



(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2070/94

(51) Int.Cl.⁶ : C12P 19/06

(22) Anmeldetag: 8.11.1994

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1999

(45) Ausgabetag: 27.12.1999

(30) Priorität:

8.11.1993 JP 277997/1993 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0365390A1 DE 2901485A1 DE 2708239A1

(73) Patentinhaber:

SHIN-ETSU CHEMICAL CO., LTD.
TOKYO (JP).
SHIN-ETSU BIO. INC.
92121 SAN DIEGO (US).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON XANTHANGUMMI DURCH FERMENTATION

(57) Verfahren zur Herstellung von Xanthangummi durch Fermentation, welches den Schritt des Kultivierens unter Verwendung einer wasserlöslichen, Stickstoffkomponente allein als Stickstoffquelle eines Produktionsmediums, und durch das Mischen und Verwenden der wasserlöslichen, Stickstoffkomponente und einer wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente als Stickstoffquellen eines Impf fermentationsmediums umfaßt.

B

AT 405 941

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Xanthangummi durch Fermentation. Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung von Xanthangummi mit verbesserter Effizienz und Qualität.

Wasserlösliche, viskose Polysaccharide, wie Akaciengummi, Xanthangummi, Guar gummi und Rhamsangummi, werden in der Nahrungsmittel-, Farb-, Papierherstellungs-, Kosmetik-, medizinischen, Erdölgevinungs- und ähnlichen Industrien verbreitet verwendet. In den letzten Jahren ist die Nachfrage nach derartigen Polysacchariden gestiegen, insbesondere nach dem meistverwendeten Xanthangummi. Xanthangummi hat ausgezeichnete Eigenschaften, wie eine Verdickungsfunktion, eine emulsionsstabilisierende Wirkung, Salzbeständigkeit, pH-Beständigkeit und eine Stabilität gegenüber verschiedenen Enzymen, was zur vermehrten Verwendung von Xanthangummi als Additiv geführt hat.

Xanthangummi kann durch aerobe Kultivierungsmikroorganismen der Art Xanthomonas, beispielsweise *X. campestris*, in einem wässrigen Kulturmedium erhalten werden, das einen pH von 5,5 bis 9 aufweist und zumindest eine Kohlenstoffquelle, z.B. Glucose, Molassen, Stärke und dgl., eine wasserlösliche Stickstoffquelle, wie Pepton oder Hefeextrakt, ein Magnesiumsalz, Phosphationen und andere Spurenkomponenten enthält. Im allgemeinen wird das Kulturmedium nach der Kultivierung sterilisiert, und die gewünschte Komponente wird mit einem Alkohol, wie Ethanol oder Isopropanol, ausgefällt und dann getrocknet. Herstellungsverfahren von Xanthangummi sind in den US-Patenten 3 020 206, 3 251 479, 3 391 060, 3 433 708, 3 594 280, 4 282 321 und 8 659 026 beschrieben.

Neben *X. campestris* können andere bekannte Xanthomonas-Bakterien zur Produktion von Xanthangummi verwendet werden, wie *X. carotae*, *X. incanae*, *X. begoniae*, *X. paravericola*, *X. translucens*, *X. vasculorum* und *X. hederae*.

Das übliche Verfahren zur Durchführung derartiger Fermentationen involviert zwei getrennte Schritte. Zuerst wird der zu verwendende Organismus einem Kultivierungsschritt in relativ kleinem Maßstab unterworfen, um die Anzahl oder Konzentration der Bakterien aufzubauen. Dies wird hier üblicherweise als Impffermentation oder Impfkulturschritt bezeichnet. Danach wird ein Gefäß größeren Maßstabs, das ein geeignetes Medium zur tatsächlichen Produktion von Xanthan enthält, mit einer Portion dieser Impfkultur mit einer relativ hohen Bakterienkonzentration beimpft, was hier als Produktionskultur oder Fermentation bezeichnet wird. Dementsprechend wird das Medium für die Impfkultur als Impfkulturmedium bezeichnet, und jenes für die Produktionskultur wird als Produktionskulturmedium bezeichnet.

Herkömmlich wird die Fermentationsbrühe, die das Xanthangummi-Produkt enthält, unter Verwendung von Zentrifugaltrennung oder Kuchenfiltration gereinigt, wobei ungelöste Substanzen, wie Bakterienrückstände und wasserunlösliche, nicht verbrauchte Stickstoffkomponenten darin entfernt werden. Die Verwendung der Zentrifugaltrennung oder Kuchenfiltration ist jedoch vom Kosten- und betrieblichen Standpunkt nicht verwendbar, da die Fermentationsflüssigkeit äußerst visko ist, und so ein Verdünnungsschritt unter Verwendung von Wasser und ein anschließender Konzentrationsschritt erforderlich sind.

Andere Reinigungstechniken sind bekannt, bei denen die ungelösten Substanzen in der Fermentationsflüssigkeit durch eine Enzymbehandlung solubilisiert werden. Beispielsweise offenbart das US-Patent 5 705 368 ein Klärverfahren, das eine kontinuierliche Behandlung mit alkalischer Protease und Lysozym umfasst. Die US-Patente 3 966 618 und 4 010 071 offenbaren Klärverfahren unter Verwendung einer alkalischen und neutralen Protease. Das EP-Patent 78 621 schlug ein Verfahren unter Verwendung einer Säureprotease und einer neutralen Protease vor, und das US-Patent 4 119 491 schlug eine Technik vor, bei der nach einer Proteasebehandlung eine wässrige Polymer-Lösung mit einem silikat-Feststoff in Berührung gebracht wird, wobei Zellen aus der wässrigen Polymer-Lösung entfernt werden. Es sind auch Techniken geoffenbart, bei denen andere Materialien mit Protease verwendet werden, beispielsweise eine Enzymbehandlung unter Verwendung von Polysaccharase und Protease im US-Patent 4 431 734, ein Verfahren unter Verwendung eines Enzyms mit Polygalacturonase-Aktivität und eines Enzyms mit Protease-Aktivität im US-Patent 4 904 568, und ein Verfahren unter Verwendung eines zusammengesetzten Enzyms mit β -1,3-Glucanase-Aktivität und Protease-Aktivität im EP-39 962. Es sind auch Reinigungstechniken unter Verwendung anderer Enzyme bekannt, einschließlich eines Verfahrens unter Verwendung eines Enzyms mit Nuclease-Aktivität und eines Reinigungsverfahrens unter Verwendung von Cellulase, wie im US-Patent 4 729 958 bzw. US-Patent 4 416 990 vorgeschlagen. Bei allen diesen Verfahren unter Verwendung von Enzymbehandlungen können mühevolle Schritte, wie Verdünnung und Konzentration, wie sie für die herkömmlichen Filtrations- und Zentrifugaltrennungstechniken erforderlich sind, entfallen. Daher sind diese enzymatischen Reinigungsverfahren vom wirtschaftlichen und betrieblichen Standpunkt vorteilhaft.

Stickstoffquellen, die sowohl für die Impfkultur als auch die Produktionskultur verwendet werden, können entweder wasserunlöslich oder wasserlöslich sein. Wasserunlösliche, organische Stickstoffquellen, die im Kulturmedium eingesetzt werden können, schließen Mehle ein, wie Destillationsrückstände, geoffenbart im US-Patent 3 000 790, Sojabohnenmehl, geoffenbart im US-Patent 3 335 447, in den GB-Patenten 2

012 792 A und 8 115 854, und Maismehl, beschrieben in den US-Patenten 3 271 267 und 3 455 786.

Wasserlösliche, anorganische Stickstoffquellen schließen Ammoniumsalze ein, wie Ammoniumnitrat, Ammoniumbromat, Ammoniumlactat, Ammoniumhydrochlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat und Harnstoff, die beschrieben sind in den US-Patenten 3 391 060, 4 254 046, 4 282 321 und 5 4 394 447, in den GB-Patenten 2 012 792 und 8 115 855, im FR-Patent 7 605 933, im EP-Patent 66 961 und den Japanischen offengelegten Patentanmeldungen 165 798/1983, 92 591/1986, 173 796/1986 und 9 385/1990.

Wenn eine ungelöste, wasserunlösliche, organische Substanz, wie ein Mehl, als einzige Stickstoffquelle verwendet wird, sind das Wachstumsverhältnis der Bakterien während der Impffermentationskultur und die 10 Fermentationsproduktivität des Xanthangummis während der Produktionskultur hoch, und das Xanthangummi-Produkt zeigt gute Viskositätseffekte in wässriger Lösung. Die Fermentationsbrühe am Ende der Fermentation enthält jedoch etwa 5 bis 10 g/l der nicht verbrauchten, wasserunlöslichen Stickstoffkomponente, den zellulären Rückstand der Bakterien und dgl. zusätzlich zu etwa 20 bis 50 g/l des Xanthangummi-Produkts. Zur Herstellung von Xanthangummi mit hoher Transparenz ist es notwendig, die wasserunlösliche 15 Komponente zu entfernen, die vom Kulturmedium und dem zellulären Rückstand der Bakterien stammt. Auch wenn eine lysierende Enzymbehandlung mit Protease, Lysozym oder dgl. verwendet wird, zeigt jedoch die wässrige Lösung des Xanthangummis und des Xanthangummi-Produkts, das von der Fermentationsflüssigkeit abgetrennt und/oder daraus extrahiert wird, eine schlechte Transparenz.

Wenn andererseits eine wasserlösliche, organische Stickstoffquelle sowohl für die Impfkultur als auch 20 das Produktionskulturmedium verwendet wird, verläuft das Bakterienwachstum sowohl während der Fermentationskultur als auch der Produktionskultur langsam. Folglich sind die Produktivität und die Endproduktionsausbeute von Xanthangummi in der Produktionskulur unerwünscht niedrig, z.B. 10 g/l oder weniger. Der hier verwendete Ausdruck "Produktivität" bedeutet die pro Stunde produzierte Menge an Xanthangummi.

25 Wenn eine wasserunlösliche, organische Stickstoffkomponente im Impffermentationsmedium verwendet wird und eine wasserlöslich, anorganische Komponente im Produktionsmedium eingesetzt wird, enthält die Fermentationsflüssigkeit am Ende der Fermentation 3 bis 6 g/l ungelöste Substanzen, die aus Bakterienrückständen, wasserunlöslicher, nicht verbrauchter Stickstoffkomponente und dgl. bestehen. Auch wenn eine Enzymbehandlung zur Reinigung verwendet wird, sind daher die erhaltene wässrige Xanthangummi-30 Lösung und das Xanthangummi-Produkt hievon nicht ausreichend transparent.

Wenn eine wasserlösliche, anorganische Stickstoffkomponente im Impffermentationsmedium verwendet wird und eine wasserunlösliche, organische Stickstoffkomponente als Stickstoffquelle im Produktionsmedium eingesetzt wird, ist die Wachstumsrate der Bakterien im Impffermentationsmedium niedrig, so daß auch das Bakterienwachstum in der Produktionskultur langsam verläuft. Daher verschlechtert sich die Produktivität des Xanthangummis. Außerdem enthält die Fermentationsflüssigkeit am Ende der Fermentation etwa 4 bis 8 g/l ungelöste Substanzen, die aus Bakterienrückständen der wasserunlöslichen, nicht verbrauchten Stickstoffkomponente und dgl. bestehen, und demgemäß kann keine ausreichende Reinigung mit einer lysierenden Enzymbehandlung erzielt werden.

40 Zusätzliche Stickstoffquellen schließen ein: wässrige, organische Stickstoffkomponenten biologischer Extrakte, wie Hefextrakt, Pepton, Bouillon, Trypton, Malzextrakt, enzymatisch abgebautes Casein, Gelatine und Sojabohnenmolke sowie Aminosäuren, wie Glutaminsäure, Aspartamsäure, Alanin, Prolin und Threonin, wie in den US-Patenten 3 427 226, 3 433 708, 3 391 060, 4 119 546, 4 263 399 und 4 375 512, der Japanischen Patentveröffentlichung 42 634/1980, den Japanischen offengelegten Patentanmeldungen 165 798/1983, 58 089/1985, 92 591/1986, 173 795/1986, 86 894/1989 und 218 701/1990 beschrieben. Sie 45 enthalten keine wasserunlösliche Komponente und können demgemäß zur Herstellung von Xanthangummi mit ausgezeichneter Transparenz verwendet werden. Sie sind jedoch auf Grund ihrer Kosten nicht effizient.

Die Zusammensetzungen der herkömmlichen Kulturmedien, die oben beschrieben wurden, und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 1 (I), (II) und (III) angegeben.

AT 405 941 B

Tabelle 1(I)

Zusammensetzungen herkömmlicher Kulturmedien bei der Herstellung von Xanthangummi durch Fermentation			
	Kombination	Stickstoffkomponente im Impf fermentationsmedium	Stickstoffkomponente im Produktionsmedium
5	1	unlöslich & organisch	unlöslich & organisch
10	2	unlöslich & organisch	wasserlöslich & anorganisch
	3	unlöslich & organisch	wasserlöslich & organisch
15	4	wasserlöslich & anorganisch	unlöslich & organisch
	5	wasserlöslich & anorganisch	wasserlöslich & anorganisch
	6	wasserlöslich & anorganisch	wasserlöslich & organisch
	7	wasserlöslich & organisch	unlöslich & organisch
	8	wasserlöslich & organisch	wasserlöslich & anorganisch
	9	wasserlöslich & organisch	wasserlöslich & organisch

Tabelle 1(II)

	Kombination	Wachstumsverhältnis der Bakterien im Impf fermentationsmedium	Produktivität von XG im Produktionsmedium	ungelöste Substanzen im Produktionsmedium
25	1	△	○	viele
	2	△	△	viele
	3	△	○	viele
30	4	✗	△	viele
	5	✗	✗	wenige
	6	✗	✗	wenige
	7	○	○	viele
	8	○	△	wenige
35	9	○	○	wenige

○: gut, △: mittel, und ✗: schlecht.

Tabelle 1(III)

	Kombination	Wirkung der Enzymbehandlung	Expressionseigenschaften der Viskosität	Kosten des Kulturmediums
40	1	✗	○	○
	2	✗	○	○
45	3	✗	○	✗
	4	✗	△	○
	5	○	✗	△
	6	○	△	✗
50	7	✗	○	✗
	8	○	△	✗
	9	○	○	✗

○: gut, △: mittel, und ✗: schlecht.

55 Wie gezeigt, sieht keine der herkömmlichen Fermentationstechniken und Kombinationen von Kulturmediumzusammensetzungen zufriedenstellende Produktivitätswerte, Reinigungs- und Transparenzwerte der Enzymbehandlung sowie Viskositätseffekte unter gewünschten wirtschaftlichen Bedingungen vor.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung von Xanthangummi mit hohen Produktivitätswerten vorzusehen, das Xanthangummi mit guter Transparenz, hoher Reinheit und einem ausgezeichneten Viskositätseffekt auf wässrige Lösungen hievon erzeugt.

5 Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, ein Verfahren vorzusehen, welches das obige hochqualitative Xanthangummi unter zufriedenstellenden wirtschaftlichen Bedingungen vorsieht.

Es ist noch ein weiteres Ziel der Erfindung, ein hochqualitatives Xanthangummi mit guter Transparenz, hoher Reinheit und einem ausgezeichneten Viskositätseffekt auf wässrige Lösungen hievon vorzusehen

Es konnte festgestellt werden daß diese sowie andere Ziele erreicht werden durch die Schritte:

10 1. Herstellen einer Impf fermentationskultur in einem Medium, das als Stickstoffquelle eine Kombination einer wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente und einer wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente enthält;

15 2. Beimpfen eines Produktionskulturmediums, das als einzige Stickstoffquelle eine wasserlösliche, anorganische Stickstoffkomponente enthält, mit einer aliquoten Menge der Impfkultur;

3. Durchführen der Produktionskultivierung oder-Fermentation unter herkömmlichen Bedingungen und danach Unterwerfen der erhaltenen Fermentationsbrühe einer Klärung unter Verwendung herkömmlicher Enzymbehandlungen, wie oben beschrieben, und anschließendes Ausfällen des Xanthangummis, üblicherweise mit Alkohol, z.B. Ethanol oder Isopropanol, gefolgt von Trocknen, wobei das gewünschte, gereinigte Xanthangummi-Produkt erhalten wird.

20 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine verbesserte Wachstumsrate der Bakterien in der Impf fermentationskultur erhalten, die zur Beschleunigung des Bakterienwachstums in der Produktionskultur führt. Dies bewirkt wesentliche Verbesserungen der Produktivität des Xanthangummis. Da die Menge der wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente, die im Kulturmedium enthalten ist, reduziert wird, werden außerdem die Effizienz und Wirkungen der anschließenden Enzymbehandlung verbessert.

25 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine hohe Produktivität des Xanthangummis unter Verwendung billiger Kulturmedienkomponenten erhalten werden, was zu niedrigen Kosten des Herstellungsverfahrens und erhaltenen Xanthangummi-Produkts führt. Außerdem kann die Transparenz der wässrigen Produkt-Lösung durch bloße Behandlung der Fermentationsflüssigkeit mit einem Enzym mit lytischer Aktivität, wie einer Protease oder Lysozym, leicht auf gewünschte Werte verbessert werden. So können die teureren und komplizierteren herkömmlichen Reinigungsschritte, wie Verdünnung, Filtration und Konzentration, entfallen. Wir haben auch gefunden, daß das mit der vorliegenden Erfindung erhaltene Xanthangummi nicht nur eine verbesserte Transparenz zeigt, sondern auch eine ausgezeichnete Fähigkeit zur Beeinflussung (üblicherweise Erhöhung) der Viskosität von Lösungen, denen es zugesetzt wird, aufweist. Das erfindungsgemäße Produkt findet somit verbreitete Anwendung auf vielen erweiterten Industriegebieten.

30 Fig. 1 ist eine graphische Darstellung, die ein Mischverhältnis einer wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente zu einer wasserunlöslichen, organischen Komponente in einem Impf fermentationsmedium zeigt.

35 Als für die Durchführung der vorliegenden Erfindung geeignete, Xanthangummi-produzierende Bakterien können die herkömmlichen *Xanthomonas*-Bakterien (Bakterien einer *Xanthomonas*-Gattung) verwendet werden, die als öffentliche Hinterlegungen in bekannten Hinterlegungsstellen verfügbar sind, wie bei der American Type Culture Collection und der NRRL. Zusätzlich zu den oben erwähnten *X. campestris* können beispielsweise *X. carotae*, *X. incanae*, *X. begoniae*, *X. paravericola*, *X. translucens*, *X. vasculorum* und *X. hederae* zur Produktion des Xanthangummis eingesetzt werden. Bevorzugte Stämme sind die öffentlich erhältlichen *X. campestris*, hinterlegt unter der Nummer ATCC 55298, ATCC 55258 und NRRL B-1459.

40 Verschiedenste wasserlösliche, anorganische Stickstoffkomponenten können für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Bevorzugt werden Ammoniumsalze, wie Ammoniumnitrat, Ammoniumbromat, Ammoniumlactat, Ammoniumhydrochlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat und Harnstoff. Ammoniumnitrat mit hohem Stickstoffgehalt wird besonders bevorzugt, es besteht jedoch keine bestimmte Einschränkung bezüglich der spezifischen wasserlöslichen Stickstoffkomponente.

45 Ähnlich können verschiedenste wasserunlösliche, organische Stickstoffkomponenten im Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Diese schließen aus Körnern hergestellte Produkte ein, wie Sojabohnenmehl, Erdnußmehl, Maisextrakt und Baumwollsamenextrakt. Besonders bevorzugt wird Sojabohnenmehl mit hohem Stickstoffgehalt. Auch hier besteht jedoch keine bestimmte Einschränkung bezüglich der spezifischen wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente, die verwendet wird.

50 Weiters haben wir gefunden, daß durch das Steuern der Gesamtmenge an Stickstoff sowohl in der Impf- als auch Produktionskultur und auch durch das Steuern des Verhältnisses des Stickstoffgehalts, der von der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffquelle bzw. der wasserunlöslichen, organischen Stickstoffquelle stammt, das Bakterienwachstum während der Impfkultur maximiert werden kann, die Xanthan-Produktion in der Produktionskultur maximiert werden kann, die Effizienz des Enzym-Klärschritts verbessert

werden kann und die Gesamtkosten des Verfahrens reduziert werden können. Es ist zu bemerken, daß bei der Bezugnahme auf den Stickstoffgehalt und/oder das Verhältnis des Stickstoffgehalts entweder für das Impf fermentationsmedium oder das Produktions fermentationsmedium der Gehalt und/oder das Verhältnis immer jener bzw. jenes am Beginn des Impfkulturschritts oder Produktionskulturschritts sind.

5 Insbesondere haben wir gefunden, daß die besten Ergebnisse erhalten werden, wenn am Beginn des Impf fermentationsschritts das Verhältnis des Stickstoffgehalts der wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente und der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente, die als Stickstoffquellen für das Impf fermentationsmedium zugesetzt werden, zwischen etwa 1:2 und 1:5 beträgt, und der gesamte Stickstoffgehalt im Impf fermentationsmedium im Bereich von etwa 0,6 bis 1,5 g/l liegt (schraffierter Bereich in
10 Fig.1).

Wenn der gesamte Stickstoffgehalt im Impf fermentationsmedium weniger als etwa 0,6 g/l beträgt (Zone (1) in Fig.1), ist der Absolutbetrag des Stickstoffgehalts gering, so daß das Wachstumsverhältnis der Bakterien unerwünscht niedrig sein kann. Der Stickstoffgehalt der entsprechenden Stickstoffkomponenten, die in der oben angegebenen GB 2 012 792A geoffenbart sind, liegt in diesem Bereich.

15 Wenn das Verhältnis des Stickstoffgehalts in der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente zu jenem in der wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente weniger als etwa 2 beträgt, und wenn der gesamte Stickstoffgehalt im Impf fermentationsmedium mehr als 0,6 g/l beträgt (Zone (2) in Fig.1), ist die Menge an wasserunlöslicher, organischer Stickstoffkomponente übermäßig, und dies kann die nach Abschluß der Produktionskultur durchgeführte Enzymreinigung nachteilig beeinflussen.

20 Wenn das Verhältnis des Stickstoffgehalts in der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente zu jenem in der wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente mehr als etwa 2 beträgt, und wenn der gesamte Stickstoffgehalt im Impf fermentationsmedium mehr als etwa 1,5 g/l beträgt (Zone (3) in Fig.1), ist der Absolutbetrag der Stickstoffkomponente im Impf fermentationsmedium hoch, das Wachstumsverhältnis der Bakterien ist jedoch relativ niedrig, und die Kosten für das Medium sind hoch. Da die Menge an
25 nicht gelösten Bakterienrückständen, nicht-verbrauchter Stickstoffkomponente und dgl. steigt, kann außerdem in diesem Fall der Reinigungseffekt durch das Enzym nicht ausreichend sein.

Wenn das Verhältnis des Stickstoffgehalts in der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente zu jenem in der wasserunlöslichen, organischen Stickstoffkomponente mehr als etwa 5 beträgt, und wenn der gesamte Stickstoffgehalt im Impf fermentationsmedium im Bereich von etwa 0,6 bis 1,5 g/l liegt (Zone
30 (4) in Fig.1), ist der wasserunlösliche, organische Stickstoffgehalt niedrig, und das Wachstumsverhältnis der Bakterien kann unerwünscht gering sein.

Der Stickstoffgehalt der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente, die als Stickstoffquelle für das Produktionsmedium am Beginn des Produktionsschritts im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet wird, liegt im Bereich von etwa 0,2 bis 1,0 g/l, vorzugsweise etwa 0,3 bis 0,6 g/l. Wenn der Stickstoffgehalt
35 der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente weniger als etwa 0,2 g/l beträgt, wird die Produktivität des Xanthangummis nicht signifikant verbessert. Wenn der Stickstoffgehalt der wasserlöslichen, anorganischen Stickstoffkomponente mehr als 1,0 g/l beträgt, erhöht sich der zelluläre Rückstand der Produktionsbakterien, so daß der Enzymreinigungseffekt nach Abschluß der Fermentation nicht ausreichend ist.

40 Bei der Durchführung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung liegt die Menge des Impf fermentationsmediums, mit dem das Produktionsmedium beimpft wird, im Bereich von etwa 5 bis 15 Vol.-%. Wenn die Menge des aufzuimpfenden Impf fermentationsmediums weniger als etwa 5 % beträgt, ist die Ausgangsmenge der Bakterien im Produktionsmedium gering, verläuft das Bakterienwachstum langsam, und tendiert demgemäß die Produktivität des Xanthangummis dazu, unerwünscht zurückzugehen. Wenn sie mehr als
45 etwa 15 % beträgt, steigen die Kosten des Kulturmödiums, und es erhöhen sich auch die wasserunlöslichen Substanzen, die vom Impf fermentationsmedium stammen, was die Enzymreinigung unerwünscht beeinträchtigen kann.

Beim Verfahren der vorliegenden Erfindung werden zusätzlich zur Stickstoffquelle herkömmliche Kulturmödienkomponenten, wie eine Kohlenstoffquelle, Phosphat, Magnesiumsalz und Spurenkomponenten
50 verwendet, die zur Fermentation der Xanthangummi-Produktionsbakterien notwendig sind.

Beispiele der Kohlenstoffquelle schließen ein: Saccharosen, wie Glucose, Sucrose, Xylose, Molassen, Stärke, Maltose und Dextrin, sowie mehrwertige Alkohole, wie Glycerin und Sorbit. Sie können allein oder in Kombination verwendet werden. Die Menge der zuzusetzenden Kohlenstoffquelle liegt im Bereich von etwa 5 bis 70 g/l.

55 Beispiele des Phosphats schließen ein: primäres Kaliumphosphat, sekundäres Kaliumphosphat, primäres Natriumphosphat und sekundäres Natriumphosphat. Diese können allein oder in Kombination verwendet werden. Die Menge des zuzusetzenden Phosphats liegt im Bereich von 1 bis 5 g/l.

Beispiele des Magnesiumsalzes schließen ein: Magnesiumphosphat, Magnesiumsulfat und Magnesiumnitrat, und sie können allein oder in Kombination verwendet werden. Die Menge des zuzusetzenden Magnesiumsalzes liegt im Bereich von etwa 0,1 bis 1 g/l.

- 5 Beispiele der Spurenkomponenten schließen ein: Eisen(II)-chlorid, Eisen(III)-chlorid, Eisen(II)-nitrat, Eisen(III)-nitrat, Eisen (II)-phosphat, Eisen(III)-phosphat, Zinksulfat, Zinkchlorid, Zinknitrat und Zinkphosphat, und diese können allein oder in Kombination verwendet werden. Die Menge der zuzusetzenden Spurenkomponenten liegt im Bereich von etwa 0,02 bis 0,08 g/l.

- 10 In der vorliegenden Erfindung können verschiedenste lytische Enzyme für den Reinigungsschritt verwendet werden. Beispiele der bevorzugten lytischen Enzyme zur Behandlung des fermentierten Xanthangummi-Kulturmediums schließen ein: alkalische Protease, neutrale Protease, Säureprotease und Lysozym. Hier von werden alkalische Protease und Lysozym besonders bevorzugt.

Die folgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung.

Beispiel 1:

15

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

20

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,1 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,74 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	5,4 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,35 g/l)
Verhältnis =	0,35/0,74 = 0,47
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

25

30 Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

35

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

40

Ein die oben angegebene Zusammensetzung A enthaltendes Kulturmedium wurde mit einer 2 ml Bakterienprobe (Konzentration = 10¹⁰/ml) (Xanthomonas campestris (ATCC 55298)) beimpft, und eine Kultivierung wurde in einem Schüttelkolben (Schüttelkultivierung) 24 h lang durchgeführt. Danach wurde dieses Kulturmedium einem die oben angegebene Zusammensetzung B enthaltenden Kulturmedium in einem 5 l Fermenter zugesetzt, und anschließend wurde eine Belüftungskultivierung bei pH 6,5 bis 7,0 2 Tage lang bei 30 °C durchgeführt. Als nächstes wurde die erhaltene Fermentationsflüssigkeit einer Enzymbehandlung mit alkalischer Protease und Lysozym gemäß einem in der JP 54898/1992 A beschrieben Verfahren unterworfen.

50 Spezifisch wurde die Fermentationsflüssigkeit bei einer Temperatur von 55 °C bei einem Ausgangs-pH von 11 während 90 min unter Rühren wärmebehandelt, und danach wurde der pH der Fermentationsflüssigkeit auf 8,5 eingestellt, während die Temperatur durch den tropfenweisen Zusatz von 26 Masse-% NaOH-Lösung bei 55 °C gehalten wurde. Eine wässrige Suspension, enthaltend 330 ppm alkalische Protease (Warenname: Bioprase; hergestellt von Nagase Biochemical Co., Ltd.), wurde durch ein 0,4 µm Mikrofilter filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde der obigen Fermentationsflüssigkeit mit eingestelltem pH zugesetzt und die Lösung dann unter Rühren 2 h lang bei 55 °C behandelt.

55 Als nächstes wurde die Fermentationsflüssigkeit auf 35 °C gekühlt und der pH der Lösung durch den tropfenweisen Zusatz einer 10 Masse-% H₂SO₄-Lösung auf 6,5 eingestellt. Danach wurden 3 ppm Lysozym

AT 405 941 B

(Warenname Lysozyme Taiyo; hergestellt von Taiyo Chemical Co., Ltd.) der Lösung mit eingestelltem pH zugesetzt, und die Lösung wurde 1 h lang bei 35 °C gerührt.

Beispiel 2:

5

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

10

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,5 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,88 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	3,4 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,22 g/l)
Verhältnis =	0,22/0,88 = 0,25
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

15

20 Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

25

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

30

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

35

Beispiel 3:

40

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

45

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,5 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,88 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	3,4 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,22 g/l)
Verhältnis =	0,22/0,88 = 0,25
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

50

55

AT 405 941 B

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

5

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	7 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,60 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

10

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche 15 Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

Beispiel 4:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

20

25

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,5 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,88 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	3,4 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,22 g/l)
Verhältnis =	0,22/0,88 = 0,25
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

30

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

35

40

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,8 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,98 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

45

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

50

55

Beispiel 5:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

5

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	1,3 g/l
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	0,46 g/l)
(Stickstoffgehalt: Verhältnis =	3,4 g/l
NaCl:	0,22 g/l)
Wasser:	0,22/0,46 = 0,48
	9 g/l
	0,3 l

10

15

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

20

25

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt: KH ₂ PO ₄ :	0,32 g/l)
MgSO ₄ .7H ₂ O:	2 g/l
Spurenkomponenten:	0,5 g/l
Wasser:	0,05 g/l
	2,7 l

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden
30 Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche
Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

35

Beispiel 6:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

40

45

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	1,5 g/l
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	0,53 g/l)
(Stickstoffgehalt: Verhältnis =	1,7 g/l
NaCl:	0,11 g/l)
Wasser:	0,11/0,53 = 0,21
	9 g/l
	0,3 l

50

55

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

5

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

10

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

Beispiel 7:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

20

25

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,7 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,95 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	6,3 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,41 g/l)
Verhältnis =	0,41/0,95 = 0,43
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

30

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

35

40

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

45

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

50

55

Beispiel 8:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

5

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	3,2 g/l
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	1,12 g/l)
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	3,7 g/l
Verhältnis =	0,24 g/l)
NaCl:	0,24/1,12 = 0,21
Wasser:	9 g/l
	0,3 l

10

15

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

20

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt: KH ₂ PO ₄ :	0,32 g/l)
MgSO ₄ .7H ₂ O:	2 g/l
Spurenkomponenten:	0,5 g/l
Wasser:	0,05 g/l
	2,7 l

25

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden
30 Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche
Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

Vergleichsbeispiel 1:

35 Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

40

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	3,1 g/l
(Stickstoffgehalt: NaCl:	1,09 g/l)
Wasser:	9 g/l
	0,3 l

45

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

50

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt: KH ₂ PO ₄ :	0,32 g/l)
MgSO ₄ .7H ₂ O:	2 g/l
Spurenkomponenten:	0,5 g/l
Wasser:	0,05 g/l
	2,7 l

55

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

5 **Vergleichsbeispiel 2:**

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

10

Glucose:	5 g/l
entfettetes Sojabohnenmehl:	17 g/l
(Stickstoffgehalt:	1,11 g/l)
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

15

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

20

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

25

30 Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

35 **Vergleichsbeispiel 3:**

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

40

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	3,1 g/l
(Stickstoffgehalt:	1,09 g/l)
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

45

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

50

Glucose:	50 g/l
entfettetes Sojabohnenmehl:	4,6 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,30 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

55

AT 405 941 B

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

5 Vergleichsbeispiel 4:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

10

Glucose:	5 g/l
entfettetes Sojabohnenmehl:	17 g/l
(Stickstoffgehalt:	1,11 g/l)
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

15

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

20

Glucose:	50 g/l
entfettetes Sojabohnenmehl:	4,6 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,30 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

25

30 Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

35

Vergleichsbeispiel 5:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

40

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	3,1 g/l
(Stickstoffgehalt:	1,09 g/l)
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

45

50

55

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

5	Glucose:	50 g/l
	NH ₄ NO ₃ :	0,8 g/l
	(Stickstoffgehalt:	0,28 g/l)
	entfettetes Sojabohnenmehl:	0,3 g/l
	(Stickstoffgehalt:	0,02 g/l)
10	KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O:	0,5 g/l
	Spurenkomponenten:	0,05 g/l
	Wasser:	2,7 l

15 Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

Vergleichsbeispiel 6:

20 Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

25	Glucose:	5 g/l
	NH ₄ NO ₃ :	1,0 g/l
	(Stickstoffgehalt:	0,35 g/l)
	entfettetes Sojabohnenmehl:	3,4 g/l
	(Stickstoffgehalt:	0,22 g/l)
30	Verhältnis =	0,22/0,35 = 0,63
	NaCl:	9 g/l
	Wasser:	0,3 l

35 Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

40	Glucose:	50 g/l
	NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
	(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
	KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O:	0,5 g/l
	Spurenkomponenten:	0,05 g/l
45	Wasser:	2,7 l

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

50

Vergleichsbeispiel 7:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

5

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,0 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,70 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	7,0 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,46 g/l)
Verhältnis =	0,46/0,70 = 0,66
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

10

15

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

20

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

25

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

30

Vergleichsbeispiel 8:

35

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

40

45

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	3,5 g/l
(Stickstoffgehalt:	1,23 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	7,0 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,46 g/l)
Verhältnis =	0,46/1,23 = 0,37
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

50

55

AT 405 941 B

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

5

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

10

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmiedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche 15 Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

Vergleichsbeispiel 9:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

20

25

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
entfettetes Sojabohnenmehl:	2,7 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,18 g/l)
Verhältnis =	0,18/0,32 = 0,56
NaCl:	9 g/l
Wasser:	0,3 l

30

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

35

40

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	0,9 g/l
(Stickstoffgehalt:	0,32 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
Spurenkomponenten:	0,05 g/l
Wasser:	2,7 l

45

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmiedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

50

55

Vergleichsbeispiel 10:

Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

5

10

15

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,5 g/l
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	0,88 g/l)
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	3,4 g/l
Verhältnis =	0,22 g/l)
NaCl:	0,22/0,88 = 0,25
Wasser:	9 g/l
	0,3 l

20

25

Glucose:	50 g/l
NH ₄ NO ₃ :	3,5 g/l
(Stickstoffgehalt: KH ₂ PO ₄ :	1,23 g/l)
MgSO ₄ .7H ₂ O:	2 g/l
Spurenkomponenten:	0,5 g/l
Wasser:	0,05 g/l
	2,7 l

30 Die Fmentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

Vergleichsbeispiel 11:

35 Zusammensetzung A: Komponenten des Impf fermentationsmediums

40

45

Glucose:	5 g/l
NH ₄ NO ₃ :	2,5 g/l
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	0,88 g/l)
(Stickstoffgehalt: entfettetes Sojabohnenmehl:	3,4 g/l
Verhältnis =	0,22 g/l)
NaCl:	0,22/0,88 = 0,25
Wasser:	9 g/l
	0,3 l

50

55

Zusammensetzung B: Komponenten des Produktionsmediums

5	Glucose:	50 g/l
	NH ₄ NO ₃ :	0,4 g/l
	(Stickstoffgehalt:	0,14 g/l)
	KH ₂ PO ₄ :	2 g/l
10	MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5 g/l
	Spurenkomponenten:	0,05 g/l
	Wasser:	2,7 l

Die Fermentation wurde in den die oben genannten Zusammensetzungen A und B umfassenden Kulturmedien durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 1 durchgeführt, und es wurde die gleiche Enzymbehandlung wie in Beispiel 1 verwendet.

Nach Abschluß der Enzymbehandlung wurde jede Fermentationsflüssigkeit gesammelt, und Xanthangummi wurde extrahiert und abgetrennt unter Verwendung von Isopropanol in einer Menge des 1,5-fachen der Probenmasse. Dann wurde das abgetrennt Produkt luftgetrocknet. Danach wurde für jede Probe die Ausbeute an festem Xanthangummi gemessen. Außerdem wurde eine 0,3 % wässrige Lösung des erhaltenen festen Xanthangummis hergestellt, und dann wurden der Transmissionsgrad sowie die Viskosität (Brookfield-Viskosimeter: 30 UpM) für jede Probe gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 angegeben.

Die für diese Messungen verwendeten, spezifischen Verfahren sind wie folgt:

1. Transparenz

25

- (a) Die Transparenz wurde unter Verwendung eines Spektrophotometers mit einer Wolframlampe für sichtbare Strahlen und einem Auslaßrohr für schweren Wasserstoff für die Ultraviolettrahlen gemessen. Eine Quarzzelle mit einer Schichtdicke von 1 cm wurde verwendet.
- (b) 0,90 g trockenes Xanthangummi wurden genau in ein 500 ml Becherglas, enthaltend 299,1 g Wasser, dosiert. Dann wurde es dispergiert, um den Einschluß von Luftblasen zu vermeiden, und unter Rühren 2 h lang gemischt, bis es gelöst war, und die Luftblasen wurden entfernt. Die Temperatur wurde auf 20 ± 0,5 °C eingestellt. Die erhaltene Lösung wurde als Testlösung verwendet. Die Wellenlängen der Spektrophotometer-Lichtquellen betrugen 486,0 nm und 656,1 nm für das Auslaßrohr für schweren Wasserstoff. Die Testlösung wurde in eine Quarzzelle eingebracht und Wasser als Bezug verwendet. Die Permeabilität bei 0 % und 100 % bei einer gemessenen Wellenlänge von 600 nm wurde eingestellt. Danach wurde die Testlösung in eine 10 cm Quarzzelle gegeben, so daß die Permeabilität von 600 nm abgelesen und gemessen werden konnte.

2. Viskosität

40

- Die Viskosität wurde unter Verwendung eines Brookfield-Rotationsviskosimeters mit einem Nr.2 Rotor und einer Austauscheranzahl von 10 gemessen. Für diese Messung wurde eine Menge, die 0,9 g Xanthangummi entsprach, genau in ein 500 ml Becherglas, enthaltend 299,1 g Wasser, dosiert. Die Mischung wurde 2 h lang gerührt, bis sie gelöst war, und die Luftblasen wurden entfernt. Die Temperatur wurde auf 25 ± 0,5 °C eingestellt. Diese Lösung wurde als Testlösung verwendet. Der Viskositätstest wurde mit einem Brookfield-Rotationsviskosimeter bei einer Drehzahl von 60 UpM durchgeführt. Nach 30 s wurde die Drehung angehalten, und die Messung wurde abgelesen und mit der Austauscheranzahl multipliziert.

50

55

T a b e l l e 2 - Ergebnisse der Beispiele und Vergleichsbeispiele

gesamter Stickstoffgehalt				Produktionsmedium				0,3 % wässrige XG-Lösung			
Impf fermentationsmedium		NH ₄ NO ₃ [g/l]	gesamt [g/l]	NH ₄ NO ₃ [g/l]	SF [g/l]	gesamt [g/l]	nicht gelöste Substanzen im Produktionsmedium [g/l]	nicht gelöste Substanzen im Produktionsmedium [g/l]	Transmissionsgrad [%]	Viskosität [CP]	
Beispiele											
1	0,71	0,35	1,09	0,32	-	0,32	1,0	31	2,8	82	
2	0,88	0,22	1,10	0,12	-	0,32	1,0	30	2,6	85	
3	0,88	0,22	1,10	0,60	-	0,60	1,0	31	2,7	83	
4	0,88	0,22	1,10	0,98	-	0,98	1,0	30	2,9	80	
5	0,46	0,22	0,68	0,32	-	0,32	0,9	28	2,5	81	
6	0,53	0,11	0,64	0,32	-	0,32	0,8	27	2,4	83	
7	0,95	0,41	1,36	0,32	-	0,32	1,2	32	3,1	80	
8	1,12	0,24	1,36	0,32	-	0,32	1,1	31	2,7	82	
Vergleichsbeispiele											
1	1,09	-	1,09	0,32	-	0,32	0,3	8	1,5	88	
2	1,09	1,11	1,11	0,32	-	0,32	0,7	24	4,8	56	
3	1,09	-	1,09	-	0,30	0,30	0,3	23	6,7	37	
4	-	1,11	1,11	-	0,30	0,30	0,7	33	3,4	380	
5	1,09	-	1,09	0,28	0,02	0,30	0,2	21	2,2	80	
6	0,35	0,22	0,55	0,32	-	0,32	0,7	25	2,3	82	
7	0,70	0,46	1,16	0,32	-	0,32	1,2	31	3,4	74	
8	1,23	0,46	1,69	0,32	-	0,32	1,3	32	3,5	72	
9	1,02	0,18	1,20	0,32	-	0,32	0,5	24	2,0	81	
10	0,88	0,22	1,10	1,23	-	1,23	1,0	32	3,3	76	
11	0,88	0,22	1,10	0,14	-	0,14	1,0	16	1,8	81	

Wie in den obigen Beispielen und Vergleichsbeispielen gezeigt, werden bei der vorliegenden Erfindung eine wirtschaftliche, wasserlösliche, anorganische Stickstoffkomponente und eine wasserunlösliche, organische Stickstoffkomponente gemischt, und bei einem spezifischen Verhältnis (erstere allein in einer Produktionskultur) als Stickstoffquellen einer Impf fermentationskultur hauptsächlich zum Züchten von Bakterien und der Produktionskultur hauptsächlich zur Produktion des Xanthangummis verwendet. Dadurch werden ein hohes Bakterienwachstumsverhältnis in der Impf fermentationskultur und eine hohe Xanthangummi-

Produktivität in der Produktionskultur vorgesehen. Wenn die erhaltene Fermentationsflüssigkeit mit einem lytischen Enzym behandelt wird und dann das feste Xanthangummi aus/von der Fermentationsflüssigkeit unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels extrahiert/abgetrennt wird, haben außerdem 0,3 Masse-% wässerige Lösung dieses festen Xanthangummis einen hohen Transmissionsgrad von 80 % und 5 ausgezeichnete Viskositätseigenschaften von 300 cP oder mehr zusätzlich zur hervorragenden Xanthangummi-Produktivität.

Patentansprüche

- 10 1. Verfahren zur Herstellung von Xanthangummi durch Submers-Fermentation von Xanthan-produzierenden Mikroorganismen in einem Kulturmedium, bei welchem zuerst ein Impfkulturschritt in Anwesenheit eines Impfkulturmediums, das eine erste Stickstoffquelle zur Erhöhung der Konzentration der Mikroorganismen und zur Produktion einer Impfkultur enthält, durchgeführt wird, anschließend ein Produktionskulturmedium, das eine zweite Stickstoffquelle enthält, mit einer Portion der Impfkultur betupft wird, und ein Produktkulturschritt durchgeführt wird, wobei Xanthangummi hergestellt wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Stickstoffquelle eine Kombination einer wasserunlöslichen Stickstoffquelle und einer wasserlöslichen Stickstoffquelle umfaßt, und die zweite Stickstoffquelle aus einer wasserlöslichen Stickstoffquelle besteht.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Verhältnis des Stickstoffgehalts der unlöslichen Stickstoffquelle zur löslichen Stickstoffquelle im Impfkulturmedium zu Beginn des Impfkulturschritts 1:2 bis 1:5 beträgt.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gesamte Stickstoffgehalt im Impfmedium von 0,6 bis 1,5 g/l zu Beginn des Impfkulturschritts beträgt.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gesamte Stickstoffgehalt im Produktionsmedium im Bereich von etwa 0,2 bis 1,0 g/l zu Beginn des Impfkulturschritts liegt.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gesamte Stickstoffgehalt im Produktionsmedium im Bereich von 0,3 bis 0,6 g/l zu Beginn des Impfkulturschritts liegt.
- 35 6. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die lösliche Stickstoffquelle ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Ammoniumnitrat, Ammoniumbromat, Ammoniumlactat, Ammoniumhydrochlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat und Harnstoff.
- 40 7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die wasserunlösliche Stickstoffquelle ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Sojabohnenmehl, Erdnußmehl, Maisextrakt und Baumwollsamenextrakt.

45 Hiezu 1 Blatt Zeichnungen

50

55

FIG. 1

MISCHVERHÄLTNIS VON WASSERLÖSLICHER, ANORGANISCHER
STICKSTOFFKOMPONENTE ZU WASSERUNLÖSLICHER, ORGANISCHER
STICKSTOFFKOMPONENTE IM PRODUKTIONSMEDIUM

