



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 144 792

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 144 792 (44) 05.11.80 3(51) C 12 P 7/48

(21) WP C 12 D / 214 170 (22) 06.07.79

-
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD
(72) Weißbrodt, Erika; Behrens, Ulrich, Dr. Dipl.-Chem.; Stottmeister, Ulrich, Dr. Dipl.-Chem., DD
(73) siehe (72)
(74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Institut für technische Chemie, Arbeitsgruppe Patentwesen, 7050 Leipzig, Permoserstraße 15
-

(54) Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure durch Hefen

(57) Das Ziel der Erfindung besteht darin, bakterielle Infektionen, die bei dem pH-Optimum der Zitronensäure-Synthese von 5 bis 6 auftreten, zu beseitigen oder zu begrenzen. Erfindungsgemäß wird das Wachstum der Hefen in einem pH-Bereich zwischen 5 und 6 bevorzugt durch eine Puffersubstanz, wie z.B. CaCO₃, gehalten, während er in der nachlogarithmischen Phase auf 2 bis 3 bevorzugt durch die Eigensäuerung für einen längeren Zeitraum gesenkt wird, wodurch die weniger säuretoleranten Bakterien inaktiviert werden. Die Erfindung ist für die Herstellung von Zitronensäure mit Hefen anwendbar.

EEC EPO EPO

7 Seiten

AEP 857

Titel

Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure durch Hefen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung gehört in das Gebiet der mikrobiellen Produktsynthese, in die IPK V 12 D.

Die Erfindung kann genutzt werden, um bei der Herstellung von Zitrat und/oder Isozitrat durch Hefen, unter aeroben, submersen Bedingungen aus verschiedenartigen Kohlenstoffquellen, wie Glukose, Saccharose, n-Alkanen, Äthanol oder Essigsäure nach diskontinuierlicher oder semikontinuierlicher Betriebsweise bakterielle Infektionen zu verringern oder zu vermeiden.

Bekannte technische Lösungen

Zitronensäure wird seit über fünfzig Jahren durch oxidative Gärung des Pilzes Aspergillus niger aus saccharosehaltigen Lösungen, wie Melasse oder aus Glukoselösungen gewonnen. Seitdem es bekannt geworden ist, daß auch bestimmte Hefen Zitronensäure - meist zusammen mit Isozitronensäure - in relativ großer Menge unsscheiden können und daß als Kohlenstoffquelle neben Sacchariden auch Kohlenwasserstoffe, wie n-Alkane von einer Kettenlänge C₁₀ bis etwa C₂₀, Äthanol oder Essigsäure geeignet sind (Tabuchi, T., Tanaka, Y., Abe: J. Agr. Chem. Soc. Jap. 43, 154 (1969); Abe, M., Tabuchi, Y.: J. Agr. Chem. Soc. Jap. 44, 493 (1970)), sind in zahlreichen Patenten unter-

schiedliche Wege zur Herstellung von Zitronensäure mit Hefen beschrieben worden (DE-OS 2005848), (DE-OS 2028933), (DE-OS 2109094).

Besonders hohe Produktausbeuten wurden mit Stämmen der Hefeart *Candida lipolytica* erzielt (DE-OS 2050361; JA 72/24.152 29.10.69/4.7.72). Aber auch über die Gewinnung leistungsfähiger Mutanten wurde berichtet, wobei das Hauptziel die Unterdrückung der Isozitratsynthetase ist (DE-OS 2264764, DE-OS 2521469).

10 Die Fermentation kann diskontinuierlich, semikontinuierlich oder auch kontinuierlich durchgeführt werden (DE-OS 2360091).

Typisch für den Verlauf einer diskontinuierlichen Zitronensäurefermentation ist die Trennung von Wachstums- und

15 Produktbildungsphase. Produktbildung setzt erst ein, wenn das Wachstum zum Erliegen kommt, was allgemein durch Auszehren der N-Quelle erreicht wird.

Die Wachstumsphase dauert etwa 18 bis 24 Stunden, die Produktionsphase bis zu 6 bis 7 Tagen. Das pH-Optimum für 20 das Wachstum liegt allgemein zwischen 4 und 5, pH-Werte bis hinunter zu 2,5 werden von Hefen häufig toleriert, ohne daß allerdings noch Wachstum auftritt (A.H. Cook: The Chemistry and Biology of Yeasts, S. 304, Academic press, New York, 1958).

25 Das pH-Optimum für die Produktbildung liegt zwischen pH 5 und 6,5 (Nakanishi, T. et al., J. Ferm. Technol. 50, S 855 (1972)), obwohl ein Hefestamm beschrieben wurde, der bis hinunter zu einem pH-Wert von 2 noch produktiv bleibt (DE-OS 2134826).

30 Wird während der Produktionsphase der pH-Wert unter 4, auf etwa 3,5 gesenkt, tritt eine Verringerung der Zitronensäureakkumulation zugunsten von Polyolausscheidung ein.

Grundsätzlich wird unter aeroben, submersen Bedingungen bei Temperaturen um 30 °C fermentiert.

Der Nachteil der in üblicher Weise durchgeführten diskontinuierlichen und semikontinuierlichen Verfahren liegt in der Gefahr des Auswachsens bakterieller Infektionen. Durch die Notwendigkeit, die Stickstoffquelle auszehren zu müssen, um den Stillstand des Wachstums zu erreichen, wird die nachlogarithmische Phase des Wachstums stark verlängert, so daß für schnellwüchsige bakterielle Infektionen die Gelegenheit einer starken Vermehrung gegeben ist. Besonders bei semikontinuierlichen Verfahren, wo nicht mit neu gezüchteten Kulturen angeimpft wird, sondern wo ein Rest der ausfermentierten Produktionskultur im Fermentor als Impflösung belassen wird (meist 1/10 des Füllvolumens), ist die Unterdrückung des Wachstums von Fremdorganismen – als solche kommen hier nur Bakterien in Betracht – von besonderer Bedeutung. Bei semikontinuierlicher Betriebsweise würde eine Infektion mit Fremdorganismen den Abbruch der Fermentation erforderlich machen.

Ziel der Erfindung

Es ist daher das Ziel der vorliegenden Erfindung, Maßnahmen vorzuschlagen, die bei diskontinuierlichen oder semikontinuierlichen Verfahren das Auswachsen von Bakterien verhindern.

Merkmale der Erfindung

Erfindungsgemäß wird das Ziel dadurch erreicht, daß etwa bei Beendigung der logarithmischen Wachstumsphase der pH-Wert der Lösung gesenkt wird, wodurch die weniger säuretoleranten Bakterien im Wachstum gehemmt oder gar geschä-

digt werden. Zweckmäßigerweise wird die Senkung des pH-Wertes durch die physiologische Säuerung und durch die nachfolgende Eigensäuerung, bedingt durch die Ausscheidung von Zitronen- und Isozitronensäure, erreicht.

5 Die Bestandteile des Nährmediums müssen daher so gewählt sein, daß die Pufferkapazität in der nachlogarithmischen Phase so gering ist, daß eine Säuerung des Mediums nicht verhindert wird. Zweckmäßigerweise werden für die Gewährleistung des pH-Optimums für das Wachstum während der 10 logarithmischen Phase (pH 4) und für die Absenkung des pH-Wertes in der nachlogarithmischen Phase solche Verbindungen gewählt, die essentielle Bestandteile des Nährmediums sind und deren Wirkungsweise im Sinne der vorliegenden Erfindung keinerlei zusätzlicher Manipulationen 15 bedarf. Solche Verbindungen sind z.B. Kalziumsalze, wie CaCO_3 . Eine bestimmte Menge an CaCO_3 verhindert während des logarithmischen Wachstums das Absinken des pH-Wertes; die Menge muß aber so gewählt sein, daß in der nachlogarithmischen Phase der pH-Wert langsam fällt, jedoch in 20 einem Bereich bleibt, der die Aktivität der Produktionshefen nicht gefährdet. Dieser Bereich liegt zwischen 2,0 und 3,5. Er kann jedoch bei besonders säuretoleranten Hefen noch tiefer liegen. Die vorzulegende Menge an Ca-Ionen wird von vielerlei Faktoren bestimmt, wie Menge der 25 Biomasse, Maß der physiologischen Säuerung (das von den freisetzbaren Kationen der Bestandteile der Nährsalze abhängt), erwünschter End-pH-Wert u.a. Durch experimentelle Untersuchungen läßt sich die vorzulegende Menge des Kalziumsalzes oder eines anderen im Sinne der Erfindung 30 wirkenden Salzes unschwer bestimmen, (z.B. 0,1 bis 0,5 %, bevorzugt 0,2 bis 0,3 %, bezogen auf 10 g Hefetrockensubstanz). Es ist durchaus im Sinne der Erfindung, auch durch Zugabe einer Säure den gewünschten pH-Wert einzustellen, wobei hierfür nicht nur Mineralsäuren, sondern

auch die produzierten Säuren selbst oder andere organische Säuren dienen können. Die Phase des erniedrigten pH-Wertes beträgt ca. 0,5 bis 10 Stunden.

An nachfolgendem Beispiel wird die Erfindung näher erläutert.

Beispiel:

Stamm: *Candida lipolytica*

Medium (für etwa 10 g/l Biomasse): NH_4Cl 3,0 g; CaCO_3 2,5 g; KH_2PO_4 0,8 g; MgSO_4 0,4 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 10 0,04 g; ZnCl_2 0,018 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g auf 1 l wurden mit Leitungswasser aufgefüllt. Zu 1 l Medium wurden 160 ml n-Alkane ("Parex, C_{11} bis C_{19} , bevorzugt C_{13} bis C_{16}) gegeben.

Das Medium wurde bei 120 °C 30 min erhitzt. Nach dem Erkalten wurde auf 1 l wäßrige Lösung 1 mg Thiamin-HCl, als wäßrige Lösung durch Filtration sterilisiert, gegeben. Der pH-Wert liegt nach der Sterilisation bei 6,0.

Kultivierung: In einen sterilisierten 200 l Rührfermentor wurden 160 l Medium unter aseptischen Bedingungen gefüllt 20 und mit 10 l einer 24 Stunden gewachsenen Kultur (Medium wie oben beschrieben, lediglich der Paraffinanteil auf 30 ml/l reduziert) beimpft. Die Temperatur wurde bei 30 °C (± 1 °C) gehalten. Der Luftdurchsatz betrug $10 \text{ m}^2/\text{h}$. Die logarithmische Phase des Wachstums war nach 12 Stunden 25 beendet. Während dieser Zeit blieb der pH-Wert bei 6 bis 6,2 und fiel danach innerhalb von 12 Stunden auf 2,3.

Auf dieser Stufe wurde der pH-Wert für weitere 4 Stunden belassen. Für eine optimale Zitronen-Isozitronensäure-ausscheidung wurde der pH-Wert auf 5,5 gehoben und bei 5,2 30 durch 20% NaOH-Lösung automatisch gehalten.

214170 -6-

Patentanspruch

Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure durch Hefen aus verschiedenen Kohlenstoffquellen, wie Glukose, n-Alkane, Azetat und Äthanol, unter submersen, aeroben
5 Bedingungen nach diskontinuierlicher oder semikontinuierlicher Betriebsweise, dadurch gekennzeichnet, daß während des logarithmischen Wachstums der pH-Wert durch eine Puffersubstanz, vorzugsweise CaCO_3 , in einer Konzentration von 0,1 bis 0,5 %, bevorzugt 0,2 bis 0,3 %,
10 berechnet für 10 g Hefebiomasse als Trockensubstanz, im optimalen Bereich zwischen pH 5 und pH 6 gehalten wird und in der nachlogarithmischen Phase des Wachstums der pH-Wert für einen Zeitraum zwischen 0,5 und 10 Stunden auf einen Bereich unter pH 4, vorzugsweise zwischen pH 2 und pH 3 abgesenkt wird.