DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **242 055 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 12 N 11/12**
C 12 P 7/42

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 282 112 4 (22) 28.10.85 (44) 14.01.87

(71) Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg, 4020 Halle, Universitätsplatz 10, DD
(72) Schellenberger, Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Döpfer, Klaus-Peter, Dr. Dipl.-Chem.; Straube, Gunhild, Doz. Dr. Dipl.-Biol.; Dautzenberg, Horst, Dr. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung von organischen Säuren

(57) Die vorliegende Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung von organischen Säuren, besonders organischen Genußsäuren, das es gestattet, organische Säuren in solcher Qualität herzustellen, daß sie sowohl für den Einsatz in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie als auch für medizinische und biochemische Zwecke geeignet sind. Organische Säuren produzierende Mikroorganismen werden in geeigneter Weise in eine Kapsel aus Polyelektrolytkomplexen eingeschlossen und mit Nähr- bzw. Produktionsmedium umspült. Die Substanzumsetzung findet bei Temperaturen von 4–40 °C und bei für die Produktion der jeweiligen Säure optimalen *p*H-Werten statt. Die resultierende, die organische Säure enthaltende Lösung über eine geeignete ionenaustauschaktive Substanz enthaltende Säule geführt und so vom Produkt befreit. Die vom Produkt befreite Lösung kann mit Substrat versetzt und der erneuten Fermentation zugeführt werden.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung von organischen Säuren, vorzugsweise organischen Genußsäuren, **gekennzeichnet dadurch,** daß organische Säuren produzierende Mikroorganismen in eine semipermeable Membran aus Polyelektrolytkomplexen eingeschlossen und einer aeroben oder anaeroben Fermentation unterworfen werden, wobei zur kontinuierlichen Verfahrensführung dem ausgezehrten Medium ständig Substrat zugeführt wird und die entstehende organische Säure an anionenaustauschaktive Substanzen gebunden wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Fermentation bei Temperaturen von 0°C bis zur oberen Stabilitätsgrenze der Mikroorganismen und bei *p*H-Werten von 2.0–7.5 durchgeführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß die Fermentation bei Substratkonzentrationen von 0,5% bis zur Stabilitätsgrenze der semipermeablen Kapseln durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kontinuierlichen Gewinnung von organischen Säuren mittels immobilisierter Mikroorganismen, wobei die immobilisierten Mikroorganismen eine kontinuierliche Herstellung organischer Säuren wie beispielsweise Citronensäure, Isocitronensäure, Gluconsäure, α-Ketogularsäure gestatten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Herstellung von Stoffwechselprodukten vermittels immobilisierter lebender Systeme oder Teilen von ihnen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung von immobilisierten Mikroorganismen erwiesen, da die Reindarstellung von Enzymen entfällt und auch die Abtrennbarkeit der gewünschten Produkte weniger Probleme aufwirft. Außerdem sind diese Biokatalysatoren oft wiederverwendbar. Es sind auf diese Weise technologische Vorteile gegenüber dem Arbeiten mit freien Mikroorganismen zu erzielen und sie können zu Kosteneinsparungen führen (S. Birnbaum, P.-O- Larsson und K. Mosbach, Solid Phase Biochemistry: Analytical Synthetic Aspects 679–762 [1983]).
Die Fermentation mit freien Mikroorganismen ist entweder im emersen oder submersen Verfahren durchführbar. Der Nachteil dieser Verfahrensweise besteht in starker Kontaminationsempfindlichkeit gegenüber Infektionen mit Fremdorganismen und der schlechten Abtrennbarkeit der das gewünschte Fermentationsprodukt enthaltenden Lösung. Eine kontinuierliche Verfahrensführung ist kaum möglich.
Immobilisierung von ganzen Zellen ist im wesentlichen durch inotrope Gelierung von Polysacchariden (z. B. Na-Alginat mit Ca^{2+}) oder durch Polymerisation einer Suspension von Zellen mit einem geeigneten Monomeren (z. B. Acrylamid) zu bewerkstelligen. Die alginatimmobilisierten Zellen können nicht in phosphatpufferhaltigen Systemen verwendet werden, das Acrylamid selbst besitzt erhebliche Toxizität für lebende Systeme.
Es wird beispielsweise ein Verfahren zur Produktion von Citronensäure mit in Polyacrylamidgel immobilisierten Candidalipolytica-Zellen von U. Stottmeister (Z. Allg. Mikrobiol. **19** [10], 763–765 [1979], vgl. auch R. Berger und G. Langhammer Z. Allg. Mikrobiol. **20** [1], 69–72 [1980]) beschrieben. Infolge der schon erwähnten Toxizität des Acrylamids und der Diffusionslimitierung durch das Polymernetzwerk liegen die Ausbeuten an organischer Säure nur bei ca. 5% im Vergleich zu freien Zellen. Zudem treten durch Zellwachstum freie Zellen im Fermentationsmedium auf.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in einfacher und ökonomischer Weise eine kontinuierliche Produktion organischer Säuren, vorzugsweise organischer Genußsäuren vermittels immobilisierter Mikroorganismen durchzuführen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, organische Säuren, vorzugsweise organische Genußsäuren, mit Hilfe eingekapselter Mikroorganismen zu produzieren und dieselbe vermittels geeigneter ionenaustauschender Substanzen selektiv aus dem Produktionsmedium zu entfernen.
Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß organische Säuren produzierende Mikroorganismen in bekannter Weise in eine Kapsel aus Polyelektrolytkomplexen eingeschlossen werden und diese Kapseln in ein für die Fermentation der jeweiligen Säure geeignetes Medium überführt werden. Die Fermentation erfolgt entweder anaerob oder aerob in der Weise, daß ein steriler Luftstrom durch die die Kapseln enthaltende Lösung geleitet wird. Das organische Säure enthaltende Medium wird über eine Säule mit ionenaustauschaktiven Substanzen, wie z. B. schwach basische Ionenaustauscher, geleitet und auf diese Weise die organische Säure selektiv entfernt. Das vom Produkt befreite Medium wird wiederum mit Substrat versetzt und erneut der Fermentation zugeführt. Durch den Entzug der Säuren entfällt das Einstellen des *p*H-Wertes auf den für die Herstellung der jeweiligen Säure optimalen Wert. Durch den Einschluß in Kapseln sind die produzierenden Mikroorganismen vor Fremdeinflüssen geschützt. Im Falle einer mikrobiellen Kontamination des Reaktionsmediums können die eingekapselten Mikroorganismen leicht abgetrennt und einem erneuten Fermentationsprozeß unterworfen werden; d. h. es entfällt die Anzucht von neuen produzierenden Zellen, wie es im Falle der Verwendung freier Zellen notwendig wäre.
Die Fermentation kann bis zum Erreichen der natürlichen Lebenszeit der Mikroorganismen geführt werden. Beliebige Unterbrechungen bei adäquater Aufbewahrung der Kapseln sind ebenfalls möglich.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1
Die Erfindung soll nachstehend am Beispiel der Herstellung von Citronensäure näher erläutert werden.
1 ml Suspension von Yarrowia lipolytica EH 59 (= 1 mg Hefetrockenmasse) wird mit 1 ml 2% Cellulosesulfat in Wasser gemischt und in eine 2%ige wäßrige Lösung von Polydimethyldiallylammoniumchlorid getropft und 2 Minuten sanft gerührt. Die die Zellen enthaltenden Kapseln werden abgetrennt und mit sterilem Leitungswasser gewaschen.
450 der nach obiger Vorschrift dargestellten Kapseln werden in 250 ml Produktionsmedium nach BEHRENS (Die Nahrung **21**, 525–530 [1977]) suspendiert und steril belüftet. Die Fermentation wird bei 30°C durchgeführt. Das Medium wird über eine einen schwach basischen Ionenaustauscher vom Wofatit-Typ enthaltende Säule geführt und nach dem Passieren der Säule wieder der Fermentation zugeführt. Bei Verarmung des Mediums an Substrat (z. B. Glucose) wird dieses nachdosiert. Die Ionenaustauschersäule kann zwecks Elution der Citronensäure aus dem Kreislauf entfernt werden.
Pro g eingesetzter Glucose sind von den Zellen 0,7 g Citronensäure produziert worden.

Beispiel 2
Analog Beispiel 1 werden Zellen von Acetobacter suboxydans eingeschlossen und der Fermentation mit Glucose als Substrat unterworfen. Das Produkt Gluconsäure wird analog abgetrennt und nach Elution als Ca-Gluconat isoliert.

Beispiel 3
Analog Beispiel 1 werden Zellen von Yarrowia lipolytica EH 59 immobilisiert und einer Fermentation in der Weise unterworfen, daß Glucose in einem thiaminfreien Medium zugesetzt wird, der *p*H-Wert der Fermentationslösung zwischen 2 und 4 gehalten und die α-Ketoglutarsäure mit geeigneten Ionenaustauschern entfernt wird.