

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1
Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **236 754 B1**

4(51) C 12 P 7/58

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP C 12 P / 246 334 4

(22) 22.12.82

(45) 22.07.87

(44) 18.06.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Babel, Wolfgang, Dr. sc.; Mieth, Dietmar, Dr. rer. nat.; Iske, Uwe, Dr. rer. nat.; Sattler, Karl, Dr. sc.; Richter, Hans-Peter, Dr. rer. nat.; Schmidt, Jörg, Dipl.-Ing.; Düresch, Rolf, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Glukonsäure mittels Bakterien

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Glukonsäure mittels Bakterien, **gekennzeichnet dadurch**, daß Glukose mittels acidophiler methylophiler Bakterien unter unsterilen Bedingungen, sowohl für die Erzeugung des Produzenten als auch bei der Produktbildung, und ohne Neutralisation während der Produktbildung in einem pH-Bereich zwischen 6 und 1 und bei Temperaturen zwischen 10 und 35°C zu freier Glukonsäure oxidiert wird, wobei die Produktbildung mit Zellkonzentrationen $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** die Verwendung des Bakterienstammes *Acetobacter methanolicus* IMET B346.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** die Verwendung des Bakterienstammes *Thiobacillus acidophilus* DSM 700.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch** die Verwendung des Bakterienstammes *Thiobacillus versutus* CCM 2505.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und einem der Ansprüche 2–4, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Produktbildung entweder durch Zugabe von Glukose zum Wachstumsmedium, das den Produzenten enthält, oder durch Zugabe des Produzenten zu einer wäßrigen Glukoselösung erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein biotechnisches Verfahren zur Herstellung einer wäßrigen Glukonsäurelösung durch Oxydation von Glukose mit Hilfe von Bakterien.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Glukonsäure kann im technischen Maßstab mikrobiell unter Verwendung von Schimmelpilzen oder Bakterien, biochemisch mit Hilfe immobilisierter Glucose-Oxidase (und Katalase) oder elektrochemisch durch Oxydation von Glukose hergestellt werden (s. H. J. Rehm: Industrielle Mikrobiologie, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York 1967).

Die technische Herstellung von Glukonsäure, die gegenwärtig hauptsächlich in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie angewendet wird, erfolgt fast ausschließlich auf mikrobiellem Wege, wobei meist Stämme von *Aspergillus niger* benutzt werden. Obwohl die Fähigkeit zur Oxydation von Glukose unter Bildung von Glukonsäure (und H_2O_2) auch bei Penicillien und Pullularien bekannt ist und verschiedene *Aceto*-, *Gluconbacter*- und *Pseudomonas*-Species Glukose ebenfalls in Glukonsäure umwandeln können, werden in technischen Verfahren Bakterien nicht eingesetzt (s. K. Yamada: Biotechn. Bioeng. 19 [1977] 1563; H. J. Rehm: Industrielle Mikrobiologie. Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York 1980).

Die bekannten mikrobiellen Verfahren zeichnen sich dadurch aus, daß hohe Glukonsäurekonzentrationen und hohe Ausbeuten erreicht werden. Sie haben alle den Nachteil, daß die Produktionskultur unter sterilen Bedingungen — und nur zum Zwecke der Glukoseoxydation — gewonnen werden und daß sowohl in der Wachstumsphase als auch in der ersten Produktbildungsphase („Gärphase“) — bis die Enzymsynthese abgeschlossen ist — Sterilität gewahrt und der pH-Wert durch Titration mit Alkali- oder Erdalkali-Hydroxid zwischen 6 und 7 konstant gehalten werden müssen (s. Patent DE-AS 1817–907). Diese Notwendigkeit zur Neutralisierung bedingt einen weiteren Nachteil insofern, als durch die damit eintretende Viskositätserhöhung erhebliche Schwierigkeiten für den weiteren technischen Prozeß (erhöhter Energieaufwand, Aufarbeitung usw.) entstehen (s. Patent DE AS 1817907).

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung von Glukonsäure mit geringem technologischen Aufwand zu entwickeln.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Glukonsäure unter unsterilen Bedingungen, ohne Neutralisation des Mediums während der Erzeugung des Produzenten und der Produktbildung und ohne Induktionsphase für die Bildung des glukseoxidierenden Enzymes herzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem acidophile methylophile Bakterienspezies nach bekannten Verfahren auf Methanol oder Glukose kultiviert und als Produzenten für Glukonsäure durch Oxidation von Glukose verwendet werden. Als Mikroorganismen sind erfindungsgemäß alle acidophilen methylophilen Bakterienspezies geeignet.

Vorteilhafterweise kann der acidophile methylotrophe Stamm *Acetobacter methanolicus* IMET B 346 verwendet werden. Andere Stämme, die beispielhaft aufgezählt werden sollen, sind *Thiobacillus acidophilus* DSM 700 oder *Thiobacillus versutus* CCM 2505.

Die mikrobielle Glukoseoxidation erfolgt im pH-Bereich von 6–1 und bei Temperaturen zwischen 10 und 35°C, wobei freie Glukonsäure erhalten wird.

Die Glukonsäurebildung kann entweder nach Separierung der erzeugten Biomasse vom Fermentationsmedium in einer wäßrigen Glukoselösung vorgenommen werden, was den Vorteil hoher Reinheit des Produktes und geringer Aufarbeitungsoperationen hat, oder direkt nach Auszehrung des Wachstumsmediums (z. B. Methanol, NH_3) und Zugabe von Glukose im Fermentationsmedium durchgeführt werden, wobei die Glukosekonzentration 5–20% betragen kann.

Da der Produzent nach dem Chemostat-Prinzip unter C-Limitation erzeugt wird, sind Verunreinigungen der Glukonsäure durch Intermediate des Stoffwechsels vernachlässigbar klein.

Die Biomassekonzentration in der Produktionsphase kann im Interesse hoher spezifischer Produktbildungsrate (bis $6 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) und Ausbeuten (bis 97%) unter $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, bis hin zu $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ gehalten werden. Dies ermöglicht — im Falle der Gewinnung von Glukonsäure für technische Zwecke, z. B. in der Waschmittelindustrie — einfachste Aufarbeitung; eine vorherige Abtrennung der Biomasse ist nicht notwendig.

Die wäßrige Glukonsäurelösung (bis $310 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) kann durch bekannte Verfahren weiter konzentriert werden.

Der Vorteil der Verwendung acidophiler methylotropher Bakterienspezies besteht darin, daß sie als Produzenten für Glukonsäure unsteril auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle erzeugt werden können, daß die Produktbildung sofort, d. h. ohne Verzögerung und nicht mit der wie für *Aspergillus niger* notwendigen Induktionsphase für das Glukose-oxidierende Enzym (DE-AS 1817907, US 3669840) bei dem für das Wachstum optimalen pH-Wert, aber auch im Bereich von pH 4–6 nach Zugabe von Glukose einsetzt, was im Vergleich zu den bekannten technischen Lösungen höhere Raum-Zeit-Ausbeuten ermöglicht (bis $15 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$). Das der pH-Bereich der Glukose-Oxidation den für das Wachstum dieser acidophilen Bakterien bei weitem überschreitet, bedingt weitere Vorteile.

Die Produktbildung kann unsteril durchgeführt werden und Neutralisation ist nicht erforderlich, und somit kann die bei den bekannten mikrobiologischen Verfahren, die Glukonsäure im wesentlichen als Glukonat produzieren, nachteilige Viskositätserhöhung umgangen werden.

Schließlich erübrigen sich für die Gewinnung von Glukonsäure für technische Zwecke wegen der zur Produktion notwendigen geringen Biomassekonzentration aufwendige Operationen zur Abtrennung. Die Produktion von Glukonsäure kann sowohl diskontinuierlich durchgeführt werden.

Im Falle einer bestehenden SCP-Produktion auf der Basis dieser Bakterien ist eine enge Koppelung mit der Glukonsäureproduktion vorteilhaft insofern, als damit der Glukonsäureproduzent sofort zur Verfügung steht.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Die zur Produktion von Glukonsäure verwendete Bakterienbiomasse MB 58 IMET B 346 (vgl. Beispiel 5) wurde bei 7000 xg mit einer T-23-Zentrifuge von der Kulturflüssigkeit abgetrennt, einmal mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in Wasser suspendiert. Der pH-Wert der Suspension betrug 6,0.

100 ml der Suspension (1,4 g/l Trockenmasse) und 20 g Glukose wurden in einen 500 ml Schüttelkolben gegeben und bei 30°C 40 Stunden unter unsterilen Bedingungen geschüttelt. Die mittels Titration bzw. spektrophotometrisch nach H. U. Bergmeyer (Methoden der enzymatischen Analyse, Berlin, Akademie-Verlag, 1970) bestimmte Glukonsäurekonzentration betrug 206,8 g/l; dies entspricht einer Ausbeute von 97,5%. Die Restglukose betrug 2,6%, die spezifische Produktbildungsrate lag bei $3,7 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und die Produktivität bei $5,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Beispiel 2

Zu 4 l einer Suspension von MB 58 IMET B 346-Bakterien in Wasser (50 g/l Bakterientrockenmasse, pH-Wert 4,2) wurden in einem Rührkesselreaktor von 15 l Gesamtvolumen zu Beginn 800 g Glukosemonohydrat (Ausgangskonzentration an Glukose 15,4%) nach 21 und 35 Stunden weitere 500 g Glukosemonohydrat zugegeben.

Folgende Prozeßparameter wurden eingehalten:

Rührerdrehzahl: 800 U/min Belüftungsrate: 10 l/h

Temperatur: 30°C

Eine Regelung des pH-Wertes erfolgt nicht.

Nach 11 Stunden wurden mittels spektrophotometrischer Messung (vgl. Beispiel 1) 161 g/l Glukonsäure ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt betrugen die spezifische Produktbildungsrate $2,9 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, die Produktivität 14,6 g und die Ausbeute 92%. Nach 52 Stunden wurden 310 g/l Glukonsäure bestimmt. Die Restglukose im Fermentationsmedium war < 0,1%. Dies entspricht einer durchschnittlichen Produktivität von $6,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, einer durchschnittlichen spezifischen Produktbildungsrate von $1,15 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und einer Ausbeute von 89,9%. Der zur Oxydation der Glukose benötigte Sauerstoffbedarf betrug in den ersten 20 Stunden 0,12 g Sauerstoff/g Glukonsäure und stieg in den folgenden 30 Stunden auf 0,16 g Sauerstoff/g Glukonsäure an.

Beispiel 3

Zu 12l einer Suspension von MB 58 IMET B 346-Bakterien in Wasser (1 g/l Bakterientrockenmasse, pH-Wert 4,5) wurden in einen Rührkesselreaktor von 30l Gesamtvolumen 2,4kg Glukosemonohydrat, nach 21 Stunden 1,2kg und nach 31 Stunden 0,6kg Glukosemonohydrat zugegeben. Der Versuch wurde durchgeführt analog wie im Beispiel 2 beschrieben.

Folgende Werte wurden ermittelt:

nach 21 Stunden gebildete Glukonsäure:	121,5 g/l
Ausbeute: 95,4 %	
Produktivität:	$5,7 \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$
spezifische Produktbildungsrate:	$5,7 g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$
Restglukose:	44%
nach 44,5 Stunden gebildete Glukonsäure:	210 g/l
Ausbeute:	91,1 %
Restglukose:	5%
durchschnittliche Produktivität:	$4,7 \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$
durchschnittliche spezifische Produktbildungsrate:	$4,7 g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$

Beispiel 4

Zu einer wäßrigen Glukoselösung analog Beispiel 2 wird 1 g/l MB 58 IMET B 346 Bakterienbiomasse gegeben und bei gleichen Prozeßparametern fermentiert. Nach Erreichen einer Glukonsäurekonzentration von ca. 100g/l wird erneut 1 g Biomasse/l zugesetzt. Der Zusatz von weiteren 1 g Biomasse/l erfolgt nach Erreichen einer Säurekonzentration von 250 g/l. Nach einer Gesamtfermentationsdauer von 60 Stunden wird der Produktbildungsprozeß bei einer Säurekonzentration von 359 g/l entsprechend einer Raum-Zeit-Ausbeute von $5,98 g/l \cdot h$ beendet. Die substratbezogene Ausbeute beträgt 89,8% und der durchschnittliche Sauerstoffbedarf 0,12 g/g Säure.

Beispiel 5

In einen Laborrührkesselfermentor von 12l Bruttovolumen mit 6 Blattscheibenrührern werden 5l eines Nährmediums folgender Zusammensetzung gegeben:

NH ₄ Cl	2,0 g/l	H ₃ BO ₃	7,0 mg/l
K ₂ HPO ₄	0,6 g/l	FeCl ₂ · 7 H ₂ O	4,2 mg/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,4 g/l	CaCl ₂ · 6 H ₂ O	7,2 mg/l
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	2,4 mg/l	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	7,8 mg/l
CoSO ₄ · 5 H ₂ O	0,6 mg/l	ZnCl ₂ · 7 H ₂ O	6,0 mg/l
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	4,7 mg/l	Hefeextrakt	0,1 %

Dieses Nährmedium ermöglicht einen Organismenzuwachs von 5g/l.

Nach Einstellung eines pH-Wertes von 4,1 und einer Temperatur von 32°C wird das Fermentationsmedium mit der Kultur MB 58 IMET B 346 angeimpft, so daß sich eine Startkonzentration von ca. 0,5g Biomasse/l ergibt. Das Medium wird mit einer Belüftungsrate von 100l/h begast und mit 1200 U/min gerührt. Durch Zusatz von 15g Methanol/l wird der Wachstumsprozeß gestartet und die Methankonzentration durch portionsweise Zugabe im Bereich zwischen 0,2 und 0,4% gehalten. Die Regulierung des pH-Wertes erfolgt mittels 5%iger Natronlauge. Nach Erreichen einer Biomassekonzentration von ca. 5,5g/l, limitiert durch den Stickstoffgehalt des Fermentationsmediums, wird der diskontinuierliche Wachstumsprozeß beendet und dem biomassehaltigen stickstofffreien Fermentationsmedium 200g/l Glukose zugesetzt.

Gleichzeitig wird die Rührerdrehzahl auf 800 U/min und die Belüftungsrate auf 40l/h reduziert.

Nach einer Produktbildungsdauer von 20 und 30 Std. werden jeweils weitere 125 g Glukose/l dem Fermentationsmedium zugesetzt. Die erreichte Glukonsäurekonzentration beträgt nach 44 Stunden 308 g/l entsprechend einer Ausbeute von 89% und einer Raum-Zeit-Ausbeute von $7,0 g/l \cdot h$.

Der zur Glukoseoxydation benötigte durchschnittliche Sauerstoffbedarf beträgt $0,13 g O_2/g$ Säure.

Beispiel 6

In einen 30l Membranrührkesselreaktor werden 12l wäßrige Glukoselösung (100g/l) gegeben und mit 7 g/l Bakterienmasse MB 58 IMET B 346 angeimpft.

Analog Beispiel 3 werden nach 21 Std. und 31 Std. 1,2kg bzw. 0,6kg Glukose dem Fermentationsmedium zugesetzt. Die Rührerdrehzahl und die Belüftungsrate während des Produktionsbildungsprozesses beträgt 100 U/min bzw. 1,4l/min. Nach einer Fermentationszeit von 45 Stunden ist eine Glukonsäurekonzentration von 215 g/l erreicht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die kontinuierliche Zudosierung einer 25,0%igen wäßrigen Glukoselösung mit einer Verweilzeit von 20 Stunden. Nach ca. 1,5 Verweilzeitperioden stellt sich ein stationärer Prozeßzustand bei einer durchschnittlichen Glukonsäurekonzentration von 227 g/l, entsprechend einer Produktivität von $11,3 g/l \cdot h$ ein. Das glukonsäurehaltige wäßrige Fermentationsmedium wird zellfrei aus dem Reaktor über ein geeignetes Membranfilter kontinuierlich abgezogen. Zu diesem Zweck wird mit Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise der Reaktordruck auf 0,5M Pa erhöht. Die Glukoserestkonzentration in der zellfreien wäßrigen Glukonsäurelösung beträgt $\leq 0,5\%$.

Nach einer kontinuierlichen Prozeßführung von ca. 300 Stunden wird der Prozeß unterbrochen und mit frischer Biomasse erneut gestartet.

Die Rückhaltung der für den Glukoseoxydationsprozeß erforderlichen Biomasse bzw. Enzymkonzentration kann darüber hinaus durch Trägerfixierung bzw. Immobilisierung nach einem der bekannten Verfahren erfolgen.

Eine periodische Erneuerung der Biomasse kann vermieden werden, wenn die zur Produktbildung erforderliche Biomasse analog einem 2stufigen Verfahren dem Prozeß kontinuierlich zugeführt wird. In diesem Falle wird jedoch zur Gewinnung einer zellfreien wäßrigen Glukonsäurelösung ein nachgeschalteter Aufarbeitungsprozeß erforderlich.

Beispiel 7

Zu 4 l einer 15%igen Glukoselösung werden 25 g/l der Bakterienkultur *Thiobacillus versutus* CCM 2505, kultiviert auf Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, gegeben und analog Beispiel 2 fermentiert.

Nach 35 Stunden wird eine Glukonsäurekonzentration von 142 g/l, entsprechend einer Produktivität von 4,05 g Säure/l · h und einer Ausbeute bezogen auf Glukose von 94,0%. Die Restglukosekonzentration beträgt 0,85 g/l.

Eine Regelung des pH-Wertes erfolgte nicht. Am Ende des Prozesses betrug der pH-Wert des Mediums 1,9.

Beispiel 8

100 ml einer Suspension, die 10 g Glukose und 5 g Biomasse der Bakterienkultur *Thiobacillus acidophilus* DSM 700 enthält, wird in einen 500 ml Schüttelkolben gegeben und bei 32 °C auf einer Schüttelapparatur kultiviert. Die Bakterienkultur wurde vorher unsteril auf Methanol als Substrat kultiviert und durch Zentrifugation vom Fermentationsmedium getrennt. Der pH-Wert der Suspension im Schüttelkolben betrug zu Beginn der Kultivierung 6,1. Nach einer Kultivierungszeit von 50 Stunden wurde titrimetrisch eine freie Glukonsäurekonzentration von 91 g/l ermittelt. Das entspricht einer Produktivität von 1,8 g/l · h und einer Ausbeute von 91%. Die Restglukosekonzentration lag bei 1 g/l. Der pH-Wert am Ende der unsterilen Kultivierungsphase lag bei 2,3.