

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11) 192 452

A bejelentés napja: (22) 84. 09. 21.

(21) 3586/84

A bejelentés elsőbbsége:

(33)

GB

(32)

83. 09. 22.

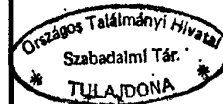
(31)

(8325445)

A közzététel napja: (41) (42) 1985. 10. 28.

Megjelent: (45) 88. 11. 10.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄
C 12 P 19/04



Feltaláló(k): (72)

LINTON John Dudley, kutató vegyész, GODLEY Andrew Richard, kutató vegyész, Sittingbourne, Kent, EVANS Michael William kutató vegyész, Chichester, West Sussex, GB

Szabadalmas: (73)

Shell Internationale Research Maatschappij B. V., Hága, NL

(54)

ELJÁRÁS HETEROPOLISZACHARIDOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány szerint NCIB 11 883 törzset tenyésztenek asszimilálható szénhidrátot és nitrogénforrást tartalmazó vizes táptalajon, előnyö-

sen 0,635—0,8 g asszimilálható nitrogén/100 g szénhidrát tartalmú táptalajon, levegőztetett tenyészetben, és a kapott heteropoliszacharidot ismert módon kinyerik.

A találmány tárgya heteropoliszacharidok előállítására szolgáló baktériumokkal való fermentációs eljárással.

Ismeretes, hogy heteropoliszacharidok előállíthatók szénhidrátforrásokon megfelelő mikroorganizmusok tenyésztésével. A 81 200 479.4 számú európai szabadalmi bejelentésben például *Pseudomonas* sp. NCIB 11 592 alkalmazását ismertetik ilyen célra.

Új, Gram-negatív sarjadzó baktériumot izoláltak és a National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, Aberdeen depónálóján 11 883. számon letétbe helyezték. A *Pseudomonas* sp. NCIB 11 592 megjelölésű mikroorganizmushoz képest az NCIB 11 883 poliszacharid termelése sokkal gyorsabbnak tűnik.

Ezen kívül az NCIB 11 883 törzs termelékenysége — a viszkozitást növelő hatásban megadva — lényegesen magasabb, mint a *Pseudomonas* sp. NCIB 11 592 törzsé. A viszkozitást növelő hatást azzal a hígítási faktoriall fejeztük ki, amely hígítás alkalmazásával a fermentálé 30 °C-on, 15%-os sókoncentrációban, 7,5 sec⁻¹ nyíróhatás mellett 2 · 10⁻² Pa · s viszkozitású.

A találmány tárgya az előzőekben ismertetettek alapján heteropoliszacharidok előállítására szolgáló eljárás, melyben NCIB 11 883 törzset tenyésztünk asszimilálható szénhidrát- és nitrogénforrást tartalmazó vizes táptalajon levegőztetve, majd a kapott heteropoliszacharidot kinyerjük. Az eljárást végezhetjük szakaszos rendszerben, utántáplálásos rendszerben, melynél tetszés szerint tápanyag utántöltést és/vagy termékelvonást végzünk, vagy folyamatos rendszerben. A termelékenységet figyelembe véve a folyamatos eljárás vagy az utántöltéses — elvonásos eljárás az előnyös. A mikroorganizmust előnyösen élesztőkivonat nélkül, kémiaiag definiált táptalajban tenyésztjük. Adott termelékenység vagy adott végső sejtkoncentráció elérése érdekében könnyebben kezelhető az olyan nitrogénforrás, mint például a nátrium-glutamát, az ammónium- vagy a nitrátsók, mint a komplex nitrogénforrások, például az élesztőkivonat vagy a desztillálóberendezések szárított oldható maradékanyagai. Nitrogénforrásként előnyösen nátrium-glutamátot, ammónium-szulfátot vagy nátrium-nitrátot alkalmazunk. A találmány szerinti eljárással előállított heteropoliszacharidok alkalmazhatók vizes oldatok viszkozitásának módosítására.

A vizes rendszer előnyösen a kiegészítő, átdolgozó, hatásfokozó vagy fűrófolyadékok körébe tartozik. A fűrófolyadék a gáz- vagy olajkutat fűrásánál alkalmazott fűrófej sikosítására szolgál. A kiegészítő, átdolgozó és hatásfokozó folyadékokat az olaj- és gáztartalmú köztrétegekbe injektáljuk be az olaj- és gázkeringés fokozására. A hatásfokozó folyadékokat például rétegrepesztéses roncsolásnál és savas roncsolásnál alkalmazzák. A legtöbb kiegészítő, átdol-

gozó, fűró- és hatásfokozó folyadék legalább még egy adalékanyagot, például sót, a folyadékvesztésre ható adalékanyagot, iszapstabilizáló anyagot, savakat, bázisokat, felületaktív anyagokat stb. tartalmaz. A sűrítendő vizes rendszer lehet azonban nyomdafesték vagy a „francia öntet” elnevezésű salátaöntet is.

A találmány szerint előállított heteropoliszacharid egyik előnyös alkalmazási lehetősége a vizet és 0,06—1,5 t⁰/₀ a találmány szerint előállított heteropoliszacharidot tartalmazó fűrófolyadék. Ugyancsak előnyös alkalmazási terület az olyan kútkezelési eljárás is, melynek során a kútba vizes közeget, azaz vizet és 0,05—1,5 t⁰/₀ találmány szerint előállított heteropoliszacharidot vezetünk. A vizes közeg célszerűen sóoldat vagy más folyadék, kívánt esetben adalékanyagokat is tartalmazhat. A találmány szerint előállított heteropoliszacharid vizes oldata olaj fokozott kinyerésének elősegítésére is alkalmazható. A fokozott olajkinyerés érdekében történő felhasználás történhet a fenti heteropoliszacharid oldatnak a kútban levő folyadék helyettesítésére való alkalmazásával és/vagy egy a kúttal kapcsolatban levő permeábilis felület alatti képződménybe való bevezetésével, mozgékonyvizsgálatokban mozgékonyviszkozitási pufferként, például felületaktív micelláris elárasztásnál, profil kontrollhoz, a víztermelés csökkentésére, a víz : olaj arány csökkentésére stb.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott NCIB 11 883 törzs egy szokatlan Gram-negatív sarjadzó baktérium, amely — úgy tűnik — nem illeszthető könnyen egy ismert taxonómiai csoportba sem. A mikroorganizmus jellemzését és azonosítását a „National Collection of Industrial Bacteria” végezte.

Az NCIB 11 883 törzs jellemzése és azonosítása.

A vizsgálatokat 30 °C hőmérsékleten végeztük, az ettől eltérő hőmérsékletet külön jelöltük.

Sejtmorfológia.

Rövid pálcák, párhuzamos oldalúak vagy enyhén kúposak, egyenesek vagy enyhén hajlottak vagy görbültek. Bipoláris fázis — az öregebb tenyészetekben sötét területek (Oxoid CM55, 30°, 8 nap). Elágazó flagellumok, EM rácson a sejtek csomósodása.

Telepmorfológia

Oxoid CM55 48 óra, piszkosfehér, áttetszőtől félig átlátszatlan, ép szélű, lekerekített, sima és fényes, 1 mm, a telepek enyhén nyálkásak, amíg glukóz tartalmú táptalajon több poliszacharid nem képződik.

Oxoid CM55 telepméret: 24 óra, 0,2 mm; 38 óra, 1,5 mm.

Oxoid CM3 + 1,0% glukóz, 60 óra: jó növekedés, piszkosfehér, kerek, a szélek kissé szabálytalanok, sima, fényes, nyálkás, 2,5—3 mm.

1. táblázat

Szénforrások hasznosítása. A felsorolt vegyületek a *Pseudomonas* vizsgálatra Bergey (Manual of Determinative Bacteriology, 1974) és R. Y. Stainer és munkatársai [J. Gen. Microbiol. 43, 159 (1966)] munkáiban megadottak.

	NCIB 11 883			Sav O-F ⁽²⁾	NCIB 11 883			
	CSU ⁽¹⁾ Cluster 1 ⁽³⁾	CSU NCIB ⁽⁴⁾ 9439 9440	CSU		CSU Cluster 1	CSU NCIB ⁽⁴⁾ 9439 9440	CSU Sav O-F	
Szénhidrátok és cukorszármazékok				Alkohol				
D-Ribóz			+		Metanol*	—	—	—
D-Xilóz	+	+	+	+	Etanol	—	—	+
L-Arabinóz	±	+	+	nyomnyi	Geraniol	—	—d	
L-Rhamnóz	+	—	+		<i>Nem nitrogéntartalmú aromás és más gyűrűs vegyületek</i>			
L-Glukóz	+	+	+	gyenge +	m-hidroxi-			
D-Fruktóz	+	+	+	gyenge +	-benzoát	—	—	
Szacharóz	+	—	+	+	p-hidroxi-			
Trehalóz	+	—	+	nyomnyi	-benzoát	±	—	—
Cellobióz	+	—	+	+	Tesztoszteron	—	—	
2-ketoglukonát								
Szacharát	—	—	—					
Galaktóz	+	+	+	nyomnyi				
Mannóz*	+			nyomnyi				
Laktóz*			+	gyenge +				
Maltóz*		d	+	gyenge ±				
Melibióz*				nyomnyi				
Zsírsavak				Alifás aminosavak				
Acetát	+	—	+		β-Alanin	+	+(I-)	+
Propionát	±d	—	+		L-Valin	+	—	—
Butirát			+		L-Arginin*	+	+(DL-)	+
					L-Metionin*			
Dikarbonsavak				Gyűrűs aminosavak				
Malonát	—	—	—		Hisztidin	±	+(L-)	+
					L-Triptofán*			—
					Antranilát*			—
Hidroxisavak				Aminok				
D (—)-Tartarát	—	—	—		Benzil-amin			—
mezo-Tartarát			—		Triptamin	—	—	
DL-β-Hidroxi-butirát			—		α-Amil-amin	—	d—	
DL-Laktát	+	+	+					
Glikolát			—					
Egyéb szerves savak				Egyéb nitrogéntartalmú vegyületek				
Levulinát	—	d D—	—		Betain	+	+	
Citrakonát		—	—		Pantotenát			
Mezakonát			—					

1. táblázat
(folytatás)

NCIB 11 883				NCIB 11 883			
CSU ⁽¹⁾	CSU	CSU	Sav	CSU	CSU	CSU	Sav
Cluster 1 ⁽³⁾	NCIB ⁽⁴⁾		O-F ⁽²⁾	Cluster 1	NCIB ⁽⁴⁾		O-F
	9439				9439		
	9440				9440		

Cukor polialkoholok és glikolok

Eritrit	—	—	—	
Szorbit	+	+	+	+
mezo-Inozit	+	+	+	gyenge +
Adonit	—	±	+	+
Propilén-glikol	—	—	—	
2,3-Butilén-glikol	—	±	—	—

(1) CSU = Szénforrás hasznosítása (Növekedés egyedi szénforráson)

(2) Sav O-F = Savtermelés O-F táptalajon.

(3) Green, P. N. és Boiusfield, Y. J. (J. Gen. Microbiol 128 623—638) közleményében ismertett törzs.

Cukor polialkoholok

Policukoralkoholok és glikolok

D-Mannit*	+	+	+	— (nyomnyi?)
Glicerin	+	+	+	— (nyomnyi?)

* Hozzáadott vegyület

* DL — helyett

(4) Az NCIB 9439 Mycoplana dimorpha és az NCIB 9440 M. bullata szénforrás-hasznosítási eredményeit Green P. N. 1981 és Green és Bousfield 1982 eredményeiből vettük (d = kétséges eredmény). Hasonlóképpen cluster 1 esetén a ± jelölés különböző törzsek esetén eltérő eredményt jelöl.

Izolátum	NCIB 11 883	40	Izolátum	NCIB 11 883
°C inkubálás	30°		°C inkubálás	30°
Piocianin			Lakmusz tej	barna (redukált?) részben peptonizált (kétséges eredmény) 28
Fluoreszcenc	—			
L-Arg CSU	+	45		
Betain CSU				
Glukóz CSU	+	(összefüggő lepedék)	Gáz, glukóz	
Laktát CSU	+	(nincs lepedék)	ONPG	
Acetát CSU	—	(nincs lepedék)	Arg. Moller	—
			Lys. Moller	—
Érzékenység (1 nap)			Orn Moller	—
Penicillin G	4 µg		NO ₃ ⁻ — NO ₂ ⁻	—
Sztreptomycin	25 µg gyenge +	55	NO ₃ ⁻ — N ₂ Gáz	+
Kloramfenikol	50 µg +		maradék NO ₃ ⁻ — DNA-áz	—
Tetraciklin	25 µg +++			
Novobiocin	5 µg +		Szűrt gél 20°	— 28
Polimixin B	25 µg gyenge +	60	Géllemez	— 7
O/129			Kazeinlemez	— 7
Leván			Keményítőlemez	— 7
Növekedés faktor igény	—		Lecitin-tojás sárgája lemez	— 7
Ureáz Christiansen	+	65	Lipáz-tojás sárgája lemez	— 7
			NH ₃	+ 7

Izolátum	NCIB 11 883
°C inkubálás	30°
Indol	— 7
H ₂ S (TSI)	— 7
Ólom-acetátos papír	gyenge + 7
MR	— 7
VP	— 7
Arg Thornley	— 7
CM3, növekedés °C-on (léginkubátorok, kivéve 4 °C-on)	
5°	—
30°	+
37°	+
CM1 (vízfürdő)	
41°	gyenge +
45°	—
CM3, pH beállítása, növekedés pH-n	
3	—
5	3 +
7,2	3 +
8	3 +
9	3 +
10	3 +
Szaporodás NaCl-ban	
2 ⁰ / ₀	3 +
2 ⁰ / ₀	3 +
4 ⁰ / ₀	3 +
5 ⁰ / ₀	—
3-ketolaktóz-termelés (De Ley-módszer)	—

Irodalmi hivatkozások:

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn. (1974). (R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, eds.). Baltimore: Williams and Wilkins.

2. Cowan, S. J. and Steel, K. J. (1974). Manual for the Identification of Medical Bacteria Cambridge University Press.

A kiválasztott táptalajok és módszerek

CM1 Oxoid CM1 táptalaj;
CM3 Oxoid CM3 tápagar;
CM55 Oxoid CM55 véres agar;
mindhárom az Oxoid Ltd., Wade Rd., Basings-toke, Hants, Nagy-Britannia terméke.

Palleroni és Doudoroff 1972 módosított ásványi alaptáp (PD)
(A. Rev. Phytopathol 10, 73)

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6,0 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,01 g

CaCl ₂ · 6H ₂ O	0,01 g
Ionmentes víz	1 liter
pH 6,8	

5 Ezt az alaptáptalajt használtuk a szénforrás hasznosításának vizsgálatánál.

PD ásványi alaptáp + 0,1% sterilre szűrt glükóz (P.D.G.)

Szűrt zselatin

Oxoid No2. táptalaj	2,5%
Zselatin (Difco)	12,0%
Zselatinlemez	
Oxoid CM3 tápagar	2,8%
Zselatin	1,0%

Tejes lemezek

15 Sovány tej (Difco) külön sterilizelve	3 %
Pepton (Difco)	0,1%
Marhahúskivonat Lab-Lemco	0,1%
NaCl	0,5%
Agar	1,5%

20 pH 7,4 autoklávban történő sterilizés előtt.

Növekedés só jelenlétében

2, 3, 4 és 5% NaCl tartalmú alaptáptalajt készítettünk Hayward és Hodgkiss (1961) eljárása szerint. A tenyészeteket inkubáljuk.

Növekedési faktor vizsgálata

30 Üvegben desztillált vízzel készített PDG táptalajt egyenes drótszállal beoltva három tenyészetet készítettünk. Ha körülbelül 4 nap alatt megfelelő növekedést észleltünk, az azt jelentette, hogy nincs abszolút növekedési faktor igény.

Szénforrás hasznosítása

35 0,1% sterilre szűrt kizárólagosan használt szénforrást tartalmazó PD táptalajt beoltunk, és a tenyészetet 14 napig inkubáljuk.

Savtermelés szénhidráttól

40 Hayward és Hodgkiss (1961) oxidációs-fermentációs táptalaját (O-F) 1% sterilre szűrt szénforrással egészítjük ki. A csöveket beoltjuk és 14 napig inkubáljuk.

A National Collection of Industrial Bacteria arra a következtetésre jutott, hogy az NCIB 11 883 a patogenitástól függően A. radiobacter vagy A. tumefaciens törzsnek tekinthető. Az izolátum atipikus, mivel nincs 3-ketolaktóz termelés.

50 A találmányt a továbbiakban példákkal világítjuk meg.

1. példa

Az NCIB 11 883 sarjadzó baktérium poliszacharid termelése

A poliszacharid termelés kimutatása az aktív szaporodási szakaszban történik.

Táptalaj-összetétel g/l

60 (A) (NH ₄) ₂ · SO ₄	0,75 g	
	KH ₂ · PO ₄	0,75 g
(B) MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4 g	
	FeSO ₄ 1 mol/l-es oldat	0,05 ml
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 ml
65	IPP nyomelem oldat	2,5 ml

(C) Glukóz	20 g	H ₃ BO ₃	0,06 mg/l
IPP nyomelem törzsoldat g/l		(NaH ₄) ₂ SO ₄	0,79 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,249 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,05 mg/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,223 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,287 g	5 CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,23 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,118 g	KI	0,16 mg/l
H ₃ BO ₃	0,030 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	14,0 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,124 g	Glukóz	25 g/l
KI	0,083 g		

Az A, B és C táptalajkomponenseket külön 10 sterilizzük és lehűlés után elegyítjük.

3,2 l fenti táptalajt tartalmazó Bioteic fermentort 10% NCIB 11 883 inokulummal oltunk be, melyet előzőleg pH 6,8-on, MOD-D₂ táptalajon rázott tenyészetben rotációs rázógépen 30 °C-on 24 órán át tenyésztettünk.

Az MOD-D₂ táptalaj összetétele (pH 6,8)

Vegyületkoncentráció l⁻¹

(glukóz a megjelölés szerint)

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g	20
Na ₂ HPO ₄	3,0 g	
KH ₂ PO ₄	3,0 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	
FeSO ₄	63,2 mg	20
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,33 mg	25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,36 mg	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,32 mg	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,30 mg	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,36 mg	
H ₃ BO ₃	0,20 mg	30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,60 mg	
Oxoid tisztított agar		
L28	15,0 g	

A fermentáció során a fermentor hőmérsékletét 30 °C-on, a pH-t 6,8 értéken tartjuk, 1000 rpm keverést biztosítunk két 6 lapátos Rushton-keverővel és folyamatos levegőztetést végzünk 1000 ml/perc levegőmennyiséggel. Extracelluláris poliszacharid termelés folyt az NCIB 11 883 törzs exponenciális szaporodása közben. Úgy tűnik, ez az organizmus két fázisban termel polimert; a szaporodás alatt és a szaporodás megszűnte után is.

A szaporodás megszűnése előtt 2,5 g/l (a táptalajra vonatkozóan) biopolimer keletkezett 2,5 g/l (táptalajra vonatkozó) sejtsűrűség mellett, 12 óra fermentálás alatt. A szaporodás megszűnése után a végső hozam 6,5 g/l 2,5 g mikroorganizmus/l sejtsűrűség mellett (táptalajra vonatkozóan) 45 óra teljes fermentációs idő alatt.

2. példa

NCIB 11 883 és Pseudomonas NCIB 11 592 törzsek heteropoliszacharid termelése kinetikájának összehasonlítása 30 °C-on és 37 °C-on végzett szakaszos fermentáció esetén a szaporodás megszűnése után.

Táptalaj		60
KH ₂ PO ₄	0,68 g/l	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,49 g/l	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,44 mg/l	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,57 mg/l	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,24 mg/l	65

A fenti táptalajt úgy állítottuk össze, hogy a nitrogénforrás 1,6 g/l körüli sejtsűrűség elérésékor kimerüljön. Ezért ha ezt a sejtsűrűséget elérjük, további szaporodás már nincs, de a polimertermelés tovább folytatódik.

15 Biotec fermentorban levő 2,5 l fenti táptalajt 60% NCIB 11 883 vagy Pseudomonas NCIB 11 592 inokulummal oltunk be, amelyeket 16 órán át 30 °C-on vagy 37 °C-on tenyésztettünk. A fermentort 600 fordulat/perc levegővel levegőztetjük és a keverő fordulatszámát 500 fordulat/perc állandó értéken tartjuk. A keverést két, egyenként 6 lapátos Rushton-keverővel végzzük.

Az NCIB 11 883 törzs alkalmazása esetén a fajlagos polimertermelési sebességet 30 °C-on 0,137 g/g, óra, 37 °C-on 0,13 g/g, óra értékűnek találtuk, míg a Pseudomonas NCIB 11 592 törzsnél 0,066 g/g, óra maximális fajlagos polimertermelési sebességet észleltünk. Ami még fontosabb — mint azt az előzőekben már említettük — a termelékenység a hígítási faktoriall kifejezett viszkozitásnövelő képességben megadva az NCIB 11 883 törzs alkalmazásakor lényegesen magasabb. Az 1. ábrán látható, hogy 1,6 g/l összehasonlító sejtsűrűség mellett a fermentálé 25-ös hígítási faktorú állapotának eléréséhez Pseudomonas 11 592 törzs alkalmazásakor 160 óra, NCIB 11 883 törzs 30 °C-on való tenyésztése esetén 80 óra, NCIB 11 883 törzs 37 °C-on való tenyésztése esetén 35 óra fermentációs idő szükséges.

A poliszacharid hozamot és a polimertermelés termelékenységét Pseudomonas NCIB 11 592 és NCIB 11 883 törzsek alkalmazása esetén az 1. táblázatban ismertetjük:

1. táblázat

Mikro- organizmus glukózon	Terme- lékeny- ség (g poli- mer/l, óra)	Terme- lékeny- ség (hígítási sebesség h ⁻¹)	Polimer- hozam g/g
Pseudomonas			
NCIB 11 592	0,064	0,156	0,43
NCIB 11 883, 30 °C	0,15	0,31	0,57
NCIB 11 883, 37 °C	0,14	0,71	0,52

A szakaszos tenyésztéssel 30 és 37 °C-on termelt extracelluláris poliszacharid jellemzőit a 2. táblázatban adjuk meg.

2. táblázat

	NCIB 11 883 30 °C, szakaszos tenyésztés	NCIB 11 883 37 °C, szakaszos tenyésztés
Sóoldat %*	15	15
Hőmérséklet °C	30	60
1 g/l konc.-jú oldat viszkozitása, (Pa.s) 7,5 s ⁻¹ -nál	6,1 · 10 ⁻²	5,1—10 ⁻²
1 g/l konc.-jú oldat viszkozitása, (Pa.s) 23 s ⁻¹ -nál	15,0 · 10 ⁻²	14,5 · 10 ⁻²
Hígítási faktor (2,10 ⁻² Pa.s)	26,5	18,5
	55	43

* 15% NaCl + 1,5% CaCl₂

A pseudomonas NCIB 11 592 törzssel 30 °C-on, szakaszos tenyésztéssel nyert polimer jellemzőit a 3. táblázatban ismertetjük.

3. táblázat

Sóoldat %	15	15
Hőmérséklet °C	30	60
1 g/l konc.-jú oldat viszkozitása (Pa.s) 7,5s ⁻¹ -nál	7,9 · 10 ⁻²	5,5 · 10 ⁻²
23 s ⁻¹ -nál	4,1 · 10 ⁻²	3,2 · 10 ⁻²
Hígítási faktor (2,10 ⁻² Pa.s)	24,5	17,5

3. példa

*Poliszacharid termelés exponenciális
utántáplálásos tenyésztéssel*

A táptalajt úgy állítjuk össze, hogy 1,2 g/l NCIB 11 883 sejtömeg létrehozására legyen elegendő. Ennek az értéknek eléréséig a mikroorganizmus maximális sebességgel szaporodik (0,31 óra⁻¹). A szaporodást ezt követően az exponenciálisan betáplált ammónium-szulfáttal szabályozzuk, úgy, hogy a mikroorganizmus szaporodási sebessége az előre meghatározott értéknek megfelelő legyen. A táp exponenciális betáplálást komputerrel szabályozzuk.

Táptalaj g/l	
(A) (NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g
(B) MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4 g
FeSO ₄ · 1 mol/l	0,05 ml

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,012 g
IPP nyomelem oldat	2,5 ml
(C) Glukóz	20 g

- 5 Az A, B és C táptalajkomponenseket autoklávban külön-külön sterilizzük, majd lehülés után elegyítjük. Biotec fermentorban 2,5 l fenti táptalajt 10% NCIB 11 883 inokulummal beoltunk, az inokulumot MOD-D2 táptalajon 30 °C-on, pH 6,8-on, 24 órás rázott tenyészetben készítjük. A szaporodás exponenciálisan, maximális szaporodási sebességgel folyik körülbelül 1,2 g/l száraz sejtömeg eléréséig. A fermentorban az ammóniaszintet ellenőrizzük, és az ammónium-szulfát exponenciális betáplálását 20 ppm alatti szintnél megkezdjük. A betáplálás sebességét úgy szabályozzuk, hogy az exponenciális szaporodási sebesség 0,064 óra⁻¹ értékű legyen.
- 10 A fermentálé 10 g/l extracelluláris poliszacharid tartalmának eléréséhez körülbelül 28 óra fermentációs idő szükséges. A fajlagos polimertermelési sebesség 0,12 g/g, óra. Az átlagos termelékenység 0,35 g poliszacharid/l.
- 15
- 20
- 25

4. példa

*Folyamatos poliszacharid termelés
NCIB 11 883 törzssel*

- 30 A táptalaj azonos az 1. példában megadottal. Szaporodási körülmények:
Az NCIB 11 883 törzset nitrogén korlátozással 3,1 l hasznos térfogatú Biotec fermentorban tenyésztjük. A hőmérsékletet 30 °C-on tartjuk, a pH-t 2 n nátrium-hidroxid és 2 n kálium-hidroxid adagolásával 6,8 értéken tartjuk. A fermentorba 1 l/perc mennyiségű levegőt engedünk és 2 db 6—6 lapátos Rushton-keverővel 1000 fordulát/perc fordulatszámmal keverjük. A mikroorganizmust különböző szaporodási sebességekkel tenyésztjük, és megfigyeljük a polimerképződés kinetikáját.
- 35 A Pseudomonas 11 592 és az NCIB 11 883 törzsek poliszacharid termelésének sebességét a 2. ábrán hasonlítjuk össze. Az NCIB 11 883 törzs fajlagos poliszacharid termelési sebessége 2—3-szor nagyobb, mint a Pseudomonas 11 592 törzse. Ezen túlmenően — mint az a 4. táblázatban látható — az NCIB 11 883 törzs 1 g elfogyasztott glukózra, illetőleg elfogyasztott oxigénre vonatkoztatott poliszacharid termelése is jelentősen magasabb, mint a Pseudomonas 11 592 törzse.
- 40 A 4. táblázatban korlátozott nitrogénforrás mellett, egyensúlyi állandósult állapotban fennálló, a glukózra, illetve oxigénre vonatkoztatott poliszacharid hozam, sejtömeg és szén-anyagcsere adatokat összegezzük.
- 45
- 50

4. táblázat

A poliszacharid termelés hozamának és sebességének összegzése a nitrogénben korlátozott NCIB 11 883 tenyészet szaporodási sebességének függvényében.
A tenyésztés hőmérséklete 30 °C, pH 6,8

Hígítási sebesség (D) (h ⁻¹)	0,034	0,047	0,080	0,137
Glukózra vonatkoztatott poliszacharid hozam (g száraz tömeg/g glukóz)	0,519	0,60	0,55	0,287
Glukózra vonatkoztatott sejttömeg (g száraz tömeg/g glukóz)	0,068	0,096	0,12	0,18
Oxigénre vonatkoztatott polimer hozam (g száraz tömeg/g O ₂)	1,6	3,2	2,19	1,6
Oxigénre vonatkoztatott sejttömeg (g száraz tömeg/g O ₂)	0,22	0,53	0,68	0,95
Glukóz fogyasztás sebessége (g/g száraz tömeg, óra)	0,35	0,49	0,62	0,76
Polimer képződés sebessége (g/g nyers fehérje, óra)	0,205	0,30	0,24	0,21
Szén visszanyerése				
Bevitel	100	100	100	100
Sejtek széntartalma	8,8	10,5	14,02	19,7
Polimer széntartalma	48,7	62,4	44,0	33,5
Egyéb oldható szén	31,6	7,35	22,9	33
CO ₂ -ban levő szén	18,8	17,0	15,75	16,78
Visszanyerés	—	97,25	96,6	—
Polimer konc. — direkt száraz tömeg	9,17	9,84 (9,41)	4,77	2,58
IPA*-val kicsapott száraz tömeg	8,52	9,41	5,37	2,50

* IPA = izopropil-alkohol.

A korlátozott nitrogéntartalom mellett folyamatos tenyésztésben a Pseudomonas NCIB 11 592 és az NCIB 11 883 törzssel nyert maximális po-

liszacharid hozamokat és poliszacharid termelési sebességeket az 5. táblázatban összegezzük.

5. táblázat

A Pseudomonas NCIB 11 592 és az NCIB 11 883 törzsek folyamatos tenyésztésben, 30 °C-on, pH 6,8 paraméterek mellett kapott po-

liszacharid hozamának és poliszacharid termelési sebességének összehasonlítása.

Paraméter	Egység	Maximumérték			
		NCIB 11 592		NCIB 11 883	
		D (óra ⁻¹)-nál	D (óra ⁻¹)-nál	D (óra ⁻¹)-nál	D (óra ⁻¹)-nál
A termelés fajlagos sebessége	[g/g száraz tömeg, óra]	0,09	0,04	0,30	0,047
Térfogategységre jutó polimer termelés	[g/l, óra]	0,13	0,03	0,46	0,047
Glukózra jutó polimer hozam	[g/g glukóz]	0,4	0,02	0,60	0,047
Oxigénre jutó polimer hozam	[g/g O ₂]	0,92	0,03	3,2	0,047
Polimer : sejt arány	[g/g száraz baktérium-tömeg]	5,0	0,017	6,3	0,047
	[g/g sejtfehérje]	3,2	0,020	12,8	0,047

Az NCIB 11 883 törzs D = 0,034 óra⁻¹, 30 °C, pH = 6,8 paraméterek mellett végzett folyama-

tos tenyésztésével nyert poliszacharid jellemzőit a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

Sóoldat (%)	15	15	3	3	0
Hőmérséklet (°C)	30	60	30	60	30
1 g/l-es oldat viszkozitása (Pa.s) 7,5 s ⁻¹ -nál	11,0·10 ⁻²	9,6·10 ⁻²	9,0—10 ⁻²	7,0—10 ⁻²	8,4·10 ⁻²
1 g/l-es oldat viszkozitása (Pa.s) 23 s ⁻¹ -nál	5,0·10 ⁻²	4,5·10 ⁻²	4,2·10 ⁻²	3,5·10 ⁻²	3,8·10 ⁻²
Hígítási faktor (2,10 ⁻² Pa.s) 7,5 s ⁻¹ -nál	16,5	4,9	5,5	3,9	5,6
Hígítási faktor [P] ^{dw} (R faktor)	2,83	2,13	2,39	1,70	2,43
Szűrés 5 μM + PF*	16,5	14,2	11,4	11,6	7,5
Szekvencia 1,2 μM	37,5	39	20,7	17,5	15,5
Idő 200 ml-re 0,8 μM	39,0	42,5	40	58,1	15,2

* Előszűrés.

A folyamatos tenyésztéssel, NCIB 11 883 törzssel (D = 0,05 h⁻¹, 37 °C, pH 6,8) nyert po-

liszacharid jellemzőit a 7. táblázatban ismertetjük.

7. táblázat

Sóoldat (%)	0	3	15	
Hőmérséklet (°C)	30	30	30	
1 g/l oldat viszkozitása (Pa. s) 7,5 s ⁻¹ -nál	135	138	130	30
1 g/l oldat viszkozitása (Pa. s) 23 s ⁻¹ -nál	56	58	54	

A 11 883 törzssel termelt poliszacharid kémiai elemzésének eredményeit a 8. táblázatban ismertetjük.

8. táblázat

Glukóz : Galaktóz	5:1—10:1	
Piroszölősav %	1,9— 5,5	40
Borosztánkósav %	2,4—10,1	

Egyéb azonosítatlan savak is vannak jelen, acetátot nyomokban kimutattunk.

25

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

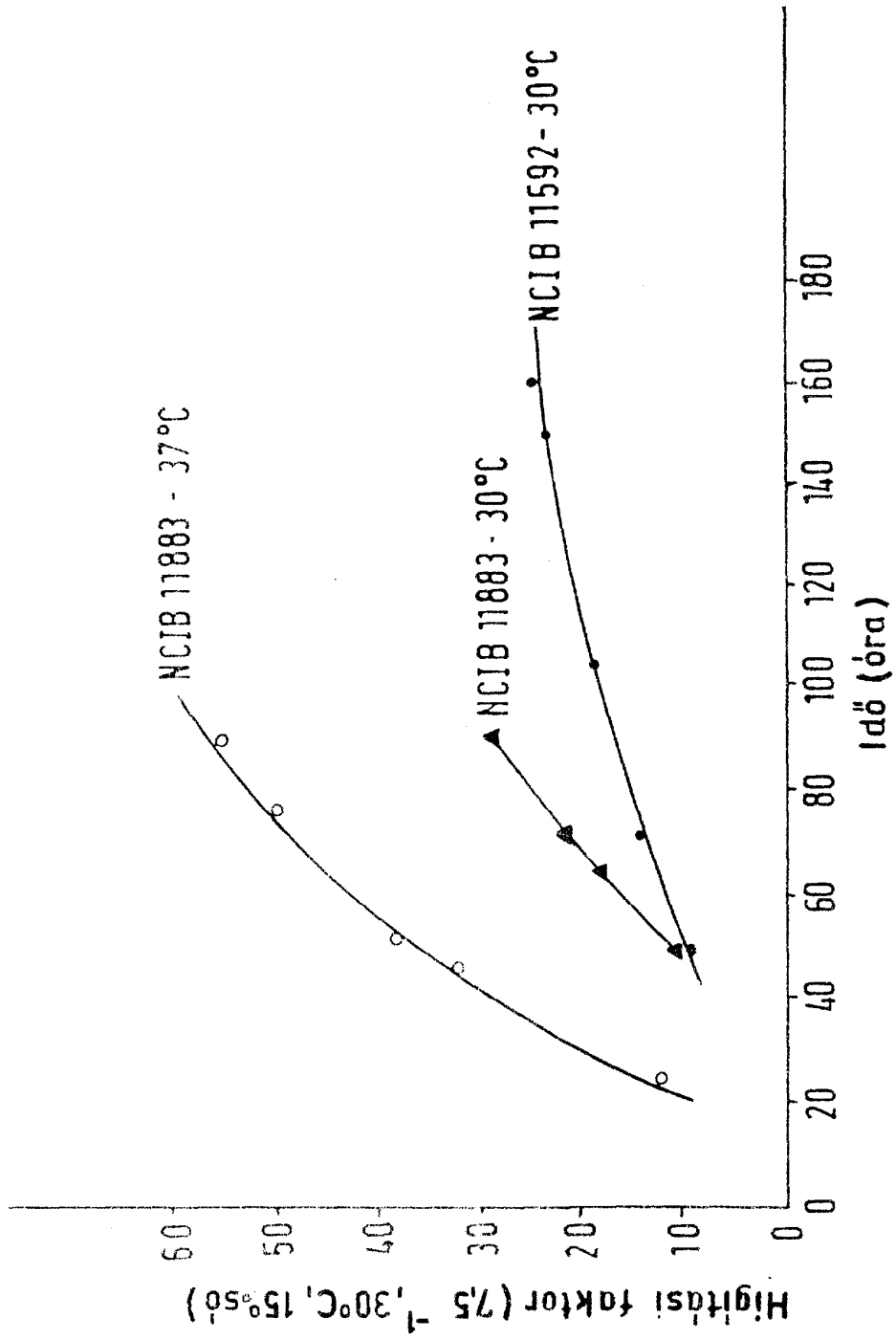
1. Eljárás heteropoliszacharidok előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy NCIB 11 883 törzset tenyésztünk asszimilálható szénhidrátot és nitrogénforrást tartalmazó vizes táptalajon, előnyösen 0,635—0,8 g asszimilálható nitrogén/100 g szénhidrát-tartalmú táptalajon, levegőztetett tenyészetben, és a kapott heteropoliszacharidot ismert módon kinyerjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy folyamatos vagy után-táplálásos tenyésztést végzünk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy nitrogénforrásként nátrium-glutamátot, ammónium-szulfátot vagy nátrium-nitrátot alkalmazunk.

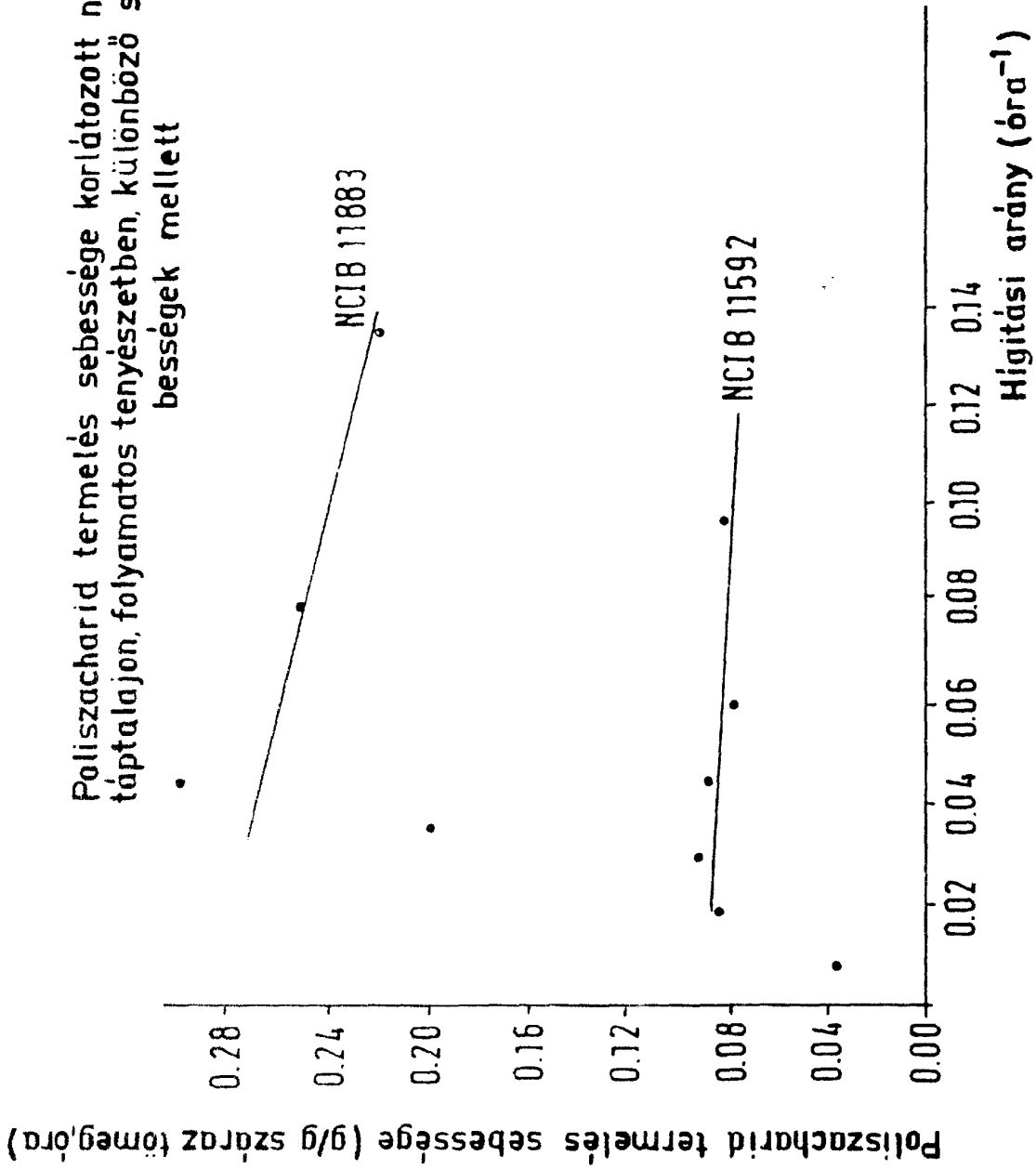
2 db ábra

Hígítási faktor az inkubációs idő függvényében



1. ábra

Poliszacharid termelés sebessége korlátozott nitrogéntartalmú táptalajon, folyamatos tenyésztésben, különböző szaporodási sebességek mellett



2. ábra