



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **311096**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 P 19/02, 1/20

// (C 12 N 1/20, C 12 R 001:385)

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19932327	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1993.06.24	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	1993.06.24	(30) Prioritet	1992.06.25. DE. 4220437
(41) Alm. tilgj.	1993.12.27		1992.07.31. DE. 4225283
(45) Meddelt dato	2001.10.08		
(83) Mikroorganisme deponert:	DSM nr 7107, 7108		
(71) Patenthaver	Hoechst AG, D-65926 Frankfurt am Main, DE		
(72) Oppfinner	Carlo Giani, Frankfurt am Main, DE Dieter Wullbrandt, Hofheim, DE Reinhardt Rothert, Niederhausen, DE Johannes Meiwes, Idstein, DE		
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo		

(54) **Benevnelse** **Pseudomonas aeruginosa og dens anvendelser i fremgangsmåter for bioteknologisk fremstilling av L-ramnose**

(56) **Anførte publikasjoner** EP A 282942, EP A 153634, GB A 2194247
Applied and Environmental Microbiology, mai 1986, 51, 5, s. 985-989
Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57, 6, s. 1740-1745
Zeitschrift für Naturforschung, 40c, nr. 1, 2, 1985, s. 61-67

(57) **Sammendrag** Bakteriestammer er istand til å danne rhamnolipider som blir avgitt til kulturopløsningen. Bakterier av arten *Pseudomonas aeruginosa* blir benyttet for fermentering og syntetiserer mikroorganismene rhamnolipider i en konsentrasjon på 70-120 g/l kulturopløsning. Fra kulturopløsningen kan L-rhamnosen bli utvunnet direkte gjennom hydrolyse av rhamnolipidet, dvs. uten en kostbar rensing av cellemassen og uten isolering av rhamnolipidet før hydrolysen.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av L-ramnose fra *Pseudomonas aeruginosa* ramnolipider samt *Pseudomonas aeruginosa* som syntetiserer *Pseudomonas aeruginosa* ramnolipid i kulturopløsning.

5

Desoksysukkeret L-ramnose (6-desoksy-L-mannose) egner seg svært godt som chiral byggesten for fremstilling av forskjellige organiske forbindelser. L-ramnose eller dets derivater, finner stadig større anvendelse ved syntesen av farmasøytiske produkter og plantebeskyttelsesmidler, som også i området cyologi av plante- og animalske celler, mikrobiologi, immunbiologi og aromafremstilling. Det lar seg således f.eks. med L-ramnose som utgangsforbindelse fremstille 2,5-dimetyl-4-hydroksey-2,3-dihydrofuran-3-on (Furaneol®), som videre tjener som bestanddel for forskjellige aromastoffer i nærings- og duftstoffindustrien.

10

15

Sukkeret L-ramnose er kun svært vanskelig tilgjengelig ad kjemisk vei. Den lar seg riktignok fremstille fra forskjellige, naturlige kilder, ekstraksjon etter sur eller enzymatisk hydrolyse, som f.eks. fra flavonoide glykosider, hesperidin, rutin, naringin, quercitrin eller f.eks. fra gummi arabicum eller marine alger. [(Biotechnology and Bioengineering, Col. 33, S. 365 (1989), R.J. Linhardt et al.; EP-A-0.317.033; JPA 62293; U.S.-patent nr. 5.077.206, Cheetham et al.]. Som ulemper for fremgangsmåten ved sur hydrolyse, virker de prosesseringsintensive isoleringstrinnene for L-ramnose, delvis under anvendelse av organiske oppløsningsmidler, foruten de blandede aromatiske, potensielt toksiske avfallsproduktene for opparbeidningen og at sammensetningen av innholdet i de naturlige kildene svinger avhengig av årtidsrytmen.

20

25

30

I US-PS 5.077.206 blir det gjort krav på en fremgangsmåte for fremstilling av L-ramnose fra plantematerialet under anvendelse av flere enzymer, og deretter flere rensingstrinn. Ulemper ved denne fremgangsmåten er den vanskelige rensingen

35

av L-ramnosen av sukrene som stammer fra plantematerialet, spesielt fra glukose, på grunn av den sterkt kjemisk strukturelt likheten av sukrene (angår også molekylvekten).

5 L-ramnose lar seg også fremstille i form av ramnoseinnholdende heteropolysakkarider ved hjelp av bakterier av forskjellig slag, som f.eks. alkaligener, acintobakter, Klebsiella, Streptococcus eller Lactobacillus. [Enzyme Microb. Technol., Vol. 10, s. 198 (1988), M. Graber et al.;
10 J. Amer. Chem. Soc., Vol. 71, s. 4124 (1945), F.G. Jarbis og M.J.Johnson; J. Bacteriol., vol. 68, s. 645 (1954), G. Hauser og M.L.Karnovsky].

Ulemper ved disse fremgangsmåtene er det vanligvis viskositetsavhengige utbyttet og den etter hydrolytiske spaltning av heteropolysakkaridet nødvendige, vanskelige rensingen av L-ramnosen (for sak: se over) fra en blanding av forskjellige
15 sukkere. I en ytterligere litteraturhenvisning blir det beskrevet en ramnoseinnholdende heteropolysakkarid som fermentativt blir fremstilt med en bakterie av arten
20 Klebsiella. ramnoseutbyttet utgjør, i forhold til kulturopløsning, ca. 17 g/l [Commission Of The European Communities, ECLAIR-Progam, Contract nr. AGRE-0011-C, rapport nr. 2 (siste rapport) 1991].

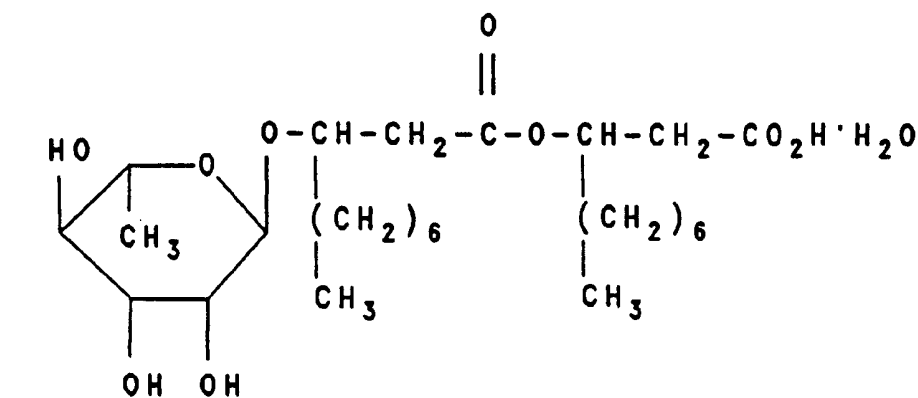
25 En ytterligere biologisk kilde for 6-desoksusukkere er glykolipider, som fermentativt lar seg fremstille [Microbiological Sciences Vol. 3, nr. 5, s. 145, (1986), D.G. Cooper; Surfactant Sci. Series, Vol. 25, s. 89 (1987), Christoph
30 Syldatk og Fritz Wagner; Biotechnology and Bioengineering, vol. 33, s. 365 (1989), R.J. Linhardt et al.; US-patent 4.933.281, Daniels et al.; US-patent 4.814.272, Wagner et al.].

35 Det har lenge vært kjent at ramnolipider blir dannet av bakterien Pseudomonas aeruginosa [J. Amer. Chem. Soc., Vol. 71, s. 4124 (1949), F. G. Jarvis et al.; J. Bacteriol., vol.

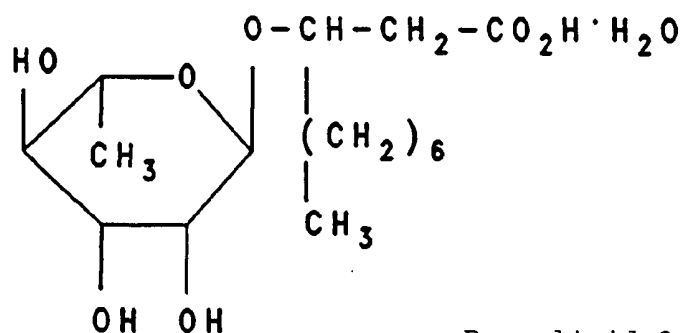
68, s. 645 (1954) George Hauser og Manfred L. Karnovsky]. Tallrike publikasjoner og patenter befatter seg med den fermentative utvinningen av ramnolipider ved *Pseudomonas aeruginosa*. [Applied and Environmental Microbiology, vol. 51, nr. 5, s. 985 (1986), H.E. Reiling et al.; J. Chem. Techn. Biotechnol., vol. 45, s. 249 (1989), K. Venkata Ramana et al., US-patent 4.933.281, Daniels et al., Deutsche Offenlegungsschrift 2.150.375, 1972; US-patent 4.814.272, Wagner et al.].

I kulturopløsningen av *Pseudomonas aeruginosa* kommer det fortrinnsvis 4 ramnolipider (RL1 - RL4, se avsnitt 1), som består av 1 eller 2 L(+)-ramnose-enheter og en eller to β -hydroksydekansyrer [Z. Naturforsch. 40 c, s. 61 (1985), C. Syldatk et al.].

Figur 1: Ramnolipider fra *Pseudomonas aeruginosa*

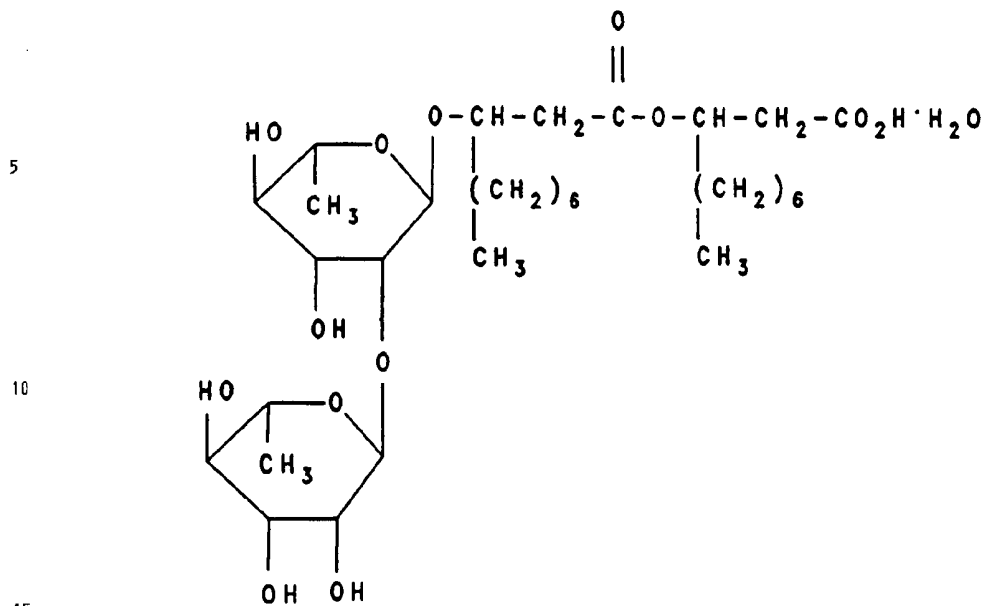


Ramnolipid 1

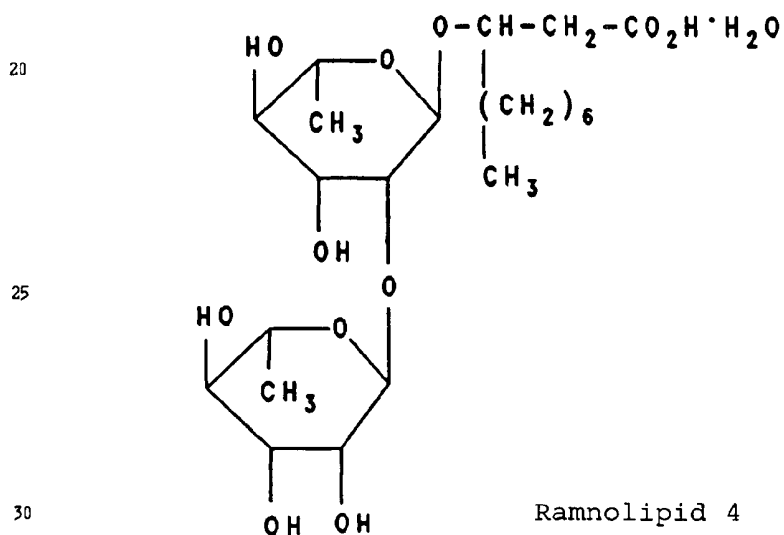


Ramnolipid 2

4



Ramnolipid 3



Ramnolipid 4

En ny offentliggjørelse viser at *Pseudomonas aeruginosa* er i
 35 stand til å danne ytterligere rhamnoliper [Biochemica et
 Biophysica Acta, vol. 1045, s. 189, (1990) N.B. Rendell et
 al.]. Disse kan riktignok mengdevis ikke konkurrere med

ramnolipid 1-4. De er ved siden av L-ramnose og β -hydroksydekansyre også sammensatt av 3-hydroksyoktansyre, 3-hydroksydodekansyre eller 3-hydroksydodecan-5-en-syre.

5 Ved siden av glykose, glycin, n-alkaner, fettalkoholer og fettsyrer egner også planteoljer som soyaolje eller olivenolje seg som kilder for ramnolipidproduksjon [Z. Naturforsch. 40 c, s. 61 (1985), C. Syldatk et al.; Surfactant Sci. Series, vol. 25, s. 89 (1987), S. Syldatk et al.; Applied and Environmental Microbiology, vol. 51, nr. 5, s. 985
10 (1986), H.E. Reiling et al.; Biotechnology and Bioengineering, vol. 33, s. 365 (1989), R.J. Linhardt et al.; Agr. Biol. Chem., vol. 35, nr. 5, S. 686 (1971), H. Hisatsuka et al.; US-patent 4.814.272, Wagner et al.]. Forholdet av ramnolipider til hverandre og deres utbytte, avhenger i stor grad
15 av kulturbetingelsene [Z. Naturforsch. 40 c, s. 61 (1985), C. Syldatk et al.; Tenside Surf. Det. 27, 5, s. 302 (1990), J.L. Parra et al.].

20 Således viste Parra et al., at foreliggende RL1 og RL3 blir dannet ved anvendelse av olivenolje som C-kilde.

Det hittil maksimalt oppnådde fermentative utbyttet av ramnolipider er beskrevet i US-PS 4.933.281 (Daniels et al.).
25 Fra kravene går det frem at ved anvendelse av maisolje (Corn-oil) som C-kilde blir det etter fermentering av en *Pseudomonas aeruginosa*-stamme isolert ramnolipidet i en konsentrasjon fra 30-50 g/l fra kulturmediet. Idoleringen skjer for å gi det rensede rhamnolipidet. I den etterfølgende
30 hydrolysen av det isolerte ramnolipidet dannes som reaksjonsprodukt L-ramnose og hydroksydekansyre.

Eksemplene i patentskriftet, spesielt eksempel 3, gjør det tydelig at ramnolipidkonsentrasjonen som er angitt i kravene
35 på 30-50 g/l, angår konsentrasjonen som er tilstede i kulturopløsningen.

Det er nå overraskende funnet en fremgangsmåte for fremstilling av L-ramnose ved fermentering av *Pseudomonas aeruginosa*, med hvis hjelp det blir oppnådd en fermenteringsoppløsning med ramnolipid-konsentrasjon fra 70-120 g/l. Fremstillingen av L-ramnose skjer uten kostbar rensing av celledmassen fra kulturopløsningen, og uten en isolering av ramnolipidet før hydrolysen.

Foreliggende oppfinnelse angår således:

1. Fremgangsmåte for fremstilling av L-ramnose, hvorved ramnolipider syntetiseres ved fermentering av *Pseudomonas aeruginosa* og hydrolyse av ramnolipidene til L-ramnose, som er kjennetegnet ved at ramnolipidene som utskilles fra *Pseudomonas aeruginosa* og som finns i kulturopløsningen hydrolyseres uten foregående isolering til L-ramnose.
2. *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7107 og/eller DSM 7108, som er kjennetegnet ved at de syntetiserer ramnolipider i en konsentrasjon fra 70-120 g/l kulturopløsning.

Under blir foreliggende oppfinnelse detaljert beskrevet. Dessuten blir den bestemt av innholdet av kravene.

Fermenteringen kan bli gjennomført i laboratoriemålestokk (fermenteringsmengde i literområdet) likeledes som i industriell målestokk (f.eks. i 20-50 m³ målestokk).

Prosentangivelser er vekt-% når ikke annet er angitt.

Som mikroorganismer kan det bli benyttet alle bakteriestammer som utskiller ramnolipid i kultursupernatanten.

Mikroorganismene blir isolert ved hjelp av anrikningskultur

fra sine naturlige omgivelser. Disse er utstrakt kjent av fagmannen. Kort sammenfattet:

5 Anrikningsbetingelsene er alle, under hvilken en organisme blir utsatt for konkurranse. For olje- og fettelskende mikroorganismer, som f.eks. *Pseudomonas aeruginosa*, blir det anvendt minimalmedia med oljer, fett og/eller hydrokarboner som karbonkilder. Man stiller disse opp i omgivelsesbetingelsene og oppnår således en blandet populasjon som den 10 som foreligger i de naturlige omgivelsene. I en slik anrikningsnæringsoppløsning, slipper de ønskede bakteriestammene gjennom, og overviner alle de ledsagende organismene. Gjennom flere overføringer til like næringsoppløsninger, og fordeling av en fast næringsbunn av den til- 15 strebede stammen, lar seg lett isolere. En hyppig "flytende-flytende overføring" som skjer etter korte intervaller, vekker veksten til ledsagerorganismene som vil benytte de utskilte eller autolyseproduktene fra de primært ønskede cellene (Allg. Mikrobiologie von H.G. Schlegel, 6. opplag, s. 20 182, G. Thieme Verlag Stuttgart, New York).

Fortrinnsvis blir det anvendt bakterier som er isolert ved en anrikningskultur fra en vannprøve. Spesielt blir det anvendt vannprøver fra en olje- og fettbearbeidende bedrift.

25

Den anvendte vannprøven stammet fra eget vann. Stammen som ble isolert fra denne vannprøven, ble bestemt av Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Macheroder Weg 1 B, W-3300 Braunschweig, Tyskland, som *Pseudomonas aeruginosa*. 30

Cellene av *Pseudomonas aeruginosa* er stavformige, har et tverrsnitt på ca. 0,6-0,8 μm , er ca. 1,5-3,0 μm lange og er bevegelige.

35

Etter isoleringen følger mutageniseringen av *Pseudomonas aeruginosa*. Mutagenesen av *Pseudomonas aeruginosa* ble

gjennomført på kjent måte ved hjelp av det kjemiske mutagenet N-metyl-N'-nitro-guanidin (MNNG).

5 Etter mutagenesen av *Pseudomonas aeruginosa* ble det ved hjelp av gjennomstrømningscytometri gjennomført en oppspalting i enkeltceller for isolering av produktstammer. Derved ble de optiske egenskapene til de suspenderte cellene, som er behandlet med MNNG, målt ved gjennomstrømning. Celler med typiske eller forskjellige størrelser og form, blir så
10 automatisk fordelt på forskjellige næringsbunner.

Det ble anvendt et vanlig cytofluometer med følgende utstyr: Argon-laser (bølgelengde: 488 m, effekt: 20 mW); måleanretning for de optiske signalene av strølys forover og 90°C
15 strølys for beregning av cellestørrelsen og -formen; automatisk sorteringsenhet.

Sorteringen av enkeltceller ble foretatt på 2 forskjellige næringsbunner, en for fagmannen kjent glycerin-minimalnæringsbunn, og en for soyaolje-minimalnæringsbunn.
20

Etter inkubasjon av næringsbunn ved 37°C, ble klonene av de dyrkede enkeltcellene testet for sin produktivitet av ramnolipider i ristekolber og små fermentorer.
25

På denne måten ble 2 høy-ytelsesmutanter av *Pseudomonas aeruginosa* isolert. Disse mutantene ble spesielt foretrukket for fermentering og derfor benyttet for fremstilling av L-ramnoser.
30

De var, lik de ikke-mutageniserte *Pseudomonas aeruginosa*, stavformige, hadde et tverrsnitt på ca. 0,6-0,8 µm, er ca. 1,5-3,0 µm lange og er bevegelige.

35 Høy-ytelsesmutantene av *Pseudomonas aeruginosa* ble deponert under betegnelsen DSM 7107 og DSM 7108 ved "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH", Mascheroder Weg 1

B, W-3300 Braunschweig, Forbundsrepubl. Tyskland, den 16. juni 1992, ifølge Budapestkonvensjonen.

5 Slike mutanter kan også bli oppnådd på andre kjente måter ved fysikalske midler, eksempelvis bestråling med ultraviolette- eller røntgenstråler, eller ved hjelp av andre kjemiske mutagener, som eksempelvis etylmetansulfonat (EMS) eller 2-hydroksy-4-metoksybenzofenon (MOB).

10 Fremgangsmåtene beskrevet under, gjelder for alle *Pseudomonas aeruginosa*-isolater.

Pseudomonas aeruginosa ble fermentert i et medium med planteoljer som karbonkilde. Eksempler for planteoljer er
15 raps-, oliven-, mais- og solsikkeolje. Mediet må, foruten planteolje, også inneholde én eller flere nitrogenkilder, sulfat- og magnesiumioner såvel som kalium- og klorioner, én eller flere fosforkilder og sporelementer. Som planteolje blir det fortrinnsvis anvendt soyaolje i konsentrasjoner fra
20 ca. 100-250 g/l næringsoppløsning, hvor konsentrasjoner mellom 125 g/l og 165 g/l er foretrukket.

Som nitrogenkilder kan det bli benyttet de for fagmannen kjente N-kildene, som eksempelvis $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i konsentrasjoner
25 fra 5-50 g/l næringsoppløsning, hvor fortrinnsvis NaNO_3 blir tilsatt i en konsentrasjon på 15 g/l.

For å stille til rådighet sulfat- og magnesiumioner ble det tilsatt 0,01-2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, fortrinnsvis 0,5 g/l. For
30 produksjon av nødvendige kalium- og kloridioner kan disse bli stilt til rådighet ved tilsetning av 0,1 til 5 g/l KCl, hvor 1 g/l er foretrukket.

Som fosforkilde og for oppløsning for mediet, blir det
35 benyttet en 0,001 til 0,1 molar natriumfosfatbuffer. Fortrinnsvis blir det på dette anvendt ca. 6,5 g/l av en 75% fosforsyre og ca. 8,9 g/l av en 33% natronlut.

En FeCl_3 inneholdende sporelementoppløsning med forskjellige metallsalter oppløst i en vandig oppløsning av natriumsitrat, blir etter sterilisering av mediet enten tilsatt 4-5 ganger konsentrasjonen eller fortrinnsvis 4-5 ganger i startkonsentrasjon til forskjellige tider i fermentasjonsoppløsningen.

pH-verdien til næringsoppløsningen skal ved fermentasjonsstarten være mellom pH 5,5 og 7,5, fortrinnsvis ved pH 6,3, og pleier ikke i løpet av fermentasjonen å bli regulert.

Luftingen ble foretatt med steril luft som blir innblåst i den omrørte fermentasjonsoppløsningen. Luftingsraten varierer mellom 0,02 og 0,5 VVM (volum luft pr. volum fermentasjonsoppløsning pr. minutt) og er avhengig av fermentasjonsgeometrien, rørrgeometrien, energiopptaket og først og fremst på den aktuelle tilstanden til fermentasjonsoppløsningen. Typisk blir den innstilt på vekstfasen på ca. $0,3 \pm 0,05$ VVM og i produksjonsfasen $0,1 \pm 0,03$ VVM.

Avhengig av skumningsforholdene til fermentasjonsoppløsningen blir det under fermenteringen tilsatt ca. 5-15 ml/l kulturopløsning av et vanlig silikonantiskumningsmiddel, eksempelvis antiskumningsmiddel VP 1133 fra fa. Wacker Chemie GmbH (München, Tyskland).

Fermenteringstemperaturen ligger mellom 20°C og 40°C , fortrinnsvis ved $30-35^\circ\text{C}$. Fermentasjonstiden er ca. 4-11 dager, fortrinnsvis 6-8 dager. *Pseudomonas aeruginosa*-stammen kan bli fermentert som enkel- eller blandingskulturer. DSM 7107 og 7108 er godt egnet såvel for fermenteringen i laboratoriemålestokk som i industriell målestokk.

Under de ovenfor nevnte fermentasjonsbetingelsene danner mikroorganismene de foreliggende ramnolipidene 1 og 3 (fig. 1) med en volumetrisk totalproduktivitet av ramnolipider på

ca. 70-120 g/l kulturopløsning. Derved blir det oppnådd en konsentrasjon av L-ramnoser på 30-50 g/l.

5 Utvinningen av L-ramnoser skjer ved direkte hydrolyse av ramnolipidet, dvs. uten rensing av cellemassen, og uten en isolering av ramnolipidet før dets hydrolyse til L-ramnose.

10 Foruten ramnolipider befinner det seg i kulturopløsningen også ufordøyet planteolje, hovedsakelig soyaolje, døde celler, foruten kulturmediebestanddeler som ikke er forbrukt av mikroorganismene, fettsyrer, skumdemper, oppløste salter såvel som ytterligere, ikke nærmere bestemte bakterielle stoffskifteprodukter.

15 For ytterligere opparbeiding av fermenteringsoppløsningen blir bakteriene, som oppholder seg i den, først avlivet ved at man oppvarmer det totale fermenteringsinnholdet til 80-120°C, fortrinnsvis til 100°C, og holder denne temperaturen i 15-90 min., fortrinnsvis 60 minutter.

20 De ytterligere fremgangsmåtetrinnene for opparbeidelse av det avkjølte kulturbrygget, som hovedsakelig er en vannemulsjon, blir beskrevet i utlegningsskriftet PCT-EP 91-01756 ("Verfahren zur Herstellung gereinigter Glycolipide durch Membrantrennverfahren") og utlegningsskriftet PCT-EP 91-01426 ("Verfahren zur Herstellung von L-Ramnose aus Ramnolipiden").

30 Opparbeidingstrinnene for isolering av ramnose er i logisk rekkefølge:

1. Surgjøring av den varmeinaktiverte kulturopløsningen.
2. Oppkonsentrering ved ultrafiltrering med membraner med en skillegrense på 30.000 til 300.000 Dalton.
3. Avsalting ved diafiltrering på de samme membraner.

4. Hydrolyse av det avsaltede konsentratet ved en pH-verdi fra 0-3 og en temperatur fra 120-150°C.
5. Rensing av den vandige, ramnoseholdige fasen fra lipidfasen.
- 5 7. Rensing av den vandige fasen ved pH 3-8 ved behandling med avfarvingsmidler som aktivt kull eller bentonitt eller ved ionebyttekromatografi.
8. Krystallisering av L-ramnose fra den inndampede, vandige fasen.

10

Surgjøringen av den varmeaktiverte kulturopløsningen skjer med syrer, spesielt enten med H_2SO_4 , når den kontinuerlige hydrolysen av ramnolipid til L-ramnose blir gjennomført, eller ved "Batchhydrolyse", spesielt med HCL eller H_2SO_4 .

15

Under disse sure betingelsene ble glykolipider, som normalt ville passere gjennom ultrafiltreringssmembranen, tilbakeholdt.

20

Ved tilslutningen til ultrafiltreringen blir saltene delvis utvasket ved diafiltrering på den samme membranen ved permanent tilsetning av vann og fjerning av filtratet. Saltkonsentrasjonen blir bestemt ved resistensmålinger under filtreringen. Resistensmålingene blir gjennomført ved vanlig elektroder.

25

30

Som resultat av denne fremgangsmåten (oppkonsentrering og vasking), oppstår en vandig, 2 til 3 gangers oppkonsentrert oppløsning, som i det vesentlige inneholder de følgende bestanddelene: ikke-metaboliserte fettsyrer og soyaoljerester, salter (ledningsevne redusert til ca. 20%), døde celler, skumdemper, ramnolipider og andre bakterielle, høymolekylære stoffskifteprodukter. Ramnolipidene blir ved denne fremgangsmåten fullstendig holdt tilbake.

35

Den kjemiske hydrolysen av ramnolipidene blir uten deres

foregående isolering direkte gjennomført i kulturoopløsningen, som har fått den ovenfor beskrevne behandlingen.

Den kjemiske hydrolysen finnes i homogenisert tilstand, dvs. under omrøring. I tilslutning til hydrolysen, blir den vandige og lipidholdige fasen rensset etter metoder som er kjent for fagmannen. Isoleringen av L-ramnose skjer fra den vandige fasen.

Dersom de første trinnene (surgjøringstrinnet) ble tilsatt H_2SO_4 , blir den vandige fasen tilsatt $Ca(OH)_2$ eller $CaCO_3$ for fjerning av H_2SO_4 . Deretter skjer rensingen av den vandige fasen ved pH 3-8 ved behandling med avfarvingsmidler eller ved ionebyttekromatografi. Hydroksydekansyre som er blitt dannet i små mengder under hydrolysen, blir ikke isolert.

EKSEMPLER

Eksempel 1:

Utvinning av *Pseudomonas aeruginosa*-isolat:

a) Anrikningskultur

Mikroorganismene ble tatt fra egne vannprøver. For dette ble ca. 10 ml avvannsprøver inkubert i en 500 ml Erlenmeyerkolbe med 200 ml anrikningsmedium (mineralsaltmedium) ved $37^\circ C$ i 3 dager i ristemaskin.

Mineralsaltmedium:

15	g/l	Olivenolje
10	g/l	$NaNO_3$
0,1	g/l	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
0,4	g/l	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
6,8	g/l	KH_2PO_4
8,7	g/l	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
5	ml/l	Sporsalter
		deionisert vann

Sporsalter:

	1 g/l	Jern(III)sitrat
	0,2 g/l	MnSO ₄
5	0,1 g/l	ZnCl ₂
	0,025 g/l	CuSO ₄ ·5H ₂ O
	0,02 g/l	Natriumtetraborat
	0,01 g/l	Natriummolybdat
	0,004 g/l	CoCl ₂
10	deionisert vann	

2 ml av den 1. anrikningskulturen ble inkubert i en 2. kolbe på nytt med mediet som ovenfor beskrevet.

15 Denne fremgangsmåten ble gjentatt fire ganger.

b) Isolering

Kulturopløsningen fra den siste anrikningskulturen ble satt ut på en agarplate med fullmedium bestående av 10 g/l glukose, 4 g/l kaseinpepton, 0,5 g/l gjærekstrakt, 0,5 g/l leverekstrakt og 2,5 g/l NaCl. Etter inkubering ved 37°C, ble Pseudomonas aeruginosa isolert som klone.

c) MNNG-mutagenese

25 Klonen fra eksempel 1, avsnitt b, ble kultivert i 24 timer i fullmedium ved 37°C. Deretter ble kulturmediet fortynnet 1:10 med friskt fullmedium. Cellene ble degenerert i 2 timer ved 37°C på ristemaskinen.

30 Cellene som ble rensset ved sentrifugering og vasket med tris-maleinsyrebuffer (pH 6), ble behandlet med MNNG (0,4-0,8 mg/ml) ved 37°C i 15-20 minutter på ristemaskin.

Etter tre gangers gjentatte vaskinger av cellene i tris-maleinsyre-buffer, ble den mutageniserte celleduspensjonen 35 kultivert i fullmedium ved 37°C i 24 timer.

Ved hjelp av strømningscytometri ble deretter en oppdeling i enkeltceller foretatt.

Sorteringen av enkeltceller ble foretatt på de følgende næringsbunnene:

Minimale næringsbunner:

20 g/l Glyserin (eller Soyaolje^{**})
10 g/l NaNO₃
10 1 g/l KCl
1 g/l NaCl
0,02 g/l CaCl₂·2H₂O
6,8 g/l KH₂PO₄
8,7 g/l K₂HPO₄
15 0,5 g/l MgSO₄·7H₂O
2 ml/l Sporelementoppløsning*
20 g/l Agar
deionisert vann
pH-innstilling til pH 6,5 før sterilisering
20 * Tilsetning etter sterilisering
** Homogenisering av den oppvarmede næringsbunnen kort før støpingen

Sporelementoppløsning:

25 1 g/l Natriumsitrat·2H₂O
0,14 g/l FeCl₃·6H₂O
0,7 g/l ZnSO₄·7H₂O
0,6 g/l CoCl₂·6H₂O
0,6 g/l CuSO₄·5H₂O
30 0,4 g/l MnSO₄·5H₂O
deionisert vann

Den således dannede stammen ble tilsatt i de følgende beskrevne fermenteringene.

Eksempel 2:

Porsjonsfermentering i industrimålestokk for utvinning av L-ramnose

5

a) Forkultur

Den første forkulturen av stammen *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7107 i 4 l forkultur-næringsoppløsning (tabell 1), ble fremstilt i ristekolber (2 l-Erlenmeyerkolber hver med 500 ml næringsoppløsning, 30°C, 200 UpM, 20 t). Hele den 1. forkulturen ble anvendt for start av den 2. forkulturen (350 l).

Av dette ble det fermentert i en 450 liters fermentor med 350 l av den komplekse forkulturopløsningen (tabell 1) av stamme DSM 7107 aerobt ved en luftingsrate på 180 l luft/min. med en rørehastighet på 300 rpm, ved en temperatur på 28°C i 16 timer.

20 Tabell 1: Forkultur - næringsoppløsning:
 10 g/l glukose
 5 g/l kaseinpepton
 1 g/l gjærekstrakt
 0,5 g/l NaCl.
25 Vann

Den totale 2. forkultur ble anvendt for start av hovedkulturen.

30 b) Hovedkultur

I en fermentor med ca. 30 m³ totalvolum ble det tilberedt 17 m³ av næringsoppløsningen angitt i tabell 2:

35

Tabell 2: Hovedkultur - næringsoppløsning:

6,47 g/l 75% H_3PO_4
ca. 8,94 g/l 33% NaOH
0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
1 g/l KCl
15 g/l $NaNO_3$
125 g/l soyaolje
vann

5

10 Deretter ble blandingen innstilt med H_3PO_4 og NaOH til en pH-verdi på 6,8. Etter tilsetning av resten av næringsoppløsningsbestanddelene ble pH-verdien korrigert med H_2SO_4 til pH 6,2.

15 Etter 45 minutters sterilisering hadde det innstilt seg en pH-verdi på ca. 6,3. I en separat beholder ble en oppløsning med sporelementer (tabell 3) sterilisert. Deretter ble de følgende stoffene oppløst i 150 l deionisert vann og sterilisert:

20

Tabell 3: Sporelementoppløsning:

2 mg/l natriumsitrat $\cdot 2H_2O$
0,28 mg/l $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
1,4 mg/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
1,2 mg/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
1,2 mg/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
0,8 mg/l $MnSO_4 \cdot 1H_2O$
deionisert vann

Konsentrasjonsangivelsen angår 1 l hovedkultur.

30

Denne sporelementoppløsningen ble tilsatt ved starten og 3 ytterligere ganger etter 20, 40 og 70 timers fermentasjonstid til hovedfermentoren under sterile betingelser.

35 Som inokulum ble det totale innholdet av forfermentoren (350 l) anvendt. Fermentasjonstemperaturen var 30°C. I de første 10 timenes fermentering, ble det luftet med 250 m³ luft/time,

fra den 10. til den 30. timen med 400 m³/time og fra den 30. time med 100-75 m³/time.

5 For skumbekjempelse ble det anvendt et separat sterilisert silikonantiskummingsmiddel VP 1133 (fa. Wacker), som ble dosert porsjonsvis avhengig av skumningsforholdene i fermentasjonsoppløsningen ved hjelp av en skumningselektrode i fermentoren.

10 Som røreorgan ble det benyttet en radialrører med fire turbiner, med et tverrsnitt på 1040 mm, (rører Ø: Fermentor Ø = 0,4:1). Omdreiningstallet var i de første 10 fermenteringstidene 50 rpm, fra den 10. timen 75 rpm.

15 Under de ovenfornevnte fermenteringsbetingelsene lar det seg i 167 timers fermenteringstid oppnå ca. 78 g ramnolipid og et L-ramnoseinnhold på ca. 32 g L-ramnose pr. liter kulturoppløsning. Etter fermentasjonsavslutningen blir den totale fermentasjonsoppløsningen oppvarmet til 100°C for avliving av
20 produksjonsstammen, og ved denne temperaturen blir det omrørt i 1 time. De ytterligere opparbeidelsestrinnene til krystallinske L-ramnose ble gjennomført analogt med patentskriftene PCT/EP 91-01756 og PCT/EP 91-01426.

25 Eksempel 3:

Føde-porsjons-fermentering i industrimålestokk for utvinning av L-ramnose.

30 18,5 m³ hovedkulturmedium med sammensetningen fra eksempel 1, ble startet med 350 l forkultur (også beskrevet i eksempel 1). Som produksjonsstamme ble det tilsatt stammen *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108. Før starten og etter 20, 40, 70 og 120 timer fermentasjonstid, ble det under sterile betingelser
35 hver gang tilsatt en sporelementoppløsning (se eksempel 1).

Luftingshastigheten ble variert som følger: Ved fermenteringsstart 250 m³/time, etter 10 timers fermentasjonstid 350 m³/time og etter 30 fermentasjonstimer, avhengig av intensiteten til skumdanningen, 100-130 m³/time luft.

5

I de 10 første fermenteringstimene ble det omrørt med 50 rpm, deretter med 75 rpm. Fra den 72. til den 109. fermentasjonstimen ble det kontinuerlig tilsatt ytterligere 564 l soyaolje.

10

Skumbekjempningen skjedde på samme måte som beskrevet i eksempel 1. Under de nevnte fermenteringsbetingelsene ble det i 9 dager i kulturopløsningen oppnådd 95 g/l ramnolipid og et innhold av L-ramnose på 39-40 g/l. Den videre opparbeidningen av kulturopløsningen skjedde som beskrevet i

15

Eksempel 4:

20

Porsjons-fermentering for utvinning av L-ramnose i 300 liters målestokk.

I en fermentor på 450 liters totalvolum, ble det sterilisert 300 l hovedkulturmedium (sammensetning som i eksempel 1).

25

Det ble startet med 4 l av en ristekolbe-forkultur (medium fra eksempel 1) av stammen *Pseudomonas aeruginosa* DSM 7108.

30

Følgende fermenteringsbetingelser ble innstilt: Fermenteringstemperaturen var 30°C. I den første fermenteringstimen ble det omrørt med 300 rpm og fra den 30. timen med 400 rpm. Til den 10. fermenteringstimen ble det luftet med 80 l/min., fra den 10. fermenteringstimen med 120 l/min. og fra den 30. fermenteringstimen med 30 l/min. Før starten og etter 20, 40 og 70 fermenteringstimer, ble sporelementene fra eksempel 1 alltid sterilisert i 4 l E-vann, tilsatt. Etter 112 timers fermenteringstid, ble det pånytt tilsatt 11,3 kg soyaolje

35

sterilt. Alt etter skunningsforholdene, ble det etter behov
tilsatt silikon-antiskummingsmidlet VP 1133 (fa. Wacker).
Under de nevnte fermenteringsbetingelsene ble det på 11 dager
dannet ca. 112 g rannolipid pr. liter kulturopløsning, og
5 ca. 46 g/l L-rannose.

Opparbeidingen av kulturopløsningen skjedde som beskrevet i
eksempel 1.

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av L-ramnose, hvorved
ramnolipider syntetiseres ved fermentering av *Pseudomonas*
aeruginosa og hydrolyse av ramnolipidene til L-ramnose,
k a r a k t e r i s e r t v e d at ramnolipidene som
utskilles fra *Pseudomonas aeruginosa* og som finns i kultur-
oppløsningen hydrolyseres uten foregående isolering til L-
10 ramnose.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det blir fermentert med *Pseudomonas aeruginosa*
15 DSM 7107 og/eller DSM 7108.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d at ramnolipidene hydrolyseres til L-ramnose
20 i en konsentrasjon fra 30 -50 g/liter kulturopløsning.

4.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det som karbonkilde
25 blir tilsatt en eller flere vegetabiliske oljher, spesielt
soyaolje, til kulturmediet.

5.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående
30 kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d at fermenta-
sjonstiden er 3 - 11 dager.

6.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående
35 kravene, k a r a k t e r i s e r t v e d at luftings-
hastigheten ligger mellom 0,02 og 0,5 VVM.

7.

Pseudomonas aeruginosa DSM 7107 som syntetiserer ramnolipider i en konsentrasjon på 70 -120 g/liter kulturmedium.

5

8.

Pseudomonas aeruginosa DSM 7108 som syntetiserer ramnoliper i en konsentrasjon på 70 -120 g/liter kulturmedium.

10

15

20

25

30

35