



# Xanthomonas campestris

## Fermentation



### Einleitung

Die Bakterien der Gattung *Xanthomonas* zählen zu den pflanzenpathogenen, gelb-pigmentierten Pseudomonaden. Stämme von *Xanthomonas campestris* scheiden enzymatisch schwer abbaubare Exopolysaccharide (Xanthan) aus. Xanthan wird seit den 60iger Jahren kommerziell hergestellt und ist in der Lebensmittelindustrie, Chemie und der Erdölförderung weit verbreitet. Von großer Bedeutung sind dabei die Unempfindlichkeit der Viskosität von Xanthanlösungen über einen großen pH- und Temperaturbereich, sowie der geringe Einfluss des Salzgehaltes. Die Xanthane werden als Dickungsmittel und Stabilisator in der Lebensmittelherstellung (Pudding, Schmelzkäse, Schlagsahne, Fruchtsäften, Saucen) und in der kosmetischen Industrie (Zahnpasta) eingesetzt.

### 1. Equipment

- BIOSTAT® Aplus 5 L mit MO-Ausstattung
- Animpfgarnitur
- 10 Petrischalen
- Impfösen
- 2 × 250 mL Schottflaschen oder Kolben
- 1 × 50 mL Erlenmeyerkolben + Stopfen
- 14 × 100 mL Erlenmeyerkolben + Stopfen
- 7 × 500 mL Schüttelkolben + Stopfen
- Zentrifugenröhrchen
- Moisture Analyzer (Sartorius) oder Mikrowelle
- Trockenschrank
- Viscosimeter
- Glucose Analyzer oder Glucose-Kit
- Whirl-Mix
- Zentrifuge
- Magnetrührer + Magnetfisch
- Waage (z. B. Sartorius CP-Modelle)
- Thermoschüttler (z. B. CERTOMAT®, Sartorius)
- *Xanthomonas campestris* DSM 1706

### 2. Vorbereitung

#### a) Zeitplan

1. Tag: Herstellen der Agarplatten
2. Tag: Animpfen der Agarplatten
2. Tag: Ansetzen und Autoklavieren der Vorkultur I
3. Tag: Animpfen der Vorkultur I
3. Tag: Ansetzen und Autoklavieren der Vorkultur II
4. Tag: Animpfen der Vorkultur II
5. Tag: Ansetzen der Hauptkultur und Vorbereitung des Fermenters
6. Tag: Inokulation des Fermenters

#### Beachte

Glucoselösungen und Nährmedium immer getrennt autoklavieren (Maillard-Reaktion!)

#### b) Bioreaktor

- Kalibrierung und Einbau der pH-Elektrode
- Einbau der pO<sub>2</sub>-Sonde
- Kalibrierung der Pumpen
- Ansetzen und Autoklavieren der Korrekturmittel, Schläuche manuell füllen
- Sterilisation des Kulturgefäßes mit der Hauptkultur
- Kalibrierung der pO<sub>2</sub>-Sonde bei Kultivierungstemperatur und -drehzahl
- Sterile Anbindung der Peripherie

#### c) Anzucht in Petrischalen

Es werden 200 mL Nährmedium pH = 7,0 für 10 Petrischalen vorbereitet.

- |                    |        |
|--------------------|--------|
| Glucose-Monohydrat | 20 g/L |
| Hefeextrakt        | 10 g/L |
| CaCO <sub>3</sub>  | 10 g/L |
| Agar               | 25 g/L |
- 4 g Glucose in 50 mL dest. Wasser lösen
  - 2 g Hefeextrakt, 2 g CaCO<sub>3</sub> und 5 g Aga in 150 mL auf 80°C vorgewärmtes dest. Wasser lösen
  - Glucoselösung und Nährmedium getrennt autoklavieren und abkühlen lassen
  - Steril vermischen, auf die 10 Petrischalen verteilen und trocknen lassen
  - Petrischalen mit *Xanthomonas campestris* im 13-Strich-Verfahren animpfen und im Brutschrank für 48 h bei 27°C inkubieren.

#### d) Vorkultur I

Es werden 7 × 20 mL Nährmedium pH = 7,0 vorbereitet.

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| Glucose - Monohydrat | 10 g/L |
| Hefeextrakt          | 5 g/L  |
| Pepton aus Casein    | 5 g/L  |

- 1,4 g Glucose im 50 mL Erlenmeyerkolben abwägen und in 14 ml dest. Wasser lösen
- 0,7 g Hefeextrakt und 0,7 g Pepton aus Casein in 126 mL dest. Wasser lösen und auf pH = 7 einstellen
- Jeweils 18 mL Lösung auf sieben (7) 100 mL-Erlenmeyerkolben verteilen
- Glucoselösung und Nährmedium getrennt autoklavieren und abkühlen lassen
- Glucoselösung steril mit dem Nährmedium vermischen; 2 mL Glucose pro Kolben
- 4 volle Ösen *Xanthomonas campestris* von den Petrischalen in jeden Kolben überführen
- Inkubation für ca. 36 h bei 27°C und 100 U/min im Thermoschüttler

#### e) Vorkultur II

Es werden 7 × 200 mL Nährmedium pH = 7,0 vorbereitet.

- |  |            |
|--|------------|
| Glucose-Monohydrat                     | 55 g/L     |
| Citronensäure-Monohydrat               | 2,3 g/L    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 5,0 g/L    |
| NH <sub>4</sub> Cl                     | 2,0 g/L    |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>        | 0,5 g/L    |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>        | 0,114 g/L  |
| MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O | 0,163 g/L  |
| FeCl <sub>3</sub>                      | 0,0014 g/L |
| ZnCl <sub>2</sub>                      | 0,0067 g/L |
| CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O  | 0,012 g/L  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>         | 0,006 g/L  |

- 7 × 11 g Glucose in 7 × 50 mL dest. Wasser lösen
- Salzlösungen auf 1400 mL umrechnen und in 910 mL dest. Wasser lösen, den pH-Wert auf 7,0 einstellen
- je 130 mL der Salzlösung auf die sieben Schüttelkolben verteilen
- Glucose-Lösung und Nährmedium getrennt autoklavieren
- Nach dem Abkühlen in jeden Kolben 50 mL Glucoselösung und 20 mL Vorkultur I steril zuführen.

Die Anzucht dauert ca. 48 h bei 27°C und 100 U/min im Thermoschüttler (z. B. CERTOMAT®, Sartorius).

### f) Hauptkultur

Medienkomponenten sind mit der Vorkultur II identisch. Die Menge an Glucose und Salzen werden auf 4 L Endvolumen hochgerechnet. Die Glucoselösung wird im Kulturgefäß des Fermenters sterilisiert. Die Salzlösung wird nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 separat autoklaviert und steril dem Fermenter zugeführt. Das Inokulum besteht aus 1400 mL der Vorkultur II. Die Inokulummenge wird erhöht, um die Fermentationsdauer zu verkürzen.

### g) Korrekturmittel

Säure 2 N H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>  
Lauge 20% (w | w) KOH  
Antischaum 1% (w | w) Silikonöl (Serva)

### h) Kulturbedingungen

Kulturvolumen 4 L  
Belüftungsrate ab 0,125 vvm  
Rührerdrehzahl ab 100 U/min  
Temperatur 27°C  
pO<sub>2</sub> 40%, geregelt  
pH value 7,0 geregelt

## 3. Analytik

### Biotrockensubstanz

Für die Bestimmung der Biotrockensubstanz stehen verschiedene Methoden zur Auswahl:  
– BTS-Bestimmung mit dem Moisture Analyzer  
– BTS-Bestimmung im Trockenschrank  
– BTS-Bestimmung in der Mikrowelle

### Xanthankonzentration

Das Polysaccharid Xanthan wird mit Methanol ausgefällt, gewaschen, getrocknet und gewogen. Dazu werden 5 mL des Überstandes in ein getrocknetes und gewogenes Zentrifugenröhrchen pipettiert, und unter ständigem Rühren auf dem Whirl-Mix 15 mL Methanol tropfenweise zugegeben. Anschließend wird 30 min bei 15°C und 1700 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet mit 5 mL 1%iger KCl-Lösung resuspendieren und den o. g. Fällungsschritt wiederholen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei 80°C für 24 h im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exikator werden die Röhrchen erneut abgewogen und die Xanthankonzentration nach folgender Gleichung berechnet:

$$c_{\text{Xanthan}} [\text{g/L}] = (\text{Gewicht}_{\text{voll}} [\text{g}] - \text{Gewicht}_{\text{leer}} [\text{g}]) * \text{DF} * 1000 [\text{mL}] / 5 [\text{mL}]$$

mit DF = Verdünnungsfaktor

### Viskosität

Zur Bestimmung der Viskosität des Fermentationsmediums kann z. B. das FANN-Direct-Reading Viskosimeter Modell 35 A verwendet werden. Zur Viskositätsmessung wird die unbehandelte Probe verwendet. Bei einem hohen Anteil an Luftblasen in der Fermentationsbrühe wird die Probe auf einer Platte flach ausgestrichen. Nachdem ein Großteil der Blasen gewichen ist, wird die Probe in das thermostatisierte Probengefäß des Viskosimeters überführt. Bestimmung der Viskosität siehe Bedienungsanleitung.

### Glucose

Die Glucosebestimmung kann mittels  
– Glucoseanalyzer (z. B. YSI-Modelle) oder  
– mit dem Testkit Nr. 071 6251 (Roche Diagnostics) laut Herstellerprotokoll durchgeführt werden.

Sartorius Stedim Biotech GmbH  
August-Spindler-Strasse 11  
37079 Goettingen, Germany

Phone +49.551.308.0  
Fax +49.551.308.3289  
www.sartorius-stedim.com

USA Toll-Free +1.800.368.7178  
UK +44.1372.737159  
France +33.442.845600  
Italy +39.055.63.40.41  
Spain +34.91.3586102  
Japan +81.3.3740.5407

Specifications subject to change without notice. Printed and copyrighted by Sartorius Stedim Biotech GmbH  
W · G  
Publication No.: SBT1005-d09061  
Order No.: 85034-538-36  
Ver. 06 | 2009