

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 803038 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 803038

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 26.09.1980

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 26.09.1980

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 01.01.1981

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

28.09.1979 US 079,665 10.04.1980 US 139,036

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Kita, Donald Albert, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Fentor, Dennis Michael, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

2,5-diketoglukonihapon valmistus.

Framställning av 2,5- diketoglukonsyra.

Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, N.Y., Yhdysvallat

2,5-diketoglukonihapon valmistus - Framställning av 2,5-diketoglukonsyra

Keksinnön kohteena on 2,5-diketoglukonihapon valmistus, joka on käyttökelpoinen välituotteena askorbiinihappoa valmistettaessa. 2,5-diketoglukonihapon liuos voidaan selektiivisesti pelkistää 2-ketogulonihapoksi, joka voidaan muuttaa askorbiinihapoksi. 2,5-diketoglukonihapon pelkistäminen voidaan suorittaa alkalimetalliboori-hydridi-pelkistyksellä kuten on esitetty U.S.patentissa nro 4 159 990 tai fermentiivisesti pelkistämällä kuten on kuvattu esim. U.S.patentissa nro 3 922 194, 3 959 076 ja 3 963 574.

2,5-diketoglukonihappo on myös käyttökelpoinen välituotteena komeenihapon valmistamisessa kuumentamalla sitä hapon läsnäollessa, kuten on selostettu esimerkiksi U.S.patentissa nro 3 654 316.

Tähän asti 2,5-diketoglukonihappoa on valmistettu useilla erilaisilla bakteeri-lajeilla, kuten *Acetobacter melanogenum*, *Acetobacter aurantium*, *Gluconoacetobacter rubiginosus*, *Gluconoacetobacter liguifaciens* ja *Pseudomonas sesami*. Näiden mikro-organismien

käyttö ei kuitenkaan ole tyydyttävä teolliselta näkökannalta, mikä johtuu suhteellisen alhaisista 2,5-diketoglukonihappo-saaliista, suhteellisen pitkistä fermentointiajoista sekä siitä, että viljelyn sivutuotteina muodostuu suuria määriä ruskeita tai kellanruskeita pigmenttejä, vähentäen siten halutun 2,5-diketoglukonihapon puh-
tautta.

U.S.patentin nro 3 790 444 kohteena on 2,5-diketoglukonihapon valmistus, johon ei liity ruskean pigmentin muodostumista, uudella lajilla, joka on nimitetty Acetobacter fragum ATCC nro 21409:ksi.

U.S.patenttihakemuksen nro 79 668, jätetty 28.9.1979, kohteena on 2,5-diketoglukonihapon valmistaminen hyvillä saaliilla ilman pigmentoidun aineksen muodostumista saattamalla Acetobacter cerinus aerobisesti lisääntymään glukoosia sisältävässä väliaineessa. Samalla kun voidaan käyttää glukoosin kokonaismääriä väliltä n. 2,5- % - n. 20 % (paino/tilav.), on havaittu, että mikro-organismit eivät voi sietää väliaineessa suurempia glukoosin alkupitoisuuksia kuin 15 %. Niinmuodoin glukoosin kokonaismääriä, jotka ovat suurempia kuin n. 15 % (paino/tilav.) voidaan käyttää ainoastaan suorittamalla fermentointi glukoosinalkupitoisuudessa n. 10 % - 15 % (paino/tilav.) ja senjälkeen lisäämällä lisämääriä glukoosia fermentointiväliaineeseen fermentoinnin edetessä, niin että glukoosin pitoisuus väliaineessa ei minään ajankohtana ylitä n. 15 % (paino/tilav.). Siten tähän asti on kokonaispitoisuuksia tai 2,5-diketoglukonihapon tuotantokykyä rajoittanut suhteellisen alhainen alkuglukoosipitoisuus, jota voidaan käyttää fermentointiväliaineessa. Muiden prosessien. joissa käytetään muita mikro-organismeja, tuottavuutta 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi, kuten edellä kuvattiin, rajoittaa myös pakko käyttää suhteellisen alhaista alkuglukoosi-pitoisuutta fermentointiväliaineessa.

On siis selvää, että menetelmä, jossa mikro-organismit voivat sietää ja käyttää hyväksi alkuglukoosipitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin n. 15 % (paino/tilav.), erityisesti yli 20 %:n tasoja, 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi, saa aikaan olennaisen lisäyksen tuotantokyvyssä ja siitä on seurauksena oleellisia säästöjä työprosessissa. Tällaisella menetelmällä vältetään myös fermentointiväliaineen saastumismahdollisuus, jota saastumista voi tapahtua, kun tuotantokykyä lisätään lisäämällä glukoosilisäyksiä fermentoinnin aikana.

Tämän keksinnön mukaisesti on nyt havaittu, että mikro-organismi *Acetobacter cerinus* voi käyttää hyväksi yli 20 %:n alkuglukoosipitoisuuksia ja n. 30 %:iin asti (paino/tilav.) fermentointiväliaineessa 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi, kun fermentointiväliaineeseen lisätään vähintään n. 0,04 paino-% koliinia, laskettuna D-glukoosin määrästä väliaineessa. Erityisesti tämä keksintö antaa menetelmän 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi suurissa pitoisuuksissa fermentointiväliaineessa ^{kasvatuskannalla} (saattamalla) *Acetobacter cerinus* aerobisesti lisääntymään fermentointiväliaineessa, joka sisältää D-glukoosia yli 20 %:n alkuväkevyydessä ja n. 30 %:iin (paino/tilav.) asti ja koliinia vähintään n. 0,04 paino-% määrässä, laskettuna D-glukoosin määrästä väliainesssa. Alkuglukoosiväkevyyys fermentointiväliaineessa on edullisesti n. 25 % - 30 % (paino/tilav.). Lisääntyminen saatetaan edullisesti tapahtumaan lämpötilassa väliltä 25-30°C, edullisesti pH:ssa väliltä n. 5-6. Edullisia kantoja ovat *Acetobacter cerinus* tai *Acetobacter cerinus* IFO 3263 ja IFO 3266.

2,5-diketoglukonihappoa valmistetaan tämän keksinnön menetelmällä hyvällä saattilla, ilman että muodostuu merkittäviä määriä pigmentoituja aineksia ja suhteellisen lyhyissä fermentointiajoissa. Lukuisia *Acetobacter cerinus* kantoja kuten IFO 3262 (ATCC 12303) IFO 3263, IFO 3264, IFO 3265, IFO 3266, IFO 3267, IFO 3268 ja IFO 3269 on julkisesti saatavissa ja niitä voidaan käyttää tässä menetelmässä 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi. Erityisen edullisia kantoja ovat IFO 3263 ja IFO 3266. On selvää, että näiden mikro-organismien mutantit, jotka on saatu aikaan tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi säteilyttämällä röntgensäteillä tai ultraviolettivalolla, käsittelemällä röntgensäteillä tai ultraviolettivalolla, käsittelemällä typpisinapeilla jne., ovat myös käyttökelpoisia tässä menetelmässä ja kuuluvat tämän selityksen ja patenttivaatimuksien piiriin.)

Acetobacter cerinus'ta viljellään väliaineessa, jonka päähiililähteenä on D-glukoosi. On ymmärrettävä, että tavanomaisen fermentointikäytännön mukaisesti fermentointiväliaine sisältää myös typpi-, kalium-, fosfori- ja magnesium-lähteitä. Käsite "fermentointiväliaine" tässä selityksessä ja patenttivaatimuksissa on tarkoitettu määrittämään väliaineen, joka sisältää tällaisia yhdisteitä. Kun tässä menetelmässä käytetään *Acetobacter cerinus*-mikro-organismia, ei ole tarpeen käyttää kalliita orgaanisia typpilähteitä, kuten

7015
-pm liite 1,
58

peptonia tai lihausutetta. Typpi voidaan taloudellisesti saada käyttämällä urea^g tai epäorgaanisia typpilähteitä, kuten ammoniumsulfaattia, ammoniumnitraattia, ammoniumfosfaattia tai samankaltaisia suoloja, yleensä määrissä väliltä n. 0,1 g - 2 g/litra fermentointiväliainetta, ~~kun~~ nikotiinihappoa myös lisätään kasvutekijäksi, yleensä määrässä n. 0,2 - 10 mg/l fermentointiväliainetta. Kalium, magnesium ja fosfori saadaan helposti lisäämällä suoloja, kuten kaliumfosfaattia, ammoniumfosfaattia, magnesiumsulfaattia tai samankaltaisia suoloja, yleensä määrissä väliltä n. 0,1- n. 1 g/l fermentointiväliainetta. Huomattava vaihtelu fermentointiväliaineen koostumuksessa on kuitenkin mahdollinen. Muut sopivat väliaineet käyvät helposti selville alaan perehtyneille eikä tätä menetelmää ole tarkoitus rajoittaa edellä ja esimerkeissä kuvattujen nimenomaisen väliaineiden käyttöön. Tämän menetelmän mukaisesti fermentointiväliaine sisältää D-glukoosia alkupitoisuuksissa, jotka ovat suurempia kuin tähän asti on ollut mahdollista ilman vahingollista vaikutusta fermentoinnissa käytettyihin mikro-organismeihin. Erityisesti alku-D-glukoosi-pitoisuus tässä menetelmässä käytetyssä fermentointiväliaineessa on yli 20 % ja n. 30 %:iin asti (paino/tilav.), Jos halutaan, voidaan D-glukoosi lisätä sereloosina (D-glukoosimonohydraattina).

Jotta *Acetobacter cerinus*-mikro-organismit pystyisivät sietämään ja käyttämään hyväksi tällaiset ^{la}suuret ^{la}glukoosi-pitoisuudet ^{lsc}fermentointiväliaineessa, on tarpeen lisätä fermentointiväliaineeseen koliinia vähintään n. 0,04 paino-%:n määrä, laskettuna D-glukoosin alkumäärästä fermentointiväliaineessa. Jos halutaan, voidaan käyttää suhteellisen suuria koliini-määriä, esimerkiksi n.0,5 paino-%, laskettuna alku-D-glukoosi-pitoisuudesta käymisväliaineessa, vaikkakin saavutetaan vain vähäistä etua käytettäessä enemmän kuin n. 0,1 paino-% koliinia ja n. 0,04- n. 0,06 paino-% koliinia pidetään yleensä parhaana. Koliini voidaan lisätä joko vapaana emäksenä tai suolana, esimerkiksi koliinikloridina, koliinidikarbonaattina, koliinisitraattina, koliiniglukonaattina tai samankaltaisina suoloina. Koliinikloridi on edullinen suola. Koliinin pitoisuus, kuten se on määriteltä tässä patenttiselityksessä ja patenttivaatimuksissa, lasketaan koliini-emäksenä. Pieni osa tarvittavasta koliinista voidaan saada, jos halutaan, lisäämällä käymisväliaineeseen maissin

liuotusnestettä. Maissin liuotusneste, jota on käytetty käymisväliaineessa vitamiinien ja mineraalien lähteenä, sisältää yleensä vain n. 0,5 - 3 mg koliinia g:aa kohti maissin liuotusnestettä. Kuitenkaan ei tavallisesti käytetä enempää kuin n. 5 g maissin liuotusnestettä litraa kohti käymisväliainetta, sillä maissin liuotusneste sisältää väriaineita ja yli n. 5 g:n maissin liuotuslientä litraa kohti käymisväliainetta lisääminen tekee 2,5-diketogluukonihapon talteenoton ja puhdistamisen vaikeammaksi. Siten maissin liuotusnestettä voidaan käyttää, jos niin halutaan, lähteenä ainoastaan pienelle osalle käymiseen tarvittavasta koloonista ja loput tarvittavasta koliinimäärästä lisätään käymisväliaineeseen koliini-emäksenä tai sen suolana, kuten edellä selostettiin.

Käyminen saatetaan yleensä tapahtumaan lämpötilassa väliltä 20°- 35°C, edullisesti välillä 25°-30°C ja kaikkein edullisimmin n. 28°C:ssa. Viljelyväliaineen alku pH on väliltä n. 3,5-7,5, edullisesti välillä n. 5-6. Käymisen aikana pH pidetään edullisesti tällä alueella, edullisesti n. 5,5:ssä, esimerkiksi lisäämällä alkalimetallihydroksidia, edullisesti natriumhydroksidiliuosta. Vaihtoehtoisesti pH:n säätöön voidaan käyttää alkalimetalli- tai maa-alkalimetallikarbonaattia, edullisesti kalsiumkarbonaattia ja sitä lisätään tähän tarkoitukseen väliaineena valmistuksessa autoklaavi-käsittelyn jälkeen määrässä, joka on riittävä antamaan halutun pH:n, yleensä n. 20-30 g/100 g glukoosia. Lisäksi on ymmärrettävä, että 2,5-diketogluukonihappoa saadaan tällaisissa käymisväliaineissa vastaavien alkali- tai maa-alkalimetallisuolojen, kuten natrium- tai kalsiumsuolojen muodossa, ja että tällaiset suolat sisältyvät käsitteen "2,5-diketogluukonihappo" käyttöön tässä selityksessä ja patenttivaatimuksissa.

Ympäyksen jälkeen käymisväliainetta sekoitetaan, esimerkiksi mekaanisella sekoittimella ja ilmastetaan, edullisesti n.0,5-1 tilavuusosan määrällä ilmaa tilavuusosaa kohti käymislientä minuutissa. Jos halutaan, voidaan ylimääräistä glukoosia lisätä vielä käymisen aikana korvaamaan osa käymisessä hyväksikäytetystä glukoosista, lisäten siten saadun 2,5-diketogluukonihapon kokonaispitoisuutta käymisliemessä.

Käymisen annetaan jatkua kunnes haluttu saalis on saatu. Esimerkiksi käytettäessä *Acetobacter cerinus* IFO 3263 tai 3266 antaa n. 40-50 tunnin käymisaika n. 90-95 %:n 2,5-diketogluukonihappo-

saaliin, laskettuna D-glukoosista. Kuitenkin on odotettavissa jonkin verran vaihtelua reaktioajoissa ja saaliissa riippuen mikro-organismin nimenomaisesta kannasta, glukoosi-pitoisuudesta käymisväliaineessa ja viljelylämpötilasta.

Haluamatta olla sidottu seuraavaan mekanismiin, uskotaan, että glukoosin konversio 2,5-diketoglukonihapoksi etenee seuraavia teitä:

glukoosi $\rightarrow$ 2-ketoglukonihappo $\rightarrow$ 2,5-diketoglukonihappo

glukoosi $\rightarrow$ 5-ketoglukonihappo $\rightarrow$ 2,5-diketoglukonihappo.

Välituotteet 2-ketoglukoni- ja 5-ketoglukonihappo ja 2,5-diketoglukonihappo voidaan erottaa paperikromatografisesti käyttäen Whatman nro 1 ja nro 4 paperia ja liuotinjärjestelmää metyylietyyliketoni/asetoni/muurahaishappo/vesi (80:6:2:12). Happojen täplät paikallistetaan suihkuttamalla 0,2-%:sella o-fenyleenidiamiinin etanolipitoisella liuoksella, joka sisältää 1 % typpihappoa ja kuumentamalla n. 70°C:seen (5-ketoglukonihappo -sininen; 2-ketoglukonihappo -keltainen; 2,5-diketoglukonihappo -vihreä). Voidaan käyttää myös suurpainenestekromatografiaa. Käyttämällä edellä esitettyjä menetelmiä voidaan seurata käymisen edistymistä.

2,5-diketoglukonihappo voidaan erottaa ja ottaa talteen lopullisesta käymisliemestä jollakin tavanomaisella alaan perehtyneen tuntemalla menetelmällä. Käymisliemi voidaan esimerkiksi suodattaa, vesipitoisen suodoksen pH asettaa n. 2-2,5:een lisäämällä mineraalihappoa, kuten kloorivetyhappoa, mitä seuraa liuoksen väkevöinti ja alemman alkyylialkoholin, edullisesti etanolin tai metanolin lisääminen. Annettaessa seistä 2,5-diketoglukonihappo erottuu kalsium- tai natriumsuolansa muodossa liuoksesta kiinteänä aineena. 2,5-diketoglukonihappo saadaan suolasta käsittelemällä laimealla mineraalihapolla, mitä seuraa käsittely esimerkiksi kationinvaihtohartsilla, kuten sulfonihappohartsilla, esimerkiksi Dowex 50:llä (Dow Chemical Company).

Jos halutaan, voidaan käymislientä käsitellä muodostuneen 2,5-diketoglukonihapon muuttamiseksi muiksi halutuiksi tuotteiksi, esimerkiksi fermentiivisellä pelkistyksellä 2-ketog^{ul}glukonihapoksi, kuten on kuvattu U.S.patenteissa nro 3 922 194, 3 959 076 tai 3 963 574. Vaihtoehtoisesti suodatettua käymislientä voidaan käyttää sopivana reaktioliuoksena 2,5-diketoglukonihapon pelkistämiseksi 2-ketog^{ul}glukonihappoa sisältäväksi liuokseksi saattamalla reagoimaan

alkalimetalliboorihydridin kanssa, kuten on kuvattu U.S.patentissa nro 4 159 990. Näissä reaktioissa valmistunut 2-ketoglu^ukonihappo muutetaan helposti askorbiinihapoksi alalla tunnetuin menetelmin, esimerkiksi kuumet^uttamalla sen metyyliesteriä emäksen läsnäollessa.

Keksintöä valaistaan seuraavin esimerkein. [On kuitenkin ymmärrettävä, että keksintöä ei rajoiteta näiden esimerkkien spesifisiin yksityiskohtiin.]

Esimerkki 1

Valmistettiin seuraava vesipitoinen ympäpiväliaine:

<u>Aineosa</u>	<u>grammaa/l</u>
glukoosi-monohydraatti	25
maissin liuotusneste	5
KH_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
CaCO_3	7,0

pH 6,2

Ravistuspulloa, joka sisälsi 1 litran väliainetta, käsiteltiin autoklaavissa 30 minuuttia 121°C :ssa. *Acetobacter cerinus* IFO 3263:n soluja ravintoaagari-viillosta (5 ml 20 ml:n steriilistä vesipitoisesta suspensiosta) lisättiin pulloon, jota sitten tärästettiin pyörivällä tärästimellä n. 28°C :ssa n. 24 tuntia. Jäähdytetyn väliaineen pH oli 5,0.

Viljelykasvun tasaosa, joka oli riittävä antamaan 10 %:n tilav./tilav. ympin, lisättiin 4 l:n sekoituksenalaaiseen käymisastiaan, joka sisälsi 2 l seuraavaa valmistusväliainetta:

<u>Aineosa</u>	
glukoosi-monohydraatti	225 g/l
maissin liuotusneste	0,5 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5 g/l
KH_2PO_4	1,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
urea	1,0 g/l
koliinikloridi	100 mg/l
nikotiinihappo	10 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg/l
P-2000 Antifoam	1,0 mg/l

pH 6,0

Käyminen saatettiin tapahtumaan 28°C:ssa sekoittaen kierrosluvulla 1700 r/min. ja ilmastamalla määrässä 1,0 tilavuusosaa/tilavuusosaa lientä/minuutti. pH pidettiin 5,5:ssä lisäämällä 20-%:sta natriumhydroksidiliuosta tarpeen mukaan, 2,5-diketoglukonihappoa saatiin natriumsuolana 95 %:n saaliilla 48 tunnin käymisajan jälkeen.

Esimerkki 2

Valmistettiin seuraava vesipitoinen ympäiväliaine:

<u>Aineosa</u>	<u>Grammaa/l</u>
glukoosi-monohydraatti	25
maissin liuotusneste	5
KH_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
CaCO_3	7,0

Ravistuspulloa, joka sisälsi 1 l:n väliainetta, käsiteltiin autoklaavissa 30 minuuttia 121°C:ssa. *Acetobacter cerinus* IFO 3263:n soluja ravintoaagari-viillosta (5 ml 20 ml:n steriilistä vesipitoisesta suspensiosta) lisättiin pulloon, jota sitten tärytettiin pyörivällä täryttimellä n. 28°C:ssa n. 24 tuntia. Jäähdytetyn väliaineen pH oli 5,0.

Viljelykasvun tasaosa, joka oli riittävä antamaan 10 %:n tilav./tilav. ympin, lisättiin 4 l:n sekoituksenalaiseen käymisastiaan, joka sisälsi 2 l seuraavaa väliainetta:

<u>Toisen vaiheen ympä</u>	<u>g/l</u>
glukoosi-monohydraatti	100
maissin liuotusneste	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5
KH_2PO_4	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
urea	1,0
nikotiinihappo	10,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
koliinikloridi	500 mg
P2000	0,5 ml

Toinen vaihe saatettiin tapahtumaan 28°C:ssa sekoittaen kierrosluvulla 1700 r/min. ja ilmastamalla määrässä 1,0 tilavuusosaa/tilavuusosaa lientä/minuutti. pH pidettiin 5,5:ssä lisäämällä 20-%:sta natriumhydroksidiliuosta tarpeen mukaan.

20 tunnin kuluttua lisättiin viljelyyn kasvun tasaosa, joka oli riittävä antamaan 10 %:n tilav./tilav. ympä, 14 l:n sekoituksenalaiseseen käymisastiaan, joka sisälsi 6 l seuraavaa valmistusväliainetta:

<u>Aineosa</u>	<u>g/l</u>
glukoosi-monohydraatti	334
maissin liuotusneste	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,58
KH_2PO_4	1,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
urea	1,0
nikotiinihappo	10,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
koliinikloridi	150 mg
P2000	0,5 ml

Käyminen saatettiin tapahtumaan 28°C:ssa sekoittaen kierrosluvulla 750 r/min. ja ilmastamalla määrässä 1,0 tilavuusosaa/tilavuusosaa lientä/minuutti. pH pidettiin 5,5:ssä lisäämällä 20-%:sta natriumhydroksidiliuosta tarpeen mukaan. 2,5-diketoglukonihappoa natriumsuolanaan saatiin 95 %:n saaliilla 6570 tunnin käymisajan jälkeen.

Esimerkki 3

Seuraten esimerkin 1 menettelyä testattiin kukin *Acetobacter cerinuskannoista* IFO 3262, 3264, 3265, 3266, 3267, 3268 ja 3269. Kussakin tapauksessa käymistuote sisälsi 2,5-diketoglukonihappoa yli 50 %:n saaliilla, yhdessä pienen määrän kanssa muuttumattomia 2-ketoglukonihappo- ja 5-ketoglukonihappoväliaineita. Halutun 2,5-diketoglukonihapon suurempia saaliita saadaan käyttämällä pitempiä käymisaikoja käytettäessä näitä *Acetobacter cerinus*-kantoja.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä 2,5-diketoglukonihapon valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että saatetaan *Acetobacter cerinus* aerobisesti lisääntymään käymisväliaineessa, joka sisältää D-glukoosia yli n. 20 %:n alkupitoisuudessa ja n. 30 %:iin asti (paino/tilav.) sekä koliinia määrässä vähintään n. 0,04 paino-%, laskettuna D-glukoosin alkumäärästä tässä väliaineessa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että D-glukoosin alkupitoisuus on väliltä n. 25 - 30 % (paino/tilav.).

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että väliaine sisältää koliinia määrässä väliltä n. 0,04 paino-% - 0,1 paino-%.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisääntyminen saatetaan tapahtumaan lämpötilassa väliltä n. 25 - 30°C.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisääntyminen saatetaan tapahtumaan pH:ssa väliltä n. 5-6.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pH ylläpidetään lisäämällä natriumhydroksidia.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että väliaine sisältää koliinia määrässä väliltä n. 0,04 paino-% - 0,1 paino-% ja lisääntyminen tapahtuu välillä n. 25 - 30°C ja pH:ssa väliltä n. 5-6.

8. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että *Acetobacter cerinus* on kanta IFO 3263.

9. Patenttivaatimuksen 1 tai patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että *Acetobacter cerinus* on kanta IFO 3266.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av 2,5-diketoglukonsyra, k ä n n e t e c k n a t därav, att Acetobacter cerinus bringas aerobiskt fortplanta i ett fermentationsmedium innehållande D-glukos i en begynnelsekoncentration av över ca 20 % och upp till ca 30 % (vikt/vol) och kolin i en mängd av minst ca 0,04 vikt-% baserat på begynnelsemängden av D-glukos i mediet.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att begynnelsekoncentrationen av D-glukos är från ca 25 % till 30 % (vikt/vol).

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att mediet innehåller kolin i en mängd från ca 0,04 vikt-% till 0,1 vikt-%.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att fortplantningen sker vid en temperatur mellan ca 25°C och 30°C.

5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att fortplantningen sker vid ett pH från ca 5 till 6.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att pH-värdet upprätthålles genom tillsatsen av natriumhydroxid.

7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att mediet innehåller kolin i en mängd mellan ca 0,04 vikt-% och 0,1 vikt-% och fortplantningen sker vid en temperatur mellan ca 25°C och 30°C och vid ett pH från ca 5 till 6.

8. Förfarande enligt patentkravet 1 eller patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att Acetobacter cerinus är stammen IFO 3263.

9. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att Acetobacter cerinus är stammen IFO 3266.