



(12) Wirtschaftspatent

Korrigiert gemäß § 23 Absatz 2 Anordnung
über die Verfahren vor dem Patentamt(19) **DD** (11) **232 309 C2**

4(51) C 12 P 7/48

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 P / 265 195 0	(22)	12.07.84	(44)	30.09.87
				(44)	22.01.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
 (72) Behrens, Ulrich, Prof. Dr. sc.; Ringpfeil, Manfred, Prof. Dr. sc. nat.; Stottmeister, Ulrich, Dr. rer. nat.; Weißbrodt, Erika; Karbaum, Klaus, Dr. rer. nat.; Hubald, Monika, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Citronensäure durch Hefen

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Fermentationsverfahren zur Herstellung von Citronensäure durch Citronen- und Isocitronensäure ausscheidende Hefen unter aeroben, submersen Bedingungen mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, mit dem Ziel, im wesentlichen nur Citronensäure in großen Mengen und mit hoher Produktivität zu akkumulieren. Es wird der Hefestamm *Saccharomycopsis lipolytica* H 181 ZIMET 43720 (Selektante) eingesetzt. Der säuretolerante Stamm verwertet u. a. n-Paraffine, Kohlenhydrate (z. B. Glucose, glucosehaltige Hydrolysate, Invertzucker, Triglyceride (z. B. Schweineschmalz, Rindertalg, Rinderklauenöl), niedere Alkohole, wie Äthanol, Glycerin und Fettsäuren, wie z. B. Essigsäure. Die Fermentationsparameter sind vorzugsweise pH 3,0 bis 5,0 und 28 bis 36°C. Es können große Mengen von z. B. 140 g/l Citronensäure mit nur geringem Isocitratanteil akkumuliert werden. Die Produktivität ist hoch. Ein Abfall der spezifischen Leistungsparameter des Stammes konnte auch über einen Zeitraum von mehreren Jahren nicht beobachtet werden. Die Anwendung der Erfindung liegt im Bereich der mikrobiologischen Produktsynthese.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Citronensäure durch Hefen, **dadurch gekennzeichnet**, daß der säuretolerante Hefestamm *Saccharomycopsis lipolytica* H 181 ZIMET 43720 bei einem pH-Wert von < 6,5, vorzugsweise 3,0 bis 5,0 und einer Temperatur von < 40°C, vorzugsweise 28 bis 36°C, unter aeroben, submersen Bedingungen in bekannter Weise kultiviert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Citronensäure durch Hefen unter aeroben, submersen Bedingungen in Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Verfahren zur mikrobiellen Gewinnung von Citronensäure werden seit Jahrzehnten praktiziert. Hierbei wird vorwiegend ein Stamm von *Aspergillus* genutzt und als Fermentationsverfahren das Schalenverfahren — auch Oberflächenverfahren genannt — angewendet. Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die Fermentation in der Produktionsphase autosteril abläuft, da die *Aspergillus* — Kulturen die Citronensäureproduktion auch bei pH-Werten zwischen 2 und 3 durchführen können. Das mit günstigeren Raum-Zeit-Ausbeuten arbeitende Submersverfahren konnte wegen der empfindlicheren, speziell für eine submerse Fermentation selektierten Stämme (Röhr, M. u. a.: An improved method for characterization of citrate production by conidia of *Aspergillus niger*, BIOTECHN. LETTERS 1 282.286 (1979) und den höheren Energiebedarf (Schierholt, J.: Fermentation Processes for the production of citric acid, PROCESS BIOCHEMISTRY 11, 20–21 (1977)) das Oberflächenverfahren nicht vollständig verdrängen. Außerdem muß der Rohstoff Melasse hinsichtlich des Schwermetallgehaltes behandelt werden. Es ist das Charakteristikum des Pilzes *Aspergillus niger*, daß er Citronensäure in größeren Mengen nur aus hexose- bzw. hexosehaltigen Substraten wie Glucose, Invertzucker oder Saccharose bilden kann. In den letzten Jahrzehnten sind zahlreiche Patente und akademische Publikationen über die Verwendung von Hefen als Citronensäureproduzenten erschienen (Zusammenfassende Literatur: Suzuki, Takeo: Production of organic acids, HAKKO TO KOGYO 35 (6) 459–71 (1977) und Stottmeister, U. u. a. Die Nutzung von Paraffinen und anderen Nichtkohlehydratkohlenstoffquellen zur mikrobiellen Citronensäuresynthese, Z. Allgemein. Mikrobiol. 22 (6) 399–424 (1982). Der Vorteil der Hefen ist ihre Fähigkeit, komplikationslos submers gezüchtet werden zu können und aus unterschiedlichen assimilierbaren Kohlenstoffquellen wie Glucose, Invertzucker, Fetten, Ölen, n-Alkanen, Essigsäure und Äthanol Citronensäure zu bilden. Nachteilig ist, daß in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und anderen Parametern der Fermentation mehr oder weniger viel Isocitronensäure mit ausgeschieden wird. So wird durch den Stamm *Candida* (*Saccharomycopsis*) *lipolytica* EH 59 ZIMET H 134 mit Glucose als C-Quelle etwa 10–20% und mit n-Alkanen als C-Quelle etwa 50% der Gesamtsäure als Isocitronensäure ausgeschieden. Ähnlich verhalten sich nahezu alle in der Literatur beschriebenen Citronensäure ausscheidenden Hefe-Wildstämme. Die Leistungen dieser Stämme sind sehr stabil, die erreichten Säurekonzentrationen hoch (Zusammenfassend in: Stottmeister, U. u. a.: Die Nutzung von Paraffinen und anderen Nichtkohlehydratkohlenstoffquellen . . . , Z. Allgemein. Mikrobiol. 22 (6) 399–424 (1982). Der Isocitratanteil ist jedoch bei der herkömmlichen Art der Aufarbeitung über eine Kalziumfällung nachteilig. Ein Citronensäure-Isocitronensäuregemisch ist schwer zur Kristallisation zu bringen. Bei einigen technischen Anwendungsgebieten der Citronensäure ist ein Anteil von Isocitronensäure durch die schlechteren Komplexbildungseigenschaften der letzteren nicht erwünscht. Aus diesem Grunde sind citronensäureausscheidende Stämme von Interesse, die einen sehr hohen Citronensäureanteil in der Gesamtsäure erreichen. Es ist nun über Mutationen und anschließende Selektionen gelungen, Citronensäure/Isocitronensäure ausscheidende Stämme so zu verändern, daß besonders bei der Nutzung von n-Alkanen als C-Quelle, fast nur Citronensäure ausgeschieden wird.

Bei den in der Literatur zu findenden Aussagen über die Stämme mit der spezifischen Leistung, fast nur Citronensäure zu bilden, fehlen Angaben über die Stabilität und Konstanz dieser Leistung. Von vielen Mutanten ist allgemein bekannt, daß sie unkontrollierbaren Rückmutationen unterliegen können.

Der Weg über die Mutation mit einer anschließenden Selektion zum Erhalten von Stämmen mit spezifischen Leistungen ist mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden, wobei die Erfolgsquote derartiger Arbeiten unsicher ist. Die Nachteile der bisherigen Verfahren liegen bei der Verwendung von *Aspergillus* sp. in den zusätzlichen Aufwendungen für die submerse Fermentation und bei der Nutzung von Hefen darin, daß Stämme mit einer spezifischen Leistung mutativ gewonnen werden und daß Angaben über die Stabilität der so gewonnenen Stämme fehlen. Ferner besitzen auch die meisten Mutanten noch die deutlich ausgeprägte Eigenschaft, Isocitronensäure zu bilden (z. B. DE — OS 2264763 Benckiser GmbH 1972).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, mit einer Hefe aus unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im wesentlichen nur Citronensäure durch ein Fermentationsverfahren in großen Mengen und mit hoher Produktivität zu akkumulieren.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Hefestamm zu selektieren, der in der Lage ist, in einem aeroben, submersen Fermentationsverfahren, überwiegend Citronensäure zu produzieren. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man den Hefestamm *Saccharomycopsis lipolytica* H 181 ZIMET 43720 in bekannten Medien bei einem pH-Wert von < 6,5 vorzugsweise bei 3,0 bis 5,0 und bei einer Temperatur < 40°C, vorzugsweise bei 28 bis 36°C kultiviert. Der Stamm zeichnet sich dadurch aus, daß er den verschiedensten assimilierbaren Kohlenstoffquellen wie z. B. Glucose, glucosehaltigen Hydrolysaten, Invertzucker, n-Paraffinen, Triglyceriden wie Schweineschmalz, Rindertalg, Klauenöl u. a., Äthanol, Glycerin, Essigsäure bzw. Acetat in Gegenwart einer mineralischen Nährlösung und Wuchsstoffen (wie z. B. Hefeautolysat, Thiamin) wächst und mit stabiler Leistung große Mengen Citronensäure mit einem sehr geringen Isocitronensäuregehalt ausscheidet. Eine weitere wesentliche Eigenschaft des Stammes ist darin begründet, daß er unterschiedliche C-Quellen wie z. B. n-Paraffin und Glucose auch im Gemisch gleichzeitig verwerten kann oder aber daß man unterschiedliche C-Quellen zu unterschiedlichen Zeiten verwendet, wie z. B. für die Wachstumsphase Paraffin und für die Produktbildungsphase Glucose oder umgekehrt. Nach der Auszehrung der Stickstoffquelle des Mineralsalzmediums, die mit einer Einstellung des replikatorischen Wachstums verbunden ist, setzt neben einer Reservestoffbildung die Citronensäureausscheidung ein. Der Stamm behält seine Eigenschaft, Citronensäure mit einer hohen Geschwindigkeit bei erreichbaren hohen Endkonzentrationen und einem geringen Isocitronensäureanteil zu bilden, unverändert über einen langen Zeitraum. Nachfolgend wird der neue Stamm charakterisiert.

1. Morphologische Eigenschaften

a) Kolonien (Malzagar, 48 Stunden)

- Größe: 2 mm
- Farbe: creme
- Form: rund — unregelmäßig
- Formquerschnitt: terrassenförmig
- Rand: wellig, fädig durch Mycel
- Oberfläche: matt und rau (mycoides Wachstum)
- Konsistenz: butterartig
- spätere Stadien:
 - auf Malzagar
 - Formquerschnitt: erhaben
 - Oberfläche: haarig und im Zentrum wulstig
 - auf Glucoseagar
 - Formquerschnitt: erhaben
 - Oberfläche: wulstig

b) Zellen

- Größe: 3–4 µm × 5–8 µm, längsgestreckte bis 20 µm und länger
- Form: ovoid bzw. längsgestreckt
- Pseudomycel: ja
- septierte Hyphen: ja

2. Physiologisches Parameter

a) Assimilierung der Substrate

D-Galactose	variabel
L-Sorbose	+ positiv
D-Ribose	variabel
L-Arabinose	– negativ
D-Arabinose	– negativ
L-Rhamnose	– negativ
Sucrose	– negativ
Maltose	– negativ
Trehalose	– negativ
Cellulose	– negativ
Salicin	– negativ
Arbutin	– negativ
Melibiose	– negativ
Laktose	– negativ
Raffinose	– negativ
Melezitose	– negativ
Inulin	– negativ
Stärke	– negativ
Erythrit	+ positiv
Ribit	– negativ
Galactitol	– negativ
D-Glucitol	variabel
m-Inositol	– negativ
Gluconolacton	+ positiv
DL-Lactat	variabel
Citrat	variabel
ohne Vitamine	– negativ

b) Fermentation

– negativ

In den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert:

Beispiel 1

6l Medium folgender Zusammensetzung

NH ₄ Cl	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,7 g/l
MgSO ₄	0,35 g/l
CUSO ₄ · 5 H ₂ O	0,001 g/l
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,015 g/l
ZnCl ₂	0,01 g/l
Glucose	75,0 g/l

aufgefüllt mit Leitungswasser, wurden bei 120°C 30 min. sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurden 6 mg/l Thiaminhydrochlorid (gelöst in 10 ml destilliertem Wasser und durch Filtration kalt sterilisiert) sowie 300 ml einer 24 Stunden gewachsenen Kultur der Hefe *Saccharomycopsis lipolytica* H 181 ZIMET 43720 als Inokulum zugesetzt.

Medium für Inokulum:

NH ₄ Cl	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	0,7 g/l
MgSO ₄	0,35 g/l

CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,001 g/l
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,015 g/l
ZnCl ₂	0,01 g/l
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,004 g/l
H ₃ BO ₃	0,04 g/l
Hefeextrakt	2,0 g/l
Glucose	20,0 g/l

unter Verwendung von Leitungswasser gelöst.

Die Fermentation wurde in einem 10l Rührfermentor mit 4l Füllvolumen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Jeweils nach 50 und 80 Stunden wurden insgesamt 500g Glucose in Form einer sterilen 75%igen Lösung zudosiert.

Fermentationsbedingungen:

Temperatur 30 ± 1°C, Luftmenge 200l/h, Rührung 188 U/min, Entschäumerzugabe, pH-Regulierung während der Wachstumsphase auf pH 4,5 mit 20%iger NaOH, pH-Regulierung während der Produktionsphase auf pH 4,0 mit 40%iger NaOH. Nach 144 Stunden wurde die Fermentation abgebrochen. Die Konzentration an Citronensäure und Isocitronensäure betrug in der Fermentationslösung 100g/l. Der Anteil an Isocitronensäure betrug 6%. Nach einer Berücksichtigung der Volumenkorrektur (Volumenvergrößerung durch Lauge- und Substratnachdosierung) ergab sich eine Produktionsleistung, die einer Endkonzentration von 140g/l Säure entsprach.

Beispiel 2

Jeweils 50ml eines Mineralsalzmediums nach Beispiel 1 wurden in einen gezahnten Schüttelkolben gefüllt, mit 4g/l CaCO₃ und 6ml Parex-Paraffin (Kettenlängen C₁₀-C₂₀, bevorzugt C₁₃-C₁₆) versetzt und bei 121 °C 20 min. autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden dem Kolben 0,05mg Thiaminhydrochlorid in Form einer sterilen wässrigen Lösung sowie 5ml Inoculum zugesetzt, die wie in Beispiel 1 beschrieben, angezüchtet wurde, jedoch statt Glucose 20g/l Paraffin enthielt.

Der Kolben wurde bei 30°C auf einem Rotationsschüttler 90 Stunden geschüttelt. Der pH-Wert wurde durch CaCO₃-Zugabe zwischen 3,0-6,5 gehalten. Nach der Beendigung der Fermentation betrug der Gehalt an Citronensäure 57g/l. Der Isocitronensäureanteil betrug 2,3g/l.

Beispiel 3

Die Fermentation wurde wie im Beispiel 2 durchgeführt, jedoch wurde anstelle des Paraffins 5g Triglycerid in Form des tierischen Fettes Schweineschmalz zugesetzt. Die Anzucht des Inokulums erfolgte wie im Beispiel 1, es wurde jedoch anstelle der Glucose 25g/l Schweineschmalz zugesetzt. Nach einer Schütteldauer von 116 Stunden betrug die Konzentration an Citronensäure und Isocitronensäure 65g/l. Der Isocitronensäureanteil betrug 12%.

Beispiel 4

Stabilitätstest und semikontinuierliche Fermentation

Nach Beispiel 2 wurde eine Fermentation über 4 Tage durchgeführt, danach wurden 9/10 des Volumens unter aseptischen Bedingungen aufgefüllt und anschließend 4 Tage fermentiert. Diese Prozedur wurde 10mal wiederholt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Endkonzentration Citronensäure + Isocitronensäure (g/l)

Satz 1	55	5
Satz 10	54	6

Es ist im Sinne dieser Erfindung, die Fermentation unter satzweisen, semikontinuierlichen und kontinuierlichen Bedingungen durchzuführen und eine Erhöhung der Produktbildungsgeschwindigkeit durch eine Erhöhung der Biomassekonzentration zu bewirken.

Beispiel 5

Die Kultivierungen wurden nach Beispiel 1 sowohl mit Glucose, als auch mit Paraffin (150g/l) durchgeführt. Zur Beimpfung diente jedoch eine Abimpfung des erfindungsgemäß beschriebenen Stammes aus einer Stammhaltung, in welcher der Stamm über 51 Monate nach folgender Methode gehalten worden war.

Schrägagarkultur (Mediumzusammensetzung wie Beispiel 1 für das Inokulum angegeben) Überimpfung zwei- bis dreiwöchentlich. Die Ergebnisse hinsichtlich erzielter Endkonzentration an Gesamtsäure, wie auch der Anteil an Isocitronensäure entsprachen denen, die bei Beginn der Stammhaltung erzielt wurden:

Glucose 150g/l, Dauer 110h, Gesamtsäure 84g/l, davon 3,5g/l Isocitronensäure.

Paraffin 150g/l, Dauer 110h, Gesamtsäure 120g/l, davon 8g/l Isocitronensäure.

Beispiel 6

Nach Beispiel 2 wurde eine Fermentation mit Mischsubstrat durchgeführt, indem gleichzeitig mit 6ml Paraffin 2g Glucose pro 50ml Mineralsalzmedium vorgegeben wurden. Nach 90 Stunden Fermentationszeit betrug der Gehalt an Citronensäure 77g/l. Der Isocitronensäuregehalt betrug 5,6g/l.