

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **250 721 A1**

4(51) **C 12 P 19/06**

C 12 N 1/00

C 12 M 1/36

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 292 157 0

(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. nat.; Stottmeister, Ulrich, Dr. rer. nat., DD

(54) **Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Xanthan**

(57) Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Xanthan durch nitratutilisierende Stämme von *Xanthomonas campestris*. Bekannterweise scheiden diese Stämme bei Verwendung von Hexosen oder Hexosen bildenden Kohlehydrate bei 30 °C unter Rührung und Belüftung bei einem pH-Wert von 7,5 Xanthan in das Medium aus. Die ingenieurtechnische Beherrschung dieser bekannten Verfahren bereitet aber, auf Grund der hohen Viskosität des Fermentationsmediums große Schwierigkeiten. Es ist das Ziel der Erfindung, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem man bei kurzen Fermentationszeiten und einem geringen Energieeintrag hohe Ausbeuten an Xanthan gewinnt. Aufgabe der Erfindung ist es eine Meßgröße zu ermitteln, mit der es möglich ist, die Energieeintragsleistung zu steuern. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß als Meßgröße der aktuelle pH-Wert verwendet wird und über eine Standard pH-Regelung, die mit einer Impulssteuerung gekoppelt ist, eine Veränderung der Rührerdrehzahl bewirkt wird. Durch diese Maßnahme steigt der pH-Wert wieder in den vorgegebenen Bereich und man erzielt einen optimalen Verlauf der Fermentation mit kurzen Produktionszeiten und hohen Ausbeuten an Xanthan.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Xanthan unter Verwendung von Hexosen oder hexosenbildenden Kohlehydraten als Kohlenstoffquelle unter Rührung und Belüftung, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Meßgröße für die Steuerung der Rührerdrehzahl, der aktuelle pH-Wert verwendet wird und die Steuerung über eine Impulssteuerung durch eine Standard-pH-Regelung erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft das Gebiet der mikrobiellen Polysaccharidbildung und bezieht sich auf die Herstellung des Exopolysaccharids Xanthan durch nitratutilisierende Stämme von *Xanthomonas campestris*.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das Exopolysaccharid Xanthan wird in bekannter Weise durch eine aerobe, sterile Fermentation in Bioreaktoren hergestellt, wobei eine intensive Rührung, eine gute Durchmischung und ein ausreichender Sauerstoffeintrag ermöglicht werden muß. (Magarites, A. und Zajic, J. E., *Biotechnol. Bioeng.* 1978, XX, 939-1001).

Bewährt hat sich die satzweise Fermentation. Kontinuierliche Verfahren bereiten durch die Aufspaltung der Kultur bei längerem Betrieb oft Schwierigkeiten (Silman und Rogovin, P., *Biotechnol. Bioeng.* 1972, 14, 23-31), wenngleich Bemühungen bekannt geworden sind, stabile Stämme zu selektieren (US 4418145).

Bekannterweise werden Stämme von *Xanthomonas campestris* eingesetzt, die bei Verwendung von Hexosen oder Hexosen bildenden Kohlehydraten bei 30°C unter Rührung und Belüftung bei einem pH = 7,5 Xanthan in das Medium ausscheiden. Dabei werden Ausbeuten von 60 bis 75% erreicht (DD-PS 121954).

Die ingenieurtechnische Beherrschung dieser bekannten Verfahren bereitet jedoch durch die hohe Viskosität der Fermentationslösung große Schwierigkeiten. Mit steigender Viskosität treten in Bioreaktoren nahezu unvermeidbare stehende Zonen auf, in denen andere pH-Verhältnisse und Gelöstsauerstoffkonzentrationen herrschen als in den bewegten Zonen des Reaktors. Diesen Nachteil kann man durch eine Steigerung des Energieeintrages, indem man die Rührerdrehzahl erhöht, zum Teil umgehen. Eine Steuerung der Energieeintragsleistung kann aber nur empirisch erfolgen, da eine spezielle Meßgröße bisher nicht bekannt ist. Das führt dazu, daß entweder ein zu niedriger oder ein zu hoher Energieeintrag erfolgt, was besonders im letzteren Falle die Neigung des Mediums zum Schäumen unterstützt (DD-PS 147531).

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem man bei kurzen Fermentationszeiten und einem geringen Energieeintrag hohe Ausbeuten an Xanthan erzielen kann.

Wesen der Erfindung

Um einen optimalen Verlauf der Fermentation mit kurzen Produktionszeiten und hohen Ausbeuten zu realisieren, ist es erforderlich, einen konstanten pH-Wert von etwa 7,5 und eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 20% der Luftsättigung einzuhalten.

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, eine Meßgröße zu ermitteln, mit der es möglich ist, die Energieeintragsleistung zu steuern.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß der aktuelle pH-Wert als Meßgröße verwendet wird und über eine Standard-pH-Regelung, die mit einer Impulssteuerung gekoppelt ist, die Rührerdrehzahl verändert wird. Bei jedem Absinken des pH-Wertes vom vorgegebenen Wert, wird durch einen Steuerimpuls die Rührerdrehzahl um einen festen Betrag erhöht, wobei durch eine Verzögerungsschaltung die Trägheit des Systems berücksichtigt wird. Bei dem von uns verwendeten optimierten Medium steigt durch diese Maßnahme der pH-Wert wieder in den vorgegebenen Bereich und man erzielt einen optimalen Verlauf der Fermentation mit kurzen Produktionszeiten und hohen Ausbeuten an Xanthan.

Durch die Anpassung der Rührerdrehzahl an den Zustand des Wachstums der Kultur wird ein gleichförmiges Wachstum mit gleichzeitiger Produktionsbildung erreicht, sowie ein Schäumen der Fermentationsflüssigkeit weitestgehend vermieden. Gleichzeitig werden erhebliche Mengen an Neutralisationsmitteln, die bei den bekannten Verfahren erforderlich sind, eingespart. Darüber hinaus ist eine wesentliche Einsparung an Elektroenergie zu verzeichnen, da durch die erfindungsgemäße Verfahrensweise nur die unbedingt notwendige Elektroenergie für die Rührung aufgewendet wird. Die Qualität des Xanthans wird durch den geringeren Salzgehalt im Medium positiv beeinflusst.

In den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert:

Beispiel 1

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

2,0g Glucose in 100ml destilliertem Wasser lösen (Lösung 1)

2g NaNO_3

2g Hefeautolysat „BRAMSCH“ 6–6,5% N

0,5g MgSO_4

0,1g KCl

1,0g KH_2PO_4

und

0,01g FeSO_4 in ca. 500ml Leitungswasser lösen (Lösung 2).

Beide Lösungen werden getrennt sterilisiert, danach vereinigt und auf 1000ml aufgefüllt.

Die Vorkultur wurde auf diesem Medium aus Abimpfungen vom Schrägagarröhrchen in 500ml gezahnten Schüttelkolben, gefüllt mit 100ml Medium durchgeführt (Rotationsschüttler 190 U min^{-1}). Die Fermentation erfolgte mit dem gleichen Medium. Lösung 1 enthielt jedoch 3,0g Zucker in 100ml. Verwendet wurde ein 16l Fermentor mit einem großflächigen Flügelrührer, der mit 10l Medium gefüllt wurde. Die Animpfung erfolgte mit vereinigten Schüttelkolben im Verhältnis 1:20. Die Animpfkolben hatten einen Titer von $2-4 \times 10^{10}$ Zellen ml^{-1} .

Der pH-Wert der Lösung betrug $\text{pH} = 8,0$. Die Rührung war auf $n = 600\text{ U min}^{-1}$ eingestellt.

Nach ungefähr 6 Stunden begann das Wachstum, das sich durch einen Abfall des pH-Wertes bemerkbar machte. Die pH-Messung regulierte die Steigerung der Rührerdrehzahl. Nach jeder Drehzahlerhöhung verschob sich der pH-Wert wieder auf den für die Fermentation vorgewählten Wert von 7,5.

Nach 18 Stunden setzte die Xanthanbildung ein, nach 34 Stunden betrug die Rührerdrehzahl 1600 U min^{-1} und war damit an die systembedingte Grenze angelangt. Die Viskosität betrug zu diesem Zeitpunkt 6000 mPas die acetonfällbare Substanz 1,7%, die Zuckerkonzentration 1,3%. Daraus errechnet sich eine Ausbeute von 75%. Nach einer Gesamtfermentationszeit von 50 Stunden war gleichzeitig das Biomassewachstum beendet und der Zucker ausgezehrt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Endviskosität 10100 mPas ($D = 3,0\text{ s}^{-1}$). Die acetonfällbare Substanz wurde zu 2,12% bestimmt. Es errechnete sich eine substratbezogene Gesamtausbeute von 67%.

Die notwendige Elektroenergie für die Gesamtzeit der Fermentation wurde im verwendeten System zu 1,7kW gemessen.

Beispiel 2

Entsprechend dem Beispiel 1 wurde mit gleichen Medien und im gleichen Fermentor jedoch ohne die Einrichtung zum Regulieren der Drehzahl gemessen. Diese betrug zum Beginn der Fermentation gleichfalls 600 U min^{-1} , wurde jedoch von Hand und nach den Erfahrungen gesteigert. Es kam zu Säuerungsperioden, bei denen 120ml Lauge (20% NaOH) zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes verbraucht wurden.

Die Fermentation wurde nach der Auszehrung des Zuckers beendet, dieser Zeitpunkt wurde nach 67 Stunden erreicht. Die Endviskosität betrug 9650 mPas ($D = 3,0\text{ s}^{-1}$). Es errechnete sich eine Ausbeute von 59% aus einer acetonfällbaren Substanz von 1,9%. Die für den Versuchszeitraum verwendete Elektroenergie wurde zu 2,4kW gemessen.