



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 507 234 A2**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **92105464.9**

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 1/00, C08B 37/00,**  
//(C12N1/00,C12R1:01,1:38)

22 Anmeldetag: **30.03.92**

30 Priorität: **30.03.91 DE 4110549**

71 Anmelder: **Gesellschaft für  
Biotechnologische Forschung mbH (GBF)  
Mascheroder Weg 1  
W-3300 Braunschweig-Stöckheim(DE)**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**07.10.92 Patentblatt 92/41**

72 Erfinder: **Deckwer, Wolf-Dieter  
Mascheroder Weg 1  
W-3300 Braunschweig(DE)**  
Erfinder: **Lobas, Detlef  
Mascheroder Weg 1  
W-3300 Braunschweig(DE)**  
Erfinder: **Schumpe, Adrian  
Mascheroder Weg 1  
W-3300 Braunschweig(DE)**

84 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL SE**

74 Vertreter: **Boeters, Hans Dietrich, Dr. et al  
Boeters & Bauer Bereiteranger 15  
W-8000 München 90(DE)**

54 Verfahren zur Zellisolierung, isolierte Zellen (dsm 6314 und dsm 6418) und Verwendung isolierter Zellen zur Polysaccharidherstellung.

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Zellen, eine nach diesem Verfahren erhaltene Zelllinie sowie ein Verfahren unter Verwendung isolierter Zellen, das auf die effiziente Herstellung von Polysacchariden gerichtet ist.

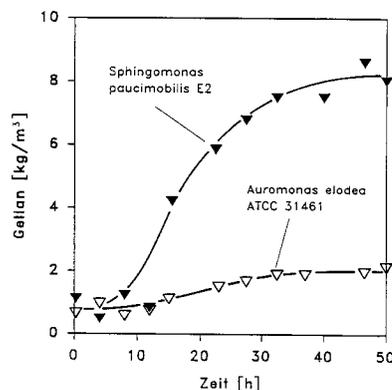


Abb. 1 Gellankonzentration als Funktion der Zeit für die Fermentationen mit *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) und *Auromonas elodea* (ATCC 31461)

EP 0 507 234 A2

Es ist erwünscht, den Stand der Technik, der die biotechnologische Herstellung von Polysacchariden betrifft, zu verbessern.

Gellan beispielsweise ist ein mikrobielles, anionisches Heteropolysaccharid aus Tetrasaccharid-Grund-  
 5 einheiten, das von *Auromonas elodea* ATCC 31461 gebildet wird. Natives Gellan ist mit Acetyl- und L-  
 Glycerinsäureresten substituiert. Diese Substituenten lassen sich durch eine Alkalibehandlung leicht abspal-  
 ten. Das dadurch erhältliche unsubstituierte Gellan (im folgenden Gellan/u) ist ein technisch interessantes  
 Produkt, das die physikalische Eigenschaft aufweist, in wässrigen Lösungen thermoreversibel Gele zu  
 bilden. Gellan/u wird bereits als Agar-Ersatz vertrieben (Gelrite von Kelco, Rahway/USA). Für die Lebensmit-  
 10 telindustrie ist ein weites Feld von Applikationen denkbar. Eine Zulassung als Lebensmittelzusatz in den  
 USA und in Europa ist bereits beantragt worden [1]. In Japan ist Gellan bereits seit 1988 als Lebensmittel-  
 zusatz zugelassen [1].

Bakterienspezies, bei denen die Bildung eines Polysaccharids, wie beispielsweise Gellan, zu beobach-  
 15 ten ist, sind bekannt. Die Schwierigkeit, derartige Spezies zur Produktion von Polysacchariden heranzuzie-  
 hen, besteht darin, daß nicht alle Stämme, Klone oder Zellen dieser Spezies das gewünschte Polysaccharid  
 effizient extrazellulär bilden.

Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß Zellen, die Gellan extrazellulär produzieren, nicht  
 in eine Gellanmatrix einsinken, während Zellen, die kein Gellan extrazellulär produzieren, in der Gellanma-  
 20 trix untergehen. Ausgehend von der genannten Beobachtung wurde nun ein Verfahren entwickelt, mit dem  
 sich Zellen und Klone isolieren lassen, die ein gewünschtes Polysaccharid, wie Gellan, effizient extrazellulär  
 produzieren.

Zur Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe wird gemäß einer Ausführungsform der  
 Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Zellen einer Bakterienspezies vorgeschlagen, bei der die Bildung  
 eines Polysaccharids beobachtet wird, wobei die zu isolierenden Zellen das Polysaccharid extrazellulär  
 bilden, und das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- 25 (a) einen Nährboden mit unsubstituiertem Gellan als Gelbildner verwendet,
- (b) die Zellen der Spezies, von denen man ausgeht, durch Verdünnungsausstrich vereinzelt und
- (c) die Zellen oder Klone isoliert, die nicht in die Nährbodenmatrix einsinken.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann man von Zellen einer Bakterienspezies ausgehen, bei der  
 die Bildung eines Polysaccharids beobachtet wird, und Zellen oder Klone isolieren, die das Polysaccharid in  
 30 effizienterer Weise extrazellulär bilden als die Ausgangskultur.

Auch kann man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von Zellen einer Bakterienspezies ausgehen,  
 bei der die Bildung von Gellan beobachtet wird, und Zellen oder Klone isolieren, die Gellan extrazellulär  
 bilden.

Man kann dabei von Zellen einer Spezies der Gattung *Auromonas* oder *Sphingomonas*, insbesondere  
 35 von Zellen der Spezies *Auromonas elodea* oder *Sphingomonas paucimobilis*, beispielsweise von Zellen von  
*Auromonas elodea* ATCC 31461 ausgehen. Aus dieser Kultur wurde nach dem erfindungsgemäßen  
 Verfahren *Sphingomonas paucimobilis* DSM 6314 erhalten, ein effizienter Gellanbildner.

Ferner kann man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von Zellen einer Bakterienspezies ausgehen,  
 bei der die Bildung des Polysaccharids P4 beobachtet wird, und Zellen oder Klone isolieren, die P4  
 40 extrazellulär bilden.

Das Exopolysaccharid P4 ist nach ersten Analysen (Zuckersequenzierung) aus zwei Teilen Glucose und  
 einem Teil Rhamnose aufgebaut. In wäßriger Lösung zeigt P4 viskositätserhöhende Eigenschaften. Die  
 Viskosität von wäßrigen P4-Lösungen bleibt im Bereich von pH 2 bis pH 10 und bei Temperaturen bis etwa  
 80 °C stabil. Mit steigender Salinität fällt die Viskosität wäßriger P4-Lösungen nur langsam ab. Nach  
 45 Erhitzen im alkalischen Medium bildet P4 feste Gele.

Man kann dabei von Zellen einer Spezies der Gattung *Pseudomonas* oder *Sphingomonas*, insbesonde-  
 50 re von Zellen der Spezies *Pseudomonas paucimobilis* oder *Sphingomonas paucimobilis*, insbesondere von  
 Zellen von *Pseudomonas paucimobilis* NCIMB 11 942 ausgehen. Aus dieser Kultur wurde nach dem  
 erfindungsgemäßen Verfahren *Sphingomonas paucimobilis* DSM 6 418 (im folgenden auch P4) erhalten, ein  
 effizienter P4-Bildner.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird *Sphingomonas paucimobilis* DSM 6314  
 vorgesehen. Es handelt sich um einen Stamm, der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten  
 worden ist und in effizienter Weise Gellan extrazellulär bildet.

Ferner wird gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung *Sphingomonas paucimobilis* DSM 6  
 55 418 vorgesehen. Es handelt sich um einen Stamm, der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten  
 worden ist und in effizienter Weise P4 extrazellulär bildet.

Schließlich wird gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ein Verfahren zur chargenweisen  
 oder kontinuierlichen Herstellung eines Polysaccharids vorgesehen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß

man das Polysaccharid mit Hilfe von Zellen oder Klonen dieser Zellen herstellt, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten worden sind.

Beispiele für das erfindungsgemäße Verfahren betreffen die Herstellung Gellan oder P4.

## 5 Hintergrund der Forschungen

Durch eine neu entwickelte Screeningtechnik konnten aus einer Kultur des Stammes (ATCC 31461) *Auromonas elodea* [2], (vor 1987 *Pseudomonas elodea* [3]), zwei Stämme isoliert werden, deren Charakterisierung durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Braunschweig, eine Einordnung unter dem systematischen Namen *Sphingomonas paucimobilis* ergab. Es handelt sich um neue bisher unbekannte Mikroorganismen, die sich in mehreren Merkmalen von denen des Stammes (ATCC 31461) unterscheiden. In der Literatur wird die Kultur (ATCC 31461) als pleomorph bezeichnet [3]. Kang et al. [3] erwähnen, daß nur bei Verwendung einer frisch ausplattierten Kultur für das Inoculum ein gutes Wachstum und eine gute Produktion von Gellan resultiert [4]. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß sich mit zunehmenden Alter der Kultur nichtproduzierende Varianten durchsetzen. Von den zwei in Reinkultur isolierten Varianten des Stammes *Sphingomonas paucimobilis* produziert nur die Variante E2, nicht aber die Variante E1 extrazelluläres Polysaccharid. Die technisch interessante Variante *Sphingomonas paucimobilis* E2 wurde als Lyophilisat bei der DSM unter der Nummer 6314 hinterlegt. Auch Mischkulturen der Varianten E1 und E2 verlieren relativ schnell ihr Potential zur Produktion des Polysaccharids Gellan. Die Folge aus der Unkenntnis dieser Sachverhalte sind höchst uneinheitliche Fermentationsergebnisse, bedingt durch ein unkontrollierbares Impfgut.

Als ein weiterer Erfolg der neu entwickelten Screeningtechnik konnten aus einer Kultur des Stammes *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942) [5] mehrere verschiedene Stämme isoliert werden. Die Charakterisierung der in Reinkultur erhaltenen Variante P4 durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Braunschweig, ergab ebenfalls eine Einordnung unter dem systematischen Namen *Sphingomonas paucimobilis*. Es handelt sich um eine neue bisher unbekannte Mikroorganismenspezies, die sich in mehreren Merkmalen von denen des Stammes *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942) unterscheiden. Von den isolierten Varianten aus der Kultur *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942) produziert nur die Variante *Sphingomonas paucimobilis* P4 das extrazelluläres Polysaccharid P4. Die technisch interessante Variante *Sphingomonas paucimobilis* P4 wurde als Lyophilisat bei der DSM unter der Nummer 6418 hinterlegt. Mischkulturen der Varianten verlieren relativ schnell ihr Potential zur Produktion des Polysaccharids P4.

*Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) produziert bei aerober Fermentation aus verschiedenartigen Kohlenstoffquellen wie z.B. Glucose, mit Ammoniumnitrat oder anderen Stickstoffquellen, bei Anwesenheit von Mineralsalzen und Spurenelementen sowie mit oder ohne komplexe Nährmedien, das Exopolysaccharid Gellan. Die Fermentationszeit zur Umsetzung von 30 kg/m<sup>3</sup> Glucose liegt unter 46,5 Stunden. Die Fermentationsbrühe zeigt thixotropes Verhalten. Nach vorheriger Scherung lassen sich die Fließeigenschaften der pseudoplastischen Gellan-Lösungen mit der Beziehung nach Ostwald und de Waele beschreiben. Während der Fermentation steigt die Viskosität erheblich an. Am Ende der Fermentation werden Konsistenzfaktoren über 20000 mPa s<sup>n</sup> erreicht. Der Fließindex  $n$  fällt dabei auf den Wert 0,11. Die Ausbeute an reinem Gellan beträgt mehr als 28 % bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle. Hierin ist eine deutliche Steigerung der Produktausbeute gegenüber dem herkömmlichen Verfahren zu sehen. Kang et al. [3] erhalten 50 Gew.% Polysaccharid und Biomasse bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, wobei davon etwa 50 Gew.% aus Protein und unlöslichen (Zell-) Bestandteilen bestehen, d.h. die Ausbeute an reinem Gellan liegt nach diesen Angaben bei 25 Gew.% bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle [4,6]. Da hier Abweichungen durch unterschiedliche analytische Methoden möglich sind, wurden eigene Versuche auch mit dem Stamm *Auromonas elodea* (ATCC 31461) durchgeführt. In diesen Vergleichsfermentationen wurde beobachtet, daß die tatsächliche Ausbeute an reinem, proteinfreiem Gellan nach dem Fermentationsverfahren von Kang mit *Auromonas elodea* (ATCC 31461) erheblich geringer ist und etwa bei ca. 6-10 % liegt.

## Isolierung der Kulturen

Wenn man eine Kultur von *Auromonas elodea* (ATCC 31461) bzw. *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942) auf festen Nährböden mit Gellan/u statt Agar ausplattiert, zeigt sich nach ca. 48 h Inkubation bei 30 °C, daß die Kolonien in die Matrix einsinken. Versuche ohne Kohlenstoffquelle zeigten kein Wachstum, so daß offenbar Gellan/u nicht als Substrat verwertet wird. Das Gel wird durch die Mikroorganismen jedoch verflüssigt. Bei Verdünnungsreihen von *Auromonas elodea* (ATCC 31461) bzw. *Pseudomonas paucimobilis*

## EP 0 507 234 A2

(NCIMB 11942) in physiologischer Natriumchloridlösung, und anschließendes Ausplattieren auf Yeast/Malt-Gellan/u Platten zeigte sich, daß einige Kolonien nicht in die Matrix des Gellan/u einsanken. Diese Kulturen erwiesen sich als besonders gut für die Polysaccharidproduktion geeignet. Durch mehrfaches Überimpfen und Wiederholen dieses Aufreinigungsschrittes erhielten wir die Reinkulturen der Stämme Sphingomonas paucimobilis E2 (DSM 6314) bzw. Sphingomonas paucimobilis P4 (DSM 6418). Die nicht produzierenden Varianten wurde durch Vereinzeln aus einsinkenden Kolonien erhalten.

Um bei der Fermentation eine möglichst hohe Produktausbeute zu erreichen, muß eine Kontamination durch die nicht produzierenden Varianten ausgeschlossen werden. Die besten Ergebnisse erzielt man, indem man die erste Vorkultur für die Fermentation aus einer Verdünnungsreihe animpft.

### Stammhaltung und Anzuchttechnik

Die Stammhaltung von Sphingomonas paucimobilis E2 (DSM 6314) kann routinemäßig auf Yeast/Malt-Platten mit Agar oder Gellan/u als Gelbildner erfolgen, auf denen gutes Wachstum zu verzeichnen ist. Die Stammhaltung von Sphingomonas paucimobilis P4 (DSM 6418) kann routinemäßig auf Czapek Dox-Platten oder auf Yeast/Malt-Platten erfolgen; auf beiden Medien ist gutes Wachstum zu verzeichnen. Die Selektion der produzierenden Stammvarianten erfolgt auf Yeast/Malt-Gellan/u-Platten. Die Platten werden in der Regel 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Kulturen sind ca. 1-2 Wochen bei 4 °C lagerfähig, ohne daß die Mikroorganismen einer Aktivitätsminderung unterliegen. Als eine andere Art der Konservierung ist es z.B. möglich, die Kulturen ohne Vorbehandlung bei -20 °C tiefzुकühlen. Vor einer Verwendung sollten diese Kulturen jedoch einmal überimpft werden. In der DSM wurden die Kulturen als Lyophilisate hinterlegt.

Zur ersten Vorkultur wurden Kolben mit 25 ml des Fermentationsmediums verwendet. Jede folgende Stufe wurde mit jeweils 10 % ihres Volumens an Inoculum aus der vorhergehenden Stufe beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C auf einem Schüttler bei 180 rpm für jeweils 24 h.

Alle Bestandteile des Nährmediums bis auf die Glucose wurden zusammen bei 121 °C sterilisiert. Die Glucose wurde separat gelöst und sterilisiert, um eine Karamelisierung zu vermeiden. Die Glucoselösung und die Lösung mit den anderen Komponenten wurden unter einer Cleanbench zur Nährlösung vereinigt. Das für die submersen Kultivierungen (Schüttelkolben und Fermenter) verwendete Nährmedium nach Kang [3] hat folgende Zusammensetzung:

3,3 %	Glucose H <sub>2</sub> O
0,01 %	MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O
0,09 %	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
0,05 %	Promosoy (Central Soya Overseas B.V., Chem. Div., Rotterdam)
1 ml	Spurenelementkonzentrat Lösung
5 ml	Kaliumphosphatpuffer pH7 (1 molar)

Die Spurenelementkonzentratlösung besitzt folgende Zusammensetzung:

Manganchlorid 4 H <sub>2</sub> O	1,800 g/l
Eisen II sulfat 7 H <sub>2</sub> O	2,488 g/l
Borsäure	0,285 g/l
Kupfersulfat 5 H <sub>2</sub> O	0,052 g/l
Zinkchlorid	0,021 g/l
Kobaltchlorid 6 H <sub>2</sub> O	0,074 g/l
Magnesiummolybdat	0,023 g/l
Natriumnitrat 2 H <sub>2</sub> O	2,1 g/l

Neben der aufgeführten wurden auch andere Mediumszusammensetzungen erfolgreich zur Gellanproduktion und zur Herstellung des Polysaccharids P4 verwendet.

### Charakterisierung des Stammes Sphingomonas paucimobilis E2 (DSM 6314)

#### Morphologie

## EP 0 507 234 A2

Bei den Bakterien *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) handelt es sich um Gramnegative, stäbchenförmige Zellen von 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  Breite und 1,5-4,0  $\mu\text{m}$  Länge. Die Zellen in frischen Kulturen sind gut beweglich. Mit zunehmendem Alter der Kulturen wird die Beweglichkeit durch das gebildete Polysaccharid stark eingeschränkt. Die Mikroorganismen wachsen nur aerob.

5 Die Bakterien bilden auf Y/M-Agar nach 48 h Inkubation Kolonien mit einem Durchmesser von 2-3 mm. Die Kolonien sind durch ein nicht diffundierendes Pigment gelb gefärbt. Die Stammvariante E1 ist intensiv gelb und erzeugt auf festen Nährböden harte nicht viskose Kolonien. Die Variante E2 erscheint auf festen Nährböden etwas dunkler gelb als die Variante E1. Wegen des gebildeten Polysaccharides sind die Kolonien der Variante E2 viskos. Über längere Zeit inkubierte Platten von E2 zeigen transparente Kolonien  
10 mit eingelagerten gelben Zellanhäufungen, wobei augenscheinlich Polysaccharid in erheblichen Mengen ausgeschieden wird.

### Physiologie und biochemische Eigenschaften

15 Die biochemische Charakterisierung der Kulturen erfolgte in unserem Auftrag durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig. Diese Untersuchungen ergaben, daß es sich bei *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) um eine neue bisher nicht bekannte Spezies handelt. *Auromonas elodea* (ATCC 31461) zeigte bei einer parallelen Untersuchung deutliche Unterschiede. Die Bakterienkultur *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) besitzt folgende physiologische und  
20 biochemische Eigenschaften:

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 1: Charakterisierung von *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314)

5

Test/Eigenschaft		ADH	
			-
		ODC	-
10	Lyse durch 3% KOH	+	VP
	Aminopeptidase (Cerny)	+	Indol
	Sporen	-	NO <sub>2</sub> aus NO <sub>3</sub>
15	Oxidase	+	Denitrification
	Catalase	+	Phenylalanindesaminase
	Wachstum anaerob	-	Levan aus Saccharose
20	37/40 °C	+/-	Lecithinase
	pH 5,6	-	Urease
	Mac-Conkey-Agar	-	
	SS-Agar	-	Hydrolyse von Stärke
	Cetrimid-Agar	-	Gelatine
25	Pigmente	gelb	Casein
	nicht diffundierend	+	DNA
	diffundierend	-	Tween 80
	fluoreszierend	-	Asculin
	Pyocyanin	-	
30	Säure aus (OF-Test)		Tyrosin-Abbau
	Glucose aerob	-	
	Glucose anaerob	-	Substratverwertung
	Gas aus Glucose	-	Acetat
			Adipat
			Caprat
35	Säure aus (ASS)		Citrat
	Glucose	+	Glycolat
	Fructose	+	Lactat
	Xylose	+	Lävulinat
	Arabinose	+	Malat
	Fucose	-	Malonat
	Maltose	+	Phenylacetat
40	Mannose	+	Suberat
	Lactose	+	L-Arabinose
	Saccharose	+	Fructose
	Trehalose	+	Glucose
	Cellobiose	+	Mannose
	Rhamnose	-	Xylose
	Raffinose	+	Mannitol
45	Melezitose	+	Gluconat
	Melibiose	+	2-Ketogluconat
	Aldonitol	-	N-Acetylglucosamin
	Dulcitol	-	L-Histidin
	Inositol	-	L-Serin
	Mannitol	-	Hydroxybutyrat
50	Sorbitol	-	
	N-Acetylglucosamin	+	
	Glycerol	-	

55 Charakterisierung des Stammes *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418)

## Morphologie

## EP 0 507 234 A2

Bei den Bakterien *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418) handelt es sich um Gramnegative, stäbchenförmige Zellen von 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  Breite und 1,5-4,0  $\mu\text{m}$  Länge. Die Zellen in frischen Kulturen sind gut beweglich. Mit zunehmendem Alter der Kulturen wird die Beweglichkeit durch das gebildete Polysaccharid stark eingeschränkt. Die Mikroorganismen wachsen nur aerob.

5 Die Bakterien bilden auf Y/M-Agar nach 48 h Inkubation Kolonien mit einem Durchmesser von 1-2 mm. Die Kolonien sind durch ein nicht diffundierendes Pigment gelb gefärbt. Die Stammvariante P4 ist intensiv gelb und erzeugt auf festen Nährböden harte nicht viskose Kolonien. Auf Czapek Dox Agar erscheinen die Kolonien leuchtend gelb und leicht transparent, die Kolonien auf diesem Medium sind extrem hart und zäh.

### 10 **Physiologie und biochemische Eigenschaften**

Die biochemische Charakterisierung der Kulturen erfolgte in unserem Auftrag durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig. Diese Untersuchungen ergaben, daß es sich bei *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418) um eine neue bisher nicht bekannte Spezies  
15 handelt. *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942) zeigte bei einer parallelen Untersuchung deutliche Unterschiede. Die Bakterienkultur *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418) besitzt folgende physiologische und biochemische Eigenschaften:

20

25

30

35

40

45

50

55

Tabelle 2: Charakterisierung von *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418)

5

Test/Eigenschaft		ADH	-
		ODC	-
10	Lyse durch 3 % KOH	VP	-
	Aminopeptidase (Cerny)	Indol	-
	Sporen	NO <sub>2</sub> aus NO <sub>3</sub>	-
15	Oxidase	Denitrification	-
	Catalase	Phenylalanindesaminase	-
	Wachstum anaerob	Levan aus Saccharose	-
20	37/40 °C	Lecithinase	-
	pH 5,6	Urease	-
	Mac-Conkey-Agar	Hydrolyse von Stärke	+
	SS-Agar	Gelatine	-
	Cetrimid-Agar	Casein	-
25	Pigmente nicht diffundierend	DNA	+
	diffundierend	Tween 80	+
	fluoreszierend	Äsculin	+
	Pyocyanin		
30	Säure aus (OF-Test)	Tyrosin-Abbau	+
	Glucose aerob		
	Glucose anaerob	Substratverwertung	
	Gas aus Glucose	Acetat	+
		Adipat	-
35	Säure aus (ASS)	Caprat	-
	Glucose	Citrat	-
	Fructose	Glycolat	-
	Xylose	Lactat	-
	Arabinose	Lävulinat	-
	Fucose	Malat	+
	Maltose	Malonat	-
40	Mannose	Phenylacetat	-
	Lactose	Suberat	-
	Saccharose	L-Arabinose	+
	Trehalose	Fructose	+
	Cellobiose	Glucose	+
	Rhamnose	Mannose	+
45	Raffinose	Xylose	+
	Melezitose	Mannitol	-
	Melibiose	Gluconat	-
	Aldonitol	2-Ketogluconat	-
	Dulcitol	N-Acetylglucosamin	+
	Inositol	L-Histidin	-
	Mannitol	L-Serin	+
50	Sorbitol	Hydroxybutyrat	-
	N-Acetylglucosamin		
	Glycerol		

55 Vergleich von *Sphingomonas paucimobilis* E2 und P4 mit *Auromonas elodea* (ATCC 31461) und *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942)

Die Stämme *Sphingomonas paucimobilis* E2 und P4 unterscheiden sich in wesentlichen Merkmalen von

den Ausgangskulturen *Auromonas elodea* (ATCC 31461) und *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942). In der folgenden Tabelle sind diejenigen Merkmale aufgeführt, bei denen sich Unterschiede ergaben.

5 **Tabelle 3: Vergleich der Unterschiede der Varianten E2 und P4 von *Sphingomonas paucimobilis* und *Auromonas elodea* (ATCC 31461) und *Pseudomonas paucimobilis* (NCIMB 11942)**

10

Eigenschaften des Stammes    DSM 6314 (E2)    ATCC 31461    DSM 6418 (P4)    NCIMB 11942

15

Zellform:				
Länge $\mu\text{m}$	1,5-4,0	1,5-5,0	1,5-4,0	1,5-4,0
Wachstum bei 37 °C:	+	-	+	+
20 Säure aus (ASS):				
Fucose	-	-	+	+
Melezitose	+	-	+	-
N-Acetylglucosamin	+	+	-	+
25 Verflüssigung von Gellan/u-Gel:	-	+	-	+
Substratverwertung:				
L-Arabinose	+	w	+	w
2-Ketogluconat	-	+	-	+
30 L-Serin	-	-	+	+

### 1. Beispiel (Vergleichsfermentationen)

35 Im folgenden sollen typische Saizfermentationen der Stämme *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) und *Auromonas elodea* (ATCC 31461) miteinander verglichen werden. Beide Fermentationen wurden unter gleichen Bedingungen in einem Biostat E Fermenter (B. Braun, Melsungen) im Maßstab von 10 l ausgeführt. Als erste Vorkultur wurden vier Kolben mit jeweils 25 ml des oben angegebenen Kulturmediums von einer 3 Tage alten Yeast/Malt-Gellan/u Platte beimpft. Die zweite Vorkultur (vier Kolben mit jeweils 250 ml) wurde nach 24 h mit der Gesamtmenge der ersten Vorstufe angeimpft. Diese zweite Vorstufe diente nach weiteren 24 h als Inoculum für den Fermenter.

Der Fermenter wurde mit 0,33 vvm Luft begast. Die Temperatur betrug 30 °C. Um stagnante Zonen im Fermenter zu vermeiden und eine gute Durchmischung zu gewährleisten, wurde die Kulturlösung mit einem vierstufigen Intermig-Rührer (Durchmesser 63 % des Behälterdurchmessers) mit 800 Upm gerührt. Im Kulturmedium wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt und mittels 1 n Natronlauge und 1 n Phosphorsäure über eine Regelung konstant gehalten.

Die Gellankonzentration am Ende der Fermentation war bei *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) etwa um den Faktor 4 größer als bei der Fermentation mit *Auromonas elodea* (ATCC 31461) (**Abb. 1**). Die maximalen Gellankonzentrationen betragen 8 kg/m<sup>3</sup> für *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) und 2 kg/m<sup>3</sup> für *Auromonas elodea* (ATCC 31461). Für die Raum-Zeit-Ausbeuten dieser Fermentationen ergaben sich **0,172 kg/m<sup>3</sup>h** für *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314), und **0,04 kg/m<sup>3</sup>h** für *Auromonas elodea* (ATCC 31461).

Die Bestimmung des Gesamtgehaltes an Gellan und Biomasse erfolgte durch Zusatz von zwei Volumenteilen Isopropanol, Abzentrifugieren und Trocknen (48 Stunden bei 80 °C). Zur Bestimmung des Biotrockenmasse-Gehaltes wurden die Proben mit dest. Wasser verdünnt, die Zellen abzentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Sediment mit Wasser aufgenommen, und nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren das Sediment getrocknet. Die Ermittlung der Gellankonzentration erfolgte durch Differenzbildung aus den Ergebnissen dieser Bestimmungen.

Bedingt durch die hohe Viskosität der Fermentationsbrühe bei *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) war es notwendig, die Proben vor der Zentrifugation stärker zu verdünnen. Aus diesem Grund streuen die Meßwerte weiter als bei der Fermentation mit *Auromonas elodea* (ATCC 31461). Die geringsten Fehler entstehen bei der Bestimmung der Summe von Gellan- und Biomassegehalt (von Kang [4] als natives Gellan bezeichnet) aus der unverdünnten Fermentationsbrühe (**Abb. 2**).

In beiden Fermentationen wurden in etwa gleiche Biotrockenmasse-Gehalte (BTM) erreicht. Der Biomassegehalt erreichte Maximalwerte von etwa 4 kg/m<sup>3</sup> am Ende der Wachstumsphase. Danach starben die Mikroorganismen teilweise ab; Der Biomassegehalt sank (**Abb. 3**). Bei der Fermentation mit *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) war nach 46,5 h die Glucose vollständig verbraucht, und damit die Fermentation beendet. Bei *Auromonas elodea* (ATCC 31461) waren nach 46,5 h noch 2,3 kg/m<sup>3</sup> Glucose vorhanden, nach 50 h noch 0,42 kg/m<sup>3</sup>.

## 2. Beispiel

Die Fermentation des Stammes *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418) verlief im wesentlichen ähnlich den vorher beschriebenen Fermentationen. Die Fermentation wurde unter gleichen Bedingungen in einem Biostat E Fermenter (B. Braun, Melsungen) im Maßstab von 10 l ausgeführt. Als erste Vorkultur wurden vier Kolben mit jeweils 25 ml des oben angegebenen Kulturmediums von einer 3 Tage alten Capek Dox Gellan/u Platte beimpft. Die zweite Vorkultur (vier Kolben mit jeweils 250 ml) wurde nach 24 h mit der Gesamtmenge der ersten Vorstufe angeimpft. Diese zweite Vorstufe diente nach weiteren 24 h als Inoculum für den Fermenter.

Der Fermenter wurde mit 0,33 vvm Luft begast. Die Temperatur betrug 30 °C. Um stagnante Zonen im Fermenter zu vermeiden und eine gute Durchmischung zu gewährleisten, wurde die Kulturlösung mit einem vierstufigen Intermig-Rührer (Durchmesser 63 % des Behälterdurchmessers) mit 800 Upm gerührt. Im Kulturmedium wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt und mittels 1 n Natronlauge und 1 n Phosphorsäure über eine Regelung konstant gehalten.

Die Bestimmung des Gesamtgehaltes an P4 und Biomasse erfolgte durch Zusatz von zwei Volumenteilen Isopropanol, Abzentrifugieren, Dekantieren und Trocknen (48 Stunden bei 80 °C). Zur Bestimmung des Biotrockenmasse-Gehaltes wurden die Proben mit Dimethylsulfoxid verdünnt, die Zellen abzentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Sediment mit Wasser aufgenommen, und nach erneuten Zentrifugieren und Dekantieren das Sediment getrocknet. Die Ermittlung der Polysaccharidkonzentration erfolgte durch Differenzbildung aus den Ergebnissen dieser Bestimmungen. Die P4-Konzentration am Ende der Fermentation betrug ca. 10 kg/m<sup>3</sup> (**Abb. 4**).

### 35 Drittes Beispiel

Es wurden folgende Stämme eingesetzt:

*Leuconostoc mesenteroides* DSM 20187

*Enterobacter sakazakii* DSM 4485

*Xanthomonas campestris* NRRL 8-1459 S4L-II

*Aureobasidium pullulans* DSM 2404

Als Medium wurden entsprechend den Wachstumsanforderungen der Stämme die von der DSM vorgeschlagenen Standardmedien benutzt, die dem DSM-Katalog "Catalogue of Strains 1989", 4. Auflage, zu entnehmen sind. In Abweichung vom DSM-Katalog und in Übereinstimmung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde jedoch für alle Medien Gellan/u an Stelle von Agar verwendet. Der Ausstrich der Verdünnungsreihen, die Inkubation und die Weiterbehandlung erfolgten in der Weise, wie sie für das erfindungsgemäße Verfahren für die Gellan und P4 bildenden Spezies beschrieben wurden.

Tabelle 4

Verwendete Medien		
Stamm	Medium	DSM Catalogue of Strains 1989
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (DSM 20187)	MRS	Medium 11, S. 279
<i>Enterobacter sakazakii</i> (DSM 4485)	Nutrient	Medium 1, S. 279
<i>Xanthomonas campestris</i> (NRRL B-1459 S4L-II)	Yeast/Malt	siehe Stammhaltung und Aufzuchttechnik
<i>Aureobasidium pullulans</i> (DSM 2404)	Potato Glucose	Medium 129, S. 290

Die Stämme *Enterobacter sakazakii* DSM 4485, *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 S4L-II, *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20187 und *Aureobasidium pullulans* DSM 2404 zeigten innerhalb der eingesetzten Zellpopulationen keine einsinkenden Zellen, vielmehr wuchsen alle Zellen auf der Oberfläche der Gellan/u-Platten. Daraus ergibt sich, daß es sich bei den eingesetzten Populationen um Reinkulturen mit hohem Potential zur Polysaccharidbildung handelt.

#### Literatur

- [1] V.J. Morris, Food Biotechnology 4 (1990) Nr. 1, S. 45-57.
- [2] R. Moorhouse, Structure/property relationships of a family of microbial polysaccharides, in: Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/property Relations and Applications, Hrsg. M. Yalpani, Bd. 3, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1987, S. 187-205
- [3] K.S. Kang, G.T. Veeder, P.J. Mirrasoul, T. Kaneko und I.W. Cottrell, Applied and Environmental Microbiology 43 (1982) Nr. 5, S. 1086-1091
- [4] K.S. Kang, G.T. Colegrove und G.T. Veeder, Deacetylated Polysaccharide S-60, US-Patent 4,326,052, 1982
- [5] A. Anson, P.J. Fisher, A.F.D. Kennedy und I.W. Sutherland, Journal of Applied Bacteriology (1987) Nr. 62, S. 147-150
- [6] K.S. Kang und G.T. Veeder, Polysaccharide S-60 and bacterial fermentation process for its preparation, US-Patent 4,326,053, 1982.

#### Patentansprüche

- Verfahren zur Isolierung von Zellen einer Bakterienspezies, bei der die Bildung eines Polysaccharids beobachtet wird, wobei die zu isolierenden Zellen das Polysaccharid extrazellulär bilden, dadurch **gekennzeichnet**, daß man
  - einen Nährboden mit unsubstituiertem Gellan als Gelbildner verwendet,
  - die Zellen der Spezies, von denen man ausgeht, durch Verdünnungsausstrich vereinzelt und
  - Zellen oder Klone isoliert, die nicht in die Nährbodenmatrix einsinken.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man von Zellen einer Bakterienspezies ausgeht, bei der die Bildung von Gellan beobachtet wird, und Zellen oder Klone isoliert, die Gellan extrazellulär bilden.
- Verfahren nach Anspruch 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß man von Zellen einer Spezies der Gattung *Auromonas* oder *Sphingomonas*, insbesondere von Zellen der Spezies *Auromonas elodea* oder *Sphingomonas paucimobilis*, insbesondere von Zellen von *Auromonas elodea* ATCC 31461 ausgeht.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß man von Zellen einer Bakterienspezies ausgeht, bei der die Bildung des Polysaccharids P4 beobachtet wird, und Zellen oder Klone isoliert, die das Polysaccharid P4 extrazellulär bilden.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß man von Zellen einer Spezies der Gattung

## EP 0 507 234 A2

Pseudomonas oder Sphingomonas, insbesondere von Zellen der Spezies Pseudomonas paucimobilis oder Sphingomonas paucimobilis, insbesondere von Zellen von Pseudomonas paucimobilis NCIMB 11 942 ausgeht.

- 5 6. Sphingomonas paucimobilis DSM 6 314.
7. Sphingomonas paucimobilis DSM 6 418.
8. Verfahren zur chargenweisen oder kontinuierlichen Herstellung eines Polysaccharids, dadurch **gekenn-**  
10 **zeichnet**, daß man das Polysaccharid mit Hilfe von Zellen oder Klonen dieser Zellen herstellt, die nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 erhältlich sind.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Gellan herstellt.
- 15 10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch **gekennzeichnet**, daß man das Polysaccharid P4 herstellt.

20

25

30

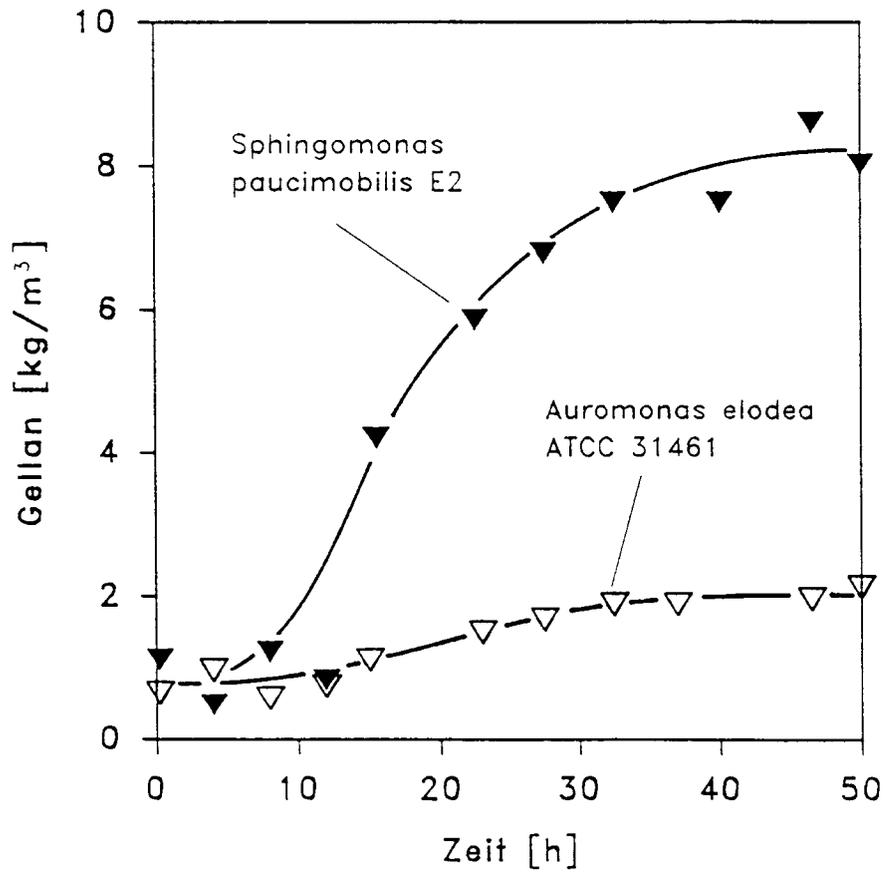
35

40

45

50

55



**Abb. 1** Gellankonzentration als Funktion der Zeit für die Fermentationen mit *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) und *Auromonas elodea* (ATCC 31461)

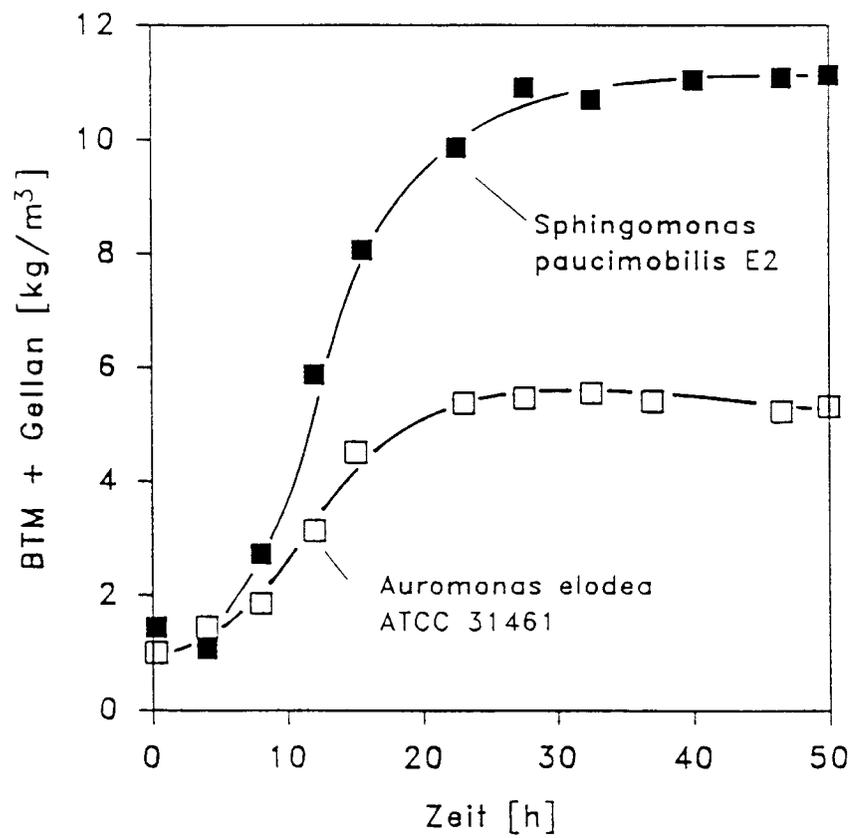


Abb. 2 Gellan+Biomasse als Funktion der Zeit für die Fermentationen mit *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) und *Auromonas elodea* (ATCC 31461)

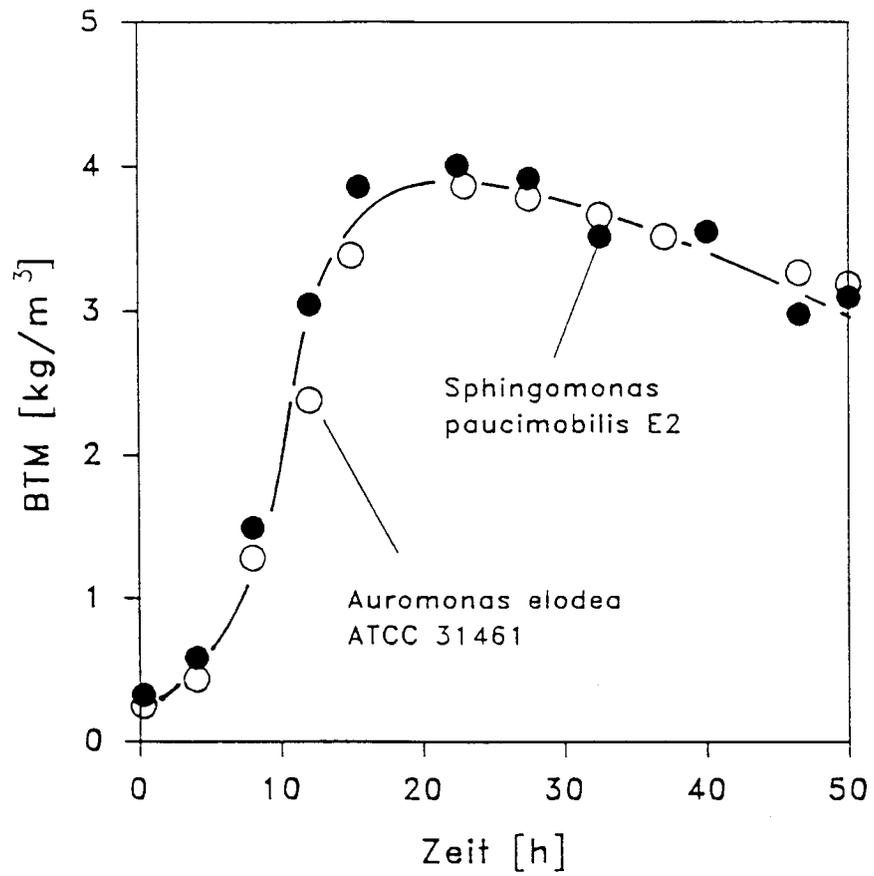


Abb. 3 Biomassegehalte als Funktion der Zeit für die Fermentationen mit *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314) und *Auromonas elodea* (ATCC 31461)

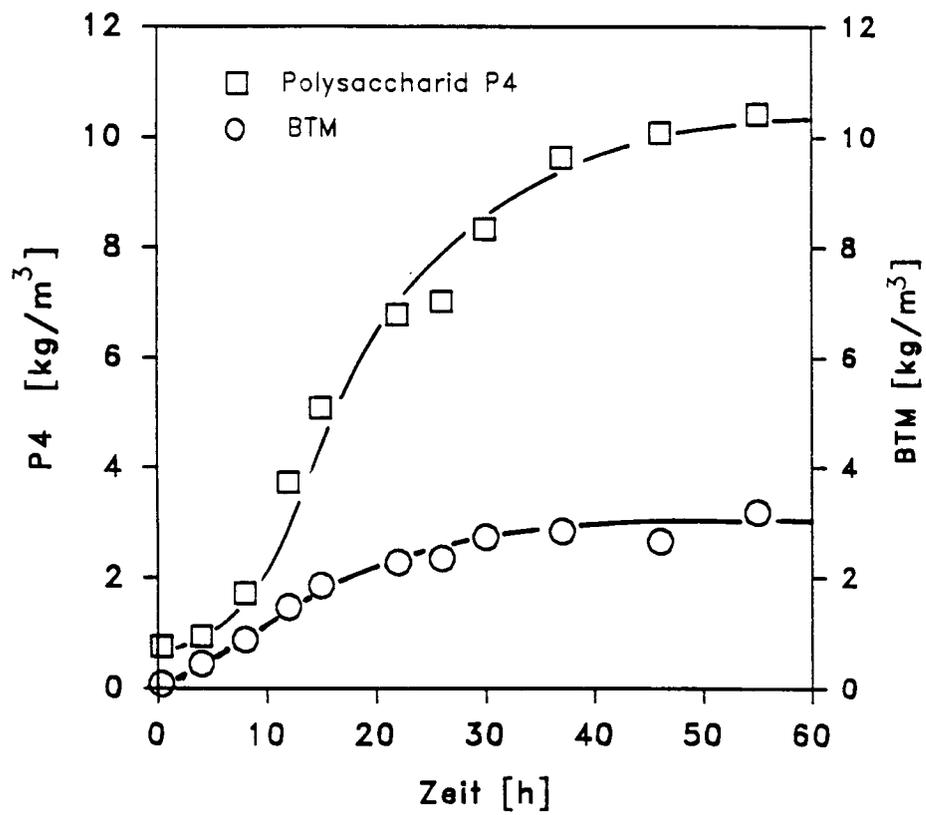


Abb. 4 Polysaccharid P4 und Biomassegehalt als Funktion der Zeit für die Fermentation mit *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418)