



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 147 551

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

			Int. Cl. ³
(11)	147 551	(44)	08.04.81
(21)	AP C 12 K / 217 203	(22)	28.11.79
(31)	964 951	(32)	30.11.78
	80 195		09.10.79
		(33)	US

(71) siehe (73)
(72) Wernau, William C., US
(73) Pfizer Inc., New York, US
(74) Patentanwaltsbüro Berlin, 1130 Berlin, Frankfurter Allee 286

(54) Verbessertes Fermentationsverfahren zur Herstellung von Xanthan

(57) Die von Xanthomonas produzierten hydrophilen Kolloide sind Polysaccharide, die Mannose, Glucose, Glucuronsäure u.a. für die Ernährung wichtige Substanzen enthalten. Mit der Erfindung sollen erhöhte Xanthanausbeuten erreicht werden. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Xanthomonas-Biopolymeren durch aerobes Vermehren eines Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas in einem wäßrigen Nährmedium ist dadurch gekennzeichnet, daß dem Nährmedium nach und nach eine Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs, beispielsweise Glucose, Saccharose, Maltose, Fructose, Lactose oder Stärke zugefügt wird.

217203 - 1-

Verbessertes Fermentationsverfahren zur Herstellung von
Xanthan

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Fermentationsverfahren zur Herstellung von Xanthan.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Zahlreiche Veröffentlichungen befassen sich mit der Herstellung hydrophiler Kolloide durch die aerobe Vermehrung von Bakterien der Gattung Xanthomonas in wässrigen Nährmedien. Die früheste Arbeit auf diesem Gebiet erfolgte bei The Northern Regional Research Laboratory of The United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, und ist in der US-PS 3 000 790 beschrieben. Abgewandelte Fermentationsverfahren sind beschrieben in den US-PS'en 3 020 206, 3 391 060, 3 427 226, 3 433 708, 3 271 267, 3 251 749, 3 281 329, 3 455 786, 3 565 763, 3 594 280 und 3 391 061.

Die von Xanthomonas produzierten hydrophilen Kolloide sind Polysaccharide, die Mannose, Glucose, Glucuronsäure, O-Acetyl-

Reste und Acetal-verknüpfte Brenztraubensäure enthalten. Diese Harze und ihre Derivate haben breite Anwendung auf dem Nahrungsmittelsektor und in der Industrie gefunden. Von besonderem Interesse ist die zunehmende Zuspitzung auf die Verwendung von Xanthomonas-Polymeren bei der Verdrängung von Öl aus teilweise erschöpften Vorkommen oder Lagerstätten.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Die allmähliche Zugabe einer Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs, vorzugsweise Glucose, zu dem wässrigen Nährmedium im Verlauf einer Xanthomonas-Fermentation führt zu erheblich erhöhten Xanthanausbeuten.

Die Kostenfaktoren bei sekundärer und tertiärer Restölgewinnung und die konkurrierende Verwendung von verdünnten Xanthomonas-Gesamtbrühen bei einer solchen Gewinnung zwingen aus wirtschaftlichen Gründen zur Steigerung der Fermentationskonzentration der Xanthomonas-Polymeren. Reduzierte Verschiffungskosten, Lagerkapazitäten für die Fermentationsbrühe und Handhabungskosten sind einige der daraus sich ergebenden Vorteile. Ferner werden verringerte Volumina an Lösungsmittel für die Gewinnung benötigt, wenn die Ausgangskonzentrationen der Fermentationsbrühe bei solchen Verfahren hoch sind, wo Xanthomonas-Harze für Anwendungsgebiete, wie dem Nahrungsmittelsektor, dem industriellen Bereich und der Restölgewinnung, gewonnen werden.

Eines der dem Fachmann auf dem Gebiet gut bekannten Verfahren zur Erhöhung der Fermentationsausbeute eines gewünschten mikrobiellen Produkts besteht darin, ein oder mehrere Nährmedien im Verlauf des Fermentationszyklus zuzusetzen. Dabei kann einfach zwischendurch eine Lösung, die eine Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs enthält, zugegeben werden.

Herkömmliche Medien für die Produktion von Xanthan (Xanthomonas-Polymer) enthalten ein geeignetes Kohlenhydrat in den wässrigen Nährmedien bei einer Konzentration von etwa 1 bis etwa 5 Gew.-%/Vol.-%. Geeignete Kohlenhydrate sind z.B. Glucose, Saccharose,

Maltose, Fructose, Lactose, bearbeitete, invertierte Zuckerrüben-Molassen, Invertzucker, filtrierte, verdünnte Qualitätsstärke oder Gemische dieser Kohlenhydrate. Die bevorzugte Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs ist Glucose.

Die Verwendung von Glucose-Konzentrationen über 5 Gew.-/Vol.-% in einem typischen oxydativen Xanthomonas-Fermentationsansatz führt zu starker Hemmung des Xanthomonas-Wachstums und zur Ansammlung toxischer Nebenprodukte (Säuren), die eine vorzeitige Beendigung der Fermentation verursachen. Es wurde gefunden, daß dieses Problem durch Zugabe oder "Nahrungszufuhr" von Glucose im Verlauf der Xanthomonas-Fermentation umgangen werden kann. Die allmähliche Zugabe von Glucose zum Fermentationsmedium, das anfangs wenig Glucose enthält oder Glucose-frei ist, ermöglicht nicht nur eine Glucosezugabe letztlich bis zu 7 Gew.-/Vol.-%, sondern führt zu erheblich erhöhter Xanthankonzentration in der fertigen Fermentationsbrühe (5 Gew.-/Vol.-% und 70 % Ausbeute, bezogen auf die Gesamtglucose in dem Inoculum der zweiten Stufe und auf die Menge, die dem letzten Fermentator zugesetzt wurde). Dies bedeutet eine Steigerung von mehr als 60 % gegenüber einem herkömmlichen Ansatzverfahren.

Das Fermentationsmedium kann unter den in der Literatur für die Xanthanproduktion beschriebenen ausgewählt werden. Ein bevorzugtes, chemisch definiertes Fermentationsmedium ist in der US-PS 4 119 546 beschrieben.

Die Zugabe von Glucoselösung (etwa 15 bis 50 Gew.-/Vol.-%) erfolgt unmittelbar nach der Beimpfung. Die Glucose wird für etwa 0 bis 24 h nach der Beimpfung exponentiell und von etwa 24 bis etwa 120 h mit konstanter Geschwindigkeit zugeführt. Während der frühen Stadien tritt etwas Zuckeransammlung (8 g/l; Spitzen bei etwa 48 h) auf und fällt auf nicht nachweisbare Mengen (etwa 72 h). Andere Nährstoffe können mit der Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs ohne Änderung des Wesens der Erfindung zugeführt werden.

Luft wird in den Produktionsfermentator mit herkömmlichen Mitteln eingeführt. Der Sauerstoffbedarf für die Fermentation kann den Anlagenbeschränkungen des Mischens und Sauerstofftransports angepaßt werden, um die Ansammlung toxischer Säure-Nebenprodukte herabzusetzen. Dies kann durch Herabsetzen der Zuführungsgeschwindigkeit der assimilierbaren Kohlenstoffquelle geschehen, bis der Sauerstoffbedarf der Sauerstofftransportkapazität des Systems besser entspricht.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

Zellen von *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 aus einer Agar-Schräggkultur wurden in 2,8 l-Fernbach-Kolben überführt, die jeweils 500 ml-Mengen eines Mediums folgender Zusammensetzung enthielten:

<u>Bestandteil</u>	<u>g/l</u>
Glucose	10,0
Diammoniumphosphat	2,0
Kaliumdihydrogenphosphat	1,0
Magnesiumsulfat	0,5
enzymatisch abgebautes Kasein (NZ Amine YT)	11,0
pH - 6,8	

Nach etwa 22 h Schütteln bei 28 °C wurde eine Teilmenge, die ausreicht, um ein 5 Vol.-%iges Inoculum zu liefern, jeweils in eine Reihe von Fernbach-Kolben, die 500 ml eines Mediums der folgenden Zusammensetzung enthielten, überführt:

<u>Bestandteil</u>	<u>g/l</u>
Glucose (separat im Autoklaven)	30,0
Ammoniumnitrat	1,0
Magnesiumsulfat	0,1
Zitronensäure (wasserfrei)	1,0

Calciumhydroxid	0,1
Eisen(II)sulfat	0,01
Dikaliumhydrogenphosphat	4,1
Kaliumdihydrogenphosphat	0,69
Mangansulfat	0,03
pH - 6,8	

Nach etwa 25 h Schütteln bei 28 °C wurde eine Menge, die ausreichte, ein 10%iges Inoculum zu liefern, in einen 14 l-Microferm-Fermentator überführt, der 2 vierblättrige Flachschaufelturbinen (11,9 cm bzw. 4,7" Durchmesser) und eine Sonde für gelösten Sauerstoff hatte.

Der Fermentator enthielt 5,8 l eines Mediums folgender Zusammensetzung:

<u>Bestandteil</u>	<u>g/l</u>
Ammoniumnitrat	1,0
Magnesiumsulfat	0,01
Zitronensäure (wasserfrei)	1,0
Dinatriumhydrogenphosphat	1,0
Mangansulfat	0,03
Eisen(II)sulfat	0,01
Calciumhydroxid	0,01
pH - 6,8	

Eine sterile Glucoselösung (511 g in einem Gesamtvolumen von 1335 ml Wasser) wurde dem Fermentator (Inkubationstemperatur 28 °C) bei folgendem, von einem automatischen Zeitmesser gesteuertem Programmschema zugeführt:

Zeit (h)	Zeitmesser ein (s)	Zeitmesser aus (s)	Zufuhrgeschwin- digkeit (cm ³ /h)	insgesamt angesam- meltes Zufuhrma- terial (cm ³)
0	5,0	59,3	1,49	0,00
1	5,2	54,8	1,66	1,49
2	4,9	45,8	1,86	3,15
3	4,9	40,7	2,06	5,01
4	5,0	36,9	2,29	7,07
5	5,0	32,9	2,53	9,36
6	5,0	29,0	2,82	11,9
7	7,0	35,9	3,13	14,7
8	7,0	30,5	3,58	17,8
9	7,0	25,7	4,11	21,4
10	7,0	25,0	4,65	25,5
11	8,0	23,4	5,33	30,2
12	9,0	19,3	6,11	35,5
13	9,0	15,8	6,97	41,6
14	9,0	14,2	7,93	48,6
15	10,0	11,2	9,06	56,5
16	10,0	8,9	11,0	65,6
17	12,0	7,4	11,9	76,6
18	12,0	6,8	12,3	88,5
19-92	12,0	6,8	12,3	100,8-998,7
92-127	12,0	12,0	9,6	998,7-1335

Während der Fermentation wurde der pH-Wert mit 10 % NaOH und 10 % H₂SO₄ zwischen 6,5 und 6,9 gesteuert. Gelöster Sauerstoff wurde nach dem folgenden Fermentator-Geschwindigkeitsprogramm gesteuert:

<u>Zeit (h)</u>	<u>Geschwindigkeit (UpM)</u>	<u>Belüftung (l/min)</u>
0	400	4,0
19	450	
24	470	
25	600	
26	670	
27	720	
28	750	
30	830	
31	860	
32	910	
33	970	
34	1000	
35	900	
45	1000	
50	1012 (max.)	

Die Fermentation erfolgte für insgesamt 136 h, worauf keine nachweisbare Glucosemenge mehr vorlag. Die Xanthankonzentration war 5,1 Gew.-/Vol.-% mit 70%iger Ausbeute (bezogen auf die Inoculum-Glucose der zweiten Stufe und Gesamtglucose, die dem Fermentator zugesetzt wurde). Die Endviskosität war 42,75 Pa · s (42750 cP), gemessen mit einem Brookfield-Viskosimeter bei 12 UpM.

Beispiel 2

Das Verfahren des Beispiels 1 kann unter Ersatz von Glucose durch eine assimilierbare Kohlenstoffquelle aus der Gruppe Saccharose, Fructose, Inertzucker, Maltose, Lactose, Stärke, Stärkehydrolysate und deren Gemische wiederholt werden.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Xanthomonas-Biopolymeren durch aerobes Vermehren eines Mikroorganismus der Gattung Xanthomonas in einem wässrigen Nährmedium, dadurch gekennzeichnet, daß dem wässrigen Nährmedium nach und nach eine Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs zugesetzt wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs Glucose, Saccharose, Maltose, Fructose, Lactose, Stärke, Stärkehydrolysate, Rohquellen des assimilierbaren Kohlenstoffs oder deren Gemische verwendet wird bzw. werden.

3. Verfahren nach Punkt 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs Glucose verwendet wird.

4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Quelle assimilierbaren Kohlenstoffs bis zu mehr als 5 Gew.-/Vol.-% zugesetzt wird.