



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 250 720 A1

4(51) C 12 P 19/04
C 12 P 19/06
C 12 N 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 292 158 7	(22)	04.07.86	(44)	21.10.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Behrens, Ulrich, Prof. Dr. sc.; Stottmeister, Ulrich, Dr. rer. nat., DD

(54)	Verfahren zur mikrobiellen Synthese von Polysacchariden
------	---

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Synthese von Polysacchariden durch Mikroorganismen bei einer satzweisen Prozeßführung. Ziel der Erfindung ist es, die Endkonzentration an Polysacchariden bezogen auf acetonfällbare Substanz wesentlich zu erhöhen. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, durch eine spezielle Prozeßführung die Mikroorganismen zu einer verstärkten Ausschüttung von Polysacchariden ins Fermentationsmedium anzuregen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß am Ende der Fermentation, wenn die Kohlenstoffquelle verbraucht ist, die Mikroorganismen nicht mehr wachsen und kein Polysaccharid mehr gebildet wird, erneut eine Kohlenstoffquelle zugegeben wird, die aber in ihrer Konzentration um das 2- bis 10fache der Anfangskonzentration der Kohlenstoffquelle liegt. Durch diese Maßnahme wird eine Steigerung der Endkonzentration an Polysacchariden um mindestens 40 % erreicht.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur mikrobiellen Synthese von Polysacchariden mittels Mikroorganismen auf der Basis von Hexose oder hexosenbildenden Kohlehydraten als Kohlenstoffquelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß am Ende der Fermentation, wenn die vorgegebene Kohlenstoffquelle verbraucht ist und die Mikroorganismen ihr Wachstum eingestellt haben, erneut eine Kohlenstoffquelle in einer Konzentration zugegeben wird, die die Anfangskonzentration der Kohlenstoffquelle um das 2- bis 10fache übersteigt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die mikrobielle Synthese von Polysacchariden, die in satzweiser Prozeßführung in Bioreaktoren durch Mikroorganismen gewonnen werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Herstellung von mikrobiellen Polysacchariden erfolgt sowohl durch Bakterien, Hefen und Pilzen, als auch durch Algen. Als Kohlenstoffquelle für das Wachstum der Mikroorganismen und die Produktion des Polysaccharides dienen vorzugsweise Hexosen oder hexosenbildende Kohlehydrate.

In den bekannten technischen Verfahren werden überwiegend Rührreaktoren (Magarites, A. and Zajic, I. E. Biotechnol. Bioeng. 1978, XX, 939-1001), in letzter Zeit sind auch Strahldüsenbelüftungssysteme vorgeschlagen worden (Stein, W. A. und Schäfer, H. 1982 Chem. Ing. Techn. 54, 616-617).

Die Fermentation mit einer satzweisen Prozeßführung wird bekannter Weise so durchgeführt, daß das für das Wachstum der Mikroorganismen und die Produktion des Polysaccharides benötigte Medium einschließlich der Kohlenstoffquelle vorgegeben, und bis zur Auszehrung der Kohlenstoffquelle fermentiert wird. Dabei haben sich bei verschiedenen Polysacchariden, insbesondere dem Xanthan Anfangszuckerkonzentrationen von maximal 4% bewährt. Bei höheren Konzentrationen sinkt die substratbezogene Ausbeute und zum anderen verbleibt ein Restzuckergehalt in der Fermentationslösung, der als Verlust zu betrachten ist.

In der DD-PS 147551 wird ein Verfahren beschrieben, wo über den gesamten Zeitraum der Fermentation eine konzentrierte Glukoselösung allmählich nachdosiert wird. Die so nachdosierte Zuckermenge würde bei einer einmaligen Zugabe einer 6%igen Zuckerlösung entsprechen.

Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß durch die allmähliche, empirische Nachdosierung der Kohlenstoffquelle es zu Auszehrungsbedingungen oder zu Überdosierungen im Fermentationsprozeß kommen kann, da der aktuelle Zustand der Kultur nicht gemessen und somit auch nicht berücksichtigt werden kann.

Die erreichbaren Endkonzentrationen des Polysaccharides, bezogen auf acetonfällbare Substanz, liegt bei den bekannten Verfahren bei etwa 2,0 bis 2,2%.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur mikrobiellen Synthese von Polysacchariden zu entwickeln mit welchen man eine Endkonzentration des Polysaccharides bezogen auf acetonfällbare Substanz von > 2,2% erzielen kann.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, durch eine spezielle Prozeßführung die Mikroorganismen zu einer verstärkten Ausschüttung von Polysacchariden ins Fermentationsmedium anzuregen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß polysaccharidbildende Mikroorganismen auf der Basis von Hexosen oder hexosenbildenden Kohlehydraten als Kohlenstoffquelle fermentiert werden und das am Ende der Fermentation, wenn die vorgegebene Kohlenstoffquelle verbraucht ist und die Mikroorganismen ihr Wachstum eingestellt haben, erneut eine Kohlenstoffquelle in das Fermentationsmedium zugegeben wird, deren Konzentration das 2 bis 10fache der Anfangskonzentration der vorgegebenen Kohlenstoffquelle beträgt.

Durch diese schockartige Zugabe einer neuen Kohlenstoffquelle kommt es zu einer erneuten Ausschüttung von Polysacchariden durch die nicht mehr wachsenden Mikroorganismen. Im Ergebnis dieser Maßnahme erzielt man eine Erhöhung der Endkonzentration an Polysacchariden um ca. 40%.

Nach Abtrennung der Polysaccharide aus dem Fermentationsmedium was in bekannter Weise durch organische Lösungsmittel erfolgt, wird das anfallende Lösungsmittel-Wasser-Gemisch zwecks Rückgewinnung des Lösungsmittels redestilliert. Der dabei anfallende Sumpf enthält die nicht umgesetzte Kohlenstoffquelle, niedermolekulare Polysaccharide und Spurensalze und kann für die erste Phase eines neuen Fermentationsprozesses eingesetzt werden, wobei bei Bedarf eine Ergänzung mit reiner Kohlenstoffquelle um auf die gewünschte Konzentration zu kommen, ergänzt werden kann.

In den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert.

Beispiel 1

Der Stamm *Xanthomonas campestris* 2P wurde in einem Medium folgender Zusammensetzung kultiviert:

Lösung 1 2,0g Glukose gelöst in 100ml

Lösung 2 in 500ml destilliertem Wasser wurden gelöst

2g NaNO_3

2g Hefeautolysat „BRAMSCH“

0,5g MgSO_4

0,1g KCl

1,0g KH_2PO_4

0,001g FeSO_4

Beide Lösungen wurden gesondert im Autoklaven sterilisiert und nach dem Abkühlen vereinigt, auf $\text{pH} = 7,5$ eingestellt und auf 1000ml aufgefüllt.

100ml dieses Mediums in 500ml Schüttelkolben (4fach gezahnt) wurden mit frisch gewachsenen Kulturen von *X. campestris* 2P vom Schrägagarröhrchen angeimpft und bei 30° auf einem Rotationsschüttler (190 U min^{-1}) für 24 Stunden kultiviert.

Diese Vorkultur hatte Titer von 4×10^{10} Keimen.

Es wurde für die Produktionskultur ein Medium verwendet das genau dem Vorkulturmedium entsprach, jedoch einen Glukosegehalt von 30 g l^{-1} aufwies und nach der gleichen Art und Weise sterilisiert wurde. Dieses Medium wurde in einen Laborrührfermentor überführt (1l Gesamtvolumen, Fermentationsvolumen $\sim 500 \text{ ml}$). Der Laborfermentor hatte ein großflächiges kreuzförmiges Rührsystem, dessen Flügelänge 70% des Fermentordurchmessers entsprach und war mit der üblichen Meß- und Regeltechnik versehen. Die Fermentationstemperatur betrug 30°C . Der Fermentor wurde mit der Animpfkultur im Verhältnis 1:10 angeimpft. Der Gelöstsauerstoff wurde — soweit er in den Anfangsphasen der Fermentation meßbar war — bei Werten über 60% der Luftsättigung gehalten, was durch Variation von Luftdurchsatz ($30\text{--}60 \text{ l h}^{-1}$) und der Rührerdrehzahl ($500\text{--}1000 \text{ U min}^{-1}$) erreicht wurde, wobei gleichzeitig das Schäumen der Fermentationslösung in den ersten Stunden unterdrückt werden konnte. Eine pH-Regulation war während der über 40 Stunden dauernden Fermentation nicht notwendig.

Nach dieser Zeit war die Glukose ausgezehrt. Die erzielte Endkonzentration betrug 1,9% acetonfällbare Substanz. Daraus errechnet sich bei einer Anfangskonzentration von 2,5% Glukose eine Ausbeute von 76%. Die Viskosität (gemessen mit dem Rotationsviskosimeter Rheotest II-Prüfgerätewerk Medingen bei $D = 3,0 \text{ s}^{-1}$) betrug = 9910 mPas.

Zu diesem Zeitpunkt wurden 40g einer sterilisierten Glukoselösungen zugegeben, die in 1l 600g Glukose gelöst enthielt. Damit betrug die sich im Fermentor ergebene Zuckerkonzentration 5,3%.

Die Fermentation wurde bei einer Rührerdrehzahl von 1000 U min^{-1} und einem Luftdurchsatz von 60 l h^{-1} fortgeführt. Nach weiteren 12 Stunden hatte sich eine Polysaccharidkonzentration von 2,9% acetonfällbarer Substanz ergeben, die Viskosität wurde zu 14100 mPas ($D = 3,0 \text{ s}^{-1}$) bestimmt. Die Zuckerendkonzentration betrug 3,3%, daraus errechnet sich für diese Phase der Fermentation eine Ausbeute von 50%.

Die Steigerung der Endkonzentration im Vergleich zur optimierten Standardfermentation errechnet sich zu 52,6%.

Beispiel 2

Unter Anwendung der Anzucht- und Kultivationsbedingungen des Beispiels 1 wurde eine Fermentation durchgeführt, bei der die Anfangszuckerkonzentration 5,0% betrug. Nach einer Gesamtfermentationszeit von 55 Stunden betrug die Zuckerendkonzentration 0,7%. Die acetonfällbare Substanz betrug 2,1%, die zugehörige Viskosität 10200 mPas ($D = 3,0 \text{ s}^{-1}$). Es errechnet sich eine Ausbeute von 48,8%.

Beispiel 3

Die Fermentationslösung, die entsprechend dem Beispiel 1 erhalten wurde, wurde in die 4fache Enthanolmenge gegeben. Das Xanthan wurde durch Filtration abgetrennt und die Alkohol-Wasser-Mischung redestilliert. Es verblieb ein Rest von rund 400g glukosehaltiger Lösung. Dieser Lösung wurden die volle Natriumnitrat- und Hefeautolysatmenge entsprechend Beispiel 1 zugegeben, jedoch mit der halben Menge an Hefeautolysat und Nährsalzen versetzt und sterilisiert. In 100ml Wasser wurden 14g Glukose gelöst und nach der Sterilisation mit der aus der Aufarbeitung stammenden Lösung vereinigt. Nach der Überführung wurde die Lösung in den Fermentor entsprechend dem Beispiel 2 überführt und unter den dort angegebenen Bedingungen fermentiert. Nach der Auszehrung der Glukose hatte sich Polysaccharid in der Menge von 2,0% als acetonfällbare Substanz gebildet, die zugehörige Viskosität wurde zu 10200 mPas ($D = 3,0 \text{ s}^{-1}$) gemessen. Nach der Zudosierung entsprechend Beispiel 1 ergab sich eine Endkonzentration von 3,0% acetonfällbare Substanz, die Viskosität betrug 14600 mPas ($D = 3,0 \text{ s}^{-1}$). Der Gesamtprozeß wurde in der geschilderten Art und Weise 4x wiederholt, ohne daß sich auf Ausbeute oder Endkonzentration negative Auswirkungen zeigten.