuches.

Ein weiterer Unterschied zwischen der Autolyse mit gewaschener Biomasse und der direkt nach der Fermentation induzierten Autolyse ist erkennbar beim Verbrauch von Natronlauge: Für die Autolyse mit gewaschener Biomasse wird für die pH Regulierung ca. 2,5 Mal weniger Natronlauge benötigt.

Der hier gezeigte Versuch hat jedoch nur einen theoretischen Charakter, da im industriellen Prozess eine Aufreinigung der Biomasse nach der Fermentation ohne vorhergehende Inaktivierung der Mikroorganismen nicht praktikabel ist. Werden die Mikroorganismen nicht inaktiviert, verändert sich die Viskosität der Fermentationsbrühe. Die Abtrennung des Riboflavins kann als Folge in diesem Maßstab nicht so schnell erfolgen, wie die Autolyse einsetzt (vgl. Kapitel 3.2.1.2, Seite 56). Bedingt durch die Autolyse der Biomasse werden jedoch Proteine in den Überstand freigesetzt, so dass die Viskosität der Fermentationsbrühe deutlich zunimmt und somit eine Abtrennung des Produktes Riboflavin nicht mehr möglich ist.

Im industriellen Maßstab ist die Gefahr einer Kontamination im Vergleich zu Laborversuchen wesentlich höher. Eine Minimierung der Kontaminationsgefahr während der Autolyse könnte durch zwei Maßnahmen vermieden werden: Einerseits könnten antiseptische Mittel zugeführt werden, andererseits könnte der Prozess bei einer höheren Temperatur durchgeführt werden. In der Literatur [Reiff *et al.*, 41] wird berichtet, dass die Gefahr einer Kontamination während der Autolyse verringert wird, wenn die Temperatur während des Prozesses auf mindestens  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  erhöht wird. In allen weiteren Versuchen wurde daher für die Lyseversuche eine Temperatur von  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gewählt. Dies führt jedoch dazu, dass der Autolysegrad abnimmt: Die BTM – Konzentration nach 24 Stunden nimmt von 43,5 auf 51,2 % zu. Dementsprechend nimmt die Proteinkonzentration im Überstand von 48,6 auf 35,5 % ab (vgl. Abbildung 3.10).

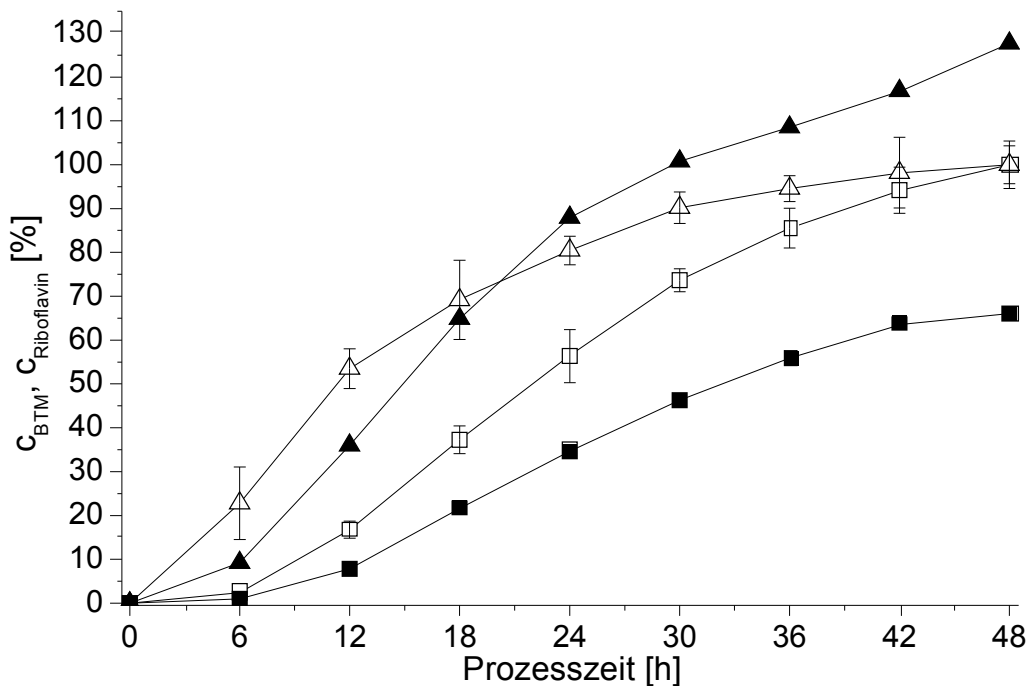


**Abbildung 3.10:** Vergleich der Autolyse bei 40°C (□ BTM, △ Proteinkonzentration im Überstand) und 45°C (■ BTM, ▲ Proteinkonzentration im Überstand) bei einem konstanten pH Wert von 7,5.

Im Folgenden sollte untersucht werden, was für einen Einfluss der Zellaufschluss auf die Fermentation hat und ob dadurch bessere Ergebnisse erzielt werden als mit nicht aufgeschlossener Biomasse (Kapitel 3.1). Der Überstand der Autolyse (bei 45 °C und pH 7,5) wurde dazu mittels Zentrifugation (4250g, 10 min.) abgetrennt. Bedingt durch die hohe Proteinkonzentration ließ sich eine Fermentation mit diesem Überstand nicht ohne weiteres durchführen. Um eine übermäßige Schaumbildung während der Sterilisation im Fermenter zu vermeiden, musste das hochmolekulare Protein aus dem Überstand entfernt werden. Eine Fällung des Proteins mittels Säure ist nicht sinnvoll, da nach der Fällung die Säure wieder neutralisiert werden muss und somit ein hoher Salzeintrag in das Medium erfolgt. Die zweite Möglichkeit zur Entfernung des hochmolekularen Proteinanteils ist eine Ultrafiltration. Diese Möglichkeit ist wesentlich effizienter als eine Fällung, da diese Methode keinen Einfluss auf den Salzgehalt hat, und zusätzlich neben dem hochmolekularen Protein auch noch Schwebstoffe aus dem Medium entfernt werden. Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Verwendung eines Filters mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa ausreichend ist, um ein

Schäumen während der Fermentation und der Sterilisation zu vermeiden. Durch die Filtration nimmt der Kohlenstoffgehalt im Überstand des Autolysates um 32,6 % ab. Die Abnahme des Kohlenstoffgehalts ist jedoch nicht nur auf das Entfernen der hochmolekularen Proteine zurückzuführen, da wie bereits erwähnt durch die Filtration sowohl die hochmolekularen Proteine als auch Schwebstoffe aus dem Überstand entfernt werden.

Nach der Filtration wurde der Überstand als Substrat in einer Fermentation mit der Standardfermentation mit Hefeextrakt verglichen.



**Abbildung 3.11:** Vergleich BTM und B2 zwischen durchschnittlicher Standardfermentation und *Bacillus* – Extrakt hergestellt durch Autolyse (■ Riboflavin *Bacillus* – Extrakt, □ Riboflavin Hefeextrakt, ▲ BTM *Bacillus* – Extrakt, △ BTM Hefeextrakt).

Der Feed - Start der Fermentation mit aufgeschlossener Biomasse erfolgte im Vergleich zu der Fermentation mit nicht aufgeschlossener Biomasse wesentlich früher und war im Vergleich zu der Standardfermentation mit Hefeextrakt nur noch 3,5 Stunden verspätet. Jedoch zeigt die Auswertung der BTM-Bestimmung, dass in der Anfangsphase der Fer-

mentation das Anwachsen der Biomasse stark verzögert ist (vgl. Abbildung 3.11). Erst nach 18 Stunden wächst die Biomasse auf dem Biomassenextrakt jedoch besser als auf Hefeextrakt, was zur Folge hat, dass weniger Riboflavin gebildet wird. Bedingt durch die Kopplung der Riboflavin – Bildung mit dem Wachstum der Mikroorganismen ist die Riboflavin - Produktion am Anfang der Fermentation niedriger. Im Vergleich zu der Standardfermentation mit Hefeextrakt ist die Riboflavin - Endkonzentration um ca. 34 % niedriger. Somit beträgt auch die Riboflavin – Ausbeute lediglich 66,3 % der Standardfermentation mit Hefeextrakt. Im Vergleich zu der Fermentation mit aufkonzentrierter Biomasse (vgl. Kapitel 3.1) bedeutet dies eine verringerte Ausbeute um 27,2 %.

Dieser Versuch bestätigt die Annahme, dass die Autolyse eine geeignete Methode zur Herstellung von Extrakt ist, jedoch empfiehlt es sich, wie von Sommer [Sommer, 49] beschrieben, noch Proteasen zu verwenden, um die Qualität des Extraktes zu steigern.

### 3.2.1.3 Einfluss von Polyphosphat auf die Autolyse

Anorganisches Polyphosphat (polyP) ist aufgrund seiner Eigenschaft Aromen zu schützen und Wasser zu binden ein weit verbreiteter Nahrungsmittelzusatz (insbesondere in der Fleisch- und Molkerei-Industrie). Die höhermolekularen Polyphosphate sind in neutraler und schwach alkalischer Lösung bei gewöhnlicher Temperatur sehr beständig, jedoch werden sie bei Temperaturen über 100 °C hydrolytisch abgebaut. In Lösung liegen die Polyphosphat-Ketten wahrscheinlich gefaltet oder als Spirale gewunden vor, wobei die Faltung zum Teil durch Wasser-Moleküle, die über H-Bindungen an O-Atome gebunden sind, aufrechterhalten wird. Polyphosphate sind Polyelektrolyte, lassen sich in Lösungen als Ionenaustauscher verwenden und vermögen so höherwertige Ionen, z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Zn}^{2+}$ - und Fe-Ionen an der Ausfällung durch Anionen, mit denen diese Ionen schwerlösliche Salze bilden, zu hindern. Diese Eigenschaft der catena-, nicht jedoch der cyclo-Polyphosphate, zeigt sich bereits bei Konzentrationen, die weit unter der stöchiometrischen Komplexierung liegen (Threshold-Effekt, s. Härte des Wassers) [Roempp Chemielexikon, 43].

Eine Inhibition des Bakterienwachstums durch polyP konnte in der Literatur [Maier *et al.*, 30] schon mehrfach nachgewiesen werden und im Allgemeinen scheint es so zu sein, dass Gram-



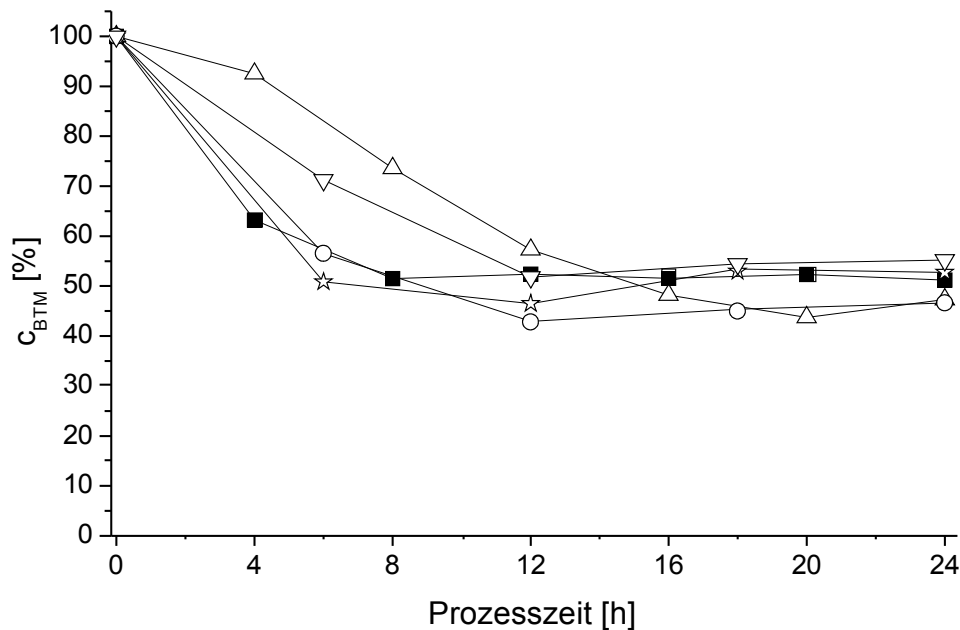
positive Organismen wesentlich sensibler als Gram-negative Organismen auf polyP reagieren. Das Wissen über die antimikrobielle Wirkung von polyP ist sehr beschränkt, jedoch wird die Fähigkeit von polyP, zweiwertige Kationen zu chelieren als Ursache für die beobachteten inhibitorischen Effekte betrachtet.

Maier [Maier *et al.*, 30] berichtet, dass 0,05 % Polyphosphat bei *Bacillus cereus* zu einer Hemmung des Zellteilungszyklus führt und sich lange Stäbchen bilden. Eine Erhöhung der Polyphosphatkonzentration auf 0,1 % inhibiert die Sporenbildung und Sporenwachstum, höhere Konzentrationen bis 1 % haben sogar sporozidoide Wirkung. Eine Zugabe von divalenten Metallionen führt zu einer Aufhebung dieses Effekts und zu weiterem Wachstum der Zellen.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob durch Zugabe von Polyphosphat die Autolysegeschwindigkeit bzw. der Grad der Autolyse angehoben werden kann. Bedingt durch die geringe Menge an zugeführtem Polyphosphat, das durch die Sterilisation des Mediums zu *ortho*-Phosphat hydrolysiert, sollte dieses noch keinen negativen Einfluss auf die Fermentation durch eine erhöhte Phosphatkonzentration haben. Jedoch hat Polyphosphat einen Einfluss auf die Proteinanalytik. Durch die Zugabe von Polyphosphat zur BSA-Standardlösung konnte eine sofortige Ausfällung des Proteins beobachtet werden und mittels Bradford kein Protein mehr nachgewiesen werden. Sonstige kolorimetrische Proteinbestimmungen, wie z.B. BCA und Biuret funktionieren aufgrund verschiedenster Chemikalien im Fermentationsmedium ebenfalls nicht.

In den folgenden Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 1,0 % (V:V) Polyphosphat während der Autolyse zugegeben, um dessen Auswirkungen auf die Autolyse festzustellen.

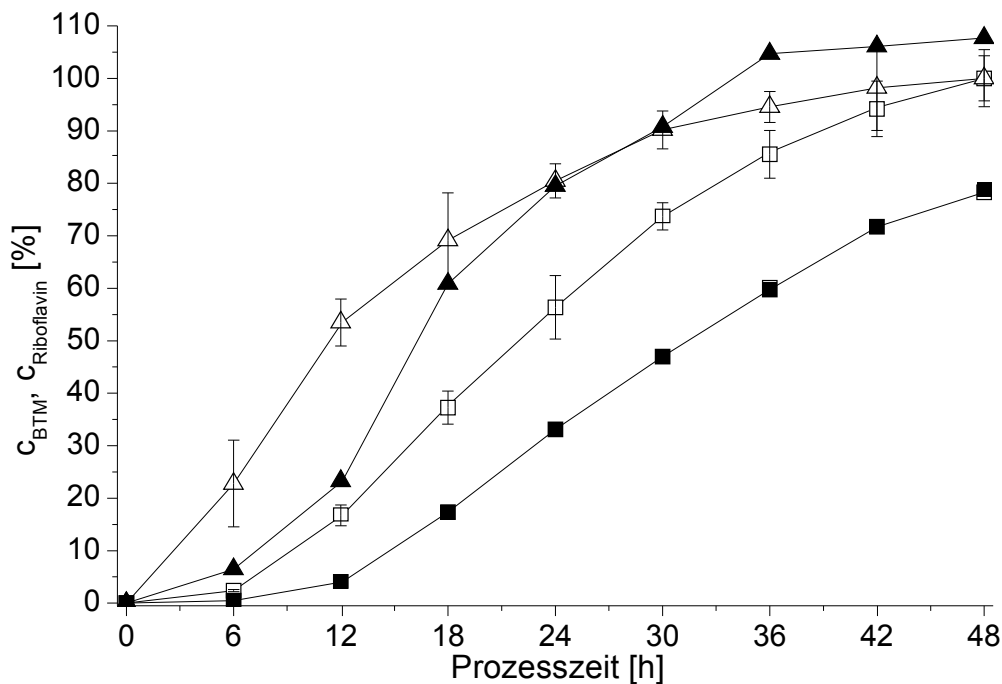
Anhand von Abbildung 3.12 kann man erkennen, dass die Zugabe von Polyphosphat nicht die erhoffte Wirkung im Bezug auf eine Beschleunigung der Autolyse oder eine erhöhte Zelllyse hat. Mit geringen polyP - Konzentrationen (0,1 und 0,3 %) verläuft die Autolyse ähnlich der Autolyse ohne Zugabe von polyP. Bei erhöhten Konzentrationen an polyP (0,5 und 1,0 %) wird die Autolyse in den ersten 12 Prozessstunden sogar gehemmt. Der Vergleich der Prozessparameter zwischen der Autolyse ohne und unter Zugabe von polyP fällt auf, dass für die pH-Regulierung bei der Autolyse unter Zugabe von polyP ca. 2,5 mal weniger Natronlauge benötigt wird. Dieses Phänomen wurde bereits bei der Autolyse mit gewaschener Biomasse beobachtet.



**Abbildung 3.12:** Vergleich der Autolyse ohne und mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen Polyphosphat (■-Standard, ☆-0,1%, ○-0,3%, △-0,5%, ▽-1,0% V:V).

In der Fermentation wurde lediglich der mit 0,5 % polyP Zusatz hergestellte Extrakt getestet und mit dem Standard unter Verwendung von Hefeextrakt verglichen. Hierzu wurde der Extrakt wie bereits beschrieben durch Zentrifugation (4250g, 10 min) abgetrennt, jedoch anschließend nicht filtriert, da der Großteil der hochmolekularen Proteine bereits durch die Zugabe von polyP gefällt worden waren und eine Abtrennung der Schwebstoffe nicht zwingend notwendig war. Der Kohlenstoffgehalt war im Vergleich zu dem Überstand der Autolyse ohne polyP lediglich 2,4 % niedriger. Dies lässt vermuten, dass der Schwebstoffanteil im Überstand doch höher als erwartet ist.

Aufgrund der Kohlenstoffbilanz wird durch die Zugabe von polyP im Vergleich zum Hefeextrakt die dreifache Menge an *ortho*-Phosphat durch den Extrakt in das Medium gebracht, wodurch sich die Phosphat - Konzentration im Medium verdoppelt.

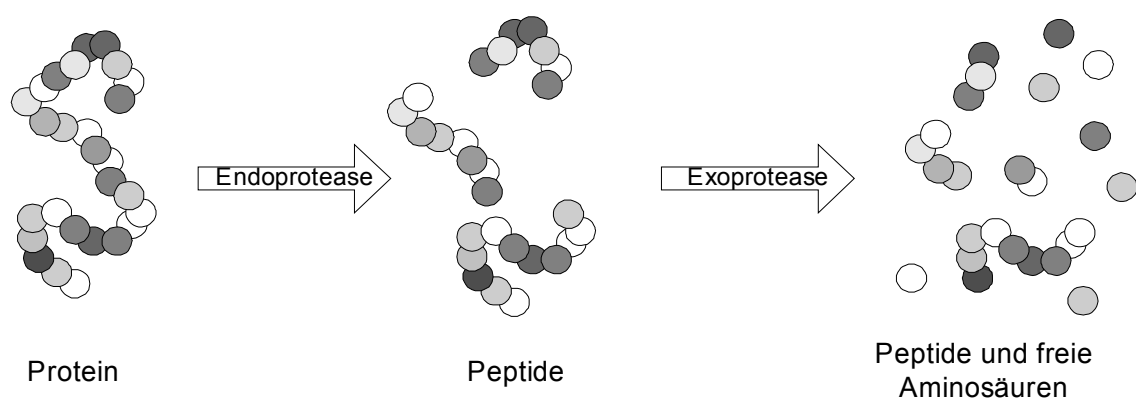


**Abbildung 3.13:** Vergleich BTM und Vitamin B2 zwischen durchschnittlicher Standardfermentation und *Bacillus* – Extrakt hergestellt durch Autolyse mit Polyphosphat 0,5 % (■ Riboflavin *Bacillus* – Extrakt, □ Riboflavin Hefeextrakt, ▲ BTM *Bacillus* – Extrakt, △ BTM Hefeextrakt).

Der Verlauf der Fermentation (vgl. Abbildung 3.13) zeigt, dass die polyP Zugabe zwar keinen Einfluss auf die Autolyse hat, jedoch einen Einfluss auf die Extraktqualität. Durch die Zugabe von polyP während der Autolyse wird in der Fermentation eine wesentlich höhere Riboflavin-Endkonzentration erreicht und somit auch eine wesentlich höhere Ausbeute als bei Autolyse ohne polyP Zugabe. Während mit dem einfachen Extrakt eine Riboflavin – Endkonzentration von lediglich 66,1 % erreicht werden konnte, wird mit dem polyP Extrakt eine Riboflavin – Endkonzentration von 78,3 % erreicht. Die Ausbeute steigert sich von 66,3 % mit dem Autolysat auf 85,5 % mit dem Autolysat unter Zugabe von polyP. Hierbei fällt auf, dass die Biomasse nicht wesentlich besser anwächst und der Feed - Start verzögert nach 3 Stunden anstelle von 3,5 Stunden auftritt. Des Weiteren erreicht die Biomasse erst nach 24 Stunden eine höhere Konzentration als der Standardansatz. Am Ende der Fermentation ist die BTM – Konzentration zwar höher als beim Standard aber immer noch niedriger als bei Verwendung von einfachem Extrakt.

### 3.2.2 Autolyse unter Zugabe von Proteasen

Die oben gezeigten Versuche verdeutlichen, dass mit aufgeschlossener Biomasse bessere Ergebnisse im Bezug auf den Feed – Start und somit auf die Raum-Zeit Ausbeute erzielt werden als mit unaufgeschlossener Biomasse. Des Weiteren wird klar, dass die endogenen Proteasen nicht ausreichend sind, um die Proteine, die während der Autolyse in den Überstand gelangen, abzubauen. Die im Überstand verbleibenden hochmolekularen Proteine werden mittels Querstromfiltration abgetrennt, wodurch einerseits ein Schäumen während Sterilisation und Filtration vermieden und andererseits aber auch die Qualität des Extraktes vermindert wird. Um die frei werdenden Proteine zu spalten und somit eine höhere Extraktqualität zu erhalten, empfiehlt sich die Zugabe von Proteasen. Proteasen werden je nach Angriffsort in Endo- und Exoproteasen unterteilt. Endoproteasen spalten das Proteingerüst an jeweils spezifischen, internen Aminosäuren und erzeugen so ein für jedes Protein und das jeweils verwendete Enzym spezifisches Peptidmuster. Sind die Proteine in Peptide gespalten, können sehr effizient Exoproteasen eingesetzt werden, da diese dann eine größere Angriffsfläche haben und die durch die Endoproteasen entstandenen Peptide vom ihrem C- und N-terminalen Ende her weiter abbauen (vgl. Abbildung 3.14). Somit können die Proteine durch die Proteasen bis auf die Grundbausteine, den Aminosäuren, abgebaut werden und dadurch eine Steigerung der Qualität des Extraktes erreicht wird [Lottspeich *et al.*, 28, Sommer 49].

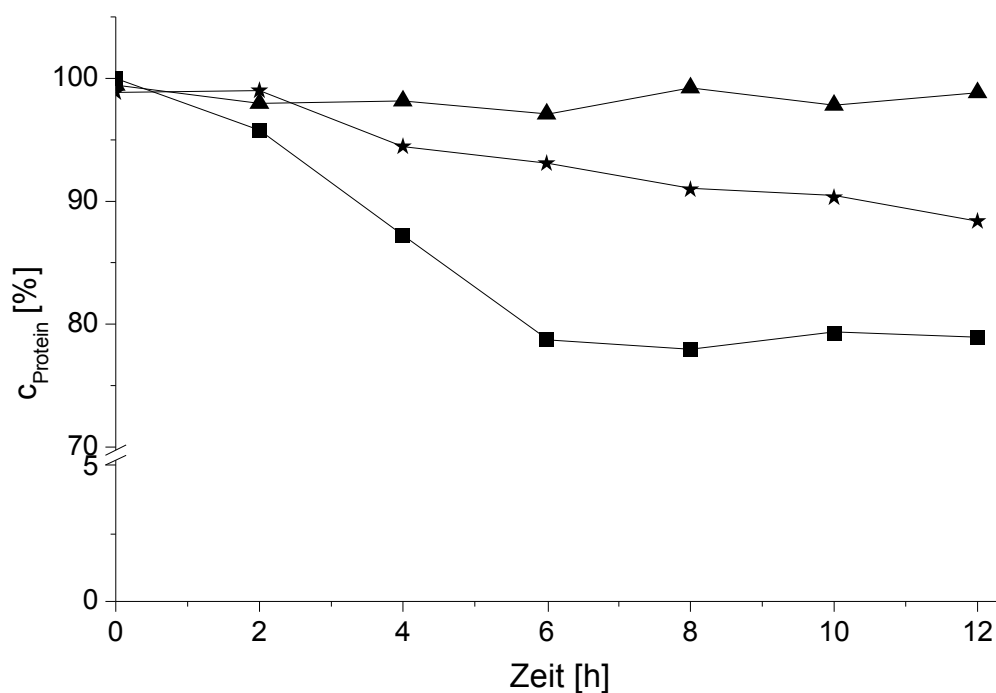


**Abbildung 3.14:** Schematische Darstellung der Arbeitsweise von Endo- und Exoproteasen

Werden während der Autolyse Proteasen zugegeben, kann jedoch kein Polyphosphat zuge-

geben werden, da polyP wie bereits in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben, die Proteine im Überstand ausfällt und somit auch die zugegebenen Proteasen inaktivieren würden.

Beim Vergleich der Fermentation mit dem Überstand der Autolyse (vgl. Abbildung 3.11) mit einer Fermentation mit nicht – aufgeschlossener Zellmasse werden im Bezug auf den Feed – Start bessere Ergebnisse erzielt. Damit eine effiziente und ökonomische Zugabe der Proteasen erfolgen kann, sollte festgestellt werden, im welchem pH Bereich die endogenen Proteasen arbeiten. Bekannt ist, dass der beste Autolysegrad im pH Bereich von 6,5 bis 7,5 erreicht wird. Jolliffe *et al.* [Jolliffe *et al.*, 23] berichten, dass die Autolysine von *Bacillus subtilis* bei einem pH von 7,2 aktiv sind. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein Versuch mit aufgeschlossener Biomasse im Schüttelkolben durchgeführt und der endogene Proteinabbau bei pH – Werten von 7, 7,5 und 8 untersucht.



**Abbildung 3.15:** Proteinabbau durch die endogenen Proteasen bei 40 °C und einem pH-Wert von 7,0 (■), 7,5 (★) und 8,0 (▲).

Hierfür wurde nach dem Ende einer Fermentation die Biomasse mittels Zentrifugation isoliert, dreimal mit Phosphatpuffer (Konzentration entspricht der Phosphatkonzentration am

Ende der Fermentation, pH 7,0) gewaschen und anschließend in drei Durchläufen mit dem Hochdruckhomogenisator bei 1900 bar aufgeschlossen. Der Überstand des Homogenisats wird mittels Zentrifugation isoliert. Von dem erhaltenen Überstand wurden jeweils 50 ml in sechs Schüttelkolben gegeben und immer jeweils zwei Schüttelkolben auf pH – Wert von 7, 7,5 und 8 eingestellt. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis, um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch Proteasen die schon bei Raumtemperatur aktiv sind, so gering wie möglich zu halten.

Anschließend wurden die Schüttelkolben bei 40 °C im Schüttler inkubiert. Alle zwei Stunden wird die Proteinkonzentration mittels Bradford Protein Assay bestimmt. Nach zwölf Stunden wurde der Versuch abgebrochen. Dieser Versuch (vgl. Abbildung 3.15) bestätigte die Ergebnisse der Autolyse (vgl. Abbildung 3.6, Kapitel 3.2.1.2) und zeigte, dass bei dem optimalen pH – Wert für die Autolyse auch die optimale Proteinhydrolyse durch die endogenen Proteasen stattfindet. Anhand der Abbildung 3.15 kann man erkennen, dass die endogenen Proteasen ihr pH Optimum im neutralen Bereich haben. Bei einem pH Wert von 8,0 kann keine Proteinhydrolyse mehr festgestellt werden. Aufgrund dieser und der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1.2 wird in den weiteren Versuchen ein pH Wert von 6,5 bzw. 7,5 gewählt.

### 3.2.2.1 Autolyse mit Zugabe von Proteasen bei pH 7,5

*Alcalase* (Calbiochem, San Diego, CA, USA) ist eine reine Endoprotease (EC 3.4.21.14) gewonnen aus *Bacillus licheniformis* für den Laborbedarf. Diese Protease hat ihr pH – Optimum zwischen 7,0 und 8,5 und wird mit einer Aktivität von  $\geq 0,75$  Anson Einheiten<sup>2</sup> pro Milliliter geliefert und erscheint somit für die Autolyseversuche bei einem pH von 7,5 geeignet. Anstelle dieser Protease kann auch Alcalase 2.4 LF von Novo (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dänemark) verwendet werden.

Risse *et al.* [Risse *et al.*, 42] konnte durch die Zugabe von Alcalase eine Verbesserung der Autolyse im Bezug auf den Autolysegrad feststellen. Eine signifikante Abnahme der Proteinkonzentration im Überstand konnte ebenso festgestellt werden. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Eine Optimierung der Zeit und der zugegebenen Menge ergab,

---

<sup>2</sup> Eine Anson Einheit ist definiert als die Menge Protease die 1  $\mu$ mol L-Tyrosin von Hämoglobin in einer Minute bei 37 °C und pH 7,5 abspaltet.

dass die optimale Gesamtmenge an Alcalase 0,015 % (V:V) für den vorliegenden Prozess ist. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn eine zweifache Zugabe der Protease nach einer und fünf Stunden erfolgt. Ist die zugegebene Menge geringer als die oben angegebene Menge, hat dies negative Auswirkungen sowohl auf den Autolysegrad als auch auf den Grad der Proteinhydrolyse. Ist die zugegebene Menge höher, hat dieses keinen Einfluss, da weder der Autolysegrad noch der Grad der Proteinhydrolyse zunehmen.

Durch die Zugabe der Protease sank die Konzentration der BTM von 51 % bei der Autolyse auf 26 % bei der Autolyse unter Zugabe von Alcalase (vgl. Abbildung 3.16). Somit ist die Konzentration der BTM im Vergleich sogar um 18 % niedriger als bei der Autolyse ohne Proteasen bei einer Temperatur von 40 °C. Die maximale Lyserate nimmt von 7,44 %\*h<sup>-1</sup> auf 8,65 %\*h<sup>-1</sup> unter Zugabe von Alcalase zu. Die Proteinkonzentration im Überstand nimmt durch die Zugabe der Alcalase von 35 auf 25 % ab. Der Proteinhydrolysegrad ist jedoch tatsächlich wesentlich höher, da wie bereits oben erwähnt durch die Zugabe von Alcalase der Autolysegrad zunimmt und somit wesentlich mehr Protein freigesetzt wird.

**Promod 25P – P025P** (Biocatalysts, Pontypridd, England) ist ein Gemisch aus Endo- und Exoprotease gewonnen aus *Aspergillus spp.*, das für den industriellen Gebrauch erhältlich ist. Die hier verwendete Protease hat eine angegebene Aktivität von 400 U/g und ihr Temperaturoptimum bei 50 °C. Vom Hersteller wird eine 80%ige Aktivität der Endoprotease in dem Temperaturbereich zwischen 45 - 55 °C und dem pH Bereich von 5,0 – 9,0 angegeben. Den Herstellerangaben zufolge sollten 0,4 - 0,8 % (W/W) für einen hohen Hydrolysegrad und 0,3 - 0,4 % (W/W) für den ersten Schritt einer Proteinhydrolyse verwendet werden.

In den mit dieser Protease durchgeführten Versuchen wurde als erstes die vom Hersteller empfohlene Mindestmenge an Enzym eingesetzt. Hierbei wurde von der zuvor bestimmten Gesamtmenge an Protease jeweils eine Hälfte nach einer und die andere Hälfte nach fünf Stunden zugegeben. Die Zugabe der Protease erfolgte analog zu den Versuchen mit Alcalase, die Parameter wie pH und Temperatur wurden beibehalten. In diesem Versuch konnte weder ein erhöhter Proteinhydrolysegrad noch ein erhöhter Autolysegrad wie bei den Versuchen mit Alcalase festgestellt werden. In dem folgenden Versuch wurden die Zeitpunkte der Zugabe beibehalten, jedoch die Menge auf die vom Hersteller empfohlene Menge für einen maximalen Proteinhydrolysegrad (0,8 % W/W) zugegeben.

Anhand der Abbildung 3.16 kann man erkennen, dass die Zugabe von Promod 25P – P025P

zwar eine Senkung der Proteinkonzentration im Überstand von 35,5 auf 26,4 % (Amano P 24,8 %) bewirkte, dabei jedoch auch ein erniedrigter Autolysegrad festgestellt wurde, da die BTM von 51,2 auf 58,4 % (Amano P 54,9 %) zunahm. In weiteren Versuchen, bei denen die Menge und die Zeitpunkte der Zugabe variiert wurden, ergaben keine Verbesserung.

**Protease P „Amano“ 6** (EC 3.4.21.63, Amano Enzymes, Nagoya, Japan) ist wie auch Promod 25P ein Gemisch aus Endo- und Exoprotease für den Industriebedarf gewonnen aus *Aspergillus melleus*. Die hier verwendete Protease hat eine angegebene Aktivität von  $\geq 60000$  U/g<sup>3</sup>, das Temperaturoptimum liegt bei 45 °C und das pH-Optimum bei pH 8,0.

In den Versuchen mit Protease P wurden die Prozessparameter wie bei den Versuchen mit Alcalase beibehalten. Es wurden wieder die oben genannten Zeitpunkte der Zugabe beibehalten und die zugegebene Menge variiert. Anhand der Abbildung 3.16 kann man erkennen, dass die Zugabe von Protease P wie auch von Promod 25P keinen Einfluss auf den Proteinhydrolysegrad als auch auf den Autolysegrad hat.

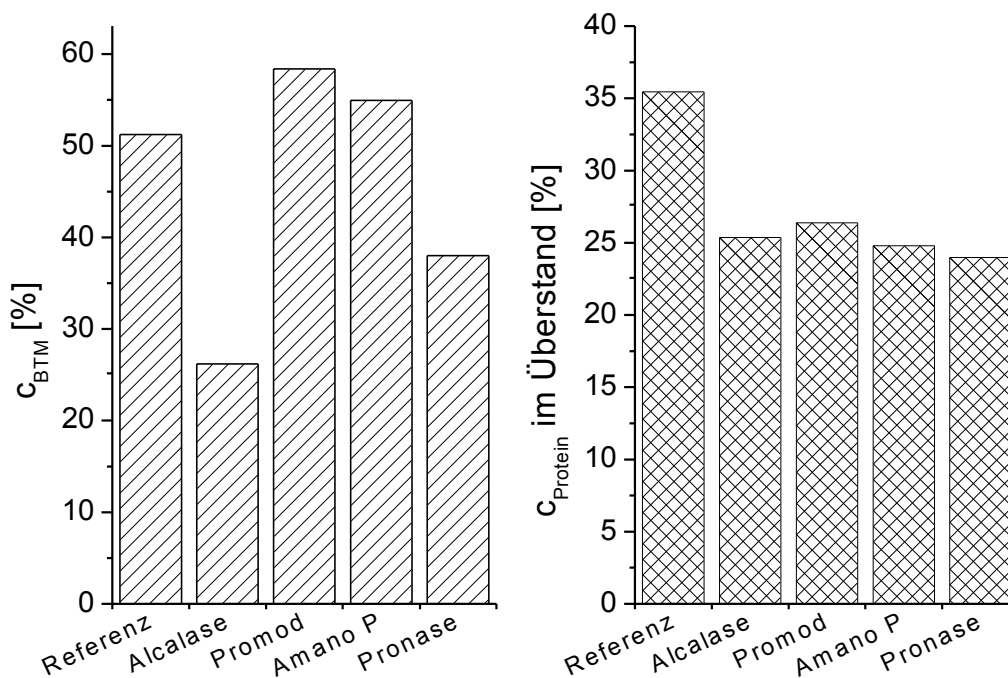
**Pronase** (Calbiochem, San Diego, CA, USA) ist wieder wie auch die vorhergehenden Proteasen ein Gemisch aus Endo- und Exoprotease für den Laborbedarf, gewonnen aus *Streptomyces griseus*. Bei diesem Gemisch ist jedoch im Vergleich zu den vorgehenden Proteasen der Hauptanteil Exoprotease. Das Temperaturoptimum dieser Protease liegt bei 40 °C und das pH-Optimum bei pH 7,5. Die verwendete Aktivität liegt bei 500000 U/g<sup>4</sup>.

Die Zugabe der Protease erfolgte genau wie bei den vorangegangenen Versuchen nach einer und fünf Stunden. Die zugegebene Menge an Pronase wurde dabei von 200 bis 2000 U variiert. Anhand der Abbildung 3.16 kann man, wie auch bei den Versuchen mit Alcalase erkennen, dass durch die Zugabe von Pronase die Autolyse verbessert wird und die BTM von 51,2 auf 38 % abnimmt. Die Proteinkonzentration im Überstand nimmt von 35,5 auf 24 % ab. Im Vergleich dazu konnte mit Alcalase noch 26 % Protein im Überstand nachgewiesen werden. Allerdings war auch der Autolysegrad wesentlich höher, da in diesem Versuch lediglich 26 % BTM nachgewiesen werden konnten.

<sup>3</sup> Eine Einheit ist die Menge an Enzym die bei pH 8,0 in 60 Minuten ein Äquivalent von 100 µg Tyrosin an Aminosäuren hydrolysiert.

<sup>4</sup> Eine Einheit ist definiert als die Menge an Enzym die in einer Minute bei pH 7,5 und einer Temperatur von 40 °C 25 mg Tyrosinäquivalente freisetzt.



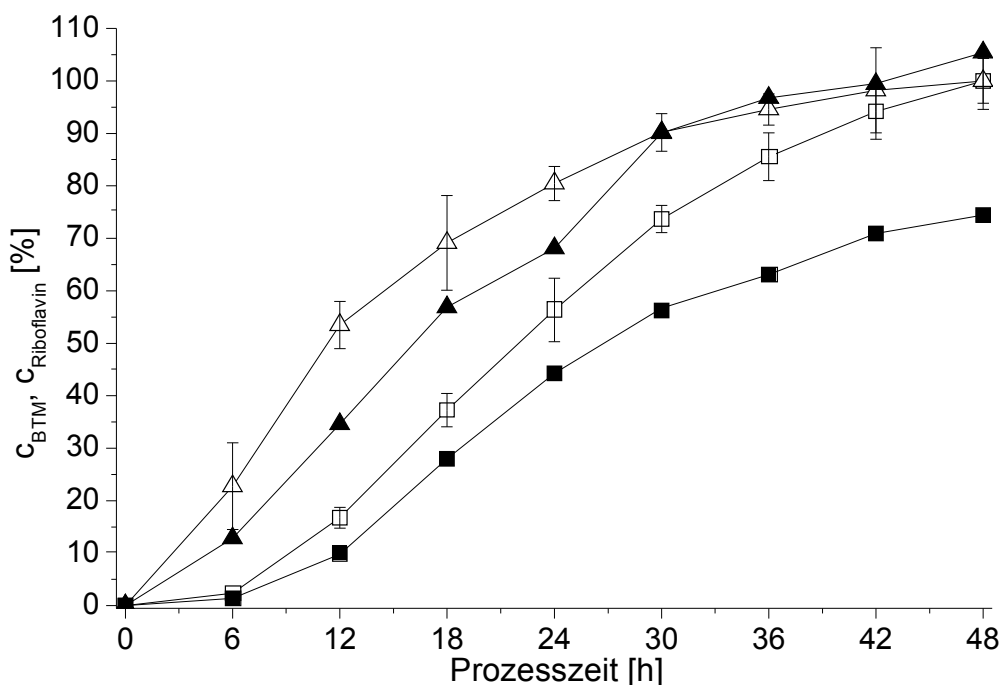


**Abbildung 3.16:** Vergleich der bei der Autolyse eingesetzten Endoproteasen bei pH 7,5 und einer konstanten Temperatur von 45 °C.

Die durchgeführten Screening – Versuche nach einer geeigneten Endoprotease ergeben, dass Alcalase unter den gegebenen Voraussetzungen (pH 7,5 und 45 °C) die Endoprotease der Wahl ist. Im Folgenden wurde nun im Rahmen einer Fermentation überprüft, ob durch die Einwirkung der Protease sich die Qualität des Extraktes verbessern ließ. Hierzu wurde der Überstand nach der Autolyse wie bereits beschrieben mittels Zentrifugation abgetrennt, anschließend filtriert und der Kohlenstoffgehalt bestimmt. Anhand der Kohlenstoffbestimmung nach der Filtration konnte die verbesserte Proteindegradation während der Autolyse bestätigt werden. Die Berechnung des prozentualen Kohlenstoffgehalts pro prozentualer lysierter Biomasse ergab im Vergleich zu der Autolyse ohne Proteasen einen um 28 % erhöhten Kohlenstoffgehalt im Überstand.

Für die Fermentation wurde im Medium wieder der Hefeextrakt aufgrund des Kohlenstoffgehaltes 1:1 durch den filtrierten Überstand der Autolyse ersetzt. Die Fermentation (vgl. Ab-

bildung 3.17) zeigte, dass im Vergleich zur Autolyse ohne Proteasen die Zugabe von Alcalase nicht nur einen positiven Einfluss auf die Autolyse, sondern auch einen positiven Einfluss auf die Extraktqualität und somit auch auf die Fermentation hat. Durch die Zugabe von Alcalase wurde eine wesentlich höhere Riboflavin – Endkonzentration und Ausbeute als durch die Autolyse ohne Alcalase erreicht. Während mit dem einfachen Extrakt eine Riboflavin – Endkonzentration von lediglich 66,1% erreicht werden konnte, wurde mit dem Extrakt unter Zugabe von Alcalase eine Endkonzentration von 74,4 % erreicht. Die Ausbeute steigert sich von 66,3 % mit dem Autolysat auf 72,5 % mit dem Autolysat unter Zugabe von Alcalase. Hierbei war auffällig, dass die Biomasse besser anwuchs und der Feed - Start im Vergleich zur Standardfermentation nur noch ca. 2,5 Stunden anstelle von 3,5 Stunden verspätet als bei der Standardfermentation eintritt. Des Weiteren erreichte die Biomasse erst nach 30 Stunden eine höhere Konzentration als im Standardansatz. Am Ende der Fermentation war die BTM – Konzentration zwar höher als beim Standard aber niedriger als beim einfachen Extrakt hergestellt durch Autolyse ohne Zugabe von Proteasen.



**Abbildung 3.17:** Vergleich des BTM- und Vitamin B2- Verlaufes einer Standardfermentation mit Hefeextrakt und einer Fermentation mit *Bacillus* – Extrakt hergestellt durch Autolyse unter Zugabe von Alcalase (■ Riboflavin *Bacillus* – Extrakt, □ Riboflavin Hefeextrakt, ▲ BTM *Bacillus* – Extrakt, △ BTM Hefeextrakt).

Im Folgenden sollten nun Exoproteasen getestet werden, um zu überprüfen, ob dadurch die Extraktqualität weiter zu steigern war. Hierfür wurden folgende Proteasen gefunden und unter gleichzeitiger Zugabe von Alcalase nach 1 und 5 Stunden untersucht:

**Umimazyme** (Amano Enzymes, Nagoya, Japan) ist ein Gemisch aus Endo- und Exoprotease mit dem Hauptanteil an Exoprotease gewonnen aus *Aspergillus oryzae*, die für den industriellen Gebrauch erhältlich ist. Das pH-Optimum der Peptidasenfraktion liegt zwischen pH 7,0 und 8,0, das Temperaturoptimum zwischen 45 und 50 °C. Die Stabilität der Endoproteasenfraktion bei der verwendeten Temperatur von 45 °C wird vom Hersteller als sehr gering angegeben. Die Aktivität der Protease ist  $\geq 70$  U/g.

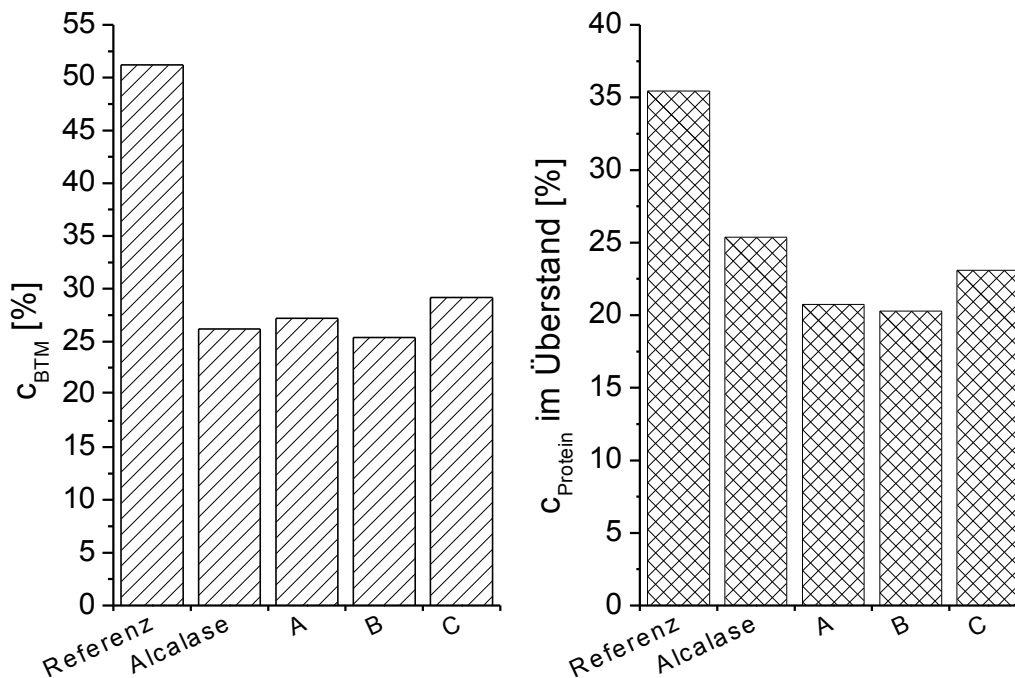
In den folgenden Screening – Versuchen erwies sich eine Menge von insgesamt 0,38 % Umimazyme (W/W, bezogen auf die durchschnittliche BTM zu Versuchsbeginn) als optimal. Als optimaler Zeitpunkt der Zugabe ergaben sich 8 und 16 Stunden, wobei jeweils die Hälfte der Gesamtmenge zugegeben wurde.

Anhand der Abbildung 3.18 kann man erkennen, dass die Zugabe von Umimazyme keinen Einfluss auf die Autolyserate hatte. Somit konnte die vom Hersteller angegebene Instabilität der Endoprotease bei dieser Temperatur bestätigt werden. Die Proteinkonzentration im Überstand nahm durch die Zugabe der Exoprotease von 25,4 auf 20,8 % ab. Eine Erhöhung der Menge bzw. eine Änderung der Zeiten bewirkte keine Erhöhung der Hydrolyserate. Eine weitere Variierung der zugegebenen Menge und der Zeitpunkte erbrachte keine Zunahme des Proteinhydrolysegrad.

Die Protease **Amano P** (Amano Enzymes, Nagoya, Japan) wurde schon in einem vorhergehenden Versuch (vgl. Seite 71) auf ihre Endoproteaseaktivität hin getestet. Im Folgenden sollte sie nun in Kombination mit Alcalase auf ihre Exoproteasenaktivität getestet werden.

Die Optimierung der Menge und der Zeitpunkte der Zugabe ergaben eine Abnahme der Proteinkonzentration im Überstand von 25,4 % auf 20,3 % wie man anhand der Abbildung 3.18 erkennen kann. Hierbei wurde festgestellt, dass die gleichen Mengen und auch die gleichen Zugabezeitpunkte wie mit Umimazyme verwendet werden können. Der Proteinachweis mit Bradford ergab jedoch keinen Aufschluss darüber, ob die verminderte Proteinkonzentration im Überstand auf die Aktivität der Endo- oder der Exoprotease zurückzuführen

war.



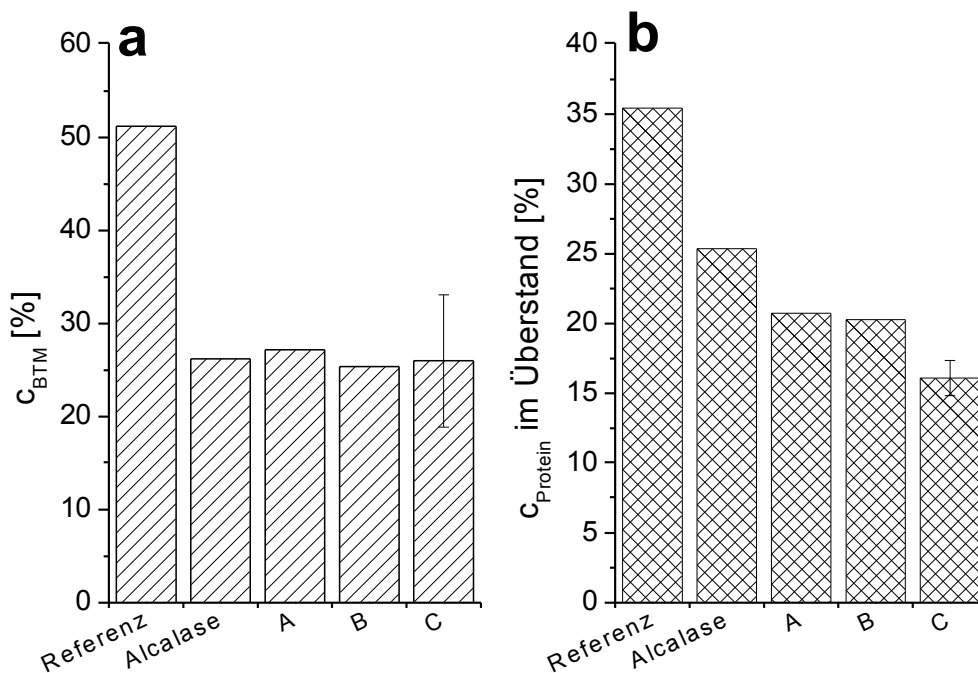
**Abbildung 3.18:** Vergleich der verschiedenen eingesetzten Kombinationen an Endo- und Exoproteasen bei pH 7,5 und einer konstanten Temperatur von 45 °C (A= Alcalase und Umimazyme, B= Alcalase und Amano P, C= Alcalase und Pronase).

**Pronase** hatte in dem vorangegangenen Versuch (vgl. Seite 72) im Vergleich zu den anderen verwendeten Proteasen die zweitbesten Ergebnisse im Bezug auf die Proteinhydrolyse und des Autolysegrades ergeben. Im Folgenden sollte nun festgestellt werden, ob durch eine Kombination von Pronase mit Alcalase ein höherer Proteinhydrolysegrad und unter Umständen vielleicht auch ein höherer Autolysegrad erreicht werden konnte. Anhand der Versuchsergebnisse (vgl. Abbildung 3.18) kann man erkennen, dass Proteinkonzentration im Überstand im Vergleich zur Autolyse unter der Zugabe von Alcalase nur unwesentlich abnahm. Die Autolyse erreicht nach 24 Stunden nur denselben Autolysegrad wie unter dem Einsatz von Alcalase ohne Zusatz.

Aufgrund des höheren Hydrolysegrads der Proteine im Überstand unter der Zugabe der

Kombination von Alcalase und Umimazyme bzw. Amano P wird im nächsten Versuch überprüft, ob mit einer Kombination dieser beiden Proteasen (Umimazyme und Amano P) und Alcalase ein höherer Hydrolysegrad der Proteine im Überstand erreicht wird. Hierzu werden die Zeiten und Mengen an Exoprotease der vorangegangenen Versuche beibehalten, so dass zu diesen Zeitpunkten beide Proteasen gleichzeitig zugegeben werden.

Aufgrund des höheren Hydrolysegrads der Proteine im Überstand unter der Zugabe der Kombination von Alcalase und Umimazyme bzw. Amano P sollte im nächsten Versuch überprüft werden, ob mit einer Kombination dieser beiden Proteasen (Umimazyme und Amano P) und Alcalase ein höherer Hydrolysegrad der Proteine im Überstand erreicht werden konnte. Hierzu wurden die Zeiten und Mengen an Exoprotease der vorangegangenen Versuche beibehalten.

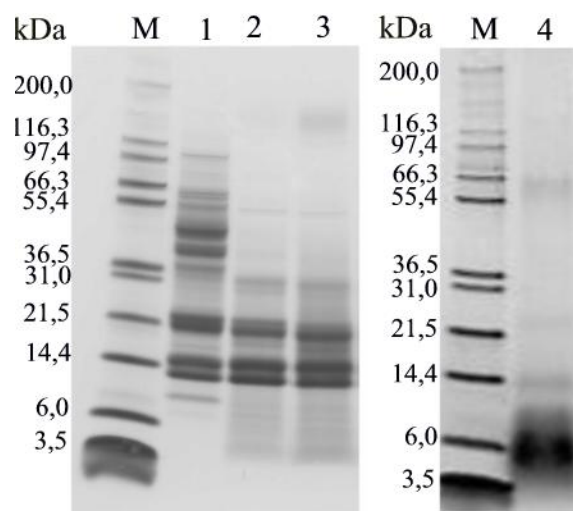


**Abbildung 3.19:** Vergleich der eingesetzten Kombinationen an Endo- und Exoproteasen bei pH 7,5 und einer konstanten Temperatur von 45 °C (A= Alcalase und Umimazyme, B= Alcalase und Amano P, C= Alcalase, Umimazyme und Amano P). a: BTM – Konzentration, b: Konzentration des Proteins im Überstand.

Anhand der Abbildung 3.19 kann man erkennen, dass die Kombination der beiden Exoproteasen einen höheren Hydrolysegrad der Proteine im Überstand zur Folge hatte. Die Ver-

wendung der einzelnen Proteasen hatte eine Senkung der Proteinkonzentration im Überstand von 25,4 auf ca. 20 % zur Folge (vgl. Abbildung 3.18 rechts). Die Verwendung von Alcalase führt zu einer Abnahme der Proteinkonzentration im Überstand von 35,1 % auf 25,4 %. Die Kombination von Alcalase mit einer der beiden Exoproteasen führt zu einer Abnahme von 35,1 % auf 21,3 %, während die Kombination aller drei Proteasen (Alcalase, Umimazyme und Amano P) sogar zu einer Abnahme auf 16,1 % führt.

Da die Proteinbestimmung nach Bradford [8] ein quantitativer Proteinnachweis ist, der erst ab einer Proteingröße von ca. 3 kDa greift und keinen Aufschluss über die verschiedenen Molekülgrößen gibt, wurde der Verlauf der enzymatischen Proteinhydrolyse anhand einer SDS-PAGE überprüft. Hierzu wurden analog zu den Konzentrationen der Ergebnisse aus Abbildung 3.19 für die SDS-PAGE höhere Proteinkonzentrationen verwendet um den Hydrolysegrad deutlicher erkennen zu können. Dementsprechend sind in Abbildung 3.20 auf Spur 2 (Autolyse unter Zugabe von Alcalase) die doppelte Menge der auf Spur 1 (Referenz, Autolyse ohne Proteasen) aufgetragenen Probe eingesetzt und auf Spur 3 (Autolyse unter Zugabe von Alcalase, Umimazyme, und Amano P) ist sogar die 3fache Menge der auf Spur 1 aufgetragenen Probe eingesetzt.



**Abbildung 3.20:** Vergleich der Proteinkonzentration im Überstand der Autolysen unter den verschiedenen Bedingungen auf einem SDS Gel (1= Autolyse, 2= Autolyse mit Alcalase (doppelte Probenmenge), 3= Autolyse mit Alcalase, Umimazyme, Amano P (dreifache Probenmenge), 4= Hefeextrakt 1:4 verdünnt, M= Marker).

Als Referenz für die enzymatische Proteinhydrolyse wurden einerseits die Autolyse ohne Zugabe von Proteasen (Spur 1) und andererseits das in dem Herstellungsprozess verwendete Trockenhefeextrakt. Hierzu wurde ein Teil Trockenhefeextrakt in drei Teilen Wasser aufgelöst.

Die Abbildung 3.20 bestätigt die Ergebnisse des Bradfordassays. Durch den Einsatz der Alcalase sinkt die maximale Fragmentgröße von ca. 100 kDa auf ca. 30 kDa. Der Einsatz der Exoproteasen hat zur Folge, dass die Intensität der hochmolekularen Proteinfragmente auf dem Gel abnehmen.

Die Abbildung 3.20 verdeutlicht jedoch auch, dass ein Verdau mit den verwendeten Proteasen nicht ausreichend ist, um eine zum Hefeextrakt vergleichbare Qualität zu erreichen (vgl. Spur 4).

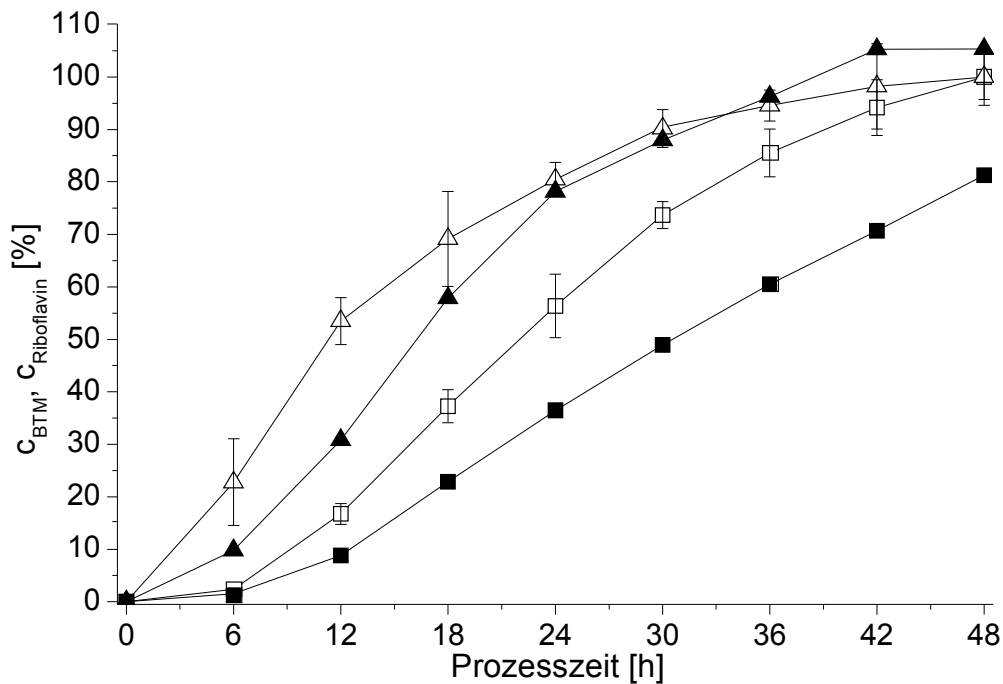
### **3.2.2.2 Fermentation mit *Bacillus* – Extrakt hergestellt bei pH 7,5**

In Fermentationen sollte nun überprüft werden, ob die durch Zugabe der Proteasen Alcalase, Umimazyme und Amano P erzeugten Extrakte im Vergleich zu dem Extrakt hergestellt durch Autolyse ohne Zugabe von Proteasen gesteigert werden konnte.

Hierzu wurde der Überstand der Autolyse wieder mittels Zentrifugation abgetrennt und einer Filtration unterzogen. Die Kohlenstoffbestimmung nach der Filtration liefert neben der SDS-PAGE (vgl. Abbildung 3.20) einen weiteren Hinweis auf eine verbesserte Proteinhydrolyse während der Autolyse. Im Vergleich zu der Autolyse unter Zugabe von Alcalase, nahm der Kohlenstoffgehalt des Extraktes im Bezug auf die Differenz der BTM (Anfang – Ende Autolyse) um durchschnittlich 28 % zu. Im Vergleich zu der Autolyse ohne Proteasen nimmt der Kohlenstoffgehalt um ca. 48,7 % zu. Dieser erhöhte Kohlenstoffgehalt deutet darauf hin, dass durch die Zugabe von Proteasen wesentlich mehr hochmolekulare Proteine hydrolysiert wurden und somit die Qualität des Extraktes gesteigert wurde.

Der Hefeextrakt wird in den folgenden Fermentationen analog zu den vorhergehenden Versuchen wieder 1:1 aufgrund der Kohlenstoffbilanz durch filtrierten Überstand aus der Autolyse unter Zugabe der Proteasen Alcalase, Umimazyme und Amano P ersetzt. Mit den durch Autolyse unter Zugabe der Proteasen Alcalase, Umimazyme und Amano P erzeugten Ex-

trakten wurde zum ersten Mal eine Ausbeute von über 86 % erreicht. Die durchschnittliche Ausbeute der Fermentationen mit dem oben genannten Extrakt betrug jedoch lediglich 78 %.



**Abbildung 3.21:** Vergleich von Fermentationen mit Hefeextrakt und *Bacillus* - Extrakten hergestellt mittels Autolyse unter Zugabe von Alcalase, Umimazyme und Amano P bei 45 °C und pH 7,5 (■ Riboflavin *Bacillus* - Extrakt, □ Riboflavin Hefeextrakt, ▲ BTM *Bacillus* - Extrakt, △ BTM Hefeextrakt).

Der Feed - Start war weiterhin um ca. 2,5 Stunden verzögert, allerdings kann man anhand des Verlaufs der BTM erkennen, dass die Biomasse auf diesem Extrakt wesentlich besser als auf den bisher hergestellten Extrakten anwächst.

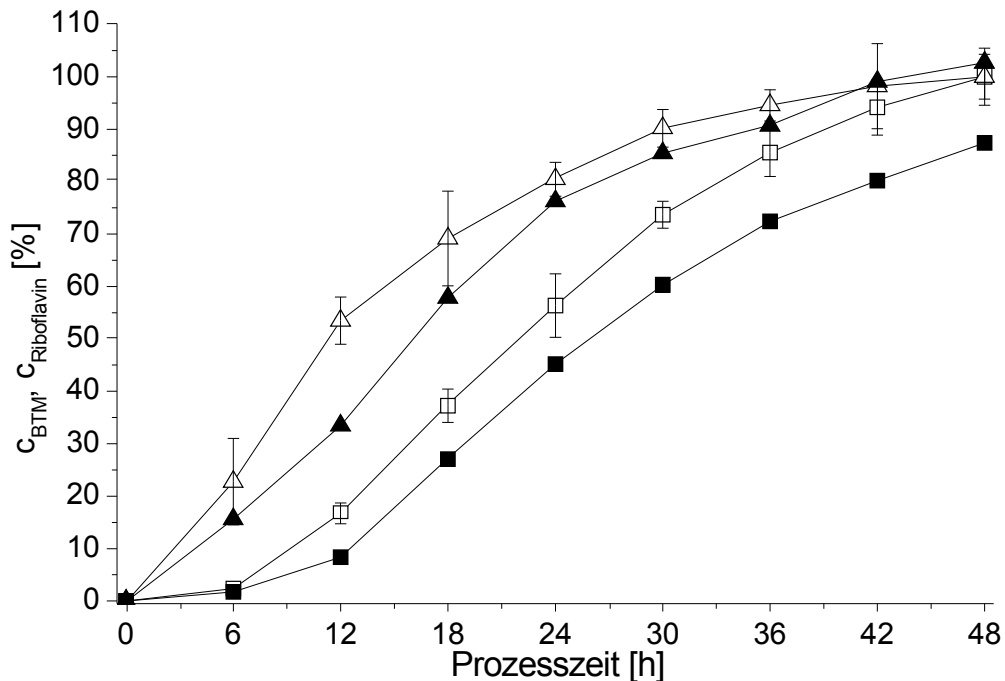
In Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass im Vergleich der Fermentationen mit Extrakten hergestellt durch Autolyse mit vorhergehender Aufreinigung der Biomasse bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als mit den Extrakten die durch direkte Autolyse der Fermentationsbrühe hergestellt wurden. Zum Abschluss der Autolyseversuche bei pH 7,5 unter Zugabe von Proteasen sollte nochmals untersucht werden, was für einen Einfluss die Proteasen bei der Autolyse von isolierter Biomasse auf die Fermentation hat.



Hierzu wurde die Biomasse nach der Fermentation mittels Zentrifugation abgetrennt und dreimal in Phosphatpuffer (Konzentration entsprach der *ortho*-Phosphatkonzentration am Ende der Fermentation, pH 7,0) gewaschen. Anschließend wurde die Autolyse induziert und die Proteasen Alcalase, Umimazyme und Amano P wie in den vorhergehenden Versuchen beschrieben zugegeben. Nach 24 Stunden konnten nur noch 10 % der anfänglichen BTM nachgewiesen werden. Dieses bedeutete, dass mit gewaschener Biomasse unter Zugabe von Proteasen eine vollständige Autolyse der Biomasse stattfand. Da jedoch in Kapitel 3.2 ein Zellwandanteil von ca. 17 % der Gesamtzellmasse von *B. subtilis* bestimmt werden konnte, kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass auch ein Teil der Zellwände abgebaut wurde und in Lösung ging. Diese Fragmente der Zellwände haben offenbar ein so geringes Molekulargewicht, dass das Zentrifugieren bei 1100g für 5 min. nicht ausreichend ist, um diese abzutrennen. Sommer [44] konnte ebenfalls beobachten, dass durch die Zugabe von Proteasen eine erhöhte Autolyse bei Hefe stattfindet und eine erhöhter Anteil an unlöslichen Peptiden und Zellmembranen in Lösung gehen. Des Weiteren konnte neben dem erhöhten Autolysegrad auch eine erhöhte Proteasenaktivität nachgewiesen werden. Im Überstand konnte nach 24 Stunden trotz des hohen Autolysegrads lediglich noch 6,8 % Protein im Überstand nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass gewaschene *Bacillus subtilis* - Kulturen wie bereits von Jolliffe *et al.* [Jolliffe *et al.*, 24] beschrieben besser lysieren als ungewaschene Kulturen. Des Weiteren scheinen die im Fermentationsmedium enthaltenen Stoffe nicht nur die Autolyse zu inhibieren, sondern auch die Aktivität der zugegebenen Proteasen.

Der wie oben beschrieben erhaltene Überstand der Autolyse wurde wieder filtriert und damit aufgrund der Kohlenstoffbilanz der Hefeextrakt im Fermentationsmedium ersetzt. Während der Fermentation konnte als erstes beobachtet werden, dass die Biomasse besser auf diesem Extrakt anwuchs, da der Feed - Start im Vergleich zur Standardfermentation mit Hefeextrakt nur noch um ca. 1,5 Stunden verzögert eintrat. Diese Beobachtung wurde auch durch den BTM – Verlauf bestätigt (vgl. Abbildung 3.22). In der hier vorgestellten Fermentation wurde im Bezug zu der Standardfermentation mit Hefeextrakt eine Riboflavin - Ausbeute von 96,8 % erhalten. Im Durchschnitt wurden mit den auf diese Weise hergestellten Extrakten Riboflavin – Ausbeuten von 94 % erzielt.



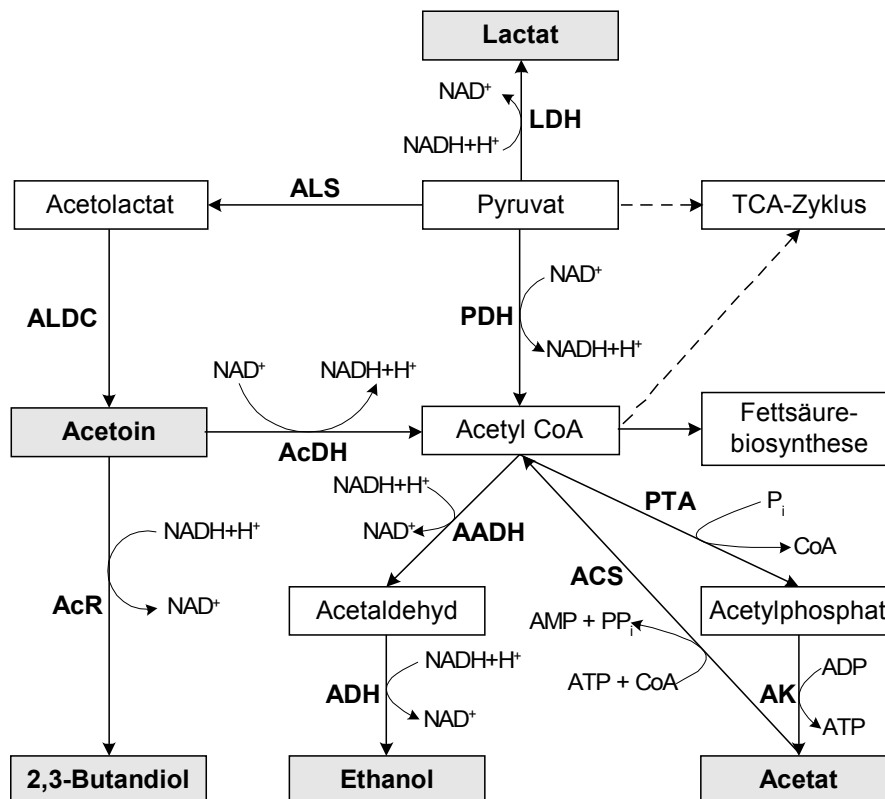
**Abbildung 3.22:** Vergleich einer Standardfermentation auf Hefeextrakt mit einer Fermentation deren Extrakt durch Autolyse aus gewaschener Biomasse unter Zugabe von Proteasen bei pH 7,5 hergestellt wird (■ Riboflavin *Bacillus* – Extrakt, □ Riboflavin Hefeextrakt, ▲ BTM *Bacillus* – Extrakt, △ BTM Hefeextrakt).

Somit konnte mit dieser Fermentation gezeigt werden, dass durch Verwendung von Proteasegemischen auf Basis von gewaschener Biomasse ein Extrakt hergestellt werden kann, der dem Hefeextrakt gleichwertig ist und in der Fermentation als vollwertiger Ersatz dafür eingesetzt werden kann.

Die Bewertung der hergestellten *Bacillus* – Extrakte erfolgte zwar anhand des Riboflavin – Ausbeutekoeffizienten ( $Y_{P/S}$ ), jedoch wurden, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, auch die während der Fermentation von *B. subtilis* gebildeten Nebenprodukte Acetoin, Acetat und 2,3-Butandiol bestimmt.

*B. subtilis* besitzt einen sogenannten „Überflussmetabolismus“. Liegt Glucose im Überschuss vor (Batch-Phase), bildet *B. subtilis* Acetoin, Acetat, 2,3-Butandiol, Ethanol und Lactat, das in das Medium ausgeschieden und in der stationären Phase wieder abgebaut wird (Abbildung

3.23). *B. subtilis* verwendet Acetoin als externe Kohlenstoffquelle, das in der stationären Phase über einen unbekanntem Abbauweg, jedoch nicht wie bisher angenommen über 2,3-Butandiol metabolisiert wird und als Energiequelle für die Sporulation dient [Tobisch *et al.*, 52; Stülke *et al.*, 51; Ramos *et al.*, 40; Huang *et al.*, 21].



**Abbildung 3.23:** Nebenproduktbildung bei *B. subtilis* (nach Ramos *et al.*, 40). Enzymabkürzungen: AADH, Acetaldehyd-Dehydrogenase; ACS, Acetyl-CoA-Synthetase; AcDH, Acetoin-Dehydrogenase; AcR, Acetoin-Reductase, ADH, Alkohol-Dehydrogenase; AK, Acetat-Kinase; ALDC, Acetolactat-Decarboxylase; ALS, Acetolactat-Synthase; LDH, Lactat-Dehydrogenase; PDH, Pyruvat-Dehydrogenase; PTA, Phosphotransacetylase.

In der anschließenden Fed-Batch-Phase ist Glucose der limitierende Faktor und die Nebenprodukte wie Acetoin, Acetat und 2,3 Butandiol werden langsam wieder abgebaut, so dass ab der 24 h kein Acetoin im Fermentationsmedium mehr nachgewiesen werden kann.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob anhand der bestimmten Nebenproduktkonzentrationen ein Hinweis für den verspäteten Feed – Start erhalten wird. Hierzu wurde als erstes nach der Sterilisation und noch bevor das Medium mit der Kultur angeimpft wurde, von den

Medien eine Probe auf die nachweisbaren Nebenprodukte analysiert. In allen Medien (Hefeextrakt, *Bacillus* – Extrakte) konnte vor dem Animpfen eine ähnliche Konzentration der Nebenprodukte festgestellt werden.

Acetoin ist bei der Standardfermentation mit Hefeextrakt das primär gebildete Nebenprodukt und die maximale Konzentration von  $6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  wird nach durchschnittlich 6 Stunden erreicht. Während die Acetoinkonzentration in der Fermentation mit Extrakt hergestellt aus gewaschener Biomasse ähnlich der der Standardfermentation verläuft, kann mit dem Extrakt hergestellt durch Induktion der Autolyse direkt nach Fermentationsende festgestellt werden, dass die maximale Acetoinkonzentration erst nach 12 Stunden erreicht wird, und diese in den meisten Fällen doppelt so hoch wie die der Standardfermentation mit Hefeextrakt ist. Ein ähnlicher Verlauf kann auch bei den 2,3-Butandiol – Werten festgestellt werden, jedoch mit dem Unterschied, dass die maximale Konzentration nach 12 Stunden erreicht wird. Acetat erreicht in allen Fällen nach 6 Stunden die maximale Konzentration, jedoch ist die Acetatkonzentration in der Fermentation auf Extrakt hergestellt durch die direkt nach der Fermentation induzierte Autolyse in den meisten Fällen bis zu drei Mal so hoch wie in der Standardfermentation.

Werden die Fakten BTM, Feed – Start und Nebenproduktbildung zusammengefasst, so drängt sich die Vermutung auf, dass im „*Bacillus*medium“ eine Limitierung vorliegt. Die erste nahe liegende Vermutung für das schlechtere Wachstum der Biomasse auf den hergestellten *Bacillus* – Extrakten ist eine vorliegende Phosphatlimitierung. Mittels Phosphatbestimmung (vgl. Kapitel 2.5.6) konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Limitierung an *ortho*-Phosphat nicht vorlag. Des Weiteren haben Untersuchungen zur Medienoptimierung der fermentativen Riboflavin –Herstellung [Bretz, 9] gezeigt, dass in dem industriellen Fermentationsmedium ein Überschuss an *ortho*-Phosphat vorhanden ist so dass – selbst wenn durch das hergestellte Extrakt weniger Phosphat zugeführt werden sollte – noch immer ausreichend Phosphat fürs Wachstum der Mikroorganismen zur Verfügung stehen sollte. Des Weiteren konnte anhand der BTM –Bestimmung festgestellt werden, dass ab der zwölften Prozessstunde ein höheres Wachstum der Mikroorganismen auf dem *Bacillus* – Extrakt im Vergleich zu der Fermentation mit Hefeextrakt nachweisbar war und somit auch deswegen eine Phosphatlimitierung ausgeschlossen werden konnte.

Die nächste Vermutung für das verminderte Wachstum der Biomasse wurde in einer Stick-

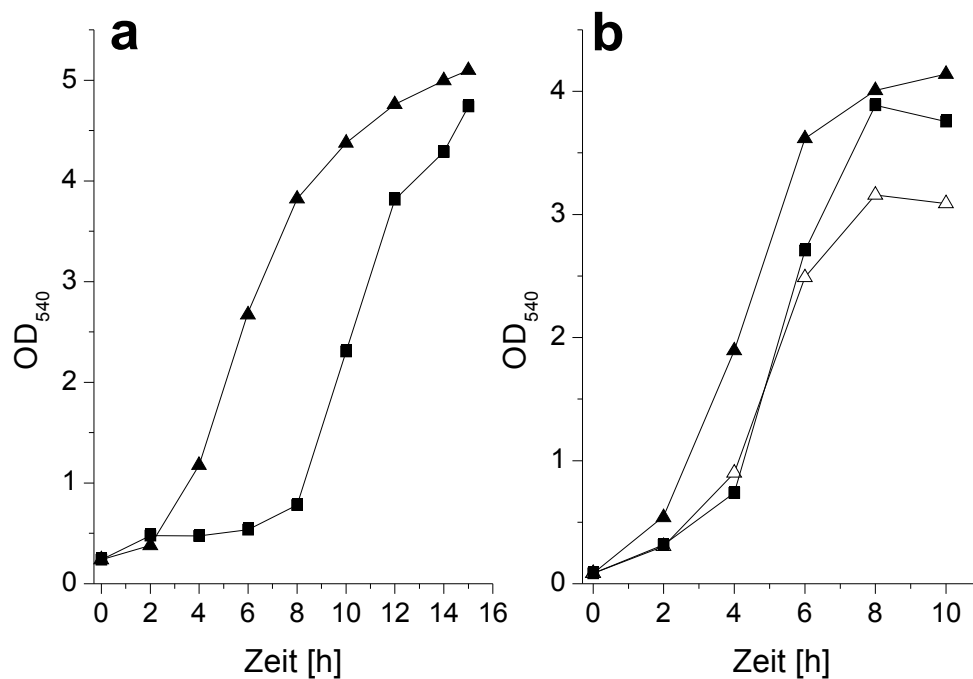
stofflimitierung angenommen. Da mit der Kohlenstoffbestimmung auch der Stickstoffgehalt bestimmt wurde, konnte festgestellt werden, dass das hergestellte Extrakt einen niedrigeren Stickstoffgehalt als das Hefeextrakt hatte. Somit wurde versucht, ob in der Fermentation bessere Ergebnisse erzielt werden, wenn das Medium nicht aufgrund der Kohlenstoffbilanz, sondern aufgrund der Stickstoffbilanz aufgestellt wurde. Der Fermentationsverlauf und die dabei durchgeführten Analysen haben deutlich gemacht, dass keine Stickstofflimitierung vorliegen kann, da im Vergleich mit den Fermentationen mit *Bacillus* – Extrakt, die aufgrund der Kohlenstoffbilanz durchgeführt wurden, identische Ergebnisse im Bezug auf Wachstum und Riboflavin erreicht wurden. Weiter gegen eine Stickstofflimitierung sprachen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Medienoptimierung der fermentativen Riboflavin – Herstellung [Bretz, 9]. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in dem Hefeextrakt – Standardmedium das zugegebene Ammoniumchlorid nicht notwendig ist. Selbst unter Zugabe des Ammoniumchlorids konnte kein besseres Wachstum der Mikroorganismen beobachtet werden.

Als nächstes wurde vermutet, dass die verlängerte lag – Phase der Mikroorganismen auf dem hergestellten *Bacillus* – Extrakt durch den Medienwechsel verursacht wurde. Am Anfang dieser Arbeit wurden alle Vorkulturen auf Hefeextrakt angezogen und anschließend in das mit *Bacillus* – Extrakt angesetzte Fermentationsmedium überführt. Bedingt durch das schlechte Wachstum der Biomasse wurde vermutet, dass sich die Zusammensetzung des *Bacillus* – Extraktes von der des Hefeextraktes unterscheidet und darin dass schlechte Wachstum der Biomasse begründet war. Aus diesem Grund wurden Wachstumsversuche der Vorkulturen auf *Bacillus* – Extrakt durchgeführt und mit dem Wachstum auf Hefeextrakt verglichen. Das Wachstum der ersten Vorkultur auf *Bacillus*- und Hefeextrakt wurde anhand der OD<sub>540</sub> verglichen.

Anhand der Abbildung 3.24a, kann man erkennen, dass die erste Vorkultur auf dem *Bacillus* – Extrakt langsamer als auf dem Hefeextrakt anwächst, jedoch am Ende eine vergleichbare OD<sub>540</sub> wie der Standardansatz mit Hefeextrakt erreicht. Somit kann gezeigt werden, dass schon die erste Vorkultur unter gleichen Bedingungen auf *Bacillus* – Extrakt im Vergleich zum Hefeextrakt schlechter anwächst.

In einem weiteren Wachstumsversuch sollte überprüft werden, ob die zweite Vorkultur auf *Bacillus* – Extrakt besser anwächst, wenn die erste Vorkultur schon auf diesem angezchtet wurde. Hierzu wurde jeweils ein Schüttelkolben mit Hefeextraktmedium mit den Vorkulturen

angezüchtet auf *Bacillus* – Extrakt und Hefeextrakt und ein dritter Schüttelkolben mit *Bacillus* –Extrakt mit einer Kultur die auf *Bacillus* – Extrakt angezüchtet wurde angeimpft.



**Abbildung 3.24:** a: Vergleich des Wachstums der ersten Vorkultur von *Bacillus subtilis* auf Hefe- (▲) bzw. *Bacillus* – Extrakt (■). b: Vergleich des Wachstums der zweiten Vorkultur auf Hefeextrakt (▲, 1 Vorkultur: Hefeextrakt) und auf *Bacillus* – Extrakt (■, 1 Vorkultur: *Bacillus* – Extrakt, △ 1 Vorkultur: Hefeextrakt).

Anhand dieses Versuches (vgl. Abbildung 3.24b) kann man erkennen, dass die verlängerte lag – Phase nicht durch den Medienwechsel von Hefeextrakt auf *Bacillus* – Extrakt hervorgerufen wird. Somit kann das verspätete Wachstum der Kulturen nicht auf den Medienwechsel zurückgeführt werden, sondern auf die Extraktqualität bzw. dessen Zusammensetzung.

Weitere Versuche zur näheren Untersuchung zum schlechteren Wachstum der Biomasse wurden durchgeführt, indem dem Medium sowohl Hefeextrakt als auch *Bacillus* – Extrakt zugeführt wurden. Hierbei wurde in der Fermentation nicht der gesamte Hefeextrakt durch das *Bacillus* – Extrakt ersetzt sondern nur 50 bzw. 75 % des Hefeextraktes. Die Ergebnisse dieser

Fermentation zeigten jedoch im Vergleich zu den Fermentationen durchgeführt unter Zugabe von reinem *Bacillus* – Extrakt keinen Unterschied im Wachstum der Mikroorganismen. Es kann auch keine erhöhte Riboflavin – Ausbeute festgestellt werden.

Nach all diesen Untersuchungen stellt sich die Frage, wieso sich der Feed – Start zwischen dem Extrakt hergestellt durch direkte Induktion der Autolyse nach der Fermentation und dem Extrakt hergestellt aus aufkonzentrierter und gewaschener Biomasse um durchschnittlich eine Stunde unterscheidet. Des weiteren stellt sich die Frage, weshalb mit dem Extrakt hergestellt unter Zugabe von Polyphosphat (vgl. Kapitel 3.2.1.3) ähnlich gute Ergebnisse in der Fermentation erzielt wurden wie mit den Extrakten, bei denen die Autolyse direkt nach Ende der Fermentation unter Zugabe von Proteasen induziert wurde.

Beim Vergleich der Versuchsdaten fällt ein Parameter auf, der sich grundlegenden unterscheidet. Bei den Autolyseversuchen unter Zugabe von Proteasen wird durchschnittlich 2,5-mal soviel Natronlauge zudosiert wie bei den Lyseversuchen mit Polyphosphat. Diese Beobachtung kann auch bei den Versuchen der Extrakterstellung mit gewaschener Biomasse gemacht werden. In den Lyseversuchen mit gewaschener Biomasse kann im Vergleich zu den Lyseversuchen mit „ungewaschener“ Biomasse ein 2,5-mal niedriger Natronlaugeverbrauch festgestellt werden. Des Weiteren kann in den Versuchen mit dem Biomass Monitor (vgl. Kapitel 3.5) festgestellt werden, dass das Fermentationsmedium der Extrakte hergestellt unter Zugabe von Proteasen (Autolyse direkt nach Fermentationsende induziert) eine erhöhte Leitfähigkeit (vgl. Abbildung 3.40) aufweisen. Diese erhöhte Leitfähigkeit ist auf eine erhöhte Ionenkonzentration im Medium zurückzuführen.

Hefeextrakte, die für die Fermentation hergestellt werden, haben einen Natriumgehalt von  $\leq 0,5$  Prozent [Sommer, 49]. Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Bacillus subtilis* Stamm das Wachstum einstellt, sobald die im Medium vorliegende Salzkonzentration höher als 2 % ist [Bretz, 9]. Somit erfolgt die Schlussfolgerung, dass bei der Herstellung der Extrakte, bei denen die Autolyse direkt nach Fermentationsende induziert wird, durch die pH-Regelung eine erhöhte Salzkonzentration in den Extrakt eingetragen wird. Diese Salzkonzentration ist jedoch nicht so hoch, um ein Wachstum der Biomasse vollständig zu unterdrücken, jedoch hoch genug, um das Wachstum der Biomasse während der Fermentation zu verzögern. Weiterführende Versuche bei denen während der Autolyse die Natronlauge durch 25 % Ammoniaklösung ersetzt wurde brachten kein besseres Wachstum der Mikroorganismen während der Fermentation.

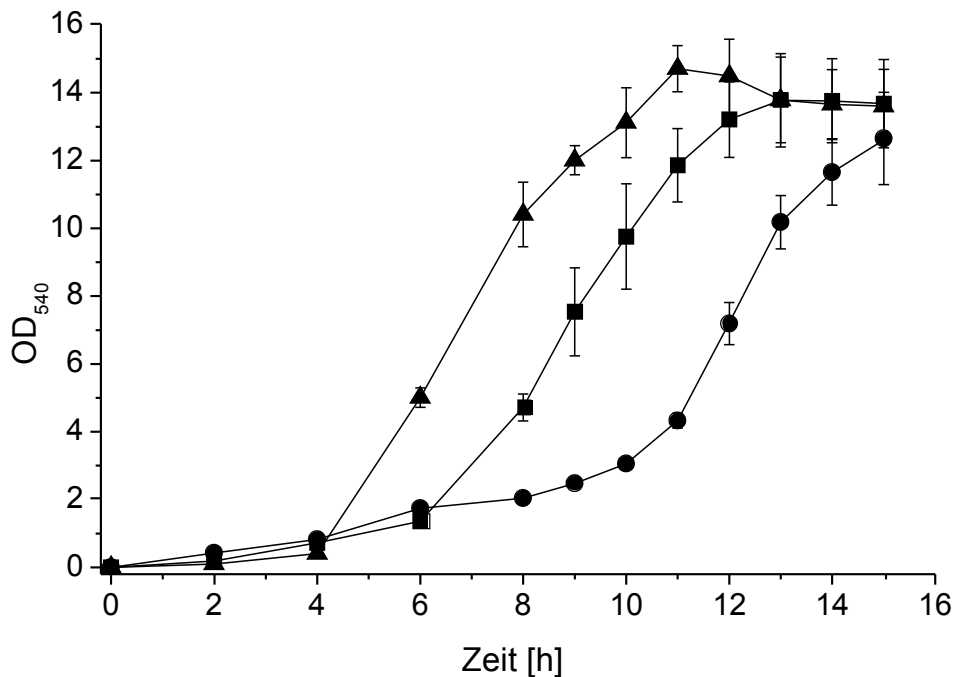
Ungeklärt ist jedoch immer noch, warum selbst die Extrakte hergestellt aus gewaschener Biomasse im Vergleich zum Hefeextrakt einen um 1 Stunde verzögerten Feed – Start aufweisen. Aufgrund der durchgeführten Analysen, konnte keine Stofflimitierung festgestellt werden. Dementsprechend wurde vermutet, dass die Wachstumsinhibierung durch Bestandteile des Extraktes wie z.B. Proteine verursacht werden könnte. Literaturrecherchen ergaben, dass bei *Bacillus subtilis* während des Eintritts in die stationäre Phase die Produktion von GSP (General Stress Protein) von 1% bei wachsenden Zellen auf 20% oder mehr in der stationären Phase ansteigt [Berhardt *et al.*, 6, Petersohn *et al.*, 39]. Dieser Wert kann unter Mangelzuständen noch höher ansteigen. González-Pastor *et al.* [17] berichtet, dass *Bacillus subtilis* – Zellen, die in den Sporulationszyklus eingetreten sind, einen sogenannten „Killing Factor“ produzieren und zusätzlich ein Signalprotein exportieren. Diese hemmen gemeinsam die Schwesterzellen bei der Sporulation und induzieren deren Lyse. Diese Literaturhinweise unterstreichen die Hypothese, dass das Wachstum der Zellen auf dem *Bacillus* – Extrakt durch Proteine inhibiert werden könnte.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde ein Wachstumsversuch im Schüttelkolben durchgeführt. Hierzu wurde nach einer Fermentation der Überstand durch Zentrifugation abgetrennt und filtriert (cut-off 10 kDa). Anschließend wurde ein Standardmedium angesetzt unter Zugabe des filtrierten Überstandes (0, 25 und 50 % V/V). Es wurde eine Vorkultur angesetzt und damit die vorbereiteten Schüttelkolben angeimpft.

Anhand der Abbildung 3.25 kann man erkennen, dass die Länge der lag – Phase abhängig von der Konzentration des filtrierten Fermentationsüberstandes ist. Je höher die Konzentration des Fermentationsüberstandes desto länger auch die lag – Phase.

Somit konnte bestätigt werden, dass das schlechte Anwachsen der Mikroorganismen zum Teil auf Proteine, die im Extrakt enthalten sind, zurückzuführen waren. Des Weiteren konnte der Rückschluss gezogen werden, dass diese Proteine kleiner als 10 kDa sind und weder von Polyphosphat ausgefällt werden noch von den in dieser Arbeit verwendeten Proteasen vollständig abgebaut werden können.





**Abbildung 3.25:** Wachstum von *B. subtilis* auf Standardmedium unter Zugabe von filtriertem Fermentationsüberstand in verschiedenen Konzentrationen (Standardansatz ▲, Standardansatz + 25 % Überstand ■, Standardansatz + 50 % Überstand ●).

Eine weitere offene Fragestellung dieser Arbeit war, ob der hier vorgestellte Prozess mehrmals in einem Kreislauf angewendet werden kann. Wird nach einer Extrakterstellung mit anschließender Fermentation wieder ein Extrakt hergestellt, kann mit diesem Extrakt abermals eine Fermentation im Anschluss durchgeführt werden und welche Ergebnisse werden damit erzielt? Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die oben gezeigte Wachstumsinhibition der Mikroorganismen in der Fermentation mit *Bacillus* – Extrakt in einer weiteren Fermentation mit Extrakt hergestellt im Kreislauf sich verstärkt. Akkumulieren eventuell andere Stoffe, so dass unter Umständen gar kein Kreislauf der Biomasse zustande kommen kann? Wie verläuft die Autolyse?

Hierzu wurde auch ein Versuch durchgeführt, bei dem die Biomasse dreimal im Kreis der Fermentation und Autolyse zugeführt wurde. Anhand der Autolyse als auch der Fermentation konnte kein Unterschied zu den sonstigen Autolysen oder Fermentationen mit *Bacillus* – Extrakt festgestellt werden. Die Autolysen wiesen dieselben Ergebnisse wie in den bisher ge-

zeigten Autolysen bei pH 7,5 und 45 °C auf. In den Fermentationen konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden. Die in diesen Fermentationen erhaltenen Ausbeuten waren ähnlich denen, die bis dahin erhalten wurden und der Wachstumsverlauf der Biomasse war in allen drei Fermentation sehr ähnlich.

Somit konnte gezeigt werden, dass die wachstumshemmenden GSP's nicht akkumulieren, sondern in jeder Fermentation aufs Neue abgebaut werden. Des Weiteren werden keine sonstigen Stoffe akkumuliert, die einen negativen Einfluss auf die Autolyse oder Fermentation haben könnten.

### 3.2.2.3 Autolyse mit Zugabe von Proteasen bei pH 6,5

Die meisten kommerziell erhältlichen Hefeextrakte werden bei sauren pH – Werten hergestellt. Da *B. subtilis* wie bereits in Kapitel 3.2.1.2 nachgewiesen wurde, ebenfalls in leicht saurem Milieu lysiert, sollte nun im Folgenden festgestellt werden, ob im Vergleich zu dem bei pH 7,5 hergestellten Extrakt bessere Ergebnisse in der Fermentation erzielt werden.

Hierzu wurde wie bereits im vorangegangenen Kapitel ein Screening durchgeführt, um wiederum die für diese Problematik am besten geeigneten Endo- und Exoproteasen zu finden.

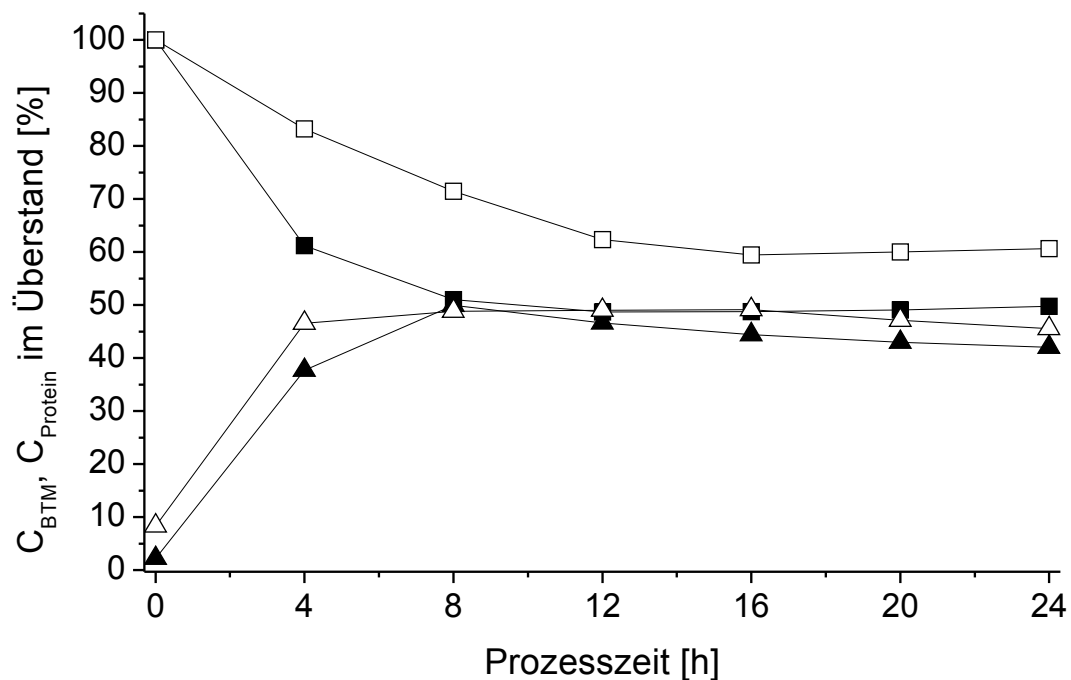
**Protease N „Amano“** (EC 3.4.24.28, Amano Enzymes, Nagoya, Japan) war in dieser Versuchsreihe die einzige Endoprotease, die ihr pH Optimum im sauren Milieu (pH 6,5) hatte. Protease N „Amano“ wird aus *Bacillus subtilis* gewonnen und hatte eine Aktivität von  $\geq 150000$  U/g<sup>5</sup>. Das Temperaturoptimum wird vom Hersteller mit 55 °C und das pH-Optimum zwischen pH 5,0 und 7,0 angegeben.

In Kapitel 3.2.1.2 konnte gezeigt werden, dass bei einer Temperatur von 55 °C kaum noch eine autolytische Aktivität stattfindet. Somit sollte Protease N nicht bei dem vom Hersteller angegebenen Temperaturoptimum eingesetzt werden. Um einen besseren Vergleich mit den Versuchen die bei pH 7,5 durchgeführt wurden, zu haben, wurde auch in dieser Versuchsreihe die Temperatur auf 45 °C eingestellt. Dieses hatte, wie auch bei pH 7,5 bereits beschrieben,

---

<sup>5</sup> Eine Einheit ist die Menge an Enzym die bei pH 8,0 in 60 Minuten ein Äquivalent von 100 µg Tyrosin an Aminosäuren hydrolysiert.

einen Rückgang der autolytischen Aktivität zur Folge, so dass nach 24 Stunden anstelle einer Restbiomasse von 44,5 noch 60,7 % vorhanden waren. Bei 45 °C entfaltet Protease N laut Hersteller nur noch 75 % der Aktivität, allerdings ist die Stabilität der Protease bei dieser Temperatur auch höher.



**Abbildung 3.26:** Vergleich der Autolyse ohne Protease und unter Zugabe von Protease N „Amano“. □ BTM Autolyse ohne Protease, ■ BTM Autolyse mit Protease, △ Protein im Überstand ohne Protease, ▲ Protein im Überstand mit Protease bei einer Temperatur von 45 °C.

Anhand der Abbildung 3.26 kann man erkennen, dass Protease N wie in den Versuchen mit Alcalase bei pH 7,5 bereits beobachtet einen positiven Einfluss auf die Autolyse hatte. Bedingt durch die Zugabe von Protease N konnte eine Abnahme der BTM von 60,7 auf 49,8 % festgestellt werden. Des Weiteren bewirkte die Zugabe von Protease N eine Abnahme des Proteingehaltes im Überstand um ca. drei auf 42 %. Die Aktivität der Protease ist jedoch tatsächlich wesentlich höher, da bedingt durch den höheren Autolysegrad auch wesentlich mehr Protein in den Überstand freigesetzt wird.

In dem hier beschriebenen Versuchen wurde die Protease in einem Verhältnis von 0,0075 An-

teilen Protease im Bezug auf die am Ende der Fermentation erreichte durchschnittliche BTM zugegeben. Durch eine Erhöhung der zugegebenen Menge noch durch eine Variation der Zugabezeitpunkte konnte wie bereits auch bei den Versuchen mit Alcalase bei pH 7,5 kein besseres Ergebnis erzielt werden

Für den möglichen weiteren Abbau des Proteins im Überstand wurden drei kommerziell erhältliche Proteasen gefunden, die bei den hier beschriebenen Bedingungen möglicherweise eingesetzt werden können.

**Peptidase R** (Amano Enzymes, Nagoya, Japan) ist ein Gemisch aus Endo- und Exoprotease mit dem Hauptanteil an Exoprotease gewonnen aus *Rhizopus oryzae*, das für den industriellen Gebrauch erhältlich ist. Das pH-Optimum der Peptidasefraktion liegt zwischen pH 6,0 und 8,0, das Temperaturoptimum zwischen 35 und 45 °C. Da die Endoprotease ihr Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert zwischen 4,0 - 5,0 hat, kann mit den vorgegebenen pH-Wert von 6,5 diese Aktivität nicht im vollen Umfang genutzt werden. Die vom Hersteller angegebene Aktivität von Peptidase R ist  $\geq 420$  U/g.

Das durchgeführte Screening zur Findung der optimalen Menge und der Zugabezeitpunkte ergab eine Menge von insgesamt 0,015 Anteilen Protease im Bezug auf die durchschnittliche Konzentration der Biomasse am Ende der Fermentation. Die Zeitpunkte der Zugabe wurde aus den bei pH 7,5 durchgeführten Versuchen übernommen, um ein besseren Vergleich der Versuche zu gewährleisten.

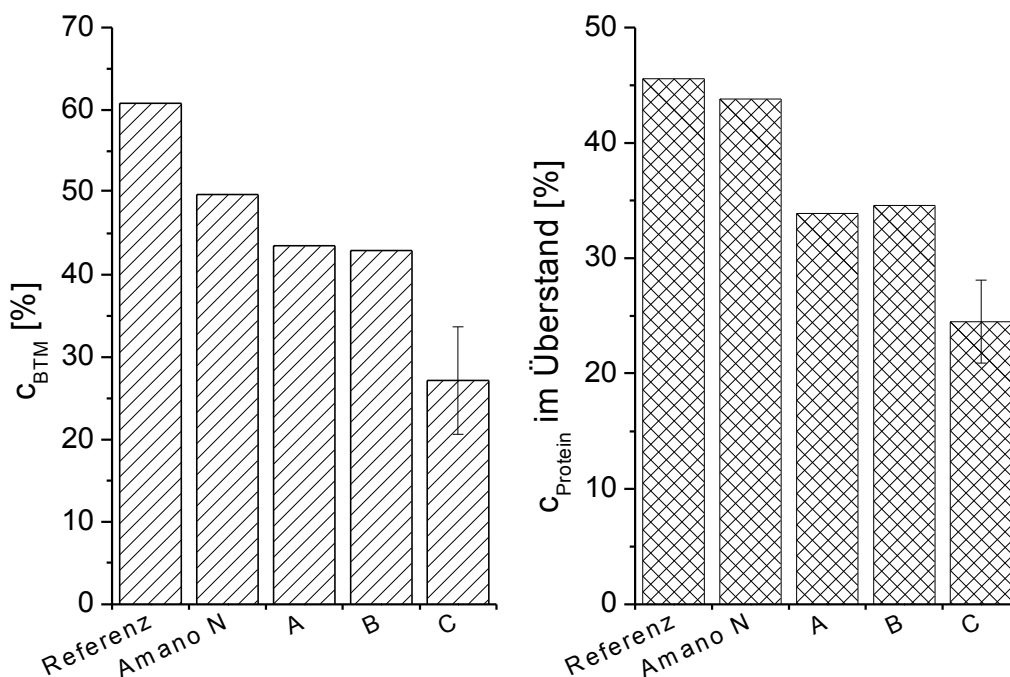
Im Gegensatz zu den Exoproteasen, die bei einem pH Wert von 7,5 verwendet wurden, hatte Peptidase R nicht nur einen positiven Einfluss auf die erreichte Proteinkonzentration im Überstand, sondern auch auf die gesamte Autolyse. Durch die Zugabe von Peptidase R nahm die BTM um 6 % ab. Die Proteinkonzentration im Überstand nahm um 3 % ab. Somit konnte nach 24 Stunden noch eine BTM Konzentration von 43,5 und eine Proteinkonzentration im Überstand von 32,9 % (vgl. Abbildung 3.27, Balken A) nachgewiesen werden.

**Promod 194P** (Biocatalysts, Pontypridd, England) ist ein Gemisch aus Endo- und Exoprotease mit dem Hauptanteil an Exoprotease gewonnen aus *Aspergillus oryzae*, die für den industriellen Gebrauch erhältlich ist. Das pH Optimum dieser Protease wird vom Hersteller im Bereich von 6,0 bis 9,0 und das Temperaturoptimum im Bereich von 40 – 55 °C ange-

geben. Der Hersteller empfiehlt für einen hohen Proteinhydrolysegrad eine Zugabe von 0,5 – 1 % bezogen auf den Gesamtproteingehalt. Für eine moderate Proteinhydrolyse wird eine Menge von 0,2 – 0,5 % angegeben.

Die Optimierungsversuche mit dieser Protease in Kombination mit Protease N „Amano“ ergaben eine optimale Proteinhydrolyse bei Einsatz von 3 % bezogen auf den durchschnittlichen Proteingehalt der Biomasse am Ende der Fermentation. Die Zeitpunkte der Zugabe blieben wie auch in den vorangegangenen Versuchen gleich.

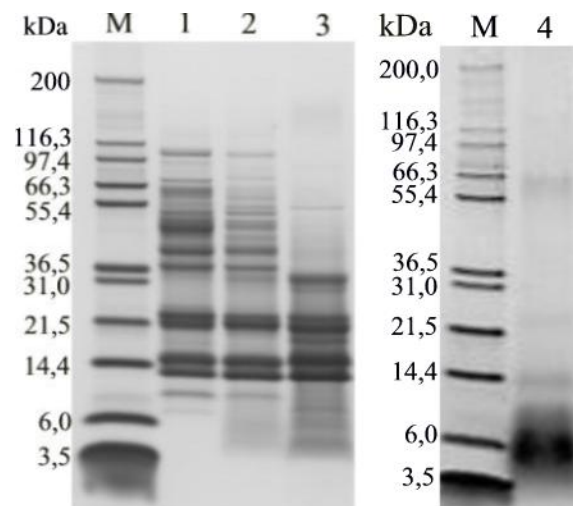
Wie bereits mit Peptidase R kann auch in dieser Versuchsreihe festgestellt werden, dass diese Protease nicht nur einen Einfluss auf die Proteinhydrolyse hat, sondern auch auf die Autolyse der Zellen. Bedingt durch Zugabe dieser Protease kann eine Abnahme der BTM-Konzentration um ca. 6 auf 43 % nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentration nimmt um ca. 9 auf 34 % ab (vgl. Abbildung 3.27, Balken B).



**Abbildung 3.27:** Vergleich der Autolyse bei pH 6,5 unter Zugabe verschiedener Proteasen. A= Amano N und Peptidase R, B= Amano N und Promod 194 P, C= Amano N, Peptidase R und Promod 194 P.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde wieder wie auch in den Versuchen bei pH 7,5 eine Kombination dieser beiden Proteasen und Protease N „Amano“ eingesetzt. Die Zugabezeiten und Mengen blieben gleich. Anhand der Ergebnisse, die in Abbildung 3.27 (Balken C) dargestellt sind, kann man erkennen, dass sowohl die BTM als auch die Proteinkonzentration im Überstand abnahm. Die BTM nahm im Vergleich zu den einzelnen Proteasen um ca. 9 % ab, so dass nur noch eine BTM Konzentration von 26,3 % nachgewiesen werden konnte. Somit wird im Bezug auf den Autolysegrad, derselbe Grad wie bei pH 7,5 erreicht.

Wie auch bei den Versuchen bei pH 7,5 wurde der Überstand für eine Fermentation abgetrennt, filtriert und der Kohlenstoffgehalt bestimmt. Der Vergleich der Kohlenstoffgehaltes dieses Extraktes mit dem Extrakt hergestellt bei pH 7,5 unter der Zugabe von Proteasen weist nach der Filtration einen um ca. 40 % niedrigeren Kohlenstoffgehalt auf. Dieses bedeutet, dass die Proteindegradation unter pH 6,5 mit den hier vorgestellten Proteasen nicht so effektiv zu sein scheint wie bei pH 7,5 und für eine Fermentation mehr Extrakt verwendet werden müsste.



**Abbildung 3.28:** Vergleich der Proteinkonzentration im Überstand nach Autolyse unter verschiedenen Bedingungen auf einem SDS Gel (1= Autolyse, 2= Autolyse mit Amano N, 3= Autolyse mit Amano N, Peptidase R, Promod 194 P (dreifache Probenmenge), 4= Hefeextrakt 1:4 verdünnt, M= Marker).

Wie auch im vorangegangenen Kapitel wurde auch in dieser Versuchsreihe der Proteinabbau auf einer SDS-PAGE überprüft. Hierzu wurden die Proben der Autolyse so aufgetragen, dass

in jedem Ansatz eine Proteinkonzentration von 10 mg/ ml erhalten wurde (vgl. Kap. 2.5.8.1). Dementsprechend ist in Abbildung 3.28 auf Spur 3 (Autolyse unter Zugabe von Amano N, Promod 194P und Peptidase R) die dreifache Menge der aufgetragenen Probe aufgetragen. Als weitere Referenz wurde der in der Produktion eingesetzte Hefeextrakt aufgetragen (Spur 4, Hefeextrakt, 1:4 verdünnt). Die Abbildung 3.28 bestätigt die Ergebnisse des Bradford-assays. Durch den Einsatz der Alcalase sinkt die maximale Fragmentgröße von ca. 100 kDa auf ca. 30 kDa. Der Einsatz der Exoproteasen hat zur Folge, dass die Intensität der Fragmente auf dem Gel abnehmen.

#### **3.2.2.4 Fermentation mit *Bacillus* – Extrakt hergestellt bei pH 6,5**

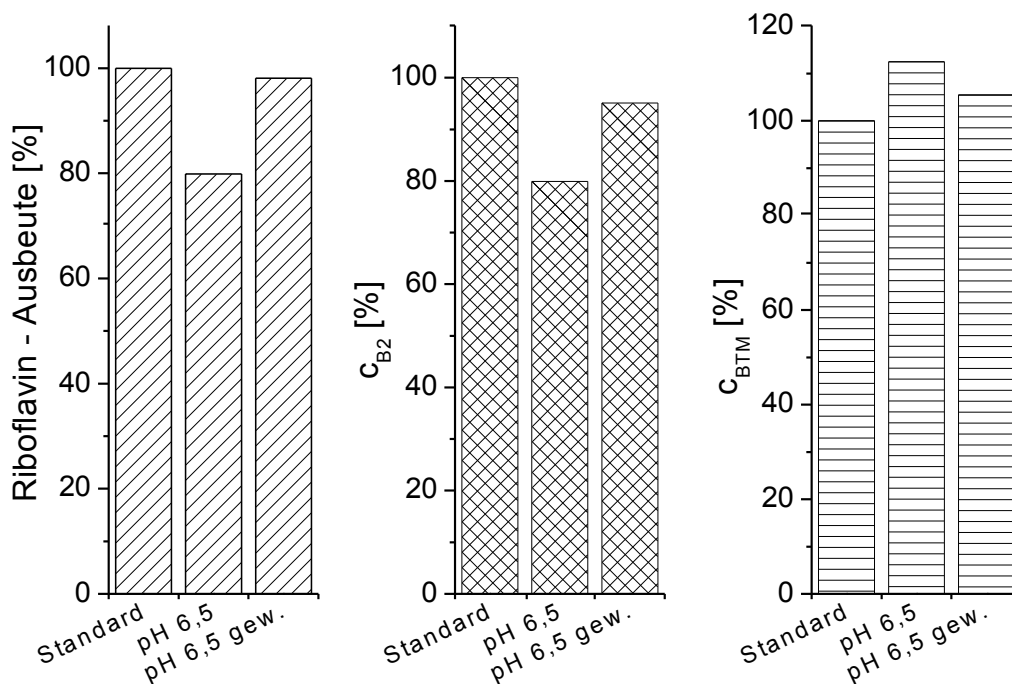
Die hergestellten Extrakte wurden wieder für Kultivierungen eingesetzt, um deren Qualität für die Fermentation zu überprüfen. Da die Fermentationsverläufe ähnlich denen in Kapitel 3.2.2.2 (S. 79) waren, sind in Abbildung 3.29 lediglich die erzielten Ergebnisse nach Fermentationsende im Vergleich dargestellt.

In der Fermentation mit Autolysat unter Zugabe von Proteasen bei pH 6,5 wurde eine Riboflavin – Ausbeute von knapp 80 % erzielt. Hierbei fiel wiederum auf, dass die Biomasse verzögert anwuchs und sich im Vergleich zu der Standardfermentation auf Hefeextrakt der Feed - Start wieder um 3 Stunden verzögert einsetzte. Des wurde beobachtet, dass das Wachstum der Biomasse erst nach 12 Stunden stärker und nach ca. 15 Stunden das des Standards auf Hefeextrakt überflügelt, so das am Ende der Fermentation eine höhere BTM - Konzentration als bei der Standardfermentation aufweist. Dementsprechend wurde wesentlich mehr Glucose für das Wachstum verbraucht und weniger zur Bildung von Riboflavin.

Wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 (S. 79) beschrieben, wurde auch diese Proteinkombination in einer Autolyse mit aufgereinigter und aufkonzentrierter Biomasse eingesetzt um zu prüfen ob damit bessere Ergebnisse als mit dem Extrakt hergestellt durch Autolyse der Fermentationsbrühe erzielt werden.

Analog zu den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.2.2 fiel erneut auf, dass eine wesentlich höhere Riboflavin – Ausbeute erreicht werden konnte. In der hier vorgestellten Fermentation wurde eine Riboflavin – Ausbeute von 98 % erreicht. Durchschnittlich wurden jedoch in diesen Fer-

mentationen lediglich eine Riboflavin – Ausbeute von 90 % im Vergleich zu der Standardfermentation auf Hefeextrakt erreicht. Der Feed – Start war im Vergleich zu der Standardfermentation durchschnittlich um 1 Stunde verzögert.



**Abbildung 3.29:** Vergleich der Standardfermentation mit Hefeextrakt mit Fermentationen mit *Bacillus* – Extrakt hergestellt bei pH 6,5 unter Zugabe von Proteasen.

Dies ist ein erneuter Beweis dafür, dass durch die Verwendung von Proteasengemischen auf Basis von gewaschener Biomasse ein Extrakt hergestellt werden kann, der dem Hefeextrakt gleichwertig ist und in der Fermentation als vollwertiger Ersatz dafür eingesetzt werden kann.



### 3.2.2.5 Autolyse mit Zugabe von Exoproteasen bei pH 8,0

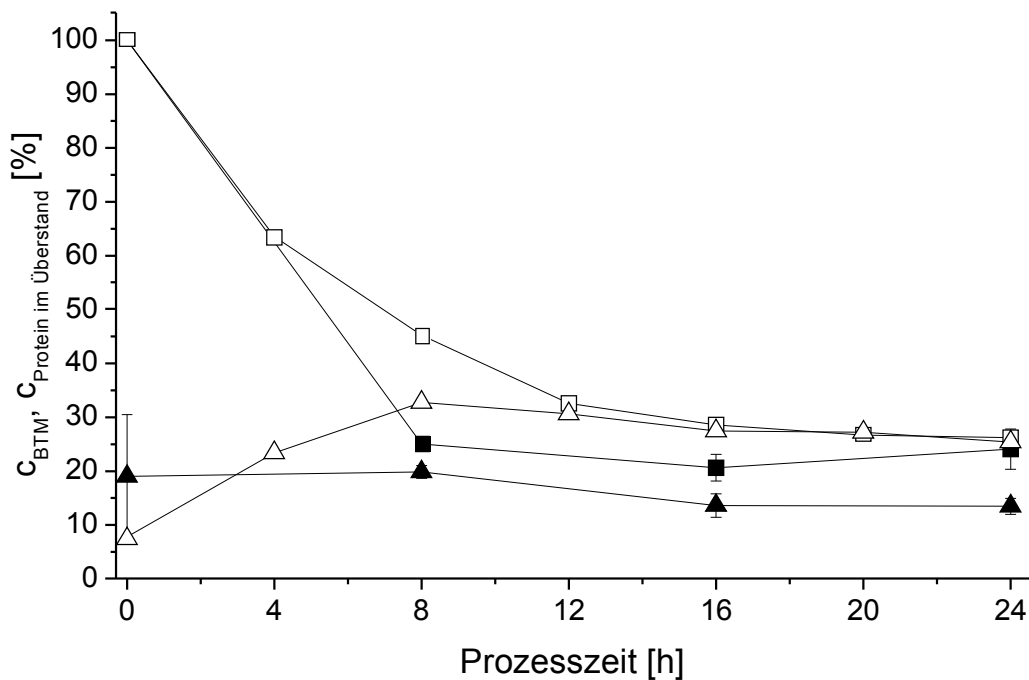
Eine weitere Exoprotease die verwendet werden könnte, ist die kommerziell erhältliche Fungal Protease (Aktivität 500000 HU/g<sup>6</sup>) von BIO-CAT INC (Troy, VA, USA). Diese Protease ist ein Gemisch aus Endo- und Exoprotease gewonnen aus *Aspergillus oryzae*. Die Endoproteasefraktion ist jedoch so gering, dass sie vernachlässigt werden kann. Da diese Protease allerdings bei 50°C und pH 8 ihr Optimum hat, musste ein neues Profil für die Lyse entworfen werden. Des Weiteren war zu berücksichtigen, dass durch den erhöhten pH-Wert mehr Natronlauge während der Autolyse zugegeben werden musste, was als Konsequenz einen erhöhten Salzeintrag im Extrakt hatte. Von der höheren Temperatur könnte zusätzlich ein negativer Einfluss auf das endogene Proteasensystem ausgehen und somit ein verringerter Hydrolysegrad der Proteine zur Folge haben.

Der höchste Autolysegrad konnte in den ersten acht Prozessstunden festgestellt werden (vgl. Abbildung 3.7, Abbildung 3.10). Durch die Zugabe der Endoprotease Alcalase wurden die freigesetzten Proteine in dieser Zeit größtenteils zu Oligopeptiden abgebaut. Somit könnte nach acht Stunden die Temperatur von 45 °C auf 50 °C und der pH von 7,5 auf 8,0 angehoben werden, um optimale Bedingungen für die Endoprotease Fungal Protease zu schaffen. Bedingt durch die allgemein begrenzte Stabilität der Proteasen bei hohen Temperaturen wurde die Proteasenmenge portioniert und zu verschiedenen Zeitpunkten dem Prozess zugegeben. Folgendes Prozessprofil wurde entworfen: von 0 bis 7 Stunden wurde ein pH-Wert von 7,5 und eine Temperatur von 45 °C eingestellt. Anschließend wurde die Temperatur auf 50 °C und der pH-Wert auf 8,0 angehoben. Die Exoprotease (Fungal Protease) wurde in zwei Portionen nach 8 und 16 Prozessstunden zugegeben.

Wie in Abbildung 3.30 dargestellt, sank durch Zugabe der Kombination von Alcalase und Fungal Protease die Proteinkonzentration im Überstand von 25,4 % auf 13,5 %. Fungal Protease hatte jedoch keinen Einfluss auf die BTM – Konzentration am Ende der Autolyse wie z.B. die Exoproteasen die bei einem pH von 6,5 (vgl. Abbildung 3.27, Seite 93) eingesetzt werden.

---

<sup>6</sup> Hämoglobin Einheiten. Eine HU ist unter den vorgegebenen Test Bedingungen die Aktivität die 0,0447 mg nicht proteinogenen Stickstoff in 30 Minuten abspaltet.

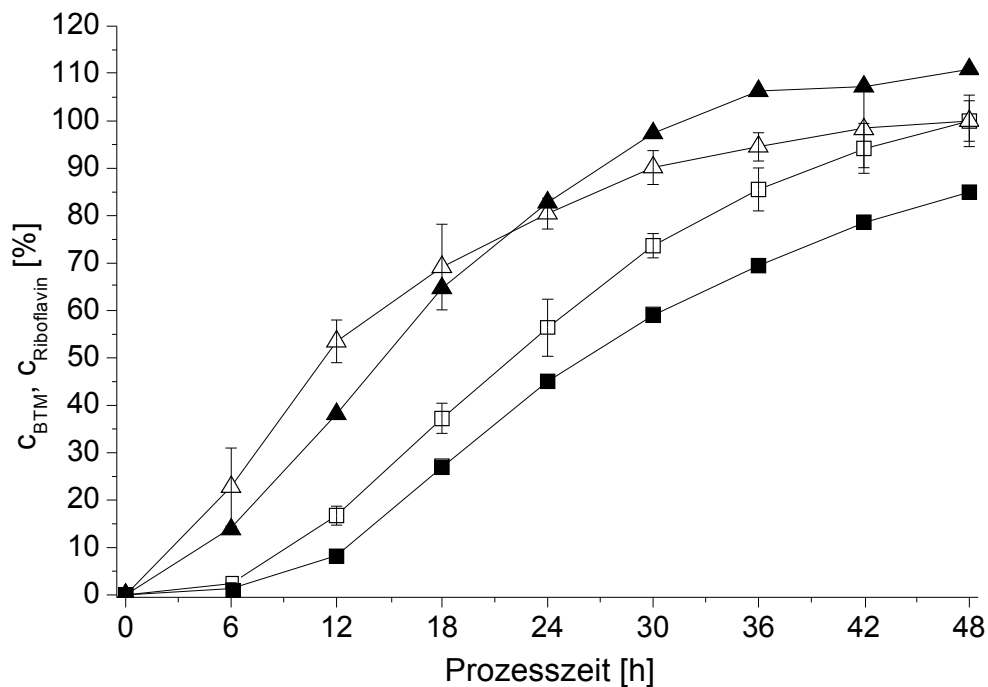


**Abbildung 3.30:** Vergleich Autolyse mit Alcalase ( $\square$  BTM,  $\triangle$  Proteinkonzentration im Überstand) und der Kombination aus Alcalase und Fungal Protease ( $\blacksquare$  BTM,  $\blacktriangle$  Proteinkonzentration im Überstand).

Der erhaltene Überstand wurde nach der Lyse mittels Zentrifugation abgetrennt und die verbliebenen hochmolekularen Proteine und Schwebstoffe mithilfe einer Crossflowfiltrationsanlage (cut off = 10 kDa) aus dem Überstand entfernt. Von dem so erhaltenen Überstand wurde mittels CHN – Elementaranalysator der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt bestimmt. Der Hefeextrakt wurde aufgrund der Kohlenstoffbilanz wiederum 1:1 durch *Bacillus* – Extrakt ersetzt.

Der Feed - Start bei der Kultivierung war um 3 Stunden verzögert. Anhand des BTM – Verlaufs kann wieder ein verzögertes Wachstum in den ersten 12 Fermentationstunden festgestellt werden. Anschließend kann eine höhere Zunahme der BTM als in der parallel dazu laufenden Standardfermentation festgestellt werden. Dieses verzögerte Wachstum der Biomasse führt zu einer verminderten Riboflavin - Produktion, da diese teilweise an das Wachstum der Mikroorganismen gekoppelt ist. Nach 12 Stunden verläuft die Riboflavin – Produktionsrate jedoch identisch zur Standardfermentation auf Hefeextrakt. Aufgrund der

schlechteren Riboflavin - Produktionsrate in den ersten 12 Stunden der Fermentation wird im Vergleich zur Standardfermentation eine um ca. 20 % niedrigere Ausbeute mit diesem Extrakt erhalten.

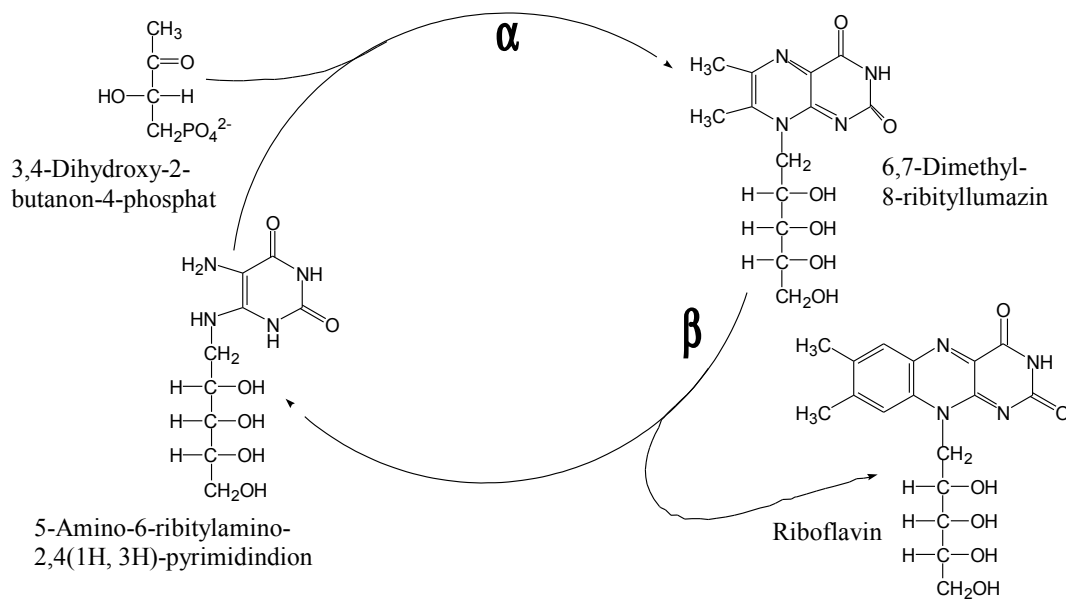


**Abbildung 3.31:** Vergleich von BTM- und Riboflavin -Verlauf einer durchschnittlichen Standardfermentation auf Hefeextrakt mit einer Fermentation mit *Bacillus* - Extrakt hergestellt mit Alcalase und Fungal Protease (■ Riboflavin *Bacillus* - Extrakt, □ Riboflavin Hefeextrakt, ▲ BTM *Bacillus* - Extrakt, △ BTM Hefeextrakt).

Somit kann festgestellt werden, dass der erhöhte Salzeintrag bedingt durch die Autolyse bei pH 8 keinen negativen Einfluss auf die Fermentation hatte. In der Fermentation konnte anhand der BTM festgestellt werden, dass in den ersten 12 Stunden die Mikroorganismen genau so schlecht anwachsen wie auch bei den Extrakten hergestellt bei pH 7,5 und 6,5. Die Riboflavin - Ausbeuten sind in etwa identisch zu denen der Fermentationen mit den bei pH 7,5 und 6,5 hergestellten Extrakten.

### 3.3 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin

6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (DMRL) wurde erstmals von Masuda [Masuda T., 32, 33] in Studien mit flavogenen Pilzen entdeckt. Das grüne fluoreszierende Material, als G Komponente benannt, konnte vom Enzym Riboflavin - Synthase in Riboflavin umgewandelt werden. Das Enzym katalysiert eine ungewöhnliche Dismutation, zwei Molekülen DMRL werden zu je einem Molekül Riboflavin und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H, 3H)-pyrimidindion umgesetzt (vgl. Abbildung 3.32). Das entstandene 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H, 3H)-pyrimidindion seinerseits wird durch eine Kondensation mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat wieder in DMRL umgesetzt [Bacher *et al.*, 4, 5].



**Abbildung 3.32:** Die Synthese von Riboflavin aus 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion und 3,4-dihydroxy-2-butanon-4-phosphat [nach Schott *et al.*, 44]

*Bacillus subtilis* hat zwei verschiedene Riboflavin - Synthesen. Es gibt einerseits das so genannte „leichte Enzym“ bestehend aus einem  $\alpha$  Trimer ( $\alpha_3$ ), das nur die Reaktion vom DMRL zum Riboflavin durchführen kann und andererseits das so genannte „schwere Enzym“, das sowohl die Synthese von DMRL als auch die von Riboflavin durchführen kann [Schott *et al.*, 44].

Während der Autolyse konnte beobachtet werden, dass das Volumen bedingt durch die pH-Regulierung um durchschnittlich 4 % des Ursprungsvolumens zunimmt. Trotz dieser Verdünnung konnte während der Autolyse eine Zunahme der Riboflavin – Konzentration nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte nach 8 Stunden im Überstand kein DMRL nachgewiesen werden.

Als erstes sollte untersucht werden, ob dieses Phänomen auch im industriellen Produktionsprozess auftrat. Hierzu wurden die Analysendaten von sieben durchschnittlichen Produktionsfermentationen herangezogen. Es wurde der Riboflavin- und DMRL- Gehalt am Ende der Fermentation und beim Zulauf Dekanter (vgl. Abbildung 1.2) untersucht. Diese Analysen zeigten, dass die DMRL – Konzentration lediglich proportional zur Verdünnung abnahm, aber immer noch nachweisbar blieb. Des Weiteren konnte keine Zunahme der Riboflavin – Konzentration festgestellt werden, da diese ebenfalls proportional zum Verdünnungsgrad abnahm. In der Produktion konnte also weder eine Zunahme der Riboflavin- noch eine Abnahme der DMRL – Konzentration nachgewiesen werden. Daher wurde vermutet, dass die Abnahme der DMRL- und die Zunahme der Riboflavin – Konzentration bei der Autolyse mit dieser im Zusammenhang stand und führte zu folgenden Hypothesen:

- Die Zunahme der Riboflavin – Konzentration erfolgt durch die Freisetzung von intrazellulärem Riboflavin und DMRL wird abgebaut.
- DMRL wird durch die freigesetzte Riboflavin – Synthase in Riboflavin umgesetzt.

Die Überprüfung der ersten Vermutung erfolgte anhand von Biomasse, die direkt nach der Fermentation isoliert wurde. Hierfür wurden 10 Liter Fermentationsbrühe nach Fermentationsende entnommen, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Biomasse aus dem Pellet geerntet. Die so erhaltene Biomasse wurde viermal mit 50 mM Natrium-Kalium-Phosphatpuffer gewaschen um auszuschließen, dass noch extrazelluläres Riboflavin an der isolierten Biomasse vorhanden war. Anschließend wurde die erhaltene Biomasse mit dem Hochdruckhomogenisator in drei Durchläufen bei 1900 bar aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer mithilfe einer Zentrifuge (10 min, 4235g) abgetrennt. Während jedes Arbeitsschritts wurde jeweils eine Probe genommen und auf Riboflavin- und DMRL - Gehalt hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Anhand der bestimmten Biotrockenmassenkonzentration und der in Tabelle 3.1 aufgeführten

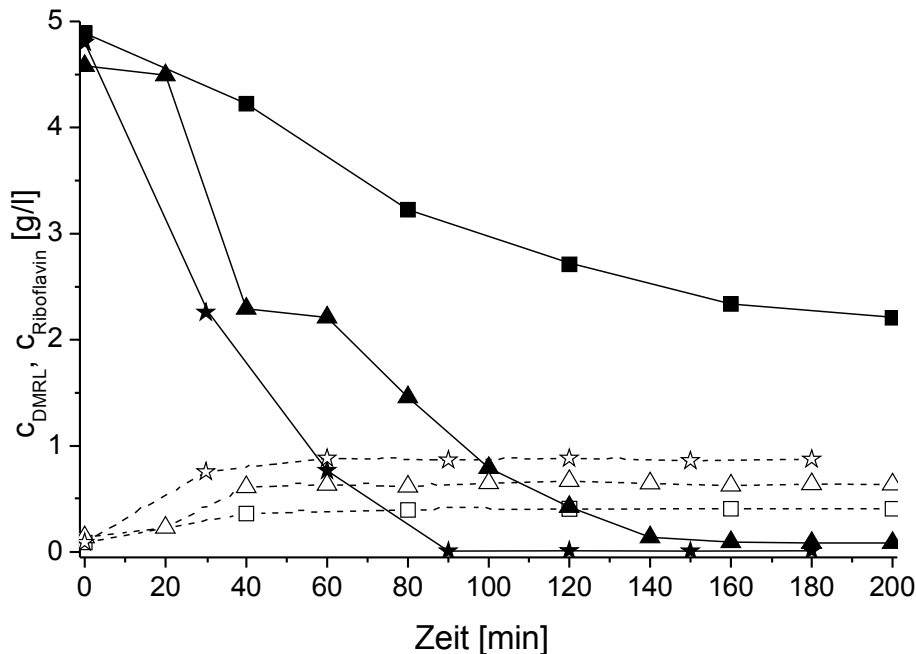
Werte konnte eine Steigerung der Riboflavin – Konzentration von 0,035 %. Während der Autolyse konnte jedoch eine Steigerung der Riboflavin – Konzentration von bis zu 6 % (bezogen auf die Konzentration zu Beginn der Autolyse) nachgewiesen werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Steigerung Riboflavin – Konzentration durch freigesetztes intrazelluläres Riboflavin zurückzuführen ist.

**Tabelle 3.1:** Riboflavin- und DMRL-Konzentration der Biomasse bzw. Überstand während der einzelnen Arbeitsschritte.

	Biomasse Gewaschen	1x Homogenisiert	3x Homogenisiert
Riboflavin Überstand [%]	0,008	-	-
Riboflavin Gesamt [%]	0,01	0,015	0,017
DMRL Gesamt [%]	0,12	0,087	0,089

Um die zweite Hypothese, dass die Zunahme der Riboflavin – Konzentration durch die Umsetzung von DMRL zu Riboflavin erfolgt, zu bestätigen, wurde das Homogenisat mit Phosphatpuffer (pH 5) auf eine Proteinkonzentration von 5 g/l (Bradford) verdünnt und in drei Schüttelkolben gegeben. Anschließend wurde der pH Wert in den Schüttelkolben jeweils auf einen pH-Wert von 6, 7 bzw. 8 eingestellt, so dass das Endvolumen in jedem Schüttelkolben 50 ml betrug. Anschließend wurde isoliertes pulverförmiges DMRL zugegeben, so dass eine DMRL – Konzentration von 5 g/l vorlag. Die Schüttelkolben wurden bei 45 °C und 120 Upm im Schüttler inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden den Schüttelkolben Proben entnommen und der DMRL- und Riboflavin – Gehalt bestimmt. Nach drei Stunden wurde der Versuch abgebrochen.

Anhand von Abbildung 3.33 kann man erkennen, dass das zugegebene DMRL von dem Rohextrakt zu Riboflavin umgesetzt wird. Die in Riboflavin umgesetzte DMRL Menge ist abhängig von dem eingestellten pH-Wert. Im leicht basischen Milieu (pH 8) ist die Umsatzrate sowie die umgesetzte Menge höher als im leicht sauren (pH 6) oder neutralen Milieu.



**Abbildung 3.33:** Vergleich des Umsatzes von DMRL zu Riboflavin bei verschiedenen pH-Werten und einer Temperatur von 45 °C (pH 6: □ Riboflavin, ■ DMRL; pH 7: △ Riboflavin, ▲ DMRL; pH 8: ☆ Riboflavin, ★ DMRL).

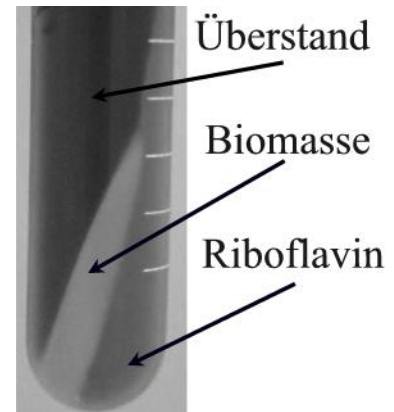
Anhand dieses Versuches konnte also gezeigt werden, dass die Umsetzung von DMRL zu Riboflavin abhängig vom eingestellten pH-Wert ist. Da im industriellen Produktionsprozess ein pH Wert von 5 eingestellt wird, kann selbst, wenn eine Autolyse stattfinden würde, daher kein DMRL zu Riboflavin umgesetzt werden. Des Weiteren kann aus Abbildung 3.33 ersehen werden, dass eine Umsetzung von DMRL zu Riboflavin nicht stöchiometrisch (2:1) erfolgt. Nebenprodukte dieser Umsetzung konnten nicht nachgewiesen werden.

### 3.4 Einfluss der Autolyse auf das Riboflavin

Riboflavin wird von *Bacillus subtilis* bei der fermentativen Riboflavin – Herstellung ins Medium ausgeschieden wo es aufgrund seiner geringen Löslichkeit auskristallisiert. In Kapitel 3.2 wurde bereits beschrieben, dass durch die Autolyse DNA und Proteine freigesetzt werden. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die unter den verschiedenen Be-

dingungen geführten Autolysen einen Einfluss auf den Protein- und DNA-Gehalt in den Riboflavinkristallen hat.

Als Ausgangspunkt dieser Untersuchung wurde der Protein und DNA-Gehalt der Riboflavinkristalle am Ende der Standardfermentation gewählt. Als weitere Referenzprobe wurden Riboflavinkristalle aus dem aktuellen Produktionsprozess verwendet, die nach der Fermentation die Pasteurisierung durchlaufen haben (vgl. Abbildung 1.2). Somit konnte überprüft werden, ob die Autolyse die Pasteurisierung des aktuellen Produktionsprozesses aufgrund der Überlegungen aus Kapitel 3.2 ersetzen kann, ohne dass die weitere Produktaufarbeitung geändert werden müsste (vgl. Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.34:** Zusammensetzung der Probe nach der Zentrifugation

Um das Riboflavin nach der Autolyse und am Fermentationsende zu isolieren, wurden die Proben fünf Minuten bei 4250g abzentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen, die Biomasse mit einem Spatel großzügig entfernt und von dem Riboflavin, das sich darunter befand, eine Probe entnommen (vgl. Abbildung 3.34). Von dem so geernteten Riboflavin wurden ca. 10 ml Volumen in ein 50 ml Falcontube gegeben und mit VE-Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Das Riboflavin wurde resuspendiert und anschließend bei 11000g 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die restliche Biomasse wieder großzügig mit dem Spatel entfernt und das Riboflavin im Trockenschrank (90 °C, 24h) getrocknet. Sollte noch Biomasse in dem Riboflavin vorhanden sein, so wäre diese nach dem Trocknen durch die Braunfärbung sichtbar geworden. Das trockene Riboflavin wurde im Mörser zerkleinert und auf Protein- und DNA-Gehalt überprüft.

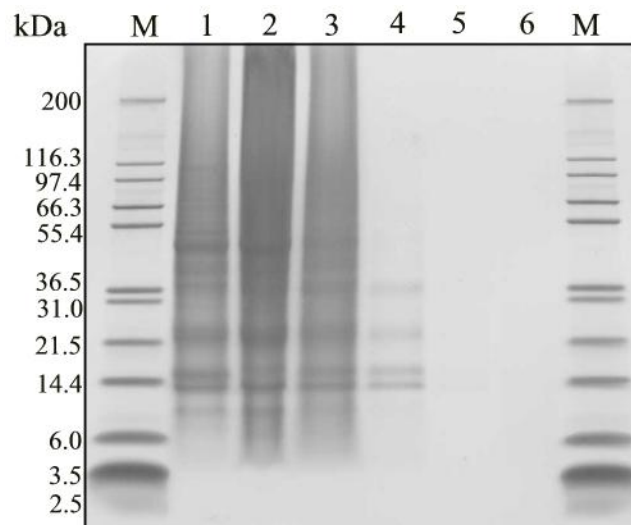
### 3.4.1 Proteingehalt

Der Proteingehalt der isolierten Proben aus Kapitel 3.4 wurde mittels SDS-PAGE überprüft und mit Proben aus dem industriellen Herstellungsprozess verglichen (vgl. Kap. 3.4).

Anhand von Abbildung 3.35 kann man erkennen, dass die höchste Proteinkonzentration in



den Riboflavinkristallen nach der Pasteurisierung nachgewiesen werden kann. Die Autolyse selber hat keinen nachweisbaren Einfluss auf den Proteingehalt der Riboflavinkristalle, da die Intensität in der dritten Spur des Gels ähnlich der ersten Spur ist. Werden während der Autolyse Proteasen zugesetzt, so nimmt der Proteingehalt in den Riboflavinkristallen bis unter die Nachweisgrenze dieser Methode ab.



**Abbildung 3.35:** Einfluss der Autolyse auf das Produkt Riboflavin. Spur M (Marker, Mark 12, Invitrogen); Proben: Spur 1: Ende Standardfermentation, Spur 2: Pasteurisierung (vgl. Abbildung 3.4a), Spur 3: Autolyse pH 7,5, Spur 4: Autolyse pH 7,5 mit 75 % der optimalen Proteasenkombination, Spur 5: Autolyse pH 7,5 mit der optimalen Proteasenkombination, Spur 6: Autolyse pH 6,5 mit der optimalen Proteasenkombination.

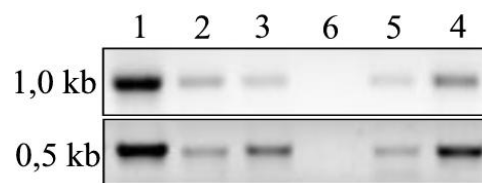
Daraus kann gefolgert werden, dass die zugesetzten Proteasen nicht nur Proteine im Überstand, sondern auch die in den Riboflavinkristallen inkorporierten Proteine abbauen. Der Abbau der in den Riboflavinkristallen inkorporierten Proteine kann durch die Zugabe von Proteasen bis unter die Nachweisgrenze der hier angewandten Methode erfolgen (vgl. Abbildung 3.35 Spur 5 und 6).

Somit kann gezeigt werden, dass durch die Autolyse unter Zugabe von Proteasen einen positiven Einfluss auf den Proteingehalt des Produktes Riboflavin hat, da hierbei ein Großteil des Proteins abgebaut wird.

### 3.4.2 DNA-Gehalt

Nachdem in Kapitel 3.4.1 gezeigt werden konnte, dass die Autolyse keinen Einfluss auf die in den Riboflavinkristallen inkorporierten Proteine hat, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der DNA-Gehalt in den Riboflavinkristallen durch die Autolyse beeinflusst wird.

Der DNA-Gehalt in den Riboflavinkristallen wurde mittels PCR bestimmt. Als erstes wurde eine PCR durchgeführt die ein 1000 bp Fragment der *rib-cat* Region amplifizierte.



**Abbildung 3.36:** DNA-Gehalt der verschiedenen Proben. Die Bezeichnung der Spuren entspricht denen aus Abbildung 3.35 (Spur 1: Ende Standardfermentation, Spur 2: Pasteurisierung (vgl. Abbildung 3.4a), Spur 3: Autolyse pH 7,5, Spur 4: Autolyse pH 7,5 mit 75 % der optimalen Proteasenkombination, Spur 5: Autolyse pH 7,5 mit der optimalen Proteasenkombination, Spur 6: Autolyse pH 6,5 mit der optimalen Proteasenkombination.)

Anhand der Abbildung 3.36 kann man erkennen, dass nach der Fermentation der höchste DNA-Gehalt in den Riboflavinkristallen nachgewiesen werden kann, in den restlichen Proben ist weniger Riboflavin enthalten. Auf Spur 4 (Autolyse pH 7,5, 75 % der optimalen Proteasenkombination) kann jedoch mehr DNA als in Spur 2 nachgewiesen werden. Bei der Spur 2 handelt es sich um die Referenz, also dem Riboflavin nach der Pasteurisierung. Bei allen anderen Proben kann gleichviel oder weniger DNA in den Riboflavinkristallen als in der Referenz nachgewiesen werden. Um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen wurde eine zweite PCR, die wesentlich sensitiver als die erste ist, durchgeführt. In dieser PCR wird nur ein 550 bp großes Fragment amplifiziert. Diese PCR bestätigt als erstes die Ergebnisse der ersten PCR im Bezug auf den DNA-Gehalt der Spur 4 (Autolyse pH 7,5, 75 % der optimalen Proteasenkombination). Des Weiteren kann man anhand der Ergebnisse dieser PCR erkennen, dass durch die Autolyse ohne Zugabe von Proteasen (Spur 3) der DNA-Gehalt höher als bei der Referenz (Spur 2, Produktion, Pasteurisierung, vgl. Abbildung 3.4, Seite 53) ist. Die Autolyse bei pH 7,5 unter Zugabe der optimalen Proteasemenge (Spur 5) zeigt einen ähnlichen DNA-Gehalt wie die Referenz. Wird eine Autolyse bei pH 6,5 unter Zugabe von

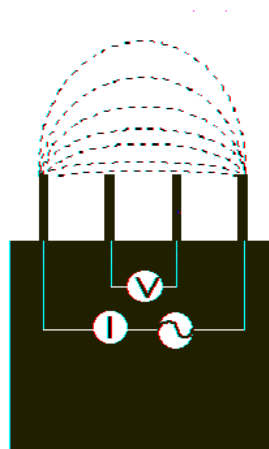
Proteasen (Spur 6) durchgeführt kann selbst mit dieser sensitiven PCR keine DNA in den Riboflavinkristallen nachgewiesen werden.

Anhand der SDS-PAGE und der PCR kann somit nachgewiesen werden, dass unter Verwendung einer Autolyse nicht nur ein Extrakt für die Fermentation hergestellt werden, sondern auch die Qualität des Produktes Riboflavin im Bezug auf Protein- und DNA-Gehalt gesteigert werden kann. Somit kann unter Umständen sogar der Prozess kostengünstiger gestaltet werden, da die Produktaufreinigung vereinfacht werden kann, was zur Folge hätte, dass weniger Energie und Rohstoffe benötigt würden. Des Weiteren sind auch die Verluste während der Produktaufreinigung wesentlich geringer.

### **3.5 Online Prozesskontrolle mittels Biomass Monitor**

Die Kosten eines Ausfalls einer industriellen Fermentation sind sehr hoch. Aus diesem Grund ist das Bestreben der Industrie hoch, mögliche Probleme rechtzeitig zu erkennen, den Prozess abubrechen und so Kosten einzusparen. Eine Möglichkeit, Ausfälle rechtzeitig zu erkennen, bieten so genannte „Online - Analyser“. Diese Analysengeräte überprüfen in vorprogrammierten Abständen vorgegebene Parameter wie z.B. Produkt- oder Biomassekonzentration wesentlich schneller als das mit so genannter „Offline - Analytik“ möglich ist und lassen so unter bereits Umständen einen Ausfall frühzeitig erkennen.

Ein dafür kommerziell angebotenes Gerät ist auch der Biomass Monitor von ABER Instruments Ltd. (Aberyswyth, Großbritannien). Das Messprinzip des Biomass Monitor beruht auf einer Messung der dielektrischen Eigenschaften von lebenden Zellen. Die zwei äußeren Elektroden der Sonde erzeugen ein hochfrequentes elektrisches Feld. Die zwei inneren Elektroden messen die Spannung (vgl. Abbildung 3.37). Wird diese Sonde in eine ionische Lösung gegeben, wandern die einzelnen Ionen zu den entgegengesetzten elektrischen Polen der Sonde. Die Konzentration der Ionen in der Lösung, ihre Ladung und ihre Beweglichkeit im Medium tragen alle zu der Leitfähigkeit (gemessen in mS) der Lösung bei.



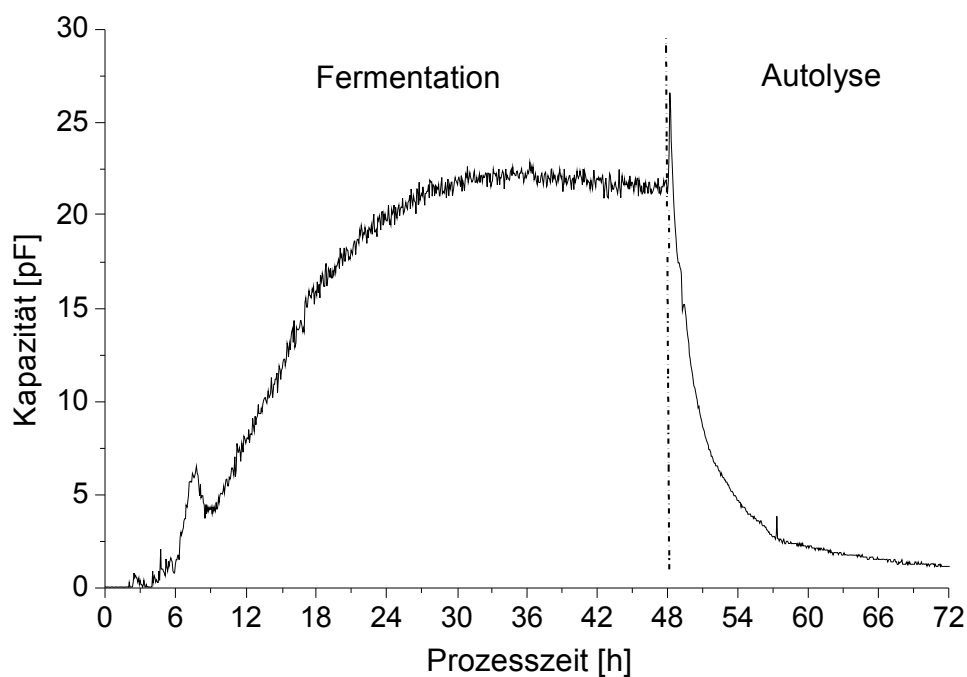
**Abbildung 3.37:** Schematischer Aufbau der Elektrode des Biomass Monitors. Die zwei äußeren Elektroden der Sonde erzeugen ein hochfrequentes elektrisches Feld ( $I$  = Stromstärke). Die zwei inneren Elektroden messen die Spannung ( $V$ ).

Werden in dieses elektrische Feld lebende Zellen gegeben, wirkt die Plasmamembran wie ein Isolator, da sie nicht leitend und für Ionen undurchlässig ist. Dementsprechend bildet sich um die Zellmembran ein elektrisches Feld und die Zelle wird als polarisiert bezeichnet. Das Maß der Membranpolarisation wird mit der Kapazität (gemessen in pF) gemessen, da Zellen wie kleine Kondensatoren im Medium wirken. Das Maß der Ladungstrennung (Membranpolarisation) in einer Zellsuspension kann direkt in Bezug zu der Biomasse gesetzt und dementsprechend die Kapazität zum Messen der Biomasse verwendet werden. Das Maß der Polarisation ist abhängig von der Frequenz des elektrischen Feldes. Ist die Frequenz gering, können die Ionen im elektrischen Feld wandern, und somit ist die Polarisation der Zellen hoch. Bei einer hohen Frequenz, können die Ionen nicht mehr wandern und somit ist die Polarisation der Zellen niedrig. Zellen mit stark beschädigter Zellmembran (z. B. tote Zellen) werden durch ein angelegtes elektrisches Feld nicht polarisiert und leisten dementsprechend keinen Beitrag zur Kapazitätserhöhung, da die Ionen die Zellmembran passieren können.

Der Biomass Monitor wird vorwiegend in der Zellkulturtechnik und in der Fermentation mit Hefe eingesetzt. Aufgrund der einfachen Bedienung und Wartung des Gerätes sollte im Folgenden untersucht werden, ob das Gerät auch zur Überwachung von Fermentationen mit *Bacillus subtilis* als auch der Autolyse eingesetzt werden könnte.

Hierzu wurde die Sonde mit dem Medium sterilisiert. Nach erfolgter Sterilisation wurde die

Sonde an dem Biomass Monitor angeschlossen und eine Messfrequenz von 0,6 MHz eingestellt. Nach ca. 15 min. ist das Gerät einsatzbereit und kann kalibriert werden. Nach erfolgter Kalibration kann das Medium mit der *Bacillus subtilis* - Vorkultur angeimpft werden.

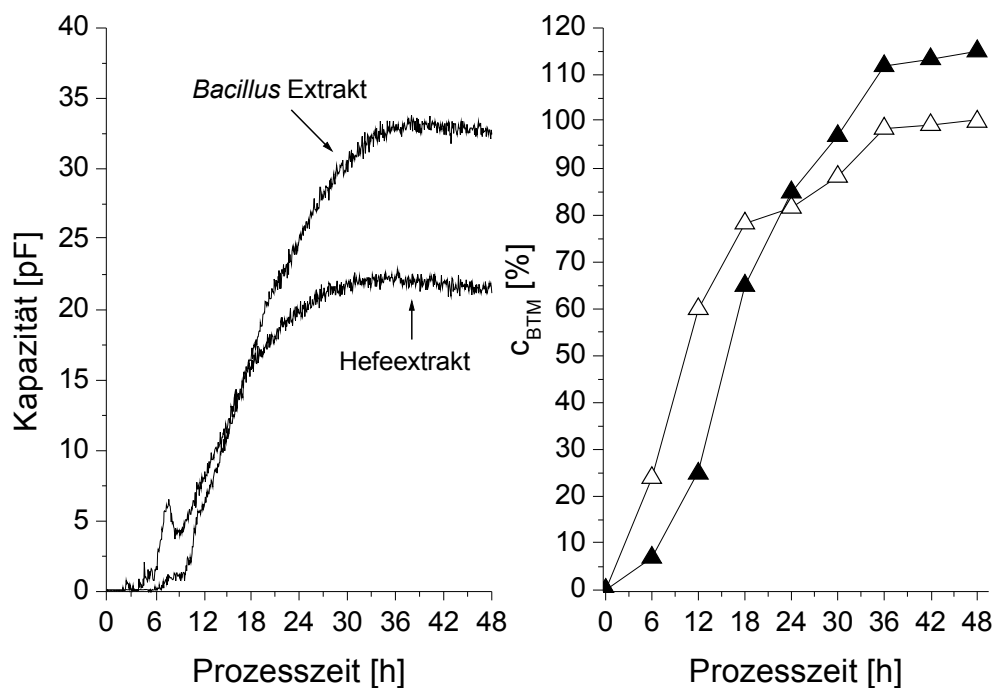


**Abbildung 3.38:** Entwicklung der Biomasse während der Fermentation und Autolyse gemessen anhand der Kapazität der Zellen mittels Biomass Monitor

Der Verlauf einer Standardfermentation mit Hefeextrakt mit anschließender Autolyse ist in Abbildung 3.38 dargestellt. Anhand dieser Abbildung kann mittels der aufgezeichneten Kapazitätsmessung das Wachstum der Zellen während der Fermentation verfolgt werden. Aus dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass die stationäre Phase schon nach 36 Stunden erreicht wird, während mit der BTM Bestimmung der Eintritt in die stationäre Phase erst ab der 42 Stunde erkannt werden kann. Dieser Unterschied kommt dadurch zustande, dass mit dem Biomass Monitor lediglich die lebenden Zellen erfasst werden, während mit der BTM – Bestimmung die gesamte Biomasse erfasst wird, also auch bereits toten Zellen.

Nach 48 Stunden wurde in diesem Versuch die Autolyse eingeleitet (vgl. Abbildung 3.38

rechte Seite). Anhand des Verlaufs der Kapazität kann man erkennen, dass der Hauptteil der Autolyse wie bereits über die Bestimmung der BTM beschrieben in den ersten acht Stunden der Autolyse stattfindet. Anhand der Kapazitätsbestimmung findet jedoch noch weiterhin eine Autolyse statt, die jedoch mit der BTM Bestimmung nicht mehr erfasst werden kann.



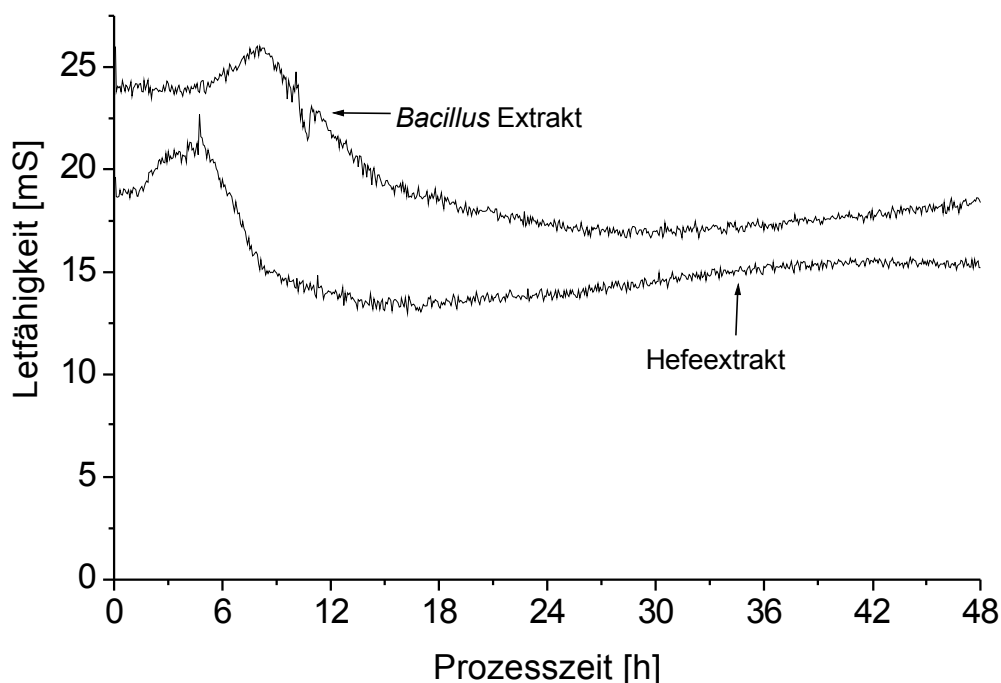
**Abbildung 3.39:** Vergleich der Kapazität (links) und der BTM Bestimmung (rechts) einer Standardfermentation mit Hefeextrakt und einer Fermentation mit Lysat hergestellt bei pH 7,5 unter Zugabe von Proteasen ( $\triangle$  BTM Standard;  $\blacktriangle$  BTM Lysat).

Der direkte Vergleich der Kapazität einer Standardfermentation mit einer Fermentation mit *Bacillus* – Extrakt bestätigt die Ergebnisse der BTM - Bestimmung (vgl. Abbildung 3.39). Anhand der Kapazitätsmessung des Biomass Monitors in Abbildung 3.39 (links) kann man erkennen, dass das Zellwachstum auf dem *Bacillus* – Extrakt in den ersten 6 Stunden der Fermentation im Vergleich zu der Standardfermentation sehr gering ist. Anschliessend erfolgt jedoch ein Wachstum mit so hoher Wachstumsrate, dass im Vergleich zu der Standardfermentation mittels Kapazitätsmessung nach der 18 Prozessstunde eine höhere Biomassenkonzentration auf dem *Bacillus* – Extrakt nachgewiesen werden kann. Mit der BTM – Be-

stimmung kann erst nach der 24. Prozessstunde eine höhere Biomassenkonzentration auf dem *Bacillus* – Extrakt nachgewiesen werden. Die mittels Kapazitätsmessung festgestellte Biomassekonzentration ist nach 48 Stunden wesentlich höher mit der BTM-Analyse bestimmt werden kann.

Trotz der recht ähnlichen Verläufe der Biomasse bestimmt durch die Kapazitätsmessung des Biomass Monitors und mittels BTM-Bestimmung kann keine Korrelation zwischen diesen Parametern festgestellt werden, da mit dem Biomass Monitor nur die lebenden Zellen erfasst werden können, während mit der BTM Bestimmung auch tote Zellen mit erfasst werden.

Der Versuch einer Korrelation zwischen Kapazität und optischer Dichte scheitert auch aufgrund einer großen Streuung der Werte. Bedingt durch die im Medium befindlichen Riboflavinkristalle und der damit notwendigen hohen Verdünnungsrate zur Bestimmung der optischen Dichte sind die Werte stark fehlerbehaftet und führen zu einer starken Streuung bei der Korrelation zwischen optischer Dichte und der gemessenen Kapazität.



**Abbildung 3.40:** Vergleich der Leitfähigkeit des Mediums bei einer Standardfermentation mit Hefeextrakt (untere Kurve) und einer Fermentation mit Lysat (obere Kurve) hergestellt bei pH 7,5 unter Zugabe von Proteasen.

Eine weitere Möglichkeit, um eine Korrelation zwischen der gemessenen Kapazität und der Biomassekonzentration herzustellen, könnte in einer Lebendzellzahl-Bestimmung bestehen. Hierzu wurde bei jeder Probennahme eine Verdünnungsreihe hergestellt und auf Caso – Agar – Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellkolonien auf den Platten ausgezählt. Aufgrund einer erneuten hohen Streuung der Werte konnte jedoch keine Korrelation zwischen der gemessenen Kapazität und den gezählten Kolonien hergestellt werden.

Zusammenfassend können die von dem Biomass Monitor gelieferten Werte zwar in keine Korrelation mit einer sogenannten „Offline – Analytik“ gesetzt werden, jedoch liefert dieses Gerät Hinweise auf eine mögliche Ursache für das langsamere Wachstum der Biomasse auf dem hergestellten Extrakt aus *Bacillus subtilis*.

Anhand der Leitfähigkeit der beiden Medien, die in Abbildung 3.40 in Abhängigkeit der Prozesszeit dargestellt sind, kann man nämlich erkennen, dass im Medium hergestellt aus *Bacillus* – Extrakt eine höhere Leitfähigkeit festgestellt werden kann als in dem vergleichbaren Hefeextraktmedium. Die erhöhte Leitfähigkeit des Mediums ist durch eine erhöhte Ionenkonzentration im Medium mit *Bacillus* – Extrakt bedingt. Somit könnte der Grund für das unterschiedliche Wachstum der Biomasse und den verzögerte Feed - Start zwischen den Extrakten hergestellt einerseits durch direkt induzierte Autolyse nach der Fermentation und andererseits durch Aufreinigung der Biomasse vor der Induktion der Autolyse, in der erhöhten Ionenkonzentration des Extraktes liegen.



## 4 Diskussion

In der fermentativen Riboflavin – Herstellung mit *Bacillus subtilis* ist Hefeextrakt neben Glucose der mit Abstand in größten Mengen eingesetzte Rohstoff und somit auch ein Kostentreiber dieses Prozesses. Hinzu kommt noch eine große Menge an produzierter Biomasse, die, obwohl sie ein hohes Energiepotential hat, kostenaufwendig entsorgt wird. Betrachtet man die Zusammensetzung der Biomasse, so stellt man fest, dass diese genau aus den Elementen besteht, die eigentlich im Fermentationsmedium benötigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem die anfallende Biomasse so aufbereitet wird, dass diese in der fermentativen Riboflavin – Herstellung als Substrat wieder verwendet werden kann. Im Erfolgsfall könnten so nicht nur die Abfallmengen deutlich reduziert, sondern auch die Riboflavin – Herstellungskosten drastisch gesenkt werden, da weniger oder unter Umständen sogar kein Hefeextrakt mehr eingesetzt werden müsste.

### 4.1 Extraktherstellung

Die bei der fermentativen Riboflavin – Herstellung anfallende Biomasse kann nur dann in einer Fermentation verwendet werden, wenn sie zuvor aufgeschlossen wird (vgl. Kapitel 3.1, Seite 48). Der Aufschluss der Biomasse kann mittels einer chemisch-, biologisch- oder physikalischen Methode erfolgen (vgl. Kapitel 1.2). Die Forderung bei der Extraktherstellung war, einen Prozess zu entwickeln, der die Produktionskosten der industriellen fermentativen Riboflavin – Herstellung senken soll. Die Untersuchung des industriellen Herstellungsprozesses ergab jedoch, dass lediglich zwei Stellen des Produktionsprozesses für eine rentable Extraktherstellung geeignet sind, da nur hier die Biomassenkonzentration hoch genug ist (vgl. Abbildung 3.4).

Die erste Möglichkeit besteht nach der Eindampfung der Biomasse. Sollte nach diesem Schritt eine Extraktherstellung erfolgen, so würde nur ein mechanisches Aufschlussverfahren in Frage kommen, da die Biomasse schon inaktiviert ist. In einem zweiten Schritt müssten dann die Proteine degradiert werden, um den Extrakt zu prozessieren.

Die zweite Möglichkeit für eine Extrakterstellung, besteht direkt im Anschluss an die Fermentation. Dieser Punkt des Riboflavin – Herstellungsprozesses scheint besonders geeignet zu sein, da die Biomasse noch nicht inaktiviert ist und somit alle aus der Literatur bekannten Verfahren zum Einsatz kommen könnten.

Die in der industriellen Hefeextrakt - Herstellung am häufigsten eingesetzte Methode ist die Autolyse, da diese im Vergleich zu den anderen Verfahren folgende Vorteile aufzuweisen hat:

- Aufschluss und Proteindegradation erfolgen in einem Arbeitsschritt
- Nutzung der endogenen Proteasen des Mikroorganismus ist möglich
- schonende Behandlung des Extraktes bedingt durch moderaten Temperatur und pH-Wert
- geringer Energieverbrauch

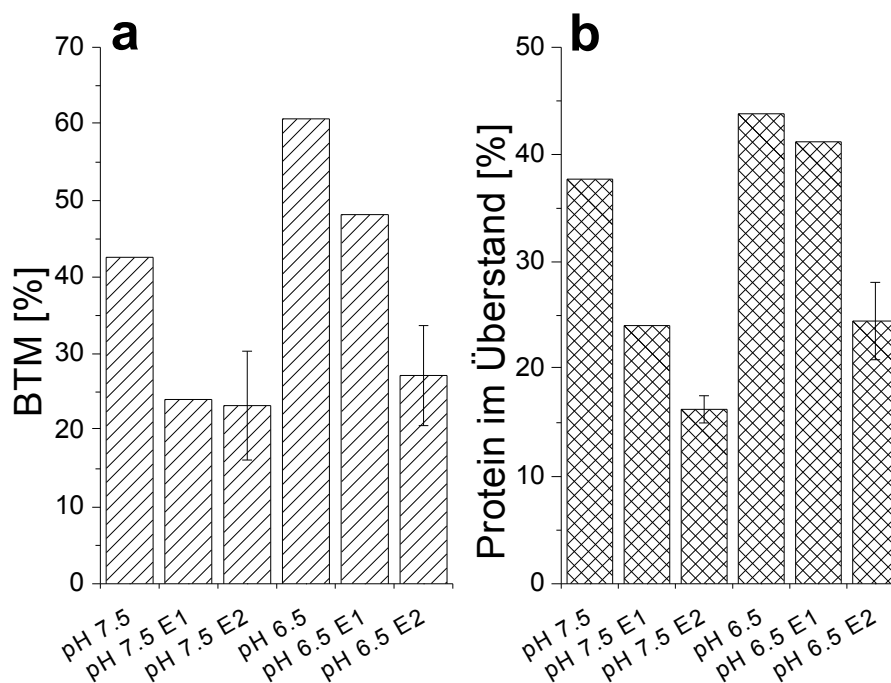
Aufgrund der oben genannten Fakten und der in der Literatur gefundenen Ergebnisse [Jolliffe *et al.*, 23, 24, Risse *et al.*, 42], wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob eine Extrakterstellung mittels Autolyse in der fermentativen Riboflavin – Herstellung mit *Bacillus subtilis* möglich ist.

Das durchgeführte pH- und Temperatur-Screening ergab, dass eine Autolyse in einem Temperaturbereich zwischen 40 und 45 °C und einem pH – Wert zwischen pH 6,5 und 8,0 möglich ist. In diesem pH- und Temperaturbereich konnte nach 24 Stunden eine Lysegrad von ca. 50 % erreicht werden. Bei der Autolyse von *B. licheniformis* [Risse *et al.*, 42] ist ein Temperaturprofil notwendig. Hierbei wurde die Autolyse bei 30 °C gestartet und anschließend die Temperatur um 5 °C/h bis zu einer maximalen Temperatur von 55 °C erhöht. Im Gegensatz dazu war für den in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis* Stamm kein Temperaturprofil für die Autolyse nötig.

Das pH- und Temperatur-Screening zeigte auch, dass das endogene Proteasensystem von *B. subtilis* nicht ausreichend ist, um eine Proteindegradation in dem Maße zu erhalten, dass der erhaltene Überstand als Extrakt in einer Fermentation verwendet werden könnte (vgl. Abbildung 4.1b).

Weitere Screeningversuche mit verschiedenen Proteasen ergaben, dass für einen pH-Wert von 7,5 die niedrigsten Proteinkonzentrationen im Überstand, mit der Kombination bestehend aus den kommerziell erhältlichen Proteasen Alcalase, Amano P und Umimazyme nachgewiesen werden konnte. Für einen pH-Wert von 6,5 zeigte sich die Kombination bestehend aus Amano N, Promod 194P und Peptidase R als am besten geeignet (vgl. Abbildung 4.1b). Diese Ver-

suche wurden durchgeführt, indem einerseits die Autolyse direkt im Anschluss an die Fermentation und andererseits die Biomasse zuvor erst aufgereinigt und aufkonzentriert wurde. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine bei der Autolyse mit aufkonzentrierter und aufgereinigter Biomasse (Proteinkonzentration im Überstand ca. 10 %) besser von der Proteasenkombination abgebaut werden als bei der Autolyse der Fermentationsbrühe im Anschluss an die Fermentation (Proteinkonzentration im Überstand ca. 25 %).



**Abbildung 4.1:** Vergleich der Autolyse (Induktion direkt im Anschluss an die Fermentation) ohne, mit Endoprotease (pH 7.5 E1 = Alcalase, pH 6.5 E1 = Amano N) und unter Zugabe von Endo- und Exoprotease (pH 7.5 E2 = Alcalase, Amano P, Umimazyme; pH 6.5 E2 = Amano N, Promod 194P, Peptidase R) bei von pH 6,5 und 7,5 bei einer Temperatur von 45 °C.

In beiden Fällen konnte durch die Zugabe der Proteasen kein vollständiger Abbau der Proteine im Überstand erreicht werden, so dass der erhaltene Überstand vor dem Einsatz in einer Fermentation noch filtriert (cut-off 10 kDa) werden musste, um ein Schäumen während der Sterilisation des Mediums und der Fermentation zu vermeiden. Risse *et al.* [Risse *et al.*, 42] konnten mittels der quantitativen Proteinnachweise nach Bradford und Biuret im *B.*

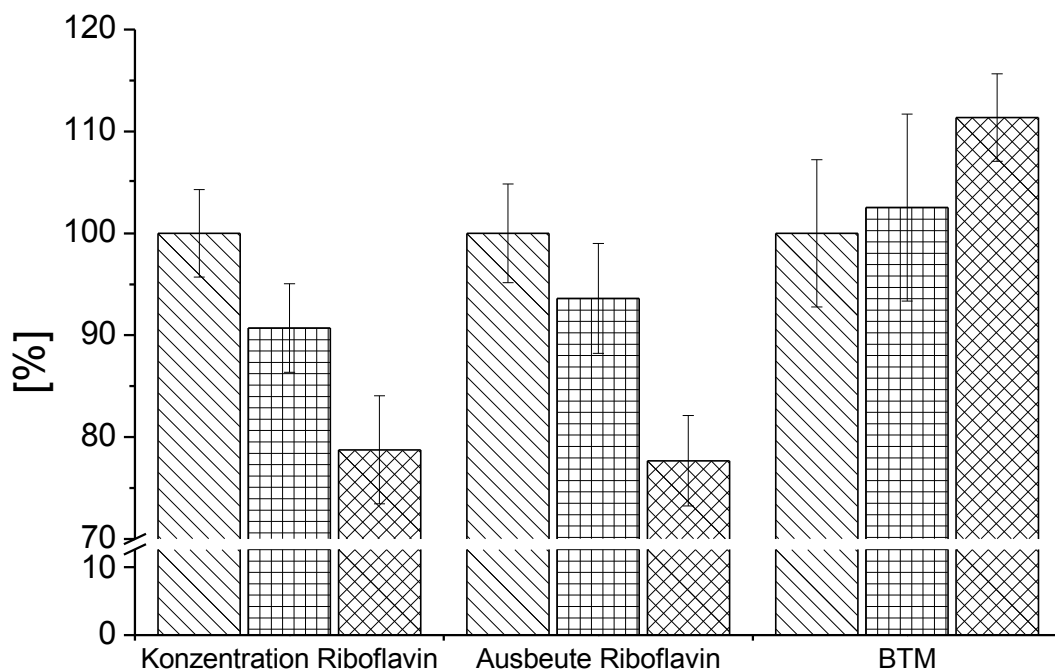
*licheniformis* Extrakt eine 4- bis 6-fach höhere Proteinkonzentration als im Hefeextrakt nachweisen. Da mit Bradford weder beim Hefeextrakt noch beim *Bacillus* – Extrakt (nach der Filtration) ein quantitativer Proteinnachweis möglich war, wurde die Aminosäurezusammensetzung des Hefe- und *Bacillus* – Extraktes in Auftrag gegeben. Aufgrund dieser Analyse konnte festgestellt werden, dass der im industriellen Riboflavin – Herstellungsprozess verwendete Hefeextrakt einen Aminosäureanteil von 67 % hat. Im Vergleich dazu, hatte der untersuchte *Bacillus* – Extrakt (Autolyse der Fermentationsbrühe bei pH 7,5 mit Zugabe der oben genannten Proteasen, Überstand lyophilisiert) mit 26 % einen um den Faktor 2,5 niedrigeren Aminosäureanteil.

Die Zugabe der Proteasen hatte jedoch nicht nur einen Einfluss auf die Proteinkonzentration im Überstand, sondern auch auf die Autolyse der Biomasse selber. Wurde die Autolyse direkt nach Fermentationsende (keine Riboflavin Abtrennung) induziert, konnte ein Lysegrad von ca. 75 % festgestellt werden. Mit aufgereinigter und aufkonzentrierter Biomasse konnte bei pH 7,5 durch die Zugabe der Proteasenkombination sogar eine vollständige Lyse der Biomasse erreicht werden. Die erhöhten Lysegrade konnten hauptsächlich auf den Einfluss der Endoprotease (Alcalase) zurückgeführt werden. Im Vergleich dazu konnte bei der Autolyse von *B. licheniformis* durch die Zugabe von Alcalase kein erhöhter Lysegrad festgestellt werden, sondern lediglich eine Beschleunigung der Autolyse. Erst bei einer Zugabe von 60000 U/g BTM konnte mit *B. licheniformis* ein maximaler Lysegrad von 95 % erreicht werden [Risse *et al.*, 42]. Unklar ist jedoch, ob dieser Lysegrad nur durch den Autolyseprozess selber erhalten wurde, da in der Arbeit von Risse bei 4 °C gearbeitet wurde. Risse schreibt: „Bei der Lagerung des Retentates bei 4 °C gingen während einer Woche ca. 21 % (w/w) und während 1 Monats ca. 36 % der ZTM in einen löslichen Zustand über.“ Weiter schreibt er: „Zell-Lyse, die durch die Autolyse bei der Bevorratung bzw. durch die zwischenzeitliche hypotonischen Bedingungen stattfand, wurde bei den ermittelten Lysegraden eines jeweiligen Lyseversuches nicht berücksichtigt.“

In der industriellen Hefeextrakt – Herstellung wird unter ähnlichen Bedingungen unter Zugabe von Glucanase und Proteasen ein Lysegrad von 70 % erreicht [Uhlig, 53].

## 4.2 Fermentation

Die in dieser Arbeit durchgeführten Fermentationsversuche zeigten, dass es möglich ist, die anfallende Biomasse der fermentativen Riboflavinherstellung zu recyceln, indem ein Extrakt daraus hergestellt wird. In dieser Arbeit wurden, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, bei verschiedenen pH-Werten zwei verschiedene Vorgehensweisen zur Herstellung des Extraktes näher untersucht. Einerseits wurde die Autolyse direkt nach der Fermentation induziert bzw. die Biomasse wurde nach der Fermentation isoliert, gewaschen und anschließend die Autolyse induziert.



**Abbildung 4.2:** Vergleich der Riboflavin Endkonzentration, der Riboflavinausbeute und der BTM nach 48h zwischen Hefeextrakt (▨), *B. subtilis* Extrakt aus gewaschenen und aufkonzentrierten Zellen (▩) und *B. subtilis* Extrakt hergestellt durch direkt nach der Fermentation induzierten Autolyse (▩).

Wie bereits schon im Zusammenhang mit der Autolyse erwähnt, wurde auch bei der Fermentation der Unterschied zwischen den beiden Extrakten nachgewiesen. Wurde der Extrakt hergestellt, indem die Autolyse direkt im Anschluss an die Fermentation induziert wurde, so

konnte eine Riboflavin - Ausbeute von durchschnittlich 78 % im Vergleich zu einer Standardfermentation mit Hefeextrakt erreicht werden. Wurde die Biomasse vor der Induktion der Autolyse isoliert, gewaschen und aufkonzentriert, konnte eine durchschnittliche Riboflavin - Ausbeute von 94 % im Vergleich zu einer Standardfermentation mit Hefeextrakt erreicht werden (vgl. Abbildung 4.2).

Die geringere Ausbeute mit dem Extrakt, der durch direkt induzierte Autolyse nach Fermentationsende hergestellt wurde, lässt sich anhand des Biomassewachstums während der Fermentation nachvollziehen. Anhand der Sauerstoffpartialdruckmessung setzte der Feed – Start um ca. 2 – 2,5 Stunden verspätet im Vergleich zu der Standardfermentation mit Hefeextrakt ein, während bei den Fermentationen mit den Extrakten, die aus gewaschener Biomasse hergestellt wurden, der Feed - Start lediglich um 1 – 1,5 Stunden verspätet einsetzte. Anhand der BTM Bestimmungen konnte in den ersten 12 Stunden der Fermentation im Vergleich zu der Standardfermentation mit Hefeextrakt ein schlechteres Wachstum der Biomasse auf den hergestellten Extrakten nachgewiesen werden. Hierbei wuchs während der Fermentation die Biomasse auf dem Extrakt hergestellt durch direkt nach Fermentationsende induzierte Autolyse schlechter als auf dem Extrakt hergestellt aus gewaschener Biomasse. Somit lassen sich auch die unterschiedlichen Riboflavin – Ausbeuten erklären, da dessen Bildung zum Teil an das Wachstum der Mikroorganismen gekoppelt ist.

Anhand der durchgeführten Versuche konnten einerseits der unterschiedliche Salzgehalt und andererseits wachstumsinhibierende Proteine (GSP) als die entscheidenden Faktoren für den verspäteten Feed – Start und das schlechtere Anwachsen der Biomasse auf dem hergestellten *Bacillus* – Extrakt festgestellt werden. Durch den Ersatz der im Autolyseprozess verwendeten Natronlauge durch Ammoniaklösung konnte kein besseres Wachstum der Mikroorganismen erreicht werden. Da *Bacillus subtilis* verschiedene GSP herstellt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden, welche hier genau wirksam sind und wie diese GSP inaktiviert werden können.

Der Vergleich der Kultivierungsdaten auf *B. subtilis* – Extrakt und auf *B. licheniformis* – Extrakt ergab identische Verläufe. Auch Risse *et al.* [Risse *et al.* 42] konnte feststellen, dass durch die Zugabe von Proteasen bessere Ergebnisse bei der Kultivierung erreicht werden können und im Vergleich zu der Kultivierung auf Hefeextrakt ein schlechteres Anwachsen der Kulturen erfolgt. Des Weiteren konnte er am Ende der Kultivierung eine höhere BTM bei

den Kulturen auf *Bacillus* – Extrakt im Vergleich zu den Kulturen auf Hefeextrakt nachweisen.

In der Arbeit von Risse *et al.* [Risse *et al.*, 42, Friehs *et al.*, 16] wird zwar erwähnt, dass der aus der alkalischen Protease – Fermentation hergestellte *B. licheniformis* – Extrakt wieder verwendet werden kann, jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich das Wachstum der MO's untersucht nicht die Produktivität in Bezug auf die Produktion der alkalischen Protease.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Art und Weise wie der Extrakt hergestellt wird einen großen Einfluss auf das Wachstum und die Produktivität während der Fermentation hat. In der Fermentation wurde jedoch nicht die Zusammensetzung des Fermentationsmediums berücksichtigt, da der Schwerpunkt der Arbeit in der Extrakterstellung lag. Somit stellt sich die Frage, ob durch einen genauen Vergleich der Zusammensetzung des *Bacillus* – Extraktes mit dem Hefeextrakt und der daraus folgenden geänderten Zusammensetzung des Fermentationsmediums eine bessere Produktivität erreicht werden würde.

### 4.3 Wirtschaftlichkeit

Eine Prozessentwicklung wird immer nur dann in den industriellen Maßstab umgesetzt, wenn sie auch wirtschaftlich ist. Von der ökonomischen Seite des Riboflavin – Prozesses wurde in dieser Arbeit versucht, die optimalen Rohstoffe und die optimalen Bedingungen und Rohstoffmengen zu finden. Es wurde jedoch noch keine Abschätzung gemacht, ob der hier entwickelte Prozess auch günstiger ist als das aktuell angewandte Verfahren.

Eine Abschätzung der Kosten als Ganzes ist im vollen Umfang nicht möglich, da Schritte, die nicht zwingend notwendig sind, weggelassen und der Prozess noch nicht im Pilotmaßstab umgesetzt wurde. Daraus wäre es möglich, die anfallenden Kosten in den Großmaßstab umzurechnen. Die wahrscheinlich höchsten Kosten werden, wie auch bisher, durch die verwendeten Rohstoffe verursacht: Bei den Rohstoffen würde theoretisch der Hefeextrakt wegfallen, stattdessen würden aber neue Kosten für Proteasen und für die pH – Regulierung hinzukommen. Als neuer Rohstoff ist bei der Durchführung einer Autolyse bei pH 7,5 nur Natronlauge nötig, wobei der Preis für die technische Qualität sehr niedrig wäre (ca. 0,04 € pro kg, 25 % Natronlauge). Die Proteasen würden den größten Kostenanteil der Rohstoffe für

die Extrakterstellung ausmachen und in der technischen Qualität mit einem Preis von 60 € / kg gerechnet. Werden nun die vorliegenden Rohstoffe gegen den wegfallenden Hefeextrakt (ca. 3 € / kg) verrechnet, so ist das hier vorgestellte Verfahren im Bezug auf das Fermentationsmedium ca. 22 % günstiger als das aktuelle Verfahren. Hierbei wird jedoch noch nicht berücksichtigt, dass mit einer Autolyse Extrakt für mindestens drei Fermentationen hergestellt werden würde. Bei Berücksichtigung dieser Tatsache läge das rein theoretische Einsparpotential im Bereich der Rohstoffe sogar bis zu ca. 75 % des Fermentationsmediums. Da allerdings mit einer Autolyse mehr Extrakt hergestellt wird als benötigt, wären die tatsächlich eingesparten Rohstoffkosten geringer.

Eine weitere Möglichkeit, die Rohstoffkosten zu minimieren, betrifft die Aufreinigung des Produktes Riboflavin. Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 3.4 kann man erkennen, dass die Reinheit des Riboflavins im Bezug auf Protein- und DNA-Gehalt durch die Autolyse gesteigert werden könnte. Jedoch kann das Einsparpotential hier nicht genau abgeschätzt werden, da erst weitere Analysen zur Reinheit des Riboflavins durchgeführt werden müssten. Erst Anhand dieser Analysen könnte festgestellt werden, ob die Aufreinigung des Riboflavins vereinfacht werden könnte und somit unter Umständen weitere Kosten eingespart werden würden.

Eine weitere Reduktion der Prozesskosten wird erreicht durch die während der Autolyse eintretende Ausbeutesteigerung an Riboflavin. In Kapitel 3.3 konnte gezeigt werden, dass eine Ausbeutesteigerung um bis zu 6 % im Bezug zur Riboflavin – Konzentration zu Beginn der Autolyse möglich ist. Diese Ausbeutesteigerung ist jedoch, wie bereits auch schon erwähnt, abhängig von der vorliegenden DMRL – Konzentration. Eine genaue Abschätzung der tatsächlichen Ausbeutesteigerung ist jedoch nicht möglich, da durch die Autolyse sich die Viskosität der Kulturbrühe verändert. Um die tatsächliche Ausbeutesteigerung festzustellen, müsste auch hier das Verfahren pilotiert werden um festzustellen, wie sich die Abtrennung des Riboflavins mittels Dekantation verhält. Erst die Pilotierung dieses Prozesses würde es dann auch zulassen, evtl. veränderte Kosten für die Energien wie z.B. Strom und Dampf festzustellen.

Weitere zu berücksichtigende Kostenpunkte, sind die Prozessstabilität und Prozessüberwachung. Die effektivste Methode einen Prozess zu überwachen ist eine Online – Überwachung. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit die Tauglichkeit des ABER Biomass



Monitors überprüft. Dieses System erwies sich für den vorliegenden Prozess jedoch als nur bedingt tauglich. Um die Autolyse mittels Biomass Monitor zu überwachen, müsste diese in demselben Behältnis wie die Fermentation durchgeführt werden, da die Sonde nur in einem zellfreien System kalibriert werden kann. Dieses würde zu einem Ausfall von Produktionskapazitäten führen, da für die Autolyse lediglich ein gerührtes und temperiertes Behältnis mit pH – Regelung benötigt wird.

Eine wesentlich einfachere und effektivere Methode zur Prozessüberwachung kann mittels der Erfassung der zudosierten Natronlauge erreicht werden. Erfolgt während des Autolyseprozesses keine pH – Regulierung, so ändert sich der pH – Wert der Lösung sehr bald nach dem Start der Autolyse aufgrund der Proteinhydrolyse. Durch die Proteinhydrolyse kommt es zur Freisetzung neuer Amino- und Carboxylgruppen, die in Abhängigkeit des pH – Wertes als Protonenakzeptor bzw. Protonendonator wirken. Bei einem niedrigen pH – Wert werden alle Aminogruppen protoniert, jedoch nur ein Teil der Carboxylgruppen deprotoniert, was dann zu einem Anstieg des pH – Wertes führt. Bei einem neutralen oder basischen pH – Wert erfolgt durch die Proteinhydrolyse eine Abnahme des pH – Wertes, da alle Carboxylgruppen deprotoniert werden, jedoch nur ein Teil der Aminosäuren protoniert werden [Adler-Nissen, 1]. Mit dieser Methode der Prozessüberwachung könnte nicht nur die Autolyse, sondern auch die Proteinhydrolyse selbst überwacht werden.

## 4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass die bei der industriellen Riboflavin – Herstellung mit *Bacillus subtilis* anfallende Biomasse in Form eines Extraktes wieder verwertbar ist. Jedoch konnte mit dem hergestellten Extrakt in der Fermentation nicht die Riboflavin – Ausbeute erreicht werden, die mit Hefeextrakt erzielt wird.

Als Ursachen für die geringere Produktivität in der Fermentation, konnten Salzgehalt und General Stress Proteins (GSP) im Extrakt festgestellt werden. Durch eine Optimierung der Extrakterstellung sollte es jedoch möglich sein, einerseits den Salzgehalt des Extraktes zu minimieren und andererseits durch den Einsatz von besser geeigneten Proteasen eventuell sogar der Abbau der im Extrakt enthaltenen GSP zu erreichen. Ein weiteres Augenmerk sollte

die gezielte Optimierung des Fermentationsmediums auf den *Bacillus* – Extrakt sein. Durch eine Mediumsoptimierung sollte auch eine Produktivitätssteigerung möglich sein.

Risse *et al.* [Risse *et al.*, 42] schreibt, dass sich durch die Extrakterstellung Entsorgungs- und Medienkosten einsparen lassen könnten. Durch die in Kapitel 4.3 durchgeführten Berechnungen konnte gezeigt werden, dass ein theoretisches Einsparpotential von bis zu 75% möglich wäre. Dies kann jedoch erst nach Pilotierung des hier beschriebenen Verfahrens endgültig geklärt werden. Da die hergestellte Extraktmenge wesentlich höher wäre als der eigentliche Bedarf für die Fermentation, sollte weiterhin untersucht werden, ob der hergestellte Extrakt auch in anderen fermentativen Herstellungsprozessen als Alternative für Hefeextrakt verwendet werden kann.

## 5 Literatur

1. **Adler-Nissen, J.** (1986): Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science, London
2. **Antelmann, H., Yamamoto, H., Sekiguchi, J., Hecker, M.** (2002): Stabilization of cell wall proteins in *Bacillus subtilis*: A proteomic approach. *Proteomics* 2:591-602
3. **Arbige, M. V., Bulthuis, B. A., Schultz, J., Crabb, D.** (1993): Chapter 60: Fermentation of *Bacillus*, pp. 871- 891; In: Sonenshein, A. L.; Hoch, J. A.; Losick, R.: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics, American Society for Microbiology, Washington, DC,
4. **Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. and Richter, G.** (2000): Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). *Annual Reviews Nutrition* 20:153-167
5. **Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B., Kis, K. and Richter, G.** (2001): Biosynthesis of vitamin riboflavin. *Vitamins and Hormones* 61:1-49
6. **Bernhardt, J., Völker, A., Antelmann, H., Schmid, R., Mach, H., Hecker, M.** (1997): Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* – a two dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* 143:999-1017
7. **Blackman, S. A., Smith, T. J., Foster, S. J.** (1998): The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology* 144:73-82
8. **Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
9. **Bretz, K.** (2002): Medienoptimierung der fermentativen Riboflavinherstellung mit *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart

10. **Bretzel, W., Schurter, W., Ludwig, B., Kupfer, E., Doswald, S., Pfister, M., van Loon, A.P.G.M.** (1999). Commercial riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis*: down-stream processing and comparison of the composition of riboflavin produced by fermentation or chemical synthesis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22:19-26
11. **Cooperman, J. M.; Lopez, R.** (1984): Handbook of Vitamins. Dekker, New York, pp. 300-327
12. **Coquard, D., Huecas, M., Ott, M., van Dijl, J. M., van Loon, A. P. G. M., Hohmann, H.-P.** (1997): Molecular cloning and characterisation of the ribC gene from *Bacillus subtilis*: a point mutation in ribC results in riboflavin overproduction. *Molecular Genetics and Genomics* 254:81-84
13. **Daridon, A., Sequeira, M., Pennarun-Thomas, G., Dirac, H., Krog, J. P., Gravesen, P., Lichtenberg, J., Diamond, D., Verpoorte, E., De Rooij, N. F.** (2001): Chemical sensing using an integrated microfluidic system based on the Berthelot reaction. *Sensors and Actuators* 76:235-243
14. **Dauner, M., Storni, T., Sauer, U.** (2001): *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *Journal of Bacteriology* 183:7308-7317
15. **Eberhardt, S., Korn, S., Lottspeich, F. Bacher, A** (1997): Biosynthesis of riboflavin: unusual riboflavin synthase of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Bacteriology* 179:2938-2943
16. **Friehs, K., Schierl, F., Flaschel, E.** (1998): Aufarbeitung bakterieller Biomasse zwecks Rückführung als Mediumskomponente in Fermentationsprozesse. *Chemie Ingenieur Technik* 70:435-437
17. **González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., Losick, R.** (2003): Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science* 301:510-513
18. **Hermann, D., Schurter, W.** (1994): Effect of the riboflavin purification process on DNA; hot hydrochloric acid rapidly destroys the biological activity of DNA. Roche Research Report No. B-164814

19. **Hermann, D., Schurter, W.** (1995): PCR-analysis of riboflavin samples from fermentation: absence of production strain specific DNA. Roche Research Report No. B-165177
20. **Hümbelin, M., Griesser, V., Keller, T., Schurter, W., Haiker, M., Hohmann, H.-P., Ritz, H., Richter, G., Bacher, A., van Loon, A.P.G.M.** (1999): GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22:1-7
21. **Huang, M., Oppermann-Sanio, F. B.; Steinbüchel A.** (1999): Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *Journal of Bacteriology* 181:3837-3841
22. **Illarionov, B., Eisenreich, W., Bacher, A.** (2001): A pentacyclic reaction intermediate of riboflavin synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:7224-7229
23. **Jolliffe, L. K., Doyle, R. J., Streips, U. N.** (1980). Extracellular protease modify cell wall turnover in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 141:1199-1208
24. **Jolliffe, L. K., Doyle, R. J., Streips, U. N.** (1981). The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25:753-763
25. **Kis, K., Kugelbrey, K., Bacher, A.** (2001): Biosynthesis of riboflavin. The reaction catalyzed by 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase can proceed without enzymatic catalysis under physiological conditions. *Journal of Organic Chemistry* 66:2555-2559
26. **Kurth, R.** (1991): Process for the enhancement of riboflavin levels in spray-dried riboflavinfermentation extracts. EP 0 487 985 B1, BASF AG
27. **Lewis, K.** (2000): Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:503-514
28. **Lottspeich, F., Zorbas, H.** (1998): in *Bioanalytik, Kapitel 8: Spaltung von Proteinen.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 179-194

29. **Mack, M., van Loon, A. P. G. M., Hohmann, H.-P.** (1998): Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by ribC. *Journal of Bacteriology* 180:950-955
30. **Maier, S. K., Scherer, S., Loessner, M. J.** (1999): Long-chain polyphosphate causes lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations; *Applied and Environmental Microbiology* 65:3942-3949
31. **Margot, P., Wahlen, M., Gholamhuseinian, A., Piggot, P., Karamata, D.** (1998): The *lytE* gene of *Bacillus subtilis* 168 encodes a cell wall hydrolase. *Journal of Bacteriology* 180:749-752
32. **Masuda, T.** (1956): Application of chromatography. XXIX. G compound isolated from the mycelium of *Eremothecium ashbyii*. *Pharmaceutical Bulletin* 4:375-381
33. **Masuda, T.** (1956): Isolation of a green fluorescent substance produced by *Eremothecium ashbyii*. *Pharmaceutical Bulletin* 4:71-72
34. **Miyamoto, Y.; Sancar, A.** (1998): Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 6097-6102
35. **Neidhardt, F. C., Umbarger, H. E.** (1996): Chapter 3: Chemical composition of *Escherichia coli* in Neidhardt, F. C. (Editor in Chief): *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology (second edition), ASM Press, 1:13-16
36. **Nugroho, F. A., Yamamoto, H., Kobayashi, Y., Sekiguchi, J.** (1999): Characterization of a new sigma-K-dependent peptidoglycan hydrolase gene that plays a role in *Bacillus subtilis* mother cell lysis. *Journal of Bacteriology* 181:6230-6237
37. **Perkins, J. P., Pero, J. G., Sloma, A.** (1990): Riboflavin overproducing strains of Bacteria. EP 0 405 370, Hoffmann-La Roche Ltd.
38. **Perkins, J. P., Sloma, A., Hermann, T., Zachago, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chattergee, N. P., Williams II, V., Rufo, G. A. Jr., Pero, J. G.** (1999): Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 22:8-18

39. **Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., Hecker, M.** (2001): Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 183:5617-5631
40. **Ramos, H. C., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., Jahn, D.** (2000): Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology* 182:3072-3080
41. **Reiff, F., Lüers, H.** (1962): Die Hefen, Band II, Technologien der Hefen, Kapitel 3: Hefen in Nahrungsmittel, Verlag Hans Carl Nürnberg, 760-789
42. **Risse, J. M., Friehs, K., Flaschel, E.** (2001): Recycling of biomass resulting from fermentation processes with *Bacillus licheniformis*. *Engineering in Life Sciences* 1:141-145
43. **Falbe, J., Regitz, M.**, (1995): Roempp Chemielexikon. 9. Auflage auf CD-ROM, Thieme Verlag, Stuttgart
44. **Schott, K., Kellermann, J., Lottspeich, F., Bacher, A.** (1990): Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 8: 4204-4209
45. **Sedmak, J. J., Grossberg, S.E.** (1977): A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry* 79:544-552
46. **Slaughter, J.C., Nomura, T.** (1992): Autocatalytic degradation of proteins in extracts of a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. The role of endoproteinases and exopeptidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:638-642
47. **Smith, T. J., Blackman, S. A., Foster, S. J.** (2000): Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* 146:249-262
48. **Sommer, R.** (1987): Hefeautolysate – Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen. BDL-Spektrum 3, Bund Deutscher Lebensmittel e. V., Rhenania Fachverlag, Hamburg
49. **Sommer, R.** (1996): Yeast Extracts: Production, Properties and Components. Handout 9<sup>th</sup> International Symposium on Yeasts, Sydney

50. **Stahmann, K.-P., Revuelta, J. L., Seulberger, H.** (2000): Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:509-516
51. **Stülke, J.; Hillen, W.** (2000): Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annual Reviews in Microbiology* 54:849-880
52. **Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., Hecker, M.** (1999): Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181:6996-7004
53. **Uhlig, H.** (1991): *Enzyme arbeiten für uns*. Carl Hanser Verlag München, Wien
54. **van Loon, A. P. G. M., Hohmann, H.-P., Bretzel, W., Hümbelin, M., Pfister, M.** (1996): Development of a fermentation process for the manufacture of riboflavin. *Chimia* 50:410-412
55. **van Veldhoven, P. P., Mannaerts, G. P.** (1987): Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar Range. *Analytical Biochemistry* 161:45-48













