



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 227 448 A1

4(51) C 12 P 7/48

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 268 502 7	(22)	18.10.84	(44)	18.09.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Barth, Gerold, Dr. rer. nat.; Krebs, Dietrich, DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure auf mikrobiellem Wege
------	--

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure auf mikrobiellem Wege. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure mit geringem Isozitronensäureanteil unter Verwendung aminosäurebedürftiger Hefestämme. Das Ziel der Erfindung ist es, Zitronensäure auf mikrobiellem Wege ohne Verwendung physiologisch bedenklicher Zusätze zwecks Reduzierung des Isozitronensäureanteils herzustellen. Ihre Anwendung liegt in der technischen Mikrobiologie. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß aminosäurebedürftige Hefestämme, insbesondere der methioninbedürftige der Hefestamm ZIMET 43728 der Art *Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica* aerob in flüssigen Medien mit geeigneten C-, N-, P-Quellen, Mineralsalzen und geringen Methioninmengen kultiviert werden, die Zitronensäureausscheidung aus den Hefezellen durch den Verbrauch des extrazellulären Methionins induziert und die Säure mit geeigneten Methoden aus dem Medium isoliert wird.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure auf mikrobiellem Wege

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die mikrobielle Herstellung von Zitronensäure durch Hefestämme mit geeigneten Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glucose, unter submersen, aeroben Bedingungen.

Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt somit in der technischen Mikrobiologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekanntlich wird Zitronensäure in der Gegenwart überwiegend durch Fermentation hergestellt. Als Mikroorganismen werden dabei am häufigsten Stämme der Pilzart Aspergillus niger sowie verschiedene Hefearten, insbesondere Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica, und einige Candida-Arten (STOTTMEISTER, U.; BEHRENS, U.; WEISSBROT, E.; BARTH, G.; FRANKERINKER, D.; SCHULZE, E.; Z. Allg. Mikrobiol., 22 (1982) 399) benutzt. Hierbei ist bekannt, daß bei der Benutzung von Aspergillus niger die Fermentation sehr lange dauert und die Instabilität der Stämme zahlreiche Schwierigkeiten bereitet.

Die Verwendung von Hefestämmen bringt zwar den Vorteil, daß die Fermentationsdauer kürzer ist und Nichtkohlenhydrat-Kohlenstoffquellen zur Zitronensäureproduktion genutzt werden können, hat aber den Nachteil, daß viele dieser Hefearten neben Zitronensäure größere Mengen an Isozitronensäure ausscheiden (STOTTMEISTER, U. u. a.; Z. Allg. Mikrobiol., 22, (1982) 399). Das Vorhandensein von Isozitronen-

säure neben Zitronensäure ist von Nachteil, weil Mischungen von beiden Säuren schwierig zur Kristallisation zu bringen sind und somit ein kristallines Endprodukt nur mit hohem technologischen Aufwand herstellbar ist. Die Komplexbildungskonstanten der Isozitrone Säure sind geringer als die der Zitronensäure, wodurch die Einsatzmöglichkeiten eines Gemisches beider Säuren mit hohem Isozitrone Säureanteil eingeschränkt werden. Eine Trennung von Zitronen- und Isozitrone Säure ist technologisch sehr aufwendig. Deshalb wird nach Möglichkeiten gesucht, die Ausscheidung von Isozitrone Säure durch Hefestämme zu verringern, ohne die Zitronensäureausscheidung wesentlich zu beeinträchtigen.

Es ist bereits beschrieben worden, daß durch den Zusatz von Substanzen zum Fermentationsmedium die Ausscheidung von Isozitrone Säure verringert bzw. völlig verhindert werden kann. Besonders wirksam erwiesen sich Monofluoracetat und α, α -Dipyridyl (NAKANISHI, T.; YAMOMOTO, M.; KIMURA, K.; TANAKA, K.; J. Ferment. Technol., 50 (1972) 855). Diese Substanzen sind aber für den Einsatz in Fermentationsprozessen nicht geeignet, weil sie teils toxisch sind, sowie teils nur mit hohem ökonomischen Aufwand bereitgestellt werden können.

Es sind mittels Mutagenese und anschließender Selektion Stämme von verschiedenen Hefearten hergestellt worden, die keine oder nur geringe Mengen Isozitrone Säure, aber große Mengen Zitronensäure bilden (AKIYAMA, S., SUZUKI, T., SUMINO, Y., NAKAO, Y., FUKUDA, H., Agr. Biol. Chem., 37 (1973) 879; IKENO, Y., MASUDA, M., TANNO, K., OOMORI, I., TAKAHASHI, N., J. Ferment. Technol., 53 (1975) 752; JA-PS 744 1588; DT-OS 2. 113. 961; DT-OS 2. 264; Sammelbericht mit Zusammenfassung der Patentschriften in: STOTTMEISTER, U. u. a., Z. Allg. Mikrobiol., 22 (1982) 399). Hierbei ist von Nachteil, daß solche Stämme nur indirekt, somit sehr aufwendig, über zitratnichtverwertende, monofluoracetatresistente oder -sensitive Zellisolate erhalten werden können. Außerdem lassen sich über diesen Weg nur von bestimmten Hefen solche Stämme isolieren, weil viele Hefe-Zitratproduktionsstämme bereits eine hohe Resistenz gegen Monofluoracetat besitzen

(DT-OS 2.264.764) und monofluorazetatsensitive Isolate von diesen Hefen eine Abnahme der Zitratproduktion sowie eine erhöhte Isozitrat Ausscheidung zeigen (BARTH, G., Dissertation, AdW der DDR, 1980).

Bekannt ist weiterhin, daß von Wildstämmen der Hefeart *Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica* methioninbedürftige Stämme durch Mutagenese und nachfolgender Selektion herstellbar sind (OGRYDZIAK, D., BASSEL, J., CONTOPOULOU, R., MORTIMER, R., Molec. Gen. Genet., 163 (1978) 229; BARTH, G., WEBER, H., Z. Allg. Mikrobiol., 23 (1983) 147). Diese Stämme werden technisch bisher nicht genutzt.

Die Zitronensäure-/Isozitronensäureproduktion wird in den bekannten mikrobiellen Herstellungsverfahren überwiegend durch den Verbrauch des Stickstoffs im Medium eingeleitet. Dabei ist von Nachteil, daß eine Neutralisation mit stickstoffhaltigen Neutralisationsmitteln, die zu einem höheren Anteil ausgeschiedener Zitronensäure führen (HATTORI, K., YOKOO, S., IMADA, O., J. Ferment. Technol., 52 (1974) 542), nicht möglich ist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, Zitronensäure auf mikrobiellem Wege herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein mikrobielles Verfahren zu beschreiben, das es erlaubt, Zitronensäure mit Hilfe eines Mikroorganismus in großen Mengen bei gleichzeitig niedrigem Isozitronensäureanteil aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen und ohne Verwendung physiologisch bedenklicher Zusatzstoffe herzustellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen in einem flüssigen Nährmedium mit entsprechenden Kohlenstoff-, Phosphat-Stickstoffquellen und Mineralsalzen ein aminosäurebedürftiger Mikroorganismus kultiviert wird und die Zitronensäureaus-

scheidung aus den Zellen durch Auszehrung der benötigten Aminosäure eingeleitet wird.

Der aminosäurebedürftige Mikroorganismus, der in dem vorliegenden Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure verwendet wird, wurde durch Mutagenese-Selektionsprozesse aus Populationen der Hefeart Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica (Stamm H 222) gewonnen und in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Jena-DDR, unter der Nummer ZIMET 43728 hinterlegt. Danach gehört dieser Zitronensäureproduzent, der Methionin zum Wachstum benötigt, zur Hefeart Saccharomycopsis lipolytica, die nach VAN DER WALT und VON ARX als Yarrowia lipolytica zu bezeichnen ist.

Die Kultivierung des methioninbedürftigen Stammes ZIMET 43728 der Hefeart Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica erfolgt unter aeroben Bedingungen. Lyophil getrocknetes oder auf komplexen Agarnährböden kultiviertes und bei +4 °C aufbewahrtes Zellmaterial wird auf geeignete, aminosäureenthaltende Agarnährboden geimpft, 1 bis 2 Tage bei 24 °C bis 34 °C bebrütet und nachfolgend in flüssige, vorher sterilisierte Nährmedien geimpft, die die benötigte Aminosäure mindestens in Konzentrationen von 25 mg/l enthalten, und unter Schütteln bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase nach 20 h bis 36 h bei 24 °C bis 34 °C, vorzugsweise 28 °C, inkubiert. Der pH-Wert dieses Vorkultivierungsmediums beträgt pH 5 bis pH 7, vorzugsweise pH 6. Mit dieser dichten Hefezellsuspension wird eine vorher sterilisierte Nährstoffbrühe, die eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoff- und Phosphorquelle, Mineralsalze und Thiamin in Konzentrationen von mindestens 200 µg/l, sowie die benötigte Aminosäure in Mengen von höchstens 5 mg/l enthalten, angeimpft. Je nach der Produktivität des eingesetzten Hefestammes wird 6 bis 8 Tage bei 24 °C bis 34 °C, vorzugsweise 28 °C, und einem pH-Wert zwischen pH 2,5 und pH 6,5, vorzugsweise pH 5, inkubiert. Die pH-Regulierung erfolgt z.B. mit Kalziumkarbonat, Natronlauge oder Stickstoff-haltigen Neutralisationsmitteln, wie Ammoniak-Wasser.

Nach Abbruch der Fermentation erfolgt die Abtrennung der Hefezellen und die Gewinnung der Zitronensäure aus dem Fermentationsmedium in an sich bekannter Art und Weise.

Die Hauptvorteile der Erfindung bestehen darin, daß ohne den Einsatz toxischer Substanzen eine wesentliche Steigerung des Zitronensäureanteils an der insgesamt ausgeschiedenen Säuremenge erreicht wird und außerdem der Einsatz stickstoffhaltiger Neutralisationsmittel, wie Ammoniak-Wasser, die ebenfalls den Anteil der Zitronensäure beträchtlich erhöhen, technologisch einfach möglich ist.

Von Vorteil ist außerdem, daß eine Verfahrenskontrolle, die prüfen soll, inwieweit der vorliegende Stamm im Fermenter noch dem ursprünglich eingesetzten Stamm entspricht, einfach möglich ist, weil nur auf die entsprechende Aminosäurebedürftigkeit getestet werden muß.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele dienen dazu, die Erfindung zu erläutern, ohne sie hierauf zu beschränken.

1. Eine 50 ml-Steilbrustflasche wird mit 10 ml des folgenden Anzuchtmediums gefüllt:

Glucose	2 %
Pepton	2 %
Hefeextrakt	1 %

in Leitungswasser

Sterilisation: 35 Min. bei 120 °C. Acidität nach Sterilisation liegt bei 6,0. Diese Kulturflüssigkeit wird mit einer Impföse voll Zellmaterial des methioninbedürftigen Stammes Yarrowia (Saccharomycopsis) lipolytica ZIMET 43728 beimpft und 24 Std. bei 28 °C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wird 1 ml in einen gezähnten 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben, der 10 ml des sterilen Vorkulturmedium folgender Zusammensetzung enthält:

NH ₄ Cl	1 g/l
KH ₂ PO ₄	0,25 g/l

MgSO₄ 0,12 g/l
CaCO₃ 1,5 g/l

Spurensalze: CuSO₄ x 5H₂O 0,014 g/l; ZnCl 0,007 g/l;
CoSO₄ x 7 H₂O 0,002 g/l; MnSO₄ x 5H₂O 0,014 g/l;
H₃BO₃ 0,020 g/l

Der Kolben wird in üblicher Weise 35 min bei 120 °C sterilisiert. Danach erfolgt die Zugabe der durch Filtration sterilisierten Glucose- (20 g/l), Thiamin-(300 µ /l) und Methioninlösungen (50 mg/l Endkonzentration). Die Kultivierung wird bei 28 °C für 24 Std. auf einem Rotationschüttler durchgeführt. Aus dieser Zellsuspension werden 2 ml Kulturflüssigkeit entnommen und in einen gezähnten 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben, in dem sich 10 ml des sterilen Produktionsmediums befinden. Dieses Produktionsmedium enthält die gleichen Mengen an Mineralsalzen wie das Vorkulturmedium, aber größere Mengen an Glucose (80 g/l), Kalziumkarbonat (20 g/l) Thiamin (500 µ /l) sowie eine geringere Menge an Methionin (5 mg/l). Diese Hefezellsuspension wird 7 Tage bei 28 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Abbruch der Fermentation wird Salzsäure der Kulturbrühe zugesetzt, bis ein pH-Wert von etwa pH 2 erreicht ist. Danach werden die Hefezellen durch Zentrifugation von der Nährbrühe abgetrennt. Das Gemisch von Zitronen- und Isozitronensäure wird aus dem Überstand in an sich bekannter Weise isoliert. Der Hefestamm hatte unter den beschriebenen Bedingungen 41 g/l beider Säuren, davon 39 g/l Zitronensäure, in die Kulturflüssigkeit abgegeben.

2. Man verfährt wie im Beispiel 1 mit dem Unterschied, daß dem Vorkulturmedium statt Methionin und Thiamin 1,5 g/l Hefeextrakt zugegeben wird und das Produktionsmedium statt Methionin 0,2 g/l Hefeextrakt enthält.
3. Man verfährt wie im Beispiel 1 oder im Beispiel 2 mit dem Unterschied, daß dem Produktionsmedium kein Kalziumkarbonat zugesetzt wird, sondern durch Zugabe von Ammoniak-Wasser während der Produktionsphase ein pH-Wert von pH 5,0 bis pH 5,5 eingestellt wird.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Zitronensäure auf mikrobiellem Wege, gekennzeichnet dadurch, daß aminosäurebedürftige Stämme der Hefeart Yarrowia (Saccharomyopsis) lipolytica unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die eine Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquelle, Mineralsalze sowie die benötigte Aminosäure in wachstumslimitierender Konzentration enthalten, bei einer Temperatur von 24 °C bis 34 °C während eines Zeitraumes von 6 bis 8 Tagen in einem pH-Bereich von pH 2,5 bis pH 6,5 kultiviert werden und große Mengen Zitronensäure und geringe Mengen Isozitronensäure aus dem Produktionsmedium nach Abbruch der Fermentation mit üblichen Methoden isoliert werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der methioninbedürftige Stamm ZIMET 43728 der Hefeart Yarrowia (Saccharomyopsis) lipolytica in methioninhaltigen flüssigen Nährmedien bei 28 °C 7 Tage kultiviert wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß zur Einstellung des pH-Wertes von pH 5 bis pH 5,5 während der Produktionsphase sowohl stickstofffreie als auch stickstoffhaltige Neutralisationsmittel dem Medium zugegeben werden.