



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 181**

51 Int. Cl.:  
**C12P 17/04** (2006.01)  
**C12P 7/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03750591 .4**  
86 Fecha de presentación : **22.09.2003**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1543136**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

54 Título: **Producción microbiana de vitamina C.**

30 Prioridad: **27.09.2002 EP 02021597**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2007**

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es: **Hoshino, Tatsuo y**  
**Sugisawa, Teruhide**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 278 181 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Producción microbiana de vitamina C.

5 La presente invención se relaciona con la producción microbiana de ácido L-ascórbico (vitamina C).

La vitamina C, que es uno de los factores nutricionales muy importantes e indispensables para los seres humanos, ha sido producida comercialmente mediante el denominado “Método Reichstein”, que es bien conocido como un proceso tecnológicamente establecido. Este método, sin embargo, comprende una serie de pasos complejos y es difícil  
10 lograr una mejora en el rendimiento global. Por consiguiente, se han hecho una cantidad de propuestas que contemplan una reducción en el número de pasos y/o una mejora en el rendimiento general.

La presente invención proporciona un proceso para la producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa mediante el cultivo de un microorganismo seleccionado entre la cepa *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos, en un medio nutriente acuoso que contiene D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa y el aislamiento y la purificación de la vitamina C del medio de fermentación.  
15

Más particularmente, la presente invención proporciona un proceso para la producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa que comprende los pasos de:

(a) cultivo de un microorganismo en un medio nutriente acuoso que contiene D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos, y  
25

(b) aislamiento y purificación de la vitamina C del medio de fermentación.

En una materialización preferida, la vitamina C se produce a partir de L-gulosa o L-sorbosona mediante el proceso definido antes. Una materialización que se prefiere más es un proceso para la producción de vitamina C a partir de L-gulosa que comprende los pasos de:

(a) cultivo de un microorganismo en un medio nutriente acuoso que contiene L-gulosa, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos, y  
35

(b) aislamiento y purificación de la vitamina C del medio de fermentación.  
40

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa el cual comprende poner en contacto un microorganismo seleccionado entre la cepa *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos con D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa en una mezcla de reacción y aislar y purificar la vitamina C de la mezcla de reacción.  
45

Más particularmente, la presente invención apunta a un método para producir vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa el cual comprende poner en contacto un microorganismo seleccionado entre la cepa *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos con D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa en una mezcla de reacción y aislar y purificar la vitamina C de la mezcla de reacción.  
50

*G. oxydans* DSM 4025 se depositó en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) en Göttingen (Alemania), sobre la base de las estipulaciones del Tratado de Budapest, con el N° DSM 4025 el 17 de marzo de 1987. El depositante fue The Oriental Scientific Instruments Import and Export Corporation por el Instituto de Microbiología de la Academia Sinica, 52 San-Li-He Rd., Beijing, República Popular de China. El depositante efectivo fue dicho Instituto, del cual la dirección completa es Institute of Microbiology, Academia of Sciences de China, Haidian, Zhongguancun, Beijing 100080, República Popular de China.  
55

Por otra parte, también se depositó un subcultivo de la cepa en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba Central 6,1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japón, también sobre la base de las estipulaciones del Tratado de Budapest, con el N° de depósito FERM BP-3812 el 30 de marzo de 1992. El depositante fue Nippon Roche K.K., 6-1, Shiba 2-chome, Minato-ku, Tokio 105-8532 Japón. Este subcultivo también se puede utilizar en la presente invención.  
60  
65

Los mutantes de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) o de un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) se pueden obtener

## ES 2 278 181 T3

tratando las células por medio de, por ejemplo, irradiación ultravioleta o de rayos X, o de un mutágeno químico como la mostaza de nitrógeno o N-metil-n-nitro-N-nitrosoguanidina.

5 Se comprende que “*Gluconobacter oxydans*” también incluye sinónimos o basónimos de dicha especie que tengan las mismas propiedades fisicoquímicas, según define el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas.

10 Se puede usar cualquier tipo de microorganismo, por ejemplo, células en reposo, células tratadas con acetona, células liofilizadas, células inmovilizadas y similares para que actúen directamente sobre el sustrato. Se puede adoptar cualquier medio conocido en sí como un método relacionado con la técnica de incubación a través del uso de aireación y se prefieren particularmente los fermentadores sumergidos con agitación. El rango de concentración celular preferido para llevar a cabo la reacción es entre aproximadamente 0,01 g de peso húmedo de las células por ml y 0,7 g de células húmedas por ml, preferentemente entre 0,03 g de células húmedas por ml y 0,5 g de células húmedas por ml.

15 El cultivo se puede realizar a un pH de 4,0 a 9,0, donde se prefiere un valor de pH de aproximadamente 5,0 a 8,0. El período de cultivo varía dependiendo del pH, la temperatura y el medio nutriente que se va a usar, y es preferentemente de aproximadamente 1 a 5 días, muy preferentemente de aproximadamente 1 a 3 días. El rango de temperatura preferido para llevar a cabo el cultivo es entre aproximadamente 13°C y 36°C, más preferentemente entre 18°C y 33°C. Un resultado que se prefiere se puede obtener de una incubación que utiliza un medio de cultivo líquido como un caldo.

20 Por consiguiente, es un aspecto de la presente invención proporcionar un proceso para la producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa que comprende los pasos de:

25 (a) cultivo de un microorganismo en un medio nutriente acuoso que contiene D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos, y

30 (b) aislamiento y purificación de la vitamina C del medio de fermentación;

donde el proceso se lleva a cabo a un pH en el rango de aproximadamente 4,0 a 9,0 y a un rango de temperaturas entre aproximadamente 13°C y 36°C durante 1 a 5 días.

35 En una materialización preferida, el proceso se lleva a cabo a un pH en el rango de aproximadamente 5,0 a 8,0 y a un rango de temperaturas entre aproximadamente 18°C y 33°C durante 1 a 3 días.

40 Como medio nutriente para la incubación de los microorganismos se puede usar cualquier medio nutriente acuoso que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, otras sales inorgánicas, pequeñas cantidades de otros nutrientes y similares, incluidos minerales y vitaminas, que puedan ser utilizados por el microorganismo. Varios nutrientes que generalmente se usan para mejorar el crecimiento de los microorganismos pueden ser adecuadamente incluidos en el medio.

45 En general se requiere que el medio de cultivo contenga dichos nutrientes como fuentes de carbono asimilables, por ejemplo glicerol, D-manitol, eritritol, ribitol, xilitol, arabitol, inositol, dulcitol, D-ribosa, D-fructosa, D-glucosa y sacarosa además de las fuentes de carbono convertidas en vitamina C; y las fuentes de nitrógeno digeribles como las sustancias orgánicas, por ejemplo, peptona, extracto de levadura, levadura de panadería, urea, aminoácidos y agua de macerado del maíz. También se pueden utilizar como fuentes de nitrógeno diversas sustancias inorgánicas, por ejemplo, nitratos y sales de amonio. Además, el medio de cultivo habitualmente contiene sales inorgánicas, por ejemplo sulfato de magnesio, fosfato de potasio y carbonato de calcio.

50 Para un rendimiento ventajoso de la incubación, se puede agregar al medio cualquier factor adecuado que pueda promover la formación del producto final. Dichos factores comprenden, pero no exclusivamente, solventes, detergentes, antiespumante y condiciones de aireación como concentración de oxígeno aplicada a la reacción.

55 Aunque la concentración de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa también se puede variar con las condiciones de cultivo, una concentración de aproximadamente 2 a 120 g/L es en general aplicable. Se prefiere una concentración de 4 a 100 g/L.

60 La vitamina C producida y acumulada de este modo en el medio o mezcla de reacción se puede separar y purificar por cualquier método convencional conocido en sí que utilice adecuadamente la propiedad del producto y se puede separar como el ácido libre o como una sal de sodio, potasio, calcio, amonio o similar.

65 Específicamente, la separación se puede realizar mediante cualquier combinación o repetición adecuada de los pasos siguientes: por formación de una sal, utilizando las diferencias en las propiedades entre el producto y las impurezas que lo rodean, como solubilidad, absorbabilidad y coeficiente de distribución entre los solventes, por absorción, por ejemplo sobre resina de intercambio iónico. Cualquiera de estos procedimientos solo o combinado constituye un medio conveniente para aislar el producto. El producto obtenido de este modo se puede purificar posteriormente de manera convencional, p. ej. por recristalización o cromatografía.

## ES 2 278 181 T3

La identificación de la vitamina C obtenida por el método de esta invención se puede realizar mediante, por ejemplo, análisis elemental así como por medición de las propiedades fisicoquímicas como el espectro de absorción infrarroja, el espectro de masa, RMN y similares.

- 5 De acuerdo con la presente invención, la mejora en términos de la reducción del número de pasos es muy significativa porque conduce a una vía de un paso dirigida a la producción de la vitamina C a partir de cualquiera de los sustratos D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa.

En los ejemplos siguientes, el proceso de la presente invención se ilustrará en más detalle.

10

### Ejemplo 1

#### *Conversión de D-sorbitol en vitamina C*

- 15 Una ansada de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) crecido en el medio de agar que contenía un 5,0% de D-manitol, 0,25% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,75% de agua de macerado del maíz, 5,0% de levadura de panadería, 0,5% de urea, 0,5% de  $\text{CaCO}_3$  y 2,0% de agar, que se cultivó a 27°C durante 4 días, se inoculó en 5 ml de medio de cultivo de siembra que contenía 8,0% de D-sorbitol, 5,0% de levadura de panadería, 0,05% de glicerol, 0,25% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,75% de agua de macerado del maíz, 0,5% de urea, 1,5% de  $\text{CaCO}_3$  y una gota de antiespumante en tubo de ensayo  
20 y luego se cultivó a 30°C con 240 rpm durante 20 h en un agitador recíproco.

- 3 ml del cultivo de siembra se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 50 ml del medio de producción que contenía 8,0% de D-sorbitol, 5,0% de levadura de panadería, 0,05% de glicerol, 0,25% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0% de agua de macerado del maíz, 1,5% de  $\text{CaCO}_3$  y 0,15% de antiespumante. El cultivo se llevó a cabo a 30°C  
25 con 180 rpm durante 45 h en un agitador rotatorio. Después, se midió la concentración de vitamina C producida por HPLC a una longitud de onda de 264 nm con el sistema que estaba compuesto por un detector UV (TOSOH UV8000; TOSOH Co., Kyobashi 3-2-4, Chuo-ku, Tokio, Japón), una bomba dual (TOSOH CCPE; TOSOH Co.), un integrador (Shimadzu C-R6A; Shimadzu Co., Kuwahara-cho 1, Nishinokyo, Chukyo-ku, Kioto, Japón) y una columna (YMC-Pack de poliamina II; YMC, Inc., 3233 Burnt Mill Drive Wilimington, NC 28403, USA). Como resultado se  
30 produjeron 118,1 mg/L de vitamina C.

### Ejemplo 2

#### *Conversión de L-sorbosa en vitamina C*

- 35 Una ansada de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) crecido en el medio de agar que contenía 5,0% de D-manitol, 0,25% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,75% de agua de macerado del maíz, 5,0% de levadura de panadería, 0,5% de urea, 0,5% de  $\text{CaCO}_3$  y 2,0% de agar, que se cultivó a 27°C durante 4 días, se inoculó en 5 ml de medio de cultivo de siembra que contenía 8,0% de L-sorbosa, 5,0% de levadura de panadería, 0,05% de glicerol, 0,25% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,75%  
40 de agua de macerado del maíz, 0,5% de urea, 1,5% de  $\text{CaCO}_3$  y una gota de antiespumante en tubo de ensayo, y después se cultivó a 30°C con 240 rpm durante 20 h en un agitador recíproco.

- 3 ml del cultivo de siembra se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía 50 ml del medio de producción que contenía 8,0% de L-sorbosa, 5,0% de levadura de panadería, 0,05% de glicerol, 0,25% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0% de agua de macerado del maíz, 1,5% de  $\text{CaCO}_3$  y 0,15% de antiespumante. El cultivo se llevó a cabo a 30°C con  
45 180 rpm durante 20 h en un agitador rotatorio. Como resultado se produjeron 407,1 mg/L de vitamina C.

### Ejemplo 3

- 50 *Producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona y L-gulosa con sistema de células en reposo*

- Se cultivó *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) en el medio de agar que consistía en 8,0% de L-sorbosa, 0,25% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,75% de agua de macerado del maíz, 5,0% de levadura de panadería, 0,5% de urea, 0,5% de  $\text{CaCO}_3$  y 2,0% de agar a 27°C durante 4 días. Las células de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) crecidas en  
55 el medio anterior se transfirieron a tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0) y se lavaron dos veces con el mismo tampón. La densidad óptica de la suspensión de células a 600 nm fue de 21,9. Contenía 0,057 g de peso húmedo de células por ml.

- La mezcla de reacción (5 ml en tubo de ensayo) contenía la suspensión de células y 8,0% de D-sorbitol, 8,0% de L-sorbosa, 0,5% de L-sorbosona o 1,0% de L-gulosa en tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0). La reacción se inició mediante la inoculación de la suspensión de células y se llevó a cabo a 30°C y con 180 rpm en un agitador recíproco. El contenido de vitamina C se midió a los tiempos de reacción correspondientes a 4, 20 y 24 h con HPLC. La Tabla 1 muestra la cantidad de vitamina C producida a partir de cada sustrato por *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812).  
65

# ES 2 278 181 T3

TABLA 1

*Producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa*

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Sustrato	Vitamina C producida [mg/L]		
	4 h	20 h	24 h
8,0 % D-Sorbitol	0,0	62,3	90,3
8,0 % L-Sorbosa	636,1	908,0	874,3
0,5 % L-Sorbosona	1.365,0	1.117,0	1.044,0
1,0 % L-Gulosa	488,8	1.355,0	1.673,0
Ninguno	0,0	0,0	0,0

**REIVINDICACIONES**

5 1. Un proceso para la producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa que comprende los pasos de:

10 (a) cultivo de un microorganismo en un medio nutriente acuoso que contiene D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. Oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos, y

(b) aislamiento y purificación de la vitamina C producida mediante microorganismos directamente a partir del medio de fermentación.

15 2. Un proceso para la producción de vitamina C a partir de D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa donde un microorganismo se cultiva en un medio nutriente acuoso que contiene D-sorbitol, L-sorbosa, L-sorbosona o L-gulosa y la vitamina C producida mediante microorganismos se aísla directamente del caldo de fermentación y se purifica por los métodos convencionales, donde dicho microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812), un microorganismo perteneciente al género *Gluconobacter* y con características identificativas de *G. oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812) y mutantes de éstos.

20 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 donde el microorganismo es *Gluconobacter oxydans* DSM 4025 (FERM BP-3812).

25 4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la vitamina C se produce a partir de L-gulosa.

30 5. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso se lleva a cabo a un pH en el rango de aproximadamente 4,0 a 9,0 y en un rango de temperaturas entre aproximadamente 13°C y 36°C durante 1 a 5 días.

35 6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso se lleva a cabo a un pH en el rango de aproximadamente 5,0 a 8,0 y a un rango de temperaturas entre aproximadamente 18° y 33°C durante 1 a 3 días.

35

40

45

50

55

60

65