



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 319 833 4	(22)	15.09.88	(44)	24.01.90
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	VE Forschungszentrum Biotechnologie Berlin (PKG), Alt-Stralau 62, Berlin, 1017, DD
(72)	Kaiser, Manfred, Dipl.-Chem.; Nölte, Doris, Dr.-Ing., Dipl.-Ing.; Weizenbeck, Eberhard, Dipl.-Ing.; May, Ulrich, Dipl.-Chem.; Kreibich, Günter, Dipl.-Ing.; Behrens, Ulrich, Prof. Dr. sc.; Stottmeister, Ulrich, Dr. sc. nat.; Weißbrodt, Erika; Schmidt, Jörg, Dr. Dipl.-Chem.; Richter, Hans-Peter, Dr. Dipl.-Ing.; Düresch, Rolf, Dr. Dipl.-Ing.; Schulze, Torsten, Dipl.-Ing., DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure durch aerobe submerse Kultivierung von Hefen
------	--

(55) Zitronensäure, Isozitronensäure, Kultivierung, Hefen, Prozeßdruck, Biomassekonzentration, Ökonomie, Ausbeuteerhöhung, lineare Proportionalität

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure durch aerobe submerse Kultivierung von Hefen. Die fermentative Herstellung der Zitronensäure erfolgt bevorzugt mit dem Stamm *Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica* EH 59 – ZIMET 134 – oder *Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica* H 181 – ZIMET 43.720 – für den Einsatz in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie und als Industriechemikalie. Durch Fermentation unter Prozeßdruck von 0,15–0,3 MPa, vorzugsweise 0,2 MPa, und bei einer Biomassekonzentration bis zu $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, wird die Produktivität gegenüber vergleichbaren Verfahren erhöht und die Ökonomie des Verfahrens verbessert. Durch die erfindungsgemäße Verfahrensweise erhält man die lineare Proportionalität zwischen Biomasse und Produktivität, was gemäß Stand der Technik bisher nur für Fermentationen mit Biomassekonzentrationen von $\leq 20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ erreicht worden ist.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure durch aerobe submerse Kultivierung von Hefen der Gattung *Yarrowia* (*Saccharomycopsis*) *lipolytica* auf Kohlenhydratbasis, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Kultivierung der Hefe mit einem Prozeßdruck von $> 0,15$ MPa bis $0,3$ MPa, vorzugsweise $0,2$ MPa, und bei einer bilanzierten Biomassekonzentration von 20 bis $40 \text{ g HTS} \cdot \text{kg}^{-1}$ gearbeitet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure durch aerobe submerse Kultivierung von Hefen für den Einsatz in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie und als Industriechemikalie.

Charakteristik bekannter technischer Lösungen

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Zitronensäure sind seit langer Zeit bekannt.

Neben den klassischen Verfahren zur Erzeugung von Zitronensäure mit Hilfe der Emers- bzw. Submerstechnologie von Pilzkulturen, vorrangig *Aspergillus niger* auf Melassebasis, wird in immer stärkerem Maße die Synthese auf der Basis von Hefen unter aeroben submersen Kulturbedingungen genutzt. Dabei kommt eine breite Palette von Kohlenstoffquellen wie n-Alkane, Kohlenhydrate, Essigsäure, Fette, Alkohole zum Einsatz. Die Verwendung von Hefen bietet u. a. den Vorteil, daß aufgrund der Unempfindlichkeit gegenüber mechanischer Beanspruchung Hochleistungsfermentoren eingesetzt werden können, die hinsichtlich des O_2 -Eintrages hohe Biomassekonzentrationen und damit hohe Produktivität zulassen.

Aus der Definitionsgleichung für die Produktivität

$P = k_p \cdot x$	
$P (\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	– Produktivität
$k_p (\text{h}^{-1})$	– spezifische Produktbildungsgeschwindigkeit
$x (\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	– Biomassekonzentration

ist abzuleiten, daß die Steigerung der Produktivität sowohl durch Verbesserung der spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeit als auch durch Erhöhung der aktiven (bilanzierten) Biomassekonzentration möglich ist. Zahlreiche Patentanmeldungen und Literaturberichte befassen sich mit der Steigerung der Produktivität durch Verbesserung der Ausbeute bzw. der Produktbildungsgeschwindigkeit. Hierbei nimmt die Erhöhung des Zitronensäure-/Isozitronensäure-Verhältnisses einen breiten Raum ein, da bei der fermentativen Herstellung mittels Hefen der weniger erwünschte Isozitatanteil sehr hoch sein kann. Vom Einsatz ausgewählter Hefearten, Mutanten und Selektanten (DE-OS 2.115.514; DE-AS 1.812.710; DD-WP 130.046; DD-WP 232.309; Ikeno, Y., et al. [1975], J. Ferm. Technol. 53, 752–756) bis hin zum Zusatz von Substanzen zur Beeinflussung des Biochemismus der Hefezelle wie Fluoracetat, Cyanoessigsäure, organische heterocyclische Verbindungen (DE-OS 2.212.929; DE-OS 2.360.091; DE-OS 2.451.484; US-PS 3.717.549) sowie dem Einsatz von ausgewählten Substraten bzw. Substratkombinationen (DD-WP 139.870; Asenjo, I., et al. [1982] Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 111–120; Franke-Rinker, D., und Mitarbeiter [1983] Zeitschr. Allg. Mikrobiol. 23, 1, 9–16; US-PS 4.178.211) reichen die Maßnahmen.

Obwohl im Hinblick auf die Erhöhung der spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeit bzw. der Ausbeute ein beachtliches Niveau erreicht worden ist, wird ein Produktivitätsniveau von $1,0$ bzw. $1,5 \text{ g/kg} \cdot \text{h}$ nicht überschritten, da zugunsten hoher Produktbildungsgeschwindigkeiten die aktive (bilanzierte) Biomassekonzentration auf relativ niedrige Werte ($\leq 20 \text{ g/kg}$) eingestellt wurde (DD-WP 149.875; Marchal et al. [1977] Europ. J. Appl. Microbiol. 4, 111–123).

Fortschritte im Sinne einer Reduzierung von kostenintensiver Fermentationstechnik werden nur dann erreicht, wenn es gelingt, hohe spezifische Produktbildungsgeschwindigkeiten bei hohen Biomassekonzentrationen zu realisieren.

Unter diesem Aspekt sind nur wenige Vorschläge bekannt (DD-WP 204.942; US-PS 4.414.329; Enzminger, J., und Mitarbeiter [1986] Biotechn. Letters 8, 1, 7–12). Letztere sind dadurch gekennzeichnet, daß zwar die angestrebte Produktivitätssteigerung, jedoch nicht die laut Definitionsgleichung mögliche lineare Proportionalität erreicht wird.

Es gibt auch zahlreiche Untersuchungen zum Einfluß des Gelöstsauerstoffes und Sauerstoffbedarfs auf die Produktion von Zitronensäure (Stottmeister, U., und Mitarbeiter, Sammelbericht [1982] Zeitschr. Allg. Mikrobiologie 22, 6, 414–415). Daher ist bekannt, daß die Kultivierung von Hefen unter erhöhtem Prozeßdruck bei O_2 -verbrauchsintensiven Prozessen zur Erhöhung der Sauerstofflöslichkeit angewandt wird (z. B. Futterhefeproduktion).

Die Angaben zur Wirkung des Sauerstoffs auf die Zitronensäurebildung sind zum Teil widersprüchlich, aber im Ergebnis der Untersuchungen ist festgestellt worden, daß eine Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration über einen Grenzwert (40 bis 50% der Luftsättigung) keine Erhöhung der Zitronensäurebildung bewirkt (Marchal, R., et al. [1977] Europ. J. Appl. Microbiol. 4, 111–123; Biffaud, J., Engasser, M., [1979] Biotechnol. Bioeng. XXI, 2083–2093). Bei Untersuchungen des Druckes selbst sowie der Anwendung von reinem Sauerstoff zur Beeinflussung der Zitronensäureproduktion wurde festgestellt, daß weder der Druck noch reiner Sauerstoff im untersuchten Bereich von $1,0$ bis $6,0 \text{ atm}$, entsprechend $0,1$ bis $0,6 \text{ MPa}$, einen signifikanten Einfluß auf die Zitronensäureproduktion zeigen (Okoshi, H. [1987] Agric. Biol. Chem. 51 [1], 257–258).

Im DD-WP 239.610 wird auf die Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeute bei der Zitronensäureherstellung mittels Hefen durch differenzierte Führung der Gelöstsauerstoffkonzentration in den einzelnen Fermentationsphasen eingewirkt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß alle Bemühungen zur Verbesserung der Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Zitronensäure zwar Produktivitätssteigerungen bewirken, jedoch bei Biomassekonzentration $> 20 \text{ g HTS l}^{-1}$ nicht die aus der theoretischen Betrachtung zu erwartende lineare Proportionalität erzielt wird.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, bei der fermentativen Herstellung von Zitronensäure mittels Hefen die Produktivität zu erhöhen und damit die Investkosten für Fermentationstechnik zu senken.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ausgehend von der Erhöhung der bilanzierten Biomassekonzentration, bei Einhaltung bestimmter Prozeßparameter, eine lineare Proportionalität zwischen Produktivität und aktiver (bilanzierter) Biomassekonzentration zu erreichen. Anhand der Beispiele 1 und 2 ist zu erkennen, daß bei druckloser Fermentation (0,10 MPa) dieses Ziel nicht erreicht wird, obwohl eine ausreichende Sauerstoffversorgung garantiert war. Dieses Ergebnis entspricht dem dargestellten Stand der Technik.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß bei einem Prozeßdruck von 0,15–0,30 MPa, vorzugsweise 0,2 MPa, die lineare Proportionalität zwischen Produktivität und aktiver (bilanzierter) Biomassekonzentration in den Grenzen zwischen $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ und $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ erreicht wird.

Dieses Ergebnis war nicht vorhersehbar, da üblicherweise der Prozeßdruck zur Erhöhung der O_2 -Löslichkeit eingesetzt wird und darüber hinaus gehende Wirkungen aufgrund der komplexen Vorgänge an und in der Zelle nicht logisch abgeleitet, sondern nur durch umfangreiche experimentelle Untersuchungen ermittelt werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur fermentativen Herstellung von Zitronensäure wird im einzelnen wie folgt durchgeführt:

In bekannter Weise in mehreren Stufen angezüchtetes Impfmateriel von Hefen der Gattung *Yarrowia* (*Saccharomycopsis*) *lipolytica*, insbesondere der Stamm H 181-ZIMET 43 720 oder EH 59 ZIMET 134 (DD-WP 232.309 bzw. DD-WP 130.046) dient zum Beimpfen des Fermentationsmediums im Verhältnis von 1:10 bis 1:20.

Das Fermentationsmedium enthält bekannte Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sowie die übrigen bekannten Zusätze wie Nährsalze, Spurenelemente und Vitamine. Die Zugabe von Stimulatoren und Fällungsmitteln ist nicht erforderlich. Als Kohlenstoffquelle werden Kohlenhydrate, bevorzugt Monosaccharide, eingesetzt. Die Stickstoffquellen in Form von Ammoniumsalzen befindet sich zu Beginn der Fermentation in der Menge im Fermentationsmedium, daß während der Wachstumsphase 20 bis $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Kulturlösung, gebildet werden, während die Kohlenhydratmenge vollständig oder teilweise nachdosiert wird. Die im Prozeß anliegende Kohlenhydratkonzentration wird von $150 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ auf $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ während des Wachstums abgesenkt und dann zwischen 5 und $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, vorzugsweise $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, gehalten. Bei vollständigem feeding von Glukoselösung wird die Konzentration ebenfalls zwischen 5 und $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, vorzugsweise $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, gehalten. Der pH-Wert liegt in der Wachstumsphase bei 4,5 und wird in der Produktbildungsphase je nach verwendetem Hefestamm zwischen 3,5 und 5,0 statiert. Seine Regulierung erfolgt in bekannter Weise durch Zugabe von Puffersubstanzen zum Fermentationsmedium oder durch Zugabe von Lauge während der Fermentation. Die Sauerstoffversorgung der Kultur erfolgt in bekannter Weise derart, daß der Sauerstoffpartialdruck von 100% Sättigung zu Beginn der Fermentation auf 15% abgesenkt, in der Übergangsphase bei $\leq 40\%$ gehalten und zu Beginn der Produktbildungsphase auf 60% erhöht wird. Erfindungsgemäß erfolgt diese Arbeitsweise jedoch bei einem Druck von 0,15–0,3 MPa. Die Fermentationsdauer beträgt 100 bis 150 Stunden. Die Aufarbeitung der Fermentationslösung und die Gewinnung der Zitronensäure erfolgen nach bekannten Methoden.

Bei der beschriebenen Verfahrensweise werden wesentlich höhere Raum-Zeit-Ausbeuten gegenüber den vergleichbaren herkömmlichen Verfahren erzielt. Die Raum-Zeit-Ausbeutesteigerung kann bis zu 100% betragen. Im Hinblick auf die vielfältigen im Stand der Technik dargelegten Bemühungen zur Intensivierung des Produktbildungsprozesses ist das erzielte Ergebnis im Verhältnis zur Einfachheit des Verfahrens überraschend. Darüber hinaus wird in Druckbereichen von 0,15–0,3 MPa energetisch günstig gearbeitet. Durch die Steigerung der Produktivität bis zu 100% wird in einer Produktionsanlage mit vorgegebener Produktionskapazität die zu installierende Fermenterkapazität bis zu 50% reduziert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in Rühr- oder Tauchstrahlfermentoren realisiert werden.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll an nachfolgenden Beispielen näher erläutert werden, wobei die Beispiele 1 und 2 als Stand der Technik zum Vergleich zur erfindungsgemäßen Verfahrensweise dienen.

Beispiel 1

(bilanzierte Biomassekonzentration $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, drucklos)

In einen 30-l-Rührfermenter werden 10 kg eines Mediums folgender Zusammensetzung gegeben:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$9,45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
KH_2PO_4	$1,68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	$0,048 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,053 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	$0,048 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	$8,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
Thiamin-HCl	$1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Die Sterilisation erfolgt in üblicher Weise 30 min bei 120°C .

Das Thiamin-HCl wird als wäßrige Lösung sterilfiltriert und anschließend zugesetzt. Die Animpfung erfolgt mit 2 kg Inoculum des Stammes *Yarrowia* (*Saccharosemycopsis*) *lipolytica* EH 59-ZIMET 134, der im Schüttelkolben auf einem Medium kultiviert wurde, das die gleichen Bestandteile wie das o. g. Produktionsmedium enthält.

Zusätzlich werden dem Medium

Glukose	$30,0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
Hefeextrakt	$2,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
Ca CO_3	$5,0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

zugesetzt.

Der Prozeßführung wurden folgende Parameter zugrunde gelegt:

Bilanzmasse (Anfangsmasse)	12 kg
bilanzierte Biomassekonzentration	$20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
pH-Wert	4,5
Wachstum	5,0
Produktbildung	5,0
pO ₂ -Regime (bezogen auf Normaldruck)	
Wachstum	100–15 % LS
Übergangsphase	$\leq 40 \geq 15 \%$ LS
Produktbildung	$\geq 60 \%$ LS
Prozeßdruck	drucklos
Prozeßdauer	100 h

Die Zuführung der C-Quelle erfolgte als Vorlage von $150 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Glukose mit Nachdosierung. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge statiert.

Unter den beschriebenen Bedingungen wurde eine mittlere Produktivität von $1,17 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}$ als Gesamtsäure (GZS) erreicht.

Beispiel 2

(bilanzierte Biomassekonzentration $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, drucklos)

Durch entsprechende Veränderung des angegebenen Mediums wurde die Biomassekonzentration auf $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ erhöht. Die Prozeßführung erfolgte analog der in Beispiel 1. Erreicht wurde eine mittlere Produktivität von $1,74 \text{ g GZS} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Beispiel 3

(bilanzierte Biomassekonzentration $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 0,2 MPa)

Verbunden mit einem Prozeßdruck von 0,2 MPa wurde die Fermentation bei sonst gleichen Prozeßbedingungen wie in Beispiel 1 angegeben geführt. Die erzielte mittlere Produktivität lag bei $1,37 \text{ g GZS} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Beispiel 4

(bilanzierte Biomassekonzentration $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 0,2 MPa)

Analog den in Beispiel 2 betriebenen Prozeßbedingungen wurde bei einem Prozeßdruck von 0,2 MPa fermentiert. Es wurde eine mittlere Produktivität von $2,08 \text{ g GZS} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erreicht.

Beispiel 5

(bilanzierte Biomassekonzentration $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 0,3 MPa)

Mit einer Biomassekonzentration $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, einem Glukosefeeding und einem Prozeßdruck von 0,3 MPa wurde die Fermentation analog dem Beispiel 1 durchgeführt.

Die mittlere Produktivität lag mit $2,77 \text{ g GZS} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ im Niveau der Linearität.