



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 20 379 T2** 2004.02.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 845 538 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12P 7/18**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 20 379.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 121 067.9**

(96) Europäischer Anmeldetag: **01.12.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.06.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2004**

(30) Unionspriorität:

32146696 02.12.1996 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:

Mitsubishi Chemical Corp., Tokio/Tokyo, JP

(72) Erfinder:

**Abe, Shuuichi, Aoba-ku, Kanagawa, JP; Satoshi,
Morioka, Aoba-ku, Kanagawa, JP**

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von Erythritol**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Erythrit, genauer, ein Verfahren zur Herstellung von Erythrit durch Fermentierung unter Verwendung von Ammoniumsulfat als Hauptstickstoffquelle in einem Kulturmedium, das für die industrielle Herstellung von Vorteil ist.

[0002] Bekannte Verfahren zur Herstellung von Erythrit umfassen ein Verfahren, welches die Züchtung eines Hefestamms, welcher zur Gattung *Topsis* oder *Candida* gehört, in einem Kulturmedium, das Glycerin als Kohlenstoffquelle und Casein-Hydrolysat als Stickstoffquelle enthält (Japanische Patentveröffentlichung Nr. 47-41549), umfasst sowie ein Verfahren, welches die Züchtung eines Hefestamms, der zur Gattung *Candida*, *Torulopsis* oder *Hansenula* gehört, in einem Kulturmedium, das Hydrocarbonate und Ähnliche als Kohlenstoffquellen und Hefeextrakt und Harnstoff als Stickstoffquellen enthält (Japanische Patentveröffentlichung Nr. 51-21072). Diese Verfahren wurden jedoch noch nicht industriell verwendet, da Rohmaterialien, die als Kohlenstoffquellen verwendet werden, für die derzeitige industrielle Produktion nicht geeignet sind.

[0003] Alternativ ist die Herstellung von Erythrit durch Züchtung von *Moniliella tomentosa* var. *pollinis* in einem Kulturmedium bekannt, das Kohlenhydrate wie Glycose als Kohlenstoffquellen und Maisquellwasser, Harnstoff und Hefeextrakt als Stickstoffquellen enthält (Japanisches offengelegtes Patent Nr. 60-110295 und Ähnliche) oder durch Züchtung von Erythrit herstellenden Mikroorganismen in einem Kulturmedium, das Hefeextrakt und Maisquellwasser als Stickstoffquellen enthält (Japanisches offengelegtes Patent Nr. 1-199584).

[0004] Verschiedene Stoffe sind wie vorstehend beschrieben als Stickstoffquellen bekannt. Harnstoff ist jedoch nicht als Nahrungsmittelzusatz zugelassen und deshalb kann es nicht für die Herstellung von Erythrit verwendet werden, welches Nahrungsmitteln zugesetzt wird. Auf der anderen Seite ist Hefeextrakt und Caseinhydrolysat sehr teuer und diese können deshalb nicht unbedingt für die industrielle Produktion von Vorteil sein. Wenn Maisquellwasser als Hauptstickstoffquelle verwendet wird, kann Glycerin als Nebenprodukt hergestellt werden, das hergestellte Erythrit kann braun gefärbt sein oder es enthält eine große Menge an Salz. Aus diesen Gründen ist der Reinigungsprozess überladen, was für die wirtschaftliche Produktion von Nachteil ist.

[0005] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von Erythrit, das durch die Verwendung von sicheren und preiswerten Stickstoffquellen als Nahrungsmittelzusatz geeignet ist.

[0006] Als ein Ergebnis der intensiven Forschung zur Lösung der vorstehenden Probleme fanden die vorliegenden Erfinder heraus, dass das vorstehende Ziel durch Verwendung von Ammoniumsulfat, das als Nahrungsmittelzusatz zugelassen ist, als Hauptstickstoffquelle erreicht werden kann.

[0007] Das Wesentliche der vorliegenden Erfindung besteht in einem Verfahren zur Herstellung von Erythrit, umfassend die Schritte der Züchtung eines Hefestamms, der in der Lage ist, Erythrit aus fermentierbaren Kohlenhydraten in einem Kulturmedium herzustellen, das das fermentierbare Kohlenhydrat als Kohlenstoffquelle enthält und Gewinnung des Erythrits aus der Kultur, in der Ammoniumsulfat als Hauptstickstoffquelle in dem Kulturmedium verwendet wird.

[0008] Die bevorzugten Ausführungsformen zur Durchführung der vorliegenden Erfindung umfassen: das vorstehende Verfahren, in dem als Stickstoffquelle im Kulturmedium Ammoniumsulfat in einer Menge von 50 bis 85 % der gesamten Stickstoffquellen in Form von Stickstoffatomen verwendet wird; das vorstehende Verfahren, in dem das Medium des Weiteren Maisquellwasser als Stickstoffquelle enthält und die Menge an Ammoniumsulfat zwischen 50 und 85% liegt und die Menge an Maisquellwasser zwischen 15 und 50% der gesamten Stickstoffquellen im Medium in Form von Stickstoffatomen vorliegen; das vorstehende Verfahren, in dem der Hefestamm zur Gattung *Moniliella* gehört; das vorstehende Verfahren, in dem der Hefestamm zur Gattung *Moniliella pollinis* gehört; das vorstehende Verfahren, in dem der Hefestamm zur Gattung *Yarrowia* gehört; das vorstehende Verfahren, in dem der Hefestamm *Yarrowia lipolytica* ist; das vorstehende Verfahren, in dem der Hefestamm zur Gattung *Trichosporonoides* gehört; das vorstehende Verfahren, in dem der Hefestamm ausgewählt ist aus *Trichosporonoides oedocephalis*, *Trichosporonoides nigrescens* und *Trichosporonoides megachiliensis*; das vorstehende Verfahren, in dem das fermentierbare Kohlenhydrat ausgewählt ist aus Glucose, Fructose und Glycerin; das in dem die Stickstoffquelle in dem Kulturmedium in einer Konzentration von 0,1 bis 5,0% (W/V) enthalten ist und das vorstehende Verfahren, in dem ein pH-Wert des Kulturmediums bei 3,0 bis 7,0 gehalten wird.

[0009] Das vorstehende Verfahren wird im Folgenden detailliert beschrieben werden.

[0010] Jeder Hefestamm kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, so lange er Erythrit aus fermentierbarem Kohlenhydrat herstellen kann. Genauer kann der Hefestamm, der zur Gattung *Moniliella*, *Yarrowia*, *Trichosporonoides* gehört, verwendet werden. Noch genauer umfassen Beispiele dafür *Moniliella pollinis*, wenn der Stamm zur Gattung *Moniliella* gehört, *Yarrowia lipolytica*, wenn der Stamm zur Gattung *Yarrowia* gehört, *Trichosporonoides oedocephalis*, *Trichosporonoides nigrescens* und *Trichosporonoides megachiliensis*, wenn der Stamm zur Gattung *Trichosporonoides* gehört. Diese Stämme können Mutanten sein, die durch UV-Strahlung, Behandlung mit N-methyl-N-nitrosoguanidin (NTG), Behandlung mit Ethyl-Methansulfonat (EMS), Behandlung mit salpetriger Säure, Acridin-Behandlung und Ähnliches erhalten werden, oder rekombi-

nante Stämme, die gentechnisch durch Verfahren der Zellfusion oder rekombinante DNA-Verfahren hergestellt sind.

[0011] Einer oder zwei weitere der vorstehend beschriebenen Stämme können im vorstehenden Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0012] Spezifische Beispiele für solche Mutanten umfassen *Moniliella pollinis* MCI3371, welche eine Mutante von *Moniliella pollinis* CBS 461.67 ist, *Moniliella pollinis* MCI3555, welche eine Mutante von *Moniliella pollinis* MCI3554 ist, *Yarrowia lipolytica* ATCC8661, *Trichosporonoides oedocephalis* MCI3440, welche eine Mutante von *Trichosporonoides oedocephalis* CBS568.85 ist, *Trichosporonoides megachiliensis* MCI3369, welche eine Mutante von *Trichosporonoides megachiliensis* CBS567.85 ist und *Trichosporonoides nigrescens* MCI3437, welche eine Mutante von CS268.81 ist.

[0013] Die vorstehenden Stämme mit Ausnahme von *Yarrowia lipolytica* ATCC8661 sind Mutanten, die weniger Schaum bilden als Stämme vom Wildtyp, nach Behandlung mit ultravioletter Strahlung oder mit einem Mutagen wie N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidin (NTG) oder Ähnlichem, wobei die Stämme bei einem der International Depository Authorities, Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Niederlande hinterlegt oder von den vorliegenden Erfindern aus der Natur isoliert wurden. MCI3369, MCI3371, MCI3437, MCI3440, MCI3554 und MCI3555 wurden am National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (Postleitzahl : 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), unter den Hinterlegungsnummern FERM BP-6172, FERM BP-6173, FERM BP-6174, FERM BP-6175, FERM BP-6170 und FERM BP-6171 hinterlegt. *Yarrowia lipolytica* ATCC8661 wurde sowohl an der American Type Culture Collection (ATCC), U.S.A. sowie am National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-6169 hinterlegt. Die mycologischen Eigenschaften von MCI3369, MCI3371, MCI3437, MCI3440, MCI3554 und MCI3555 werden im Folgenden beschrieben.

MCI3369:

[0014] Die Färbung der Kolonie von Stamm MCI3369 bei einer Kultur von 24°C auf PDA-Medium ist anfänglich weiß, dann olivgrau und nach einer Kultur von mehr als zwei Wochen oliv-dunkelbraun. Der Stamm wächst schnell und vermehrt sich durch Knospung wie Hefen. Die Färbung der hefeähnlichen Zellen ist anfänglich farblos und dann oliv-dunkelbraun. Ihre vegetativen Hyphen wachsen gut und verzweigen sich durch Bildung von Septum. Die Hyphen haben eine Breite von 2 bis 3,8 µm, sind anfänglich farblos und verändern dann ihre Farbe zu dunklem Braun mit leichter Verdickung. Das Wachstum der Luft-Hyphen ist kräftig und an der Seite der Luft-Hyphen wird Blastoconidium gebildet. Die vegetativen Hyphen und die Luft-Hyphen sind fragmentiert und bilden ein thallisch-arthritisches Conidium. Das thallisch-arthritische Conidium liegt in Form eines Zylinders oder Rohrs vor und hat eine Größe von 3,6 bis 25 µm × 2,2 bis 4,3 µm. Es ist anfänglich farblos und verändert sich dann in blassbraun. Das Blastoconidium ist einzeln oder eine Kette von drei bis vier davon. Das Conidium befindet sich in einer schlanken elliptischen Form und hat eine Größe von 3,4 bis 7,5 µm × 1,9 bis 4,1 µm (6,5 ± 1,2 µm × 3,8 ± 0,6 µm im Durchschnitt). Es ist anfänglich farblos und verändert sich dann in oliv-dunkelbraun.

[0015] Die morphologischen Eigenschaften dieses Stammes (MCI3369) befinden sich in großer Übereinstimmung mit jenen eines Standard-Stammes des parentalen Stammes *Trichosporonoides megachiliensis* CBS567.85. Somit wurde dieser Stamm als *Trichosporonoides megachiliensis* identifiziert.

MCI3371:

[0016] Bei Züchtung auf PDA-Medium bei 24°C ist die Färbung der Kolonie von Stamm MCI3369 anfänglich weiß bis gelbweiß, verändert sich dann nach einer Kultur von einer Woche in blassgelb und nach weiterer Züchtung in schwarzbraun. Der Stamm wächst schnell und vermehrt sich wie Hefen durch Knospen. Tochterzellen sind anfänglich ein dünner Film von olive-dunkelbraun. Danach verdicken sie sich und dunkeln nach. Vegetative Hyphen wachsen gleichzeitig mit hefeähnlichen Knospen. Die vegetativen Hyphen haben ein Septum und Äste. Die Breite der Hyphen liegt zwischen 2 und 4,5 µm und ihre Färbung ist anfänglich farblos, um in dunkelbraun zu wechseln. Die Hyphen sind fragmentiert und bilden ein thallisch-arthritisches Conidium. Ein Blastoconidium wird an der Seite oder an der Spitze der Hyphen gebildet. Das thallisch-arthritische Conidium liegt in Form eines Zylinders oder Rohrs vor und hat eine Größe von 6 bis 35 µm × 2,5 bis 5,0 µm. Es ist anfänglich farblos und verändert sich dann in dunkelbraun. Das Blastoconidium ist einzeln oder eine Kette von zwei bis drei davon. Das Conidium befindet sich in einer eiförmigen bis elliptischen Form und hat eine Größe von 4,7 bis 9,4 µm × 3,1 bis 5,6 µm (6,8 ± 1,3 µm × 4,5 ± 0,6 µm im Durchschnitt). Es ist anfänglich farblos und verändert sich dann in oliv-dunkelbraun.

[0017] Dieser Stamm (MCI3371) besitzt einen Dimorphismus: thallisch-arthritisches Conidium und Blastoconidium. Letzteres ist in Richtung auf die Spitze charakteristisch geformt und wird nicht gleichzeitig gebildet. Basierend auf diesen Eigenschaften wurde die Gattung dieses Stammes in Übereinstimmung mit der Monographie

von De Hoog & Hermanides-Nijhof (1977) erforscht und als Ergebnis wurde herausgefunden, dass dieser Stamm zur Gattung *Moniliella* gehört. Gemäß De Hoog (1979) „The Black Yeasts, II: *Moniliella* and Allied Genera” Studies in Mycology Nr. 19, 1–90, ist bekannt, dass drei Arten und zwei Varianten, *Moniliella suaveolens* var. *suaveolens*, *Moniliella suaveolens* var. *niger*, *Moniliella acetoabutens* und *Moniliella pollinis* zur Gattung *Moniliella* gehören. Diese Arten und Varianten sind basierend auf hauptsächlich morphologischen Eigenschaften von thallisch-arthrischen Conidien oder Blastoconidien klassifiziert. Als ein Ergebnis der präzisen Untersuchung von morphologischen Eigenschaften dieses Stammes stimmte dies gut mit der Beschreibung von *Moniliella pollinis* überein. Deshalb wurde dieser Stamm als *Moniliella pollinis* identifiziert.

MCI3437:

[0018] Der Stamm MCI3437 zeigt anfänglich weiß bis gelbweiß, gelbliches dunkelbraun nach einwöchiger Kultur und dunkles gelbbraun nach mehr als zweiwöchiger Kultur bei Züchtung bei 24°C auf LCA. Die Wachstumsrate ist mäßig. Dieser Stamm vermehrt sich durch hefeähnliche Knospung. Tochterzellen sind anfänglich ein dünner Film von olivdunkelbraun, danach verdicken sie sich und wechseln zu dunkelbraun und vermehren sich durch multilaterale Knospung ein bis drei- oder viermal. Submerse Hyphen wachsen gleichzeitig mit hefeähnlichen Knospen. Die submersen Hyphen haben Septum und Ast. Ihre Breite liegt zwischen 2 und 4,5 µm und ihre Färbung ist anfänglich farblos und dann dunkelbraun. Die Hyphen sind fragmentiert und bilden ein thallisch-arthrisches Conidium. Alternativ wird an der Seite oder an der Spitze der Hyphe ein Blastoconidium gebildet. Das thallisch-arthrische Conidium hat die Form eines Zylinders oder Rohrs, eine variable Länge und eine Breite von 2,5 bis 5,0 µm. Es ist anfänglich farblos und verändert sich dann in dunkelbraun. Das Blastoconidium wird von der Seite und von der Spitze der submersen Hyphen her und einzeln oder in einer Kette von zwei oder drei davon gebildet. Es hat eine halbrunde bis elliptische Form mit einer Größe von von 4,3 bis 9,2 × 3,8 bis 6,5 µm, ist dunkelbraun gefärbt und verdickt sich. Es wächst nicht bei 37°C.

[0019] Dieser Stamm (MCI3437) besitzt einen Dimorphismus: thallisch-arthrisches Conidium und Blastoconidium. Letzteres ist in Richtung auf die Spitze charakteristisch geformt und wird nicht gleichzeitig gebildet. Basierend auf diesen Eigenschaften wurden Gattung und Art dieses Stammes mit dem parental Stamm von *Trichosporonoides nigrescens* verglichen und in Übereinstimmung mit der Monographie von G. S. De Hoog (1979) und der ursprünglichen Beschreibung von A.D. Hocking & J.I. Pitt (1981) erforscht. Als ein Ergebnis lagen die Eigenschaften dieses Stammes in guter Übereinstimmung mit jenen von *Trichosporonoides nigrescens*. Deshalb wurde dieser Stamm als *T. nigrescens* identifiziert.

MCI3440:

[0020] Der Stamm MCI3440 zeigt anfänglich weiß bis gelbweiß, braun nach einwöchiger Kultur und dunkles gelbbraun nach mehr als zweiwöchiger Kultur bei Züchtung bei 24°C auf LCA. Er wächst schnell und vermehrt sich durch hefeähnliche Knospung. Tochterzellen sind farblos und vermehren sich durch multilaterale Knospung ein bis drei- oder viermal. Submerse Hyphen und Lufthyphen wachsen gleichzeitig mit hefeähnlichen Knospen. Die submersen Hyphen und Lufthyphen haben Septum und Ast. Ihre Breite liegt zwischen 2 und 4,5 µm und sie sind farblos. Die Hyphen sind fragmentiert und bilden ein thallisch-arthrisches Conidium. Alternativ wird an der Seite oder an der Spitze der Hyphen ein Blastoconidium gebildet. Auf LCA und PDA wird kein Vesikel gebildet. Das thallisch-arthrische Conidium hat die Form eines Zylinders oder Rohrs, eine variable Länge und eine Breite von 2,5 bis 5,0 µm. Es ist farblos. Das Blastoconidium wird von der Seite und von der Spitze der submersen Hyphen her und einzeln oder in einer Kette von zwei oder drei davon gebildet. Es hat eine elliptische Form mit einer Größe von 4,7 bis 8,1 × 2,5 bis 3,4 µm, ist farblos und wächst bei 37°C.

[0021] Dieser Stamm (MCI3440) besitzt einen Dimorphismus: thallisch-arthrisches Conidium und Blastoconidium. Letzteres ist in Richtung auf die Spitze der submersen und Lufthyphen charakteristisch geformt. Es bildet keine Vesikel vom *Oedocephalus*-Typ. Gemäß der ursprünglichen Beschreibung von Haskins & Spencer (1966) wird *Trichosporonoides oedocephalis* von anderen Arten (*T. spathulata*, *T. nigrescens*, *T. madida* und *T. megachiliensis*) vor allem in seiner Eigenschaft, Vesikel zu bilden unterschieden. Diese Variante (MCI3440) unterscheidet sich in diesem Punkt von *T. oedocephalis*. Als ein Ergebnis des Vergleichs von diesem Stamm mit dem parental Stamm von *T. oedocephalis* und des Erforschens der Gattung und der Art dieses Stammes in Übereinstimmung mit der Monographie von G.S. de Hoog (1979) und der ursprünglichen Beschreibung von R.H. Haskins & J.F.T. Spencer (1966) waren seine morphologischen Eigenschaften in guter Übereinstimmung mit jenen des parental Stammes von *T. oedocephalis*. Deshalb wurde dieser Stamm als *T. oedocephalis* identifiziert.

MCI3554:

1) Morphologische Eigenschaften

[0022] Kolonien vom Stamm MCI3554 zeigen anfänglich weiß bis gelbweiß, gelbliches dunkelbraun nach einwöchiger Kultur und dunkles gelbbraun nach Kultur von mehr als zwei Wochen bei Züchtung bei 24°C auf PDA. Die Wachstumsrate ist mäßig. Dieser Stamm vermehrt sich durch hefeähnliche Knospung. Tochterzellen sind anfänglich farblos und verdicken sich dann, während sie zu blassbraun wechseln, wobei sie eine elliptische, eiförmige oder halbrunde Form und eine Größe von 3,8 bis 6,3 µm × 3,0 bis 5,0 µm annehmen. Sie vermehren sich ein bis drei oder viermal durch hefeähnliche Knospung.

[0023] Submerse Hyphen und Lufthyphen wachsen gleichzeitig mit hefeähnlichen Knospen. Die submersen Hyphen und Lufthyphen haben eine Breite zwischen 2,2 und 3,5 µm und ein Septum mit Verästelungen. Ihre Färbung ist anfänglich farblos und wird dann dunkelbraun. Die Hyphen sind fragmentiert und bilden ein thallisch-arthrisches Conidium. Alternativ wird an der Seite oder an der Spitze der Hyphen ein Blastoconidium gebildet. Das thallisch-arthrische Conidium hat die Form eines Zylinders oder Rohrs, eine variable Länge und eine Breite von 9,4 bis 18,8 µm × 3,1 × 4,1 µm. Es ist anfänglich farblos und wechselt dann in blassbraun. Das Blastoconidium wird von der Seite und von der Spitze der submersen Hyphen her und einzeln oder in einer Kette von zwei oder drei davon gebildet. Es hat eine halbrunde bis elliptische Form mit einer Größe von 5,9 bis 10,9 × 3,8 bis 5,9 µm. Es ist anfänglich farblos und wird dann mit der Verdickung dunkelbraun.

2) Physiologische Eigenschaften

Wachstumstemperatur: 9 bis 37°C (gezüchtet auf PDA über 10 Tage)

Optimale Wachstumstemperatur: 27 bis 30°C.

Wachstums-pH-Wert: 4 bis 9 (gezüchtet in flüssigem LCA-Medium über 10 Tage).

Optimaler Wachstums-pH-Wert: 5 bis 6

Verwendung von Kohlenstoffquellen: gezeigt in Tabelle 1.

Fermentierbarkeit von Kohlenhydraten: gezeigt in Tabelle 2.

Verwendung von Stickstoffquellen: gezeigt in Tabelle 3.

3) Taxonomische Analyse

[0024] Dieser Stamm (MCI3554) wird so beschrieben, dass er 1) hefeähnliche Knospungen (Tochter-)Zellen hat, 2) einen Dimorphismus aufweist: thallisch-arthrisches Conidium und Blastoconidium, und 3) das Blastoconidium charakteristisch in Richtung auf die Spitze gebildet wird und nicht gleichzeitig gebildet wird. Basierend auf diesen Eigenschaften wurden Gattung und Art dieses Stammes mit Bezug auf die Forschungstabelle in der Monographie von G.S. de Hoog (1979), „The Black Yeasts, II: Moniliella and Allied Genera, Studies in Mycology Nr. 19, 1–36“ und die Beschreibung von Arten, die zu der Gattung Moniliella in G.S. de Hoog & D. Gueho (1984) „Desoxyribonucleic Acid Base Composition and Taxonomy of Moniliella and Allied Genera, Antonie van Leeuwenhoek, 135–141“ erforscht. Als ein Ergebnis lagen die Eigenschaften dieses Stammes in guter Übereinstimmung mit jenen von Übereinstimmung mit jenen von Moniliella olinis. Des Weiteren stimmen die Eigenschaften beim Vergleich mit dem Typenstamm (CBS 461.67) von Moniliella pollinis gut überein. Deshalb wurde dieser Stamm als Moniliella pollinis identifiziert.

MCI3555:

1) Morphologische Eigenschaften

[0025] Der Stamm MCI3555 ist eine Mutante, die von Moniliella pollinis MCI3554 abgeleitet wird. Kolonien vom Stamm MCI3555 zeigen anfänglich weiß bis gelbweiß, gelbliches dunkelbraun nach einwöchiger Kultur und dunkles gelbbraun nach Kultur von mehr als zwei Wochen bei Züchtung bei 24°C auf PDA. Die Wachstumsrate ist mäßig. Dieser Stamm vermehrt sich durch hefeähnliche Knospung. Tochterzellen sind anfänglich farblos und verdicken sich, während sie zu blassbraun wechseln, wobei sie eine elliptische, eiförmige oder halbrunde Form und eine Größe von 4,0 bis 7,8 µm × 3,5 bis 6,2 µm annehmen. Sie vermehren sich einmal bis drei- oder viermal durch multilaterale Knospung. Submerse Hyphen und Lufthyphen wachsen gleichzeitig mit hefeähnlichen Knospen. Die submersen Hyphen und Lufthyphen haben eine Breite zwischen 1,3 und 4,1 µm und ein Septum mit Verästelungen. Ihre Färbung ist anfänglich farblos und wird dann dunkelbraun. Die Hyphen sind fragmentiert und bilden ein thallisch-arthrisches Conidium. Alternativ wird an der Seite oder an der Spitze der Hyphen ein Blastoconidium gebildet. Das thallisch-arthrische Conidium hat die Form eines Zylinders oder Rohrs, eine variable Länge und eine Breite von 13,4 bis 32,8 µm × 2,5 × 4,1 µm. Es ist anfänglich farblos

und wechselt dann in dunkelbraun. Das Blastoconidium wird von der Seite und von der Spitze der submersen Hyphen her und einzeln oder in einer Kette von zwei oder drei davon gebildet. Es hat eine halbrunde bis ellip-tische Form mit einer Größe von 5,0 bis 9,4 × 4,4 bis 6,3 µm. Es ist anfänglich farblos und wird dann mit der Verdickung dunkelbraun.

2) Physiologische Eigenschaften

Wachstumstemperatur: 9 bis 37°C (gezüchtet auf PDA über 10 Tage)

Optimale Wachstumstemperatur: 27 bis 30°C.

Wachstums-pH-Wert: 4 bis 9 (gezüchtet in flüssigem LCA-Medium über 10 Tage).

Optimaler Wachstums-pH-Wert: 5 bis 6

Verwendung von Kohlenstoffquellen: gezeigt in Tabelle 1.

Fermentierbarkeit von Kohlenhydraten: gezeigt in Tabelle 2.

Stickstoffquellen: gezeigt in Tabelle 3.

3) Taxonomische Analyse

[0026] Dieser Stamm (MCI3555) wird so beschrieben, dass er 1) hefeähnliche Knospungs-(Tochter-)Zellen hat, 2) einen Dimorphismus aufweist: thallisch-arthritisches Conidium und Blastoconidium, und 3) das Blastoconidium charakteristisch in Richtung auf die Spitze gebildet wird und nicht gleichzeitig gebildet wird. Basierend auf diesen Eigenschaften wurden Gattung und Art dieses Stammes mit Bezug auf die Forschungstabelle in der Monographie von G.S. de Hoog (1979), „The Black Yeasts, II: Moniliella and Allied Genera, Studies in Mycology Nr. 19, 1-36“ und die Beschreibung von Arten, die zu der Gattung Moniliella in G.S. de Hoog & D. Gueho (1984) „Desoxyribonucleic Acid Base Composition and Taxonomy of Moniliella and Allied Genera, Antonie van Leeuwenhoek, 135-141“ erforscht. Als ein Ergebnis lagen die Eigenschaften dieses Stammes in guter Übereinstimmung mit jenen von Moniliella pollinis. Des Weiteren stimmen die Eigenschaften beim Vergleich mit dem Typenstamm (CBS 461.67) von Moniliella pollinis gut überein. Deshalb wurde dieser Stämmen als Moniliella pollinis identifiziert.

Tabelle 1: Verwendung von Kohlenstoffquellen

Nr	Kohlenstoffquelle	MCI3554	MCI3555
1	D-glucose	+	+
2	D-galactose	V	-
3	L-sorbose	±	-
4	D-glucosamine	-	-
5	D-ribose	V	±
6	D-xylose	±	-
7	L-arabinose	±	±
8	D-arabinose	-	-
9	L-rhamnose	-	-
10	Sucrose	+	+
11	Maltose	+	+
12	α, α -trehalose	-	-
13	Methyl α -D-glucoside	-	-
14	Cellobiose	+	+
15	Salicin	-	-
16	Arbutin	+	+
17	Melibiose	-	-
18	Lactose	-	-
19	Raffinose	-	-
20	Melezitose	-	-
21	Inulin	-	-
22	lösliche Stärke	-	-
23	Glycerin	+	+
24	Meso-Erythritol	+	+
25	Ribitol	-	-
26	Xylitol	+	±
27	L-arabinitol	-	-
28	D-glucitol	-	-
29	D-mannitol	+	+
30	Galactitol	-	-
31	Myo-Inositol	-	-

32	Glucono- δ -lacton	+	+
33	D-gluconsaure Säure	-	-
34	D-gluconsaure Säure	-	-
35	D-gluconsaure Säure	-	-
36	DL-Michsäure	-	-
37	sukzinsaure Säure	±	±
38	Zitronensäure	±	±
39	Methanol	-	-
40	Ethanol	+	+

+: verwendbar. ±: keine Aussage darüber, welches, V: unbestimmt, und
: nicht verwendet.

Tabelle 2: Fermentierbarkeit von Kohlenhydraten

No.	Kohlenhydrat	MCI3554	MCI3555
1	D-glucose	+	+
2	D-galactose	-	-
3	Maltose	+	+
4	Sucrose	+	+
5	Lactose	-	-
6	Raffinose	-	-

+: fermentierbar, -: nicht fermentierbar

Tabelle 3: Verwendung von Stickstoffquellen

Stickstoffquelle	MCI3554	MCI3555
Ammoniumsulfat	+	+
Kaliumnitrat	+	+
L-lysin	+	+
Kadaverin	+	+

+: verwendbar, -: nicht verwendet

[0027] Die Haupt-Kohlenstoffquellen, die in dem Kulturmedium zur Kultivierung dieser Hefestämme verwendet wurden, sind nicht besonders beschränkt, so lange sie fermentierbare Kohlenstoffe sind. Vorzugsweise können fermentierbare Kohlenstoffe wie Glucose, Fructose und Glycerin verwendet werden. Glucose wird besonders bevorzugt. Diese fermentierbaren Kohlenhydrate können allein oder in Kombination davon verwendet werden. Obwohl ihre Konzentrationen nicht besonders beschränkt sind, ist es von Vorteil, innerhalb des Bereichs, der die Produktion von Erythrit nicht hemmt, eine Konzentration zu verwenden, die so hoch wie möglich ist. Die Konzentration liegt bevorzugt zwischen 20 und 50% (W/V), stärker bevorzugt zwischen 35 und 40% (W/V).

[0028] Die Stickstoffquellen sind bevorzugt aus Ammoniumsulfat in einer Menge von 50 bis 85% der gesamten Stickstoffquellen in Bezug auf die Stickstoffatome und verschiedene organische oder anorganische Stickstoff enthaltende Verbindungen wie Ammoniumsalz außer Ammoniumsulfat, Pepton, Hefeextrakt, Maisquellwasser und Ähnliche, in einer Menge vom Rest (15 bis 50%) der gesamten Stickstoffquellen zusammenge-

setzt. Der Rest der Stickstoffquellen außer Ammoniumsulfat ist bevorzugt Maisquellwasser. Die Verwendung von Ammoniumsulfat in einer Menge von weniger als 50% ist ungünstig, da Glycerin als Nebenprodukt gebildet werden kann, das erhaltene Erythrit dunkelbraun färbt oder eine große Menge an Salz kontaminiert. Auf der anderen Seite ist die Verwendung von Ammoniumsulfat in einer Menge von mehr als 85% ebenfalls ungünstig, da der Ertrag an Erythrit reduziert wird. Beispiele für die anorganischen Salze umfassen verschiedene phosphorische Salze, schweflige Salze, Salze mit Metallen wie Magnesium, Kalium, Mangan, Eisen, Zink oder Ähnliche. Wenn nötig können Faktoren, die das Wachstum der Hefestämme fördern können, zugesetzt werden. Beispiele dafür umfassen Vitamine, Nucleotide, Aminosäuren und Ähnliche. Es ist erwünscht, eine geeignete Menge eines im Handel erhältlichen Antischaummittels zuzusetzen, um die Schaumbildung während der Züchtung zu verhindern.

[0029] Das Kulturmedium wird im frühen Stadium der Fermentierung auf einen pH-Wert von 3 bis 7,0, bevorzugt 3 bis 4,5, stärker bevorzugt 3,5 bis 4,0 eingestellt. Die Temperatur während der Kultivierung wird auf 5 bis 40°C, bevorzugt auf 30 bis 37°C eingestellt.

[0030] Um die Kultivierung zu starten können die Mikrobenzellen direkt von der Schrägkultur zum Kulturmedium inokuliert werden. Die Zellen werden bevorzugt einen bis vier Tage in einem Flüssigmedium kultiviert und die entstandene Kultur wird in das Kulturmedium inokuliert. Die Kultur wird unter aeroben Bedingungen unter Rühren bei Belüftung oder Schütteln durchgeführt. Die Kultur wird bevorzugt weitergeführt bis die Hauptkohlenstoffquelle erschöpft ist, im Allgemeinen drei bis sechs Tage lang. Die Menge des hergestellten Erythrits kann durch Gaschromatographie, Hochleistungs-Flüssigchromatographie oder Ähnliche durchgeführt werden.

[0031] Erythrit, welches so in dem Kulturmedium akkumuliert wird, kann mit den üblichen Verfahren vom Kulturmedium isoliert und gereinigt werden. Genauer, Erythrit kann durch Entfernen der Feststoffe, einschließlich der Mikrobenzellen, durch Zentrifugation, Filtration oder Ähnliches isoliert und gereinigt werden, wobei die entstandene Flüssigkeit durch die Behandlung mit Ionenaustauschharz oder aktiviertem Kohlenstoff einer Entsalzung und Entfärbung unterzogen wird und durch Durchführung einer erneuten Kristallisation von der entstandenen Lösung isoliert werden.

[0032] Gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung kann Erythrit in hohen Ertragsmengen unter Verwendung von sicheren und preiswerten Stickstoffquellen, welche als Nahrungsmittelzusätze erlaubt sind, effizient hergestellt werden.

[0033] Die folgenden Beispiele werden die vorliegende Erfindung detaillierter illustrieren, sind jedoch nicht so konzipiert, dass sie den Umfang der Erfindung beschränken, da sie innerhalb des Hauptthemas der Erfindung liegen.

(Zusammensetzung des Kulturmediums)

Tabelle 4

Glucose	40%
Maisquellwasser (Ohji Maisstärke)	1,5%
Ammoniumsulfat	0,886%
Kaliumdihydrogenphosphat	0,1%
Zinksulfat	0,005%
Vitamin B1	0,005%
Antischaummittel	0,05%

[0034] In der vorstehenden Tabelle 4 ist das Verhältnis des Ammoniumsulfats zum Maisquellwasser als Stickstoffquelle etwa 4 : 1 hinsichtlich des Stickstoffverhältnisses (Stickstoffgehalt des Maisquellwassers: durchschnittlich 3%).

BEISPIELE 1-3

[0035] Zu einer mit Watte verstopften konischen 500 ml-Flasche wurden 100 ml eines Flüssigmediums zugesetzt, welches 30% (WN) Glucose und 1% Hefeextrakt (Asahi Breweries) enthielt, gefolgt von einer Sterilisierung bei 120°C über 20 Minuten. Die Flasche wurde jeweils mit Schrägkulturen von MCI3437, MCI3440 und MCI3555, die auf herkömmliche Weise hergestellt wurden, inokuliert und 3 Tage unter Schütteln bei 30°C gezüchtet (Impfkultur). Zehn ml der Impfkultur wurden verwendet, um einen 1-Liter-Fermenter welcher 500 ml des vorstehend in Tabelle 4 gezeigten Kulturmediums enthielt, zu inokulieren und wurden bei 35°C, 0,5 vvm Belüftung und 800 UpM 4 Tage lang gezüchtet. Der pH-Wert des Mediums zur Zeit der Inokulation lag bei 3,9 bis 4,0 und der pH-Wert wurde durch Zusetzen einer 35%igen wässrigen Natriumhydroxidlösung während der Züchtung bei 3,5 bis 3,7 aufrechterhalten. Die Konzentrationen von Erythrit und Glycerin im Kulturmedium wurden durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie gemessen und der Grad der Färbung des Überstands der

Nährlösung nach Beendigung der Züchtung wurde durch Messung der Absorption bei 420 nm durch ein Spektrophotometer bestimmt.

[0036] Die Ergebnisse der Menge an hergestelltem Erythrit, der Menge an hergestelltem Glycerin und dem Grad der Färbung des Kulturmediums jedes Stammes waren wie folgt.

Tabelle 5

Beispiel Nr.	Stamm	Menge an Erythrit	Menge an Glycerin	Grad der Färbung (A_{420})
1	MCI3437	150.9 g/L	66.6 g/L	0.412
2	MCI3440	124.5 g/L	3.0 g/L	0.552
3	MCI3555	170.3 g/L	4.5 g/L	0.673

BEISPIEL 4

[0037] Zu einer mit Watte verstopften konischen 500 ml-Flasche wurden 100 ml eines Flüssigmediums zugesetzt, welches 30% (W/n Glucose und 1% Hefeextrakt (Asahi Breweries) enthielt, gefolgt von einer Sterilisierung bei 120°C über 20 Minuten. Die Flasche wurde mit einer Öse einer Schrägkultur von MCI3369, welches auf herkömmliche Weise hergestellt wurde, inokuliert und 3 Tage unter Schütteln bei 35°C gezüchtet (Die entstandene Impfkultur wird als „Impfkultur A“ bezeichnet). Zu einer mit Watte verstopften konischen 500 ml-Flasche wurden 100 ml eines Flüssigmediums zugesetzt, welches 30% (W/V) Glucose und 1% Hefeextrakt (Asahi Breweries) enthielt, gefolgt von einer Sterilisierung bei 120°C über 20 Minuten. Die Flasche wurde mit 2 ml der vorstehenden Impfkultur A inokuliert, und 3 Tage unter Schütteln bei 35°C gezüchtet (Die entstandene Impfkultur wird als „Impfkultur B“ bezeichnet). Dreihundert ml der vorstehenden Impfkultur B wurden verwendet, um einen 30-Liter-Fermenter welcher 15 l des vorstehend in Tabelle 4 gezeigten Kulturmediums enthielt, zu inokulieren und wurden bei 35°C, 0,5 vvm Belüftung, einem inneren Druck von 0,5 kg/cm²G und 350 UpM 4 Tage lang gezüchtet. Der pH-Wert des Mediums zur Zeit der Inokulation lag bei 3,9 bis 4,0 und der pH-Wert wurde durch Zusetzen einer 35%igen wässrigen Natriumhydroxidlösung während der Züchtung bei 3,5 bis 3,7 aufrechterhalten. Die Konzentrationen von Erythrit und Glycerin im Kulturmedium wurden durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie gemessen. Als ein Ergebnis lag das Verhältnis des Ertrags von Erythrit zu Glucose bei 48,2%, wohingegen das Verhältnis des Ertrags von Glycerin zu Glucose bei 1,1% lag. Der Grad der Färbung des Überstands der Nährlösung nach Beendigung der Züchtung lag bei 0,367 bei 420 nm.

BEISPIEL 5

[0038] Dreihundert ml der vorstehenden Impfkultur A wurden verwendet, um einen 30-Liter-Fermenter, welcher 15 l des Flüssigmediums, welches 30% (W/V) Glucose, 3,7% Maisquellwasser (Ohji Maisstärke) und 0,1% eines Antischaummittels enthielt, zu inokulieren und bei 35°C, 0,5 vvm Belüftung, einem inneren Druck von 0,5 kg/cm²G und 330 UpM 3 Tage lang gezüchtet. (Die entstandene Impfkultur wird als „Impfkultur C“ bezeichnet). Dreihundert ml der vorstehenden Impfkultur C wurden verwendet, um einen 30-Liter-Fermenter welcher 15 l des vorstehend in Tabelle 4 gezeigten Kulturmediums enthielt, zu inokulieren und wurden bei 35°C, 0,5 vvm Belüftung, einem inneren Druck von 0,5 kg/cm²G und 330 UpM 4 Tage lang gezüchtet. Der pH-Wert des Mediums zur Zeit der Inokulation lag bei 3,9 bis 4,0 und der pH-Wert wurde durch Zusetzen einer 35%igen wässrigen Natriumhydroxidlösung während der Züchtung bei 3,5 bis 3,7 aufrechterhalten. Die Konzentrationen von Erythrit und Glycerin im Kulturmedium wurden durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie gemessen. Als ein Ergebnis lag das Verhältnis des Ertrags von Erythrit zu Glucose bei 47,2%, wohingegen das Verhältnis des Ertrags von Glycerin zu Glucose bei 0,9% lag. Der Grad der Färbung des Überstands der Nährlösung nach Beendigung der Züchtung lag bei 0,395 bei 420 nm.

BEISPIEL 6

[0039] Erythrit wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 4 mit Ausnahme der Verwendung von MCI3371 hergestellt. Das Verhältnis des Ertrags an Erythrit zu Glucose lag bei 48,0% wohingegen das Verhältnis des Ertrags von Glycerin zu Glucose bei 4,5% lag. Der Grad der Färbung des Überstands der Nährlösung nach Beendigung der Züchtung lag bei 0,353 bei 420 nm.

BEISPIEL 7

[0040] Zu einer mit Watte verstopften konischen 500 ml-Flasche wurden 100 ml eines Flüssigmediums zugesetzt, welches 30% (WN) Glucose und 1% Hefeextrakt (Asahi Breweries) enthielt, gefolgt von einer Sterilisierung bei 120°C über 20 Minuten. Die Flasche wurde mit dem Stamm ATCC 8661, welcher auf herkömmliche Weise durch Schrägkultur hergestellt wurde, inokuliert und 3 Tage unter Schütteln bei 30°C gezüchtet (Impfkultur). Einhundert ml der Impfkultur wurden verwendet, um einen 5-Liter-Fermenter welcher 2,5 l des vorstehend in Tabelle 4 gezeigten Kulturmediums enthielt, zu inokulieren und wurden bei 30°C, 1 vvm Belüftung, 900 UpM und einem inneren Druck von 5 kg/ cm²G 5 Tage lang gezüchtet. Der pH-Wert des Mediums zur Zeit der Inokulation lag bei 3,9 bis 4,0 und der pH-Wert wurde durch Zusetzen einer 35%igen wässrigen Natriumhydroxidlösung während der Züchtung bei 3,5 bis 3,7 aufrechterhalten. Die Konzentrationen von Erythrit und Glycerin im Kulturmedium wurden durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie gemessen. Als ein Ergebnis lag das Verhältnis des Ertrags von Erythrit zu Glucose bei 43,9%,. Der Grad der Färbung des Überstands der Nährlösung nach Beendigung der Züchtung lag bei 0,365 bei 420 nm.

BEISPIELE 8 bis 12

[0041] Zu einer mit Watte verstopften konischen 500 ml-Flasche wurden 100 ml eines Flüssigmediums zugesetzt, welches 30% (WN) Glucose und 1% Hefeextrakt (Asahi Breweries) enthielt, gefolgt von einer Sterilisierung bei 120°C über 20 Minuten. Die Flasche wurde mit dem Stamm MCI3555, der auf herkömmliche Weise auf einer Schrägkultur gezüchtet wurde, inokuliert und 3 Tage unter Schütteln bei 30°C gezüchtet (Impfkultur). Zehn ml der Impfkultur wurden verwendet, um einen 1-Liter-Fermenter welcher 500 ml des Kulturmediums, wie in Tabelle 4 gezeigt, mit der Ausnahme, dass das Verhältnis des Maisquellwassers und das Ammoniumsulfat wie in Tabelle 6 gezeigt, ausgetauscht wurde, enthielt, zu inokulieren und wurden bei 35°C, 0,5 vvm Belüftung und 800 UpM 4 Tage lang gezüchtet. Der pH-Wert des Mediums zur Zeit der Inokulation lag bei 3,9 bis 4,0 und der pH-Wert wurde durch Zusetzen einer 35%igen wässrigen Natriumhydroxidlösung während der Züchtung bei 3,5 bis 3,7 aufrechterhalten.

Tabelle 6

Beispiel Nr.	Menge an Maisquellwasser	Menge an Ammoniumsulfat
8	3.0264%	0.5044%
9	2.5220%	0.6305%
10	1.2610%	0.94575%
11	0.7566%	1.07185%
12	0.5044%	1.1349%

[0042] Die Ergebnisse der Menge an hergestelltem Erythrit, der Menge an hergestelltem Glycerin und dem Grad der Färbung des Kulturmediums jedes Stammes waren wie folgt.

Tabelle 7

Beispiel Nr.	Menge an Erythrit	Menge an Glycerin	Grad der Färbung (A_{420})
8	160.5 g/L	10.2 g/L	1.585
9	180.5 g/L	6.7 g/L	1.318
10	169.3 g/L	4.8 g/L	0.993
11	135.2 g/L	27.0 g/L	0.721
12	89.7 g/L	45.0 g/L	0.691

VERGLEICHBSBEISPIELE 1 bis 3

[0043] Erythrit wurde auf dieselbe Weise wie in den Beispielen 1 bis 3 hergestellt, mit der Ausnahme, dass das Kulturmedium verwendet wurde, das die in Tabelle 8 gezeigte Zusammensetzung hat an Stelle des Kulturmediums, das die in Tabelle 4 gezeigte Zusammensetzung hat.

(Zusammensetzung des Kulturmediums des Vergleichsbeispiels)

Tabelle 8

Glucose	40%
Maisquellwasser (Ohji Maisstärke)	8%
Antischaummittel	0,05%

[0044] In Tabelle 8 war die verwendete Stickstoffquelle nur Maisquellwasser und der Stickstoffgehalt dieser Zusammensetzung ist hinsichtlich der Stickstoffatome derselbe wie in der in Tabelle 4 gezeigten Zusammensetzung. Die Ergebnisse der Menge an hergestelltem Erythrit, der Menge an hergestelltem Glycerin und dem Grad der Färbung des Kulturmediums jedes Stammes waren wie folgt.

Tabelle 9

Vergleichs-Beispiel Nr.	Stamm	Menge an Erythrit	Menge an Glycerin	Grad der Färbung (A_{420})
1	MCI3437	137.3 g/L	76.2 g/L	3.131
2	MCI3440	109.3 g/L	18.7 g/L	2.707
3	MCI3555	167.5 g/L	14.5 g/L	3.112

VERGLEICHBSBEISPIEL 4

[0045] Erythrit wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 4 hergestellt, mit der Ausnahme, dass das Kulturmedium verwendet wurde, das die in Tabelle 8 gezeigte Zusammensetzung hat an Stelle des Kulturmediums, das die in Tabelle 4 gezeigte Zusammensetzung hat.

[0046] Als ein Ergebnis lag das Verhältnis des Ertrags von Erythrit zu Glucose bei 39,89%, wohingegen das Verhältnis des Ertrags von Glycerin zu Glucose bei 19,5% lag.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Erythrit, umfassend die Schritte der Züchtung eines Hefestammes, der fähig ist, aus fermentierbarem Kohlenhydrat Erythrit herzustellen in einem Kulturmedium, das das fermentierbare Kohlenhydrat als eine Haupt-Kohlenstoffquelle enthält, und der Gewinnung von Erythrit aus der Kultur, wobei das Kulturmedium Ammoniumsulfat als eine Hauptstickstoffquelle enthält.
2. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach Anspruch 1, wobei eine Ammoniumsulfatmenge im Bereich von 50 bis 85% der Gesamtstickstoffquellen im Medium bezogen auf das Stickstoffatom liegt.
3. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach Anspruch 2, wobei das Medium zusätzlich Maisquellwasser als eine Stickstoffquelle enthält, und wobei eine Menge an Ammoniumsulfat im Bereich von 50 bis 85%, sowie eine Menge an Maisquellwasser im Bereich von 15 bis 50% der Gesamtstickstoffquellen im Medium bezogen auf das Stickstoffatom liegt.
4. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Hefestamm zur Gattung *Moniliella* gehört.
5. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach Anspruch 4, wobei der Hefestamm *Moniliella pollinis* ist.
6. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Hefestamm zur Gattung *Yarrowia* gehört.
7. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach Anspruch 6, wobei der Hefestamm *Yarrowia lipolytica* ist.
8. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Hefestamm zur Gattung *Trichosporonoides* gehört.
9. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach Anspruch 8, wobei der Hefestamm ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus *Trichosporonoides oedocephalis*, *Trichosporonoides nigrescens* und *Trichosporonoides megachiliensis*.
10. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das fermentierbare Kohlenhydrat ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glucose, Fructose und Glycerin.
11. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Stickstoffquelle in einer Konzentration von 0,1 bis 5,0% (w/v) in dem Medium enthalten ist.
12. Verfahren zur Herstellung von Erythrit nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der pH-Wert des Kulturmediums bei 3,0 bis 7,0 gehalten wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen