

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 821817 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 821817

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 21.05.1982

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 21.05.1982

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 23.11.1982

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

22.05.1981 GB 8115855

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Kelco Biospecialties, Limited, 22 Henrietta Street, London United Kingdom, TOWN UNKNOWN, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Jarman, Trevor Rodney, TOWN UNKNOWN, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Ksantaanikumin tuotannossa käytettävä inokulaatiomenetelmä.

Med produktion av xantangummi användbart inoculationsförfarande.

Ksantaanikumin tuotannossa käytettävä inokulaatiomenetelmä

Tämä keksintö koskee ksantaanikumin tuotantoa.

Ksantaanikumi on monien Xanthamonas-suvun lajien
5 tuottama polysakkaridi. Kumilla on kiinnostavia reologisia
ominaisuuksia ja sitä käytetään erityisesti sakeutusaineena
öljynporauksessa ja elintarvikkeissa.

Ksantaanikumini teollinen tuotanto tapahtuu tavallisesti käyttäen panosprosessia, jossa polysakkaridia tuottavaa Xanthomonas-kannasta istutetaan viljelmä fermentaatioastias-
10 ssa olevaan ravintoaineeseen ja annetaan sen käydä useita päiviä. Sen jälkeen kumi tavallisesti eristetään käyneestä lihaliemestä lisäämällä orgaanista liuotinta kumi-
10 niin saostamiseksi.

15 Panostuotannon vaihtoehtona on jatkuva tuotanto, jossa bakteerin istutuksen ja alkukasvun jälkeen lisätään fermentaatioastiaan jatkuvasti tuoretta ravintoainetta ja vastaava määrä käynyttä lihalientä otetaan jatkuvasti pois. Jatkuvan ksantaanikumin tuotannon edut, erityisesti tasai-
20 nen tuotanto, valvonnan helppous ja pienempi fermentaatio-astia, on tunnustettu monta vuotta. Monenlaisista syistä, erityisesti laajamittaisemman tuottavan käymisen ylläpitämiseen liittyvistä käytännön vaikeuksista, johtuen panos-
tuotanto on kuitenkin enemmän käytetty.

25 Olenmaisena osana ksantaanikumin tuotantomenetelmäs-
sä on inokulaatiovaihe, jossa tuottavan kannan viljelmä
lisätään ravintoväliaineeseen esivaiheena tuottavan fermenta-
tion alkamiselle. Tuotantoon käytettävän ravintoväli-
aineen tilavuus on tyypillisesti tilavuudeltaan 10-20-ker-
30 tainen inokulaatin tilavuuteen nähden, mikä vastaa laimen-
nusta 10-5 %. Suurempia laimennuksia vältetään, koska on
olemassa suuri mahdollisuus, ettei inokulaatiokanta jatka
aktiivista kasvua tuotantoväliaineessa.

Odottamattomasti, osana menetelmäkeksinnöstä, jota
35 kuvataan tähän liittyvässä, saman päivänä jätetyssä GB-ha-
kemusjulkaisussamme nro 81 115 856, otsikkona "Menetelmä

ksantaanikumin tuottamiseksi", olemme havainneet, että tiettyissä olosuhteissa on järkevää käyttää laimennuksia, jotka ovat alle 1 %.

Keksintö sisältää menetelmän tuotantoväliaineen inokuloimiseksi polysakkaridia tuottavalla Xanthamonas-kannalla, jota käytetään myöhempään viljelyyn polysakkaridin, ksantaanikumin, tuottamiseksi, tunnettu siitä, että inokulaatti sekoitetaan laimennussuhteessa 0,5 % tai vähemmän tuotantoväliaineeseen, joka sisältää rautaa, mangaania, sinkkiä, kobolttia, kuparia ja booria valvottuina pieninä pitoisuuksina.

Olemme havainneet, että inokulaatteja voidaan menestyksellisesti käyttää tuotantoväliaineen inokulointiin suhteessa 1 tilavuusosa inokulaattia 200 tilavuusosaa tuotantoväliainetta kohden sillä edellytyksellä, että tuotantoväliaine sisältää pieniä määriä hivenaineita. Sitoutumatta mihinkään teoriaan on ilmeistä, että suuremmat mainittujen hivenaineiden pitoisuudet vaikuttavat inhiboivasti suurissa inokulaatiolaimennuksissa.

Tarkemmin ilmaistuna, inokulaattia käytetään keksinnön mukaisesti yhdessä tuotantoväliaineen kanssa, joka sisältää kaikkiaan korkeintaan 10 ppm rautaa, korkeintaan 3 ppm mangaania ja korkeintaan 3 ppm sinkkiä (tässä määrittelyssä ppm tarkoittaa painoyksikköä alkuainetta miljoonaa tilavuusyksikköä kohden väliainetta).

Tilavuussuhde inokulaatti:tuotantoväliaine on edullisesti 1:500 - 1:10 000, edullisemmin 1:1 000 - 1:5 000. Tällaisia tilavuussuhteita käyttäen on mahdollisuus huomattavan suureen säästöön tuotantolaitoksen suhteen ja samanaikaiseen inokulaatin tuotannon vähenemiseen.

Otetaan esimerkiksi laitos, jossa pääfermentorin nestetilavuus on 10 m^3 . Kun lähdetään viljelmästä, jonka tilavuus on yksi litra ja oletetaan, että käytetään tavantomaista 10 % laimennusta kussakin vaiheessa, on välttämätöntä käydä läpi sarja:

$$1 \text{ l} \rightarrow 10 \text{ l} \rightarrow 100 \text{ l} \rightarrow 1 \text{ m}^3 \rightarrow 10 \text{ m}^3$$

Sitä vastoin keksinnön mukaisesti voidaan käyttää yhtä litraa 10 % laimennuksena, jolloin saadaan 10 l inokulaattia, joka 0,1 % laimennuksena tekee mahdolliseksi inokuloida 10 m³ tuotantoväliainetta pääfermentorissa.

5 Siten, tarkasteltavassa esimerkissä, astiat, jotka tavallisesti tarvitaan 100 l:n ja 1 m³:n vaiheisiin, voidaan nyt jättää pois. Pääomakustannusten säästön lisäksi on myös olemassa pienempi kontaminaatiovaara, koska siirto- ja on vähemmän ja myös työmäärä vähenee yleensä.

10 On huomattava, että keksinnön mukaista inokulaatiomenetelmää käytettäessä kasvatusaika on tavallisesti aiempaa pitempi. Tarvitaan useita tunteja ennen kuin bakteerit, joiden pitoisuus on tietty 1 tilavuusosassa inokulaattia, kasvavat samaan pitoisuuteen tuotantoväliaineessa, jota on
15 200 tilavuusosaa tai enemmän. Tyypillinen kasvatusaika on 10-100 tuntia. Tämä keksintö soveltuu tästä syystä parhaiten jatkuvaan fermentaatioprosessiin.

Kasvatusajan minimoimiseksi voidaan käyttää erilaisia keinoja. Erityisen edullinen keino on käyttää pääosin
20 samanlaista väliainetta ainakin inokulaatin valmistuksen viimeisessä vaiheessa kuin mitä käytetään tuotantoväliaineena. Siten, esimerkiksi yllä olevassa esimerkissä, jossa on inokuloitava 10 m³ väliainetta, tulisi lisätä yksi litra alkuviljelmää yhdeksään litraan tuotantoväliainetta, jolloin
25 saadaan 10 litraa inokulaattia, joka on kasvatettu samassa väliaineessa. Tällä keinolla saadaan esisopeutettu bakteeri kasvamaan tuotantoväliaineessa.

Toinen edullinen keino on tehdä inokulointi silloin, kun bakteeri kasvaa aktiivisesti eikä ole lepotilassa. On
30 myös edullista minimoida kasvatusaika valvomalla hapen saantia; ilmastus ja sekoitusolosuhteet säädetään edullisesti siten, että liuenneen hapen pitoisuus inokuloidussa tuotantoväliaineessa pidetään rajoittavan happipitoisuuden yläpuolella ja myrkyllisen happipitoisuuden alapuolella.

35 On myös edullista minimoida kasvatusajat käyttämällä väliainetta, joka sisältää lisäksi hivenaineita ja apuaineita valvottuina pitoisuuksina.

Tuotantoväliaine sisältää assimiloitavia hiili- ja typpilähteitä. Glukoosi ja ammoniumfosfaatti, vastaavasti, ovat soveltuvia näiden alkuaineiden lähteitä, mutta näitä käytetään edullisesti yhdessä apuaineen kanssa, joka on monimutkainen luonnosta saatava seos, joka sisältää orgaanisia typpiyhdisteitä. Erityisesti tulisi lisätä hiivauutetta 0-5 g/l, soveltuvasti 0-1 g/l. Hiivauutteen tai samantapaisten apuaineiden on havaittu auttavan kasvatusaikojen minimoinnissa, erityisesti "stressi"olosuhteissa, jotka syntyvät käytettäessä keksinnön mukaista laimennusta.

On lisäksi edullista, että tuotantoväliaine sisältää valvottuja, pieniä kokonaispitoisuuksia kuparia, kobolttia ja booria. Kuparia, kobolttia ja booria on kutakin edullisesti korkeintaan 2 ppm, vielä edullisemmin korkeintaan 1 ppm.

Siten tuotantoväliaine sisältää edullisesti seuraavat hivenaineiden kokonaispitoisuudet, jotka on annettu taulukossa 1:

Taulukko 1

20	Hivenaine	Edullinen pitoisuus	Edullisin pitoisuus
		(ppm)	(ppm)
	Fe	0,1 - 10	0,5 - 5
	Mn	0,01 - 3	0,1 - 1
	Zn	0,01 - 3	0,1 - 0,5
25	Cu	0,001 - 2	0,01 - 0,1
	Co	0,001 - 2	0,01 - 0,1
	B	0 - 2	0,005 - 0,05

Yleisemmin, tässä keksinnössä käytetään rautaa suurempina pitoisuuksina kuin mangaania, rauta:mangaani-suhteen ollessa edullisesti 40:1 - 2:1.

Valmistettaessa keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävää fermentaatioväliainetta eri hivenaineet lisätään edullisesti vesiliukoisina yhdisteinä, erityisesti epäorgaanisina suoloina, kuten rauta $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:na tai $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:na; mangaani $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:na tai $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:na; sinkki $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:na; kupari $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:na tai $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$:na; koboltti $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:na tai $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:na; ja boori H_3BO_3 :na.

Lisättäessä hivenaineita on otettava tarpeen vaatimalla tavalla huomioon muissa komponenteissa olevat määrät. On erittäin edullista käyttää demineralisoitua vettä, joka on valmistettu esimerkiksi johtamalla vesijohtovettä ioninvaihtimen läpi. Samoin on erityisen edullista analysoida
5 väliaine, kun se on tehty, jotta varmistettaisiin, ettei valvottuja pieniä hivenainapitoisuuksia ole ylitetty.

Yleensä tuotantoväliaineessa on mukana muita alkuaineita, erityisesti kaliumia, fosforia ja rikkiä. Näitä alkuaineita voidaan lisätä tavanomaiset määrät, sillä on ilmeistä, ettei mitään etua ole saavutettavissa pitoisuuksia muuttamalla. Väliaineen pH on edullisesti 6-8, ja kasvatus-
10 lämpötila on edullisesti 29-32°C.

Keksintö soveltuu mille tahansa polysakkaridia tuotavalle Xanthomonas-kannalle, mutta edullisesti käytetään X.campestris-kantaa.
15

Kun bakteerin kasvu on edennyt halutulle tasolle käytetyssä väliainetilavuudessa, voidaan aloittaa tuotantofermentaatio. Jatkuvassa prosessissa lisätään jatkuvasti
20 uutta väliainetta ja käynyttä lihalientä poistetaan jatkuvasti. Laimennusnopeus on edullisesti 0,01 - 0,12 h⁻¹.

Fermentoitu lihaliemi voidaan vielä puhdistaa haluttaessa, jolloin saadaan kiinteä ksantaanikumituote. Edullisessa menetelmässä lihalientä kuumennetaan 100-
25 140°C:ssa 1-10 minuuttia, edullisemmin 125-130°C:ssa 1-5 minuuttia ja sekoitetaan sitten IPA:n kanssa, joka aiheuttaa kumin saostumisen, minkä jälkeen kumi voidaan erottaa suodattamalla tai muulla tavoin.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä:

30 Esimerkit 1-4

Pienimittakaavaiset fermentaatiot

X.campestris-kantoja (ATCC 13951 -johdannaisia) pidettiin TGY-agar-vinopinnoilla korkeintaan 14 vrk. TGY-väliaineen koostumus on annettu taulukossa 2:

Taulukko 2

	tryptoni	5 gl ⁻¹
	glukoosi	2 gl ⁻¹
	hiivauute	5 gl ⁻¹
5	agar	20 gl ⁻¹

Esimerkkien 1 ja 3 fermentori-inokulaatit valmistettiin suspendoimalla TGY-vinopinnalla kasvavaa viljelmää Ringers-liuoksiin (10 ml, väkevyys 1/4) ja käyttäen 2 ml inokuloitaessa 100 ml MYGP:a 500 ml:n ravistettavissa pulloissa.

10 MYGP-väliaineen koostumus on annettu taulukossa 3:

Taulukko 3

	mallasuute	3 gl ⁻¹
	hiivauute	3 gl ⁻¹
	peptoni	5 gl ⁻¹
15	glukoosi	10 gl ⁻¹

Kun oli inkuboitu 24 tuntia 30°C:ssa ravistimessa, MYGP-lihaliemi käytettiin inokulointiin. Esimerkeissä 2 ja 4 käytettiin inokulaattina jatkuvasta viljelmästä otettua näytettä. Jatkuva viljelmä oli käynnistetty esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, paitsi että käytettiin inokulaatin pitoisuutta 10 %.

Jokaisessa esimerkissä 1-4 kahden litran Xanthomonas-fermantaatiot aloitettiin käyttäen inokulaatin määriä 0,1 tai 0,01 % inokuloitaessa väliaineet, joiden koostumukset on annettu taulukossa 4, jota tulee lukea yhdessä taulukon 5 kanssa.

Taulukko 4

Fermentoriviljelmien väliainekoostus

		Esimerkit 1-4	Esimerkki 5
	Dexyme 081 glukosisiirappi	60 gl^{-1}	53 gl^{-1}
5	Sitruunahappo	1 gl^{-1}	1,0 gl^{-1}
	Etikkahappo	0,45 ml	-
	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,05 gl^{-1}	0,05 gl^{-1}
	$\text{Mg}(\text{OH})_2$	0,0775 gl^{-1}	0,07 gl^{-1}
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,058 gl^{-1}	0,086 gl^{-1}
10	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3,0 gl^{-1}	2,38 gl^{-1}
	K_2HPO_4	1,0 gl^{-1}	1,0 gl^{-1}
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,83 mg l^{-1}	0,83 mg l^{-1}
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,42 mg l^{-1}	0,71 mg l^{-1}
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg l^{-1}	0,25 mg l^{-1}
15	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,28 mg l^{-1}	0,28 mg l^{-1}
	H_3BO_4	0,06 mg l^{-1}	0,06 mg l^{-1}
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	35,6 mg l^{-1}	35,6 mg l^{-1}
	Hiivauute	0 tai 0,2 gl^{-1}	0,2 gl^{-1}
	Deionisoitu vesi	1 000 ml:ksi	1 000 ml:ksi
20			

Glukosisiirappi valittiin puhtautensa perusteella, Dexyme 081 sisältää vähän hivenaineita. Ppm:inä ilmoitettuna siirappi sisälsi seuraavat pitoisuudet: Zn alle 0,01; Cu alle 0,2; Mn alle 0,04; Co alle 0,08; rauta alle 0,18.

25 Hiivauute oli suolapitoisuudeltaan erityisen pieni hiivauute ja sisälsi ppm:inä: Zn, 60; Cu, 10; Mn, 15; Co, alle 5; Fe, 100.

Muut reagenssit olivat analyyttistä laatua.

Taulukko 5

Esim. nro	Inokulaatin valmistus	Inokulaatti-	Hiivauute
		pitoisuus (% v/v)	
5	1 Ravistettava pullo; MYGP	0,1	Ei
	2 Jatkuva viljelmä; Tuotannon väliaine	0,1	On
	3 Ravistettava pullo; MYGP	0,1	Ei
	4 Jatkuva viljelmä; Tuotannon väliaine	0,01	Ei
10	E ₅₄₀ -arvon 3,0 saavuttamiseen kuluva aika (h)		
	86		
	50		
	90		
15	106		

Kutakin viljelmää seurattiin panosvaiheen aikana mittaamalla säännöllisesti solupitoisuus sameusmittauksia käyttäen /adsorptio aallonpituudella 540 nm (E₅₄₀)/ ja mittaamalla liuenneen hapen pitoisuus (DOT). Rajoittavien happipitoisuuksien ja happimyrkytyksen välttämiseksi, ilman virtaus ja sekoitusnopeus säädettiin pitämään DOT alueella 15-45 % kyllästyspitoisuudesta. Viljelmille, joiden inokulaattipitoisuus oli 0,1 %, tämä merkitsei alkuilmavirtausta 1,0 l min⁻¹ ja sekoitusnopeutta 50 rpm. Viljelmää, jonka inokulaattipitoisuus oli 0,01 % ei tarvinnut sekoittaa ensimmäisten 85 tunnin aikana, ilmavirtauksen 1,0 litraa min⁻¹ aiheuttama sekoitus ja hapen siirto oli riittävä. Ilman virtausnopeus nostettiin myöhemmin arvoon 2,0 l min⁻¹ ja sekoitusnopeutta lisättiin, kun DOT laski alle 15 %:n. Muut fermentointiolosuhteet olivat: lämpötila 30 ± 0,05°C, pH 7,0 ± 0,1 ja kaasuton työskentelytilavuus kaksi litraa.

Kussakin esimerkissä 1-4 inokulointi onnistui ja jatkuva fermentaatio ksantaanikumin tuottamiseksi oli mahdollista. Viljelmät erosivat toisistaan siinä, miten pitkä aika kului saavutettaessa haluttu biomassapitoisuus ennen

kuin vaihto panosvaiheesta jatkuvaan tuotantoon oli järkevää, kuten ilmenee taulukosta 5, jossa on annettu aika, joka kuluu saavuttamaan E_{540} -arvo 3,0, mikä vastaa kuivasolumassaa noin 2 g/l.

5 Esimerkki 5

Pilot plant -mittakaavainen fermentaatio

Inokulaatti valmistettiin 20 l:n astiassa, joka sisälsi taulukon 4 mukaista väliainetta. Väliaine inokuloitiin 100 ml:lla MYGP-lihalientä, joka oli otettu ravistettavasta pullosta, jota oli inkuboitu 30°C:ssa 48 tunnin ajan siitä, kun viljelmä oli siirrostettu THY-vinopinnalta. Fermentaation alkuolosuhteet olivat: lämpötila $30 \pm 0,05^\circ\text{C}$; Ph $7,0 \pm 0,1$; ilmavirtaus $2,0 \text{ l min}^{-1}$; sekoitusnopeus 50 rpm. Kun DOT aleni, ilmastusnopeus nostettiin arvoon $4,0 \text{ l min}^{-1}$ ja sekoitusnopeutta nostettiin asteittain 350 rpm:ksi, jotta DOT pysyisi alueella 10-50 % kyllästyspitoisuudesta. Viljelmä oli valmis käytettäväksi 1 000 l:n viljelmän inokulointiin 58 tunnin kuluttua, jolloin E_{540} oli 2,3.

Inokulaattia lisättiin 0,1 % 1 000 l:aan samaa väliainetta.

Alkuolosuhteet olivat: lämpötila $31 \pm 1^\circ\text{C}$; pH 6,8 $\pm 0,1$; sekoitusnopeus 35 rpm; työskentelytilavuus 980 l; yli-paine 27 kPa. 21 tunnin kuluttua ilmastus- ja sekoitusnopeus säädettiin pitämään DOT arvossa noin 30 %.

Kun DOT laski, sekoitusnopeutta suurennettiin asteittain suurimpaan arvoonsa 280 rpm ja ilmastusnopeus ja yli-paine nostettiin maksimiarvoonsa $1\,080 \text{ l min}^{-1}$ ja 100 kPa siten, että DOT pysyi arvossa 40-60 % kyllästysarvosta alkuperäisissä käyttöolosuhteissa. Menetelmällä päästiin solujen kahdentumisaikaan viisi tuntia. Tuotteen pitoisuus saavutti 24 g l^{-1} 46 tunnissa inokuloinnin jälkeen, jolloin lihaliemen viskositeetti oli noin 26 000 cps. Jatku-
kuvassa tuotannossa käytettävä keskimääräinen sisäänvirtaus aloitettiin sitten, mikä johti jatkuvaan ksantaanikumiliha-
liemen tuotantoon.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä ksantaanikumin tuottamiseksi fermentoimalla aerobisesti ravintoväliainetta, t u n n e t t u
 5 siitä, että ravintoväliaineen inokulointi tehdään käyttäen laimennusta 0,5 - 0,01 % inokulaatista, joka sisältää Xanthomonas-suvun orgaania ja siitä, että raudan, mangaanin ja sinkin kokonaispitoisuudet mainitussa ravintoväliaineessa on rajoitettu niin, että siinä on korkeintaan
 10 10 ppm rautaa, korkeintaan 3 ppm sinkkiä ja ppm-suhde rauta:mangaani on 40:1 - 2:1.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että organismilla on X.campestris-lajin, edullisesti kannan ATCC 13951, tunnistettavat ominaisuudet ja siitä, että laimennussuhde on 0,1 - 0,2 %.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että inokulaatin koostumus on olennaisilta osiltaan samanlainen kuin ravintoväliaineen koostumus.

20 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että inokulointi tehdään silloin, kun organismi kasvaa aktiivisesti.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ravintoväliaine sisältää lisäksi monimutkaisen luonnosta peräisin olevan seoksen orgaanisia typpilähteitä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ravintoväliaine sisältää korkeintaan 2 ppm kuparia, kobolttia tai booria.

30 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ravintoväliaine sisältää:

	ppm
rautaa	0,1 - 10
mangaania	0,01 - 3
35 sinkkiä	0,01 - 3
kuparia	0,001 - 2
kobolttia	0,001 - 2
booria	0 - 2

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että ravintoväliaine sisältää:

		ppm
	rautaa	0,5 - 5
5	mangaania	0,1 - 1
	sinkkiä	0,1 - 0,5
	kuparia	0,01 - 0,1
	kobolttia	0,01 - 0,1
	booria	0,005 - 0,05

10 9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että käytetään jatkuvaa proses-
sia laimennusnopeudella $0,01 - 0,12 \text{ h}^{-1}$.

15 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisävaiheen, jos-
sa fermentoitua väliainetta käsitellään $100-140^{\circ}\text{C}$:ssa 1-10
minuuttia ennen ksantaanikumin erottamista.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av xantangummi genom aerobisk fermentering av ett näringsmedium,
5 k ä n n e t e c k n a t därav, att inockuleringen av näringsmediet utförs i en utspädning av 0,5-0,01 % under användande av ett ympmedel i form av en organism av släktet Xanthomonas, varvid totala nivåerna järn, mangan och zink i näringsmediet begränsas så
10 att det innehåller högst 10 ppm järn, högst 3 ppm zink och att ppm-förhållandet järn:mangan är 4:1 - 2:1.
 2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att organismen har identifieringskarakteristiken för X. campestris, företrädesvis stammen
15 ATCC 13951, och att utspädningen är 0,1-0,2 %.
 3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att sammansättningen av ympmedlet är väsentligen samma som sammansättningen av näringsmediet.
 - 20 4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att inockuleringen sker medan organismen växer aktivt.
 5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att näringsmediet ytterligare
25 omfattar en komplex naturellt deriverad blandning av organiska kväveföreningar.
 6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att näringsmediet omfattar högst 2 ppm koppar, kobolt eller bor.
 - 30 7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att näringsmediet omfattar

		ppm	
	järn	0,1	- 10
	mangan	0,01	- 3
	zink	0,01	- 3
5	koppar	0,001	- 2
	kobolt	0,001	- 2
	bor	0,001	- 2

8. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att näringsmediet omfattar

10		ppm	
	järn	0,5	- 5
	mangan	0,1	- 1
	zink	0,1	- 0,5
	koppar	0,01	- 0,1
15	kobolt	0,01	- 0,1
	bor	0,005	- 0,05

9. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det är ett kontinuerligt
förfarande med en utspädningsgrad av $0,01 - 0,12 \text{ h}^{-1}$.

20 10. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det omfattar ett ytterligare
steg för behandling av det fermenterade mediet vid $100 - 140^{\circ}\text{C}$ under 1-10 minuter före utvinningen av xantangummit.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökninga

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US 3594280 (C12 d 13/00)

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksaal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

12/8-86 E. Lörin

Allekirjoitus