



Republik  
Österreich  
Patentamt

(11) Nummer: **AT 392 799 B**

(12)

## PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2461/89

(22) Anmeldetag: 25.10.1989

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1990

(45) Ausgabetag: 10. 6.1991

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> : **C12P 7/48**  
C12N 1/14, //(C12N 1/14,  
C12R 1:685)

(56) Entgegenhaltungen:

AT-PS 295448 AT-PS 296194 AT-PS 307346 US-PS2492673

(73) Patentinhaber:

JUNGBUNZLAUER AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1010 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

KIRKOVITS AUGUST E. DIPL.ING.  
STRONSDORF, NIEDERÖSTERREICH (AT).  
EDLAUER HELGA  
LAA/THAYA, NIEDERÖSTERREICH (AT).

(54) VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG VON ZITRONENSÄURE AUS KOHLEHYDRATEN

(57) Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Zitronensäure aus Kohlehydraten mittels eines Mikroorganismus der Gattung *Aspergillus niger* in einem Zinkionen und Hexacyanoferrationen enthaltenden Substrat, bei dem nicht vorgereinigte Kohlehydrate eingesetzt werden und der Zn-Gehalt des Substrats auf 30 - 250 ppm und der Hexacyanoferrat-Gehalt des Substrats auf 100 - 500 ppm eingestellt wird.

AT 392 799 B

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Zitronensäure aus Kohlehydraten mittels eines Mikroorganismus der Gattung *Aspergillus niger* in einem Zink und Hexacyanoferrat enthaltenden Substrat.

Bei der submersen Zitronensäuregärung unter Einsatz von *Aspergillus niger* aus relativ unreinem Kohlehydratmaterial ist der schädliche Einfluß von Eisenionen im Substrat schon lange bekannt.

Während beim Einsatz von hochreinen Kohlehydraten ein Gehalt von 2,0 ppm Fe im Substrat noch ohne weiteres tolerierbar ist, können bei relativ unreinen Kohlehydraten bereits 0,2 ppm Fe zuviel sein und es bilden sich große Mengen an nichtsäurebildendem *Aspergillus niger*-Myzel, während die Zitronensäurebildung drastisch abfällt. Man führt diesen Umstand auf das Vorliegen sogenannter "Eisenpotentioren" im Substrat zurück, die von den unreinen Kohlehydraten her stammen, z. B. Aminosäuren, und die negative Wirkung des Eisens in Richtung der Bildung des nichtsäurebildenden Myzels vervielfachen.

Man hat daher für Verfahren, die relativ unreine Kohlehydrate anwenden, nach Eisen-Antagonisten gesucht, und die US-PS 2 970 084 beschreibt den Einsatz von bis zu 500 ppm Cu im Substrat, um die Wirkung der Eisenpotentioren auszuschalten. Diese an sich wirkungsvolle Vorgehensweise ergibt aber als sehr unangenehme Nebenerscheinung die Anreicherung großer Mengen hochgiftiger Cu-Salze im Klärschlamm.

In der US-PS 2 492 673 ist ein anderer Fe-Antagonist beschrieben, nämlich Zink. Gemäß dieser Druckschrift wird zur Zitronensäuregärung von Invertmelasse mit *Aspergillus niger* die Invertmelasse mit einem Kationentauscher (H-Form) entkationisiert, wobei der Fe-Gehalt auf etwa 2 - 4 ppm gedrückt wird, und dann werden 10 - 30 Massenteile Zn pro Massenteil Fe zugesetzt, wobei der Gesamtzinkgehalt 150 ppm nicht überschreiten soll. Auch Zn-Salze sind jedoch kein besonders erwünschter Bestandteil der Klärschlämme, obwohl besser tolerierbar als Cu.

Aus der CH-PS 342 191 ist ein Vergleich von Cu und Zn als Fe-Antagonisten zu entnehmen, wobei angegeben ist, daß bei relativ unreinen Kohlehydraten, insbesondere bei nicht entkationisierten, der Einsatz von Zn gegenüber dem von Cu nachteilig ist. Grundsätzlich wird bei Zuckereinsatz das Cu dem Zn vorgezogen.

Die Erfindung geht aus von einem Substrat, das sowohl Zn-Ionen als auch Hexacyanoferrat-Ionen enthält.

Hexacyanoferrate, z. B.  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , sind bekannte Myzelwachstums-Inhibitoren bei der fermentativen Zitronensäureherstellung mit Hilfe von *Aspergillus niger* und werden bevorzugt in Mengen von  $\leq 10$  ppm zugesetzt, siehe z. B. die AT-PS 295 448 und 296 194.

In der AT-PS 307 346 ist ein Zitronensäurefermentationsmedium beschrieben, das 1,5 ppm  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  und  $\leq 10$  ppm  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  enthält.

Diese den gemeinsamen Einsatz von Hexacyanoferraten und Zn-Ionen betreffenden AT-PS betreffen die Verwendung von zumindest teilweise (entkationisiert) vorgereinigten Zuckerlösungen, in denen Zink als Wachstumsförderer wirkt, während das Hexacyanoferrat als Inhibitor die Mycelentwicklung beeinflusst.

Nunmehr wurde überraschenderweise gefunden, daß man nicht vorbehandelte Kohlehydratlösungen, also solche ohne Klärung durch Fällung und ohne Ionentauscherbehandlung, in einem Hexacyanoferrat und Zn-Ionen enthaltenden Substrat günstig verarbeiten kann, wenn man ein Substrat verarbeitet, das zwischen 30 und 250 ppm Zn und zwischen 100 und 500 ppm Hexacyanoferrat enthält.

Dabei sind äußerst vorteilhafte Zitronensäureausbeuten bei einem problemlosen Verfahrensablauf ohne Notwendigkeit einer Prozeßüberwachung und ohne chemische bzw. physikalische Steuerungsmaßnahmen (z. B. ohne laufende pH-Regelung) erzielbar. Weiterhin ergibt sich auch bei hohen Salzkonzentrationen im Substrat ein tolerierbarer Klärschlamm.

Vorzugsweise werden Zn und Hexacyanoferrat jeweils in Mengen von etwa 100 ppm eingesetzt.

Insbesondere werden dem Substrat mindestens soviel Zn-Ionen und Hexacyanoferrat-Ionen zugesetzt, daß sich ein Fällungsprodukt bildet. Dieses Fällungsprodukt wird nicht abgetrennt.

Als unbehandelte Kohlehydrate werden vorzugsweise Mono- und/oder Disaccharide, insbesondere Glukose, eingesetzt; der Einsatz anderer Kohlenhydratquellen, z. B. von Rohr- oder Rübenmelassen, ist möglich.

Mit ein Kennzeichen des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß alle für die wirtschaftliche Produktion von Zitronensäure notwendigen Manipulationen zu Beginn der Fermentation vorgenommen werden können. Eine andauernde Überwachung der Gärung und Eingriffe auf Grund besonderer chemischer oder physikalischer Parameter wie pH-Wert und Myzelform sind nicht notwendig.

Die so entstandene Zitronensäure kann nach einem der üblichen bekannten Verfahren isoliert und weiterverarbeitet werden.

Folgende Beispiele dienen der näheren Erläuterung der Erfindung. Sie wurden mit dem Mikroorganismus *Aspergillus niger* 6074 durchgeführt, welcher entsprechend dem Budapester Abkommen bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen am 16. August 1989 hinterlegt wurde und die Nr. DSM 5484 erhalten hat, sowie durch folgende Merkmale gekennzeichnet ist:

- das vielfach septierte, mehrkernige Mycel weist eine große Anzahl von Konidienträgern auf.

- es ist typische Köpfchenbildung infolge blasenförmig erweiterter Hyphen zu beobachten, an deren Oberfläche sich Sterigmen mit perlschnurförmig angeordneten schwarzen bis schwarzbraunen Konidien befinden.

- Morphologie der Kolonien: Anfangs weiß bis gelblich, von watteartiger Konsistenz; nach einigen Tagen infolge von Konidienbildung schwarz bis braunschwarz.

- 5      - Durchmesser der Hyphen: 2 - 8  $\mu\text{m}$   
        Länge der Konidienträger: bis 6  $\mu\text{m}$   
        Konidiendurchmesser: 4 - 6  $\mu\text{m}$  mit zerklüfteter Oberfläche

Unter geeigneten Anzuchtbedingungen weist der eingesetzte Mikroorganismus *Aspergillus niger* DSM 5484 ein überraschend hohes Sporengewicht von 1 - 3  $\cdot 10^{10}$  Einzelsporen/g auf, das bei anderen Vertretern dieser Gattung in der Größenordnung von 8 - 11  $\cdot 10^{10}$  Einzelsporen/g liegt.

10      Dieses Merkmal wird durch den Konidiendurchmesser, der bei üblicherweise zur Zitronensäureproduktion eingesetzten Stämmen 3,7 - 4,7 mm beträgt, erklärbar. Dabei ist hervorzuheben, daß Sporengewicht und Durchmesser vorzugsweise durch Anzucht auf Medien erfolgt, deren Kohlenhydratquelle aus reinen Rohstoffen, wie beispielsweise Glucose oder Saccharose, besteht und nicht durch die Zugabe komplexer Wachstumsstoffe, wie etwa Melasse, erreicht wird.

15      Im Gegensatz zu dem in der USP 2492667 beschriebenen Organismus *Aspergillus niger* ATCC 1015 ist der Einsatz des Stammes DSM 5484 nach dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht von der Einhaltung eines Übertragungszyklus von beispielsweise 5 bis 7 Tagen abhängig, sondern kann in beliebigen Zeitintervallen erfolgen.

20      Vorzugsweise hat die Anzucht der Sporen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ebenfalls auf Medien zu erfolgen, deren Kohlenhydratquelle aus reinen Rohstoffen, wie beispielsweise Glucose oder Saccharose, besteht.

#### Beispiele 1 - 3:

25      Einer mit Medium 1 bezeichneten Nährlösung wurden Sporen des Pilzes *Aspergillus niger* in einer Konzentration von  $10^9$  Sporen pro Liter Kulturflüssigkeit zugesetzt, was etwa einer Menge von 10 - 15 g Sporen pro  $\text{m}^3$  entspricht. Die Inkubation der so beimpften Brühe erfolgte bei für Zitronensäureproduktion üblicherweise bekannten und allgemein beschriebenen Bedingungen wie Lufteintrag und Temperaturkontrolle.

#### Medium 1:

30      Dextrose      150 g  
         $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$     1,5 g  
         $\text{MgSO}_4$         0,6 g  
         $\text{KH}_2\text{PO}_4$       0,12 g

35      \_\_\_\_\_  
        pro Liter Leitungswasser

Bei Beispiel 1 wurden weder Zink noch Hexacyanoferrat zugesetzt,

bei Beispiel 2 wurden 100 ppm  $\text{Zn}^{2+}$  in Form von  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  zugegeben,

40      bei Beispiel 3 wurden 100 ppm Kaliumhexacyanoferrat II zugefügt.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in Tabelle 1, ausgedrückt als Prozent Ausbeute an Zitronensäure bezogen auf eingesetzte Glucose, aufgelistet:

45

$\text{Zn}^{2+}$ [ppm]	$[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [ppm]	0	100
	0	1 %	18 %
	100	14 %	

50

55

Tabelle 1: Ausbeute an Zitronensäure

Wie aus den Beispielen hervorgeht, ist unter den gewählten Bedingungen eine wirtschaftliche Zitronensäureproduktion ohne oder mit nur einem der beiden Zusatzstoffe Zink und Hexacyanoferrat nicht möglich.

5 Beispiele 4 - 16:

Wie in den Beispielen 1-3 erläutert, wurden der Nährlösung Medium 1 Zink und Hexacyanoferrat in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

	Zn <sup>2+</sup> [ppm]	[K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ] [ppm]	
10			
	Beispiel 4	30	100
	Beispiel 5	50	100
	Beispiel 6	50	150
15	Beispiel 7	100	100
	Beispiel 8	100	150
	Beispiel 9	100	200
	Beispiel 10	150	100
	Beispiel 11	150	150
20	Beispiel 12	150	300
	Beispiel 13	200	100
	Beispiel 14	200	400
	Beispiel 15	250	100
	Beispiel 16	250	500

Die Fermentation wurde unter den gleichen Bedingungen wie in den vorherigen Beispielen durchgeführt. Die dabei erzielten Zitronensäureausbeuten sind wie folgt:

	[K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ] [ppm]	100	150	200	300	400	500
30	Zn <sup>2+</sup> [ppm]						
	30	69 %					
35	50	82 %	79 %				
40	100	86 %	77 %	72 %			
	150	79 %	71 %		75 %		
45	200	63 %				63 %	
50	250	57 %					65 %

Wie ersichtlich, sind bei Zusatz von 100 ppm Zn<sup>2+</sup> und 100 ppm [K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] wirtschaftlich sehr interessante Ausbeuten erzielbar.

Anhand von zwei Versuchen soll der Einfluß der entstehenden Ausfällung demonstriert werden.

55

Beispiele 17 und 18:

Bei Beispiel 17 wurden dem Medium 1 entsprechend Beispiel 5 50 ppm Zn<sup>2+</sup> und 100 ppm Kaliumhexacyanoferrat II, bei Beispiel 18 entsprechend Beispiel 7 100 ppm Zn<sup>2+</sup> und 100 ppm Kaliumhexacyanoferrat II zugegeben. Der auftretende Niederschlag wurde aber im Gegensatz zu den Beispielen 5

und 7 mittels Zentrifuge entfernt und die verbleibende blanke Lösung in bereits beschriebener Weise mit Sporen beimpft und dem Fermentationsprozeß unterworfen.

**Ergebnisse:**

5

Beispiel 17: 46 % Ausbeute Zitronensäure  
Beispiel 18: 57 % Ausbeute Zitronensäure

10 Verglichen mit den Ergebnissen aus den Beispielen 5 und 7, bei denen die Trübstoffe nicht entfernt wurden und deren Ausbeuten 82 % und 86 % betrugen, kann über die Bedeutung der Ausfällungen für die Produktbildung im beschriebenen System kein Zweifel bestehen.

Abschließend soll in Beispiel 19 ein Verfahren detailliert beschrieben werden, bei dem die Impfgutanzucht auf Grund besonderer technischer Gegebenheiten in einem anderen als dem Produktionsfermenter erfolgte.

15

**Beispiel 19:**

Die schon in den vorherigen Beispielen aufgelisteten Nährsalze wurden, in Leitungswasser gelöst, bei einem pH-Wert von 3,0 während 30 Minuten bei 121 °C sterilisiert, nach dem Abkühlen jeweils 100 ppm  $Zn^{2+}$  in Form von  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  sowie 100 ppm  $K_4[Fe(CN)_6]$  zugesetzt und mit Sporen entsprechend einer Konzentration von  $10^9$  Sporen pro Liter beimpft.

20

Die Kulturbedingungen wurden mit einer Temperaturregelung auf 30 °C, einer pH-Korrektur auf 3,0 mittels Ammoniak und einem Lufteintrag von 2 vvm bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit des Scheibenrührwerks von 200 rpm so gewählt, daß nach 20 - 30 Stunden genügend Impfgut ausgebildet war, um einen Produktionsfermenter zu beimpfen. Als Inokulumsmenge wurden für den beschriebenen Versuch 3 % gewählt.

25

Das Nährmedium des Produktionsfermenters wurde in gleicher Weise zubereitet wie oben angeführt, die Temperatur konstant gehalten sowie Luft- und Rühreintrag entsprechend der Viskosität des Mediums geregelt.

Bei diesem Versuch konnte unter Berücksichtigung der gesamt eingesetzten Kohlehydrate eine Ausbeute von 70 % Zitronensäure erzielt werden.

30

**PATENTANSPRÜCHE**

35

40 1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von Zitronensäure aus Kohlehydraten mittels eines Mikroorganismus der Gattung *Aspergillus niger* in einem Zinkionen und Hexacyanoferrationen enthaltenden Substrat, **dadurch gekennzeichnet**, daß nicht vorgereinigte Kohlehydrate eingesetzt werden und der Zn-Gehalt des Substrats auf 30 bis 250 ppm und der Hexacyanoferrat-Gehalt des Substrats auf 100 bis 500 ppm eingestellt wird.

45 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Zn-Gehalt und der Hexacyanoferrat-Gehalt jeweils auf etwa 100 ppm eingestellt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem Substrat mindestens soviel Zn-Ionen und Hexacyanoferrat-Ionen zugesetzt werden, daß sich ein Fällungsprodukt bildet.

50 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Kohlehydrate Mono- und/oder Disaccharide, insbesondere Glukose, eingesetzt werden.

55 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der *Aspergillus niger*-Stamm 6074 (DSM Nr. 5484 vom 16. August 1989) eingesetzt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Gärung submers geführt wird.

7. *Aspergillus niger*-Stamm 6074 (DSM Nr. 5484 vom 16. August 1989).