DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **218 387 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 12 P 7/42**
C 12 P 19/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 251 839 2	(22)	09.06.83	(44)	06.02.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD
(72) Babel, Wolfgang, Dr. sc.; Miethe, 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

(57) Die Erfindung betrifft ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von freier Glukonsäure durch Oxydation von Glukose sowie zur Trennung von Glukose/Fruktose-Gemischen bei gleichzeitiger Gewinnung von Fruktose. Das Ziel besteht darin, ein kostengünstiges und technologisch einfaches Verfahren zu entwickeln. Die Synthese wird katalysiert durch Verwendung acidophiler methylotropher Bakterien. Sie erfolgt unter unsterilen Bedingungen in einem *p*H-Bereich zwischen 6 bis 1, Neutralisation ist nicht erforderlich. Und da das Enzym konstitutiv ist, setzt die Oxydation sofort nach Zugabe der Glukose ein, was höhere Raum-Zeit-Ausbeuten als für A. niger ermöglicht. Die Produktivität beträgt bis 15 $g \cdot h^{-1} \cdot l^{-1}$ und es werden Konzentrationen bis 310 $g \cdot l^{-1}$ und Ausbeuten bis 97 % erreicht. Diese Werte sind auch mit Biomassekonzentrationen 5 $g \cdot l^{-1}$ möglich. Bei diesen geringen Biomassekonzentrationen erübrigen sich – im Falle der Herstellung von Glukonsäure für technische Zwecke – aufwendige Trennoperationen.

ISSN 0433-6461

8 Seiten

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) Wirtschaftspatent

(19) DD (11) 218 387 A1

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) C 12 P 7/42
C 12 P 19/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 251 839 2 (22) 09.06.83 (44) 06.02.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD
(72) Babel, Wolfgang, Dr. sc.; Miethe, 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

(57) Die Erfindung betrifft ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von freier Glukonsäure durch Oxydation von Glukose sowie zur Trennung von Glukose/Fruktose-Gemischen bei gleichzeitiger Gewinnung von Fruktose. Das Ziel besteht darin, ein kostengünstiges und technologisch einfaches Verfahren zu entwickeln. Die Synthese wird katalysiert durch Verwendung acidophiler methylotropher Bakterien. Sie erfolgt unter unsterilen Bedingungen in einem *p*H-Bereich zwischen 6 bis 1, Neutralisation ist nicht erforderlich. Und da das Enzym konstitutiv ist, setzt die Oxydation sofort nach Zugabe der Glukose ein, was höhere Raum-Zeit-Ausbeuten als für A. niger ermöglicht. Die Produktivität beträgt bis 15 $g \cdot h^{-1} \cdot l^{-1}$ und es werden Konzentrationen bis 310 $g \cdot l^{-1}$ und Ausbeuten bis 97 % erreicht. Diese Werte sind auch mit Biomassekonzentrationen 5 $g \cdot l^{-1}$ möglich. Bei diesen geringen Biomassekonzentrationen erübrigen sich – im Falle der Herstellung von Glukonsäure für technische Zwecke – aufwendige Trennoperationen.

ISSN 0433-6461

8 Seiten

Zur PS Nr. ....218387..
ist eine Zweitschrift erschienen.
(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Titel

Verfahren zur Herstellung von Glukonsäure mittels Bakterien

Anwendungsgebiete 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-, Gluconobacter- 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 1817 907).

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 während der Produktbildung und ohne Induktionsphase für die Bildung des glukose-oxydierenden Enzyms, herzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe so gelöst, daß acidophile

methylotrophe Bakterien-Species, z.B. MB 58 IMET B 346, auf Methanol (oder Glukose) nach den für die SCP-Synthese bekannten Verfahren kultiviert werden, wobei diese Bakterien ein glukose-oxydierendes Enzym synthetisieren. Diese Bakterienbiomasse kann als Eiweißquelle für Futter- oder Nahrungszwecke verwendet werden und/oder als Produzent für Glukonsäure aus Glukose. 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 Auszehren des Wachstumsmediums (z.B. Methanol, NH_3) und Zugabe von Glukose im Fermentationsmedium durchgeführt werden (Glukosekonzentration 5 bis 20 %). Letzteres bedingt eine durch die Nährlösung eingebrachte Verunreinigung mit Salzen. Da die Biomasse (Produzent) nach dem Chemostat-Prinzip unter C-Limitation erzeugt wird, sind Verunreinigungen durch Intermediate des Stoffwechsels vernachlässigbar klein. Hinzu kommt, daß die Biomassekonzentration in der Produktionsphase im Interesse hoher spez. Produktbildungsraten (bis 6 $g \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) und Ausbeuten (bis 97 %) unter 5 $g \cdot l^{-1}$ gehalten werden kann. Dies ermöglicht - im Falle der Gewinnung von Glukonsäure für technische Zwecke, z.B. auch in der Waschmittelindustrie - einfachste Aufarbeitung; eine vorherige Abtrennung der Biomasse ist nicht notwendig. Die wäßrige Glukonsäurelösung (bis 310 $g \cdot l^{-1}$) kann durch bekannte Verfahren sofort konzentriert werden. Der Vorteil der Verwendung dieser Bakterien besteht darin, daß sie als Produzent für Glukonsäure unsteril, weil im sauren pH-Bereich wachsend, 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-oxydierende Enzym (s. Patent DE-AS 1817 907, US-Patent 3 669 840) bei dem für das Wachstum optimalen pH-Wert, aber auch oberhalb pH 4 bis pH 6, nach Zugabe von

Glukose einsetzt, was im Vergleich zu den bekannten technischen Lösungen höhere Raum/Zeit-Ausbeuten ermöglicht (bis 15 g . h^{-1} . l^{-1}). Daß der pH-Bereich der Glukose-Oxydation 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 als auch kontinuierlich 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.
Weiterhin ist eine gleichzeitige Gewinnung von Fruktose und Glukonsäure aus Glukose/Fruktose-Gemischen durch selektive mikrobielle Oxydation des Glukoseanteils möglich. Die dabei erhaltene Glukonsäure kann nach Entfernung des Produzenten quantitativ von der im Medium verbleibenden Fruktose abgetrennt werden. Die verbleibende Fruktose kann nach bekannten Verfahren gewonnen oder ohne vorherige Abtrennung als Substrat für nachfolgende Produktsynthesen, wie beispielsweise zur Gewinnung von Citronensäure, Verwendung finden.
Ein mikrobieller Abbau der Fruktose ist auch nach erfolgtem quantitativen Umsatz der Glukose zu Glukonsäure nicht zu beobachten. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der elektrochemischen Oxydation von Glukose zu Glukonsäure in Gemischen von Glukose und Fruktose ein gleichzeitiger bzw. anschließender Abbau von Fruktose, was zwangsläufig mit erheblichen Ausbeuteverlusten an Fruktose verbunden ist (US 2 567 060, DE-OS 2 130 994, CH 631 428).

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber dem bekannten Einsatz von Aspergillus niger bzw. Aerobacter aerogenes (US 2 949 389, Dalby, J. Microbiol. 1.733 - 42, 1955) besteht darin, daß keine Nebenprodukte gebildet werden.

Außer reiner Glukose bzw. Glukose/Fruktose-Gemischen können zur Glukonsäureherstellung glukosehaltige Lösungen, wie z.B. alle bei der Hydrolyse von pflanzlichen Produkten (Cellulose, Stärke) anfallenden glucosehaltigen Zwischen- und Abprodukte verwendet werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Die zur Produktion von Glukonsäure verwendete Bakterienbiomasse MB 58 IMET B 346 wird zentrifugiert, so daß man ein Konzentrat mit einem Feststoffgehalt von ca. 80 g/kg erhält. Mit diesem Bakterienkonzentrat werden in einem 12 l Rührkesselfermenter 4 l einer Glukose/Fruktose-Mischung mit jeweils 95 g Glukose und Fruktose im Liter angeimpft, so daß sich eine Zellkonzentration von 5 g/l ergibt. Anschließend wird dieses Medium bei 30°C mit 10 l/l . h belüftet und mit 900 U/min gerührt. Nach einer Fermentationsdauer von 11 Stunden ist eine vollständige Oxydation der vorgegebenen Glukose zu Glukonsäure erfolgt und eine Säurekonzentration von 90,2 g, entsprechend einer Ausbeute von 95 % bezogen auf Glukose bei einer Produktivität von 8,2 g Säure/l . h erreicht. Während dieser Produktbildungsphase ist die aktuelle Sauerstoffkonzentration größer 10 % des Sättigungswertes zu halten.

Die Fruktose wird bei diesem Prozeß von den Mikroorganismen nicht angegriffen.

Nach Abtrennung der Biomasse sowie der Glukonsäure kann die fruktosehaltige Mutterlauge entsprechend der Zielstellung weiter verarbeitet werden.

Beispiel 2

In einem 12 l Rührkesselfermenter werden 3 l Wasser und 1,2 l eines Abproduktes aus einem Prozeß der Stärkehydrolyse gegeben, das einen Glukosegehalt von 44,5 % besitzt. Nach Zugabe der Bakteriensuspension von 5 g/l Fermentationsmedium wird analog Beispiel 1 verfahren. Nach einer Fermentationsdauer von 14 Stunden ist eine Säurekonzentration von 135 g/l entsprechend einer Ausbeute von 81 % erreicht.

Die Entfernung der gebildeten Glukonsäure aus dem Fermentationsmedium kann nach den bekannten Methoden erfolgen.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Glukonsäure mittels Bakterien dadurch gekennzeichnet, daß in Glukose/Fruktose-Gemischen der Glukoseanteil mikrobiell zu Glukonsäure oxydiert wird und nach Abtrennen der Biomasse und der Glukonsäure die verbleibende Fruktose gewonnen wird oder ohne vorherige Abtrennung aus dem Fermentationsmedium mikrobiell z. B. zu Citronensäure konvertiert wird.

2. Verfahren zur Herstellung von Glukonsäure mittels Bakterien dadurch gekennzeichnet, daß als Substrat alle bei der Hydrolyse von pflanzlichen Produkten (Stärke, Cellulose) anfallenden glukosehaltigen Ab- und Zwischenprodukte eingesetzt werden.